

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Determinación del potencial insecticida y  
repelente de mezclas de constituyentes  
químicos bioactivos presentes en aceites  
esenciales para el control de *Tribolium  
castaneum***

**Luis Fernando Perdomo Cedeño**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de ciencias, Departamento de química  
Bogotá, Colombia  
2020



**Determinación del potencial insecticida y repelente de  
mezclas de constituyentes químicos bioactivos  
presentes en aceites esenciales para el control de  
*Tribolium castaneum***

**Luis Fernando Perdomo Cedeño**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en ciencias: Química**

Director (a):

Ph.D. Luis Enrique Cuca Suárez  
Profesor Emérito Universidad Nacional de Colombia

Codirector (a):

Ph.D. Juliet Angélica Prieto Rodríguez  
Profesora asociada Pontificia Universidad Javeriana

Línea de Investigación:

Bioprospección en agentes fitosanitarios

Grupo de Investigación:

Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de ciencias, Departamento de química  
Bogotá, Colombia

2020



*A Dios y mi familia, a quienes les debo mi existencia, mis logros y el aprender a superar las derrotas.*

*No es la fuerza, sino la perseverancia de los altos sentimientos la que hace hombres superiores.*

*Nietzsche*



## Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por brindarme el conocimiento científico y el espíritu crítico para el desarrollo de mi proceso formativo.

A la pontificia Universidad Javeriana por su gran disposición en los convenios interinstitucionales, los cuales son de vital importancia para el desarrollo investigativo.

A Colciencias por la financiación con recursos del Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas a través del proyecto con contrato 382-2016 y código 120371250800.

Al grupo de investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) de la Universidad Nacional de Colombia por el tiempo compartido, el apoyo brindado y los conocimientos compartidos.

A mi director el profesor Luis Enrique Cuca Suárez, quien me abrió las puertas de su grupo de investigación y me enseñó la riqueza de los productos naturales.

A mi codirectora la profesora Juliet Angélica Prieto Rodríguez, por su tiempo y buena disposición para guiar este proyecto de investigación.

A los profesores del grupo de investigación QuiProNaB por su aporte invaluable en mi formación académica, en especial al profesor Oscar Javier Patiño, por incentivar mi interés por otras ramas de la investigación. A la profesora Mónica Constanza Ávila por su buena disposición y apoyo a los integrantes de nuestro grupo.

A mi amiga y compañera Erika Andrea Plazas González, a quien nunca terminaré de agradecer su tiempo, lealtad, paciencia, amor y conocimientos compartidos durante mi proceso académico, sin su apoyo no habría sido posible este logro.

A mis compañeros y amigos del proyecto de investigación Daniela, Leidy, Jenifer, Jasmín, Stephanie y Jeisson, en quienes siempre encontré el apoyo en diferentes momentos de mi proceso investigativo.

A mis padres Margery y Carmelo por ser mi ejemplo, mi apoyo y mi guía en todos los proyectos que he decidido emprender a lo largo de mi vida.

A mi hermana Catalina, mi mayor referente de lealtad y honestidad, de quien intento aprender cada día.

A mis grandes amigos Maria P, Camila, Lipza, Tatiana, Laura C, Estefany, Adriana, Laura M, Ana M, Danny, Natalia, Claudia, Gonzalo, Mauricio, Nicolas, Carlos y Diego, de quienes nunca faltó su voz de aliento en este proceso.



## Resumen

*Tribolium castaneum* es un insecto cosmopolita considerado una de las plagas de almacén más agresivas debido a que causa de considerables pérdidas en diferentes granos almacenados. Teniendo en cuenta que varios de estos alimentos han sido catalogados como indispensable para garantizar la seguridad alimentaria a nivel mundial, se hace necesario el control eficiente de este insecto plaga. Actualmente este control se realiza principalmente con insecticidas sintéticos, los cuales han presentado impactos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente; además del surgimiento de generaciones de insectos resistentes. En la búsqueda de nuevas alternativas de control que puedan ser inocuas y eficaces, los productos naturales han jugado un papel crucial en las últimas décadas. Particularmente, los aceites esenciales (AEs) poseen el mayor número de reportes de actividad insecticida sobre diferentes plagas de almacén. Sin embargo, debido a que los AEs son mezclas complejas de diferentes compuestos volátiles se hace difícil presumir que compuestos podrían ser los responsables de la actividad. Por esta razón, en el presente estudio se planteó evaluar la actividad insecticida de compuestos volátiles puros comúnmente encontrados en AEs, a fin de establecer su posible relación con la actividad sobre *T. castaneum*. Para este fin, se seleccionaron 49 compuestos mayoritarios y más frecuentes en AEs promisorios identificados en estudios previos realizados en los grupos de investigación en Química de Productos Naturales Bioactivos (QuiProNaB) y el grupo de investigación en Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ); así como otros reportados en la literatura. Inicialmente se realizó un tamizaje por modo de acción fumigante de los 49 compuestos, con lo que se encontró que 25 de estos exhibieron alto potencial insecticida frente al gorgojo. A los compuestos promisorios se les evaluó la actividad insecticida por cuatro modos de acción: fumigante, tóxica por contacto, repelente y disuasión alimentaria; para las dos primeras se determinaron las concentraciones y dosis medias respectivamente (CL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>). Dentro de los resultados obtenidos se encontró que por el modo de acción fumigante los enantiómeros *R* y *S* de la pulegona presentaron el mayor potencial insecticida con CL<sub>50</sub> menores a 3 ppm. Mientras que en la toxicidad por contacto la *S*-(+)-carvona presentó una actividad comparable al control positivo con una

DL<sub>50</sub> de 4,17 µg/insecto. Asimismo, para los compuestos promisorios se establecieron las clases de repelencia (0 y V) y los índices de disuasión alimentaria; estos resultados mostraron que los compuestos evaluados presentaron un menor potencial de actividad por estos modos de acción en comparación con la actividad fumigante y tóxica por contacto.

Adicionalmente, a partir de los resultados obtenidos en la fase anterior se seleccionaron los compuestos con el mayor potencial insecticida para diseñar mezclas binarias en busca de obtener un efecto sinergista para el control del insecto. Para ello, se empleó un modelo estadístico de índices de combinación para diseñar combinaciones con posible actividad fumigante y tóxica por contacto. Las mezclas binarias fueron preparadas y se evaluó la actividad frente al insecto. De allí encontramos, que de las 15 mezclas fumigantes diseñadas a partir del modelo estadístico 8 mostraron algún tipo de sinergismo, siendo las más promisorias aquellas que se obtuvieron a partir de compuestos con baja o moderada actividad individual. Por ejemplo, la combinación de 4-undecanona y *p*-cimero mostró los mejores resultados de sinergismo con un índice de combinación (IC) de 0,39. Por otro lado, en el caso de las mezclas tóxicas por contacto no se lograron obtener en los ensayos *in vitro* los resultados de sinergismo predichos por el modelo matemático. Finalmente, a las mezclas con el mayor potencial insecticida se les realizó un estudio de estabilidad preliminar evaluando algunas de sus propiedades fisicoquímicas; así como la actividad biológica a diferentes tiempos. Los resultados de este estudio permiten sugerir algunos compuestos y combinaciones que podrían ser utilizadas en la formulación de insecticidas de origen botánico.

**Palabras clave:** terpenos, fenilpropanoides, actividad insecticida, repelente, índice de combinación, sinergismo, estabilidad preliminar.

## Abstract

*Tribolium castaneum* is a cosmopolitan insect considered one of the most aggressive warehouse pests because it causes considerable losses in different stored grains. Considering that several of these foods have been classified as essential to guarantee food security worldwide, efficient control of this pest insect is necessary. Currently, this control is carried out mainly with synthetic insecticides, which have had negative impacts on human health and the environment; in addition to the emergence of generations of resistant insects. In the search for new safe and effective control alternatives, natural products have played a crucial role in the last decades. Particularly, essential oils (AEs) have the highest number of reports of insecticidal activity on different warehouse pests. However, because AEs are complex mixtures of different volatile compounds, it is difficult to assume which compounds could be responsible for the activity. For this reason, in this study it was proposed to evaluate the insecticidal activity of pure volatile compounds commonly found in AEs, in order to establish its possible relationship with the activity on *T. castaneum*. For this purpose, 49 major and most frequent compounds in promising AEs identified in previous studies carried out in the research groups in Chemistry of Bioactive Natural Products (QuiProNaB) and the research group in Phytochemistry at the Javeriana University (GIFUJ) were selected; as well as others reported in the literature. Initially, a screening by fumigant mode of action of the 49 compounds was carried out, where it was found that 25 of these, exhibited high insecticidal potential against the weevil. The promising compounds were evaluated for its insecticidal activity by four modes of action: fumigant, toxic by contact, repellent and food deterrence; for the first two, the mean concentrations and doses were determined respectively ( $LC_{50}$ ,  $LD_{50}$ ). Among the results obtained, it was found that due to the fumigant mode of action, the R and S enantiomers of pulegone had the greatest insecticidal potential with  $LC_{50}$  less than 3 ppm. While in contact toxicity, S-(+)-carvone showed an activity comparable to the positive control with an  $LD_{50}$  of 4.17  $\mu\text{g}$  / insect. Likewise, for the promising compounds, the repellency classes

(0 and V) and the food deterrence indices were established; These results showed that the evaluated compounds presented a lower activity potential for these modes of action compared to fumigant and contact toxic activity.

Additionally, from the obtained results in the previous phase, the compounds with the highest insecticidal potential were selected to design binary mixtures in order to get a synergistic effect for insect control. To accomplish this, a statistical model of combination indices was used to design combinations with possible toxic activity fumigant and contact. The binary mixtures were prepared and the activity against the insect was evaluated. It was found that 8 from 15 fumigant mixtures designed from the statistical model, showed some type of synergism, the most promising was obtained from compounds with low or moderate individual activity. For example, the combination of 4-undecanone and *p*-cimero showed the best synergistic results with a combination index (CI) of 0.39. On the other hand, in the case of toxic contact mixtures, the synergism results predicted by the mathematical model were not obtained in *in vitro* tests. Finally, the mixtures with the highest insecticidal potential underwent a preliminary stability study evaluating some of their physicochemical properties; as well as biological activity at different times. The results of this study allow us to suggest some compounds and combinations that could be used in the formulation of insecticides of botanical origin.

**Keywords:** terpenes, phenylpropanoids, insecticidal activity, repellent, combination index, synergism, preliminary stability.

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	IX
Lista de figuras.....	XV
Lista de tablas .....	XVI
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVII
Introducción .....	1
<b>1. Estado actual del tema.....</b>	<b>4</b>
1.1. Seguridad Alimentaria: Un Reto Global.....	4
1.2. Generalidades de los Cereales .....	5
1.2.1. Producción de cereales .....	7
1.2.2. Pérdidas en cereales .....	8
1.2.3. Daños producidos por plagas en granos almacenados .....	8
1.3. <i>Tribolium castaneum</i> .....	9
1.3.1. Métodos de control de <i>Tribolium castaneum</i> .....	11
1.4. Productos naturales vegetales como agentes fitosanitarios .....	14
1.4.1. Neem.....	14
1.4.2. Piretroides .....	15
1.5. Perspectivas de aceites esenciales para el control de <i>Tribolium castaneum</i> .....	16
1.5.1. Generalidades de aceites esenciales .....	16
1.5.2. Aplicación de aceites esenciales como insecticidas .....	18
1.6. Diseño de mezclas insecticidas .....	29
1.6.1. Modelos de mezclas.....	30
<b>2. Metodología .....</b>	<b>37</b>
2.1. Fase I: Determinación de la actividad fumigante de compuestos presentes en aceites esenciales promisorios. ....	37
2.1.1. Cría de insectos: .....	37
2.1.2. Selección de compuestos presentes en aceites esenciales bioactivos: .....	38
2.1.3. Obtención de compuestos .....	39
2.1.4. Determinación de la actividad fumigante .....	39
1.1.4.1. Determinación de las concentraciones letales frente a la actividad fumigante	40
2.2. Fase II: Determinación de la actividad tóxica por contacto, repelente y antialimentaria .....	43
2.2.1. Determinación de la toxicidad tóxica por contacto .....	43

2.2.2. Ensayo de actividad repelente.....	44
2.2.3. Actividad antialimentaria.....	45
2.3. FASE III: Diseño, evaluación y estabilidad preliminar de mezclas de constituyentes de aceites esenciales.....	46
2.3.1. Diseño de mezclas a partir de los compuestos con mejores resultados .....	46
2.3.3. Análisis de sinergismo de la actividad insecticida de las mezclas.....	47
2.3.4. Caracterización fisicoquímica y de actividad insecticida de las mejores mezclas.....	48
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>51</b>
3.1. Fase I: Determinación de la actividad fumigante .....	51
3.1.1 Tamizaje de actividad fumigante .....	51
3.1.2. Determinación de las concentraciones letales de los compuestos activos del tamizaje .....	52
3.2. Fase II: Determinación de la actividad tóxica por contacto, repelente y antialimentaria .....	62
3.2.1. Toxicidad tóxica por contacto de los compuestos con potencial fumigante ....	62
3.2.2. Actividad repelente de los compuestos con potencial fumigante .....	65
3.2.3. Actividad antialimentaria de los compuestos con potencial fumigante .....	71
3.2.4. Compuestos que presentaron alto potencial insecticida frente a <i>T. castaneum</i> en los cuatro modos de acción evaluados.....	73
3.3. Fase III: Diseño, evaluación y estabilidad preliminar de mezclas de compuestos con potencial insecticida .....	74
3.3.1. Mezclas binarias con acción fumigante y toxicidad por contacto .....	75
3.3.2. Diseño y evaluación de mezclas fumigantes .....	75
3.3.3. Diseño y evaluación de mezclas tóxicas por contacto .....	84
3.3.4. Caracterización fisicoquímica, biológica y estabilidad preliminar de las mejores mezclas fumigantes.....	87
<b>4. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>98</b>
Conclusiones .....	98
Recomendaciones .....	101
<b>Anexos .....</b>	<b>103</b>
Anexo A: Perfil cromatográfico CG-EM y espectros APT y <sup>1</sup> H de la purificación del estragol.....	103
ANEXO B. Análisis de varianza de las constantes físicas de las mejores mezclas ....	105
Anexo C. Perfiles cromatográficos CG-EM a los 0 horas y 40 días de las 5 mejores mezclas en las dos condiciones de almacenamiento .....	107
Anexo D: Perfiles cromatográficos CG-FID a los 40 días de las mejores mezclas en las dos condiciones de almacenamiento .....	117
<b>Bibliografía .....</b>	<b>122</b>

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 <i>Tribolium castaneum</i> (adulto, ciclo de vida y glándulas protorácicas).....	10
Figura 1-2 Estructuras de compuestos químicos utilizados sobre <i>T. castaneum</i> .....	13
Figura 1-3 Estructura azaridactina (Kumar, et al.,2016).....	15
Figura 1-4 Estructuras químicas de piretroides. (a):estructura de las Piretrinas I y II; (b):Estructura cipermetrina. ....	15
Figura 2-1 Fotografías de pies de cría de <i>Tribolium castaneum</i> . ....	38
Figura 2-2 Método vial en vial para actividad fumigante. ....	40
Figura 2-3 Método toxicidad tópica por contacto sobre <i>Tribolium castaneum</i> .....	43
Figura 2-4 Método preferencia de áreas con alimento para actividad repelente sobre <i>T. castaneum</i> .....	44
Figura 3-1 Resultados de actividad fumigante sobre <i>T. castaneum</i> para los compuestos evaluados a una concentración de 100 ppm. ....	51
Figura 3-2 Monoterpenos monocíclicos evaluados sobre <i>T. castaneum</i> .....	58
Figura 3-3 Estructuras químicas de monoterpenoides monocíclicos. ....	59
Figura 3-4 Estructuras químicas de monoterpenos y monoterpenoides bicíclicos. ....	60
Figura 3-5 Análisis estructura-actividad de algunos grupos de compuestos del tamizaje por modo de acción fumigante. ....	61
Figura 3-6 Gráfico dosis-respuesta de los compuestos del grupo 2 para fumigante .....	76
Figura 3-7. Isobogramas de las 8 mezclas activas de la predicción del modelo.....	83
Figura 3-8. Gráfico dosis respuesta de los compuestos del grupo 3 para actividad toxica por contacto .....	84
Figura 3-9 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 1 (4-undecanona[1]-p-cimeno[2] 15:85) en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas. ....	91
Figura 3-10 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 2 (1,8-cineol [1]-DL-limoneno[2] 30:70) en las dos condiciones de almacenamiento. ....	91
Figura 3-11 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 3 ((-)-isopulegol[1]-DL-limoneno[2] 10:90) en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas. ....	92
Figura 3-12 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 4 (nonano[1]-DL-limoneno[2] 50:50) en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas. ....	92
Figura 3-13 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 5 (2-decanona[1]-safrol[2] 20:80) en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas. ....	93
Figura 3-14 Seguimiento de los porcentajes de mortalidad de las 5 mejores mezclas en dos condiciones de almacenamiento.....	94
Figura 3-15 Isobograma de la mezcla 5 fumigante en la evaluación tóxica por contacto. ....	95

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1 Reportes de aceites esenciales promisorios sobre <i>T.castaneum</i> .....	20
Tabla 1-2 Aceites esenciales promisorios sobre <i>T. castaneum</i> evaluados por QuiProNaB Y GIFUJ .....	22
Tabla 1-3 Compuestos presentes en AEs evaluados sobre <i>T. castaneum</i> . ....	25
Tabla 1-4 Descripción y símbolos de sinergia o antagonismo en estudios de combinación de compuestos analizados por método de IC.....	35
Tabla 2-1 Clasificación de repelencia. ....	45
Tabla 2-2 Clasificación de disuasión alimentaria. ....	46
Tabla 3-1 Concentraciones letales (CL) de los compuestos promisorios por el modo de acción fumigante sobre <i>Tribolium castaneum</i> .....	53
Tabla 3-2 Dosis letales de los compuestos activos del tamizaje sobre <i>Tribolium castaneum</i> .....	63
Tabla 3-3 Porcentajes y clases de repelencia de los compuestos promisorios del tamizaje sobre <i>T.castaneum</i> .....	67
Tabla 3-4 Índices de disuasión alimentaria de compuestos sobre <i>T. castaneum</i> .....	72
Tabla 3-5 Clasificación de los compuestos por actividad fumigante .....	75
Tabla 3-6 Evaluación por toxicidad fumigante de las mezclas que el modelo predijo .....	76
Tabla 3-7. Índices de combinación (IC), factores de sinergismo y tipos de efecto de las mejores mezclas fumigantes. ....	78
Tabla 3-8. Clasificación de compuestos actividad tóxica por contacto.....	85
Tabla 3-9 Evaluación toxica por contacto de mezclas binarias que el modelo predijo en una sola proporción.....	85
Tabla 3-10. Evaluación toxica por contacto de las proporciones adicionales de las mezclas binarias que el modelo predijo .....	86
Tabla 3-11 caracterización y seguimiento de las constantes físicas: densidad e índice de refracción. ....	88
Tabla 3-12 Diferencias significativas de las mejores mezclas fumigantes de acuerdo con la condición de almacenamiento. ....	89
Tabla 3-13 Porcentajes de mortalidad de la evaluación tóxica por contacto de las mejores mezclas fumigantes.....	95
Tabla 3-14 Porcentajes y clases de repelencia de las mejores mezclas fumigantes. ....	96



## Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
AEs	Aceites esenciales
EM	Espectrometría de masas
HR	Humedad relativa
IDA	Índice de disuasión alimentaria
$\mu\text{L}$	Microlitros
m/Z	Relación masa carga
RMN	Resonancia magnética nuclear
CA	Adición de concentración
CAEs	Compuestos de aceites esenciales
CL <sub>30</sub>	Concentración letal para el 30% de la población.
CL <sub>50</sub>	Concentración letal para el 50% de la población.
CL <sub>90</sub>	Concentración letal para el 90% de la población.
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
CG-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización en llama.
CCD	cromatografía en capa delgada
$\rho$	Densidad
DE	Desviación estándar.
DL <sub>30</sub>	Dosis letal para el 30% de la población.
DL <sub>50</sub>	Dosis letal para el 50% de la población.
DL <sub>90</sub>	Dosis letal para el 90% de la población.
eV	Electrón voltios.
°C	Grados celcius
IE	Impacto electrónico
IC	Índice de combinación.
$\eta^T_D$	Índice de refracción
®	marca registrada
m	Masa
$\mu\text{M}$	Micromolar

nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
PR	Porcentaje de repelencia
<sup>1</sup> H	Protón (hidrogeno)
APT	prueba protones adjunta
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
v	Volumen

# Introducción

El aumento exponencial de la población mundial en los últimos años y los efectos del cambio climático han causado repercusiones en la seguridad alimentaria. Por esto, la producción y almacenamiento de productos de consumo humano que sean asequibles económicamente, de fácil conservación y transporte, es uno de los mayores retos de la sociedad actual (Prosekov, et al., 2018). De esta manera, los cereales han tomado un papel protagónico en la alimentación mundial, ya que cumplen con las características mencionadas anteriormente (Robert, et al., 2016).

La organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) en su último reporte informó una disminución en las existencias de cereales respecto a su producción y utilización. Adicionalmente, la FAO señala que la producción tendrá los mayores requerimientos para el 2030 (FAO, 2019). Así, a fin de garantizar la demanda y las existencias de productos de molienda es indispensable controlar las pérdidas en la cadena productiva (Saddique, et al., 2020). Los cereales presentan altas pérdidas en diferentes etapas de producción. Por ejemplo, en precosecha los cultivos son afectados por microorganismos y plagas que afectan la planta, durante la cosecha pueden sufrir daños por la maquinaria empleada para su recolección o pérdida del grano por vientos y lluvias (Garza, 2009). Sin embargo, las mayores pérdidas se presentan en periodos poscosecha donde el grano molido y almacenado es afectado principalmente por microorganismos, roedores, e insectos; siendo estos últimos los que generan mayores efectos con desperdicios superiores al 20% del producto almacenado. Entre las principales plagas de granos almacenados se encuentra *Tribolium castaneum* (Antunes, et al., 2013), que es considerado una de las plagas más agresivas en cereales, particularmente en el trigo, por el impacto económico y su densidad poblacional (Navas, 2012).

Para el control de *Tribolium castaneum* se emplean diferentes tipos de métodos físicos, biológicos, etológicos, y químicos; siendo el método químico el más utilizado con aplicación

de sustancias de origen sintético como organofosforados, organoclorados, piretroides, entre otros (Antunes, et al., 2013; Ponce, et al., 2006); (Martínez, 2009). El problema de estos plaguicidas sintéticos es que son considerados contaminantes orgánicos persistentes (COP) puesto que su degradación es lenta lo que ocasiona acumulación en el medio ambiente. Esta persistencia conlleva a la toxicidad sobre diferentes organismos vivos como abejas, anfibios, aves y mamíferos (Syed, et al., 2018). También producen afectación irreversible de suelos y cuerpos de agua (Puerto, et al., 2014). Además, su uso indiscriminado causa diferentes tipos modificaciones biológicas, ya sea en su morfología, su comportamiento, el sitio activo o metabólicas, las cuales producen nuevas generaciones resistentes a dichas sustancias (Muñoz, et al., 2014). Debido a estos efectos secundarios y no deseados algunos de estos compuestos como fosfinas, lindano, aldrin, endosulfan, y bromuro de metilo estén prohibidos tanto en Colombia como en otros países (Minagricultura, 2020).

Por lo anterior, se hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas de control de *T. castaneum*. En este contexto, los productos naturales (PNs), que han sido empleados por el hombre desde tiempos inmemoriales para controlar infestaciones por insectos, representan una de las fuentes más promisorias de agentes insecticidas. Particularmente, los compuestos volátiles de las plantas presentes en los aceites esenciales han mostrado el mayor potencial insecticida, debido al rol ecológico que cumplen estos metabolitos en la protección frente a diferentes depredadores (Ainane, et al., 2019).

Los AEs hacen parte de los llamados insecticidas de origen botánico o bioracionales, presentan ventajas como su alta especificidad sobre plagas objetivo, baja toxicidad en humanos y animales, menor persistencia en el medio ambiente, y al no ser sistémicos sus modos y mecanismos de acción reduce las posibilidades de generar resistencia (Nava, et al., 2012; Ebadollahi & J. Jalali, 2015; Belles, 1988). El alto potencial insecticida de los AEs se ha relacionado con su composición química, principalmente con la presencia de terpenos, fenilpropanoides y en menor proporción aldehídos, cetonas, alcanos, compuestos nitrogenados y azufrados (Pino, 2015). Los cuales son sintetizados por las plantas en su proceso de coevolución como mecanismo de defensa para sus depredadores naturales e incluso comunicación (Taiz & Zeiger, 2007). Muchos AEs han sido evaluados sobre plagas de insectos obteniendo buenos resultados, por ejemplo, en coleópteros como *Tribolium* y *Sitophilus* ciertos aceites han mostrado ser muy activos (Olivero, et al, 2009).

Por lo anterior, después de algunos trabajos desarrollados dentro del grupo de investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) de la Universidad Nacional de Colombia, en convenio con el Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ), desde el año 2008 hasta el momento, se han venido adelantando estudios sobre este tipo de metabolitos como posibles agentes fitosanitarios para el control de diferentes plagas de almacén. Estudios como el realizado entre el 2008 y 2012 en QuiProNaB comprendió la evaluación de la actividad insecticida, repelente, e inhibitoria de la reproducción sobre *S. zeamais*, *S. oryzae* y *T. castaneum* de los metabolitos fijos y volátiles de algunas especies de las familias Lauraceae, Rutaceae y Myristicaceae (Prieto, 2012). Así como el estudio más reciente en el cual realizó un tamizaje de 45 aceites esenciales, de los cuales 23 mostraron ser promisorios obteniendo  $CL_{50}$  entre 16,23 y 264,59  $\mu\text{L/L}$  aire (Oviedo, 2019).

Sin embargo, los AEs presenta algunas desventajas como sus bajos rendimientos y variabilidad en su composición, lo que dificulta un escalamiento e incluso determinar que compuesto o compuestos presentes en el aceite podrían tener la actividad sobre el insecto. Teniendo en cuenta la variabilidad en los resultados de los análisis cromatográficos de los AEs promisorios evaluados por los grupos de investigación, además de otros AEs reportados en la literatura, al no encontrarse una relación entre la composición y la actividad en estos AEs, se decidió seleccionar algunos compuestos mayoritarios y/o más frecuentes en AEs promisorios, para determinar la actividad por diferentes modos de acción sobre *T. castaneum*. Para posteriormente, a partir de los compuestos con mayor actividad frente al insecto diseñar y evaluar mezclas binarias de estos compuestos a fin de aumentar el potencial insecticida de estos. Estas combinaciones con algún tipo de efecto sobre la plaga nos permiten contar con las ventajas de las mezclas volátiles, además de estimar un posible efecto sinérgico que no solo mejore la actividad, sino que mejore la efectividad y otros factores como flexibilidad en la aplicación (EPPO ,2012).

Por lo anterior, este estudio presenta la evaluación de 49 compuestos presentes en AEs promisorios, a los cuales se les determinó su actividad fumigante, luego aquellos compuestos con mejores resultados del modelo fumigante se les determinó su actividad tóxica por contacto, repelente y antialimentaria. Finalmente, a partir de los resultados de los compuestos con mayor potencial individual se seleccionaron para diseñar y evaluar mezclas binarias, de las cuales aquellas mezclas con mayores sinergismos fueron seleccionadas para un estudio de caracterización fisicoquímica y estabilidad preliminar.

# 1.Estado actual del tema

## 1.1. Seguridad Alimentaria: Un Reto Global

Un objetivo común de gobiernos y organizaciones no gubernamentales ha sido la reducción de la pobreza y la inseguridad alimentaria, esto debido al panorama de escasez, contaminación, la inequitativa distribución de recursos, variación de precios, etc; que se presenta en gran parte de la población (Friedrich, 2014). A pesar de que los niveles de hambre se han reducido a nivel mundial con respecto al aumento de la población, garantizar los pilares de la seguridad alimentaria (disponibilidad de alimentos, acceso económico, utilización apropiada y sana, y la garantía de estos durante todo el tiempo) es un tema complejo pues mientras disminuye el hambre, aumenta el nivel de subalimentación (disposición de alimentos que no cuentan con los nutrientes necesarios) (FAO, 2019). Diferentes estudios han identificado algunas dificultades a nivel global para garantizar la seguridad alimentaria, se destacan algunas como: la incapacidad de abordar las dinámicas a escala cruzada; desequilibrios de poder y bajas capacidades institucionales; y valores e interpretaciones conflictivas de la "seguridad alimentaria" (Moragues-Faus, et al., 2017). Para mitigar esta situación, se han creado programas para la reducción de hambre como la gobernanza global de la UE-FAO, e incluso el enfoque de algunos mecanismos intergubernamentales como la comunidad de estados Latinoamericanos y caribeños (CELAC) para garantizar la seguridad alimentaria y la erradicación del hambre para el año 2025 (Kepple, et al., 2017).

Por lo anterior, uno de los retos agroecológicos para la producción sostenible de alimentos centra su atención en aquellos productos de cosechas rápidas, alto contenido nutricional, accesibles económicamente y de fácil almacenamiento y distribución, ejemplo de estos son los cereales, cuya producción anual es una de las mayores en el sector alimenticio (Altieri & Nicholls, 2010). Estos encajan en uno de los principales retos de la seguridad alimentaria por ser alimentos básicos fácilmente cultivables en diferentes pisos térmicos, y se propone que todos los países puedan ser pequeños productores, mejorando incluso otras problemáticas como las importaciones de este tipo de alimentos. En la búsqueda de asegurar las cosechas de estos cereales, se han desarrollado diferentes estudios genéticos con el fin de garantizar que estos granos no sean afectados durante los periodos precosecha, estas modificaciones genéticas a sus frutos han permitido asegurar que diferentes factores bióticos y abióticos no los afecten hasta su recolección. Sin embargo, estas modificaciones no mitigan las pérdidas postcosecha para este tipo de alimentos (Ferro, et al; 2009).

## **1.2. Generalidades de los Cereales**

El cultivo de cereales se remonta a las primeras civilizaciones como la egipcia, ya que además de ser un producto de alimento está reportado por su impacto cultural y religioso en los muchos pueblos. Este tipo de cultivos fueron bastante cosechados por su importante valor energético, ya que cuenta con un porcentaje bajo de agua, lo que permite la mayor concentración de nutrientes y la posibilidad de almacenarlos por largo tiempo (Rodríguez, et al., 2008). El principal uso de los cereales es para consumo humano ya sea en grano entero o como producto de molienda, aunque también se cosechan para alimentación de ganado y otros animales para construcción e incluso algunos para producción de biocombustibles (UNAM, 2018).

Se conoce a los cereales como frutos sanos, enteros y secos, pertenecientes a la familia de las gramíneas, aunque dentro de estos se encuentran especies como el trigo sarraceno que hace parte de la familia poligonáceas. Este tipo de cultivos los conforman plantas angiospermas monocotiledóneas, su inflorescencia es una pequeña espiga, los ejemplares de consumo humano tienen alturas aproximadas de 30 cm hasta 300 cm de acuerdo con el tipo de cereal, su tallo es variable, en algunos casos delgado y en otros grueso como el caso de sorgo, maíz y mijo perlado (Rodríguez, et al., 2008). Estos cereales pueden cultivarse en climas muy variados, por ejemplo, el sorgo y el mijo se desarrollan en climas

semiáridos, el centeno y la cebada en climas fríos y otros como el arroz bajo el agua. A través de los años estos cultivos se han ido adaptando a diferentes condiciones climáticas, lo cual tiene que ver mucho en su desempeño durante cosecha. El grano de cualquier cereal se le denomina cariósipide, una estructura protegida por glumas que son una especie de cascarilla, estas glumas en especies como el arroz, la cebada, trigo y avena están fusionadas al grano por tanto se separa hasta procesos de trilla (Rodríguez, et al., 2008).

Entre los cereales más representativos a nivel global y que además son protagonistas en el proceso de garantizar la seguridad alimentaria se encuentran: el arroz, el maíz, el trigo y la cebada (Godfray, et al., 2010). La oferta y la demanda de estos alimentos ha aumentado considerablemente las últimas décadas, esto debido a ventajas como el contenido de nutrientes y su alto aporte energético (Yu, et al., 2019). En gran parte estos cereales se distribuyen como productos de molienda (harinas) para consumo humano, entre estos e destaca el trigo, el tercero más producido, y cuyo valor nutricional es mayor que otros cereales como el maíz y el arroz, además su importancia económica en muchos países (Peña, et al, 2007). A nivel nacional juega un papel importante ya que la agricultura es uno de los principales pilares económicos, gracias a la disponibilidad del suelo, pisos térmicos y condiciones agroecológicas para cualquier tipo de cultivo (El Tiempo, 2018).

Entre los cereales con mayor producción global se encuentra el trigo, su nombre científico es *Genus Triticum*, es una planta perteneciente a la familia de las *Gramíneas* de cosecha anual, posee espigas de donde sale el fruto que se seca para molienda y se convierte en harina. Se cultiva en todo el mundo, principalmente en China, Estados Unidos, Canadá, América latina y Europa. Se cosecha en climas subtropicales ligeramente cálidos y fríos (Garza, 2009).

El embrión es aproximadamente el 3,5% del peso del grano mientras el endospermo es el 85% aproximadamente. El embrión o germen es rico en proteínas, azúcares simples, lípidos y vitaminas como la E y la B. Tanto el interior celular del endospermo como la masa de las paredes es lo que posterior al proceso de molienda se convertirá en harina, dichas estructuras son ricas en almidón, el cual es un componente principal de los cereales, de esta manera la calidad de la harina dependerá de la cantidad de proteína presente en las células del endospermo (Rodríguez, et al., 2008).



Dentro de sus características de los cereales se encuentra su alto valor nutricional, para el caso del trigo, un germen aporta por cada 100 g 360 Kcal de energía, 51,8 g de carbohidratos, 23,15 g de proteína, 13,2 g de fibra, 9,75 de grasa, no contienen colesterol, y poseen cantidades menores pero necesarias de micronutrientes como: tiamina (1,88 mg), riboflavina (0,499 mg), niacina (6,8 mg), hierro (2,26 mg), sodio (12 mg), zinc (12,29 mg), selenio (79,2 ug), entre otros (USDA, 2018).

### **1.2.1. Producción de cereales**

A nivel mundial se ha presentado un aumento en la producción de cereales como maíz, arroz, sorgo cebada y trigo. En 1961 la producción total de cereales era de 876.874.886 toneladas, de las cuales 222.357.231 toneladas fueron de trigo, el comportamiento de la cantidad cultivada ha sido creciente. Entre los años 2015 y 2019 la producción de cereales superó los 2.700 millones de toneladas y la producción de trigo las 750 mil toneladas alcanzado una cifra de 763.300.579 toneladas para el 2019. Esto es un buen indicador tomando como referencia la estimación de la FAO de más de 3000 millones de toneladas de cereales por año para cumplir con la demanda mundial (FAO, 2020).

Sin embargo, el panorama para Colombia no es el mismo, ya que desde 1970 según reporta la federación nacional de cereales y leguminosas (FENALCE) el comportamiento en la producción del trigo ha sido decreciente, desde 1970 hasta el primer semestre del 2019 la producción no ha superado las 100.000 toneladas por año, dicha disminución ha aumentado desde el año 2010. A pesar de que el consumo aparente en toneladas de este cereal también ha disminuido desde el 2008 que pasó de 1.426.471 toneladas hasta llegar a 851.853 toneladas en el 2018, la producción nacional es insuficiente, lo que ocasionado que desde el año 1950 haya sido necesario aumentar las importaciones de este cereal, para el 2018 la cifra fue de 2.000 toneladas. Este aumento progresivo de importaciones afecta otros factores económicos como el producto interno bruto (PIB), debido a que cada año aumenta el precio por tonelada de este cereal (FENALCE, 2020).

Teniendo en cuenta la producción y las proyecciones en los requerimientos para los próximos años de los cereales, se estima que la producción será suficiente, considerando que se mantengan las existencias y no se presenten pérdidas. Sin embargo, los cereales son productos que en su mayoría se almacenan por determinados periodos de tiempo, en

estos periodos son afectados por diferentes organismos que causan las pérdidas más significativas de toda su cadena productiva.

### **1.2.2. Pérdidas en cereales**

Los cereales presentan pérdidas en diferentes periodos, en precosecha pueden ser afectados por microorganismos, en el trigo por ejemplo algunas royas producidas por especies del género caries-tizón hediondo producida por el hongo *Tilletia caries*, tizón común producida por el hongo *Ustilago*, hongo *Erysiphe graminis*; Además de plagas de animales como *Anguilulina tritici*, chinche de trigo, mosca de la flor del trigo, larvas de *thrips* (Garza, 2009). En periodos de cosecha se presentan pérdidas por destrozamiento del grano por la maquinaria empleada para la colecta, además de la caída de espigas o frutos ocasionados por lluvias y vientos. Estas pérdidas son menores comparadas con las de postcosecha en periodos de almacenamiento (Augsburger, 1992)

Las principales pérdidas de los cereales se presentan en el periodo postcosecha, donde el grano (entero o molido) se encuentra almacenado y es afectado por diferentes organismos como roedores, hongos, bacterias e insectos que causan daños irreversibles sobre el alimento. De los anteriores los insectos son los responsables de los mayores daños (más del 20%), en especial en países tropicales, donde la temperatura auspicia el desarrollo de estos insectos (García, et al., 2007). Los principales impactos sobre los cereales son: disminución en el peso, el poder germinativo, disminución en la calidad de las propiedades organolépticas, y a causa de los cambios resultantes en el calentamiento espontáneo de la actividad de los insectos, favorece el desarrollo de microorganismos como hongos y bacterias. Entre los insectos más comunes en granos almacenados se encuentran algunos como: *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae*, *Prostephanus truncatus*, *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium confusum* y *Tribolium castaneum* (Rodríguez & Herrera, 2003) Entre los anteriores, *T. castaneum*, es uno de los más agresivos, considerado plaga primaria de harinas y secundaria en granos enteros (Antunes, et al., 2013).

### **1.2.3. Daños producidos por plagas en granos almacenados**

En los granos almacenados se presentan una serie de daños causados en su mayoría por insectos, estos daños se relacionan directamente con la calidad y cantidad del producto,

estos daños se clasifican en dos grupos principales, los directos e indirectos: (Viñuela & Adan, 1993)

**a) Daños directos**

Son aquellos daños que se producen cuando el insecto plaga altera el peso del grano, su contenido nutricional o su capacidad germinativa, esta última de acuerdo con la especie de plaga que infeste el cereal almacenado ya sea en grano entero o como producto ya molido (García, et al., 1994).

**b) Daños indirectos**

Estos daños son aún más delicados ya que pueden afectar la viabilidad del producto para consumo humano o animal. Ejemplos de estos son la presencia de exuvios y deyecciones las cuales poseen sustancias como en el caso de *T. castaneum* que deprecian la calidad por la alteración del color y los malos olores. También se presenta calentamiento del producto por la actividad metabólica de los artrópodos que ocasionan un gradiente de temperatura que causa que la humedad se condense en zonas poco cálidas, favoreciendo el desarrollo de hongos patógenos que pueden producir algunas micotoxinas que hacen al producto no apto para consumo. Las plagas de almacén pueden actuar como reservorio de enfermedades ya que son hospederos de ciertos patógenos que causan enfermedades en mamíferos como: nematodos, solitarias, bacterias, etc (Viñuela & Adan, 1993).

### **1.3. *Tribolium castaneum***

Entre las plagas más comunes en granos almacenados se encuentra *Tribolium castaneum*, este coleóptero causa importantes daños directos e indirectos en diferentes productos almacenados como granos enteros y harinas, además de productos amiláceos y semillas oleaginosas (Skourti, et al, 2019). Popularmente es conocido como el gorgojo rojo de la harina por su apariencia color rojo marrón, es un insecto perteneciente al orden Coleóptera de la familia *Tenebrionidae*. Como se muestra en la Figura 1-1, los adultos miden entre 3 y 4 mm de largo, morfológicamente consta de los últimos tres segmentos antenales anchos y bien definidos. Se desarrollan en ambientes húmedos (entre 60% y 80%), con poca presencia de luz a temperaturas aproximadamente entre 25 y 35 °C, entre mayor sea la temperatura sus larvas, huevos y pupas se desarrollarán más rápido. Su ciclo de vida es holometábolo cuya etapa de huevo es de tres días aproximadamente, 16 en estados de larva y 5 días en pupa. Su ciclo de vida completo tarda alrededor de 7 a 12 semanas

(INTAGRI, 2018). Este insecto es propio de países geográficamente ubicados en zonas tropicales y subtropicales. Se le reconoce como una plaga secundaria para granos ya que no es capaz de perforar granos almacenados, pero es considerada plaga primaria en harinas almacenadas o vegetales secos y molidos guardados en silos (Martínez, 2009).

Una característica importante es su habilidad de competitividad y supervivencia a condiciones difíciles, también pueden adaptarse a cambios bruscos de climas. Sus adultos y larvas pueden llegar al canibalismo alimentándose de huevos y ninfas (Ghrahimi, et al, 2018). Su tasa de desarrollo es muy rápida, una hembra puede poner hasta cuatrocientos huevecillos y en condiciones favorables pueden reproducirse entre cuatro y cinco veces al año, causando una densidad poblacional muy alta (Unruh, et al, 1998).

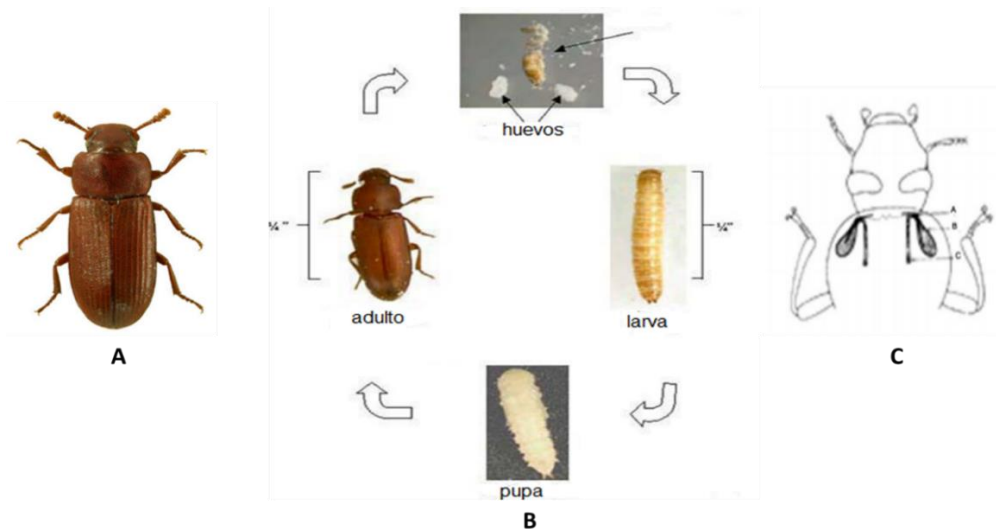


Figura 1-1 *Tribolium castaneum* (adulto, ciclo de vida y glándulas protorácicas)

**A:** *Tribolium castaneum* (INTAGRI, 2018); **B:** Ciclo de vida *Tribolium castaneum* (Baldwin & Fasulo, 2003); **C:** Glándulas protorácicas *T.castaneum* (Villaverde, 2014).

Su impacto económico negativo es bastante alto en este tipo de productos ya que son polífagos, su alta densidad poblacional genera pérdida de calidad en el producto por desprendimiento de quinonas presentes en su exoesqueleto, que no solo afectan el color sino también el olor de la harina (Cervantes, 1999). Las quinonas que expulsan son: metil-1,4-benzoquinona (MBQ) y etil-1,4-benzoquinona (EBQ) (Unruh, et al., 1998); estas benzoquinonas (BQ) son producidas como mecanismo de defensa en condiciones de estrés en el insecto ante la presencia de depredadores, dichas BQ se almacenan en los reservorios glandulares ubicados en la parte posterior de la cabeza, que luego son

expulsadas por medio de las glándulas protorácicas y abdominales (Figura 1-1 c) (Villaverde, 2014). Este tipo de sustancias presentan citotoxicidad aguda, inmunotoxicidad y carcinogénesis; ya que permite que se formen especies reactivas con el oxígeno, por medio de uniones covalentes a macromoléculas o modifican el metabolismo del ion calcio  $Ca^{++}$  estropeando la respuesta inmune que inhibe funciones de células como los macrófagos (Bolton, 2000). Estas BQ pueden afectar al mismo insecto por lo cual son almacenadas exclusivamente en dichas glándulas como hidroquinonas, que son transformadas durante la excreción en BQ por una reacción con  $H_2O_2$  y catalizadas por enzimas peroxidasas. Otras sustancias producidas por el insecto como el 1-pentadeceno sirven como solventes de estas BQ para ser expulsadas (Villaverde, 2014). También deprecian el producto por presencia de exuvios y cadáveres (Cervantes, 1999). Estos insectos pueden causar pérdidas hasta el 30 % del producto neto almacenado por tanto es importante aplicar estrategias que permitan controlarlo (Antunes, et al., 2013).

*Tribolium castaneum* un problema bastante complejo, ya que este insecto no solo está reportado dentro de las 12 plagas más agresivas de almacén junto con *Sitophilus zeamais* Motsch, *Sitophilus oryzae*, *Prostephanus truncatus*, entre otras (INTAGRI, 2018) sino también como la más resistente entre 10 plagas, siendo esta la más agresiva con reporte de resistencia a 34 plaguicidas, entre estos los comerciales sintéticos más empleados como la fosfina, bromuro de metilo, el malatión y cipermetrina (Talukder, 2009).

### **1.3.1. Métodos de control de *Tribolium castaneum***

Se han desarrollado diferentes métodos para el manejo integrado de plagas (MIP), para *Tribolium castaneum* existen métodos directos de control de plagas, entre los cuales se encuentran:

#### **1.3.1.1. Métodos físicos**

Estos se clasifican en medidas mecánicas y físicas, las primeras evitan o dificultan que la plaga o vectores hagan contacto con la planta, las medidas físicas incluyen procesos de desinfección de suelos y sitios de almacenamiento usando calor, radiación, humedad; sin embargo, estas son de gran costo (Sanchez, 2017)

#### **1.3.1.2. Métodos Biológicos**

Este consiste en combatir la plaga con sus enemigos naturales, es decir, organismos vivos que afecten la plaga (Sanchez, 2017). Algunos enemigos de plagas de almacén, entre

estas *Tribolium castaneum* son parasitoides como: *Anisopteromalus calandrae*, *Apanteles taragamae*, *Bassus asper*, *Bracon hebetor*, *Cephalonomia waterstoni*, las cuales atacan al insecto en etapas de huevo o larva generalmente (García, et al., 2009.)

### 1.3.1.3. Control Etológico

En este control se aprovechan la reacción a ciertos comportamientos de los insectos a un estímulo generado por una sustancia química, este tipo de sustancias son entre otras de tipo aleloquímico que producen un efecto en organismos de diferente especie; entre estas encontramos las **Alomonas**, donde la reacción favorece únicamente al organismo emisor, **Kairomonas**, en este caso la reacción beneficia al receptor y **Sinomonas**, interacción donde se benefician los dos organismos (mutualismo) (Cermeri & Diaz, 2019) o feromonas, estas son productos químicos o mezclas de estos que producen una reacción en el comportamiento de organismos que pertenezcan a la misma especie, estas sustancias pueden regular el mensajes de envío o recepción de atracción sexual, agregamientos, alarma, orientación, entre otros (Torres, 1998) Para el caso de *T. castaneum* los machos producen un feromona de agregación denominada 4,8-dimetildecenal (4,8-DMD), dicha molécula atrae ambos sexos y sirve para direccionarlos a lugares de alimentación o reproducción. Actualmente se han sintetizado este tipo de moléculas las cuales se comercializan para el control de especies de del género *Tribolium* (Villaverde, 2014).

### 1.3.1.4. Métodos Químicos

En este caso se usan agrotóxicos para controlar una determinada plaga, estas sustancias aplicadas pueden ser de diferente naturaleza, ya sean: inorgánicos, orgánicos, aceites de petróleo o sustancias químicas orgánicas sintéticas, este control es ventajoso en cuanto a efectividad, sencillez y costos se refiere, sin embargo desventajas como la generación de resistencia a los plaguicidas, efectos colaterales en otras especies y su impacto ambiental negativo, hacen poco viable este método (Rogg, 2000)

Entre los principales controles químicos sobre *T. castaneum* encontramos ciertos grupos toxicológicos como: organofosforados; estas sustancias derivadas del ácido fosfórico (Mena, 2008), fueron desarrollados durante la segunda guerra mundial para una posible guerra química, sin embargo, investigaciones posteriores mostraron su importante actividad insecticida, estos pueden actuar sobre el insecto de manera fumigante, por

contacto o estomacal; Para el control de granos almacenados los organofosforados más comunes son: malatión (Figura 1-2 a), fosfina, diclorvos, diazinón y clorpirifos. Su mecanismo de acción al igual que los carbamatos causa el bloqueo de importantes enzimas del sistema nervioso como las colinesterasas (Ponce, et al., 2006).

Otro grupo importante son los organoclorados, estos poseen átomos de carbono, cloro, hidrogeno, incluso oxígeno en sus moléculas, también poseen anillos cíclicos, heterocíclicos de carbono, se consideran apolares y lipofílicos, lo que los convierte en sustancias con poca reactividad química. Son estables y muy efectivos como insecticidas de amplio espectro y son de bajo costo; sin embargo, su degradación en el medio ambiente es lenta y su carácter lipofílico permite la acumulación de estos residuos en tejidos de mamíferos, lo que desencadena una serie efectos negativos sobre estos (Ponce, et al., 2006).

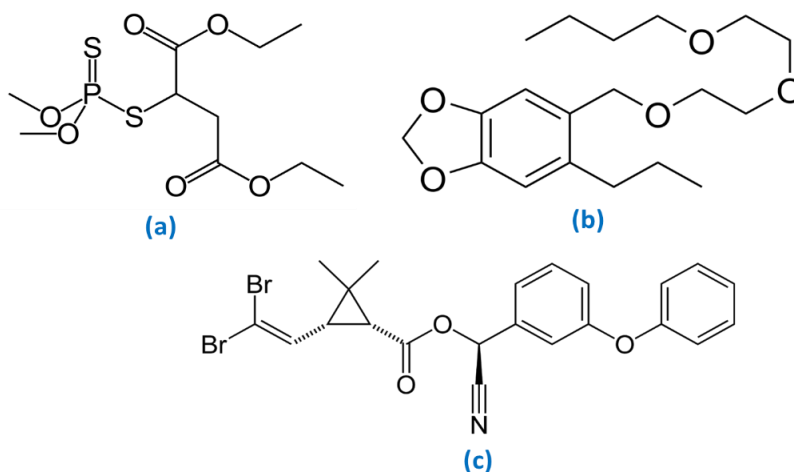


Figura 1-2 Estructuras de compuestos químicos utilizados sobre *T. castaneum*  
 a: Estructura del malatión (Coroflot, 2019), b: Estructura del butóxido de piperonilo (Belles, 1998),  
 c: Estructura Deltametrína (Alamy,2019)

Otros compuestos para el control químico de plagas de granos almacenados son algunos de origen natural, como las referencias comerciales K-Obiol® EC25 y K-Obiol® ULV6, los dos tiene como componente activo un piretroide llamado deltametrína (Figura 1-2 c), el cual posee gran actividad insecticida (BAYER, 2018). en el caso del KObiol® ULV6 está combinado con butóxido de piperonilo (BTO) (Figura 1-2 b), este compuesto presenta una importante actividad sinérgica, ya que por sí solo no genera mayor efecto sobre ninguna plaga, el BTO causa la pérdida de señalización biológica fundamental en el desarrollo neurológico de los insectos (Sacaluga, 2013).

## **1.4. Productos naturales vegetales como agentes fitosanitarios**

El uso descontrolado y excesivo de plaguicidas sintéticos y su prohibición en algunas legislaciones, convirtieron en una tendencia el potencial insecticida de los productos naturales desde los 80's y 90's, tanto así que en el mercado global estos productos conocidos como bioplaguicidas o insecticidas botánicos han alcanzado más de 1000 millones de dólares en los últimos años; con propensión a aumentar (Regnault, 2012).

El resurgimiento de plagas de productos almacenados y sus efectos negativos en este tipo de alimentos ha ocasionado un interés mundial por los bioplaguicidas, en especial en regiones tropicales o donde sean numerosos los cultivos de cereales como Estados Unidos, Egipto, México, entre otros (Moshi & Matoj, 2017) Entre los insecticidas botánicos con mayores aplicaciones en el control de plagas de granos almacenados se encuentra el neem, los piretroides y los aceites esenciales.

### **1.4.1. Neem**

El árbol de neem potencialmente subutilizado en todo el mundo, sus hojas se emplean como alimento de rumiantes en zonas secas, además de tratamientos tradicionales para mordeduras de serpientes e insectos. Su parte aérea posee una gran riqueza química en alcaloides, taninos, aceites, saponinas, flavonoides, esteroides y calcio, sus semillas en ácidos grasos y proteínas. Posee gran variedad de bioactividades como: antimicrobiana, antivirales, antimicóticas, anticancerígenas, antioxidantes, antisépticas e insecticida (Montero, et al.,2012). El efecto insecticida se atribuye por algunos de sus compuestos característicos, azaridactina, meliacin, meliacinol, meliatetraoleno, el primero con mayor potencial insecticida. La azaridactina (Figura 1-3) se encuentran en mayor cantidad en las semillas de frutos inmaduros, y se extraen fácilmente con diferentes solventes orgánicos. Presenta baja toxicidad en vertebrados e insectos benéficos. Su mecanismo de acción involucra la inhibición de la enzima que cataliza la última parte del proceso que transforma a la ecdisona en la hormona 20-dihydroecdysone, dicha inhibición interrumpe los procesos de apareamiento, comunicación sexual, ovoposición, eclosión de huevos, pasos de mudas, fertilidad y síntesis de quitina(Kumar, et al.,2016).



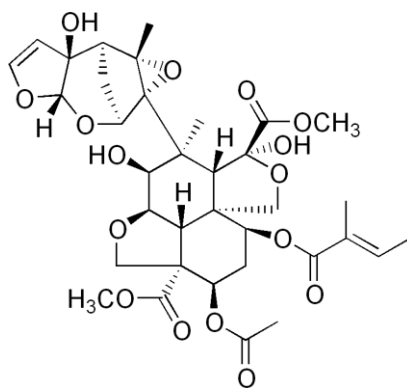


Figura 1-3 Estructura azaridactina (Kumar, et al.,2016).

### 1.4.2. Piretroides

Estos compuestos se desarrollan desde el ácido crisantémico, una sustancia de origen natural que se obtiene esterificado de las flores de *Chrysanthemum*. Tienen características como foto estabilidad, gran potencial insecticida y una rápida degradación en el ambiente (Marcano & Hasegawa, 2002). Estructuralmente posee un anillo ciclopropánico. Su actividad insecticida se le atribuye a los principios activos de las piretrinas I y II (Figura 1-4 a), son más seguro y estables que los plaguicidas sintéticos tradicionales, sin embargo su costo es mayor, por esto se han desarrollado algunos piretroides de segunda generación (sintéticos) los cuales conservan estructuralmente las características del ácido crisantémico, pero con algunos elementos halogenados o grupos  $\alpha$ -ciano en su estructura que aumentan su toxicidad y estabilidad (Mancheno, et al., 2001). Los primeros piretroides de segunda generación en sintetizarse fueron la decametrina, cipermetrina (Figura 1-4 b) y deltametrina. El efecto de este tipo de compuestos sobre diferentes insectos puede ser Knockdown o letal ya que actúa sobre el sistema nervioso central y Periférico (Bradberry, et al.,2005).

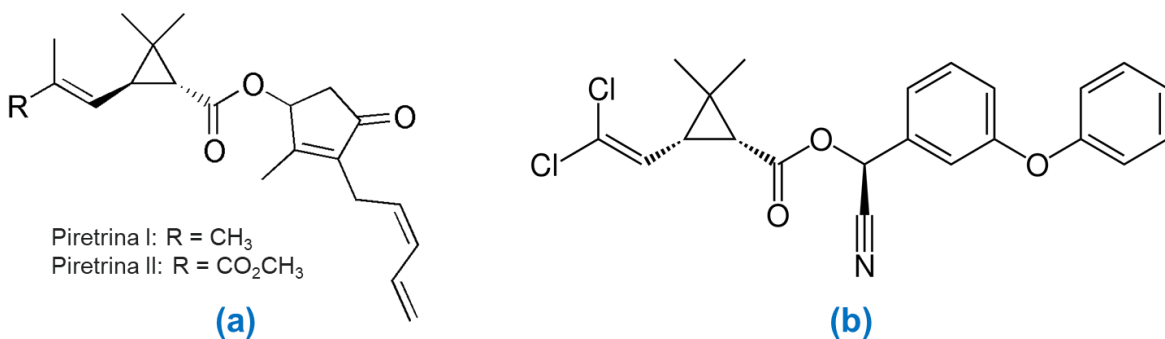


Figura 1-4 Estructura químicas de piretroides. (a):estructura de las Piretrinas I y II; (b):Estructura cipermetrina.

## **1.5. Perspectivas de aceites esenciales para el control de *Tribolium castaneum***

Los aceites esenciales obtenidos desde hace cientos de años, han sido utilizados como fragancias y saborizantes, en estudios recientes se han empleado en aromaterapia, lo que ha incrementado el mercado mundial de estos. Además, se han documentados algunos como repelentes tradicionales de insectos, sin embargo la formulación de insecticidas y repelentes comerciales a partir de aceites esenciales es mínima (Isman, 2016). Actualmente se han convertido en tendencia como agentes fitosanitarios, por los buenos resultados que han venido mostrando diferentes investigadores que han evaluado estos volátiles de un gran número de especies y familias frente a plagas típicas de almacén como: *Sitophilus zeamais*, *S.oryzae*, *Tribolium castaneum*, *T.confusum*, entre otros (Stashenko & Martinez, 2012).

Los compuestos de origen natural han mejorado su demanda, ya que muchos consumidores prefieren productos sanos sin residuos agrícolas perjudiciales para su salud, en esta búsqueda los aceites esenciales han mostrado una buena actividad insecticida frente a diferentes ordenes de insectos entre ellos las plagas de almacén (Descamps, et al., 2004)

### **1.5.1. Generalidades de aceites esenciales**

Los aceites esenciales son mezclas de metabolitos secundarios de las plantas, reciben también el nombre de aceite volátil, aceite etéreo o esencia. Su composición es una mezcla compleja de compuestos con alta presión de vapor cuya estructura y naturaleza química es muy diversa. Sus funciones en la planta son de defensa contra depredadores o enemigos naturales, sobre los cuales presenta mortalidad o repelencia, aunque también se les atribuyen características como atracción de polinizadores (Stashenko & Martinez, 2012) Se caracterizan por ser de olores muy agradables de las diferentes partes de la planta, hojas, tallos, frutos o inflorescencias; se presentan generalmente en mayores proporciones en plantas aromáticas de tipo arbustos o hierbas, aunque en otras también se pueden obtener, en menor cantidad y menos característico su olor, pero se encuentran. Estos se pueden obtener de algunas plantas mediante procesos de arrastre por vapor, hidrodestilación o destilación agua-vapor, aunque se han desarrollado nuevas técnicas a partir de estas para mejorar sus extracciones tales como microondas, ultrasonido y fluidos

supercríticos (Preedy, 2016). El rendimiento y su composición varían de acuerdo con la especie, la familia incluso la ubicación geográfica, quimiotipo, condiciones agroecológicas, tratamiento postcosecha, y método de extracción de la planta. La composición química principal está conformada por: terpenoides, fenilpropanoides, bencenoides y derivados de ácidos grasos y aminoácidos (Pino, 2015). Sus aplicaciones van desde la industria cosmética, aseo, hasta la farmacéutica, de alimentos y agroquímica (Stashenko & Martinez, 2012).

La variabilidad cualitativa y cuantitativa en los aceites esenciales está relacionada con factores climáticos, composición del suelo, órgano de la planta, edad, estacionalidad y fase del ciclo circadiano, esta es una limitante de estos productos de origen natural para posibles escalamientos (Furtado, 2018). Estas variaciones se identifican gracias a la caracterización de estos volátiles, por determinación sus propiedades fisicoquímicas, estas, son el referente para los controles de calidad para estos productos que garantizan que estos no tengan ningún tipo de adulteración. La caracterización química generalmente se realiza por técnicas instrumentales como cromatografía de gases acopada a espectrometría de masas (CG-EM), y cromatografía de gases con detector de ionización en llama (FID), además de estas dos técnicas se han descrito algunas específicas para garantizar la pureza enantiomérica de algunos compuestos o para detallar en análisis de ciertos aceites como: Cromatografía de gas capilar enantioselectiva y espectrometría de masa de relación isotópica, acoplada en línea con cromatografía de gas capilar en una columna HP5 para diversos aceites esenciales; Cromatografía de gases en línea pirólisis relación de isótopos espectrometría de masas (HRGC – P – IRMS) para compuestos de sabor como decanal, linalool, acetato de linalilo, E-2-hexenal y E-2-hexenol en aceites esenciales; Espectrometría de masas con relación de isótopos en línea junto con cromatografía de gases capilar (GC-Py-IRMS); Cromatografía de gases – Combustión – espectrometría de masas con relación isotópica (GC – C – IRMS); Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento - tiempo de vuelo - espectrometría de masas (UHPLC–TOF – MS) Perfil y huella digital de resonancia magnética nuclear (RMN) 1H; espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), entre otras (Preedy, 2016).

En cuanto a los parámetros de control de calidad, un aceite esencial debe estar debidamente etiquetado con el nombre botánico, método de cultivo, país de origen, tejido vegetal empleado para la destilación y componentes principales. Además deben determinarse sus características organolépticas (olor, color, sabor, apariencia),

determinaciones físicas (densidad, punto de congelación, índice de refracción, poder rotatorio, solubilidad en etanol, punto de inflamación, rango de destilación), índices químicos (índice de acidez, índice de éster, índice de saponificación, índice de acetilo, índice de fenoles), características cromatográficas (descritas anteriormente, resaltando siempre componentes mayoritarios), características espectroscópicas (ultravioleta, visible, infrarrojo). En general las normas de calidad para el control de calidad de aceites esenciales las genera cada país, sin embargo, un referente puede ser las normas ISO (international organization for standarization) o algunas farmacopeas, el control de calidad de un aceite también puede variar de acuerdo con su utilización (cosmética, alimenticia, farmacéutica, fitosanitarios) (Preedy, 2016; Montoya, 2010; Sostenible, 2003).

### **1.5.2. Aplicación de aceites esenciales como insecticidas**

Se ha reportado que los Aes de diferentes especies presentan actividad insecticida, repelente, antialimentaria e inhibitoria de la reproducción frente a diferentes coleópteros como *T.castaneum*. Adicionalmente, cabe destacar que estos presentan algunas ventajas como su baja toxicidad en humanos y en el medio ambiente por la poca persistencia. Además al actuar por diferentes modos de acción, pueden disminuir las posibilidades que el insecto genere resistencia (Ringuelet, et al., 2014).

A continuación, se describen algunos de los modos de acción reportados para los Aes frente a *T. castaneum*

#### **1.5.2.1. Modos de acción de los aceites esenciales**

##### **a) Tóxicos fumigantes:**

las sustancias que actúan por modo de acción fumigante son gaseosas a temperatura ambiente, su aplicación es relativamente fácil y permite penetrar en todo el cereal almacenado. Entre sus desventajas está la necesidad de aplicarse en un ambiente hermético para garantizar su efectividad. Los compuestos comerciales más comunes en este modo son el bromuro de metilo, la fosfina y el fluoruro de sulfurilo. Este tipo de compuestos afecta al insecto ya que entran por el sistema traqueal, modificando proteínas vitales para la supervivencia del insecto (Dierksmeier, 2007).

Teniendo en cuenta la alta volatilidad de los aceites esenciales pueden actuar por este modo de acción y para ello solo requiere un pequeño aumento de la temperatura. Además

han demostrado una rápida penetración en el insecto, por lo cual, poseen un amplio espectro de actividad sobre diferentes especies de insectos de granos almacenados. Estos generalmente no acumulan desechos tóxicos en el producto almacenado y el aumento de la temperatura no descompone los constituyentes de estos aceites (Kumar, et al., 2007) . Cabe resaltar que la actividad fumigante en los AEs se ha atribuido a los monoterpenos y sesquiterpenos principalmente, aunque existen otros tipos de compuestos con reportes de actividad que hacen parte de la composición de estos. Se han reportado AEs de la familia Apiaceae que han mostrado actividad por este modo de acción sobre *T. castaneum* (Mossa, 2016)

### **b) Tóxico por contacto**

Los aceites esenciales también pueden actuar por contacto con el insecto absorbiéndose directa y rápidamente por la cutícula de este. También pueden ser afectados por caminar sobre una superficie que tenga este tipo de sustancias. De esta forma, se ha reportado que los AEs son especialmente activos en insectos de suelos, plagas de almacén y ambientes domésticos (Saunders, et al., 1998). La actividad tóxica por contacto se ha relacionado con el carácter lipofílico de la sustancia que ejerce el efecto. Así que teniendo en cuenta que los AEs son mezclas de compuestos mayoritariamente apolares este carácter les permite atravesar la cutícula del insecto causándole la muerte. Dentro de los insecticidas actualmente usados que presentan este modo de acción se encuentran: la nicotina, la rotenona y derivados de piretrinas (Belles, 1988).

Algunos aceites esenciales de la familia Asteraceae como *Artemisia brachyloba*, cuya composición presenta monoterpenos en mayor proporción (55%), mostró toxicidad por contacto con dosis letales cincuenta ( $DL_{50}$ ) menores a 32  $\mu\text{g/g}$  de insecto. Adicionalmente, se evaluaron los compuestos mayoritarios de este aceite, el  $\alpha$ -terpineol y la davanona, encontrando que el  $\alpha$ -terpineol presentó resultados similares a los del aceite. Lo cual, no se observó con la davanona, que presentó una  $DL_{50}$  mayor (Hu, et al., 2019)

### **c) Ingestión**

En este caso el compuesto se aplica en el alimento, el cual es ingerido por el insecto y son absorbidos en el intestino, este modo funciona de manera especial en plagas masticadoras como coleópteros, lepidópteros y ortópteros. Para garantizar una dosis letal debe ser uniforme la aplicación del plaguicida en el producto, para este caso la harina (Rogg, 2000). Esta se da porque alguna sustancia induce al insecto a modificar su

comportamiento por acción directa en la sensibilidad periférica, incitando a este a disuadir la alimentación. Aceites esenciales de la familia Myrtaceae, como *Eucalyptus globulus* y *Lavandula stoechas* tienen una importante actividad antialimentaria (Mossa, 2016).

#### d) Repelente

Este modo de acción sobre plagas no es de tipo insecticida como los anteriores, ya que no causa la muerte del insecto, en este caso solo aleja al organismo del área donde esté la presencia de alguna sustancia que tenga un efecto sobre él (Torres, 1998). Se considera repelentes aquellos compuestos que puedan actuar de manera local o en un límite determinado, influyendo sobre el organismo evitando el contacto con una determinada superficie (Nerio, et al, 2010). Las sustancias con potencial repelente regularmente suministran barreras de vapor que causa que ciertos organismos no lleguen a una superficie (Brown & Helbert, 1997). Se han reportados algunas especies de aceites esenciales con actividad repelente sobre *Tribolium castaneum* como: *Ocimum basilicum* L (Labiatae), *Baccharis salicifolia* (Asteraceae), *Artemisia annua* (Asteraceae), *Nigella sativa* (Ranunculaceae), *Trachyspermum ammi* (Umbelliferae) y *Anethum graveolens* (Umbelliferae) (Caballero, et al.,2011).

#### 1.5.2.2. Aceites esenciales para el control de *Tribolium castaneum*

Se han reportado un gran número de aceites esenciales pertenecientes a diferentes familias sobre *T. castaneum*, su composición, sus modos de acción y determinación de su mecanismo de acción. Estas evaluaciones generalmente se analizan partiendo de la caracterización química del aceite, buscando un patrón de relación entre su actividad y que tipo de compuestos presentes en estos. Algunas de estas sustancias ya han sido reportadas, otras tienen pocos reportes y de algunas presentan escasa información dentro de la revisión bibliográfica realizada. En la Tabla 1-1, se presentan los reportes de algunos aceites esenciales evaluados sobre el insecto que han mostrado resultados sobre *T. castaneum*.

Tabla 1-1 Reportes de aceites esenciales promisorios sobre *T.castaneum*

Espece	Familia	Compuestos mayoritarios	Actividad evaluada	Referencia
<i>A. calamus</i>	Acoraceae	$\alpha$ -asarona, metilisoegenol, shyobunona, isoshyobunona	Repelente (>90% repelencia a 78 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a 60 h)	(Miao, et al.,2016)
<i>C. copticum</i>	Apiaceae	$\rho$ -cimeno, timol, $\gamma$ -terpineno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 33,14 $\mu\text{l}/\text{L}$ de aire)	(Fang, et al, 2010)

<i>A. herba</i>	Asteraceae	alcanfor cis-tujona crisantenona	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> :17,4 µL/L aire) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : 0,08 ml/cm <sup>2</sup> )	(Abbad, et al., 2014).
<i>A. lancea</i>		acetato de geranilo, terpinoleno, α-terpineol α- pineno, sabineno, α-felandreno, γ-terpineno acetato de linalilo , acetato de terpenilo, L-acetato de mentilo y R-acetato de mentilo	Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : 5,78 µl/adulto) Repelente (80% repelencia a 0,63 µL/ cm <sup>2</sup> a 4 horas)	(Guo, et al., 2019).
<i>L. sempervirens</i>	Cupressaceae	safrol limoneno	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 1,66 µl/L de aire) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : 44,05 µg/mg adulto Repelente (43,44% 0,001 µl/cm <sup>2</sup> 4 H)	(Zapata & Smagghe, 2010)
<i>S. bachtiarica</i>	Lamiaceae	p-cimeno, linalol, borneol, timol, carvacrol.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 4,71 µg/ guarida) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> :40,6 µg/mg adulto) Repelente (10,00% 1%(v/v) 8 horas)	(Taban, et al., 2017)
<i>S. calamintha</i>		pulegona, mentona mentol	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> :7,8 µL/L aire) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> :0,09 ml/cm <sup>2</sup> )	(Abbad, et al., 2014).
<i>S. multifida</i>		Mentona, pulegona, limoneno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 26,41 mg/ cm <sup>3</sup> ) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : 2,75 µg/adulto)	(Liu, et al, 2011).
<i>R. officinalis</i>		β-pineno, alcanfor, canfeno,D -limoneno, terpineol, linalol	Repelente (-80% repelencia a 0,001 µL/ cm <sup>2</sup> a 3 H)	(Licciardello, et al., 2013)
<i>C. nardus</i>		geraniol, citronelol, D- limoneno, linalol, farnesol	Repelente (20% repelencia a 0,001 µL/ cm <sup>2</sup> a 3 horas)	(Licciardello, 2013)
<i>R. chalepensis</i>	Rutaceae	2-undecanona 2-nonanona 2-decanona	Toxicidad fumigante (Sin Actividad) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : 0,17 mg/cm <sup>3</sup> )	(Abbad, et al., 2014).
<i>M. koenigii</i>		γ-selineno, α-selineno, espatulenol, α-terpineno, α-cariofileno	Repelente (26,00% 0,13 nL/cm <sup>2</sup> 4 horas)	(Chun-Xue, et al., 2015)
<i>D. winteri</i>	Winteraceae	Γ-curcumene, limoneno, mirceno, limoneno, trans- cariofileno, α-pineno, sabineno y 4-terpineol.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 8,96 µl/L de aire) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : 84,05 µg/mg adulto) Repelente (50,00% 0,02 µL/cm <sup>2</sup> 4 H)	(Zapata & Smagghe, 2010)

<i>A. conchigera</i>	Zingiberaceae	1,8-cineol, $\beta$ -pineno, $\alpha$ -pineno, $\beta$ -sesquifelandeno	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 73 $\mu$ L/L aire)	(Suthisut, et al, 2011)
<i>Z. zerumbet</i>		canfeno, $\alpha$ -humuleno, alcanfor, 1,8-cineol	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : >593 $\mu$ L/L aire)	(Suthisut, et al, 2011)

Teniendo, en cuenta la abundancia de AEs en especies colombianas y basados en los reportes previos de actividad frente a diferentes plagas de almacén, en los grupos de investigación QuiProNaB de la universidad Nacional de Colombia, y GIFUJ de la Universidad Javeriana se han venido desarrollando diferentes investigaciones enfocadas a la búsqueda de agentes fitosanitarios desde hace aproximadamente 12 años. Así, a la fecha se han evaluado 67 aceites esenciales de diferentes especies vegetales y por diferentes modos de acción frente a *T. castaneum*. En la Tabla 1-2 se presentan algunos de los resultados más promisorios obtenidos en las investigaciones de los grupos QuiProNaB y GIFUJ

Tabla 1-2 Aceites esenciales promisorios sobre *T. castaneum* evaluados por QuiProNaB Y GIFUJ

Especie	Familia	Compuestos mayoritarios	Actividad evaluada	Referencia
<i>F. vulgare</i>	Apiaceae	anetol, $\alpha$ -felandreno, limoneno	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 16,23 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>P. anisium</i>		anetol, $\rho$ -anialdehido, limoneno, estragol.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 79,16 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>A. graveolens</i>		$\alpha$ -felandreno, D-limoneno, carvona, anentofurano, $\beta$ -felandreno, estragol.	Actividad Fumigante (CL <sub>50</sub> : 131,3 $\mu$ L/L aire) Actividad Repelente (50% repelencia 24 H, 0,063 $\mu$ L/cm <sup>2</sup> )	(Riveros, 2018)
<i>Petroselinum sp</i>		$\alpha$ -pineno, $\beta$ -pineno, $\beta$ -mirceno, $\beta$ -felandreno, terpinoleno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 26,58 $\mu$ L/L aire) Actividad antialimentaria (IDA: 0,01 a 500 ppm)	(Azuelo, 2019)
<i>A. dracunculus</i>	Asteraceae	estragol, $\beta$ -mirceno, cis- $\beta$ -mirceno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 22,77 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>H. juniperinum</i>	Hypericaceae	$\beta$ -cariofileno, acetato de geranilo, $\alpha$ -pineno, $\alpha$ -cariofileno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 67,26 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>L. angustifolia</i>	Lamiaceae	1,8-cineol, alcanfor, borneol.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 34,14 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>O. vulgare</i>		timol, $\gamma$ -terpineno, $\rho$ -cimeno.	Actividad Fumigante (CL <sub>50</sub> : 127,3 $\mu$ L/L aire) Actividad Repelente (55% repelencia 24 H, 0,025 $\mu$ L/cm <sup>2</sup> )	(Riveros, 2018)



<i>T. vulgaris</i>		$\beta$ -cimeno, $\gamma$ -terpineno, metilcarvacrol, timol, cariofileno, $\beta$ -bisaboleno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 21,89 $\mu$ L/L aire) Actividad antialimentaria (IDA: 1,10 a 500 ppm)	(Azüero, 2019)
<i>O. longifolia</i>	Lauraceae	$\alpha$ -felandreno, 3-careno, $\alpha$ -terpinoleno, germacreno D, biciclogermacreno	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 36 $\mu$ L/L aire) Toxicidad por contacto (7% mortalidad 0,20 $\mu$ L/L aire) Actividad Repelente (36% repelencia 24 H, 0,063%(v/v)) Actividad antialimentaria (IDA:25,6 a 500 ppm)	(Prieto, 2012)
<i>V. carinata</i>	Myristicaceae	E- $\beta$ -ocimeno, $\beta$ -cadineno	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> :75,6 $\mu$ L/L aire) Toxicidad por contacto (0% mortalidad 0,20 $\mu$ L/L aire) Actividad Repelente (68% repelencia 24 H, 0,063%(v/v)) Actividad antialimentaria (IDA: 26,7 a 500 ppm)	(Prieto, 2012)
<i>P. adumcum</i>	Piperaceae	Cis- $\beta$ -farneseno, $\alpha$ -copano .	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 41,91 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>P. nigrum</i>		$\beta$ -cariofileno, $\delta$ -elemeno, linalol.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 43,90 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>P. eriocladium</i>		$\alpha$ -felandreno, $\beta$ -pineno, $\rho$ -cimeno, limoneno, $\alpha$ -pineno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 58,28 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>P. asperiusculum</i>		dilapiol, limoneno, $\beta$ -cariofileno, miristicina.	Actividad Fumigante (CL <sub>50</sub> : 264,1 $\mu$ L/L aire) Actividad Repelente (100% repelencia 24 H, 0,025 $\mu$ L/cm <sup>2</sup> )	(Patiño, 2015)
<i>P. pertomentellum</i>		limoneno, $\beta$ -cariofileno, germacreno D, oxido de cariofileno.	Actividad Fumigante (CL <sub>50</sub> : 63,2 $\mu$ L/L aire) Actividad Repelente (44% repelencia 24 H, 0,0025 $\mu$ L/cm <sup>2</sup> )	(Patiño, 2015)
<i>Z. monophyllum</i>	Rutaceae	$\beta$ -pineno, $\alpha$ -pineno, 3-careno, $\alpha$ -felandreno, cis- $\beta$ -mirceno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 18,53 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).
<i>Z. rhoifolium</i>		$\beta$ -mirceno, $\beta$ -felandreno, germacreno D, biciclogermacreno.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : >500 $\mu$ L/L aire) Toxicidad por contacto (7% mortalidad 0,20 $\mu$ L/L aire 24 H)	(Prieto, 2012)
<i>R. graveolens</i>		2-undecanona, 2-nonanona, geijereno, 2-decanona.	Actividad Fumigante (CL <sub>50</sub> :1,7 $\mu$ L/L aire) Actividad Repelente (60% repelencia 24 H, 0,025 $\mu$ L/cm <sup>2</sup> )	(Riveros, 2018)
<i>E. cardamomum</i>	Zingibiraceae	1,8-cineol, acetato de $\alpha$ -terpenilo, linalol, acetato de linalol.	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 29,37 $\mu$ L/L de aire)	(Oviedo, 2019).

De acuerdo con los resultados de las Tablas 1-1 y 1-2, se observa que los aceites esenciales más promisorios sobre el insecto, posee una composición mayoritaria en monoterpenos. Por lo tanto, se podría esperar que estos compuestos puedan estar directamente relacionados con la actividad sobre insecticida sobre *T. castaneum*. También se observan otros compuestos con menor distribución que los monoterpenos, pero que son frecuentes en varios de los AEs activo como: fenilpropanoides, aldehídos, cetonas y alcanos. Por ejemplo, el nonano, el cual fue reportado como uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *H. mexicanum*. Esta especie fue evaluada por modo de acción toxica fumigante en los grupos de investigación GIFUJ y QuiProNaB una CL<sub>50</sub> de 229,06 ppm.

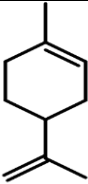
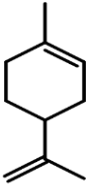
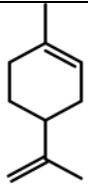
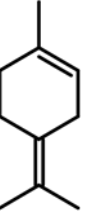
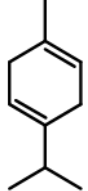
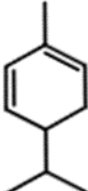
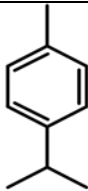
A partir de estos resultados, teniendo en cuenta algunas desventajas de estas mezclas volátiles como su variabilidad química, los diferentes quimiotipos sus bajos rendimientos, se planteó la propuesta de evaluar aquellos compuestos mayoritarios y más frecuentes en los aceites esenciales, buscando determinar cuáles podrían ser los responsables de la actividad sobre el insecto.


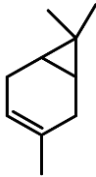

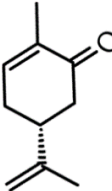
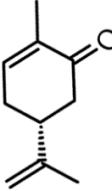
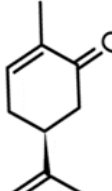
De esta forma, se realizó una revisión en literatura de que compuestos volátiles, comúnmente encontrados en AEs, que presentaban reportes de actividad insecticida frente a *T. castaneum*. A continuación, se presentan algunos de los resultados encontrados.

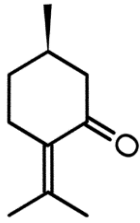
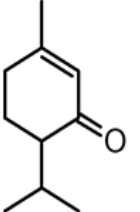
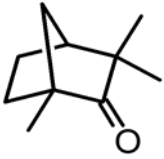

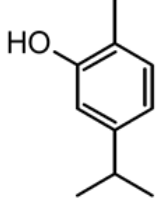
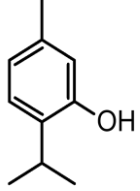
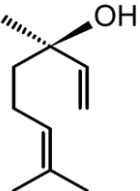
### **1.5.2.3. Compuestos de aceites esenciales para el control de *Tribolium castaneum***

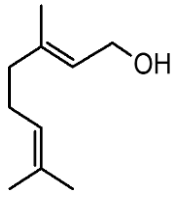
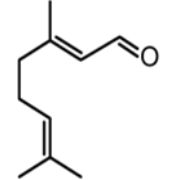
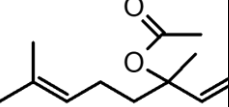
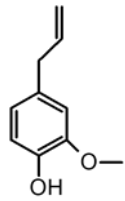
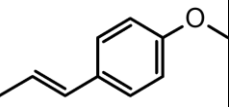
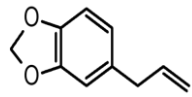
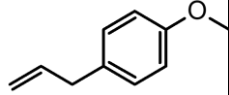
Algunos compuestos como el 1,8-cineol, linalool, eugenol, timol, p-cimeno, pulegona,  $\alpha$ -pineno, limoneno, terpineol, citronelal, han sido analizados en la actividad frente al insecto de interés con resultados promisorios de actividad insecticida. También, otros compuestos oxigenados como cetonas y aldehídos han mostrado potencial repelente e insecticida sobre *T. castaneum* (Stashenko & Martinez, 2012; Mossa, 2016). Algunos de estos reportes fueron compilados en la Tabla 1-3.

Tabla 1-3 Compuestos presentes en AEs evaluados sobre *T. castaneum*.

Nombre	Estructura	Tipo	Actividad Evaluada	Referencia
limoneno		monoterpeno	Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 33,77 mg/ L aire) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : >400 mg/cm <sup>2</sup> )	(Abdelgaleil, et al., 2009).
D-limoneno			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 19,10 µg/ L aire) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : 20,14 µg/cm <sup>2</sup> ) Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 5,24 mg/ L aire) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : 79,78 µg/ mg adulto) A. antialimentaria (IDA: 21 con 2,4 mg/g disco)	(Fang, et al., 2010; Tripathi, et al., 2003a)
(+)-limoneno			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 22,8 mg/L aire)	(Prieto, 2012)
terpinoleno			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 16,7 mg/ L aire) Actividad repelente (85% repelencia a 4 h a 78,63 nL/cm <sup>2</sup> )	Liang, et al., 2018)
γ-terpineno			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 24,2 mg/L aire)	(Prieto, 2012)
α-felandreno			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 25,6 mg/L aire)	(Prieto, 2012)
p-cimeno			Actividad repelente (44% repelencia 0,02 µL/cm <sup>2</sup> a 4 h)	(Caballero, et al., 2011)

sabineno			<p>Toxicidad fumigante  <math>CL_{50}</math>: 18,22 mg/L aire            Toxicidad por contacto            (<math>DL_{50}</math>: 48,22 mg/cm<sup>2</sup>)            Actividad repelente            (60 &amp; repelencia 2 h a 3.15 nL/cm<sup>2</sup>)</p>	(Wang, et al., 2019)
3-careno			<p>Toxicidad fumigante            (<math>CL_{50}</math>: 14,7 mg/L aire)            Toxicidad por contacto            (<math>DL_{50}</math>: 64,8 mg/adulto)            Actividad repelente:            (88% repelencia 2 h a 78,93 nL/cm<sup>2</sup>)</p>	(Luo, et al., 2019)
1,8-cineol			<p>Toxicidad fumigante            (17,5% mortalidad a 100 µg/720 mL aire)            Toxicidad fumigante            (<math>CL_{50}</math>: 17,16 mg/L aire)            Toxicidad por contacto            (<math>DL_{50}</math>: &gt;400 mg/cm<sup>2</sup>)            Toxicidad fumigante            (<math>CL_{50}</math>: 33,9 mg/L aire)            Toxicidad fumigante            (5% mortalidad con 40 µg/cm<sup>2</sup> aire)            A. antialimentaria            (IDA: 0% con 1 mg/g disco)</p>	(Rozman, et al, 2007; Abdelgaleil, et al., 2009; Prieto, 2012; Kanda, et al., 2017)
(-)-carvona		monoterpenoide	<p>Toxicidad fumigante  <math>CL_{50}</math>: 179,49 mg/L aire            Toxicidad por contacto            (<math>DL_{50}</math>: 19,80 mg/cm<sup>2</sup>)</p>	(Abdelgaleil, et al., 2009).
R(-)-carvona			<p>Toxicidad fumigante            (<math>CL_{50}</math>: 1,96 µg/L aire)            Toxicidad por contacto            (<math>DL_{50}</math>: 2,64 µg/cm<sup>2</sup>)            Actividad repelente            (68% repelencia 0,02 µL/cm<sup>2</sup> a 4 H)</p>	(Fang, et al., 2010; Caballero, et al., 2011)
S-(+)-carvona			<p>Actividad repelente            (30% repelencia 0,02 µL/cm<sup>2</sup> a 4 H)            Toxicidad fumigante            (<math>CL_{50}</math>: 2,51 mg/L aire)            A. antialimentaria            (IDA: 3,1 con 9,6 mg/g disco)</p>	(Caballero, et al., 2011; Tripathi, et al., 2003b)

pulegona			<p>Toxicidad fumigante (CL<sub>50</sub>: 11,56 mg/ cm<sup>3</sup> aire) Toxicidad por contacto (DL<sub>50</sub>: 1,55 µg/adulto) Toxicidad fumigante (CL<sub>50</sub>: 18% mortalidad a 40 µg/ cm<sup>3</sup> aire) A. antialimentaria (IDA: 18,22 con 1 mg/g disco)</p>	(Liu, et al, 2011; Kanda, et al.,2017)
piperitona			<p>Toxicidad fumigante (CL<sub>50</sub>: 0,5 ml/ L aire)</p>	(Bossou, et al.,2015)
fenchona			<p>Toxicidad fumigante (1% mortalidad con 40 µg/ cm<sup>2</sup> aire) A. antialimentaria (IDA: 0% con 1 mg/g disco) Toxicidad Fumigante (CL<sub>50</sub>: 43,35 mg/ L aire) Toxicidad por contacto (DL<sub>50</sub>: 179,49 mg/cm<sup>2</sup>)</p>	(Kanda, et al.,2017; Abdelgaleil, et al., 2009).
alcanfor			<p>Toxicidad fumigante (CL<sub>50</sub>: &gt;200 mg/ L aire) Toxicidad por contacto (DL<sub>50</sub>: &gt;400 mg/cm<sup>2</sup>) Toxicidad fumigante (12,5% mortalidad a 100 µg/ 720 mL aire)</p>	(Abdelgaleil, et al., 2009; Rozman, et al, 2007).
carvacrol			<p>Toxicidad fumigante (20% mortalidad a 100 µg/ 720 mL aire) Toxicidad fumigante (CL<sub>50</sub>: 21,16 µg/ cm<sup>2</sup> aire) A. antialimentaria (IDA: 0% con 1 mg/g disco)</p>	(Caballero, et al.,2011; Rozman, et al, 2007; Kanda, et al.,2017)
timol			<p>Toxicidad fumigante (5% mortalidad a 100 µg/ 720 mL aire) Toxicidad fumigante (CL<sub>50</sub>: 11,21 µg/ cm<sup>2</sup> aire) A. antialimentaria (IDA: 19,3% con 1 mg/g disco)</p>	(Rozman, et al, 2007; Kanda, et al.,2017).
linalol			<p>Toxicidad Fumigante (CL<sub>50</sub>: &gt;200 mg/ L aire) Toxicidad por contacto (DL<sub>50</sub>: &gt;400 mg/cm<sup>2</sup>) Toxicidad fumigante (12,5% mortalidad a 100 µg/ 720 mL aire) Toxicidad fumigante</p>	(Abdelgaleil, et al., 2009; Rozman, et al, 2007; Kanda, et al.,2017)

			(2% mortalidad a 40 µg/ cm <sup>2</sup> aire) A. antialimentaria (CD <sub>50</sub> : 0,207 mg/g disco)	
geraniol			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : >200 mg/ L aire) Toxicidad por contacto (DL <sub>50</sub> : >400 mg/cm <sup>2</sup> ) Actividad repelente (64% repelencia 0,02 µL/cm <sup>2</sup> a 4 horas)	(Abdelgaleil, et al., 2009; Caballero, et al.,2011).
citral			Actividad repelente (55% repelencia 0,02 µL/cm <sup>2</sup> a 4 horas)	(Caballero, et al.,2011)
acetato de linalilo		éster de monoterpene	Toxicidad fumigante (12,5% mortalidad a 100 µg/ 720 mL aire)	(Rozman, et al, 2007).
eugenol		fenilpropanoide	Toxicidad fumigante (17,5% mortalidad a 100 µg/ 720 mL aire) Toxicidad Fumigante (CL <sub>50</sub> : 18,88 µg/ cm <sup>2</sup> aire) A. antialimentaria (CD <sub>50</sub> : 0,010 mg/g disco)	(Rozman, et al, 2007; Kanda, et al.,2017)
trans-anetol			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> : 20,06 µg/ cm <sup>2</sup> aire) A. antialimentaria (CD <sub>50</sub> : 0,468 mg/g disco)	(Kanda, et al.,2017)
safrol			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> :37,68 mg/L aire) Toxicidad por contacto (CL <sub>50</sub> : 0,54 mg/ cm <sup>2</sup> ) A. antialimentaria (16,22 mg/g de alimento, 0% IDA)	(Huang, et al .,1999)
estragol			Toxicidad fumigante (CL <sub>50</sub> :6,4 µL/mL agua)	(Olmedo, et al., 2015)

En la mayoría de los estudios de constituyentes de aceites esenciales se observa la determinación del efecto de estos por uno o más modos de acción. Principalmente se han reportado compuestos de tipo terpeno y algunos fenilpropanoides. Considerando el potencial insecticida de algunos de estos compuestos, en el presente trabajo de planteó hacer una búsqueda de compuestos volátiles que pudieran presentar actividad frente a *T. castaneum* para posteriormente preparar mezclas entre ellos a partir de un diseño estadístico basado en su actividad individual, teniendo en cuenta que mezclar compuestos

con un gran potencial individual pueden presentar sinergismos que alcancen concentraciones y dosis más efectivas, además de contar con ventajas de las mezclas volátiles como actuar por diferentes modos de acción.

## 1.6. Diseño de mezclas insecticidas

Una característica decisiva en el diseño de un insecticida es el número de ingredientes activos que constituirán un producto terminado, tomando de referencia la subsección anterior, las mezclas de volátiles en las plantas (aceites esenciales) logran incrementar el potencial insecticida en agrupación respecto a un principio activo individual (Borrero, et al.,2020). En algunos reportes como el realizados por Pavela, se documenta la elaboración y evaluación de 435 mezclas binarias de metabolitos secundarios sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, de las cuales 249 mezclas exhibieron algún tipo de sinergismo. Este y otros reportes sugieren que las combinaciones de volátiles de planta pueden ser una alternativa prometedora para el desarrollo de insecticidas (Pavela, 2015). Sin embargo, los modelos de diseño de mezclas para potenciar actividad insecticida son escasos y poco estandarizados.

Por mezcla, se entiende que es una combinación de dos o más sustancias que no reaccionan entre sí, conservando la identidad y propiedades químicas de las sustancias que la constituyen (Hurtado, 2012). Para el caso de las mezclas con actividad insecticida, requieren la combinación de dos o más principios activos que permitan tener un mejor efecto sobre el objetivo para mejorar la efectividad, selectividad y mecanismos de resistencia (Bisset, 2002). Entre las principales formulaciones de mezclas insecticidas se encuentran las mezclas coformuladas, las cuales poseen ventajas como: ampliación del espectro de acción sobre diferentes plagas, alternativa para el manejo de resistencia a plaguicidas por parte de los insectos (en ocasiones el manejo de resistencia se hace con un compuesto activo con diferentes modos de acción en lugar de emplear una mezcla), mayor efectividad y flexibilidad en la aplicación. Sin embargo, también encontramos algunas desventajas como la diferencia de umbral de acción de un principio activo a otro, la diferencia del umbral de tolerancia de una plaga a otra, o la posibilidad de que la plaga ya haya hecho resistencia a uno de los principios activos de la mezcla (EPPO, 2012).

En la búsqueda de mejorar la actividad de principios activos en mezclas, el objetivo es hallar sinergismos, por sinergia se define un efecto combinado de dos o más sustancias,

cuyo efecto final es mayor que el de la suma de sus actividades individuales, así mismo, la aditividad es el resultado de la suma de las actividades de dos o más compuestos (Roell, et al., 2017). Las dos expresiones indican un incremento en la actividad de ciertos compuestos en mezcla, también se puede expresar sinergia como cualquier desviación significativa de la aditividad, es decir, esta desviación puede interpretarse como sinergia o antagonismo, para sinergia sería el evento en el cual la desviación es positiva, llamada también superaditividad (Tallarida, 2001), potenciación o supraaditividad (Geary, 2013). Por otra parte la desviación negativa de la aditividad indica antagonismo, situación en la que el efecto combinado es menor al de los compuestos individuales, también se denomina al antagonismo como subaditividad (Tallarida, 2001), infraaditividad (Geary, 2013), depotenciación o sinergia negativa (Berembaum, 1977).

A pesar de ser pocos los modelos de diseño de mezclas insecticidas se pueden tomar de referencia algunos ya reportados de otras industrias como la farmacéutica.

### **1.6.1. Modelos de mezclas**

Varias investigaciones sobre mezclas indican que la dependencia de la relación de concentración y el nivel del efecto con la interacción es un fenómeno común (Koutsaftis & Aoyama, 2007; Zhang & Liu, 2012) que requiere un método razonable y fácilmente aplicable para representar la interacción tóxica de la mezcla a fin de garantizar la fiabilidad de la evaluación de los resultados.

En la actualidad, dos modelos de referencia utilizados para realizar mezclas son: el modelo de Adición de Concentración (CA) introducidos por Loewe y Muischnek en 1926 y descrito por Berenbaum (1985) para una mezcla con  $n$  compuestos. El modelo de Acción de Independiente (IA) por Bliss en 1939, para evaluar la toxicidad de la mezcla (Backhaus & Faust, 2012).

El modelo CA se basa en la premisa de que todos los componentes de una mezcla actúan de manera similar, teniendo un modo de acción común (Hassold & Backhaus, 2014) El modelo CA es por esto aplicable para mezclas de compuestos con un modo de acción similar, mientras que el modelo IA es aplicable para mezclas con diferentes modos de acción (Altenburger et al., 200; Faust et al., 2003). Ambos conceptos se basan en el conocimiento de toxicidad de un solo compuesto y el supuesto de no interacción en general (Cedergreen, et al., 2013)



El principio teórico detrás de este modelo es que los componentes de la mezcla difieren solo en su potencia y, por lo tanto, se pueden considerar como diluciones entre sí. Loewe desarrolló el concepto de CA basándose en el hecho de que a diferentes diluciones de compuestos químicos siempre se ajustarán a la CA. Esto se suele interpretar como que los compuestos de una mezcla que comparten un modo de acción similar siempre se ajustarán a este.

El concepto alternativo de Acción Independiente (IA) asume que los componentes de una mezcla actúan de manera diferente, es decir pueden actuar en diferentes sitios de destino, pero todavía están activando un punto final toxicológico común. Este concepto fue formulado por primera vez por Bliss (1939) para mezclas binarias y luego extendido para sustancias múltiples (Backhaus, et al., 2000a).

Sin embargo, los modos de acción de muchas de las sustancias aún se desconocen y la selección de diferentes estándares sigue siendo difícil (Chou, 2006). A través de la investigación teórica y la verificación experimental, Chou (2008-2011) propuso evaluar la interacción de toxicidad de las mezclas utilizando el índice de combinación (IC) basado en una ecuación efectiva media es decir del 50% sin depender del modo de acción. Es por esto, que el IC se ha utilizado ampliamente para evaluar la toxicidad de las combinaciones de fármacos (Yamamoto, 2013).

Se ha demostrado que CA predice con precisión la toxicidad de mezclas de sustancias de acción estrictamente similar (Faust et al., 2001; Altenburger et al., 2000) así como de compuestos con un modo de acción común (Hermens et al., 1984).

Por otro lado, el enfoque de IA ha ganado sustancialmente menos atención en los estudios ecotoxicológicos. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que es superior a la CA para mezclas de múltiples componentes de sustancias de acción estrictamente diferente (Faust et al., 2003; Backhaus et al., 2000a). Para mezclas binarias, IA y CA a menudo predicen toxicidades prácticamente idénticas (Belden et al., 2007; Backhaus et al., 2004). En particular, CA ha ganado una gran aceptación y se ha propuesto como un enfoque por defecto razonable para fines regulatorios, proporcionando estimaciones prudentes incluso para mezclas químicamente heterogéneas (Faust et al., 2000; Junghans et al., 2006). Además, la capacidad predictiva de ambos conceptos CA y IA podrían verse obstaculizados, ya que se sabe que los compuestos provenientes de los AEs interactúan,

causando efectos de combinación sinérgicos o antagónicos como lo muestran varios autores (Hollman & Kendall 1997; Noergaard & Cedergreen 2010; Cedergreen et al. 2006).

Es por lo anterior que las mezclas de los Compuestos de Aceites Esenciales (CAEs) en distintas proporciones y para diferentes tipos de actividad, es decir con niveles de efecto variado son evaluadas para estimar la acción conjunta utilizando dos principios:

- a. Adición de concentración (CA) y
- b. Acción independiente (IA)

También se simulan y evaluarán efectos específicos de la mezcla: dados por la estimación del sinergismo, aditividad y antagonismo basados en el Índice de Combinación IC.

#### 1.6.1.1. Modelo de adición de concentración

Para una mezcla bien definida de  $n$ , la adición de concentración y/o dosis se expresa matemáticamente como (Fausto, et al, 2001):

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{EC_{xi}} = 1$$

Donde, donde  $EC_{xi}$  es el efecto de la concentración del  $i$  ésimo compuesto que causa un efecto de  $x\%$  cuando se aplica individualmente en  $c_i$ . El  $c_i$  se expresa como:

$$c_i = p_i * c_{mix} = p_i * EC_{x,mix}$$

Donde  $p_i$  es la proporción del componente  $i$  en una mezcla,  $c_{mix}$  la concentración de la mezcla y  $EC_{x,mix}$ , la concentración de la mezcla que provoca un efecto de  $x\%$ .

El cociente  $c_i/EC_{xi}$  también se conoce como una unidad tóxica (TU) (Sprague, 1970). Si la suma de todas las TU individuales es igual a 1 en una mezcla que provoca un efecto de  $x\%$ , entonces la toxicidad de la mezcla es de acuerdo con el principio CA.

Cabe señalar aquí que la ecuación no permite calcular directamente el efecto predicho por CA de una mezcla, es decir, responder a una pregunta como "¿Qué efecto causa una mezcla si contiene la  $CL_{50}$  de un compuesto más la  $CL_{50}$  de un segundo compuesto?" Para este propósito, las funciones de concentración-respuesta completas para todos los componentes de la mezcla deben estar disponibles y la ecuación. 1 debe resolverse de forma iterativa para  $x$  (Cedergreen et al., 2013; Faust et al., 2003)

La fórmula para predecir el efecto de una mezcla se puede expresar como:

$$EC_{x,mix} = \left( \sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{x,i}} \right)^{-1}.$$

Donde, E (cMix) es el efecto predicho de una mezcla de n-componentes con una concentración total de cMix, ci es la concentración individual del compuesto 1-n en la mezcla y E (ci) la Efecto de esta concentración si el compuesto se aplica solo.

Si el objetivo del fue investigar la toxicidad conjunta de los compuestos presentes en los AEs con presumiblemente diversos mecanismos de acción sobre el insecto. se debe evaluar o validar comparativamente la precisión predictiva de los conceptos CA e IA para los diferentes modos de acción sobre el insecto. Para este estudio en coleópteros los modos de acción más frecuentes son: toxicidad fumigante, toxicidad por contacto, actividad repelente, actividad antialimentaria, inhibición de la reproducción. Los modelos requieren evaluar experimentos de cada compuesto y posteriormente de las mezclas en dos fases, siendo la primera fase la de calibración y verificación de las estimadas por el modelo

### 1.6.1.2. Índice de Combinación

Los requisitos mínimos teóricos para estudios de combinación o mezclas (por ejemplo, drogas) y luego, para la determinación del sinergismo o antagonismo, requiere conocer tanto la "potencia" como la "forma" de la curva dosis-efecto para cada elemento a combinar (Chou, 2012). Por tanto, es necesario conocer los parámetros dosis-efecto de cada uno de los compuestos en cada una de las actividades evaluadas.

Se puede generar un algoritmo utilizado para simular los valores de concentraciones letales (CL) calculados en diferentes niveles de efecto o de fracción afectada (fa). Teniendo en cuenta la relación dosis efecto a través de la regresión Probit. se define IC como:

$$IC = \frac{D_1}{Dm_1[fa/(1-fa)]^{1/m_1}} + \frac{D_2}{Dm_2[fa/(1-fa)]^{1/m_2}}$$

Donde, D1 es la concentración del compuesto 1, fa es la fracción afectada y fu la no afectada. Dm es la concentración de efecto medio (CL<sub>50</sub>) y m1 y m2 son las pendientes de la relación dosis efecto, con valores m=1, m>1 y m<1

El objetivo del índice de combinación es cuantificar el efecto de la combinación de los compuestos y obtener un resultado que muestre la sinergia entre los compuestos al combinarse.

La sinergia se puede definir como un mecanismo que refleja la acción concertada de dos o más factores en un resultado dado de un sistema. Esta acción concertada produce un efecto amplificado positivo o negativo en comparación con el efecto producido por cada factor individualmente (Trosset & Carbonell, 2013). En términos generales, una propiedad  $x$  tiene efectos sinérgicos sobre una actividad observada  $f(x)$  en el sistema, si la dependencia de la propiedad con respecto a la actividad muestra superaditividad:

$$f(x_1 + x_2) \geq f(x_1) + f(x_2)$$

Teniendo en cuenta lo anterior y el índice de combinación se define en este trabajo el sinergismo estimado (utilizado para seleccionar las combinaciones) y el efectivo de la mezcla de la siguiente manera:

Estimación del efecto de la mezcla

- ❖ Si  $IC(C_i, C_j) < 1$  entonces se estima que hay sinergismo.
- ❖ Si  $IC(C_i, C_j) = 1$  entonces se estima que hay efecto aditivo.
- ❖ Si  $IC(C_i, C_j) > 1$  entonces se estima que hay antagonismo.

Sinergismo Efectivo:

$$\text{Sinergia}(C_i, C_j) : CL_{50_i} < CL_{50_j}$$

$$\text{Si } CL_{50_{ij}} < CL_{50_i}$$

$$\text{Si } CL_{50_{ij}} < CL_{50_j}$$

Si además, se cumple que:

$$\text{Si } \min(C_{ij}) < \min(C_i)$$

$$\text{Si } \min(C_{ij}) < \min(C_j)$$

Se considera, que la mezcla  $ij$  es altamente sinérgica, dado que se superan los umbrales mínimos de los compuestos individuales (Yadav, et al ., 2015)

La medición del sinergismo logrado por cada compuesto en la mezcla de los compuestos se realizó con el factor de sinergismo definido como:

$$SF_i = \frac{CL_{50i}}{CL_{50ij}}$$

Es por esto, que el ajuste de la curva de las respuestas de concentración individual es la base para predecir el efecto de las mezclas. Las toxicidades de las mezclas se pueden determinar a partir de la toxicidad del componente individual según el modelo de adición de concentración (CA) si la composición relativa de cada componente se conoce cuantitativamente.

Teniendo en cuenta, el concepto de adición (CA), se asume que los componentes de la mezcla actúan de manera similar contra el organismo de prueba. La acción independiente (IA) o modelo de adición de respuesta, asume que los componentes de una mezcla dada tienen diferente modo de acción. Luego, el IC dado para el modelo IA está dado por:

$$IC := \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2} + \frac{(D)_1(D)_2}{(D_m)_1(D_m)_2}$$

Para evaluar el efecto de una mezcla Chou y Talalay proponen una escala de clasificación de los resultados de los índices de combinación, el cual se muestra en la Tabla 1-4.

Tabla 1-4 Descripción y símbolos de sinergia o antagonismo en estudios de combinación de compuestos analizados por método de IC

Rango de índice de Combinación	Descripción	Símbolos en grados
<0.1	Sinergismo muy fuerte	+++++
0.1-0.3	Sinergismo fuerte	++++
0.3-0.7	Sinergismo	+++
0.7-0.85	Sinergismo moderado	++
0.85-0.90	Leve sinergismo	+
0.9-1.10	Aditividad	±
1.10-1.20	Leve antagonismo	-
1.20-1.45	Antagonismo moderado	--
1.45-3.3	Antagonismo	---
3.3-10	Antagonismo fuerte	----
>10	Antagonismo muy fuerte	-----

En términos gráficos, se puede apreciar la relación de sinergismo y antagonismo a través de los gráficos llamados isoblograma. El análisis de isoblograma evalúa la naturaleza

de la interacción de dos compuestos, es decir, el compuesto A y el compuesto B, a un nivel de efecto dado. Operacionalmente, las concentraciones requeridas para producir el efecto dado (p. Ej.,  $CL_{50}=CL_x$ ) se determinan para el compuesto ( $CL_x, A$ ) y el compuesto B ( $CL_x, B$ ) y se indican en los ejes "x" e "y" de una gráfica de dos coordenadas, formando los dos puntos ( $CL_x, A, 0$ ) y ( $0, CL_x, B$ ). La línea que conecta estos dos puntos es la línea de aditividad. Luego, las concentraciones de A y B contenidas en la combinación que proporcionan el mismo efecto, denotado como ( $C_{AX}, C_{Bx}$ ), se colocan en la misma gráfica. La sinergia, la aditividad o el antagonismo se indican cuando ( $C_{AX}, C_{Bx}$ ) se encuentra debajo, o sobre la línea, respectivamente.

Por su parte, el diseño de combinación de relación constante diagonal propuesta por Chou y Talalay (1984) y Chou (1991) puede reducir enormemente la cantidad de individuos necesarios para los experimentos y aun así obtenerse una cantidad aceptable de información útil sobre combinaciones, aumentando así la rentabilidad de la experimentación.

Finalmente, considera que para un conjunto simple de estudios de combinación *in vitro*, tomará aproximadamente 2 semanas para la cuantificación del sinergismo o antagonismo de las combinaciones. Pero si uno quiere saber cómo y por qué sinergismo o antagonismo ocurre, puede llevar meses o años y, sin embargo, no sean concluyentes (Chou, 2012). En resumen, la determinación del sinergismo o antagonismo y la determinación de las causas y cómo o por qué ocurre son cuestiones independientes.

## 2. Metodología

El diseño experimental del presente trabajo se llevó a cabo en tres grandes fases: En la fase I la determinación de la actividad fumigante. En la fase II, se evaluó la actividad tóxica por contacto, repelente y antialimentaria de los compuestos seleccionados como promisorios en la fase I. En la fase III, se llevó a cabo el diseño y evaluación de mezclas binarias a partir de los compuestos que presentaron los mejores resultados en las actividades evaluadas en las fases I y II. Finalmente, se hizo un estudio de estabilidad preliminar de las mezclas binarias que mostraron el mayor perfil de sinergismo. A continuación, se describen las metodologías de cada una de estas fases.

### 2.1. Fase I: Determinación de la actividad fumigante de compuestos presentes en aceites esenciales promisorios.

#### 2.1.1. Cría de insectos:

Los insectos de *Tribolium castaneum* se obtuvieron de dos pies de cría, uno en el laboratorio de Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) de la Universidad Nacional de Colombia–Sede Bogotá; y otro del laboratorio del Grupo de Investigación en Fitoquímica (GIFUJ) de la Pontificia Universidad Javeriana. Se dispusieron 10 insectos en cada caja de harina de trigo con 5% levadura seca. Posteriormente, estas cajas se dispusieron en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de humedad ( $65 \pm 5$  % HR), temperatura ( $27 \pm 1$  °C) y oscuridad.



Figura 2-1 Fotografías de pies de cría de *Tribolium castaneum*.

### 2.1.2. Selección de compuestos presentes en aceites esenciales bioactivos:

Para la selección de los compuestos que se emplearon en el presente estudio, se establecieron tres criterios de priorización:

1. Se hizo una revisión de la composición química de los aceites esenciales con actividad promisorio frente a *T. castaneum* determinada en estudios previos en los grupos de investigación QuiProNab y GIFUN. De esta forma se seleccionaron aquellos compuestos mayoritarios y/o más frecuentes en estos AEs.
2. Se realizó una búsqueda en bases de datos (*Scielo, Google scholar, Science direct y scifinder*) de estudios de actividad insecticida frente *T. castaneum* de otros aceites esenciales y se incluyen los compuestos mayoritarios o frecuentes en estos reportes.
3. Finalmente, a fin de complementar los dos criterios anteriores, se incluyeron también compuestos de AEs con actividad insecticida que no tuviesen reportes sobre *T. castaneum*. Para ello, también se realizó una revisión bibliográfica en las bases de datos anteriormente descritas.

Teniendo en cuenta el procedimiento descrito se seleccionaron 49 compuestos.



### 2.1.3. Obtención de compuestos

La mayoría de los compuestos seleccionados se adquirieron comercialmente. Elitral, 2-nonanona, 1,8-cineol, safrol, sabineno, 1*R*-(-)-fenchona, *R*-(-)-carvona, *S*-(+)-carvona, *R*-(+)-pulegona, *S*-(-)-pulegona, (-)-isopulegol,  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -cariofileno, eugenol, (-)-terpinen-4-ol, metilisoeugenol, acetato de geranilo, farneseno, 3-careno,  $\gamma$ -terpineno, carvacrol, nonanal, acetato de linalilo, 2-decanona,  $\alpha,\beta$ -tujona, terpinoleno, timol, alcanfor, L-acetato de mentilo, acetato de terpenilo y piperitona de la casa comercial Sigma aldrich. El isoeugenol, geraniol,  $\alpha$ -terpineol, decanal, 2-undecanona y 4-undecanona de Alpha Aesar. Mientras que, el nonano, nerolidol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, farnesol, DL-limoneno, trans-anetol, citronelal, metileugenol y *p*-cimeno de Merck.

Por otro lado, el compuesto estragol se purificó a partir de 1,0 g de aceite esencial de *Artemisia dracunculus* comprado en la empresa Suagá Organic Herbs. Para ello, se empleó cromatografía en columna *flash*, usando como fase estacionaria silica gel 60 Merck (0.04-0.063mm) y como fase móvil hexano y acetato de etilo con gradiente de elución (desde 100% hexano hasta llegar a una proporción 70:30 hexano:AcOEt), obteniendo 762 mg de un compuesto puro, el cual fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y resonancia magnética nuclear (RMN) APT y <sup>1</sup>H (Ver anexo A).

### 2.1.4. Determinación de la actividad fumigante

Los 49 compuestos seleccionados fueron evaluados a una concentración de 100 ppm (equivalente a una concentración entre 650-730  $\mu$ M de acuerdo con el peso molecular de cada compuesto) para determinar su actividad fumigante empleando el método de vial en vial (Pascual, Ballesta, & Soler, 2004; Prieto, 2012), descrito en la Figura 2-2. En un papel Wathman® de 2 cm de diámetro se aplicó un volumen específico de cada compuesto, a fin de obtener una concentración final de 100 ppm (en mL por litro de aire). El papel se dispuso en la parte superior de un vial de cristal de 1,5 mL y este a su vez se introdujo en un vial de 22 mL (volumen final) con cierre hermético. Previamente en el vial de 22 mL, se habían colocado 10 insectos de *T. castaneum* sin sexar. Como control positivo se empleó Nuvan 50®, cuyo principio activo es diclorvox (100  $\mu$ L/L aire) (100 ppm) Para el control negativo se realizó el mismo procedimiento sin adicionar compuestos sobre el papel filtro. Se hicieron 5 réplicas para cada compuesto, así como para los controles positivo y negativo. Los viales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad ( $29 \pm 1$  °C y  $65 \pm$

5 % HR) y a las 24 horas se determinaron las respuestas de mortalidad. Para este fin, los insectos se consideraron muertos cuando al observar en un estereoscopio no presentaron movimiento de las patas y/o de las antenas después de estimulación por 15 segundos con alfiler entomológico (Prieto., 2012).



Figura 2-2 Método vial en vial para actividad fumigante.

Los porcentajes de mortalidad se determinaron con la ecuación 1:

$$\%Mortalidad = \frac{\% mortalidad tratamiento - \% mortalidad control}{100 - \%mortalidad del control} * 100$$

Ecuación 1 Ecuación de Abbott

Los compuestos que causaron mortalidad igual o mayor al 60% fueron seleccionados para continuar con el estudio de actividad fumigante y determinar las concentraciones letales cincuenta, como se describe a continuación:

#### 1.1.4.1. Determinación de las concentraciones letales frente a la actividad fumigante

Se evaluó la actividad toxica fumigante de los compuestos seleccionados sobre *Tribolium castaneum*, empleando el método de vial en vial anteriormente descrito, usando concentraciones entre 150 ppm y 0,1 ppm o hasta que el compuesto perdiera su efecto sobre el insecto. Los resultados del porcentaje de mortalidad se corrigieron utilizando la fórmula de mortalidad de Abbott (ecuación 1) y las correcciones por porcentaje de pureza. Posteriormente, los valores de mortalidad por dosis se sometieron a un análisis de regresión

Probit utilizando el software R (versión 3.52) y SPSS licenciado. Con esto se determinaron las  $CL_{90}$ ,  $CL_{50}$ ,  $CL_{30}$  y los intervalos de confianza correspondientes al 95%.

**1.1.4.2. Modelo de Regresión Probit**

El modelo de regresión Probit se utiliza para estimar las concentraciones letales 30, 50 y 90 del modo de acción fumigante para los compuestos, así:

Sean  $Y_{jk}$ : La cantidad de individuos muertos al aplicar el j-ésimo tipo de compuesto, cuando se aplica el mecanismo  $k$  ( $k = 1$ =fumigante;  $=2$ =contacto)

$C_{ij}$ : La concentración aplicada del compuesto j en cada replica i

Luego, para cada tipo de compuesto j se tiene  $\pi_{ij}$ : la probabilidad de que se muera un individuo ( $Y_{jk} = 1$ ) al aplicar en la muestra i una concentración  $C_{ij} = c$ , del compuesto tipo j

. Es decir:

$$\pi_{ij} = P(Y_{ij} = 1 | C_{ij} = c).$$

Por lo tanto, el modelo Probit para cada tipo de mecanismo, ajustado para j tipo de compuesto está dado por la:

$$\Phi^{-1}(\pi_{ij}) = \mu_j + \beta_j E_j C_{ij} \tag{2.2}$$

$$E_j = \begin{cases} 1 & \text{Si se aplicó la j ésima compuesto} \\ 0 & \text{Si no se aplicó j ésima compuesto} \end{cases}$$

Donde  $\mu_j$  y  $\beta_j$  son el intercepto y la pendiente en cada modelo

**2.1.4.4. Modelo de Estimaciones de CL para fumigante y de ajuste de respuesta de letalidad (Probit)**

Para la estimación de las concentraciones letales, se utiliza  $\Phi^{-1}(\cdot)$  que es el inverso de la distribución normal estándar, conocido como la función de enlace Probit y en particular, cuando  $\pi_{ij} = 0.5$  se utiliza para estimar la concentración letal de aproximadamente el 50% ( $CL_{50}$ ). Por lo tanto, se definen los siguientes estadísticos a estimar

$\widehat{CL}_{jk50}$  se define como la concentración letal de efectividad del 50% para cada tipo de compuesto j utilizando el mecanismo k.

$\widehat{CL}_{jk30}$  se define como la concentración letal de efectividad del 30% para cada tipo de compuesto j utilizando el mecanismo k.

$\widehat{CL}_{jk90}$  se define como la concentración letal de efectividad del 90% para cada tipo de compuesto j utilizando el mecanismo k.

El cálculo de las concentraciones letales se determinó mediante:

$$\widehat{CL}_{jk} = \frac{\Phi^{-1}(\pi_{ij}) - \widehat{\mu}_i}{\widehat{\beta}}$$

Donde,  $\Phi^{-1}(\cdot)$  es el inverso de la función de la distribución normal estándar y conocida como la función de enlace Probit. En particular, para estimar el valor  $\widehat{CL}_{50i}$  se tiene que:

$$\widehat{CL}_{50i} = \frac{\Phi^{-1}(0.5) - \widehat{\mu}_i}{\widehat{\beta}_i}$$

Es decir, la concentración estimada del i-ésimo compuesto necesaria para que la mortalidad (fumigante o contacto) sea aproximadamente de 50%. Adicionalmente, se tienen los intervalos de confianza para tipo de compuesto alrededor del parámetro  $CL_{50i}$  del 95%, que nos indica el rango donde está el parámetro con una significancia dada del  $\alpha = 0.05$ :

$$\left( \widehat{CL}_{50i} - z_{0.975} \sqrt{VAR(\widehat{CL}_{50i})}; \widehat{CL}_{50i} \mp \sqrt{VAR(\widehat{CL}_{50i})} \right)$$

Para estimar las Concentraciones Letales (CLs) se utilizó el método “vial en vial”, pero utilizando rangos de concentración entre los 0.1 y 100 [ $\mu\text{L/L}$ ]. Por cada concentración se realizaron cinco replicas, la mortalidad para fumigante y contacto se determinaron a las 24 horas y los criterios de mortalidad fueron idénticos a los que se utilizaron en el tamizaje preliminar. Posteriormente, los datos obtenidos fueron analizados en el software R versión 3.5.2 y el modelo utilizado fue una técnica no lineal, que permitió explicar una variable binaria (1=muerto; 0=No muerto) en términos de la concentración. Dicho modelo está conformado por la variable dependiente: Y: “mortalidad” y las variables explicativas fueron “los Compuestos de Aceites esenciales”, a diferentes niveles (concentraciones).

Por medio de los resultados de las concentraciones letales, se seleccionaron los compuestos que presentaron los mejores resultados del modelo fumigante para continuar con el estudio de actividad insecticida frente a *T. castaneum* en la fase II.

## 2.2. Fase II: Determinación de la actividad tóxica por contacto, repelente y antialimentaria

A fin de complementar los resultados de actividad fumigante obtenidos en la fase I, a los compuestos más activos se les determinó el potencial insecticida en los ensayos de toxicidad por contacto, repelencia y disuasión alimentaria como se describe a continuación:

### 2.2.1. Determinación de la toxicidad tóxica por contacto

Se determinó la toxicidad tóxica por contacto empleando la metodología descrita por Liu y colaboradores, como se muestra en la Figura 2-3 (Liu, Goh, & Ho, 2007). Diferentes cantidades del compuesto (mg) fueron aplicadas en el protórax de los insectos con ayuda de una micro jeringa. Para el caso de las cantidades más pequeñas se emplearon diluciones del compuesto en hexano, haciendo los respectivos cálculos para determinar la cantidad de compuesto aplicado (en el caso de las diluciones los insectos del control negativo se les aplica hexano en el protórax). Como control negativo se incluyeron en el ensayo insectos sin aplicar ningún compuesto y como control positivo se agregó HAWKER 25EC® cuyo principio es cipermetrina (ciano(3-fenoxifenil)metil-3-(2,2-dicloroetenil)-2,2-dimetilciclopropancarboxilato 25% p/v) Los insectos tratados fueron transferidos a viales de vidrio de 22 mL asegurando un total de 10 insectos en cada uno. Los viales se mantuvieron en la cámara de cultivo bajo condiciones de temperatura y humedad controladas ( $29 \pm 1$  °C y  $65 \pm 5$  % HR). Todos los tratamientos se realizaron con 3 réplicas. La mortalidad de los insectos se determinó a las 24 horas (Liu, Goh, & Ho, 2007).

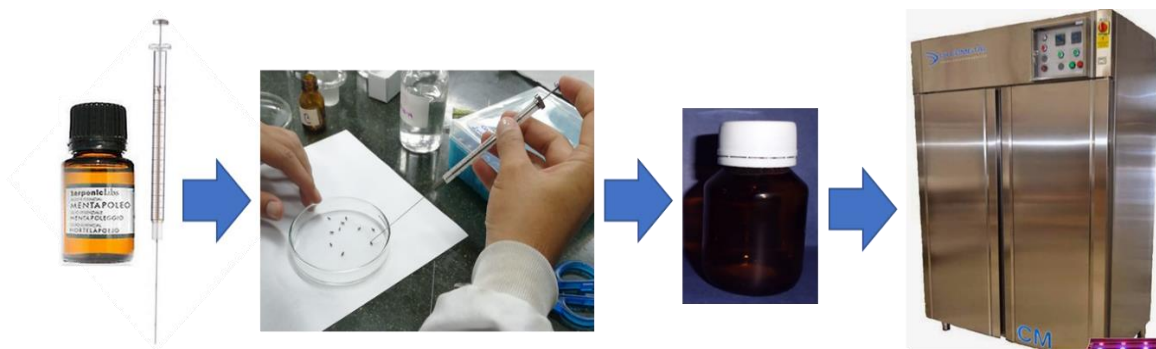


Figura 2-3 Método toxicidad tóxica por contacto sobre *Tribolium castaneum*

Se evaluaron dosis entre 0,2 mg/insecto-0,001 mg/insecto para todos los compuestos (J. Prieto, 2012) y los porcentajes de mortalidad se calcularon de acuerdo con la ecuación 1.

Los resultados se expresaron en función del porcentaje de mortalidad, se corrigieron utilizando la fórmula de mortalidad de Abbott y de acuerdo con el porcentaje de pureza. Posteriormente, los valores de mortalidad por dosis se sometieron a un análisis de regresión Probit utilizando el software R (versión 3.52) y SPSS licenciado. Con esto se determinaron las dosis letales 90 (DL<sub>90</sub>), dosis letales 50 (DL<sub>50</sub>) y dosis letales 30 (DL<sub>30</sub>) y los intervalos de confianza correspondientes al 95%, de la forma en que se indica en la sección 1.1.4.2.

## 2.2.2. Ensayo de actividad repelente

Para evaluar la actividad repelente se empleó el método de preferencia de áreas (Wagan, et al., 2016) con algunas modificaciones (Figura 2-4). Se tomaron discos de papel Whatman de 9 mm y se cortaron en partes iguales y se unieron usando cinta. Posteriormente se pusieron en la parte inferior de una caja de Petri, en una de las mitades del papel se aplicaron 500  $\mu\text{L}$  de una solución del compuesto en acetona a concentraciones de 0,1  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , 0,05  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  y 0,01  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . En la otra mitad se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de acetona como blanco. Posteriormente se dejó evaporar el solvente durante 3 minutos en una cabina de extracción. Adicionalmente, en el lado tratado se colocaron 3 gramos de harina de trigo cerca al borde de la caja. Luego en el centro de la caja se pusieron 10 insectos sin sexar, y las cajas se sellaron con Parafilm. Las cajas se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad ( $27 \pm 1$  °C y  $70 \pm 5$  % HR), y se registraron el número de insectos en las dos mitades de los discos de papel a las 2, 6 y 24 horas del inicio del ensayo. Se realizaron cinco réplicas para cada concentración evaluada. Como control positivo se empleó el repelente comercial Stay Off® que tiene como principio activo una formulación al 15% de IR3535 (acetilbutilamino propionato de 3-etilo).

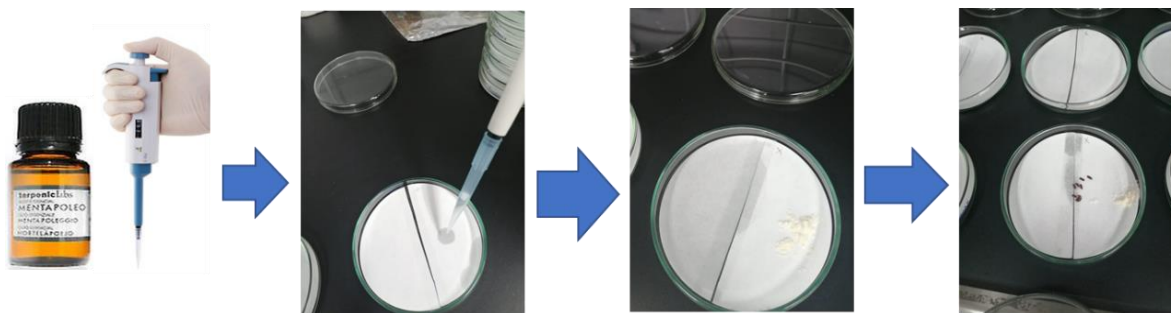


Figura 2-4 Método preferencia de áreas con alimento para actividad repelente sobre *T. castaneum*

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de repelencia (PR) para cada concentración, empleando la siguiente ecuación (Abdel-Rahman et. al 2011):

$$PR = \frac{\# \text{ insec en zona sin tto} - \# \text{ insec en zona con tto}}{\# \text{ insec en zona con tto} + \# \text{ insec en zona sin tto}} \times 100$$

La repelencia producida a diferentes concentraciones y tiempos se clasificó como se muestra en la siguiente tabla, de acuerdo con la escala de referencia de Abdel-Rahman et. al 2011.

Tabla 2-1 Clasificación de repelencia.

Porcentaje de repelencia	Clase
<0,1	0
0,1-20	I
20,1-40,0	II
40,1-60,0	III
60,1-80,0	IV
80,1-100	V

### 2.2.3. Actividad antialimentaria

Para determinar la actividad antialimentaria se empleó el método de discos de harina descrito por Xie y colaboradores (1996). Para ello, se prepararon suspensiones agua-harina mezclando 1,0 g de harina de trigo con 5 mL de agua destilada agitando con ayuda de ultrasonido. Empleando una micropipeta se tomaron 250  $\mu$ L y se elaboraron discos de harina (oblas) sobre cajas de Petri, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas y se transfieren a una incubadora para equilibrarlos a 27 °C y 65-70% HR durante 48 h. Posteriormente a los discos secos se les adicionaron diferentes volúmenes del compuesto disuelto en acetona, para obtener concentraciones finales de 300 ppm y 600 ppm. Los discos se dispusieron en viales plásticos y se pesaron. Posteriormente se ubicaron dentro de cada vial diez insectos sin sexar y se pesó el conjunto vial-disco-insectos. Los insectos empleados fueron mantenidos sin alimento por 48 horas antes del ensayo. El montaje del experimento se mantuvo en la cámara de cultivo durante 3 días (27  $\pm$  1 °C y 65  $\pm$  5 % HR). se aplicaron 500  $\mu$ L de acetona para producir los discos del control negativo dejando evaporar el solvente 3 minutos. Como control positivo se empleó extracto etanólico de semillas de Neem. Para cada ensayo se realizaron cinco (6) réplicas. Los Índices de Disuasión Alimentaria (IDA) se calcularon comparando los resultados obtenidos

con el alimento tratado con los observados con el alimento sin tratar, empleando la siguiente fórmula (Liu et al., 2007):

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

Formula índice de disuasión alimentaria (IDA) (Liu et al., 2007)

C= masa consumida de disco control

T= masa consumida de disco tratado

La actividad antialimentaria se clasifica según la siguiente Tabla: (Liu et al.2007):

Tabla 2-2 Clasificación de disuasión alimentaria.

% IDA	Clasificación
< 20	No disuasión alimentaria
>20<50	Disuasión alimentaria débil
>50<70	Disuasión alimentaria moderada
> 70	Disuasión alimentaria fuerte

### 2.3. FASE III: Diseño, evaluación y estabilidad preliminar de mezclas de constituyentes de aceites esenciales

A partir de los resultados de las 4 actividades (CL<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>, PR e IDA) de los 23 compuestos se empleó un modelo estadístico para diseñar, preparar y verificar mezclas insecticidas y repelentes con el fin de mejorar la actividad sobre el insecto de interés, como se presenta a continuación.

#### 2.3.1. Diseño de mezclas a partir de los compuestos con mejores resultados

Las mezclas se diseñaron utilizando el modelo de adición de concentración (AC) descrito en la sección 1.6. El modelo AC, a partir del Índice de Combinación (IC), permitió predecir las posibles interacciones sinérgicas, aditivas o antagonistas que podrían tener ciertas combinaciones de los compuestos con mejor resultados de las fases I y II. Para hacer las predicciones se empleó la ecuación 2 de IC:

$$IC = \frac{D_1}{Dm_1[fa/(1-fa)]^{1/m_1}} + \frac{D_2}{Dm_2[fa/(1-fa)]^{1/m_2}}$$

Ecuación 2 índice de combinación.



Donde D1 corresponde a una dosis evaluada del compuesto A y D2 a una dosis evaluada del compuesto B. Así se estimó el efecto de algunas mezclas binarias de volátiles, para este estudio se seleccionaron las mezclas que mostraron índices de combinación menores o iguales a 1.00 ( $IC \leq 1.00$ ). La proporción para cada combinación se dedujo a partir de la relación de las dosis involucradas de cada compuesto en la estimación mediante el Índice de combinación (IC).

### **2.3.2. Elaboración de mezclas**

A partir las predicciones del IC se diseñaron y evaluaron 15 mezclas binarias fumigantes y 8 mezclas binarias por contacto para ser evaluadas frente a *T. castaneum*. Para la preparación de las mezclas, se emplearon viales de cromatografía de 1.5 ml (septados), en los cuales se adicionaron las cantidades necesarias (volumen/volumen) de cada compuesto, a fin de ajustar la proporción obtenida en el diseño estadístico sin tener en cuenta el porcentaje de pureza. Las mezclas se prepararon en proporciones volumen/volumen (v/v) de acuerdo con la estimación dada por el IC.

### **2.3.3. Análisis de sinergismo de la actividad insecticida de las mezclas**

A las mezclas preparadas se les determinó el potencial insecticida frente a *T. castaneum* de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- a) Las mezclas binarias fumigantes fueron inicialmente tamizadas a una concentración cercana a la  $CL_{50}$  del compuesto más activo de la combinación. Esto se realizó a fin de asegurar que si se presentaran efectos sinergistas y de esta forma verificar de forma experimental las predicciones del modelo estadístico. Así que, las mezclas que presentaron un porcentaje de mortalidad mayor al 60% a esta concentración inicial, fueron seleccionadas para continuar con el estudio de actividad fumigante. A las mezclas promisorias se les determinó la concentración letal cincuenta de acuerdo con el método descrito anteriormente (ver numeral 2.1.4.2). Para ello, se evaluaron como mínimo 5 concentraciones y los resultados se ajustaron al modelo de regresión Probit, obteniendo la  $CL_{50}$  de cada mezcla. Cabe aclarar, que las mezclas cuyo porcentaje de mortalidad a la concentración inicial fue menor o igual al 50%, fueron descartadas puesto que no mostraron mejor actividad que los compuestos por sí solos.

**b)** Para las mezclas con actividad por contacto, se llevó a cabo un procedimiento similar, pero se tamizaron a una concentración cercana a la  $DL_{50}$  del compuesto más activo de la combinación. A las que presentaron porcentajes de mortalidad superiores al 60% se les determinaron las  $DL_{50}$ .

**c)** Finalmente, se determinó el tipo efecto sinergista (sinergismo, sinergismo moderado, sinergismo débil, aditividad) de las mejores combinaciones de acuerdo con la clasificación propuesta por Chao y Talalay empleando la ecuación 2 de IC, con una modificación en la fracción afectada, esta fracción experimental se calculó con los valores obtenidos para cada mezcla usando la ecuación 3 (Chao, 2012). Adicionalmente, se calculó el factor de sinergismo de cada compuesto de las diferentes mezclas evaluadas y la representación gráfica del sinergismo a través de los isobogramas.

$$f_a = 1/[1 + (D_m/D)^m]$$

Ecuación 3 Ecuación de fracción afectada para cálculo de IC experimental.

### **2.3.4. Caracterización fisicoquímica y de actividad insecticida de las mejores mezclas**

Se realizó un análisis calidad y estabilidad preliminar de las mezclas que mostraron los mejores resultados en la actividad frente a *T. castaneum*. Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica y biológica a diferentes tiempos (0 horas, 24 horas, 1 semana y 40 días). En el análisis fisicoquímico se determinaron las constantes físicas (densidad e índice de refracción ( $n_D^T$ )) y se analizaron en cromatografía de gases con detector FID (CG-FID) y cromatografía de gases acoplado espectrometría de masas (CG-EM). Adicionalmente, se hizo un seguimiento de la actividad fumigante a todos los tiempos del estudio.

#### **2.3.4.1. Densidad**

La determinación de la densidad se realizó en una balanza analítica con precisión de 5 cifras empleando una micropipeta de 10  $\mu$ L previamente verificada. Se tomó un volumen conocido del compuesto con la micropipeta y se colocó sobre un vidrio de reloj sobre la balanza se registró la masa de la balanza y con el volumen tomado con la micropipeta. La densidad de la mezcla se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula con tres experimentos por cada mezcla (Gabastou, 2005).

$$\rho = \frac{m}{v}$$

donde;  $\rho$ =Densidad     $m$ =masa     $v$ =volumen

#### 2.3.4.2. Índice de refracción

El índice de refracción se determinó empleando un refractómetro tipo ABBE, la longitud de onda de la luz es 589 nm. Se tomaron tres valores de muestras independientes y se promediaron (Martínez & González, 2011).

#### 2.3.4.3 Análisis de varianza de las constante físicas

Para el estudio de estabilidad preliminar de las constantes físicas (densidad e índice de refracción), se realizó un análisis no paramétrico de varianza de los resultados en el tiempo y las condiciones de almacenamiento, para ello se emplearon los test de Fligner-Killeen (Kargapoltsev, et al, 2017) y Wilcoxon (Woolson, 2007).

#### 2.3.4.4. Análisis cromatográfico

Para el análisis de cada mezcla se tomaron 25  $\mu$ L y se llevaron a un volumen final de 1 mL con n-hexano. En el Análisis por GC-FID se usó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC 2010, equipado con un detector de ionización de llama (FID), con un puerto de inyección Split/splitless (250 °C, relación de split 10) y un inyector automático Shimadzu AOC-20i. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar Zebron ZB-5 plus con fase estacionaria 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm D.I x 0,25  $\mu$ m). El gas de arrastre fue helio (99.9995%) con una velocidad lineal de 25.5 cm/s y flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del horno fue programada de 60 °C (1 min) @ 10 °C/min hasta 320 °C (5 min). Se utilizó una velocidad lineal de 25.6 cm/s y flujo constante de 1 mL/min. Además, se realizó comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) con los compuestos puros que constituían la combinación. Por otro lado, el análisis por CG-EM se realizó empleando un cromatógrafo de gases marca Shimadzu serie GC 2010 Plus acoplado a un detector selectivo de masas Shimadzu T804 Equipado con un puerto de inyección Split/splitless (250 °C, relación de split 10), un inyector automático Shimadzu AOC-20i. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar Zebron ZB-5 plus con fase estacionaria 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm D.I x 0.25  $\mu$ m). El gas de arrastre fue helio (99.9995%) con una velocidad lineal de 25.5 cm/s y flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del horno fue programada de 60 °C (1 min) @ 10 °C/min hasta 320 °C (5 min). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones (EI) con energía de 70

eV. Las temperaturas de la cámara de ionización, de la línea de transferencia y el cuadrupolo se mantuvieron a 250 °C, 270°C y 270°C respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos por medio de barrido automático de frecuencia (full scan), en el rango de masas de 40-800 m/z, con una velocidad de barrido de radiofrecuencia 1666 scans-1. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de sus espectros de masas con la base de datos NIST14. Además, se realizó comparación de los tiempos de retención con los compuestos puros que constituían la combinación.

#### **2.3.4.5. Actividad fumigante de las mejores mezclas**

La actividad fumigante se determinó empleando el método de vial en vial (2.1.4), determinado el porcentaje de mortalidad en los insectos empleando como concentración de estudio la CL<sub>50</sub> de cada mezcla.

### 3.Resultados y discusión

#### 3.1. Fase I: Determinación de la actividad fumigante

##### 3.1.1 Tamizaje de actividad fumigante

Con el objetivo de determinar la actividad fumigante de los 49 compuestos seleccionados para el estudio inicialmente se realizó un tamizaje a una concentración de 100 ppm empleando el método de vial en vial. Se calcularon los porcentajes de mortalidad y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3-1.

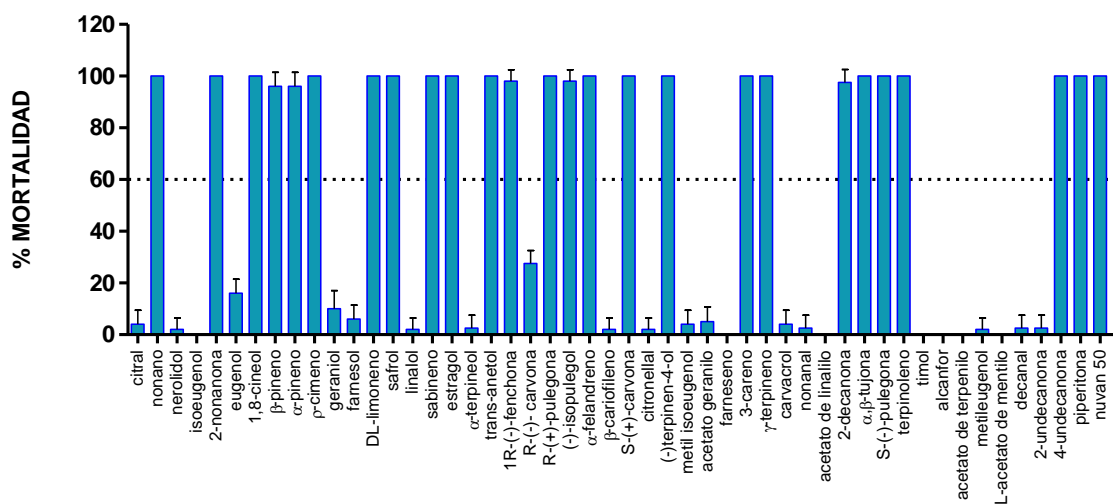


Figura 3-1 Resultados de actividad fumigante sobre *T. castaneum* para los compuestos evaluados a una concentración de 100 ppm.

En la Figura 3-1 se observa que más de la mitad de los compuestos seleccionados causaron porcentajes de mortalidad superiores al 60%. Dentro de los compuestos menos activos se encuentran principalmente los sesquiterpenos como el farneseno, nerolidol, farnesol y  $\beta$ -cariofileno los cuales presentaron porcentajes de mortalidad menores al 10% a esta concentración. De forma similar, los fenilpropanoides como el eugenol, isoeugenol,

metileugenol y metilisoegenol también presentaron bajos porcentajes de mortalidad (0-30%) en el tamizaje preliminar. Teniendo en cuenta que, dentro del grupo de los compuestos evaluados tanto los sesquiterpenos como los fenilpropanoides presentan los mayores pesos moleculares y puntos de ebullición, se podría inferir que al tener una menor volatilidad no pueden ejercer el efecto fumigante esperado, puesto que no logran ingresar por inhalación a las tráqueas del insecto (Navarro; et al., 2017). Algunos compuestos como alcanfor, carvacrol, timol, geraniol y eugenol, han sido reportados con bajo potencial fumigante como porcentajes de mortalidad inferiores a 30% en concentraciones entre 50 y 100 ppm (Rozman, et al, 2007; Kanda, et al.,2017; Abdelgaleil, et al., 2009).

Por otro lado, los compuestos con mayores porcentajes de mortalidad (>60%) a la concentración de 100 ppm poseen principalmente a los monoterpenos, los cuales poseen en general menores pesos moleculares y mayores presiones de vapor (Chaubey, 2015). Es importante destacar que, de los compuestos evaluados en el tamizaje, en este estudio se presenta el primer reporte en la literatura del efecto fumigante sobre *T. castaneum* para los compuestos nonano, 2-decanona, 4-undecanona, nerolidol, isoeugenol, farnesol, metil isoeugenol, acetato de geraniol, farneseno, nonanal, acetato de terpenilo, metileugenol, L-acetato de mentilo, decanal.

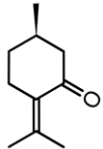
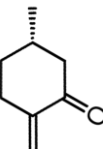
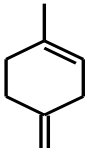
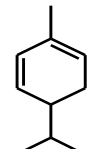
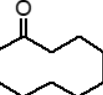
### **3.1.2. Determinación de las concentraciones letales de los compuestos activos del tamizaje**

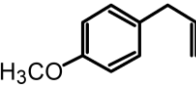
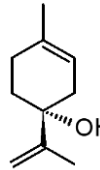
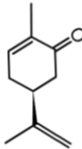
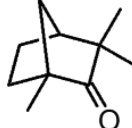
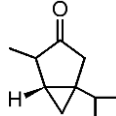
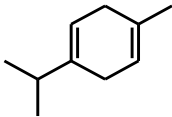
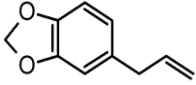
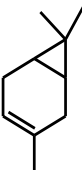
En el tamizaje anterior, 25 compuestos mostraron letalidad superior a 60% a 100 ppm, por tanto, fueron seleccionados para continuar con el estudio de la actividad fumigante. De los 25 compuestos, solo fue posible determinar las concentraciones letales de 23 de ellos, descartando la piperitona y el *trans*-anetol. En el caso de la piperitona, esta se descartó debido a que no se contaba con la cantidad suficiente para continuar el estudio. Respecto al *trans*-anetol, durante los ensayos con este compuesto se observó la aparición de una coloración amarilla en los discos de papel y se presentó una baja reproducibilidad en los resultados de los porcentajes de mortalidad, después de más de 5 repeticiones del ensayo completo. Para tratar de determinar si el compuesto presentaba algún grado de degradación durante el ensayo, los discos de papel se trataron con hexano para extraer los residuos presentes en el disco después de realizado el experimento. Los extractos obtenidos se analizaron por CG-EM, encontrando que el *trans*-anetol estaba presente y no fue posible detectar productos asociados a la degradación de éste. Por esta razón, este

compuesto fue descartado y no se continuó analizando en la determinación de las concentraciones letales.

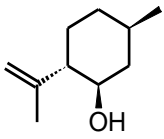
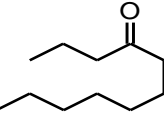
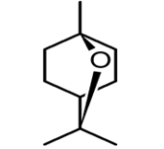
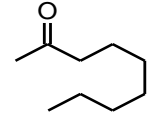
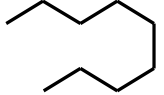
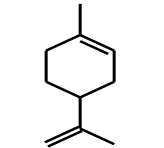
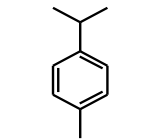
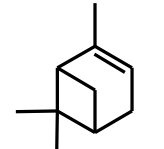
De esta forma, a los 23 compuestos restantes seleccionados en el tamizaje se les determinó la concentración letal por modo fumigante. Para ello, se emplearon como mínimo 6 concentraciones para cada compuesto en un rango entre 1-600  $\mu\text{M}$ . Los resultados de las  $\text{CL}_{90}$ ,  $\text{CL}_{50}$  y  $\text{CL}_{30}$  de los compuestos seleccionados se muestran en la Tabla 3-1.

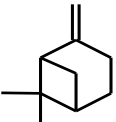
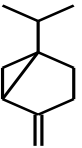
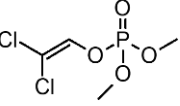
Tabla 3-1 Concentraciones letales (CL) de los compuestos promisorios por el modo de acción fumigante sobre *Tribolium castaneum*

COMPUESTOS	Presión de vapor Pa 20 °C *	Pendiente	CL ( $\mu\text{M}$ )		
			90 ( $\pm$ LI-LS)	50 ( $\pm$ LI-LS)	30 ( $\pm$ LI-LS)
R-(+)-Pulegona 	160,0	1,909	8,82 (7,32-12,99)	4,78 (3,64-5,74)	3,14 (0,75-4,17)
S-(-)-pulegona 	160,0	0.071	32,28 (25,94-44,91)	14,19 (10,30-18,72)	6,78 (1,38-10,55)
terpinoleno 	101,0	0,584	34,50 (31,30-38,52)	27,51 (23,64-30,71)	24,61 (20,07-27,95)
$\alpha$ -felandreno 	253,0	0,489	35,97 (34,15-38,24)	31,37 (28,45-32,69)	28,82 (30,86-40,35)
2-decanona 	66,0	0,323	41,91 (39,06-47,19)	32,86 (29,30-35,39)	29,19 (32,05-23,86)

estragol 	79,9	0,214	46,54 (40,57-71,32)	34,33 (30,81-39,98)	29,28 (21,38-32,54)
(-)-terpinen-4-ol 	53,2	0,050	63,61 (48,44-139,27)	39,64 (21,47-60,81)	29,82 (4,33-43,53)
S-(+)-carvona 	137,0	0,168	54,38 (49,53-92,20)	40,60 (15,84-44,67)	34,94 (13,44-40,74)
1R-(-)-fenchona 	108,0	0,067	62,84 (56,62-72,63)	41,62 (29,48-46,39)	32,97 (27,83-37,64)
$\alpha,\beta$ -tujona 	54,9	0,034	79,90 (65,71-110,50)	42,88 (29,60-54,69)	27,69 (7,37-39,23)
$\gamma$ -terpineno 	93,0	0,166	65,28 (58,59-76,19)	52,34 (14,77-58,85)	47,09 (18,65-55,49)
Safrol 	66,0	0,054	85,12 (71,83-114,15)	54,91 (46,21-66,21)	42,52 (31,59-51,43)
3-careno 	464,0	0,024	122,25 (110,44-140,98)	77,86 (69,40-86,25)	59,76 (48,22-68,29)



(-)-isopulegol 	93,0	0,019	145,64 (120,24-192,70)	82,59 (64,61-104,37)	56,83 (35,23-74,87)
4-undecanona 	66,0	0,049	115,60 (109,36-124,44)	89,94 (85,10-94,69)	79,41 (73,42-84,25)
1,8-cineol 	253,0	0,052	130,15 (123,88-138,90)	107,59 (103,25-111,82)	98,36 (93,60-102,71)
2-nonanona 	83,0	0,331	138,88 (130,31-158,13)	119,69 (114,55-127,33)	111,8 (105,75-117,12)
nonano 	593,0	0,043	205,88 (192,69-232,95)	176,72 (167,04-188,90)	164,83 (152,94-174,51)
DL-limoneno 	160,0	0,012	369,93 (328,68-448,00)	265,77 (240,00-299,47)	222,89 (193,61-248,79)
p-cimeno 	194,0	0,024	354,73 (309,56-438,49)	278,30 (249,49-335,84)	247,04 (201,92-281,34)
α-pineno 	632,0	0,012	401,54 (368,10-456,80)	306,66 (286,94-332,69)	267,87 (247,95-287,65)

<p><math>\beta</math>-pineno</p> 	390,0	0,010	514,23 (450,41-576,48)	371,22 (332,70-428,70)	312,63 (272,61-353,50)
<p>Sabineno</p> 	346,0	0,006	750,83 (686,39-846,51)	548,27 (506,24-599,04)	465,36 (422,76-507,56)
<p>nuvan 50</p> 	2,1	0,124	14,59 (13,39-15,38)	10,31 (8,82-11,10)	4,75 (4,07-5,88)

Convenciones: LS: Límite superior, LI: Límite inferior \* los límites tienen un 95% de confianza a partir del análisis Probit.

\*Datos Reportados en la literatura: <https://espanol.epa.gov/> , <https://www.sigmaaldrich.com/us-export.html>, <https://www.alfa.com/es/> y/o calculados con <https://www.acdlabs.com/products/percepta/index.php>

En la Tabla 3-1 se observa que la *R*-(+)-pulegona presentó el mayor potencial fumigante con una  $CL_{50}$  menor a 5  $\mu$ M, siendo dos veces más activa que el control positivo ( $CL_{50}$  10,31  $\mu$ M). La *S*-(-)-pulegona presentó un valor de  $CL_{50}$  de 14,19  $\mu$ M, comparable con la del control positivo. Por otro lado, 11 compuestos presentaron actividad moderada con  $CL_{50}$  entre 27 y 80  $\mu$ M, y 10 compuestos mostraron menor potencial de actividad con  $CL_{50}$  mayores a 80  $\mu$ M, siendo el sabineno el menos activo con  $CL_{50}$  de 547,23  $\mu$ M. Al comparar los resultados correspondientes a los dos compuestos con mayor actividad fumigante del presente estudio, con los reportados por Liu y colaboradores, se encuentra que en el estudio citado no es claro que enantiómero fue el evaluado, de acuerdo con la estructura documentada corresponde al enantiómero *R*, sin embargo, los datos espectroscópicos y experimentales proporcionados no especifican el tipo de isómero, además el valor de la  $CL_{50}$  es considerablemente mayor comparado al de nuestro estudio (>500  $\mu$ M)(Lui, et al, 2011). Esta misma situación se presenta en el reporte de García y colaboradores, en el cual no es claro qué tipo de isómero que se evaluó, pero los resultados obtenidos son comparables con los dos enantiómeros del presente estudio, cabe destacar que estas evaluaciones del estudio de referencia se realizaron en tiempos diferentes a los nuestros obteniendo los siguientes  $CL_{50}$ : 7,52  $\mu$ M a los 30 minutos, 6,33  $\mu$ M a los 60 minutos, 5,19  $\mu$ M a los 90 minutos y 3,91  $\mu$ M a los 150 minutos (García, et al., 2005). Teniendo en cuenta la

información anterior, y la revisión bibliográfica realizada, este estudio presenta el primer reporte de evaluación insecticida en conjunto de los dos enantiómeros *R* y *S* de la pulegona sobre *Tribolium castaneum*.

Previamente se ha descrito que la actividad fumigante tanto de aceites esenciales como de compuestos puros se encuentra directamente relacionada con propiedades físicas, como la presión de vapor (Corcuera, 2007; Rajendran & Sriramjini, 2008). Por ejemplo, se ha encontrado que los compuestos o mezclas que tiene mayores presiones de vapor pueden alcanzar concentraciones suficientemente altas en el aire, lo que les permite ingresar por la vía respiratoria del insecto y ejercer el efecto tóxico deseado (Del Puerto, et al, 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un análisis de los resultados de actividad fumigante en comparación con la presión de vapor reportada para los compuestos evaluados (Ver Tabla 3-1). Sin embargo, tal como se puede observar en la tabla, no se encontró una relación directa o proporcional entre la volatilidad de los compuestos y su actividad fumigante frente a *T. castaneum*. Por ejemplo, los enantiómeros de la pulegona que fueron los compuestos con mayor actividad tienen presiones de vapor 160 Pa, mismo que valor que tiene DL-limoneno el cual presentó una actividad considerablemente menor a los compuestos más activos, incluso  $\beta$ -pineno (390 Pa) siendo uno de los 5 compuestos con menor actividad tiene una presión de vapor casi 3 veces mayor que los enantiómeros de la pulegona.

Por lo anterior, se plantea que los resultados en el modo de acción fumigante en este estudio podrían estar relacionados con las características estructurales de los compuestos. De esta forma se realizó un análisis cualitativo de las posibles características estructurales que aportarían a la actividad fumigante frente a *T. castaneum*. Inicialmente, teniendo en cuenta la alta diversidad estructural de los compuestos, estos fueron subdivididos en 7 grupos: monoterpenos monocíclicos, monoterpenoides monocíclicos, monoterpenos bicíclicos, monoterpenoides bicíclicos, fenilpropanoides, cetonas alifáticas acíclicas y alcanos; de acuerdo con sus características principales. Basados en un análisis general, se lograron establecer algunas relaciones cualitativas entre la estructura y la actividad fumigante en los compuestos pertenecientes a los cuatro primeros grupos.

Por ejemplo, como se observa en la Figura 3-2 al comparar los monoterpenos monocíclicos con una o más insaturaciones: terpinoleno,  $\alpha$ -felandreno,  $\gamma$ -terpineno, DL-limoneno y  $\rho$ -cimeno (grupo 1) solo se encuentran diferencias en la posición de las insaturaciones del

núcleo. En general estos compuestos poseen una estructura base dada por un ciclo de seis miembros con un sustituyente metilo en la posición 4 del anillo y un sustituyente isopropilo, isopropenil o isopropilideno en la posición 1. Comparando las concentraciones letales para estos compuestos se observa que la insaturación exocíclica del sustituyente isopropilideno en el compuesto terpinoleno favorece la actividad fumigante en comparación con los sustituyentes isopropenil del DL-limoneno e isopropilo del  $\alpha$ -felandreno y  $\gamma$ -terpineno, y  $p$ -cimeno. Cabe destacar, que la  $CL_{50}$  obtenida para el DL-limoneno en el presente estudio, fue mayor a la reportada en estudios previos, lo cual puede deberse variaciones en los métodos empleados en este modo de acción como la diferencia de recipiente en que se contiene el ensayo, en este caso a diferencia del nuestro, los insectos estaban dentro de un recipiente de volumen menor al que contenía todo el experimento (Tripathi; et al, 2003a). Por otra parte, en este grupo de compuestos el  $p$ -cimeno presentó la menor actividad, considerando que este es el único de los monoterpenos monocíclicos que posee un anillo aromático, se podría proponer que la aromaticidad disminuye considerablemente su potencial fumigante.

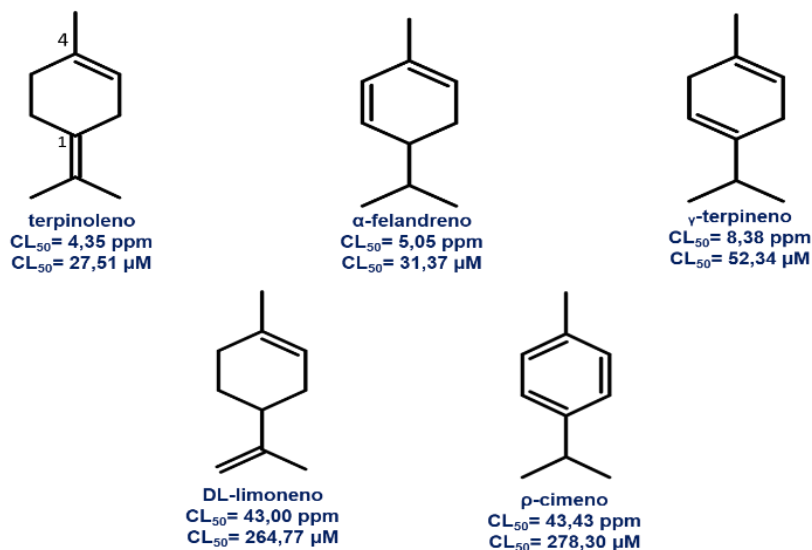


Figura 3-2 Monoterpenos monocíclicos evaluados sobre *T. castaneum*

Por otro lado, para los monoterpenoides monocíclicos *R*-(+)-pulegona, *S*-(-)-pulegona, *S*-(+)-carvona, (-)-terpinen-4-ol e (-)-isopulegol; se encontró que resultaron ser el grupo de compuestos con el mayor potencial fumigante frente a *T. castaneum* (ver Figura 3-3). Dentro de ellos, los enantiómeros *R* y *S* de la pulegona fueron los compuestos más activos con  $CL_{50}$  comparables o incluso menores que el control positivo. Sin embargo, las diferencias en las  $CL_{50}$  de permiten evidenciar que la *R*-(+)-pulegona resultó ser tres veces más activa que su enantiómero, por lo que se puede inferir que la estereoquímica de estos compuestos

está directamente relacionada con la actividad fumigante. Para el caso de los enantiómeros de la carvona, para el enantiómero S se encontró una actividad fumigante moderada ( $CL_{50}$  de 40,61  $\mu$ M, comparable con el reporte de Tripathi y colaboradores (26,07  $\mu$ M) (Tripathi, et al, 2003b), mientras que el enantiómero R resultó ser inactivo con una  $CL_{50}$  mayor a 700  $\mu$ M. En este caso la estereoquímica resultó ser aún más determinante para ejercer el efecto fumigante sobre *T. castaneum*. Adicionalmente, otros compuestos con el mismo núcleo base pero con oxigenaciones tipo hidroxilo, como en el caso de (-)-terpinen-4-ol y el isopulegol, mostraron una menor actividad respecto a los monoterpenoides de tipo cetona. Lo anterior indicaría que la presencia del grupo carbonilo podría influenciar positivamente la actividad fumigante sobre el insecto de interés.

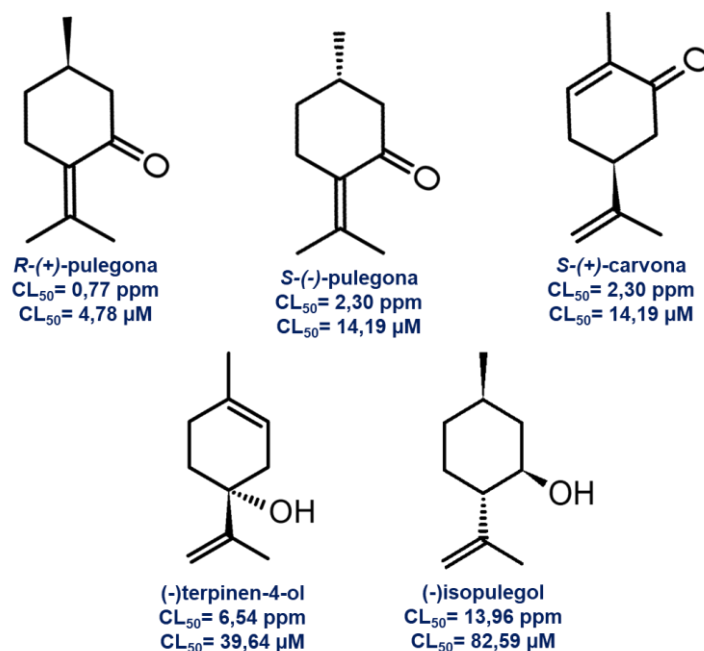


Figura 3-3 Estructuras químicas de monoterpenoides monocíclicos.

En cuanto al grupo conformado por los monoterpenos bicíclicos y comparando con los monoterpenos monocíclicos como se observa en la Figura 3-4, se encontró que los primeros poseen menor actividad. De lo anterior se podría inferir que la presencia de dos ciclos en la estructura del monoterpeno disminuye la actividad insecticida. En este grupo el 3-careno (77,87  $\mu$ M) correspondiente a un biciclo (4.1.0), fue el más promisorio en comparación con los demás monoterpenos bicíclicos, el resultado exhibido por 3-careno en nuestro estudio es comparable al de Luo y colaboradores ( $CL_{50}$ :92,47  $\mu$ M) siendo muy similares las metodologías desarrolladas durante la evaluación (Luo, et al., 2019), los

compuesto restantes dentro de este grupo, los cuales poseen estructuras bicíclicas (3.1.0) como sabineno y bicíclicas (3.1.1) como los dos pinenos, los cuales mostraron  $CL_{50}$  superiores a 300  $\mu\text{M}$ . Para el caso de los monoterpenoides bicíclicos *R*-fenchona y 1,8-cineol, los cuales poseen oxigenaciones de tipo carbonilo y éter respectivamente, mostraron mayor potencial fumigante que los monoterpenos bicíclicos, en este caso siendo más activa *R*-fenchona con una  $CL_{50}$ :41,62  $\mu\text{M}$ , lo cual podría indicar que el grupo carbonilo en su estructura favorece la actividad fumigante. Los resultados de estos dos últimos compuestos en el estudio Abdelgaleil y colaboradores, es comparable para el 1,8-cineol, el cual en nuestro reporte obtuvo una  $CL_{50}$ :107,59 y en el estudio citado  $CL_{50}$ :96,82. Contrario al caso de *R*-fenchona, cuyo reporte fue mayor ( $CL_{50}$ :284,71  $\mu\text{M}$ ) contrastado con la concentración obtenida en el nuestro ( $CL_{50}$ :41,62  $\mu\text{M}$ ), la diferencia en los resultados obtenidos es difícil determinarla, ya que la metodología empleada es similar a la nuestra, solo que en el estudio citado el papel con el compuesto fue ubicado en la tapa del recipiente que contenía el experimento, otra diferencia en la metodología reportada fue el número de insectos por replica(20 insectos)( Abdelgaleil, et al., 2008). Por otro lado, el resultado que se obtuvo para el sabineno ( $CL_{50}$ :88,70  $\mu\text{M}$ ) es mayor respecto al estudio de Wang y colaboradores, quienes determinaron una  $CL_{50}$ :28,74  $\mu\text{M}$ , esta podría estar influenciada por la pureza del compuesto empleado en los experimentos, ya que en el estudio citado no especifican el porcentaje de pureza, además que el diseño experimental es semejante al nuestro (Wang, et al., 2019).

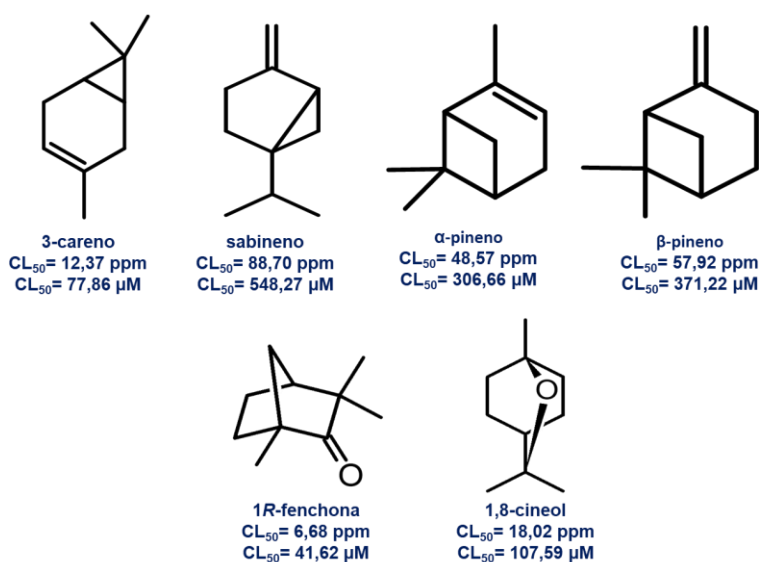


Figura 3-4 Estructuras químicas de monoterpenos y monoterpenoides bicíclicos.

El análisis anterior, nos permitió proponer algunas características estructurales que podrían jugar un papel importante en la actividad fumigante de los monoterpenos como lo son: las oxigenaciones de tipo carbonilo y la presencia de sustituyentes con insaturaciones exocíclicas, particularmente del tipo isopropilideno (ver Figura 3-5). Estas características, podrían conferirle algunos efectos electrónicos y de rigidez al núcleo base del monoterpreno; por tanto, se podría esperar que fueran importantes para establecer interacciones con el sitio activo de los receptores en el insecto. Sin embargo, esta es tan solo una primera aproximación al estudio de la actividad frente a *T. castaneum*, por lo tanto, estas hipótesis deben ser confirmadas con ensayos complementarios, estudios de acoplamiento molecular y/o con estudios cuantitativos de relación estructura-actividad.

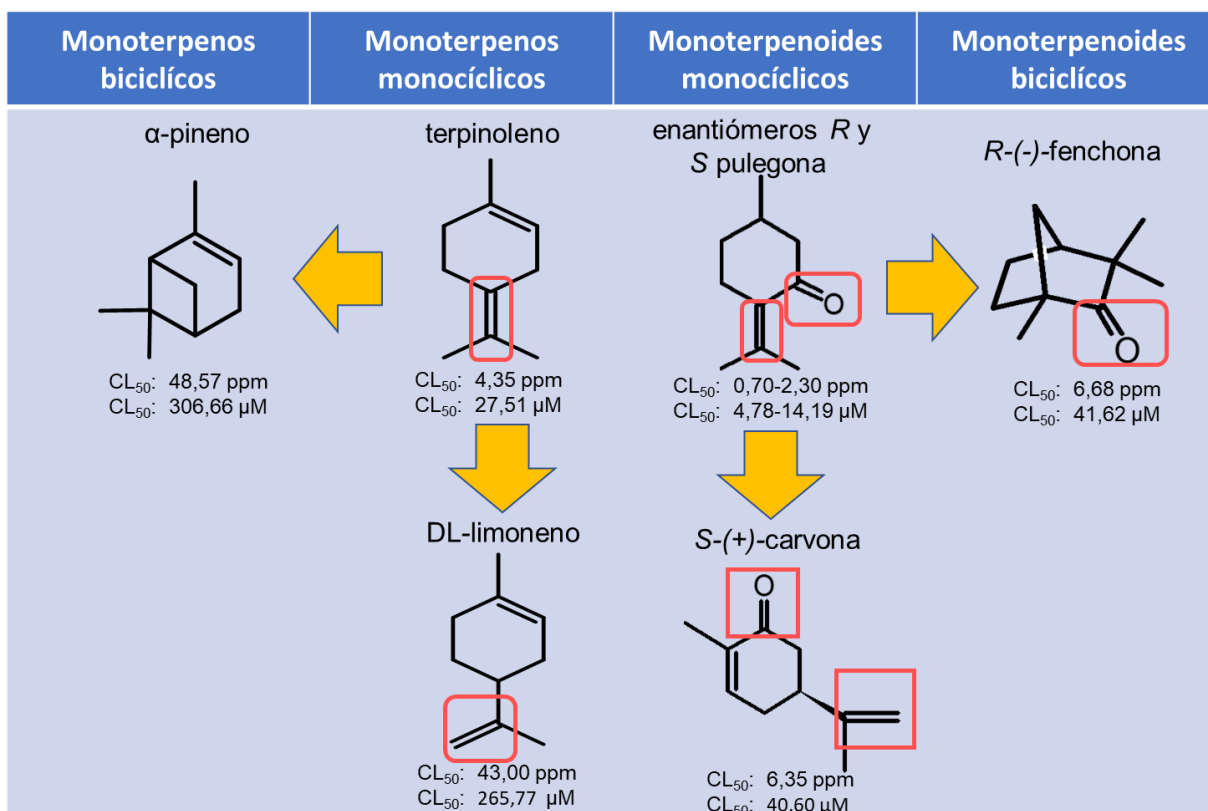


Figura 3-5 Análisis estructura-actividad de algunos grupos de compuestos del tamizaje por modo de acción fumigante.

Otro tipo de compuestos que se evaluaron fueron los fenilpropanoides, de los cuales solo el estragol y el safrol fueron activos, con concentraciones letales menores a 50  $\mu$ M. En este caso, el estragol presentó una mayor actividad que el safrol. Considerando que solo se diferencian en la presencia de un grupo metoxilo (en el estragol) y uno metilendioxi (safrol), se propone también de forma muy preliminar que en el modo de acción fumigante la

presencia de sustituyentes metoxilo favorecen este efecto. Sin embargo, se recomienda realizar estudios con un grupo mayor de fenilpropanoides para determinar de una forma más veraz estas relaciones de estructura-actividad. El estragol ha sido previamente reportado con actividad fumigante por Olmedo y colaboradores, sin embargo, la metodología empleada difiere de la nuestra, en el estudio citado, el compuesto fue evaluado en agua, con diluciones en etanol y variaciones en el tamaño del recipiente que contenía el ensayo. Por lo anterior no es posible comparar los resultados (Olmedo, et al., 2015).

A los 23 compuestos seleccionados en el tamizaje inicial también se les evaluó la actividad frente a *T. castaneum* por otros modos de acción, a fin de robustecer nuestros resultados y aumentar las posibilidades de aplicación en el control del insecto.

## **3.2. Fase II: Determinación de la actividad tóxica por contacto, repelente y antialimentaria**

Los resultados de la actividad tóxica por contacto, repelente y antialimentaria se presentan a continuación:

### **3.2.1. Toxicidad tóxica por contacto de los compuestos con potencial fumigante**

Con el fin de determinar la toxicidad por contacto de los compuestos sobre adultos de *T. castaneum*, se aplicaron diferentes cantidades de los compuestos puros o en disolución con hexano, en el protórax de los insectos y se determinó el porcentaje de mortalidad a las 24 horas (Lui et al., 2007). Los resultados obtenidos en el ensayo se presentan en la Tabla 3-2, en donde se muestran las dosis letales 30, 50 y 90, así como los valores de pendiente de acuerdo con cada una de las ecuaciones que representan las regresiones tipo Probit.

En la actividad tóxica por contacto se encontró que 15 de los compuestos evaluados presentaron  $DL_{50}$  inferiores a 50  $\mu\text{g}/\text{insecto}$ ; mientras que los 8 restantes mostraron valores entre 50 y 150  $\mu\text{g}/\text{insecto}$ . De forma general se observó que los compuestos oxigenados exhiben una mayor toxicidad por contacto, siendo los derivados monoterpénicos los de mayor potencial, seguidos fenilpropanoides y el hidrocarburo. Dentro de los compuestos más activos, se destacan la *S*-(+)-carvona, safrol, *R*-(+)- pulegona y 4-undecanona, puesto que presentaron  $DL_{50}$  menores a <10  $\mu\text{g}/\text{insecto}$  y comparables con el control positivo. Adicionalmente, estos compuestos poseen altos valores de pendiente en la ecuación de la



recta, lo que indica que se requieren los menores cambios en la concentración para lograr cambios significativos en la mortalidad del insecto. Aunque la 2-undecanona, el  $\gamma$ -terpineno y el DL-limoneno no exhibieron las DL<sub>50</sub> más bajas, si presentaron valores altos en sus pendientes, lo que indicaría que una pequeña variación en la concentración se podría aumentar significativamente la mortalidad de los insectos, lo que respaldaría su potencial actividad insecticida frente *T. castaneum*. Es importante destacar que este estudio representa el primer reporte de toxicidad tóxica por contacto para los compuestos: nonano, 2-nonanona,  $\alpha$ -felandreno, 2-decanona,  $\alpha,\beta$ -tujona, 4-undecanona.

Tabla 3-2 Dosis letales de los compuestos activos del tamizaje sobre *Tribolium castaneum*

Compuesto	Pendiente	DL <sub>90</sub> ( $\pm$ LI-LS) $\mu\text{g/insecto}$	DL <sub>50</sub> ( $\pm$ LI LS) $\mu\text{g/insecto}$	DL <sub>30</sub> ( $\pm$ LI-LS) $\mu\text{g/insecto}$
<b>S(+)-carvona</b>	1,7968	9,38 (7,29-15,63)	4,17 (3,13-6,25)	3,13 (1,04-4,17)
<b>safrol</b>	0,4857	12,37 (10,31-15,46)	7,22 (6,19-8,25)	5,15 (3,09-6,19)
<b>R(+)-pulegona</b>	0,6727	11,118 (10,00-13,33)	7,78 (6,67-7,78)	5,56 (4,44-6,67)
<b>4-undecanona</b>	0,2922	23,47 (18,37-35,71)	9,18 (5,10-12,24)	3,06 (2,04-6,12)
<b>estragol</b>	0,1245	25,26 (22,11-30,53)	15,79 (13,68-17,89)	11,58 (9,47-13,68)
<b>(-)isopulegol</b>	0,1548	26,53 (23,47-30,61)	18,37 (16,33-20,41)	15,31 (12,24-17,35)
<b>(-)terpinen-4-ol</b>	0,1078	30,53 (26,32-37,89)	18,95 (15,79-23,16)	13,68 (10,53-16,84)
<b>S(-)-pulegona</b>	0,0996	37,76 (31,63-50,00)	22,45 (18,37-27,55)	16,33 (11,22-20,41)
<b>1,8-cineol</b>	0,1006	38,38 (32,32-49,49)	23,23 (20,20-27,27)	17,17 (13,13-20,20)
<b>2-nonanona</b>	0,1625	39,39 (34,34-51,52)	28,28 (26,26-30,30)	24,24 (21,21-27,27)
<b>2-decanona</b>	0,3412	39,80 (34,69-56,12)	28,57 (24,49-33,67)	24,49 (17,35-28,57)
<b><math>\alpha,\beta</math>-Tujona</b>	0,1562	48,57 (44,29-55,71)	38,57 (34,29-41,43)	34,29 (30,00-37,14)
<b>terpinoleno</b>	0,0319	85,88 (72,94-107,06)	45,88 (37,65-55,29)	29,41 (20,00-37,65)
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b>	0,5723	58,95 (55,79-65,26)	48,42 (44,21-51,58)	44,21 (37,89-47,37)
<b>1R(-)-fenchona</b>	0,1273	64,29 (60,20-73,47)	50,00 (44,90-53,06)	43,88 (36,73-47,96)
<b>DL-limoneno</b>	0,2151	64,21 (60,00-71,58)	53,68 (49,47-56,84)	49,47 (43,16-52,63)
<b>sabineno</b>	0,1056	82,67 (77,33-94,67)	64,00 (57,33-68,00)	56,00 (46,67-61,33)
<b><math>p</math>-cimeno</b>	0,0494	92,93 (82,83-109,09)	66,67 (59,60-75,76)	56,57 (48,48-63,64)
<b><math>\beta</math>-pineno</b>	0,0819	85,71 (80,61-95,92)	70,41 (65,31-74,49)	64,29 (57,14-68,37)
<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	0,0622	91,75 (85,57-103,09)	71,13 (65,98-76,29)	62,89 (55,67-68,04)
<b>nonano</b>	0,0175	188,89 (138,38-377,78)	93,94 (59,60-149,49)	55,56 (6,06-88,89)
<b>3-careno</b>	0,0211	175,56 (150,00-218,89)	111,11 (95,56-131,11)	84,44 (68,89-100,00)
<b><math>\alpha</math>-felandreno</b>	0,0169	190,82 (156,12-272,45)	142,35 (111,76-183,53)	110,59 (74,12-141,18)
<b>cipermetrina</b>	0,0825	2,00 (1,00-4,00)	1,00 (0,05-2,00)	0,75 (0,50-1,00)

LI: Límite inferior; LI: Límite superior \*los limites tienen un 95% de confianza.

Los compuestos menos activos por este modo de acción fueron los monoterpenos 3-careno ( $DL_{50}$  175,56  $\mu\text{g/insecto}$ ) resultado prometedor respecto al reportado por Lou y colaboradores quienes reportaron  $DL_{50}$  64800  $\mu\text{g/insecto}$ , los ensayos empleados para los dos estudios comprendían la aplicación tópica, por lo cual no se encuentra una razón para la diferencia entre los resultados, la variación podría estar relacionada con la pureza del compuesto empleado, sin embargo no es una aclaración que haga parte del estudio citado (Luo, et al., 2019). El compuesto menos activo fue  $\alpha$ -felandreno ( $DL_{50}$  190,82  $\mu\text{g/insecto}$ ). Comparando estos resultados con el modo de acción fumigante se observa un gran divergencia en la actividad, teniendo en cuenta que estos dos compuestos, en particular el  $\alpha$ -felandreno mostró alto potencial en la actividad fumigante. Caso contrario, algunos compuestos como S-(+)-carvona (el mayor toxico por contacto de este estudio), los enantiómeros de la pulegona, el estragol y el safrol hacen parte de los 10 compuestos que mostraron mayor actividad por estos dos modos de acción, estos resultados cumplen algunas expectativas planteadas para el proyecto como el diseño de mezclas a partir de sustancias volátiles que cuenten con potencial multiefecto sobre el insecto.

Otros compuestos alcanzaron valores de  $DL_{50}$  (entre 30  $\mu\text{g/insecto}$ -60  $\mu\text{g/insecto}$ ) como:  $\alpha,\beta$ -tujona, terpinoleno,  $\gamma$ -terpineno, 1*R*-(-)-fenchona, DL-limoneno, sabineno y  $p$ -cimeno. Entre estos el sabineno obtuvo una  $DL_{50}$  de 60,0  $\mu\text{g/insecto}$  comparable a la reportada por Wang y colaboradores, quienes determinaron una  $DL_{50}$  48.2  $\mu\text{g/insecto}$ , en este estudio se empleó la metodología tópica por contacto, similar a la nuestra (Wang, et al., 2019) .

Respecto al compuesto más activo en la actividad por contacto en el presente estudio, la S-(+)-carvona, cabe destacar que previamente Fang y colaboradores reportaron que el estereoisómero *R* presentó una  $DL_{50}$  de 2,64  $\mu\text{g/insecto}$  frente a *T. castaneum*. Así que al comprar los resultados se podría inferir que en este caso la estereoquímica no influye en la actividad tóxica por contacto para este compuesto. En el mismo estudio fue evaluado el D-limoneno, el cual presentó una  $DL_{50}$  menor (20,64  $\mu\text{g/insecto}$ ) a la obtenida en nuestro estudio (53,69  $\mu\text{g/insecto}$ ). Es importante mencionar que en el presente estudio se empleó la mezcla de isómeros de limoneno, lo que podría indicar que el isómero D del limoneno podría tener mayor potencial insecticida por contacto sobre el insecto (Fang, et al, 2010). Este compuesto, también ha exhibido alto potencial por este modo de acción en diferentes plagas de granos almacenados, dentro de las que se encuentran el barrenador menor del grano (*R. dominica*), el gorgojo del arroz (*S. oryzae*), y el escarabajo plano del grano

(*Cryptolestes pusillus*) (Lopez, et al., 2010; Badaway, et al., 2010; Abdelgaleil, et al., 2009). De forma similar, se encontró los enantiómeros de la pulegona, presentaron resultados dependientes de la estereoquímica, en donde nuevamente la *R*-(+)-pulegona mostró mayor actividad ( $DL_{50}$  7,78  $\mu\text{g/insecto}$ ) respecto a la *S*-(-)-pulegona ( $DL_{50}$  22,45  $\mu\text{g/insecto}$ ), siendo casi tres veces menos activa. Estos resultados nos permitieron observar que en el modo de acción por contacto las características tridimensionales juegan un papel crucial en la actividad de algunos compuestos, lo cual podría estar relacionado con el sitio de acción de estos.

Es importante resaltar que la *S*-(+)-carvona presentó una  $DL_{50}$  de 4,17  $\mu\text{g/insecto}$ , muy cercana a la obtenida para el control positivo cipermetrina ( $DL_{50}$  1,0  $\mu\text{g/insecto}$ ); lo que respalda el alto potencial tóxico por contacto de este monoterpenoide.

Por otro lado, cabe destacar que no se pudieron establecer otros patrones de relación estructura-actividad en la toxicidad por contacto. Sin embargo, se encontró que los 12 compuestos que presentaron las menores dosis letales poseen sustituyentes oxigenados, aunque, dichas oxigenaciones pertenecen a núcleos diferentes. Por ejemplo, oxigenaciones tipo carbonilo en terpenoides monocíclicos como los enantiómeros *S*-(+)-carvona, *R*-(+)-pulegona y *S*-(-)-pulegona; así como oxigenaciones tipo carbonilo en cetonas alifáticas como la 4-undecanona, 2-nonanona y 2-decanona. Así que, al no observarse un patrón claro que oriente una relación de estructura-actividad sólida se recomienda hacer la evaluación de un grupo de compuestos más grande, y cuyas estructuras estén directamente relacionadas con los núcleos más activos encontrados en el presente estudio.

### **3.2.2. Actividad repelente de los compuestos con potencial fumigante**

Para continuar con el estudio de actividad sobre el insecto de los compuestos seleccionados en el tamizaje preliminar se evaluó la actividad repelente empleando el método de preferencia de área. En el presente estudio se realizó una modificación al método reportado por Wagan y colaboradores (Wagan, et al., 2016), que consistió en incluir alimento (harina) en el área tratada, con el fin de hacer una mejor aproximación a la acción repelente deseada. Esta modificación fue incluida en el ensayo teniendo en cuenta reportes previos de literatura y considerando la potencial aplicación de los compuestos en los sitios

de almacenamiento de granos y harinas. De esta forma el ensayo simula mejor las condiciones de repelencia de los compuestos sobre los insectos objetivo.

Inicialmente se realizó el ensayo a una concentración de  $0,1 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  para los 23 compuestos y de acuerdo con los porcentajes de repelencia obtenidos se seleccionaron las concentraciones para los posteriores ensayos. Debido a que la mayoría de los compuestos presentaron un bajo potencial repelente a la concentración inicial se decidió incluir solamente dos concentraciones adicionales:  $0,05 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  y  $0,01 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ . En la tabla 3-3 se presentan los porcentajes y clases de repelencia que presentaron los compuestos evaluados.

De acuerdo con los porcentajes de repelencia y la clasificación según Abdel-Rahman, los compuestos evaluados mostraron alta diversidad de resultados. Sin embargo, tal como se observa en la Tabla 3-3, la mayoría de los compuestos mostraron baja actividad repelente, con clasificación 0. Dentro de ellos, se encuentran algunos monoterpenos y monoterpenoides como el  $\alpha$ -felandreno,  $p$ -cimeno,  $\gamma$ -terpineno, 3-careno,  $\beta$ -pineno, terpinoleno y 1,8-cineol; así como algunas cetonas (2-nonanona) y alcanos como el nonano: Todos los compuestos anteriormente mencionados fueron inactivos a las tres concentraciones evaluadas y en todos los tiempos del ensayo.

También se observaron comportamientos atípicos con variaciones de los porcentajes de repelencia dentro de las concentraciones o incluso en los tiempos de ensayo. Por ejemplo, el terpinoleno a la concentración más baja ( $0,01 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ) a las 2 horas presentó un porcentaje de repelencia del 16%, sin embargo, a las 6 y 24 horas de ensayo se observaron porcentajes de repelencia negativos, comportándose como un compuesto atrayente.

Tabla 3-3 Porcentajes y clases de repelencia de los compuestos promisorios del tamizaje sobre *T.castaneum*

COMPUESTO	0,1 µl/Cm2						0,05 µl/cm2						0,01 µl/cm2					
	2 HORAS		6 HORAS		24 HORAS		2 HORAS		6 HORAS		24 HORAS		2 HORAS		6 HORAS		24 HORAS	
	PR	C	PR	C	PR	C	PR	C	PR	C	PR	C	PR	C	PR	C	PR	C
nonano	56±8,9	III	-84±8,9	0	-96±8,9	0	-60±14,1	0	-68±10,9	0	-96±8,9	0	-44±8,9	0	-2±4,4	0	-6±13,4	0
2-nonanona	-76±8,9	0	-96±8,9	0	-64±8,9	0	-76±8,9	0	-100±0,0	0	-100±0,0	0	-60±0,0	0	-82±4,4	0	-72±10,9	0
1,8-cineol	-84±8,9	0	-84±8,9	0	-68±17,8	0	-76±8,9	0	-76±8,9	0	-100±0,0	0	-24±8,9	0	-60±0,0	0	-76±8,9	0
β-pineno	-8±17,8	0	-8±17,8	0	-56±8,9	0	-44±8,9	0	-76±8,9	0	-100±0,0	0	-44±8,9	0	-6±13,4	0	-2±4,4	0
α-pineno	-16±8,9	0	-48±17,8	0	-12±17,8	0	8±17,8	I	8±10,9	I	28±10,9	II	-72±17,8	0	-68±10,9	0	-4±8,9	0
ρ-Cimeno	-44±25,7	0	-28±17,8	0	-44±8,9	0	-48±17,8	0	-56±8,9	0	-72±10,9	0	-60±0,0	0	-76±8,9	0	-48±23,8	0
DL-limoneno	28±17,8	II	76±8,9	IV	64±8,9	IV	88±7,8	V	72±10,9	IV	60±18,2	III	16±8,9	I	-36±8,9	0	-8±17,8	0
safrol	100±0,0	V	96±8,9	V	96±8,9	V	88±17,8	V	72±20,3	IV	92±10,9	V	-24±8,9	0	-60±0,0	0	0±0,0	0
sabineno	-8±17,88	0	4±23,6	I	-36±8,9	0	-8±10,9	0	44±8,9	III	16±8,9	I	-24±8,9	0	-24±8,9	0	-40±0,0	0
estragol	56±8,9	III	-16±8,9	0	4±8,9	I	-28±10,9	0	24±16,7	II	-8±10,9	0	-36±8,9	0	-4±8,9	0	-24±8,9	0
R(-)-fenchona	-12±10,9	I	-68±18,9	0	-80±0,0	0	-36±8,9	0	24±6,7	II	-24±8,9	0	-56±8,9	0	-48±16,8	0	0±0,0	0
R(+)-pulegona	92±10,9	V	64±8,9	III	20±0,0	I	12±10,9	I	8±17,8	I	32±30,3	II	-52±17,8	0	4±8,9	I	-64±8,9	0
(-)-isopulegol	48±10,9	III	4±8,9	I	0±0,0	0	-49±12,0	0	-28±10,9	0	-48±17,8	0	-60±0,0	0	-56±8,9	0	-64±8,9	0
α-felandreno	40±0,0	II	-92±17,8	0	-96±8,9	0	-28±10,9	0	-4±8,9	0	-36±21,9	0	-64±8,9	0	-40±0,0	0	-80±0,0	0
S(+)-carvona	40±0,0	II	56±8,9	III	40±0,0	II	88±10,9	V	92±17,8	V	88±17,8	V	36±8,9	II	16±8,9	I	-80±0,0	0
(-) terpinen-4-ol	-16±8,9	0	20±0,0	II	20±0,0	I	68±17,8	IV	0±20,0	0	-44±11,9	0	-64±8,9	0	-44±8,9	0	-60±0,0	0
3-careno	-20±0,0	0	-20±0,0	0	-80±24,7	0	-16±16,7	0	-16±8,9	0	16±8,9	I	-52±10,9	0	-44±8,9	0	-64±8,9	0
γ-terpineno	-52±10,9	0	-100±0,0	0	-76±8,9	0	40±14,1	II	-80±0,0	0	-60±0,0	0	-4±8,9	0	-44±8,9	0	-80±0,0	0
2-decanona	80±0,0	IV	64±8,9	IV	36±8,9	II	-20±14,1	0	-44±8,9	0	-16±8,9	0	-76±8,9	0	-60±0,0	0	-24±15,7	0
α,β-tujona	-20±0,0	0	-20±0,0	0	4±8,9	I	80±14,1	IV	84±8,9	V	-8±17,8	0	-76±8,9	0	-6±13,4	0	0±0,0	0
S(-)-Pulegona	100±0,0	V	96±8,9	V	96±8,9	V	76±8,9	IV	84±8,9	V	88±17,8	V	-72±10,9	0	-76±8,9	0	0±0,0	0
terpinoleno	-60±0,0	0	-60±0,0	0	-80±0,0	0	-52±10,9	0	-28±10,9	0	-80±0,0	0	16±8,9	I	-12±10,9	0	-72±10,9	0
4-undecanona	-60±0,0	0	-60±0,0	0	-52±17,8	0	88±17,8	V	36±8,9	II	92±10,9	V	-64±8,9	0	-76±8,9	0	-72±10,9	0
control Stay off	15±10,0	I	44±8,9	III	24±15,9	II	28±17,8	II	48±18,9	III	35±10,0	II	-15±10,0	0	28±10,9	II	40±0,0	II

Convenciones: PR: Porcentaje de repelencia ± Desviación estandar (DE) C: clase de repelencia



Otros compuestos presentaron algún tipo de repelencia en una de las concentraciones evaluadas, como es el caso del  $\alpha$ -pineno, el cual presentó mejor actividad a la concentración de  $0,05 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , e incluso se observó un efecto acumulativo al aumentar el porcentaje de repelencia a las 24 horas del ensayo a esta concentración. De forma opuesta, se observó que para el isopulegol y la 2-decanona la actividad disminuyó en el tiempo. En el caso particular del isopulegol en la concentración de  $0,01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  la actividad pasó de clase III a 0 a dentro de las diferentes lecturas. Mientras que la 2-decanona pasó de clase IV a II que la disminución en el efecto repelente de estos compuestos puede estar dada por una disminución en la concentración en el aire, lo que implicaría que se volatilizan rápidamente pero su concentración decae en el tiempo del ensayo.

El comportamiento de algunos compuestos como 2-nonanona, 1,8-cineol,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, (-)terpenen-4-ol,  $\gamma$ -terpineno y terpinoleno, tiende a disminuir su repelencia en las concentraciones evaluadas en los diferentes tiempo, por ejemplo el terpinoleno se observa una disminución en la repelencia al pasar el tiempo, exhibiendo porcentajes de repelencia de 16%, -12% y -72% en la evaluación a  $0,01 \mu\text{L}/\text{cm}^2$  a las 2, 6 y 24 horas respectivamente. Esta tendencia en algunos compuesto podría interpretarse como un efecto atrayente que estos ejercen sobre *T. castaneum*, situación que llegaría a ser beneficiosa ya que podría hacer que el insecto se acerque a la zona donde se aplique el control logrando que el mismo u otro compuesto causen letalidad sobre él.

Algunos compuestos como el sabineno, (-)terpinen-4-ol,  $\alpha, \beta$ -tujona, S(-)-pulegona y 1R(-)fenchona, estragol y safrol, mostraron actividad repelente moderada a alta a dos de las concentraciones evaluadas. Dentro de estos safrol y S(-)-pulegona presentaron los mejores resultados de repelencia a las concentraciones de  $0,1 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  y  $0,05 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ , con porcentajes incluso superiores a los del control positivo.

De los compuestos más activos entre los 23 evaluados encontramos aquellos que mostraron algún tipo de repelencia en las tres concentraciones evaluadas. Siendo DL-limoneno, R(+)-pulegona y S(+)-carvona los que mostraron mejores resultados repelentes. El DL-limoneno, presentó efectos disminuidos durante los tiempos en las evaluaciones a  $0,05 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  y  $0,01 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ . Para el caso de la R(+)-pulegona a la máxima concentración evaluada mostró una disminución del efecto repelente en el tiempo, por lo cual se obtuvieron clases V, III y I. En la concentración  $0,05 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  exhibió menor actividad con clasificaciones I, I y II en los diferentes tiempos del ensayo. La S(+)-carvona con

clases de repelencia de II, III y II a las 2, 6 y 24 horas a una concentración de 0,1  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ; en la evaluación a 0,05  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  sus clases de repelencia fueron constantes en V en los tres tiempos; finalmente a 0,01  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  mostró un efecto disminuido con clases de repelencia II, II y 0 en las lecturas a las 2, 6 y 24 horas respectivamente. Cabe resaltar que el compuesto S-(+)-carvona fue el único que después del control positivo alcanzó valores mínimos de repelencia a la menor concentración, además de haber obtenido mejores resultados en la evaluación a 0,05  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  donde el *stay-off* no obtuvo una clase de repelencia superior a III en los tiempos evaluados. En algunos reportes como el de Caballero y Colaboradores los enantiómeros *R* y *S* de la carvona mostraron resultados similares incluso mejores a los de este estudio, al comparar el enantiómero S-(+)-carvona de nuestro estudio con el reportado anteriormente se observa que su clases se mantiene entre III y V incluso en los concentraciones menores a las evaluadas en esta investigación (Caballero, et al, 2011) sin embargo, durante el experimento del estudio citado, no se aplicó alimento en el tratamiento durante la evaluación del compuesto, al parecer esta variación en el ensayo produce que la actividad repelente se vea disminuida para este compuesto.

Finalmente, los compuestos que presentaron el mayor potencial repelente frente a *T. castaneum* fueron la S(-)-pulegona, y el safrol. Los dos mostraron los mayores porcentajes de repelencia en las concentraciones de 0,1 y 0,05  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , con resultados reproducibles en los tres tiempos de evaluación. Para el caso del enantiómero R-(+)-pulegona los resultados no fueron reproducibles en los tres tiempos de evaluación en las dos concentraciones mayores, mostrando un efecto disminuido en ambas concentraciones.

De acuerdo con nuestros resultados, no fue posible establecer un patrón que relacionara la actividad repelente con las características estructurales de los compuestos evaluados. Esta misma tendencia ha sido previamente reportada en compuestos con potencial repelente, no obstante, diferentes reportes indican que características como la presión de vapor, punto de ebullición, lipofilia, interacciones electrostáticas, longitud molecular, momento principal de inercia, entre otros, son propiedades que pueden explicar la repelencia de una sustancia o compuesto sobre un organismo (Davis, 1985; Suryanarayana, et al, 1991; Katritzky, et al, 2006; Wang, et al, 2008).

Cabe destacar, que el presente estudio representa el primer reporte en la determinación del potencial repelente sobre *T. castaneum* de compuestos volátiles de alta distribución de aceites esenciales empleando la metodología de preferencia de áreas aplicando alimento.



Además, se debe tener en cuenta que se encuentran pocos reportes de la evaluación de compuestos puros en esta actividad. A la fecha la mayoría de los estudios de repelencia sobre *T. castaneum* se ha enfocado en la evaluación de aceites esenciales y no en sus constituyentes (Espitia, 2011).

### **3.2.3. Actividad antialimentaria de los compuestos con potencial fumigante**

La evaluación de la actividad fagodisuasiva se realizó basándose en estudios previos que indican que los constituyentes de AEs pueden ejercer un efecto disuasor alimentario o toxicidad por ingestión sobre diferentes coleópteros (Tripathi et al, 2003; Phillips & Throne, 2010). En el presente trabajo la actividad antialimentaria se evaluó a dos concentraciones, 300 ppm y 600 ppm. En la Tabla 3-4, se presentan los resultados de la actividad antialimentaria expresada en índices de disuasión alimentaria (IDA), así como la clasificación basada en la escala propuesta por Liu y colaboradores (Liu et al.2007).

De acuerdo con los IDA obtenidos para los 23 compuestos a la concentración de 300 ppm, es posible observar que la mayoría de estos no superaron el 20% de la disuasión, por tanto, de acuerdo con la escala de clasificación a esta concentración no presentaron actividad por disuasión. Tan solo dos de los compuestos evaluados, el sabineno y el estragol, mostraron índices superiores al 20%, así que se clasificaron dentro de la categoría de "disuasión alimentaria débil", sin embargo, como se observa en la tabla los porcentajes son bajos y cercanos al límite inferior dentro de esta categoría.

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se decidió evaluar la actividad a una concentración mayor para observar las tendencias en la actividad de disuasión mostrada por los compuestos. Sin embargo, se encontró que pese a duplicar la concentración a 600 ppm, los IDA no aumentaron drásticamente y la mayoría de los compuestos fueron clasificados dentro de la categoría de disuasión alimentaria débil con IDA entre un 20 y un 50%.

A la concentración de 600 ppm los compuestos que presentaron mayores índices de disuasión fueron: el sabineno, estragol y 2-nonanona; con porcentajes de disuasión entre el 30 y 35%, que siguen siendo bajos en comparación con el control positivo.

Tabla 3-4 Índices de disuasión alimentaria de compuestos sobre *T. castaneum*

Compuesto	IDA	Clasificación	IDA	Clasificación
	300 ppm		600 ppm	
Nonano	11,890 ±0,820	No disuasión alimentaria	3,477 ±1,172	No disuasión alimentaria
1,8-cineol	9,024 ±0,573	No disuasión alimentaria	13,669 ±0,577	No disuasión alimentaria
2-nonanona	10,746 ±1,011	No disuasión alimentaria	33,453 ±0,579	Disuasión alimentaria débil
β-pineno	15,296 ±0,643	No disuasión alimentaria	25,060 ±0,634	Disuasión alimentaria débil
α-pineno	16,009 ±0,358	No disuasión alimentaria	31,055 ±0,344	Disuasión alimentaria débil
ρ-cimeno	10,636 ±0,563	No disuasión alimentaria	24,460 ±0,230	Disuasión alimentaria débil
DL-limoneno	17,489 ±0,583	No disuasión alimentaria	27,458 ±0,383	Disuasión alimentaria débil
Safrol	12,939 ±0,527	No disuasión alimentaria	28,657 ±0,891	Disuasión alimentaria débil
Sabineno	22,697 ±0,456	Disuasión alimentaria débil	35,252 ±0,378	Disuasión alimentaria débil
Estragol	22,423 ±0,642	Disuasión alimentaria débil	33,453 ±0,449	Disuasión alimentaria débil
1 <i>R</i> -(-)- fenchona	9,430 ±1,111	No disuasión alimentaria	29,856 ±0,400	Disuasión alimentaria débil
<i>R</i> -(+)-pulegona	13,596 ±0,638	No disuasión alimentaria	26,859 ±0,742	Disuasión alimentaria débil
(-)-isopulegol	15,550 ±0,773	No disuasión alimentaria	22,748 ±0,416	Disuasión alimentaria débil
α-felandreno	7,596 ±0,546	No disuasión alimentaria	15,267 ±0,510	No disuasión alimentaria
<i>S</i> -(+)-carvona	-2,871 ±0,471	No disuasión alimentaria	16,031 ±0,589	No disuasión alimentaria
(-)-terpinen-4-ol	3,110 ±0,587	No disuasión alimentaria	9,924 ±2,058	No disuasión alimentaria
3-careno	14,175 ±1,472	No disuasión alimentaria	21,628 ±0,678	Disuasión alimentaria débil
γ-terpineno	14,593 ±0,541	No disuasión alimentaria	18,168 ±0,241	No disuasión alimentaria
2-decanona	16,507 ±0,853	No disuasión alimentaria	0,763 ±0,339	No disuasión alimentaria
α,β-tujona	3,509 ±1,146	No disuasión alimentaria	1,272 ±0,497	No disuasión alimentaria
<i>S</i> -(-)-pulegona	10,766 ±0,688	No disuasión alimentaria	5,725 ±0,805	No disuasión alimentaria
terpinoleno	9,091 ±0,935	No disuasión alimentaria	24,427 ±0,483	Disuasión alimentaria débil
4-undecanona	12,081 ±0,572	No disuasión alimentaria	14,504 ±0,453	No disuasión alimentaria
Neem	51,000 ±0,669	Disuasión alimentaria moderada	60,432 ±0,460	Disuasión alimentaria moderada

IDA: Índice de disuasión alimentaria.

En otros casos, no se observó un aumento en la actividad a la concentración de 600 ppm, de hecho, para compuestos como la α,β-tujona, y el nonano los porcentajes disminuyeron al duplicar la concentración.

A la fecha, no se tienen muchos reportes de la determinación de la actividad fagodisuasiva de compuestos volátiles puros, pese a que previamente se ha determinado que diferentes aceites esenciales poseen potencial disuasor frente a la plaga de interés (Mossa, 2016). Sin embargo, en un estudio previo desarrollado por Kandal y colaboradores, se evaluó la actividad disuasiva de 10 compuestos de AEs, entre ellos timol, carvacrol, eugenol, *trans*-

anetol,  $\alpha$ -terpineol, linalool, pulegona, verbenona, fenchona y 1,8-cineol. En este estudio se encontró que de los 10 compuestos evaluados el eugenol, *trans*-anetol y linalool presentaron disuasión alimentaria. Es importante, apuntar que varios de estos compuestos fueron tamizados en nuestro estudio preliminar, pero al presenta baja actividad fumigante, no fueron seleccionados dentro del grupo de los 23 promisorios, por lo tanto, no se les determinó este tipo de actividad. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio para el 1,8-cineol, fenchona y pulegona están en concordancia con lo reportado por Kandal y colaboradores; puesto que estos compuestos mostraron baja actividad disuasora a las concentraciones evaluadas (Kandal, et al, 2017).

Teniendo en cuenta los bajos porcentajes de actividad obtenida para los compuestos de estudio, no fue posible establecer ningún tipo de relación estructura-actividad de la disuasión alimentaria. No obstante, en estudios previos en los que se han analizado diferentes núcleos base y una mayor variedad de grupos funcionales, tampoco se han logrado establecer relaciones o patrones entre las características estructurales y el efecto fagodisuasivo frente varias especies de insectos. Lo anterior debido a que existen interacciones con diferentes receptores moleculares en el sistema sensorial, que pueden variar dentro de los diferentes insectos de acuerdo con la especie, condiciones fisiológicas, tipo de alimento que consumen, entre otras (Nawrot & Harmatha, 2012). Por otro lado, algunos autores indican que la actividad disuasiva puede estar relacionada estructuralmente con la cantidad y posición de grupos funcionales en las moléculas, además de la configuración de centros quirales de esta (Nawrot & Harmatha, 1994).

La baja actividad fagodisuasiva mostrada por los compuestos evaluados podría estar relacionada con la capacidad del insecto para establecer barreras físicas (matriz peritrófica) y barreras químicas. Principalmente, estas últimas juegan un papel crucial en los procesos de desintoxicación que puede llevar a cabo el insecto, en donde se encuentran el potencial redox intestinal y una batería enzimática especializada como oxidases, esterases, entre otras que le proporcionan protección al insecto frente a ciertos alelo químicos tóxicos producidos por plantas (Stefanazzi, et al, 2011).

#### **3.2.4. Compuestos que presentaron alto potencial insecticida frente a *T. castaneum* en los cuatro modos de acción evaluados**

Entre los 23 compuestos evaluados por modo de acción tóxico fumigante, tóxico por contacto, repelente y antialimentaria, algunos presentaron un alto potencial en 3 de las 4

actividades evaluadas. Dentro de estos se encuentra el enantiómero *R*-(+)-pulegona, el cual fue el compuesto más activo por el método fumigante con una  $CL_{50}$  4,78  $\mu$ M superando al control positivo. Además, mostró una alta actividad tóxica por contacto con una  $DL_{50}$  de 7,78  $\mu$ g/insecto; y también presentó actividad repelente a la mayor concentración evaluada. En contraste, el enantiómero *S*-(-)-pulegona mostró actividad tóxica fumigante y tóxica por contacto, pero no exhibió actividad repelente y antialimentaria.

De forma similar, la *S*-(+)-carvona presentó actividad fumigante moderada con una  $CL_{50}$  de 40,60  $\mu$ M, también presentó el mayor potencial en el ensayo de toxicidad por contacto con una  $DL_{50}$  de 4,78  $\mu$ g/insecto, y además exhibió actividad repelente en dos de las concentraciones evaluadas.

Los compuestos *R*-(+)-pulegona, *S*-(+)-carvona y safrol mostraron actividad fumigante y por contacto. En particular, el safrol presentó una alta toxicidad por contacto con una  $DL_{50}$  de 7,22  $\mu$ g/insecto, y también actividad repelente moderada.

El fenilpropanoide estragol mostró buenos resultados en tres de las cuatro actividades evaluadas, y a diferencia de los compuestos anteriores, no exhibió actividad repelente en las concentraciones ensayadas. Sin embargo, mostró potencial fumigante moderado ( $CL_{50}$  34,33  $\mu$ M), toxicidad por contacto moderada ( $DL_{50}$  15,79  $\mu$ g/insecto) y disuasión alimentaria débil a 300 ppm.

Los compuestos anteriormente descritos poseen núcleos diferentes, pero comparten como característica estructural la presencia de sustituyentes oxigenados de diferentes tipos. Teniendo en cuenta, que la mayoría de estos presentaron alto potencial en por lo menos tres modos de acción frente al insecto. Se puede inferir que poseen las características estructurales necesarias para afectar al insecto y por ende constituyen una excelente alternativa en la formulación de un producto fitosanitario para el control de *T. castaneum*.

### **3.3. Fase III: Diseño, evaluación y estabilidad preliminar de mezclas de compuestos con potencial insecticida**

Para dar continuidad a nuestra investigación, teniendo en cuenta que se ha reportado que el uso de mezclas de compuestos puede favorecer una respuesta biológica por interacciones sinérgicas o potencializadoras (Isman, 2000; Hollomon & Kendall, 1997;

Nørgaard & Cedergreen, 2010; Cedergreen & Streibig, 2009), y basados en los resultados obtenidos en las fases I y II, se diseñaron mezclas binarias a partir de los compuestos que mostraron el mayor potencial insecticida frente a *T. castaneum*. Para esto, se diseñaron mezclas con potencial fumigante y de toxicidad por contacto. Los resultados de actividad repelente y actividad fagodisuasiva no se tuvieron en cuenta, ya que los resultados obtenidos a partir de las concentraciones evaluadas no mostraron el potencial esperado para el diseño y evaluación de combinaciones.

### 3.3.1. Mezclas binarias con acción fumigante y toxicidad por contacto

Para el diseño de mezclas binarias y por contacto se empleó la misma metodología descrita en la sección 2.3 (Fase III). A continuación, se presentan los resultados de estas:

### 3.3.2. Diseño y evaluación de mezclas fumigantes

#### 3.3.2.1. Clasificación de los compuestos

Para el diseño de las mezclas insecticidas con el fin de facilitar las predicciones por medio del índice de combinación (IC) inicialmente se realizó una clasificación de los compuestos de acuerdo con el comportamiento de estos en el gráfico dosis respuesta (Figura 3-6) y las concentraciones letales 50 obtenidas, los compuestos fueron clasificados en 3 grupos como se presenta en la Tabla 3-5. En el grupo 1 se clasificaron los compuestos de menor actividad ( $CL_{50} > 80 \mu M$ ) y aquellos que tienen una etapa latente poco acelerada. En el grupo 2 los compuestos con actividad moderada ( $80 \mu M < CL_{50} > 30 \mu M$ ) y que presentan una etapa latente acelerada. En el grupo 3 se encuentran los compuestos más activos; aquellos que tienen una etapa latente muy acelerada ( $CL_{50} < 30 \mu M$ ).

Tabla 3-5 Clasificación de los compuestos por actividad fumigante

Grupo 1 ( $CL_{50} > 80 \mu M$ )	Grupo 2 ( $> 30 \mu M < CL_{50} < 80 \mu M$ )	Grupo 3 ( $CL_{50} < 30 \mu M$ )
(-)-isopulegol 4-undecanona 1,8-cineol 2-nonanona nonano DL-limoneno $\rho$ -cimeno $\alpha$ -pineno $\beta$ -pineno sabineno	$\alpha$ -felandreno 2-decanona estragol (-) terpinen-4-ol S-(+)-carvona 1 <i>R</i> -fenchona $\alpha, \beta$ -tujona $\gamma$ -terpineno Safrol 3-careno	<i>R</i> -(+)-pulegona <i>S</i> -(-)-pulegona terpinoleno

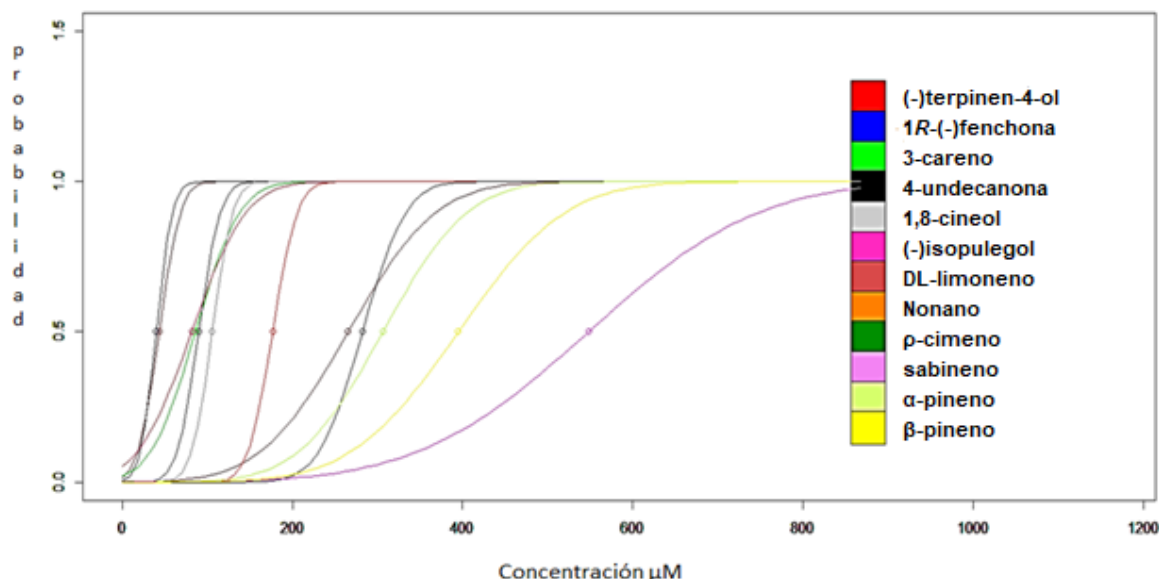


Figura 3-6 Gráfico dosis-respuesta de los compuestos del grupo 2 para fumigante

Las predicciones empleando el IC se hicieron entre grupos, es decir, compuestos del grupo 1, luego entre compuestos del grupo 2 y compuestos del grupo 3. Finalmente se hicieron predicciones entre compuestos de diferentes grupos. En total, el modelo estadístico empleado predijo 15 mezclas binarias con índices de combinación (IC) menores o iguales a 0.90, que podrían presentar un efecto sinergista en la actividad fumigante (Tabla 3-6).

### 3.3.2.2. Evaluación de las combinaciones que el modelo predijo

Las 15 mezclas que fueron diseñadas por el IC se prepararon a las concentraciones predichas y a todas se les evaluó la actividad frente a *T. castaneum* por el modo de acción fumigante a una concentración cercana a la  $CL_{50}$  del compuesto más activo de la combinación. Los resultados tanto de la predicción como de la actividad fumigante se presentan en la Tabla 3-6.

Tabla 3-6 Evaluación por toxicidad fumigante de las mezclas que el modelo predijo

N. mezcla	Compuestos	proporción	IC	$CL_{50}$ Compuestos (ppm)	$CL_{50}$ evaluada ppm	% Mortalidad
1	4- undecanona p-cimeno	15:85	0,68	18,38 43,43	18,57	100±0,0
2	(-)terpinen-4-ol α-pineno	10:90	0,97	6,54 48,57	6,42	14±1,1

3	3-careno $\alpha$ -pineno	10:90	0,75	12,37 48,57	12	10 $\pm$ 1,0
4	1,8-cineol DL-limoneno	30:70	0,99	18,02 43,00	21,00	100 $\pm$ 0,00
5	1R(-)fenchona $\rho$ -cimeno	10:90	0,51	6,68 43,43	7,14	18 $\pm$ 4,00
6	(-)-isopulegol DL-limoneno	10:90	0,92	13,96 43,00	20,00	100 $\pm$ 0,00
7	nonano DL-limoneno	50:50	0,74	31,52 43,00	31,50	100 $\pm$ 0,00
8	2-decanona safrol	20:80	0,97	6,22 8,13	7,14	100 $\pm$ 0,00
9	estragol $\alpha$ -felandreno	20:80	0,93	5,44 5,05	5,71	100 $\pm$ 0,00
10	S-(+)-carvona $\gamma$ -terpineno	30:70	0,87	6,35 8,38	6,42	100 $\pm$ 0,00
11	estragol $\alpha,\beta$ -tujona	10:90	0,39	5,44 7,05	5,71	100 $\pm$ 0,0
12	$\alpha$ -felandreno 2-nonanona	10:90	0,56	5,05 20,72	5,28	0 $\pm$ 0,00
13	R-(+)-pulegona terpinoleno	10:90	0,45	0,77 4,35	0,64	0 $\pm$ 0,00
14	R-(+)-pulegona $\alpha$ -felandreno	10:90	0,78	0,77 5,05	2,85	0 $\pm$ 0,0
15	terpinoleno $\alpha$ -felandreno	20:80	0,67	4,35 5,05	4,28	0 $\pm$ 0,0

Como se observa en la Tabla 3-6, de las 15 mezclas diseñadas y tamizadas en la actividad fumigante, ocho presentaron porcentajes de mortalidad superiores al 60% superando la letalidad media de los compuestos más activos estas. Para continuar con el estudio y complementar los resultados de las 8 mezclas que superaron el 60% de letalidad, se les determinó la CL<sub>50</sub>, los factores de sinergismo, los índices de combinación y el tipo de sinergismo, como se presenta en la siguiente Tabla 3-7.

Tabla 3-7. Índices de combinación (IC), factores de sinergismo y tipos de efecto de las mejores mezclas fumigantes.

N. Mezcla	Mezcla	CL <sub>50</sub> ppm	CL <sub>50</sub> Individual ppm	SFi	SFj	IC estimado	IC experimental	Tipo Efecto
1	4-undecanona + p-cimeno	7,64 (7,42-7,87)	18,38 43,43	2,4	5,68	0,68	0,39	Sinergismo
2	1,8-cineol + DL-limoneno	8,73 (8,42-9,04)	18,02 43	2,06	4,92	0,94	0,41	Sinergismo
3	isopulegol + DL-limoneno	10,03 (9,12-10,94)	13,96 43	1,38	4,28	0,92	0,69	Sinergismo
4	nonano + DL-limoneno	26,71 (25,56-27,86)	31,52 43	1,18	1,6	0,74	0,76	Sinergismo moderado
5	2-decanona + safrol	4,83 (4,58-5,07)	6,22 8,13	1,28	1,68	0,97	0,72	Sinergismo moderado
6	estragol + α-felandreno	4,49 (4,26-4,73)	5,44 5,05	1,21	1,12	0,93	0,9	Aditividad
7	S-(+)-carvona + γ-terpineno	6,14 (6,04-6,23)	6,35 8,38	1,03	1,36	0,87	0,87	Sinergismo leve
8	estragol + α,β-tujona	4,45 (4,23-4,66)	5,44 7,05	1,22	1,58	0,39	0,85	Sinergismo leve

Al comparar el IC estimado respecto al IC experimental, se observan diferencias en sus valores, lo cual indica que aunque la predicción se cumplió en más del 50% de las estimaciones, el modelo debe ser revisado con el objetivo de resolver las falencias que no permiten estimar el valor obtenido experimentalmente.

En este estudio se empleó el índice de combinación para cuantificar el efecto de la mezcla de los compuestos versus su actividad individual; y de esta forma indagar cuales de ellos presentarían un efecto de sinergismo al combinarse en las proporciones estudiadas. Esto, teniendo en cuenta que la sinergia se ha definido como un mecanismo que refleja la acción concertada de dos o más factores en un resultado dado. Y esta acción concertada usualmente produce un efecto amplificado positivo en comparación con el efecto producido por cada factor individual (Chou, 2008). De acuerdo con los anteriores resultados es posible observar que las combinaciones que mostraron mayores efectos sinergista fueron las conformadas por compuestos de los grupos 1 y 2. Dentro de ellas, encontramos que las mezclas constituidas por compuestos del grupo 1, presentaron mejores resultados, con un aumento de la actividad en algunos casos mayores al 50% respecto al compuesto más activo de la mezcla. En este contexto, la combinación con el mayor potencial de sinergia



fue la mezcla 1, conformada por 4-undecanona y p-cimeno, para la cual se obtuvo un IC de 0,39; con factores de sinergismo de sus compuestos individuales de 2,40 (4-undecanona) y 5,86 (p-cimeno). Para el caso de la mezcla 2 cuyo IC fue de 0,41, los factores de sinergismo respecto a los componentes individuales fueron 2,06 para 1,8-cineol y 4,92 para el DL-limoneno. Cabe señalar que los factores de sinergismos superiores a 2, indican un aumento de la actividad de la combinación respecto al componente individual. Adicionalmente, se encontró que las combinaciones (1 y 2) mencionadas anteriormente están constituidas por los compuestos menos activos dentro del grupo de los 23 compuestos seleccionados en el tamizaje, cuyas  $CL_{50}$  individuales son mayores de 17 ppm. Sin embargo, se observa que en las mezclas binarias diseñadas alcanzaron  $CL_{50}$  menores a 10 ppm.

Así mismo, la combinación de isopulegol y DL-limoneno (mezcla 3) también mostró un efecto sinergista, con un índice de combinación de 0,69; el cual está catalogado de acuerdo con la clasificación como “sinergismo moderado”. En este caso, los factores de sinergismo individuales fueron 1,38 para el isopulegol y 4,28 para el DL-limoneno, indicando que el aumento en la actividad de la combinación frente a los compuestos individuales no fue tan efectivo como en las mezclas 1 y 2.

Por otro lado, las mezclas 4 y 5 presentaron un efecto de sinergia moderado, lo cual se evidencia en la cercanía de los valores de las  $CL_{50}$  en comparación con los compuestos individuales. En este caso, ninguno de los factores de sinergismo individuales fue superior a 2, de esta forma se indica que la actividad no es mayor a un 20% en mezcla respecto a sus compuestos individuales.

Finalmente, la mezcla 6 compuesta por estragol y  $\alpha$ -felandreno, mostró un IC de 0,90 correspondiente a un efecto “aditividad” según la clasificación de los autores del modelo. En este caso, la  $CL_{50}$  fue muy cercana a la de los compuestos individuales, por ende, estos resultados no mostraron un aumento en la actividad al mezclarlos. Teniendo en cuenta que el objetivo de estas investigaciones es el desarrollo de un posible agente fitosanitario para ser aplicado a nivel de condiciones de almacenamiento, en este caso particular sería más recomendable emplear los compuestos por sí solos ya que aspectos como la formulación serían más sencillos.

Los isobogramas que se presentan en la Figura 3-7, son una forma gráfica de determinar y analizar los resultados de sinergia de las 8 mezclas activas. En estos se observa el

sinergismo de las mezclas relacionando la  $CL_{50}$  del compuesto más activo en el eje X y la  $CL_{50}$  de compuesto menos activos en el eje Y, mientras que la  $CL_{50}$  de la combinación está ubicada en un punto debajo de la línea de aditividad trazada entre las concentraciones letales cincuenta de los compuestos. Entre más alejado se encuentre este punto por debajo de la línea, mayor será el sinergismo. Por el contrario, entre más cercano éste de la línea el efecto de la mezcla será aditividad, y por encima de la línea indicará antagonismo. Así, al analizar los Isobogramas obtenidos para las mezclas encontramos que están en concordancia con los resultados obtenidos en el índice de combinación, lo cual respalda los resultados del modelo estadístico empleado para el diseño de las mezclas.

Es importante destacar que todas las mezclas en las cuales se incluyó DL-limoneno, presentaron resultados promisorios (Tabla 3-7) con sinergismo o sinergismo moderado. En los 3 casos se logró mejorar la actividad en por lo menos un 30%, respecto a la actividad individual. Esta actividad también fue mejor al combinar limoneno con terpenos como el 1,8-cineol e isopulegol, en comparación con el nonano. Por lo cual, sería interesante estudiar un mayor número de mezclas binarias usando limoneno y variar el segundo componente, usando solo monoterpenos; a fin de establecer si el limoneno tiene un papel crucial en el diseño de mezclas más activas.

A fin de establecer una posible relación entre la composición de las mezclas más activas y los resultados previos de actividad fumigante de aceites esenciales que presentaron estos constituyentes, se realizó una revisión bibliográfica y se compararon nuestros resultados con los reportes de literatura. Dentro de los compuestos que mostraron los mejores efectos sinergistas, encontramos monoterpenos como  $p$ -cimeno y DL-limoneno, fenilpropanoides como safrol, cetonas alifáticas (4-undecanona y 2-decanona) y nonano. En la búsqueda realizada, no se encontraron reportes de AEs que dentro de su composición presentarán estos constituyentes como mayoritarios y que a su vez tuvieran reportes de la actividad fumigante sobre *T. castaneum*. Por ejemplo, se encontró que el aceite esencial de *Capillipedium parviflorum* (Poaceae) presenta un 33% de 4-undecanona (Saini, et al, 2012). Por otro lado, la 4-undecanona y  $p$ -cimeno se han reportado como los constituyentes de los AEs de hojas y tallos de *Merremia borneensis* (Convolvulaceae) (Hossain, et al, 2012). Sin embargo, para estos dos AEs no se encuentran reportes de actividad frente a *T. castaneum*. Por lo tanto, sería recomendable evaluar la actividad de

estos aceites para observar el comportamiento de los constituyentes en la mezcla compleja.

Este mismo comportamiento, se encontró para la 2-decanona que está presente en el AE de hojas y flores de *Ruta chalepensis* los cuales tienen reportes de actividad frente a larvas de *Orgyia trigotephras* pero no sobre plagas de almacén como *T. castaneum*. Así mismo, otros aceites esenciales ricos en fenilpropanoides como safrol, el AE de hojas de *Laureliopsis philippiana* posee reportes frente a otras plagas de almacén como *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus granarius*, pero no frente al insecto del presente trabajo (Fierascu, et al, 2019). Por otra parte, el nonano y el DL-limoneno han sido reportados en algunos AEs de especies del género *Hypericum* como *H. juniperinum* y *H. mexicanum*. No obstante, estos aceites presentaron menor actividad fumigante en comparación con la mezcla 4. La combinación binaria evaluada en el presente trabajo mostró una actividad casi 9 veces mayor (Mezcla 4 CL<sub>50</sub> 26,71 ppm; *H. juniperinum* CL<sub>50</sub> 67,26 ppm; *H. mexicanum* CL<sub>50</sub> 229,06 ppm) (Oviedo, 2019). Algo similar ocurrió para la mezcla de 1,8-cineol y DL-limoneno. Estos compuestos se encuentran comúnmente mezclados en diferentes AEs como: *Lavandula angustifolia*, *Pimpinella anisum*, *Lippia origanoides*, *Myristica fragrans*, *Rosmarinus officinalis*, *Ocimum basilicum* y *Coleonema álbum* (Oviedo, 2019). Sin embargo, todos estos aceites presentan menor actividad fumigante en comparación la mezcla binaria diseñada en este trabajo. Adicionalmente, los compuestos de la Mezcla 3 también se han reportado en bajas cantidades en el AE de *Cymbopogon citratus* y *C.schoenanthus*. Siendo la actividad fumigante de estos aceites muy baja en comparación con la mezcla 3; la cual es casi 100 veces más activa frente a *T. castaneum* (Bossou, et al, 2015). Todo lo anterior, respalda que el uso de herramientas estadísticas para el diseño de mezclas binarias es una opción altamente viable, debido a que el modelo es capaz de predecir una proporción determinada para cada componente y dicha proporción mostró resultados superiores a todos los AEs reportados previamente. Lo que hace que el uso de mezclas binarias sea una excelente opción para el control del insecto.

Una de las ventajas de usar mezclas de compuestos es minimizar la posibilidad que el insecto pueda desarrollar resistencia, puesto que al tener un mayor número de compuestos estos podrán actuar frente a diferentes blancos. Para el caso particular de *T. castaneum* se ha reportado que este posee una gran batería bioquímica mediada por enzimas asociadas a la resistencia a diferentes insecticidas. Dentro de estas enzimas, se destacan

las esterasas las cuales son capaces de hidrolizar grupos éster en moléculas activas transformándolas en metabolitos que se pueden continuar metabolizando para ser excretados. Se ha observado que diferentes principios activos de formulaciones comerciales como organofosforados, hidrocarburos clorados, carbamatos y piretroides de primera y segunda generación poseen este tipo de grupos (Zettler, 1991; Zhu, et al, 2010; Cohen, 1982; Mackness, et al, 1983). Sin embargo, los compuestos más promisorios en el presente trabajo no poseen este tipo de grupos químicos que podrían ser lábiles frente a las enzimas relacionadas con la resistencia, lo cual puede ser una ventaja en el desarrollo de potenciales agentes para el control de esta plaga. De esta forma se recomienda, continuar con los estudios de los compuestos y mezclas promisorias a fin de determinar la posible actividad frente a enzimas y receptores del insecto; así como en estudios de posibles efectos de resistencia.

La revisión de estudios de combinaciones de compuestos de AEs sobre *Tribolium castaneum* son escasas en los diferentes motores de búsqueda, este estudio es una contribución, como el primer reporte del potencial insecticida de mezclas binarias fumigantes empleando un método estadístico confiable que es capaz de predecir y verificar diferentes combinaciones de sustancia activas a partir de constituyentes de aceites esenciales.

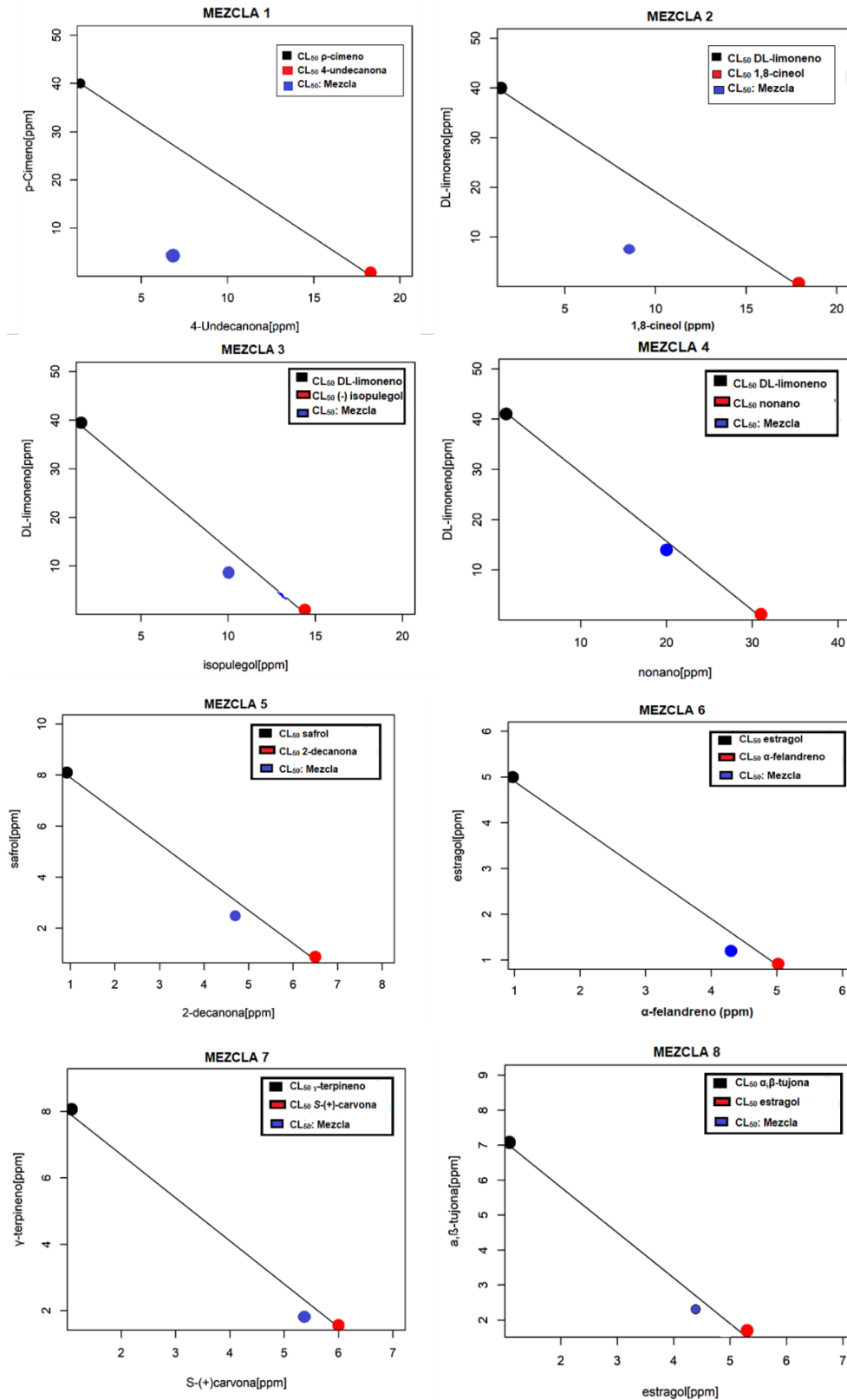


Figura 3-7. Isobogramas de las 8 mezclas activas de la predicción del modelo

### 3.3.3. Diseño y evaluación de mezclas tóxicas por contacto

#### 3.3.3.1. Clasificación de los compuestos

De acuerdo con el comportamiento de los compuestos en el gráfico dosis respuesta (Figura 3-8) y las dosis letales 50 obtenidas, los compuestos fueron clasificados en 4 grupos, uno de estos se presenta en la Tabla 3-8. En el grupo 1 se encuentran los compuestos muy activos ( $DL_{50} < 10 \mu\text{g}$ ) y aquellos que tienen una etapa latente muy acelerada. En el grupo 2 los compuestos activos ( $30 \mu\text{g} < DL_{50} > 10 \mu\text{g}$ ) y que presentan una etapa latente acelerada. En el grupo 3, los compuestos con actividad moderada ( $90 \mu\text{g} < DL_{50} > 30 \mu\text{g}$ ) y con una etapa latente moderada. En el grupo 4 se clasificaron los compuestos poco activos ( $DL_{50} > 90 \mu\text{g}$ ) y aquellos que tienen una etapa latente lenta.

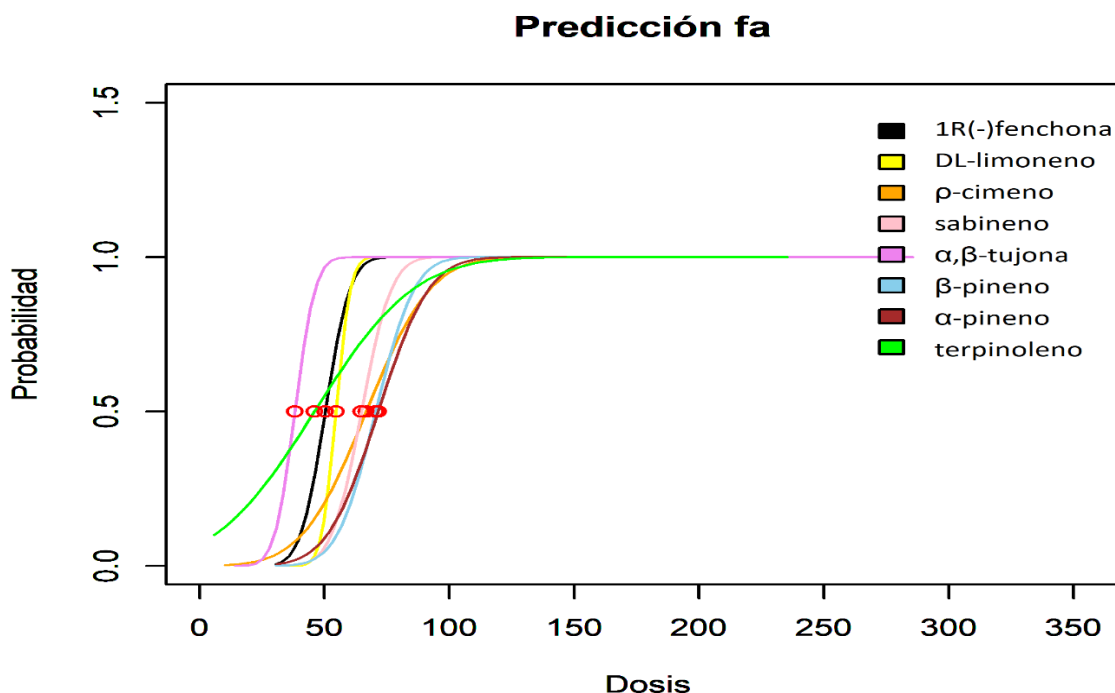


Figura 3-8. Gráfico dosis respuesta de los compuestos del grupo 3 para actividad toxica por contacto

De forma similar a lo que se explicó previamente para las mezclas fumigantes, primero se realizaron predicciones usando el IC, entre los compuestos de cada grupo, y posteriormente se realizaron entre compuestos de diferentes grupos.

Tabla 3-8. Clasificación de compuestos actividad tóxica por contacto

<b>Grupo 1</b> <b>(DL<sub>50</sub> &lt;10 µg)</b>	<b>Grupo 2</b> <b>(30 µg &lt;DL<sub>50</sub> &gt;10 µg)</b>	<b>Grupo 3</b> <b>(90 µg &lt;DL<sub>50</sub> &gt;30 µg).</b>	<b>Grupo 4</b> <b>(DL<sub>50</sub> &gt;90 µg)</b>
S-(+)-carvona 4-undecanona safrol R-(+)-pulegona	estragol isopulegol (-) terpinen-4-ol S-(-)-pulegona 1,8-cineol 2-nonanona 2-decanona	α,β-tujona terpinoleno 1R-fenchona DL-limoneno sabineno γ-terpineno ρ-cimeno β-pineno α-pineno	nonano 3-careno α-felandreno

De acuerdo con los parámetros asignados el modelo estadístico predijo 8 mezclas binarias que podrían presentar un efecto sinérgico.

Las 8 mezclas fueron preparadas en una sola proporción de acuerdo con la predicción estimada por el IC, y a todas se les evaluó su actividad tóxica por contacto sobre el insecto. En la Tabla 3-9 se muestran los porcentajes de mortalidad obtenidos para cada combinación, esta evaluación se realizó con la DL<sub>50</sub> del compuesto más activo de la mezcla.

Tabla 3-9 Evaluación tóxica por contacto de mezclas binarias que el modelo predijo en una sola proporción.

<b>N. mezcla</b>	<b>Compuestos</b>	<b>DL<sub>50</sub> Compuestos µg/insecto</b>	<b>concentración evaluada µg/insecto</b>	<b>IC estimado</b>	<b>Proporción</b>	<b>% MORTALIDAD</b>
1	4- undecanona safrol	9,18 7,21	7,71	0,62	30:70	3,33±5,77
2	DL-limoneno sabineno	53,68 64	54,63	0,90	60:40	30±0,00
3	DL-limoneno α-pineno	53,68 71,13	54,63	0,85	30:70	10±17,30
4	estragol (-)isopulegol	15,78 18,36	16,44	0,50	30:70	0±0,00
5	estragol 2-decanona	15,78 28,57	16,44	0,77	60:40	0±0,00
6	α,β-tujona terpinoleno	38,57 45,88	38,19	0,82	60:40	0±0,00
7	α,β-tujona α-pineno	38,57 71,13	38,19	0,67	30:70	0±0,00
8	estragol α,β-tujona	15,78 38,57	16,44	0,91	60:40	20±17,32

Como se puede observar en la tabla 3-9, a las concentraciones evaluadas las mezclas no mostraron resultados promisorios. De hecho, en todos los casos se obtuvieron porcentajes de mortalidad inferiores al 50%. Por lo anterior, se decidió variar las proporciones de estas combinaciones, para tratar de observar un cambio en la tendencia del compuesto sus compuestos. Sin embargo, como se observa en la tabla 3-10, la evaluación de estas proporciones adicionales no lograron obtener los efectos deseados. Incluso, se probó usar una concentración equivalente de los compuestos, así como aumentar o disminuir la concentración del compuesto más activo. Aun así no se logró superar el porcentaje de letalidad establecido (60%) para continuar con el análisis de estas mezclas.

Tabla 3-10. Evaluación toxica por contacto de las proporciones adicionales de las mezclas binarias que el modelo predijo

N. mezcla	Compuestos	DL <sub>50</sub> Compuestos µg/insecto	concentración evaluada µg/insecto	Proporciones			
				50:50	60:40	30:70	10:90
1	4- undecanona safrol	9,18 7,21	7,71	36,36±5,77	16,16±5,77	3,33±5,77	0±0,00
2	DL-limoneno sabineno	53,68 64	54,63	3,33±5,77	30±0,00	20±0,00	23,33±5,77
3	DL-limoneno α-pineno	53,68 71,13	54,63	0±0,00	0±0,00	10±17,30	
4	estragol (-)isopulegol	15,78 18,36	16,44	33,33±11,55	0±0,00	0±0,00	
5	estragol 2-decanona	15,78 28,57	16,44	3,33±5,77	0±0,00	3,33±5,77	
6	α,β-tujona terpinoleno	38,57 45,88	38,19	43,33±5,77	0±0,00	23,33±5,77	16,66±5,77
7	α,β-tujona α-pineno	38,57 71,13	38,19	23,33±5,77	0±0,00	0±0,00	
8	estragol α,β-tujona	15,78 38,57	16,44	30±0,00	20±17,32	0±0,00	

De esta forma, al no superar el 60% de mortalidad en ninguna de las combinaciones diseñadas y evaluadas, se deduce que las predicciones del modelo estadístico para el caso de mezclas por modo de acción tóxico por contacto no fueron efectivas como si ocurrió para el modo de acción fumigante. Esto puede deberse a que la ecuación seleccionada para las predicciones en las mezclas, es uno de los sugeridos por Chau y Talalay, donde se asume que los compuestos actúan por un mismo mecanismo de acción



(Lee, 2010), por lo anterior, sería recomendable probar la otra ecuación del IC contando con mayor información sobre los mecanismos de acción de estos compuestos, o evaluar otros modelos matemáticos a fin de determinar si el que se usó en el presente trabajo no se ajustaba totalmente al tipo de actividad.

### **3.3.4. Caracterización fisicoquímica, biológica y estabilidad preliminar de las mejores mezclas fumigantes**

Para la caracterización fisicoquímica y estudio de estabilidad preliminar de las mejores mezclas, se seleccionaron las 5 mejores mezclas fumigantes (mezcla 1 a 5). Las mezclas fumigantes 6, 7 y 8 no se tomaron en cuenta, puesto que, según la clasificación empleada, presentaron sinergismos leves o aditividad. Las mezclas preparadas teniendo en cuenta los resultados de actividad tóxica por contacto fueron excluidas de este estudio de estabilidad y caracterización fisicoquímica y biológica, ya que ninguna presentó sinergismos.

Los resultados de la caracterización se mostrarán simultáneamente con los datos de estabilidad en las dos condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente 18°C y refrigeración a 4°C) en los cuatro tiempos evaluados (0 horas, 24 horas, 1 semana y 40 días).

#### **3.3.4.1. Constantes físicas: densidad e índice de refracción de las mejores mezclas**

Los resultados de estas dos propiedades físicas de las 5 mejores mezclas se muestran en la Tabla 3-11, donde se calcularon y determinaron las densidades e índices de refracción para cada una de esta en sus dos condiciones de almacenamiento y cuatro tiempos de evaluación.

Tabla 3-11 caracterización y seguimiento de las constantes físicas: densidad e índice de refracción.

	Tiempo	Mezcla 1		Mezcla 2		Mezcla 3		Mezcla 4		Mezcla 5	
		Densidad 21°C	índice de refracción 20°C	Densidad 21°C	índice de refracción 20°C	Densidad 21°C	índice de refracción 20°C	Densidad 21°C	índice de refracción 20°C	Densidad 21°C	índice de refracción 20°C
Ambiente	0 horas	0,869±0,025	1,480±5x10 <sup>-4</sup>	0,864±0,125	1,469±5x10 <sup>-4</sup>	0,812±0,021	1,472±5x10 <sup>-4</sup>	0,998±0,108	1,446±0,00	0,761±0,074	1,513±5x10 <sup>-4</sup>
	24 horas	0,866±0,171	1,477±5x10 <sup>-4</sup>	0,841±0,147	1,467±0,00	0,854±0,046	1,471±5x10 <sup>-4</sup>	1,010±0,159	1,441±0,00	0,763±0,108	1,517±5x10 <sup>-4</sup>
	1 semana	0,857±0,066	1,482±3x10 <sup>-6</sup>	0,847±0,053	1,469±6x10 <sup>-4</sup>	0,833±0,087	1,473±0,00	1,032±0,186	1,442±6x10 <sup>-4</sup>	0,760±0,257	1,513±0,00
	40 días	0,873±0,092	1,477±6x10 <sup>-4</sup>	0,840±0,271	1,463±6x10 <sup>-4</sup>	0,836±0,069	1,469±3x10 <sup>-2</sup>	1,030±0,112	1,443±6x10 <sup>-4</sup>	0,755±0,197	1,514±6x10 <sup>-4</sup>
Refrigerada	0 horas	0,869±0,025	1,480±6x10 <sup>-4</sup>	0,864±0,125	1,469±5x10 <sup>-4</sup>	0,812±0,021	1,472±6x10 <sup>-4</sup>	0,998±0,108	1,446±0,00	0,761±0,074	1,513±6x10 <sup>-4</sup>
	24 horas	0,869±0,032	1,479±1,2x10 <sup>-3</sup>	0,838±0,055	1,467±6x10 <sup>-4</sup>	0,820±0,086	1,471±0,00	1,013±0,072	1,448±2,6x10 <sup>-3</sup>	0,776±0,171	1,513±3x10 <sup>-6</sup>
	1 semana	0,879±0,175	1,481±0,00	0,870±0,103	1,468±0,00	0,821±0,112	1,472±0,00	1,013±0,142	1,441±0,00	0,755±0,165	1,502±1,1x10 <sup>-3</sup>
	40 días	0,876±0,028	1,472±6x10 <sup>-4</sup>	0,873±0,042	1,461±6x10 <sup>-4</sup>	0,830±0,116	1,476±1,2x10 <sup>-3</sup>	1,001±0,162	1,437±6x10 <sup>-4</sup>	0,772±0,115	1,497±6x10 <sup>-4</sup>

Las constantes físicas determinadas no mostraron variaciones apreciables teniendo en cuenta el tipo de almacenamiento y los tiempos evaluados hasta los 40 días. Sin embargo, para verificar que las variables del estudio de estabilidad preliminar no presentaran diferencias significativas, se realizó un análisis de varianza en el cual se analizó inicialmente las varianzas en cada condición de almacenamiento en los cuatro tiempos evaluados, luego un análisis de varianza entre los valores obtenidos en una condición de almacenamiento respecto a la otra, es decir, si se presentaron cambios significativos en los resultados de índice de refracción o densidad al mantener refrigeradas o a temperatura ambiente las mezclas.

Para el caso de las mezclas a temperatura ambiente, se analizaron los resultados obtenidos juntos con las réplicas, este análisis se observa detalladamente en la Tabla 1 del Anexo B, donde se nota que, en los cuatro periodos de tiempo evaluados, las mezclas presentan coeficientes de variación bajos, al igual que los valores del error estándar de varianza, tanto en la densidad como índice de refracción. Luego se hizo un análisis de homogeneidad de varianzas empleando el test no paramétrico Fligner-Killeen, para comparar las varianzas en los resultados de densidad e índice de refracción de las réplicas para cada mezcla. En el caso de la densidad el resultado de este análisis arrojó un p-valor<0.05, para las mezclas almacenadas a temperatura ambiente, lo que indica que hay variaciones significativas en las varianzas de los valores de la densidad para esta condición de almacenamiento. Para el índice de refracción el test arrojó un p-valor<0.05, mostrando que en este caso también se presentan diferencias significativas entre las varianzas.

Para el caso de las mezclas en refrigeración, se analizaron los resultados obtenidos juntos con las réplicas, este análisis se observa detalladamente en la Tabla 2 del Anexo B, donde se nota que, en los cuatro periodos de tiempo evaluados, las mezclas presentan coeficientes de variación bajos, al igual que los valores del error estándar de varianza, tanto en la densidad como índice de refracción. El test Fligner-Killeen mostró que para las mezclas refrigeradas, tanto en la densidad como el índice de refracción, se obtuvo un p-valor > 0.05, indicando que no hay variaciones significativas en las varianzas de estas dos constantes físicas para esta condición de almacenamiento.

Así pues, en términos de cifras significativas, la mezclas en refrigeración, no presentan variaciones en los periodos de tiempo evaluados, indicando que al almacenar las mezclas en refrigeración sus propiedades físicas se mantienen más estables.

Ahora, Para comparar las variaciones en las propiedades físicas que pudieron presentarse debido a las dos condiciones de almacenamiento, se empleó el test no paramétrico de Wilcoxon, en el cual se estableció un valor de significancia de 0.05, para establecer variaciones significativas. Los resultados del test se observan en la Figura 1 del Anexo B, donde se detalla los valores de significancia para cada mezcla, en cada periodo de almacenamiento. En la Tabla 3-12, se resumen los resultados de este análisis para las 5 mezclas analizadas, en donde la palabra “No” hace referencia a p-valor > 0.05 y la palabra “Si” a un p-valor < 0.05.

Tabla 3-12 Diferencias significativas de las mejores mezclas fumigantes de acuerdo con la condición de almacenamiento.

Mezcla	Diferencias significativas	
	Densidad	Índice de refracción
1	No	No
2	Si	No
3	Si	No
4	No	No
5	No	Si

Como lo muestra la Tabla 3-12, en la densidad en las mezclas 2 y 3 se encuentran diferencias significativas al variar la condición de almacenamiento, para el caso de del índice de refracción sólo la mezcla 5 muestran diferencias significativas.

Teniendo en cuenta los resultados de los test de Fligner-Killeen y Wilcoxon para las constantes físicas, nos permiten concluir que la condición de almacenamiento de refrigeración es la más adecuada para las mezclas analizadas.

#### **3.3.4.2. Caracterización química: análisis cromatográfico CG-EM y CG-FID de las mejores mezclas**

El análisis cromatográfico por CG-EM se empleó para verificar que los compuestos que constituyen cada una de las mezclas no hubiesen sufrido ninguna degradación, en función del tiempo y en las dos condiciones de almacenamiento. Al observar los perfiles cromatográficos y los espectros de masas obtenidos para las 40 muestras analizadas (Anexo C), no se evidencian cambios en la composición química de las muestras, pues se conservó el perfil cromatográfico en las dos condiciones de almacenamiento y en los cuatro tiempos analizados.

Los resultados del análisis cromatográfico empleando el detector de ionización en llama (CG-FID) nos permitió determinar si hubo cambios en la proporción en que fueron preparadas las mezclas. En el Anexo D a manera de ejemplo se presentan los cromatogramas del análisis a los 40 días bajo las dos condiciones de almacenamiento.

En las figuras 3-9 a 3-13 se presentan los porcentajes de áreas relativas obtenidos para cada mezcla bajo las dos condiciones de almacenamiento en los cuatro tiempos evaluados. Donde los constituyentes enumerados con 1 corresponden al compuesto más activo de la mezcla el cual se encuentra en menor proporción, el numero 2 corresponde al compuesto menos activo de la combinación y el cual está en mayor proporción. La letra R hace referencia a la condición de almacenamiento en refrigeración (4°C) y la letra A la condición de almacenamiento a temperatura ambiente (18°C).

Para el caso de la Mezcla 1 (4-undecanona y *p*-cimeno 15:85) los resultados se muestran en la Figura 3-9, donde se observa que en la condición de almacenamiento refrigerada, el área de los compuestos no sufre ningún cambio apreciable. Por otro lado, en las áreas de los compuestos de la mezcla a temperatura ambiente, el compuesto *p*-cimeno quien se encuentra en mayor proporción, presenta una reducción cercana al 9% en su área después de 1 semana. Por otro lado el compuesto 4-undecanona que se encuentra en menor proporción presenta esta misma variación porcentual, pero tendiente al aumento. Lo

observado en el análisis de esta mezcla indica que esta se mantiene más estable en la condición de almacenamiento refrigerada hasta los 40 días.

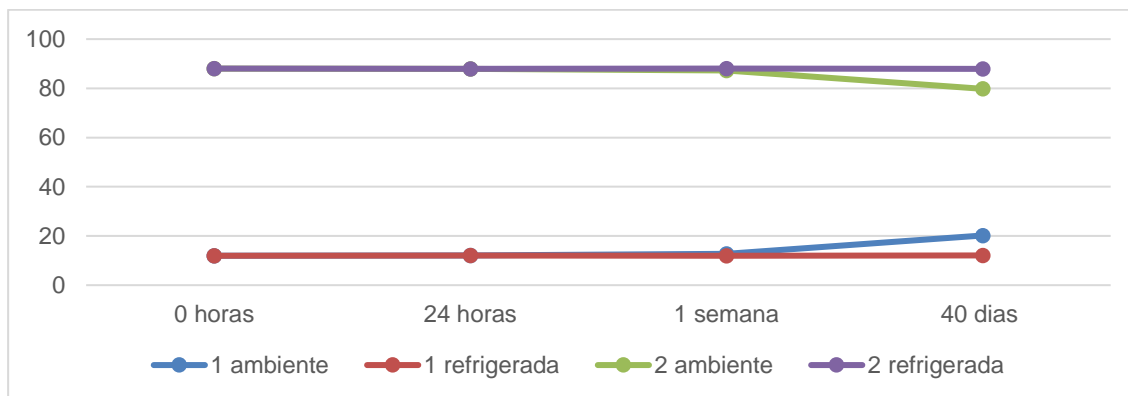


Figura 3-9 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 1 (4-undecanona[1]-p-cimeno[2] 15:85) en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas.

En la Figura 3-10 se ilustra el comportamiento de las áreas relativas para los compuestos de la Mezcla 2 (1,8-cineol y DL-limoneno 20:80). En las dos condiciones de almacenamiento se observa que en el análisis después de las 24 horas, los compuestos presentan variaciones menores en sus áreas relativas, mostrando un leve aumento del compuesto más activo(1,8-cineol) y una mínima disminución en el menos activo (DL-limoneno). Para esta mezcla la condición de almacenamiento no influye de manera determinante.

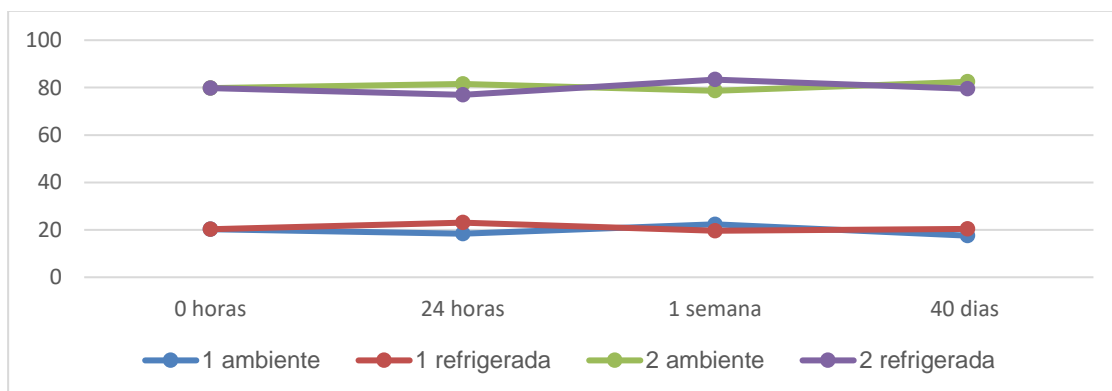


Figura 3-10 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 2 (1,8-cineol [1]-DL-limoneno[2] 30:70) en las dos condiciones de almacenamiento.

En la Figura 3-11 observamos el comportamiento de los compuestos de la Mezcla 3 ((-)-isopulegol-DL-limoneno 10:90), encontrándose que no hay cambios apreciables en las

áreas relativas, para las dos condiciones de almacenamiento y los cuatro tiempo evaluados, es la única de las cinco mezclas que en el estudio de estabilidad preliminar por cromatografía de gases, no muestra ninguna afectación por el tipo almacenamiento o durante el tiempo.

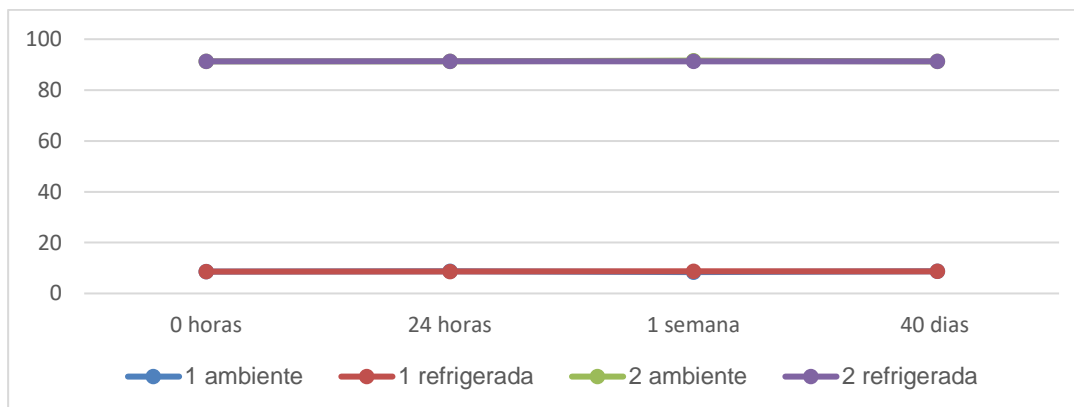


Figura 3-11 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 3 ((-)-isopulegol[1]-DL-limoneno[2] 10:90) en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas.

La Mezcla 4 (nonano-DL-limoneno 50:50) como se muestra en la Figura 3-12 presenta un comportamiento similar a las mezclas 1. En este caso los dos compuestos en la condición de almacenamiento a temperatura ambiente muestran variaciones no apreciables en los análisis de 1 semana y 40 días, situación que nos permite reafirmar que para este tipo de combinaciones a partir de compuestos volátiles es recomendable el almacenamiento bajo refrigeración.

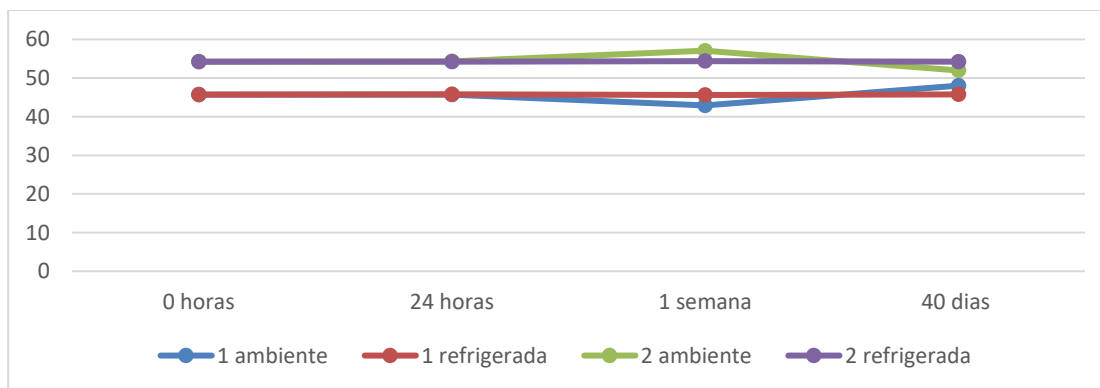


Figura 3-12 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 4 (nonano[1]-DL-limoneno[2] 50:50) en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas.

El comportamiento descrito anteriormente, también lo presentó la Mezcla 5 (2-decanona-safrol 20:80), donde las áreas relativas de los compuestos para cada condición de almacenamiento se muestran en la Figura 3-13. En este caso los compuestos de la mezcla a temperatura ambiente surten cambios de un 11% en sus áreas (aumentando en 2-decanona y disminuyendo en safrol), cambio que se conserva en el análisis a los 40 días. El comportamiento en las áreas de los constituyentes de la mezcla en condición de refrigeración se conservan en los cuatro tiempo analizados. La tendencia de aumentar el área de los compuestos en menor proporción y disminuir la del compuesto en mayor proporción, que se observó para las mezclas 1, 4 y 5 indica que al no conservar en refrigeración las mezclas, se altera la composición de estas, lo que puede conllevar a que se presenten cambios significativos en la actividad biológica.

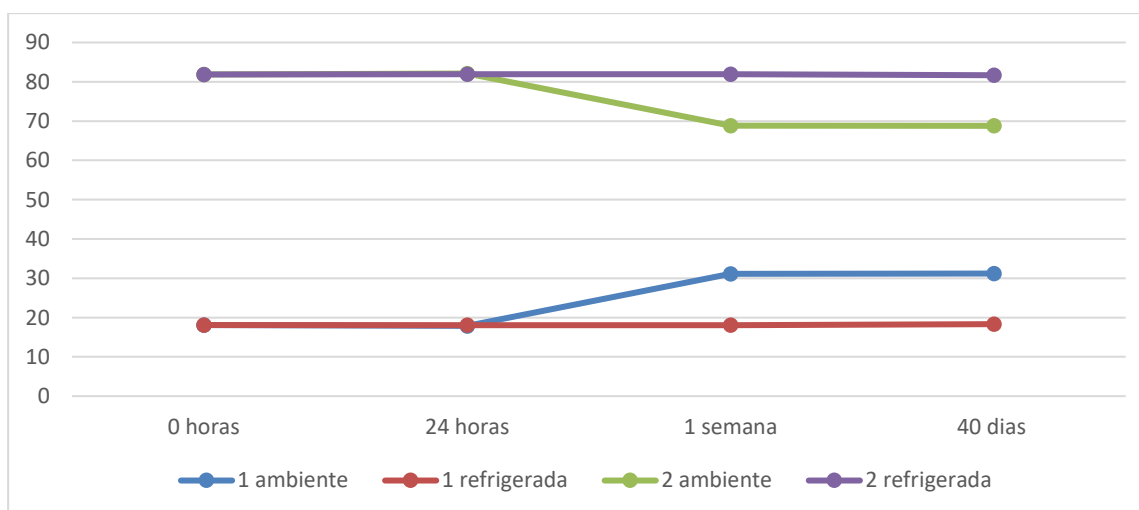


Figura 3-13 Áreas relativas de los compuestos de la Mezcla 5 (2-decanona[1]-safrol[2] 20:80) en las dos condiciones de almacenamiento evaluadas.

### 3.3.4.3. Evaluación de la actividad fumigante, tóxica por contacto y repelente de las mejores mezclas

#### 3.3.4.3.1. Evaluación de la actividad fumigante

La evaluación de estas tres actividades biológicas se realizó únicamente a las mejores mezclas fumigantes, puesto que ninguna combinación tóxica por contacto presentó sinergismo. Para la actividad fumigante, se empleó el método de vial en vial descrito en la metodología, evaluando la concentración letal cincuenta de estas mezclas, buscando establecer si se presentaban variaciones en el potencial fumigante ocasionado por el modo

de almacenamiento y tiempo de conservación de la mezcla. Los resultados de este seguimiento se muestran en la Figura 3-14, donde se observa que en las dos condiciones de almacenamiento y tiempos evaluados para todas las mezclas, sus porcentajes de mortalidad son superiores al 50%, probando que la concentración calculada en la regresión probit para cada mezcla alcanza la letalidad esperada y que no hubo variaciones apreciables en la actividad fumigante, que puedan asociarse a las condiciones de almacenamiento y tiempos de conservación. Las ligeras variaciones en los porcentajes de mortalidad entre las dos condiciones de almacenamiento o los intervalos de tiempo, se pueden estar presentando por las limitaciones propias del bioensayo.

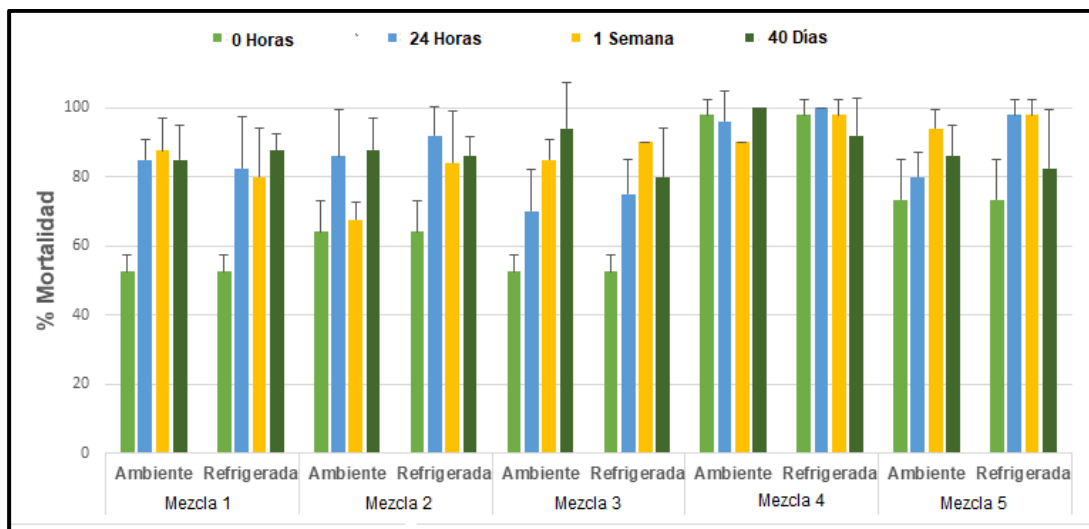


Figura 3-14 Seguimiento de los porcentajes de mortalidad de las 5 mejores mezclas en dos condiciones de almacenamiento.

### 3.3.4.3.2. Evaluación de la actividad tóxica por contacto

La actividad tóxica por contacto fue evaluada en las 5 mejores mezclas fumigantes, buscando identificar otros modos de acción que puedan tener estas combinaciones. En la Tabla 3-13 se presentan los porcentajes de mortalidad de las combinaciones evaluadas a la dosis de la  $DL_{50}$  del compuesto más activo de la mezcla. Los resultados de la tabla indican que solo la Mezcla 5 mostró un porcentaje de mortalidad superior al 60% indicando que además de tener buenos resultados como fumigante, también tiene potencial tóxico por contacto, y para esta última actividad se evidencia un posible sinergismo. Por los anteriores se evaluaron concentraciones menores para esta mezcla, y por un análisis de



regresión probit se determinaron sus dosis letales, estableciéndose una  $DL_{50}=3,45$   $\mu\text{g}/\text{insecto}$  con límites de confianza superior de 5,33 e inferior de 1,57. De acuerdo con estos resultados, se calculó un  $IC=0,40$  que de acuerdo con la clasificación empleada corresponde a “sinergismo”. Al calcular los factores de sinergismo se obtuvieron valores de 2,08 para safrol y 8,28 para 2-decanona, valores incluso mayores a los obtenidos en las mejores mezclas fumigantes. La representación gráfica del sinergismo se muestra mediante el Isoblograma en la figura 3-15. El resultado encontrado para esta mezcla respecto a la actividad tóxica por contacto, sugirieren un ajuste del modelo estadístico empleado para la predicción de las mezclas sinérgicas por acción tóxica por contacto.

Tabla 3-13 Porcentajes de mortalidad de la evaluación tóxica por contacto de las mejores mezclas fumigantes.

Mezcla	Compuestos	$DL_{50}$ individuales $\mu\text{g}/\text{insecto}$	Concentración evaluada $\mu\text{g}/\text{insecto}$	% Mortalidad
1	4-undecanona	9,18	9,2	0±0,00
	$\rho$ -cimeno	66,67		
2	1,8-cineol	23,23	23,1	16,66±5,77
	DL-limoneno	53,68		
3	(-)-isopulegol	18,37	18,36	0±0,00
	DL-limoneno	53,68		
4	nonano	93,94	53,68	3,33±5,77
	DL-limoneno	53,68		
5	2-decanona	28,57	7,21	93,33±11,54
	safrol	7,27		

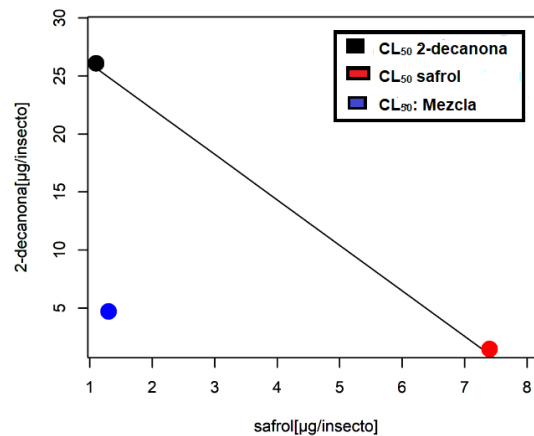


Figura 3-15 Isoblograma de la mezcla 5 fumigante en la evaluación tóxica por contacto.

### 3.3.4.3.3. Evaluación de la actividad repelente de las mejores mezclas

La evaluación de la actividad repelente a las mejores mezclas fumigantes se determinó empleando el método de preferencia de área con estímulo alimenticio a las concentraciones de 0,1  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  y 0,01  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ . En la Tabla 3-14 se presentan los porcentajes y clases de repelencia según la escala Abdel-Rahman para verificar si estas mejores mezclas fumigante, presentaban actividad repelente.

Tabla 3-14 Porcentajes y clases de repelencia de las mejores mezclas fumigantes.

[ ]	0,1 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$						0,01 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$					
	2 horas		6 horas		24 horas		2 horas		6 horas		24 horas	
Mezcla	%R $\pm$ DE	C	%R $\pm$ DE	C	%R $\pm$ DE	C	%R $\pm$ DE	C	%R $\pm$ DE	C	%R $\pm$ DE	C
1	55 $\pm$ 10,00	III	0 $\pm$ 0,00	0	8 $\pm$ 17,88	I	16 $\pm$ 8,94	I	-36 $\pm$ 8,90	0	-75 $\pm$ 10,00	0
2	-40 $\pm$ 0,00	0	60 $\pm$ 0,00	III	13,33 $\pm$ 11,54	I	40 $\pm$ 14,14	II	60 $\pm$ 0,00	III	-25 $\pm$ 10,00	0
3	12 $\pm$ 10,95	I	36 $\pm$ 8,94	II	24 $\pm$ 8,94	II	45 $\pm$ 10	III	32 $\pm$ 10,95	II	-75 $\pm$ 10,00	0
4	35 $\pm$ 10,00	II	6,7 $\pm$ 11,54	I	-15 $\pm$ 10,00	0	-15 $\pm$ 10,00	0	-44 $\pm$ 8,90	0	-60 $\pm$ 0,00	0
5	0 $\pm$ 0,00	0	15 $\pm$ 10,00	I	15 $\pm$ 10,00	I	36 $\pm$ 8,94	II	12 $\pm$ 10,95	I	-40 $\pm$ 0,00	0

[ ]: concentración evaluada %R: Porcentaje de repelencia D.E: Desviación estándar C:Clase de repelencia.

Los resultados del estudio de repelencia permiten evidenciar que las mezclas presentan efectos repelentes entre moderado y nulo a las dos concentraciones evaluadas. Las mezclas 1 y 4 presentaron una repelencia moderada a la concentración más alta evaluada después de 2 horas de tratamiento, pero su actividad fue disminuyendo en función del tiempo, indicando que su acción repelente es de corta duración. Para estas dos mezclas se encuentra que la actividad a la mínima concentración evaluada no es promisoría.

Para la mezcla 3 se observa un comportamiento particular. A la máxima concentración la actividad repelente va desde baja hasta moderada, aumentando ligeramente en función del tiempo, pasando de ser repelente de clase I a un repelente de clase II. Al disminuir la concentración de esta mezcla se observa que se mejora notablemente la actividad repelente en los dos primeros tiempos evaluados, repelencia que desaparece después de 24 horas.

Para el caso de la mezcla 2 presenta un comportamiento atípico, pues a la máxima concentración evaluada presenta una buena repelencia a las 6 horas, pero a las 2 horas

tiene efecto atrayente. Contrario a lo anterior, para la mínima concentración evaluada, se observa que la actividad repelente aumenta en un 20% entre las 2 y 6 horas.

Los resultados de la actividad repelente de las mezclas fumigantes permiten evidenciar que a pesar de no mostrar resultados prometedores, también pueden afectar al insecto por este modo de acción.

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### Conclusiones

El presente estudio hace un aporte a las investigaciones en determinación a la actividad sobre *T. castaneum* por cuatro modos de acción (fumigante, tóxico por contacto, repelente y antialimentaria) de compuestos orgánicos volátiles presentes en aceites esenciales, el diseño y evaluación de mezclas insecticidas, y la caracterización fisicoquímica y biológica de las mejores mezclas. Los resultados obtenidos permiten concluir:

- Los compuestos de tipo monoterpeno y monoterpénico fueron los que presentaron el mayor potencial fumigante, siendo los compuestos *R*-(+)-pulegona, *S*-(-)pulegona y terpinoleno los más promisorios, con valores de  $CL_{50}$  menores a 30  $\mu$ M, obteniendo concentraciones letales comparables con las del control positivo.
- Este estudio presenta el primer reporte de actividad fumigante sobre *T. castaneum* para los compuestos: nonano, 2-decanona, 4-undecanona, nerolidol, isoeugenol, farnesol, metil isoeugenol, acetato de geranilo, farneseno, nonanal, acetato de terpenilo, metileugenol, L-acetato de mentilo, decanal.
- El análisis cualitativo de relación estructura actividad fumigante sugiere que este modo de acción puede estar relacionado con la presencia de grupos carbonilo  $\alpha,\beta$  insaturados en el núcleo de monoterpenos monocíclicos y con la presencia de insaturaciones exocíclicas en sustituyentes isopropilideno en núcleos monoterpénicos con anillos de seis miembros.

- Este estudio presenta el primer reporte para la actividad tóxica por contacto sobre *Tribolium castaneum* de los compuestos nonano, 2-nonanona,  $\alpha$ -felandreno, 2-decanona,  $\alpha,\beta$ -tujona y 4-undecanona. Por este modo de acción se encontró que el monoterpenoide S-(+)-carvona fue el compuesto más activo con una DL<sub>50</sub> comparable con la del control positivo (cipermetrina).
- Empleando la metodología de preferencia de área con estímulo alimenticio, se encontró que para los compuestos DL-limoneno, R-(+)-pulegona y S-(+)-carvona se obtuvieron los mejores resultados de actividad repelente en las tres concentraciones evaluadas.
- Esta investigación hace un importante aporte en la evaluación fagodisuasiva de 23 compuestos de aceites esenciales sobre *Tribolium castaneum*, en las dos concentraciones evaluadas, los dos compuestos que presentaron mejores índices de disuasión a la menor concentración (300 ppm) fueron: sabineno y estragol, los cuales presentaron disuasión alimentaria débil.
- Este estudio representa el primer reporte para el diseño, elaboración y evaluación de mezclas insecticidas sobre *Tribolium castaneum* a partir del modelo de adición de concentración el cual permitió predecir un buen número de combinaciones constituidas por volátiles presentes en aceites esenciales, con posibles sinergismos. De las 15 mezclas que predijo el modelo de adición de concentración, a partir del índice de combinación, solo 8 presentaron efectos sinérgicos cuando fueron evaluadas en el modelo fumigante. Los mejores resultados se obtuvieron para la Mezcla 1 (4-undecanona y p-cimeno) y la Mezcla 2 (1,8-cineol y DL-limoneno), presentando efectos sinérgicos con un índice de combinación de 0,39 y 0,41 respectivamente. Las combinaciones con mejores resultados no superaron al control positivo, pero si alcanzaron valores muy cercanos a su CL<sub>50</sub>.
- El modelo estadístico empleado para predecir posibles sinergismos en mezclas con efecto tóxico por contacto no arrojó ninguna combinación que a nivel experimental presentara los sinergismos predichos.
- El estudio de estabilidad preliminar de las 5 mejores mezclas fumigantes, permitió determinar que las mezclas permanecen estables en cuanto a su composición química y actividad biológica hasta los 40 días de conservación, siendo la condición de almacenamiento de refrigeración, la más adecuada para garantizar la estabilidad de las mezclas.

- Las 5 mejores mezclas fumigantes afectan también al insecto por modo de acción repelente, pero solo la Mezcla 5, tiene la capacidad de afectarlo adicionalmente por contacto, siendo esta combinación una mezcla multiefecto.

## Recomendaciones

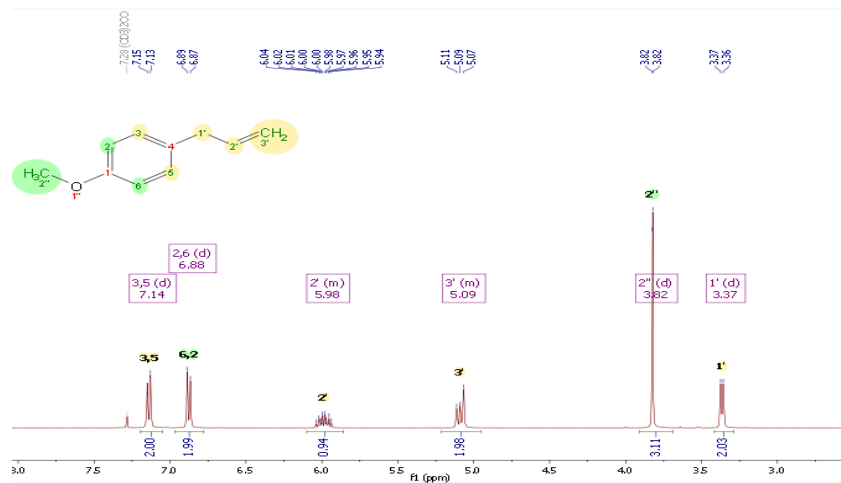
- Evaluar los mecanismos de acción de enzimas de importancia en *Tribolium castaneum* como: acetilcolinesterasa, glutatión S transferasa, catalasa, citocromo P450 y peroxidasas. de los compuestos activos y las mejores mezclas determinadas en este estudio.
- Realizar la semi síntesis de algunos compuesto, buscando obtener núcleos y características estructurales similares a las de los compuestos con mayor actividad, para ser evaluados por diferentes modos de acción sobre el insecto, de tal manera que se tenga un número mayor de estructuras que permita realizar un estudio computacional de estructura actividad.
- Revisión del modelo estadístico empleado para garantizar que todas las posibilidades de sinergismo que el modelo pueda predecir se evalúen. En especial para mezclas por modo de acción toxica por contacto, incluso emplear otro modelo buscando hallar efectos sinérgicos en combinaciones por este modo de acción.
- Realizar un estudio completo de estabilidad sobre las mejores mezclas preparando varios lotes para cada condición de almacenamiento de cada una de las mejores mezclas, y evaluar un método de encapsulación para pruebas *in vivo*.
- Obtener por purificación del aceite esencial, síntesis o comercialmente el monoterpenoide piperitona, para determinar su actividad fumigante, toxica por contacto, repelente y antialimentaria.
- Revisar a detalle el comportamiento en la actividad fumigante del fenilpropanoide *trans*-anetol, logrando controlar las variables sobre los ensayos y poder determinar su actividad fumigante, toxica por contacto, repelente y antialimentaria.
- Evaluar otros compuestos mayoritarios y más frecuentes en aceites esenciales promisorios sobre el insecto, incluso evaluar aceites esenciales que no han sido reportados sobre el insecto, y a partir de sus resultados la evaluación de sus constituyentes mayoritarios y más frecuentes.

- Evaluar la toxicidad en mamíferos de los compuestos y mezclas promisorias de este estudio.

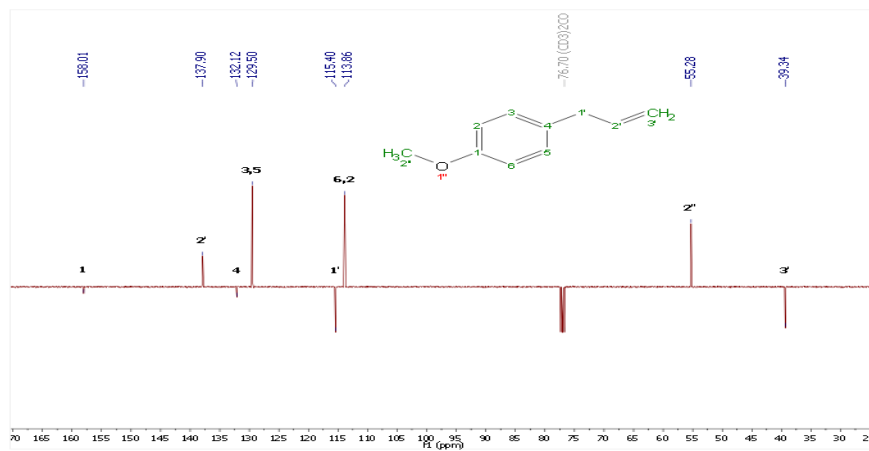


## Anexos

### Anexo A: Perfil cromatográfico CG-EM y espectros APT y $^1\text{H}$ de la purificación del estragol

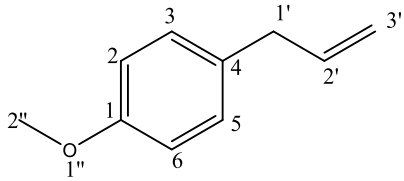


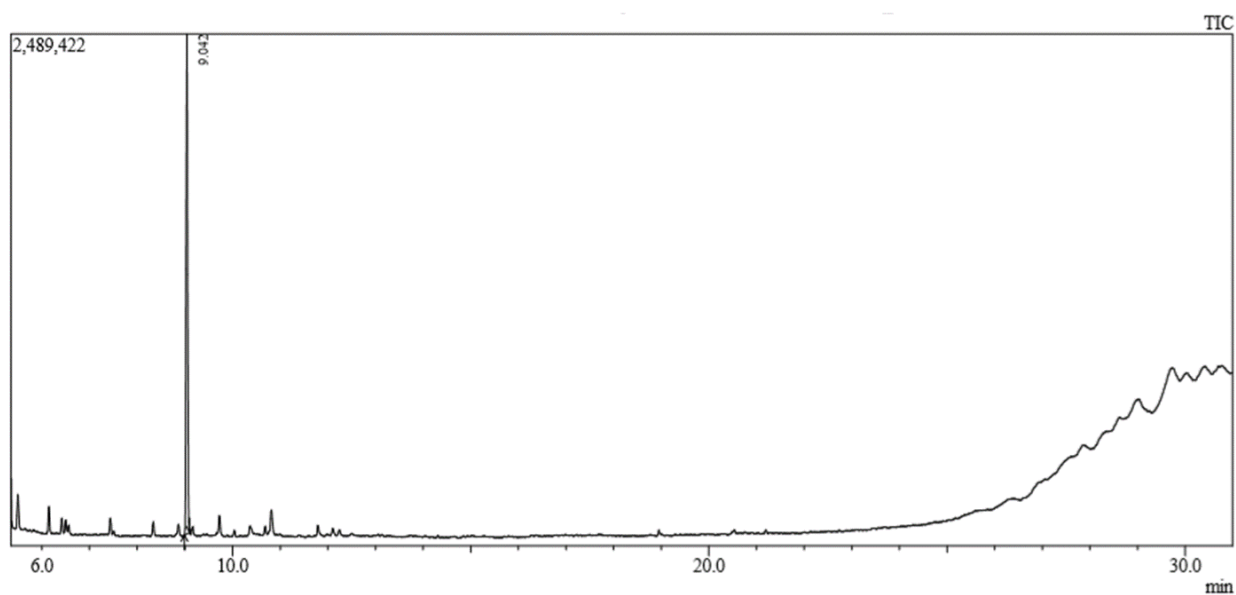
Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de estragol (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Espectro de RMN APT de estragol (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

## . Datos espectroscópicos de estragol.

	<b>Nombre</b>	1-ail-4-metoxibenceno (Estragol)
	<b>Estado fisico:</b>	Líquido incoloro
	<b>Formula molecular</b>	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O
	<b>Masa molecular</b>	148,20 g/mol
<b>RMN <sup>1</sup>H:</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ <sub>H</sub> 7.14 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.10 – 5.89 (m, 1H), 5.18 – 4.95 (m, 1H), 3.82 (s, 1H), 3.37 (d, J = 6.7 Hz, 13H).		
<b>APT:</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ <sub>C</sub> 158.0 (C), 137.9 (CH), 132.1 (C), 129.5 (CH), 115.4 (CH <sub>2</sub> ), 113.9 (CH), 55.2 (CH <sub>2</sub> ), 39.3 (CH <sub>2</sub> ).		
<b>Referencia:</b> Seomoon, D., Lee, K., Kim, H., & Lee, P. H. (2007). Inter- and intramolecular allylindiumcatalyzed allyl cross-coupling reactions using allylindium generated in situ from allyl acetates, indium, and indium trichloride. <i>Chemistry - A European Journal</i> , 13(18), 5197–5206.		



Perfil cromatográfico CG-EM del estragol

## ANEXO B. Análisis de varianza de las constantes físicas de las mejores mezclas

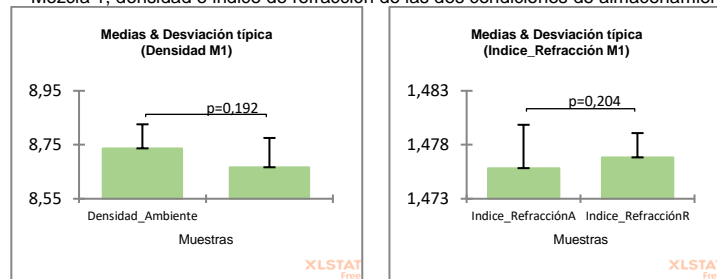
Tabla 1. Análisis de variación para índice de refracción y densidad a temperatura ambiente

Estadístico	Densidad					Índice de refracción				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
Mínimo	8.630	8.250	8.110	9.840	7.330	1.469	1.458	1.470	1.434	1.494
Máximo	8.980	8.860	8.410	10.320	7.900	1.479	1.467	1.474	1.445	1.512
Rango	0.350	0.610	0.300	0.480	0.570	0.010	0.009	0.004	0.011	0.018
Mediana	8.720	8.685	8.210	10.080	7.615	1.477	1.466	1.470	1.440	1.507
Media	8.737	8.615	8.243	10.088	7.640	1.476	1.464	1.471	1.440	1.505
Desviación típica (n-1)	0.089	0.210	0.111	0.170	0.143	0.004	0.003	0.002	0.004	0.008
Coefficiente de variación	0.010	0.024	0.013	0.017	0.019	0.003	0.002	0.001	0.003	0.005
Asimetría (Fisher)	1.929	-0.711	0.426	-0.143	-0.261	-1.165	-1.260	1.531	-0.347	-0.277
Límite inferior de la media (95%)	8.680	8.482	8.173	9.980	7.549	1.473	1.462	1.470	1.437	1.500
Límite superior de la media (95%)	8.793	8.748	8.314	10.195	7.731	1.478	1.466	1.472	1.443	1.510
Error estándar de la varianza	0.003	0.019	0.005	0.012	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

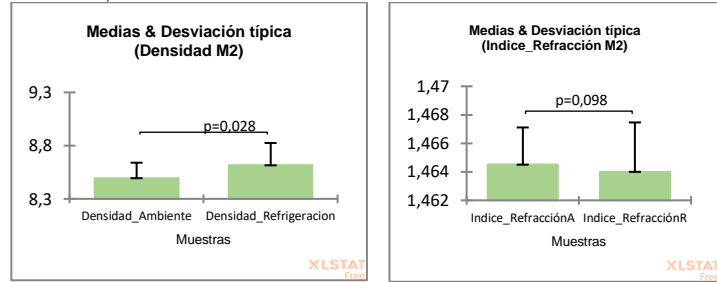
Tabla 2. Análisis de variación para índice de refracción y densidad a temperatura ambiente

Estadístico	Densidad					Índice de refracción				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
Mínimo	8.470	8.250	8.110	9.840	7.380	1.474	1.460	1.465	1.440	1.511
Máximo	8.810	8.760	8.590	10.610	7.980	1.480	1.467	1.471	1.444	1.516
Rango	0.340	0.510	0.480	0.770	0.600	0.006	0.007	0.006	0.004	0.005
Mediana	8.685	8.510	8.360	10.075	7.610	1.477	1.466	1.470	1.440	1.512
Media	8.667	8.494	8.353	10.187	7.626	1.477	1.465	1.469	1.441	1.512
Desviación típica (n-1)	0.109	0.146	0.166	0.245	0.177	0.002	0.003	0.002	0.002	0.002
Coefficiente de variación (n-1)	0.013	0.017	0.020	0.024	0.023	0.002	0.002	0.001	0.001	0.001
Asimetría (Fisher)	-0.576	-0.013	-0.225	0.349	0.425	0.363	-1.103	-1.579	1.164	1.216
Límite inferior de la media (95%)	8.598	8.402	8.248	10.031	7.514	1.475	1.463	1.468	1.440	1.511
Límite superior de la media (95%)	8.736	8.587	8.459	10.342	7.738	1.478	1.466	1.471	1.442	1.514
Error estándar de la varianza	0.005	0.009	0.012	0.026	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

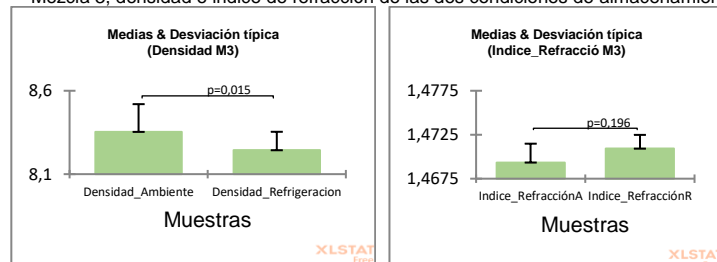
Mezcla 1, densidad e índice de refracción de las dos condiciones de almacenamiento



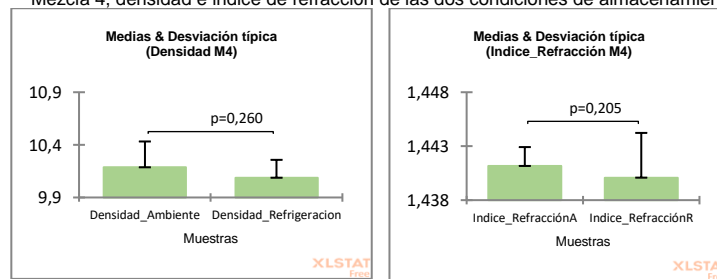
Mezcla 2, densidad e índice de refracción de las dos condiciones de almacenamiento



Mezcla 3, densidad e índice de refracción de las dos condiciones de almacenamiento



Mezcla 4, densidad e índice de refracción de las dos condiciones de almacenamiento



Mezcla 5, densidad e índice de refracción de las dos condiciones de almacenamiento

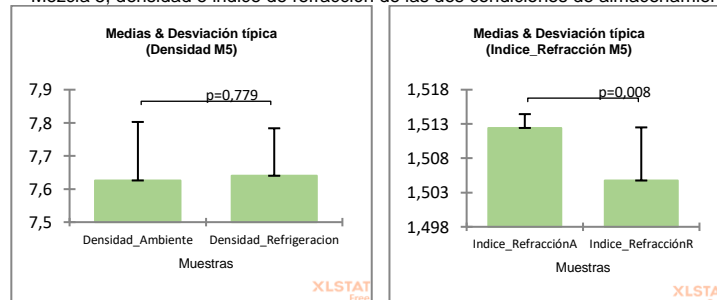
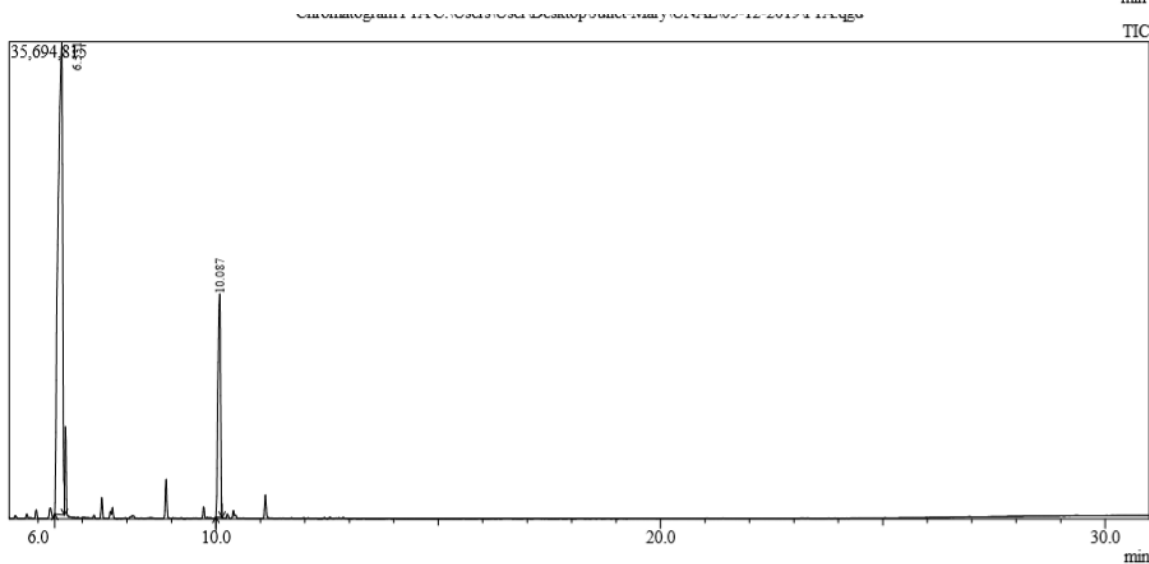
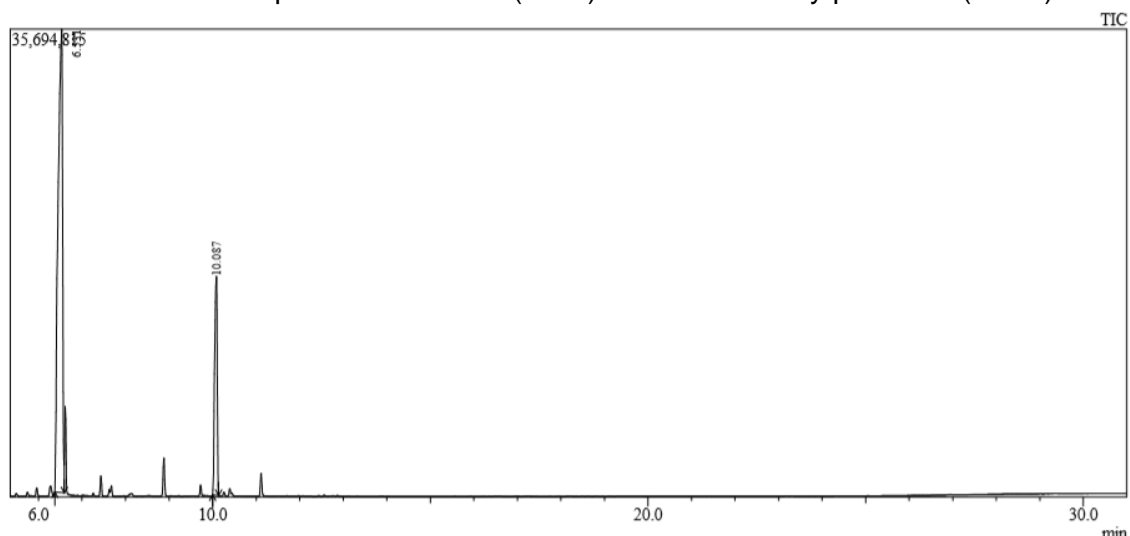


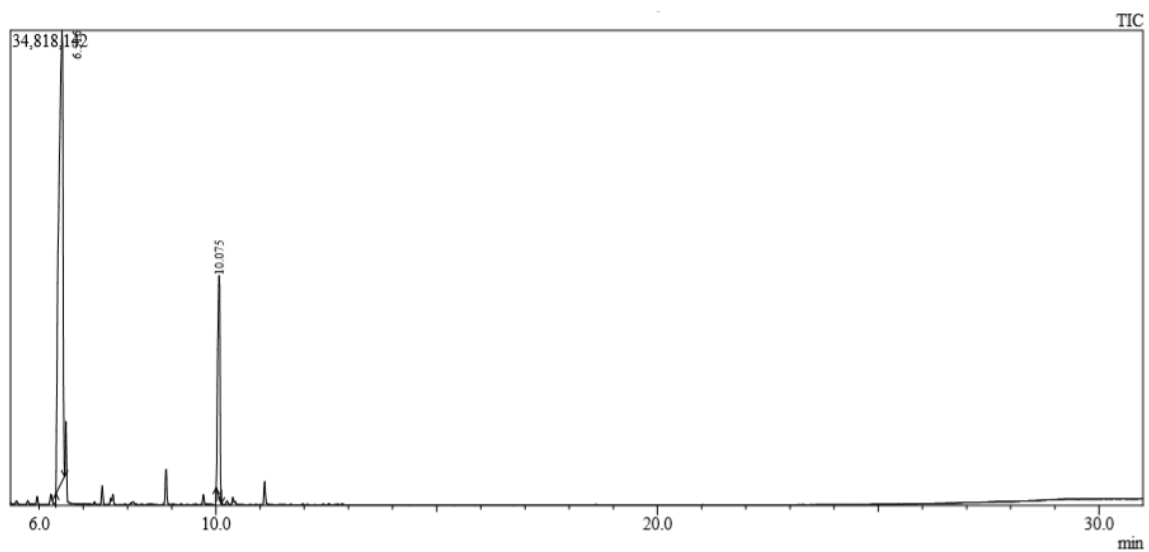
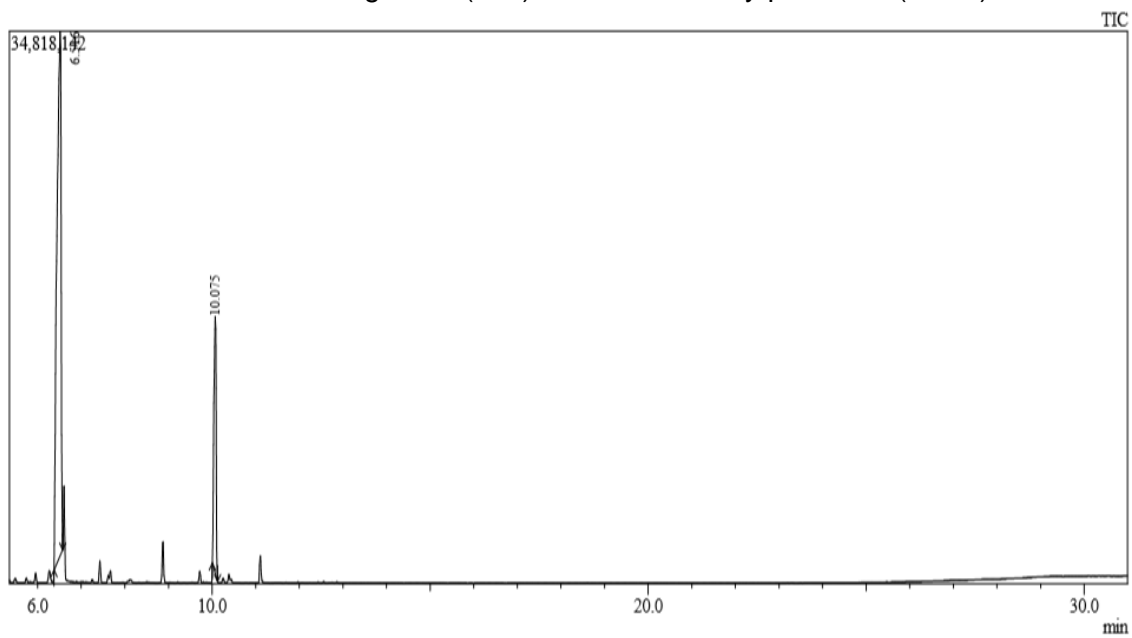
Figura 1. Varianzas de las constantes físicas de las mejores mezclas en las dos condiciones de almacenamiento.

## Anexo C. Perfiles cromatográficos CG-EM a las 0 horas y 40 días de las 5 mejores mezclas en las dos condiciones de almacenamiento

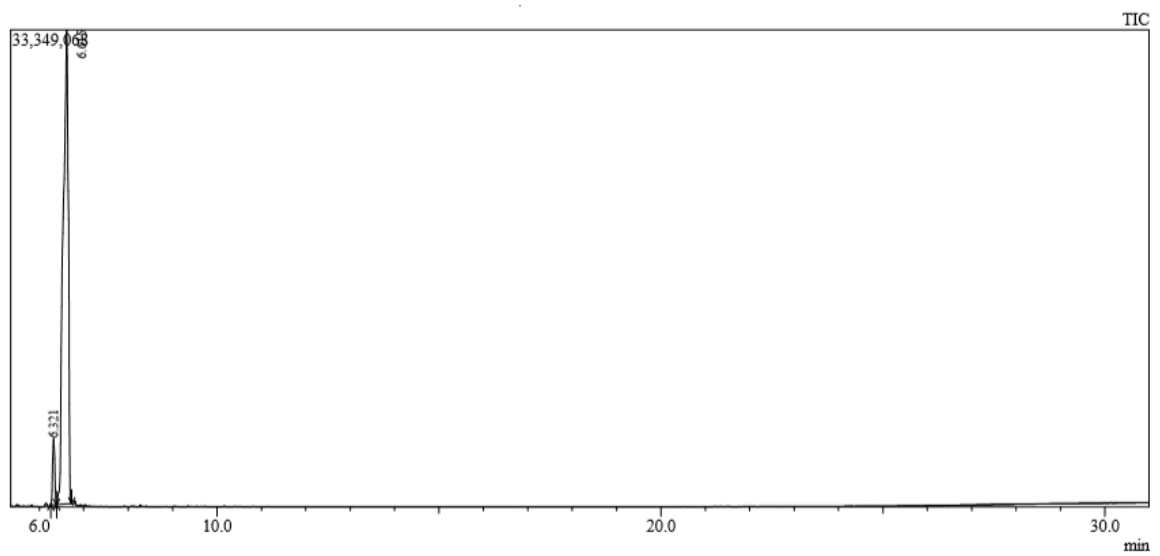
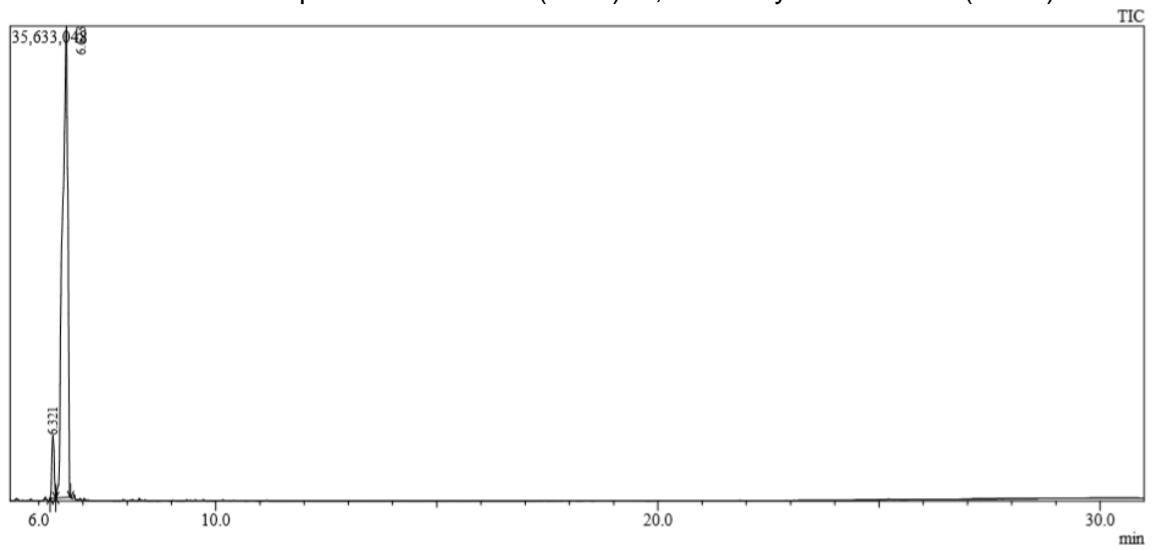
Mezcla 1 a temperatura ambiente(18°C): 4-undecanona y p-cimeno (15:85)



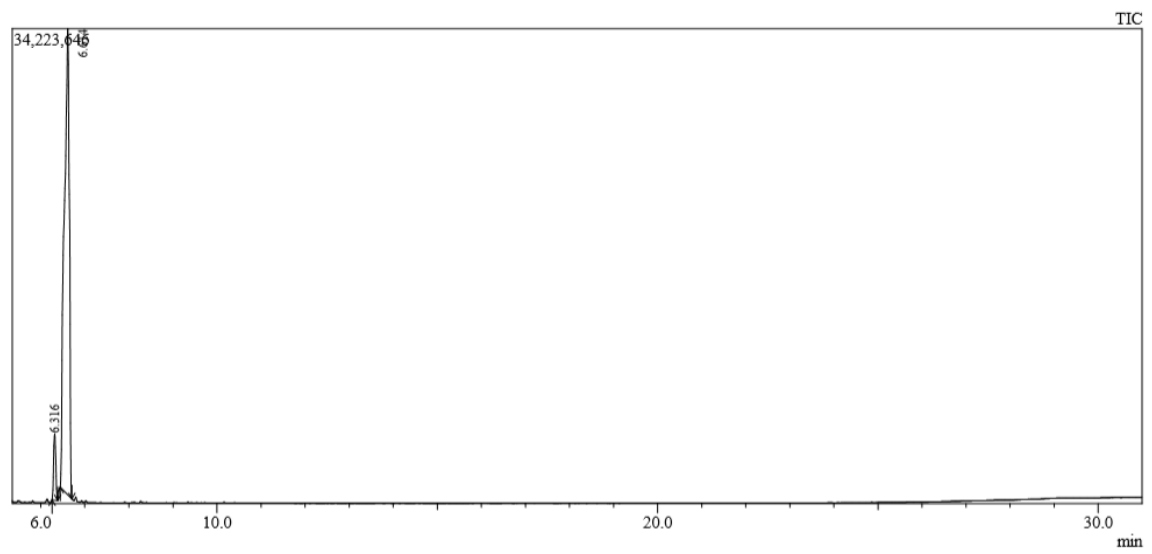
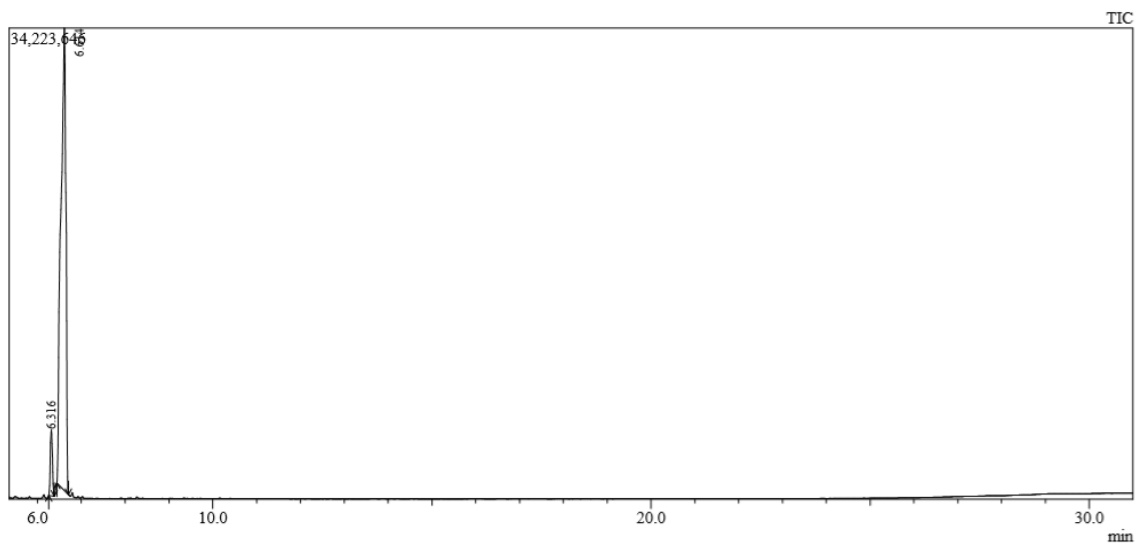
Mezcla 1 Refrigerada (4°C): 4-undecanona y p-cimeno (15:85)



Mezcla 2 a temperatura ambiente(18°C): 1,8-cineol y DL-limoneno(30:70)

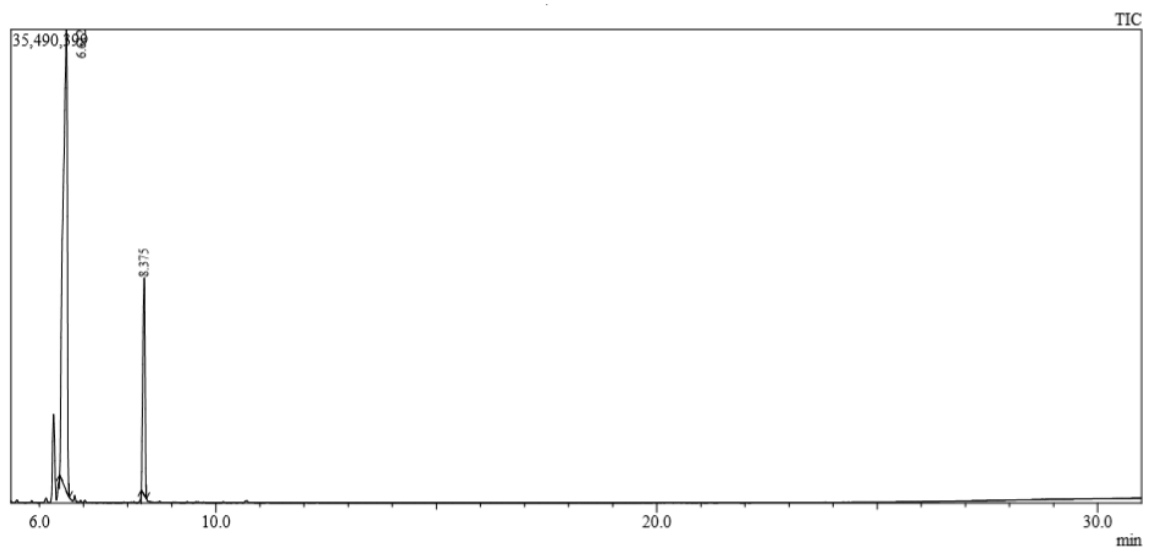
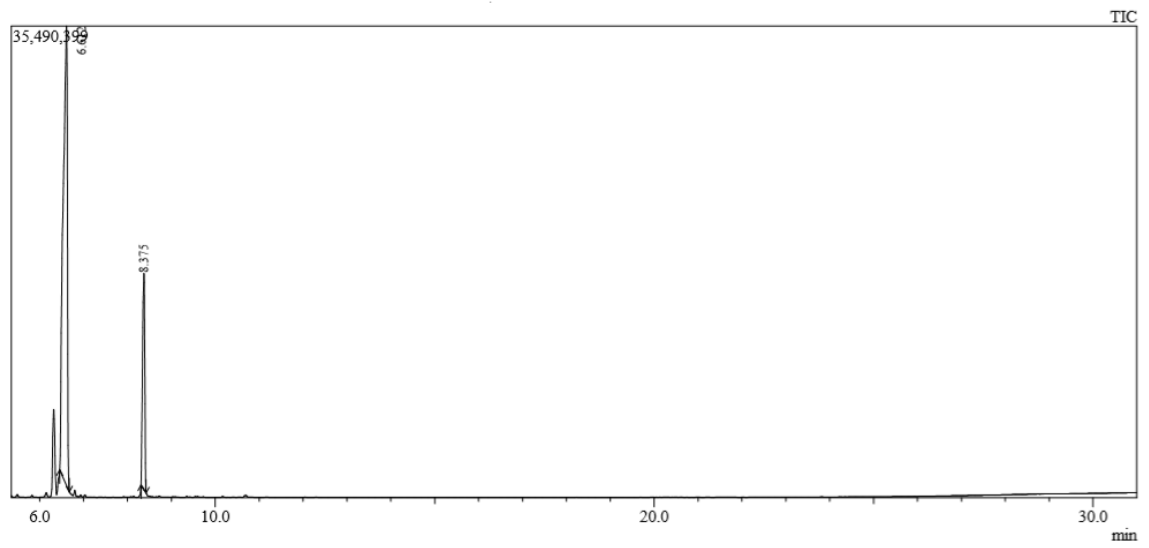


## Mezcla 2 Refrigerada (4°C): 1,8-cineol y DL-limoneno(30:70)

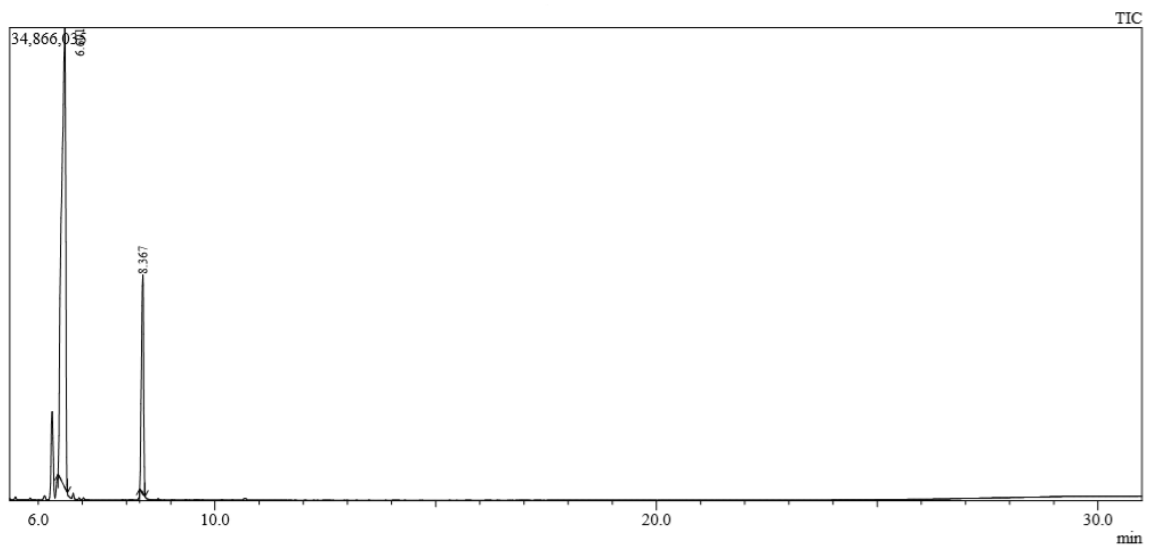
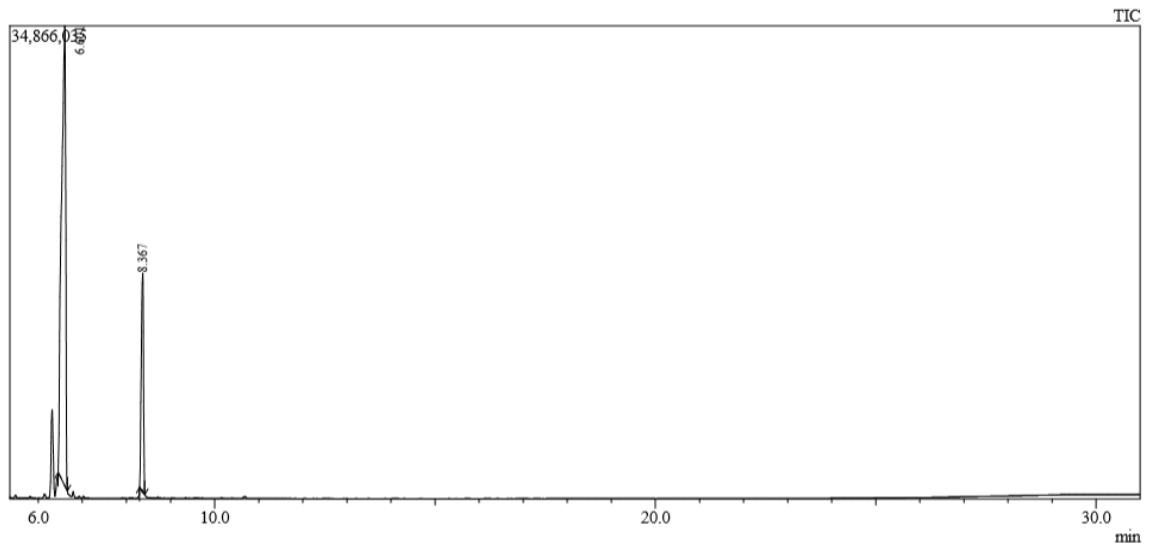




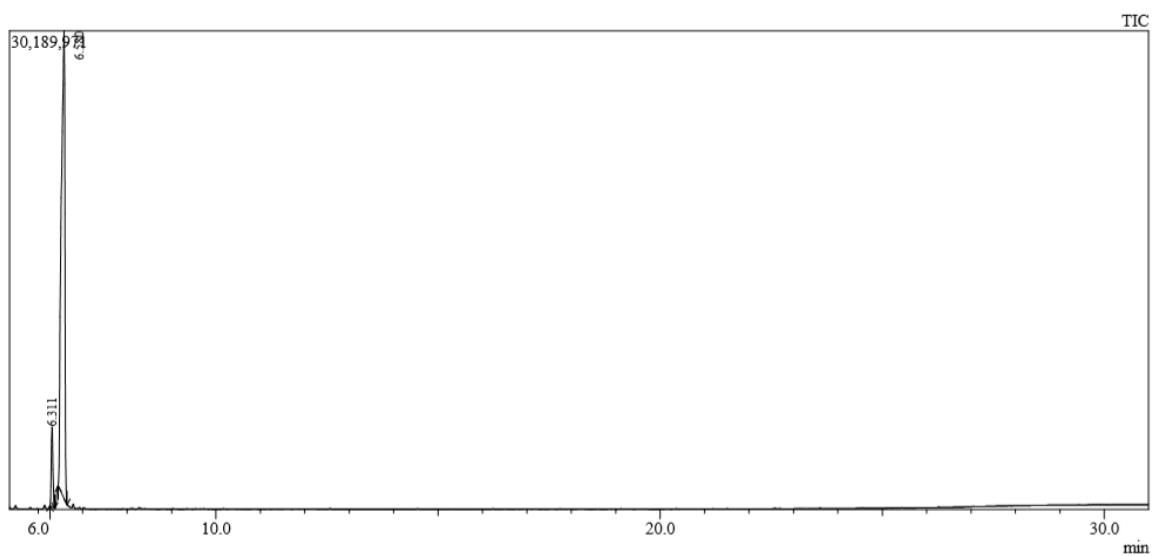
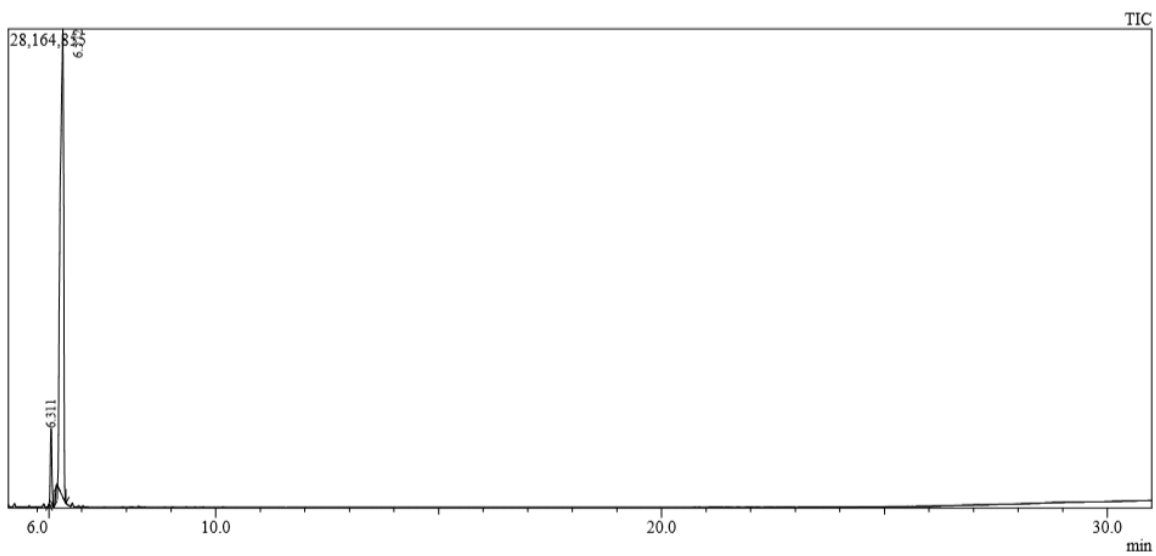
Mezcla 3 a temperatura ambiente(18°C): (-)-isopulegol y DL-limoneno(10:90)



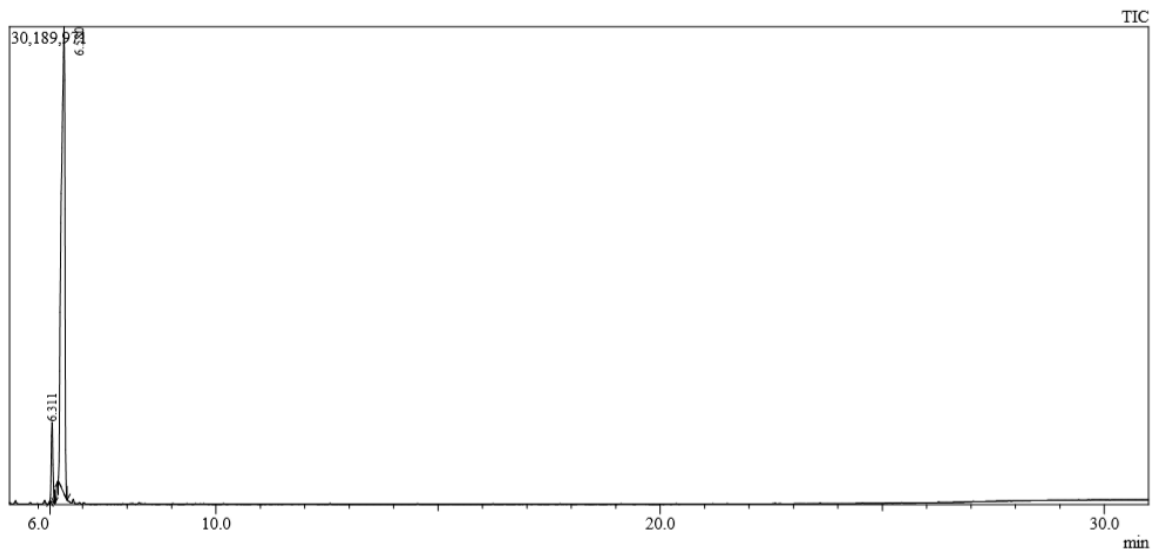
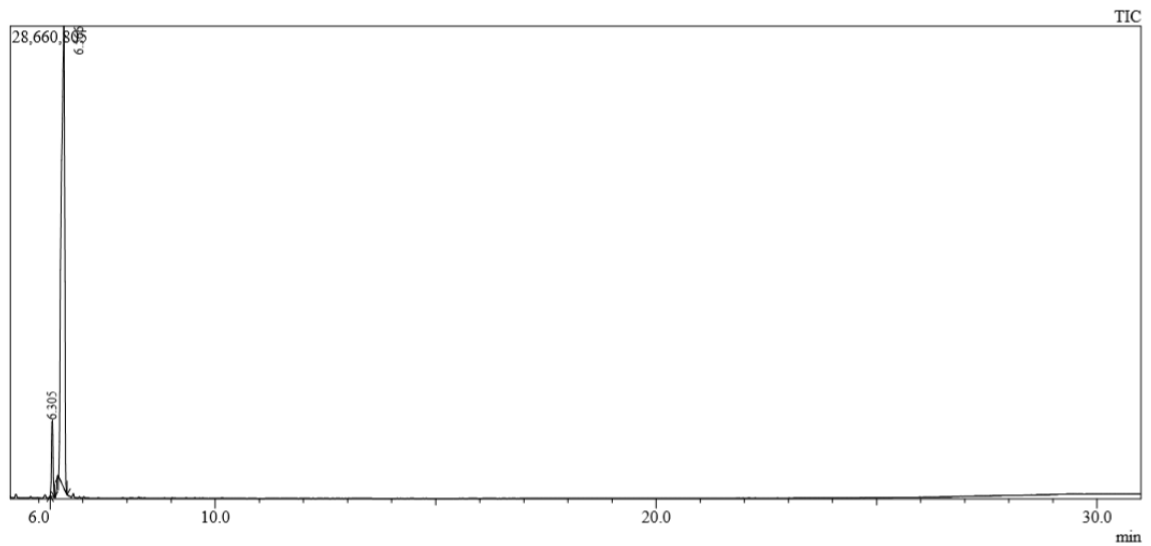
## Mezcla 3 Refrigerada (4°C): (-)-isopulegol y DL-limoneno(10:90)



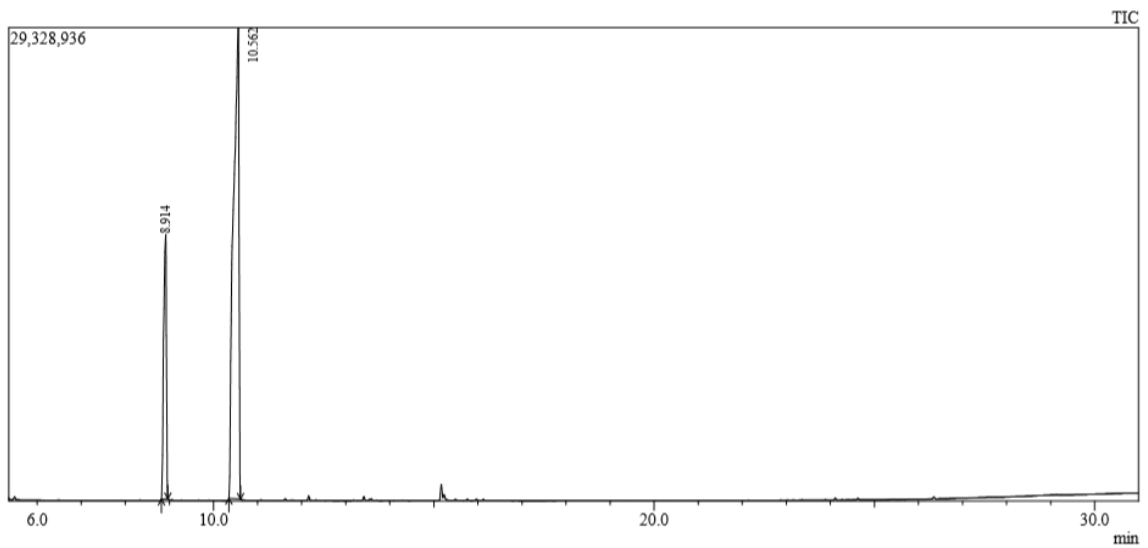
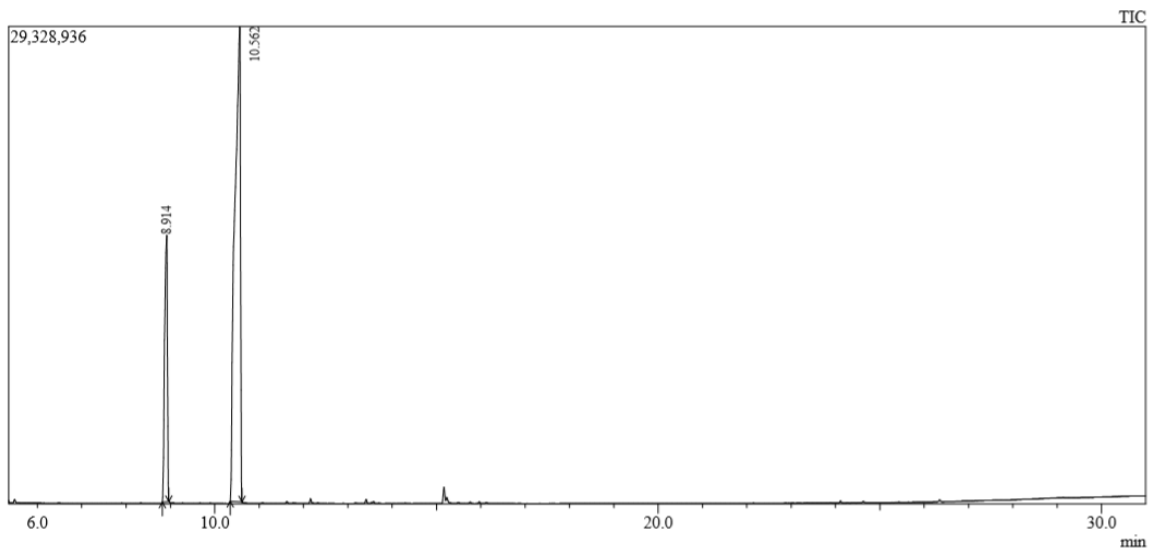
Mezcla 4 a temperatura ambiente(18°C): nonano y DL-limoneno(50:50)



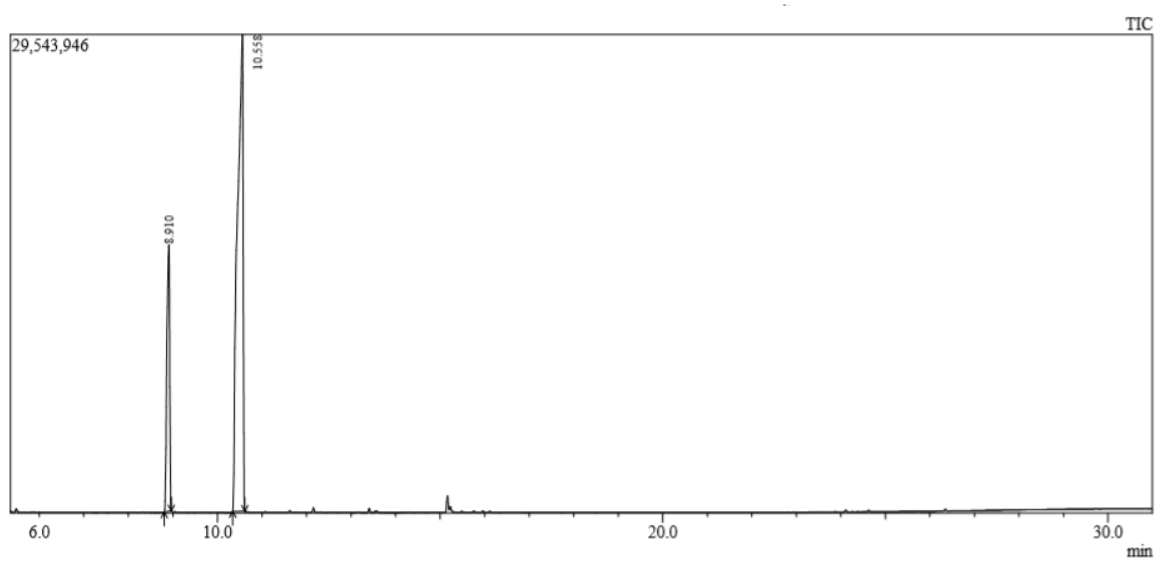
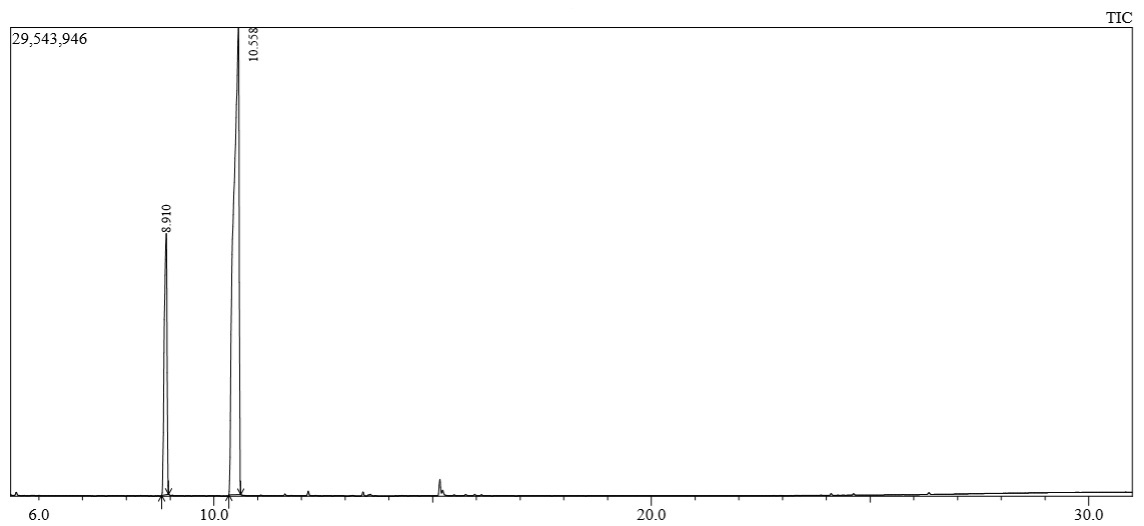
## Mezcla 4 Refrigerada (4°C): nonano y DL-limoneno(50:50)



## Mezcla 5 a temperatura ambiente(18°C): 2-decanona y safrol (20:80)

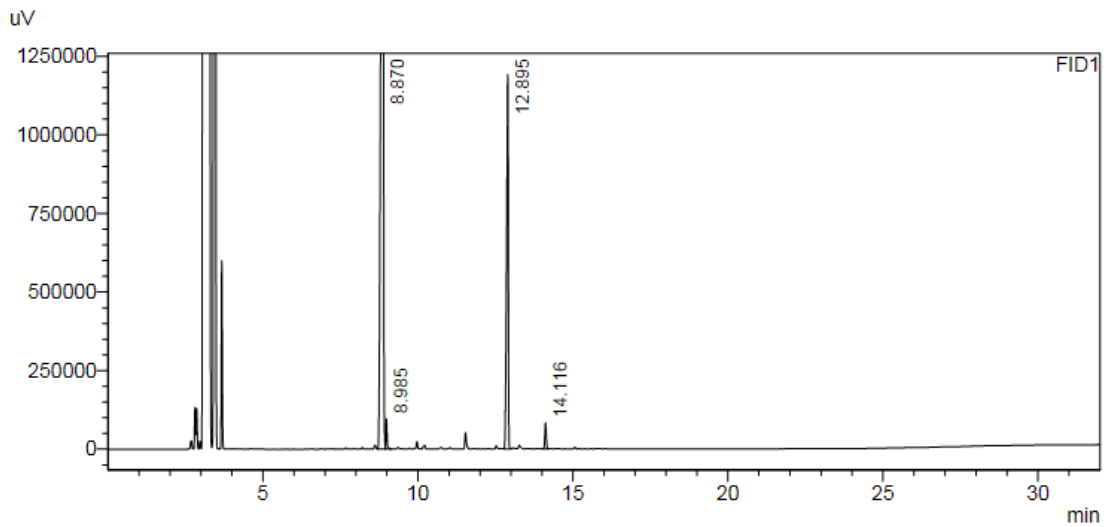


## Mezcla 5 Refrigerada (4°C): 2-decanona y safrol (20:80)

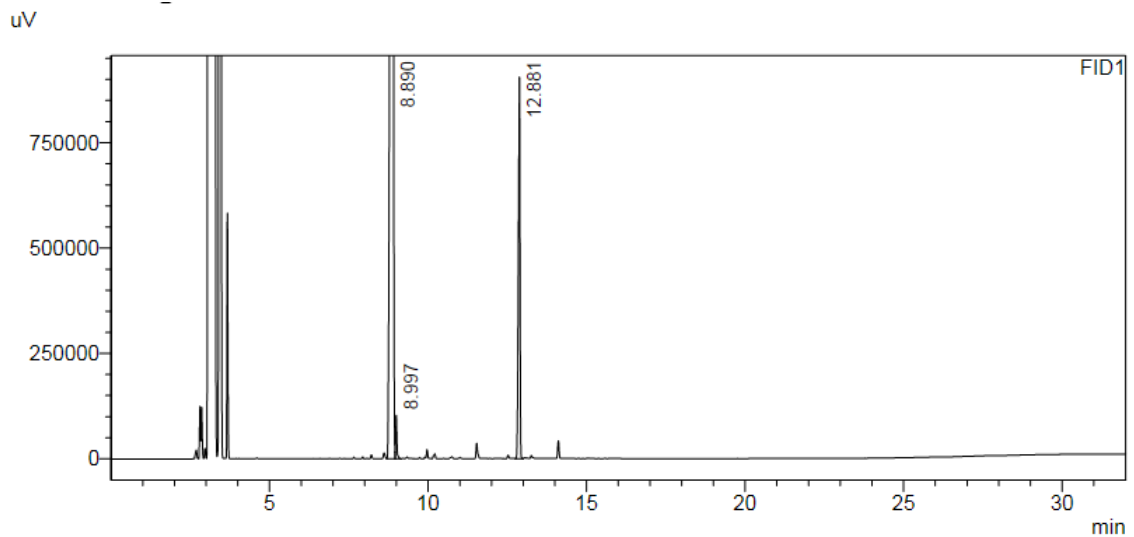


## Anexo D: Perfiles cromatográficos CG-FID a los 40 días de las mejores mezclas en las dos condiciones de almacenamiento

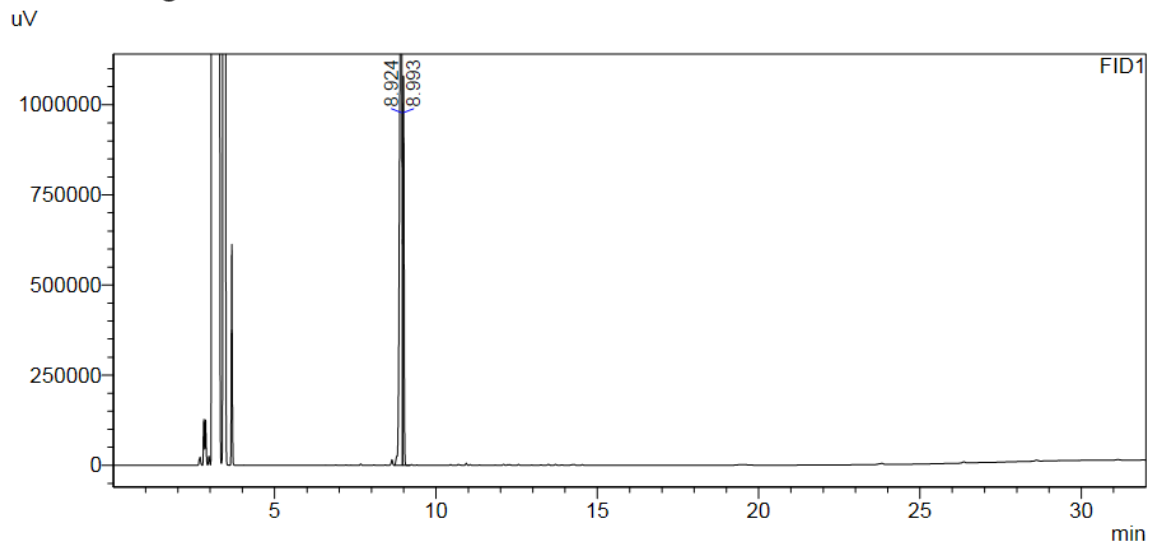
Mezcla 1 a temperatura ambiente(18°C): 4-undecanona y p-cimeno (15:85)



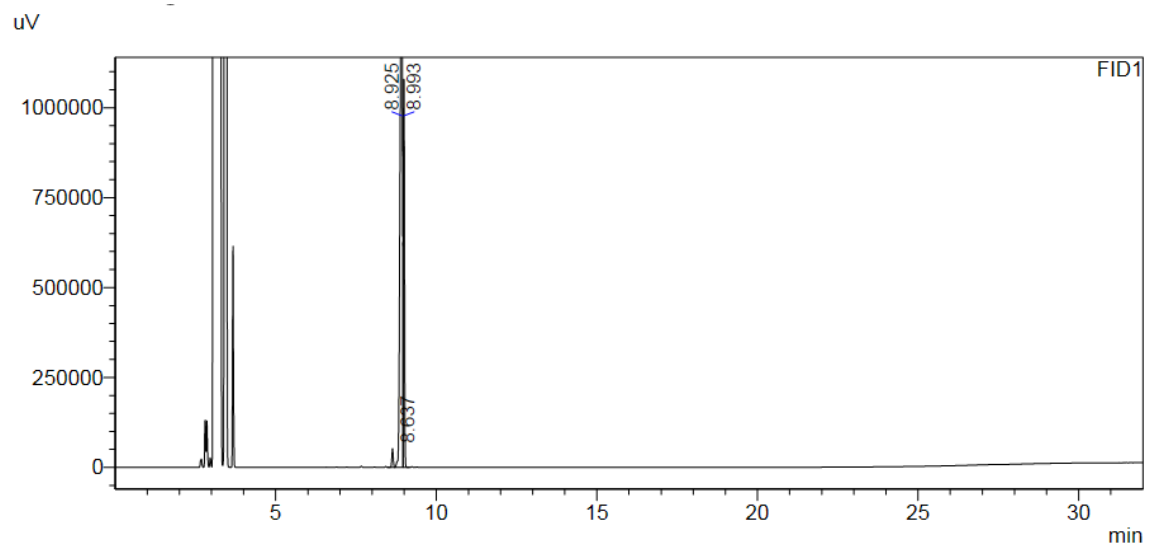
Mezcla 1 Refrigerada (4°C): 4-undecanona y p-cimeno (15:85)



Mezcla 2 a temperatura ambiente(18°C): 1,8-cineol y DL-limoneno(30:70)

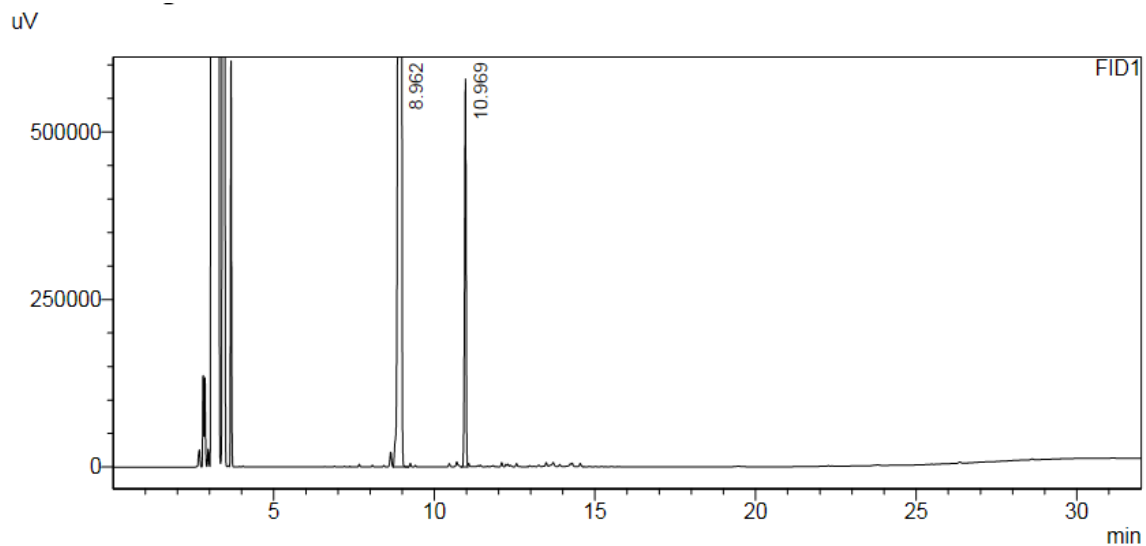


Mezcla 2 Refrigerada (4°C): 1,8-cineol y DL-limoneno(30:70)

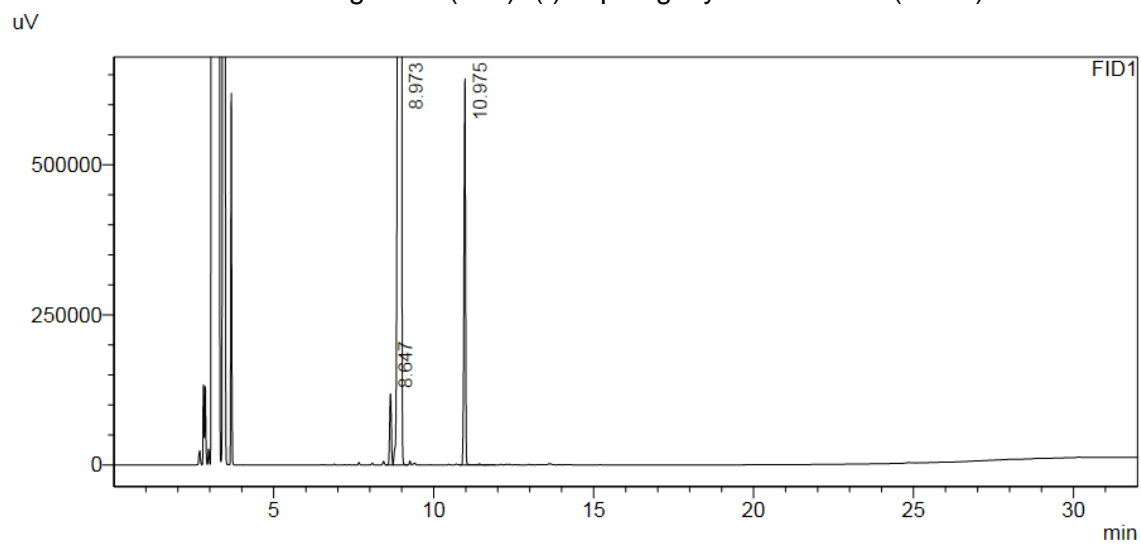




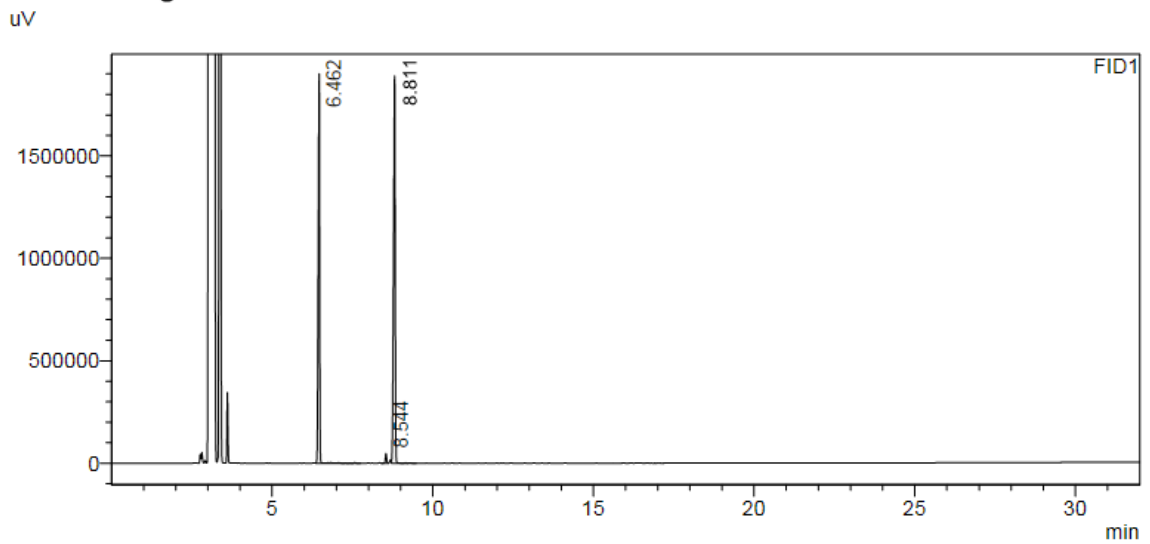
Mezcla 3 a temperatura ambiente(18°C): (-)isopulegol y DL-limoneno(10:90)



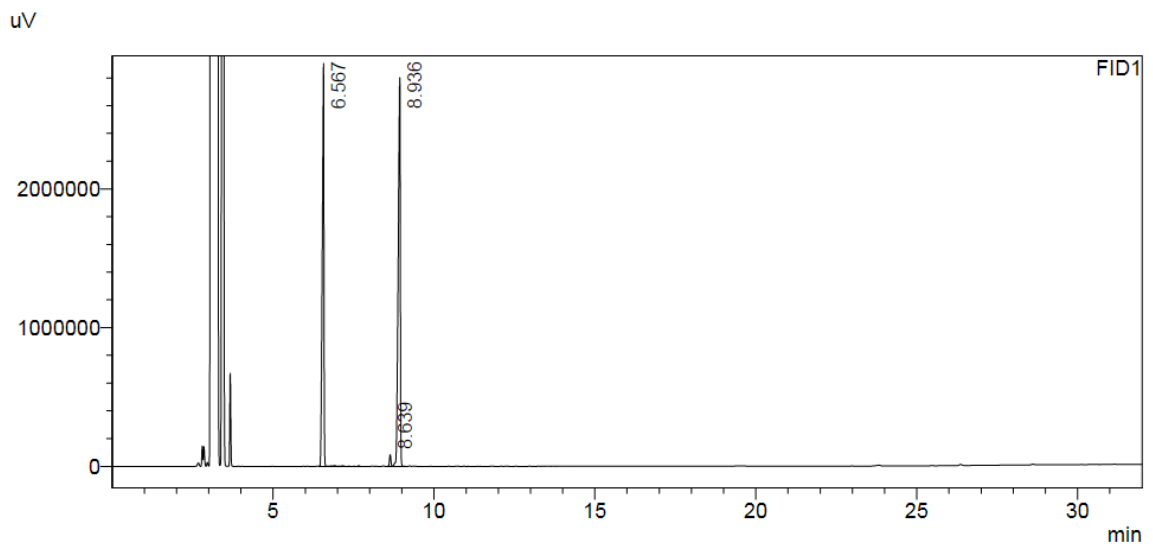
Mezcla 3 Refrigerada (4°C): (-)isopulegol y DL-limoneno(10:90)



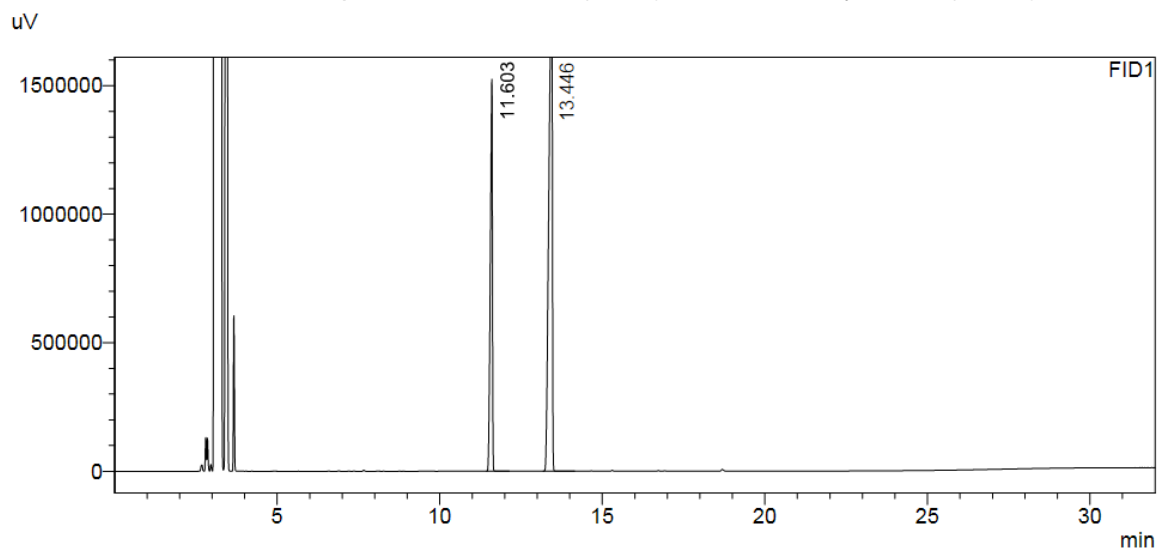
Mezcla 4 a temperatura ambiente(18°C): nonano y DL-limoneno(50:50)



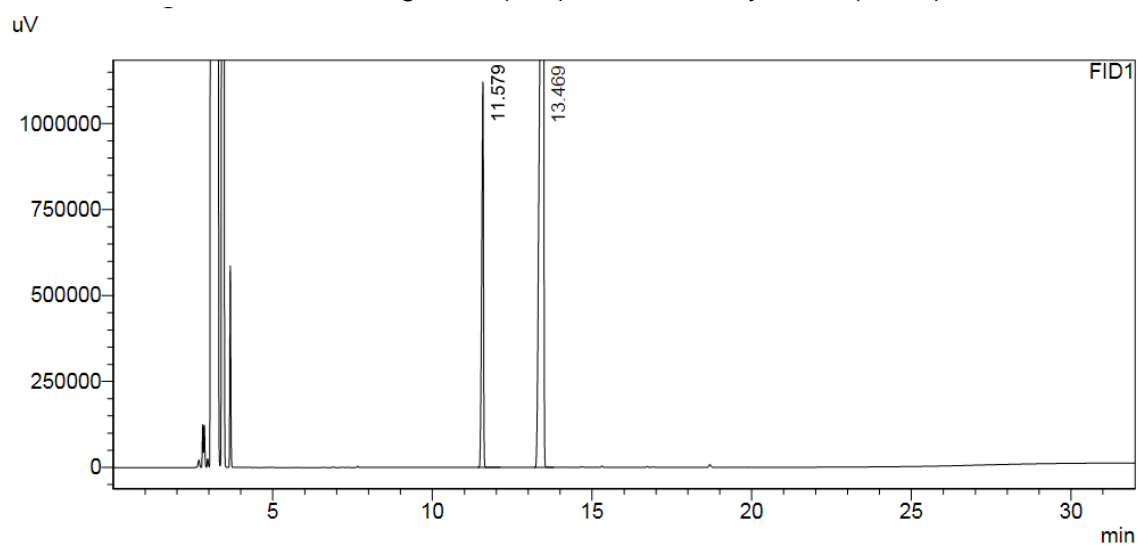
Mezcla 4 Refrigerada (4°C): nonano y DL-limoneno(50:50)



Mezcla 5 a temperatura ambiente(18°C): 2-decanona y safrol (20:80)



Mezcla 5 Refrigerada (4°C): 2-decanona y safrol (20:80)



## Bibliografía

- Abbad, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Zeroual, S., Ba M'hamed, T., Spooner-Hart, R., & Leach, D. (2014). Insecticidal properties and chemical composition of essential oils of some aromatic herbs from Morocco. *Natural Product Research*, 28(24), 2338-2341.
- Abbassy, M. A., Abdelgaleil, S. A., & Rabie, R. Y. (2009). Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131(3), p.225-232.
- Abdelgaleil, S. A., Mohamed, M. I., Badawy, M. E., & El-arami, S. A. (2009). Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *Journal of Chemical Ecology*, 35(5), 518-525.
- Abdel-Rahman, H., Abdel-Moty, H., Nabawy, E., & Eman, I. (2011). Evaluation of Twenty Botanical Extracts and Products as Sources of Repellents, Toxicants and Protectants for Stored Grains against the Almond Moth, *Cadra cautella*. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 5(1) p. 36–44.
- Aguilar, E. (2014). Determinación del estado sanitario de las plantas, suelo e instalaciones y elección de los métodos de control. *Málaga: IC Editorial España*
- Ainane.A, Khammour.F, Charaf.S, Elabboubi.M, Elkouali.M, Talbi.M, Benhima.M, Cherroud.S, Ainane.T, (2019) Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: *Cedrus atlantica*, *Citrus limonum*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globules*, *Materials Today: Proceedings*, Volume 13, Part 3. Pages 474-485
- Alamy (2019).  
<https://www.alamy.es/ladeltametrinamoleculainsecticidapiretroidesinteticoformulaesqueleticaimage155768615.html> Recuperado 5 febrero 2019.

- Altenburger.R, Backhaus.T, Boedeker.W, Faust.M, Scholze.M, Grimme.L.H, "Predicticability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting substances". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2341-2347. Noviembre 2009
- Altieri, M., & Nicholls, C. (2010). Agroecología: potenciando la agricultura campesina para revertir el hambre y la inseguridad alimentaria en el mundo. *Revista de Economía Crítica*, 10(2), 62-74.
- Antunes.L.E.G, Ferrari.E, Gottardi.R, Sant'Ana.J, Dionello.R.J, "Effect of dose and exposure to diatomaceous earth on different insects in stored corn". Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Fitossanidade. p. 2-8. Mayo 2013
- Augsburger. H. K. M, (1992) determinación de perdidas en la cosecha de granos. INIA. Uruguay. P 12-14
- Ayu, Prosekov; Ivanova, S. A. Food Security: The Challenge Of The Present. *Geoforum*, 2018, Vol. 91, P. 73-77.
- Azuero,J.D (2019) Caracterización química de aceites esenciales comerciales y evaluación de su capacidad antialimentaria y fumigante contra *Tribolium castaneum*. Tesis pregrado. Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C
- Badawy M.E.I., El-Arami S.A.A., Abdelgaleil S.A.M. Acaricidal and quantitative structure activity relationship of monoterpenes against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 2010;52:261–274.
- Baldwin.R & Fasulo.T.R, Universidad de Florida, USDA, Universidad de Nebraska-Lincoln, 2003. [http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red\\_flour\\_beetle.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red_flour_beetle.htm).
- BAYER. (2018). Productos - Granos almacenados. Recuperado Diciembre 12, 2018, <https://www.environmentalscience.bayer.es/granos-almacenados/productos>
- Belles.J. (1998) Insecticidas biorracionales. Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid. p. 144-146
- Berenbaum, MC (1977). Sinergia, aditvismo y antagonismo en inmunosupresión. Una crítica crítica. *Clin. Exp. Immunol* 28, 1–18.

- Bisset, Juan A. (2002). Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(3), p.202-219
- Bolton, JL, Trush, MA, Penning, TM, Dryhurst, G. y Monks, TJ (2000). Papel de las quinonas en la toxicología. *Investigación Química en Toxicología*, 13 (3). p. 135-160.
- Borrero-Landazabal, M. A., Duque, J. E., & Mendez-Sanchez, S. C. (2020). Model to design insecticides against *Aedes aegypti* using in silico and in vivo analysis of different pharmacological targets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 229, 108664.
- Bossou, A. D., Ahoussi, E., Ruysbergh, E., Adams, A., Smaghe, G., De Kimpe, N., ... & Mangelinckx, S. (2015). Characterization of volatile compounds from three *Cymbopogon* species and *Eucalyptus citriodora* from Benin and their insecticidal activities against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products*, 76, 306-317.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A. T., & Vale, J. A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological reviews*, 24(2), 93-106
- Brown, M., & Hebert, A. A. (1997). Insect repellents: an overview. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 36(2), 243-249.
- Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. E. (2011). Repellent activity of essential oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 59(5), 1690-1696.
- Cedergreen, N. & Streibig, J. C. (2005). Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1676-1683.
- Cedergreen.N, Streibig.J.C, "Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments?" *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1676-1683. Diciembre 2009
- Cermeri.M; Diaz.G. (2019) Control químico de insectos plaga. [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_agronomia/Zoologia\\_Agricola/Manejo\\_Integrado/Competencia2/GUIA\\_CONTROL\\_QUIMICO\\_FMIIP\\_2016.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Zoologia_Agricola/Manejo_Integrado/Competencia2/GUIA_CONTROL_QUIMICO_FMIIP_2016.pdf) \_Recuperado: 29 enero 2019. p.3-4

- Cervantes. M. (1999). Manejo integrado de plagas en productos almacenados y capacidad reproductiva del *Tribolium castaneum*. instituto tecnológico y de estudios superiores de monterrey campus Monterrey. Monterrey (M) Pag-8-9
- Chaubey, MK (2015). Actividades biológicas de los terpenos contra el escarabajo del pulso, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Cartas de entomología y ciencias aplicadas*, 2 (1), 50-61.
- Chaubey.M. K, "Acute, Lethal and Synergistic Effects of Some Terpenes Against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ecologia Balkanica*, vol. 4, no 1. P.53-62. junio 2012
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., & Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 118. P. 248-263
- Chou. T.C, "Preclinical versus clinical drug combination studies," *Leukemia & Lymphoma*, vol. 49, no. 11, pp. 2059–2080, julio 2008
- Chun-xue.Y, Wen-juanZhang,Shan-shanGuo,Cheng-fangWang,KaiYang,JunyuLiang,YingWang,Zhu-fengGeng,Shu-shanDu,Zhi-weiDeng.(2015) Chemical composition of essential oils extracted from six *Murraya* species and their repellent activity against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products*. Volumen 76. China. p. 681-687.
- Cisneros, F. (2012). Control químico de las plagas agrícolas. Sociedad Entomológica del Perú. Lima, Perú. p 28-36
- Cohen, E. (1982). Studies on several microsomal enzymes in two strains of *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 71(1), 123-126.
- Corcuera, G. D. (2007). Características y mecanismos de acción de algunos compuestos usados en el combate de plagas de almacén. *Fitosanidad*, 11(2), 81-84.
- Coroflot (2019) Malatión. <https://www.coroflot.com/rita-s/Malation> \_Recuperado enero 2019.

- Davis, E. E. Insect repellents concepts of their mode of action relative to potencial sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 1985, 22, 237–243.
- Del Puerto Rodríguez, Asela M, Suárez Tamayo, Susana, & Palacio Estrada, Daniel E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.
- Descamps, L. R.; Reviriego M. E.; Ferrero, A. (2004) Actividad repelente de extractos de *Melia azedarach* (Meliaceae) en *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Actas del VI Congreso nacional de trigo y IV Simposio nacional de cultivos de siembra otoño invernal., Ediciones INTA, Argentina. p. 213-214.
- Dierksmeier.G. (2007) Características y mecanismos de acción de algunos compuestos usados en el combate de plagas de almacén. Instituto de investigaciones de sanidad vegetal. Fitosanidad. Vol 11. Habana. p. 82-83
- Ebadollahi, A., & Jalali, J. (2015). A review on recent research results on bio-effects of plant essential oils against major Coleopteran insect pests. *Toxin Reviews*. Iran. p. 77-82
- El Tiempo. El 65,8 % de la tierra apta para sembrar en Colombia no se aprovecha (2018). <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-16601436> Recuperado: diciembre 2018
- EPPO (2012), Insecticide co-formulated mixtures. *EPPO Bull*, 42 p.353-357.
- Espitia. C. (2011) Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra *Tribolium castaneum* (herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Toxicología. Colombia. p. 15-32
- Fang, R., Jiang, C. H., Wang, X. Y., Zhang, H. M., Liu, Z. L., Zhou, L., ... & Deng, Z. W. (2010). Insecticidal activity of essential oil of *Carum carvi* fruits from China and its main components against two grain storage insects. *Molecules*, 15(12), 9391-9402.
- FAO (2020). Datos producción mundial de cereales. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> . recuperado febrero 2020.
- FAO, (2019). WORLD AGRICULTURE: TOWARDS 2015/2030 - AN FAO PERSPECTIVE; J. Bruinsma (ed), Earthscan Publications, London



- FAO. (2020) Demanda mundial de cereales <http://www.fao.org/docrep/004/y3557s/y3557s08.htm>. Recuperado mayo 2020
- FAO. Producción mundial de cereales. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Recuperado 20 mayo 2020 16:40.
- Faust.M, Altenburger.R, Backhaus.T, Blanck.H, Boedeker.W, Gramatica,P, Hamer.V, Scholze.M, Vighi.M, , Grimme.L.H, "Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants". *Aquatic Toxicology*, 56(1):13–32, diciembre 2001.
- FENALCE (2019). Índice cerealista 2018<sup>a</sup>. <http://www.fenalce.org/archivos/indicerealista2018A.pdf> . Recuperado febrero 2019 p. 10,42,43,63
- Ferro, E. M., Valdés, R. J., Chirino, E., Márquez, M., Ríos, H., Rodríguez, O., & Sarmiento, A. A. (2009). Aporte del sistema formal en semillas mejoradas de granos básicos y cereales a la seguridad alimentaria del municipio La Palma, provincia Pinar del Río. *Cultivos Tropicales*, 30(2), 00-00.
- Fierascu, R. C., Fierascu, I. C., Dinu-Pirvu, C. E., Fierascu, I., & Paunescu, A. (2019). The application of essential oils as a next-generation of pesticides: recent developments and future perspectives. *Zeitschrift für Naturforschung C*.
- Friedrich, T. (2014). La seguridad alimentaria: retos actuales. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(4), 319-322.
- Furtado, F. B. (2018). Caracterização química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*, *Hedyosmum brasiliense*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Baccharis dracunculifolia* e *Nectandra megapotamica*.
- Gabastou, J. M. (2005). Manual de Mantenimiento para equipo de Laboratorio (16) p 183-186
- García González, F., Ramírez Delgado, M., Torres Zapata, R., Manuel Pinto, V., & Ramírez Alarcón, S. (2009). Agentes de control biológico de plagas de granos almacenados stored grains pests biological control agents. Mexico DF. p 50-55
- García, J. L. M., Báez, J. R. C., & Mondaca, E. C. (1994). Manejo integrado de plagas en granos almacenados. *Tecnologías de Granos y Semillas*, 109. México D.F. p 141-142

- García, M., Donadel, O. J., Ardanaz, C. E., Tonn, C. E., & Sosa, M. E. (2005). Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(6), 612-618.
- García-Lara, S., Espinosa Carrillo, C., & Bergvinson, D. J. (2007). *Manual de plagas en granos almacenado y tecnologías alternas para su manejo y control*. CIMMYT.
- Garza, G. A. (2009) EL TRIGO. Universidad Autónoma de León. Facultad de Salud pública y nutrición. El cid editor. España. 2009. p. 2-12
- Geary, N. (2013). Comprender la sinergia. *A.m. J. Physiol. Endocrinol Metab.* 304, E237E253. doi: 10.1152 / ajpendo.00308.2012
- Ghrahiml.F; Bahramna N; Nouri-ganbalan. G; Razmjou.J. Demographic. (2018). Studies of *Tribolium castaneum* (coleoptera: *Tenebrionidae*) on various barley cultivars. *Journal of Stored Products Research* . volumen 79, p. 60-65
- Giraldo, R. D. O. (2009). Manual de técnicas de laboratorio químico. Universidad de Antioquia. Colombia. p. 49
- Godfray, HCJ, Beddington, JR, Crute, IR, Haddad, L., Lawrence, D., Muir, JF, ... & Toulmin, C. (2010). Seguridad alimentaria: el desafío de alimentar a 9 mil millones de personas. *ciencia* , 327 (5967), 812-818.
- Golden, G., Quinn, E., Shaaya, E., Kostyukovsky, M., & Poverenov, E. (2018). Coarse and nano emulsions for effective delivery of the natural pest control agent pulegone for stored grain protection. *Pest Management Science*, 74(4), 820-827.
- Guo, S. S., Wang, Y., Pang, X., Geng, Z. F., Cao, J. Q., & Du, S. S. (2019). Seven herbs against the stored product insect: Toxicity evidence and the active sesquiterpenes from *Atractylodes lancea*. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 169, 807-813.
- Hassold.E, Backhaus.T, "The predictability of mixture toxicity of demethylase inhibiting fungicides to *Daphnia magna* depends on life-cycle parameters". *Aquatic toxicology*, 152, 205-214. Julio 2014

- Henry, Robert J.; Rangan, Parimalan; Furtado, Agnelo. Functional Cereals For Production In New And Variable Climates. *Current Opinion In Plant Biology*, 2016, Vol. 30, P. 11-18.
- Hermens, J., Canton, H., Janssen, P. & De Jong, R. (1984). Quantitative structure-activity relationships and toxicity studies of mixtures of chemicals with anaesthetic potency: acute lethal and sublethal toxicity to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 5, 143-154
- Hollomon, D. W. & Kendall, S. J. (1997). Mixtures of DMI fungicides in cereal disease control. *Agro-Food-industry Hi-Tech*, 8, 44-46.
- Hossain, M. A., Shah, M. D., Sang, S. V., & Sakari, M. (2012). Chemical composition and antibacterial properties of the essential oils and crude extracts of *Merremia borneensis*. *Journal of King Saud University-Science*, 24(3), 243-249.
- Hu, J., Wang, W., Dai, J., & Zhu, L. (2019). Chemical composition and biological activity against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Artemisia brachyloba* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 128, 29-37.
- Huang, Y., Ho, S. H., & Kini, R. M. (1999). Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(3), 676-683.
- Huang, Y., Ho, S. H., & Kini, R. M. (1999). *Bioactivities of Safrole and Isosafrole on Sitophilus zeamais*(Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum*(Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(3), 676–683. doi:10.1093/jee/92.3.676
- Hurtado, M S (2012). Operaciones básicas del proceso, mezclas y disoluciones (UF0227). IC Editorial; Málaga (España). P 173
- INTAGRI. Manual de plagas de granos almacenados. <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/manual-plagas-granos-almacenados> recuperado: octubre 2018
- Isman, M. B. (2016). Pesticides based on plant essential oils: Phytochemical and practical considerations. In *Medicinal and aromatic crops: production, phytochemistry, and utilization* (pp. 13-26). American Chemical Society.

- Isman.M, "Plant essential oils for pest and disease management". Crop protection. Col 19 no 8-10. septiembre 2000
- Kanda, D., Kaur, S., & Koul, O. (2017). A comparative study of monoterpenoids and phenylpropanoids from essential oils against stored grain insects: acute toxins or feeding deterrents. *Journal of pest science*, 90(2), 531-545.
- Kargapoltsev, S. K., Krakovsky, Y. M., & Luzgin, A. N. (2017, May). Non-Parametric classification of technical condition parameters based on shift and scale tests. In *2017 International Conference on Industrial Engineering, Applications and Manufacturing (ICIEAM)* (pp. 1-5). IEEE.
- Katritzky, AR, Dobchev, D.A, Tulp, I., Karelson, M. y Carlson, DA (2006). Estudio QSAR de repelentes de mosquitos utilizando Codessa Pro. *Cartas de química bioorgánica y medicinal* , 16 (8), 2306-2311.
- Kepple, A. W., & Segall-Corrêa, A. M. (2017). Food security monitoring in Brazil and other Latin American countries: support for governance with the participation of civil society. *Global Food Security*, (14), 79-86.
- Kim, S.-I., & Lee, D.-W. (2014). Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(1), 13–17. doi:10.1016/j.aspen.2013.09.002
- Kumar, D., Rahal, A., & Malik, J. K. (2016). Neem Extract. *Nutraceuticals*, 585-597. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802147-7.00043-7>
- Kumar, R., Srivastava, M., & Dubey, N. K. (2007). Evaluation of Cymbopogon martinii oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. *Journal of food protection*, 70(1), 172-178.
- Lee, S. I. (2010). Drug interaction: focusing on response surface models. *Korean journal of anesthesiology*, 58(5), 421.
- Lee, S., Peterson, C. J., & Coats, J. R. (2003). Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, 39(1), 77-85.
- Liang, J. Y., Guo, S. S., Zhang, W. J., Geng, Z. F., Deng, Z. W., Du, S. S., & Zhang, J. (2018). Fumigant and repellent activities of essential oil extracted from

- Artemisia dubia and its main compounds against two stored product pests. *Natural product research*, 32(10), 1234-1238.
- Licciardello, F., Muratore, G., Suma, P., Russo, A., & Nerín, C. (2013). Effectiveness of a novel insect-repellent food packaging incorporating essential oils against the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 173-180.
  - Lichfield.J.T, Wilcoxon.F.J, "A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Exp. Ther". *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 96(2), 99-113. Junio 1949
  - Liu, Z. L., Chu, S. S., & Jiang, G. H. (2011). Toxicity of Schizonpeta multifida essential oil and its constituent compounds towards two grain storage insects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 905-909.
  - Liu, Z.L.; Goh, S. H.; Ho, S. H. (2007) Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal Stored Products*. p. 290–296
  - Lopez M.D., Contreras J., Pascual-Villalobos M.J. Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Cryptolestes pusillus* (Schoenherr) J. *Stored Prod. Res.* 2010;46:52–58.
  - Lopez M.D., Pascual-Villalobos M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Ind. Crop Prod.* 2010;31:284–288.
  - Luo, C., Li, D., Wang, Y., Guo, S., Zhang, D., & Du, S. (2019). Chemical Composition and Insecticide Efficacy of Essential Oils from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle Against *Tribolium castaneum* Herbst in Stored Medicinal Materials. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(5), 1182-1194
  - Mackness, M. I., Walker, C. H., Rowlands, D. G., & Price, N. R. (1983). Esterase activity in homogenates of three strains of the rust red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 74(1), 65-68.
  - Mancheno, M., Kroeger, A., & González, J. O. (2001). *No más problemas de salud causados por insectos: manual técnico para el control de malaria, dengue, chagas, leishmaniosis y oncocercosis*. P. 85-86

- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. 2da. Edición. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, p-254-256.
- Martínez Reina, M., & González, E. A. (2011). Índices de refracción, densidades y propiedades derivadas de mezclas binarias de solventes hidroxílicos con líquidos iónicos (1-etil-3-metilimidazolio etilsulfato y 1-metil-3-metilimidazolio metilsulfato) de 298, 15 a 318, 15 K. Revista Colombiana de Química, 40(2).
- Martínez, E. L. A. (2009). *evaluación de insecticidas de dos grupos toxicológicos para el control de tribolium castaneum (herbst) (coleoptera: tenebrionidae)*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro, División de Agronomía. Departamento de Parasitología. Tesis pregrado. Mexico. p. 9-21
- Mena, D. M. C. (2008). Neurotoxicidad de los organofosforados: efectos a corto ya largo plazo del clorpirifos. Tesis doctoral. Universidad Almería. Vol. 230. España. p 7-8
- Miao, JK, Shi, RH, Li, C., Li, XW y Chen, QX (2016). Aceites de Bandera Dulce (*Acorus calamus*). En *aceites esenciales en la conservación, sabor y seguridad de los alimentos* (pp. 775-782). Prensa Académica.
- Minagricultura. 2020. [https://www.minagricultura.gov.co/convocatorias/Documents/Apertura\\_Registro\\_2016\\_2018/Anexo\\_4\\_listado\\_de\\_plaguicidas\\_prohibidos\\_en\\_Colombia.pdf](https://www.minagricultura.gov.co/convocatorias/Documents/Apertura_Registro_2016_2018/Anexo_4_listado_de_plaguicidas_prohibidos_en_Colombia.pdf)  
Recuperado 24 abril 2020
- Mohan.M ; Kohli, Martino.D. (1997) Explorando altos rendimiento del trigo.INIA la Estenzuela. Colonia. Uruguay. p. 2-22
- Montero, D. A. V., Naranjo, N., & Van Strahlen, M. A. (2012). Efecto insecticida del extracto de semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Collaria scenica* Stal (Hemiptera: Miridae). *EntomoBrasilis*, 5(2), 125-129.
- Montoya Cadavid, G. D. J. (2010). Aceites esenciales: una alternativa de diversificación para el eje cafetero. *Departamento de Física y Química*.
- Moragues-Faus, A., Sonnino, R., & Marsden, T. (2017). Exploring European food system vulnerabilities: Towards integrated food security governance. *Environmental Science & Policy*, 75, 184-215

- Moser, Virginia & Casey, Michelle & Hamm, A & H Carter, W & E Simmons, J & Gennings, Chris. (2005). Neurotoxicological and Statistical Analyses of a Mixture of Five Organophosphorus Pesticides Using a Ray Design. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 86. P-101-115.
- Moshi.P.A; Matoju.I. (2017). The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. *Review. Crop Protection*. El sevier. Tanzania. p. 2-10
- Mossa. A. (2016) review article, Green pesticides:essential oils as biopesticides in insect-pest management. Environmental toxicology reserch unit (ETRU) departamento of pesticide chemistry, national research center (NRC) iza, Egypt. p. 1-9
- Muñoz. J, Staschenko. E; Ocampo C. (2014) Insecticidal activity of essential oils from native plants against *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) *Revista Colombiana de Entomología* 40 (2): 198-202 Julio – Diciembre. p. 2-4
- Nava. E; García. C; Camacho. J; Vázquez. Elva (2012) Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*. Universidad Autónoma Indígena de México El Fuerte, México. p. 17-25
- Navarro.Y.K., Sánchez.S, Solangge.B, "Extracción y fraccionamiento simultáneo del aceite esencial de toronjil (*Melissa off Leinalis*) para la obtención de los destilados de composición diferenciada" tesis de pregrado, Universidad Nacional de Callao. Perú. 2017
- Navas.E, Aplicación de productos fitosanitarios, Editorial ICB, 2012. ProQuest Ebook Central, <https://ebookcentral.proquest.com/lib/unalbogsp/detail.action?docID=5349769>
- Nawrot J, Harmatha J (1994) Natural products as antifeedants against stored products pests. *Postharvest News Inf* 5:17N– 21N
- Nawrot, J. y Harmatha, J. (2012). Detergentes fitoquímicos para la alimentación de productos almacenados de plagas de insectos. *Revisiones de fitoquímica* , 11 (4), 543-566.
- Nerio, LS, Olivero-Verbel, J. y Stashenko, E. (2010). Actividad repelente de los aceites esenciales: una revisión. *Tecnología Bioresource* , 101 (1), 372-378.

- Nørgaard, K. B., & Cedergreen, N. (2010). Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(4), 957-967
- Olivero-Verbel, J., Caballero-Gallardo, K., Jaramillo-Colorado, B., & Stashenko, E. (2009). Repellent activity of the essential oils from *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* and *Cymbopogon nardus* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*, Herbst. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 244-250.
- Olmedo, R., Herrera, J. M., Lucini, E. I., Zunino, M. P., Pizzolitto, R. P., Dambolena, J. S., & Zygodlo, J. A. (2015). Essential oil of *Tagetes filifolia* against the flour beetle *Tribolium castaneum* and its relation to acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. *Agriscientia*, 32(2), 113-121.
- Oviedo, S. (2019) Efectos insecticidas y bioquímicos de aceites esenciales obtenidos de plantas colombianas sobre el gorgojo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Tesis de maestría. Departamento de química. Facultad de ciencias . Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. p. 31-46
- Pascual, M. J., Ballesta, M. C., & Soler, A. (2004). Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 30, p.279–286
- Patiño, B. W. (2015) Evaluación de la actividad antifúngica, insecticida y de inhibición enzimática de los extractos y aceites esenciales obtenidos de las especies *Piper cf. asperiusculum var. glabricaule* y *Piper pertomentellum*. Tesis de pregrado Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. p. 10.-30 / 35-50
- Pavela, R. (2015). Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Parasitology research*, 114(10), 3835-3853.
- Peña Bautista, R. J., Perez Herrera, P., Villaseñor Mir, E., Gomez Valdez, M. M., Lozano, M., & Monterde Gabilondo, R. (2007). Calidad de la cosecha de trigo en Mexico: Ciclo otoño-invierno 2005-2006. CIMMYT. p. 2-4



- Phillips TW, Throne JE (2010) Biorational approaches to managing stored product insects. *Annu Rev Entomol* 55:375–397
- Pino. J.A. Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos. Editorial universitaria. La Habana. 2015 p 28-38
- Ponce, G., Flores, A., Badii, M., Zapata, R., López, B., & Fernández, I. (2006). Modo de acción de los insecticidas. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(4), p. 1–8.
- Preedy. V. (2016) Essential oils. In food preservation, flavor and safety. Editorial el Sevier. Londres. p. 33-37
- Prieto.R.J. (2012) Estudio fitoquímico de *Compsonera capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus sp.* Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. p. 1-38 / 55/ 135-137/ 145-166
- Puerto. A; Suárez.S; Palacio.E. (2014) Effects of pesticides on health and the environment. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). La Habana, Cuba. p. 2-6
- Rajendran, S., & Sriranjini, V. (2008). Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of stored products Research*, 44(2), 126-135.
- Rajendran.S, Sriranjini, V, "Plant products as fumigants for stored-product insect control". *Journal of stored products Research*, 44(2), 126-135. Octubre 2008
- Rasero, F. S. (1998). Características de los Formulados Comerciales de Plaguicidas: influencia sobre los residuos encontrados en los alimentos. IV Seminario Internacional sobre Residuos de Plaguicidas. Instituto de Estudios Almerienses. España p 127-135
- Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomology*, 57, p. 405-424.
- Ringuélet.J ; Ocampo.R, Henning.c; Padín.s; Urrutia.M; Dal Bello.G. (2014) Insecticidal activity of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown on

*Tribolium castaneum* Herbst in stored wheat grains. Revista Brasileira de Agroecologia. Brasil. p. 1-7

- Riveros, L.M (2018) Caracterización química y evaluación de las actividades repelente y fumigante de aceites esenciales frente a *Tribolium castaneum* (Herbst). Tesis de pregrado Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C.
- Rodríguez, R.R.; Herrera, R.F.J. 2003. Insectos y Hongos en los Granos Almacenados en Yucatán. Revista de la UADY, No. 227. p.10
- Rodríguez, V; Simón, E. Bases de la alimentación humana. Netbiblio. España. 2008 p. 9-11
- Roell, K. R., Reif, D. M., & Motsinger-Reif, A. A. (2017). An introduction to terminology and methodology of chemical synergy—Perspectives from across Disciplines. *Frontiers in pharmacology*, 8, 158.
- Rogg, W.H. (2000) Manejo integrado y control biológico de plagas y enfermedades. Proexant. Ecuador. p. 2-9
- Rozman, V, Kalinovic, I, Korunic, Z, (2007) Journal of Stored Products Research. Canadá. 43(4): p 1-4
- Sacaluga, C. F. N. (2013). Publicidad: simbología de masas. Editorial Planeta Alvi. España. p 163-164
- Saddique, Q., Li Liu, D., Wang, B., Feng, P., He, J., Ajaz, A., ... & Cai, H. (2020). Modelling future climate change impacts on winter wheat yield and water use: A case study in Guanzhong Plain, northwestern China. *European Journal of Agronomy*, 119, 126113.
- Saika Tariq, Saira Wani, Waseem Rasool, Khushboo Shafi, Muzzaffar Ahmad Bhat, Anil Prabhakar, Aabid Hussain Shalla, Manzoor A. Rather. (2019) A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens, *Microbial Pathogenesis*. 134(103580) p. 2-4
- Saini, R., Jaitak, V., Guleria, S., Kaul, V. K., Kiran Babu, G. D., Singh, B., ... & Singh, R. D. (2012). Comparison of headspace analysis of volatile constituents with GCMS analysis of hydrodistilled and supercritical fluid extracted oil of *Capillipedium parviflorum*. *Journal of Essential Oil Research*, 24(3), 315-320.

- Sanchez. J. (2017) Principios de sanidad vegetal. Editorial síntesis. España p. 153-168
- SaunderS.J; Coto.D; King.A. (1998) Plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América latina. Catie. Costa Rica. p. 261-262
- Seomoon, D., Lee, K., Kim, H., & Lee, P. H. (2007). Inter- and intramolecular alladiumcatalyzed allyl cross-coupling reactions using allylindium generated in situ from allyl acetates, indium, and indium ttrichloride. *Chemistry - A European Journal*, 13(18), 5197–5206.
- Skinner, W.A. & H.L. Johnson. 1980. The design of insect repellents. *Drug Design* 10: 277-305.
- Skourti, A., Kavallieratos, N. G., & Papanikolaou, N. E. (2019). Laboratory evaluation of development and survival of *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae) under constant temperatures. *Journal of Stored Products Research*, 83, 305-310.
- Sostenible, B. (2003). Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. *Bogotá: Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt*.
- Stashenko.E; Martinez.J.(2012) Plantas aromáticas y aceites esenciales: estudio y aplicaciones. CENIVAM. Bucaramanga. p. 15-22
- 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.
- Suryanarayana, M. V. S.; Pandey, K. S.; Prakash, S.; Raghuvveeran, C. D.; Dangi, R. S.; Swamy, R. V.; Rao, K. M. Structure-activity relationship studies with mosquito repellent amides. *J. Pharm. Sci.* 1991, 80, 1055–1057
- Suthisut, D., Fields, P. G., & Chandrapatya, A. (2011). Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *Journal of Stored Products Research*, 47(3), 222-230.

- Syed Muhammad Zaka, Naeem Iqbal, Qamar Saeed, Ahmad Akrem, Muazzama Batool, Alamgir A. Khan, Adeel Anwar, Muhammadi Bibi, Shahbaz Azeem, Dur-e-Najaf Rizvi, Rehana Bibi, Khalid Ali Khan, Hamed A. Ghramh, Mohammad Javed Ansari, Sohail Latif, (2018) Toxic effects of some insecticides, herbicides, and plant essential oils against *Tribolium confusum* Jacquelin du val (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae), Saudi Journal of Biological Sciences, p 2-5
- Taban, A., Saharkhiz, M. J., & Hooshmandi, M. (2017). Insecticidal and repellent activity of three *Satureja* species against adult red flour beetles, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Acta ecologica sinica*, 37(3), 201-206.
- Taiz. L; Zeiger. E. FISILOGIA VEGETAL. (2007) Universitat Jaume I. España. p. 536-541
- Tallarida, RJ (2001). Sinergismo de drogas: su detección y aplicaciones. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 865–872.
- Talukder. F (2009). Pesticide Resistance in Stored-Product Insects and Alternative Biorational Management: A Brief Review Agricultural and Marine Sciences, 14:9-15 (2009) Sultan Qaboos University. Omán. Pags. 1-5
- Torres.F.(1998) Biología y manejo integrado de la polilla centroamericana de la papa *Tecia solanicvora* en Venezuela. IICA. p. 32-33
- Tripathi. A.K, Prajapati.V, Khanuja. S.P.S, Kumar. S, " Bioactivities of l-carvone, d-carvone, and dihydrocarvone toward three stored product beetles". *Journal of Economic Entomology* 96, 1594-1601. Junio 2003b
- Tripathi.A.K, Prajapati.V, Khanuja. S.P.AS, Kumar.S, "Effect of  $\alpha$ -limonene on three stored-product beetles". *Journal of Economic Entomology* 96, 990-995. Junio 2003<sup>a</sup>
- Trosset, J. Y., & Carbonell, P. (2013). Synergistic synthetic biology: units in concert. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 1, 11.
- USDA. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service Nutrient data for 20078, Wheat germ, crude. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show?ndbno=20078&fg=20&man=&lfacet=&format=Abridged&count=&max=25&offset=125&sort=f&qlookup=&rptfrm=nl&>

- [nutrient1=505&nutrient2=&nutrient3=&subset=0&totCount=145&measureby=g](#)  
. Recuperado septiembre 2018.
- Unruh.L, Rongda.k, Kramer.k, (1998). Benzoquinone levels as a function of age and gender of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Vol 28. Insect Biochemistry and Molecular Biology. EE. UU. p. 1-3
  - USDA. United States Department of Agriculture Agricultural Research Service Nutrient data for 20078, Wheat germ, crude. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show?ndbno=20078&fg=20&man=&lfacet=&format=Abridged&count=&max=25&offset=125&sort=f&qlookup=&rptfrm=nl&nutrient1=505&nutrient2=&nutrient3=&subset=0&totCount=145&measureby=g>  
. Recuperado septiembre 2018.
  - Villaverde.L.M. (2014) Lípidos y feromonas de insectos plagas de granos almacenados. Universidad Nacional de la Plata. Tesis doctoral. Argentina. p. 20-21
  - Viñuela, E., & Adan, A. (1993). Plagas de los productos almacenados. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid (España). p 6-7
  - Wagan, T. A., Chakira, H., He, Y., Zhao, J., Long, M., & Hua, H. (2016). Repellency of two essential oils to *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist*, 608-615.
  - Wang, Y., Zhang, L. T., Feng, Y. X., Zhang, D., Guo, S. S., Pang, X., ... & Du, S. S. (2019). Comparative evaluation of the chemical composition and bioactivities of essential oils from four spice plants (Lauraceae) against stored-product insects. *Industrial Crops and Products*, 140, 111640.
  - Wang, Z., Song, J., Chen, J., Song, Z., Shang, S., Jiang, Z. y Han, Z. (2008). Estudio QSAR de repelentes de mosquitos de terpenoides con un anillo de seis miembros. *Cartas de química bioorgánica y medicinal*, 18 (9), 2854-2859.
  - Woolson, R.F (2007). Prueba de Wilcoxon con rango firmado. *Wiley enciclopedia de ensayos clínicos*, 1-3.
  - Yaws, C. L. (2015). *The Yaws handbook of vapor pressure: Antoine coefficients*. Gulf Professional Publishing.

- Yu, Q., Xiang, M., Wu, W., & Tang, H. (2019). Changes in global cropland area and cereal production: An inter-country comparison. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 269, 140-147.
- Zapata, N., & Smagghe, G. (2010). Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and products*, 32(3), 405-410.
- Zettler, L.J (1991). Resistencia a pesticidas en *Tribolium castaneum* y *T. confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) de molinos harineros en los Estados Unidos. *Revista de Entomología Económica* , 84 (3), 763-767.
- Zhu, F., Parthasarathy, R., Bai, H., Woithe, K., Kausmann, M., Nauen, R., ... & Palli, S. R. (2010). A brain-specific cytochrome P450 responsible for the majority of *deltamethrin* resistance in the QTC279 strain of *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8557-8562.

