



**Estudio de la acción insecticida de
constituyentes químicos presentes en
aceites esenciales y su efecto sobre
enzimas desintoxicantes y de función
motora para *Sitophilus zeamais*.**

Leidy Johana Nagles Galeano

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2021

Estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora para *Sitophilus zeamais*.

Leidy Johana Nagles Galeano

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Química

Director (a):

Doctor, Oscar Javier Patiño Ladino

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

2021

(Dedicatoria o lema)

Dedicado a mi familia, especialmente a mis padres y a mi pareja que siempre me brindaron su apoyo incondicional en esta búsqueda de aprendizaje y conocimiento, y también a todos los que estudian y enseñan la prodigiosa línea de los productos naturales como una alternativa a problemas comunes de la humanidad.

'La naturaleza nos brinda las semillas del conocimiento, no el conocimiento mismo'

Lucio Anneo Séneca

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Leidy Johana Nagles Galeano

Fecha 23/04/2021

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por brindarme el conocimiento científico y el espíritu crítico para el desarrollo de mi proceso formativo y el apoyo económico brindado por medio de las becas de la facultad de ciencias, en la modalidad de joven investigador y como becaria auxiliar de docencia.

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

A Minciencias por la beca pasantía de la convocatoria 812-2018 del programa nacional de jóvenes investigadores e innovadores con el contrato 287-2019 y 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

A mi director de tesis, el profesor Oscar Javier Patiño por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y proyecto de investigación, por compartir sus conocimientos, por su confianza y dedicación en estos años de mi proceso de formación.

A la profesora Juliet Angélica Prieto Rodríguez por acogerme en su grupo de investigación, por su incondicional apoyo, orientación, paciencia y compromiso desde el comienzo del proyecto, no sólo en los ensayos biológicos sino también en mi proceso de formación y todos los aspectos de este trabajo. Muchas gracias.

A la profesora Eddy Herrera por su gran colaboración con el desarrollo de algunos de los análisis estadísticos que se llevaron a cabo durante el desarrollo de este trabajo.

Al director del grupo de investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) de la Universidad Nacional de Colombia, el profesor Luis Enrique Cuca Suárez, por

acogerme como parte de su familia investigativa, por sus enseñanzas y apoyo invaluable en mi formación académica.

A los profesores Wilman Delgado, Mónica Ávila y Fabián López, a mis amigos y colegas de gorgojos Daniela Torres, Luis Perdomo, Sebastián Oviedo, Paula Ardila, y a todos mis amigos integrantes del grupo de investigación QuiProNaB, por ser parte de mi proceso de formación e incentivar mi interés por la investigación, especialmente aquellos en los que siempre encontré un apoyo en diferentes momentos de mi vida académica o personal, Erika Plazas, Diego Muñoz, Juan Cardozo, Stephanie Mahecha, Andrés Sierra, Luis Chitiva, Felipe Victoria y Fabian Garzón.

A toda mi familia, especialmente a mis padres Adriana Galeano y Henry Nagles por su amor incondicional y apoyo en todos los proyectos que he decidió emprender a lo largo de mi vida, a mi hermano Jhon Henry Nagles y mis abuelos Rosalba Pineda, Evania Rincón, José Galeano y José Arévalo, por hacerme entender lo importante que estar rodeado de las personas que te aman. Gracias a todos por sus grandes enseñanzas, generosidad y por estar conmigo en todos los momentos buenos y malos de mi existir.

A mi pareja Duvan Camilo, por todo su amor, paciencia y apoyo durante estos largos e interminables días de trabajo. Gracias por estar a mi lado, por llenar mi vida de alegría, por resolver mis dilemas matemáticos y comprender lo importante que era este proyecto para mí.

Resumen

Estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora para *Sitophilus zeamais*.

Sitophilus zeamais es una plaga cosmopolita que ocasiona pérdidas del 15 al 50% en granos almacenados, productos indispensables para la seguridad alimentaria. El método más utilizado para su control son los insecticidas sintéticos, que tienen desventajas como elevado costo, alta toxicidad y la generación de resistencia. Por lo tanto, se hace necesario el desarrollo de agentes fitosanitarios que permitan el control eficiente y seguro de esta plaga. En este aspecto, las plantas son una fuente prometedora de metabolitos secundarios bioactivos, con una amplia diversidad estructural, que pueden ser utilizados como bioinsecticidas. Una manera de obtener este tipo de sustancias es mediante la extracción de aceites esenciales (AEs), que se caracterizan por ser mezclas lipofílicas de compuestos volátiles, lo cual les permiten afectar de diferentes modos las funciones metabólicas, fisiológicas y el comportamiento de los insectos. En esta heurística de agentes fitosanitarios, nuestro equipo de investigación durante los últimos 14 años ha evaluado más de 100 AEs contra *S. zeamais*, provenientes de plantas nativas e introducidas en Colombia, contribuyendo a la caracterización química de especies vegetales. Estudios que permitieron determinar 26 aceites con acción repelente e insecticida por contacto y/o fumigante frente a *S. zeamais*. Si bien se avanzado mucho en la investigación de la actividad insecticida de AEs con resultados prometedores frente a *S. zeamais*, no se ha hecho gran énfasis en establecer cuáles de sus constituyentes son los responsables de la bioactividad frente al insecto, las posibles interacciones sinérgicas, aditivas y/o antagónicas entre sus componentes, ni tampoco los posibles mecanismos de acción frente a enzimas involucradas en procesos de neurotransmisión y desintoxicación celular.

En este sentido, la presente investigación determinó la acción insecticida de constituyentes químicos (CQs) de AEs bioactivos, seleccionando los compuestos con mayor efecto tóxico fumigante y/o por contacto sobre *S. zeamais*. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio de potencialización de la actividad insecticida, mediante el diseño de mezclas con los compuestos volátiles seleccionados.

XII Estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora para *Sitophilus zeamais*.

Finalmente, se estableció el efecto de las mezclas potencialmente tóxicas por inhalación y/o contacto y el de sus componentes, sobre enzimas desintoxicantes y de función motora extraídas del insecto. El objetivo 1 inicio con la determinación de la acción insecticida por contacto y fumigante de 51 CQs sobre *S. zeamais*. En el cual se establecieron 11 compuestos volátiles con actividad fumigante (compuestos de tipo hidrocarburo), 13 con toxicidad por contacto (fenilpropanoides, monoterpenoides oxigenados y cetonas alifáticas) y 13 con las dos vías de acceso insecticida (monoterpenoides con función orgánica cetona, éter y alcohol). Dentro de los cuales se resaltan a los enantiómeros de pulegona ($CL_{50} < 0.1$ mg/L y $DL_{50} < 7.5$ μ g/adulto), como los compuestos con mayor efecto tóxico. Posteriormente, con los compuestos bioactivos se realizó un análisis cluster a partir de la efectividad insecticida, armando un perfil de características fisicoquímicas y estructurales para cada grupo. En el cual se logró establecer que los compuestos monoterpenoides monocíclicos con función orgánica cetona o alcohol e insaturación exocíclica son potenciales insecticidas de doble vía de acceso frente a *S. zeamais*.

En el mismo sentido se describen las actividades realizadas en el objetivo 2, en el cual se hizo un prediseño de 29 mezclas ternarias con los compuestos volátiles tóxicos fumigantes y por contacto. Las combinaciones se sometieron a un análisis de superficie de respuesta, para establecer la influencia de la proporcionalidad, elaborando un total de 15 mezclas. Posteriormente, a estas mezclas se les estableció el potencial insecticida fumigante y/o por contacto y la interacción aditiva, sinérgica o antagónica de sus componentes, mediante el índice de combinación. De las cuales se determinaron 10 mezclas con acción insecticida promisorias, 8 que presentaron toxicidad por las dos rutas de acceso evaluadas y 5 que evidenciaron interacción sinérgica fumigante. De los resultados se resaltan la combinación M2 - CL_{50} 0.48 mg/L (*R*-pulegona + *S*-pulegona + *S*-carvona), como la mezcla con mayor acción fumigante y a M20 - CL_{50} 2.06 mg/L (isopulegona + δ -3-careno), como la combinación con mayor interacción sinérgica ($IC = 0.26$).

Finalmente, en el objetivo 3 se estableció el efecto de las mezclas y sus componentes sobre la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE), catalasa (CAT) y glutatión-S-transferasa (GST). Los resultados indicaron que algunas mezclas bioactivas y sus componentes inhiben en un nivel moderado a bajo la desintoxicación metabólica de GST y CAT, pero 7 mezclas y 8 de sus constituyentes inhiben en gran medida la AChE, en la cual 5 de las combinaciones presentan interacción sinérgica. En los resultados neurotóxicos se destacan las mezclas M20 (CI_{50} 0.61 mg/L), M12 (CI_{50} 0.81 mg/L) y su componente δ -3-careno (CI_{50} 0.19 mg/L), como las sustancias que ejercen

mayor efecto inhibitorio sobre la actividad de AChE, sugirieron que la acción insecticida de estas mezclas involucra más de un mecanismo de acción, al mostrar una reducción de dosis desfavorable para δ -3-careno. De esta manera el presente trabajo contribuye a la caracterización del efecto insecticida por dos vías de acceso de CQs de AEs, elabora algunas mezclas de metabolitos volátiles bioactivos potencializando el efecto insecticida y hace una aproximación a sus posibles mecanismos de acción, presentado nuevas sustancias que podrían usarse como principios activos de bioinsecticidas para el control de *S. zeamais*.

Palabras clave: Mezclas bioinsecticidas, gorgojo del maíz, monoterpenoides, fenilpropanoides, acetilcolinesterasa, glutatión-S-transferasa y catalasa

Abstract

Study of insecticidal action of chemical constituents present in essential oils and their effect on detoxifying and motor function enzymes for *Sitophilus zeamais*.

Sitophilus zeamais is a cosmopolitan pest, causing losses of 15 to 50% in stored grains, essential products for food security. The most used method for its control is synthetic insecticides, which have disadvantages such as their high cost, high toxicity, and the generation of resistance. Therefore, it is necessary to develop phytosanitary agents that allow the efficient and safe control of this pest. In this regard, plants are a promising source of bioactive secondary metabolites, with a wide structural diversity, which can be used as safe and effective bioinsecticides. One way to obtain this type of substance is by extracting essential oils (EOs), which are characterized by being lipophilic mixtures of volatile compounds, which allow them to affect the metabolic and physiological functions and the behavior of insects in different ways. In this heuristic of phytosanitary agents, our research team during the last 14 years has evaluated more than 100 EOs against *S. zeamais*, coming from native plants and introduced in Colombia, contributing to the chemical characterization of plant species. Studies that allowed determining 26 oils with repellent and insecticidal action by contact and/or fumigant against *S. zeamais*. Although much progress has been made in the investigation of the insecticidal activity of EOs with promising results against *S. zeamais*, little emphasis has been placed on establishing which of its constituents are responsible for the bioactivity against the insect, the possible synergistic interactions, additive and/or antagonistic between its components, nor the possible mechanisms of action against enzymes involved in neurotransmission and cellular detoxification processes.

In this sense, the present investigation determined the insecticidal action of chemical constituents (CQs) of bioactive EOs, selecting the compounds with the greatest fumigant and/or contact toxic effect on *S. zeamais*. Subsequently, a study of potentiation of the insecticidal activity was carried out, by means of the design of mixtures with the selected volatile compounds. Finally, the effect of the potentially toxic mixtures by inhalation and/or contact and that of their components on detoxifying enzymes and motor function extracted from the insect was established. Objective 1

started with the determination of the insecticidal action by contact and fumigants of 51 CQs on *S. zeamais*. In which 11 volatile compounds with fumigant activity (hydrocarbon-type compounds) were established, 13 with contact toxicity (phenylpropanoids, oxygenated monoterpenoids, and aliphatic ketones), and 13 with a toxic effect on the two access routes of the insect (monoterpenoids with functional group ketone, ether, and alcohol). From the results obtained, it was found that the enantiomers of pulegone presented the highest insecticidal potential ($LC_{50} < 0.1$ mg/L and $LD_{50} < 7.5$ μ g/adult), followed by carvacrol ($LD_{50} = 8.71$ μ g/adult) and the enantiomers of carvone ($LC_{50} < 2.9$ mg/L y $LD_{50} < 17.0$ μ g/adult). Subsequently, with the bioactive compounds, a cluster analysis was performed for each mode of action, based on the insecticidal effectiveness, assembling a profile of physicochemical and structural characteristics for each group. In which it was possible to establish that monocyclic monoterpenoid compounds with ketone or alcohol functional group and exocyclic unsaturation are potential insecticides with a double access route against *S. zeamais*.

Thus, the activities carried out in objective 2 are described, in which a pre-design of 29 ternary mixtures was made with the volatile compounds with fumigant and contact toxic. The combinations were subjected to a response surface analysis, to establish the influence of proportionality, making a total of 15 mixtures. Subsequently, the fumigant and contact insecticidal potential of the 15 mixtures and the additive, synergistic or antagonistic interaction of their components, through the combination index, were established. 10 mixtures with promising insecticidal action were determined, of which 8 presented toxicity by the two access routes evaluated, and 5 showed synergistic interaction in the fumigant activity. The results highlight the combination M2 - CL_{50} 0.48 mg/L (*R*-pulegone + *S*-pulegone + *S*-carvone), as the mixture with the greatest fumigant action, and M20 - CL_{50} 2.06 mg/L (isopulegone + δ -3-carene), as the combination with the highest synergistic interaction ($IC = 0.26$).

Finally, in objective 3, the effect of mixtures and their components on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE), catalase (CAT), and glutathione-S-transferase (GST) was established. The results indicated that some bioactive mixtures and their components have a moderate to low effect on the metabolic detoxification of GST and CAT, but 7 mixtures and 8 of their constituents greatly inhibit AChE, in which 5 of the combinations show synergistic interaction. In the neurotoxic results, the mixtures M20 (IC_{50} 0.61 mg/L), M12 (IC_{50} 0.81 mg/L) and their component δ -3-careno (IC_{50} 0.19 mg/L), as the substances that exert the greatest inhibitory effect on AChE activity. This suggested that the insecticidal action of these mixtures involves more than one mechanism of action, showing an unfavorable dose reduction for δ -3-careno. In this way, the present work contributes to the determination of the fumigant and contact toxicity of chemical constituents of EOs, such as those

XVI Estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora para *Sitophilus zeamais*.

responsible for the activity of some oils. In addition, it makes some mixtures of volatile bioactive metabolites, potentiating the insecticidal effect and makes an approximation of its possible mechanisms of action. Therefore, this study presents new substances that could be used as active principles of bioinsecticides for the control of *S. zeamais*.

Keywords: Bioinsecticide mixtures, corn weevil, monoterpenoids, phenylpropanoids, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase, catalase

Contenido

	Pág.
1. Estado actual del tema.....	5
1.1 Generalidades de los cereales: cultivo de maíz.....	5
1.2 Generalidades de <i>Sitophilus zeamais</i>	7
1.2.1 Métodos de control de <i>S. zeamais</i>	8
1.3 Aceites esenciales como bioinsecticidas contra <i>Sitophilus zeamais</i>	11
1.4 Compuestos químicos constituyentes de aceites esenciales para el control de <i>S. zeamais</i> 15	15
1.5 Métodos para determinar el potencial insecticida de volátiles sobre <i>S. zeamais</i>	17
1.5.1 Bioensayos de la actividad Fumigante.....	17
1.5.2 Bioensayos de actividad tóxica por contacto.....	19
1.5.3 Bioensayos enzimáticos.	21
▪ Enzimas desintoxicantes.....	22
▪ Enzimas de función motora.....	25
1.6 Diseños de mezclas de sustancias insecticidas.....	28
1.6.1 Modelos de mezclas.....	29
▪ Modelo superficie de respuesta.....	30
▪ Modelo del efecto mediano de la ley de acción de masas.....	31
2. Metodología.....	35
2.1 Toxicidad fumigante y por contacto sobre <i>S. zeamais</i> de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales bioactivos.	36
2.1.1 Selección y obtención de constituyentes químicos volátiles.....	36
2.1.2 Insectos.....	37
2.1.3 Ensayo de toxicidad fumigante.....	38
2.1.4 Análisis cluster de la toxicidad fumigante.....	40
2.1.5 Ensayo de toxicidad por contacto.....	40
2.1.6 Análisis cluster de la toxicidad por contacto.....	41
2.2 Estudio para potencializar la acción insecticida frente a <i>S. zeamais</i> a partir del diseño de mezclas con metabolitos volátiles bioactivos.	42
2.2.1 Prediseño de Mezclas.....	42
2.2.2 Modelo de superficie de respuesta para la predicción de mezclas.....	45
2.2.3 Estudio del potencial insecticida de las mezclas.....	46
2.2.4 Efecto de la interacción insecticida de los componentes de las mezclas.....	46
2.3 Efecto de las mejores mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en <i>S. zeamais</i>	47
2.3.1 Obtención del extracto enzimático.....	47
2.3.2 Caracterización del extracto enzimático sobre enzimas desintoxicantes y de función motora de <i>S. zeamais</i>	48
▪ Cuantificación de proteínas.....	48
▪ Actividad enzimática de la AChE en el extracto de <i>S. zeamais</i>	48
▪ Actividad enzimática de la GST en el extracto de <i>S. zeamais</i>	49
▪ Actividad enzimática de la catalasa en el extracto de <i>S. zeamais</i>	49
2.3.3 Efecto de las mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en <i>S. zeamais</i>	50

2.3.4	Efecto de la interacción inhibitoria de los componentes de las mezclas sobre enzimas desintoxicantes y de función motora.....	51
3.	Resultados y Discusión	53
3.1	Toxicidad fumigante y por contacto de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales bioactivos sobre <i>S. zeamais</i>	53
3.1.1	Constituyentes químicos con toxicidad fumigante promisorio	53
3.1.2	Análisis cluster para correlacionar la toxicidad fumigante de los compuestos activos	58
3.1.3	Constituyentes químicos con toxicidad por contacto promisorio.....	63
3.1.4	Análisis cluster para correlacionar la toxicidad por contacto de los compuestos activos	67
3.2	Potencialización de la acción insecticida a partir del diseño de mezclas con metabolitos volátiles bioactivos frente a <i>S. zeamais</i>	71
3.3	Efecto de las mejores mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora de <i>S. zeamais</i>	81
3.3.1	Caracterización del homogenizado proteico de <i>S. zeamais</i> en enzimas desintoxicantes y de función motora	81
3.3.2	Efecto de las mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en <i>S. zeamais</i>	83
	▪ Efecto de las mezclas y sus componentes sobre acetilcolinesterasa en <i>S. zeamais</i>	83
	▪ Efecto de las mezclas y sus componentes sobre catalasa en <i>S. zeamais</i>	91
	▪ Efecto de las mezclas y sus componentes sobre glutatión-S-transferasa en <i>S. zeamais</i>	92
4.	Conclusiones y Recomendaciones.....	96
4.1	Conclusiones	96
4.2	Recomendaciones.....	97
5.	Bibliografía	99
6.	Anexos	113
Anexo A.1	AEs bioactivos sobre <i>S. zeamais</i> estudiados por el equipo de investigación	113
Anexo A.2	Potenciales constituyentes químicos de AEs con actividad insecticida frente a <i>S. zeamais</i>	116
Anexo B.1	Estragol aislado de <i>Artemisia dracunculus</i>	141
Anexo B.2	Aislamiento de piperitona proveniente del AE de <i>Piper aduncum</i>	143
Anexo B.3	Síntesis de isopulegona S-1 a partir del isopulegol	145
Anexo B.4	Síntesis de pulegona S-2 a partir del isopulegona S-1	147
Anexo C.1	Parámetros para el análisis cluster de la toxicidad fumigante	150
Anexo C.2	Coefficiente de aglomeración en el análisis cluster tóxico fumigante	151
Anexo C.3	Determinación del número de clusters en la toxicidad fumigante	151
Anexo C.4	Parámetros para el análisis cluster de la toxicidad por contacto.....	151
Anexo C.5	Coefficiente de aglomeración del análisis cluster tóxico por contacto	152
Anexo C.6	Determinación del número de clusters en la toxicidad por contacto	152
Anexo D.1	Análisis de varianza del MSR cuadrático, incluidas estadísticas de diagnóstico para la fracción afectada de <i>S. zeamais</i> de matrices con tres compuestos	154
Anexo D.2	Gráficos de la interacción fumigante de los componentes de las mezclas.	156
Anexo D.3	Gráficos de la interacción fumigante de los componentes de las mezclas.	158
Anexo E.1	Curvas de calibración para caracterizar el extracto proteico de <i>S. zeamais</i>	161

Anexo E.2 Curvas dosis-efecto de inhibición de la AChE de <i>S. zeamais</i> de las mezclas y sus componentes.....	162
Anexo E.3 Gráficos de la interacción de los componentes de las mezclas frente la inhibición de AChE	165

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1.1: Consumo anual aparente de maíz amarillo en Colombia (8).	6
Figura 1.2: Estadios del ciclo de vida de la especie <i>Sitophilus zeamais</i> (modificado)(22,42)	8
Figura 1.3: Mecanismos propuestos de toxicidad inducida por aceites esenciales y sus constituyentes sobre insectos, imagen modificada (25,34).....	21
Figura 1.4: Reacción de conjugación de la actividad de Glutación-S-transferasa	23
Figura 1.5: Reacción de medida de la actividad de acetilcolinesterasa	26
Figura 1.6: Cambios fisiológicos y de comportamiento asociados con la resistencia a insecticidas (125).....	28
Figura 1.7: Diseño Simplex-lattice {3,2}	31
Figura 2.1 Diagrama metodológico del estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en AEs y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en <i>S. zeamais</i> ...	35
Figura 2.2: Cámara de cultivo para las crías de <i>S. zeamais</i>	38
Figura 2.3: Imágenes del bioensayo de la actividad fumigante mediante el método PTFE.	39
Figura 2.4: Imágenes del bioensayo de toxicidad por contacto empleando el método tópico.....	41
Figura 3.1: Mortalidad de <i>S. zeamais</i> por acción fumigante de compuestos químicos volátiles evaluados a 150 mg/L.	53
Figura 3.2: Diagrama de análisis cluster por el método <i>k-means</i> de los compuestos volátiles con acción fumigante sobre <i>S. zeamais</i>	59
Figura 3.3: Diagrama de análisis cluster por el método <i>k-means</i> de los compuestos volátiles con acción fumigante sobre <i>S. zeamais</i>	60
Figura 3.4: Mortalidad de <i>S. zeamais</i> por acción tóxica por contacto de compuestos químicos volátiles evaluados a 50 µg/adulto.....	63
Figura 3.5: Dendograma de análisis Cluster de los compuestos volátiles tóxicos por contacto.....	68
Figura 3.6: Grafico de frecuencias de las características fisicoquímicas y bioquímicas de los compuestos volátiles de los clusters de la toxicidad por contacto	69
Figura 3.7: Gráficos de superficie de respuesta que muestran la influencia de la proporcionalidad, de los compuestos volátiles en la toxicidad fumigante y por contacto sobre <i>S. zeamais</i>	73

Figura 3.8: Estudio de algunas condiciones del ensayo de inhibición para cada una de las enzimas.	82
Figura 3.9: Evaluación cinética de Michaelis-Menten del extracto proteico de <i>S. zeamais</i> para cada una de las enzimas.....	83
Figura 3.10: Efecto de las mezclas y sus componentes sobre la actividad de AChE en <i>S. zeamais</i>	84
Figura 3.11: Gráficos Lineweaver-Burk del estudio cinético de las mezclas y sus componentes sobre AChE en <i>S. zeamais</i>	88
Figura 3.12: Efecto de las mezclas y sus componentes sobre la actividad de catalasa en <i>S. zeamais</i>	91
Figura 3.13: Efecto de las mezclas y sus componentes sobre la actividad de glutatión-S-transferasa en <i>S. zeamais</i>	93
Figura 6.1: Espectros de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de estragol	142
Figura 6.2: Espectros de APT (100 MHz, CDCl ₃) de estragol	142
Figura 6.3: Espectros de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de piperitona	144
Figura 6.4: Espectros de APT (100 MHz, CDCl ₃) de piperitona	144
Figura 6.5: Espectros de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de isopulegona	146
Figura 6.6: Espectros de APT (100 MHz, CDCl ₃) de isopulegona.....	146
Figura 6.7: Espectros de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) de pulegona.....	148
Figura 6.8: Espectros de APT (100 MHz, CDCl ₃) de pulegona	148

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1: Descripción y símbolos de sinergismo o antagonismo en estudios de combinación de compuestos activos con base en el método de índice de combinación (33)	32
Tabla 2.1: Constituyentes químicos volátiles seleccionados	37
Tabla 2.2: Mezclas ternarias prediseñadas de compuestos volátiles bioactivos.	43
Tabla 3.1: Toxicidad fumigante (CL) de compuestos volátiles bioactivos contra <i>S. zeamais</i>	55
Tabla 3.2: Toxicidad por contacto (DL) de los compuestos volátiles contra <i>S. zeamais</i>	65
Tabla 3.3: Efecto insecticida de las mezclas predichas por MSR.....	74
Tabla 3.4: Toxicidad fumigante y por contacto de las mezclas de compuestos volátiles sobre <i>S. zeamais</i>	76
Tabla 3.5: Interacción de constituyentes químicos de AEs frente a <i>S. zeamais</i> , basado en el efecto mediano de la ley de acción de masas.....	78
Tabla 3.6: Caracterización de los homogenizados proteicos obtenidos de <i>S. zeamais</i>	81
Tabla 3.7: Efecto de las mezclas y sus componentes en la inhibición de AChE de <i>S. zeamais</i>	85
Tabla 3.8: Efecto de la interacción sinergista inhibitoria de los componentes de las mezclas sobre AChE en <i>S. zeamais</i>	90

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término	Unidad
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50	μM o mg/L
CL ₅₀	Concentración letal 50	μM o mg/L
D	Diámetro	cm
DL ₅₀	Dosis letal 50	μg
IC	Índice de combinación	-
μM	micromolar	μmol/L aire
LogK _{ow}	logaritmo de coeficiente de reparto octanol/agua	
Pv	Presión de vapor	kPa
ε	Coeficiente de extinción molar	M ⁻¹ · cm ⁻¹
ρ	Densidad	g · mL ⁻¹
IRD	Índice de reducción de dosis	-
β _i	Pendiente de la regresión probit	
Tf	Temperatura de fusión	°C
Tb	Temperatura de ebullición	°C

Abreviaturas

Abreviatura Término

AEs	Aceites Esenciales
CQs	Constituyentes químicos
HR	Humedad relativa
KPa	Kilopascales
ACh	Acetilcolina
AThChI	Ioduro de acetiltiocolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
COX	Citocromo C-oxidasa
CDNB	1-cloro-2,4dinitrobenceno
CFSAN	centro para la seguridad alimentaria y nutrición aplicada de la FDA
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EPA	agencia de protección ambiental
F	Factor de dilución
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FENALCE	Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación-S-Transferasa
CAT	Catalasa
h	Horas
ha	Hectáreas
HR	Humedad relativa
HSDB	Banco de datos de sustancias peligrosas
IARC	centro internacional de investigación sobre el cáncer
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario

Abreviatura Término

Ki	constante de disociación de inhibición
CL-EM	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa
% M	Porcentaje de mortalidad
min	minutos
PTFE	politetrafluoruro de etileno
T°	Temperatura
°C	Grados Celcius
CCD	Técnicas de cromatografía en capa delgada
ton	tonelada (s)
µL/L	Microlitro /Litro de aire
Gx	Gravedades (Fuerza centrífuga relativa)
RMN	Resonancia magnética nuclear
Ref.	Referencias Bibliográficas
MSR	Modelo de superficie de respuesta
H_0	Hipótesis nula
OCDE	

Producción científica

Parte de los resultados obtenidos de la presente tesis de maestría han sido objeto de las siguientes publicaciones:

1. William R. Patiño-Bayona, Leidy J. Nagles Galeano, Jenifer J. Bustos Cortes, Wilman A. Delgado Ávila, Eddy Herrera Daza, Luis E. Cuca Suárez, Juliet A. Prieto-Rodríguez and Oscar J. Patiño-Ladino. Effects of Essential Oils from 24 Plant Species on *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera, Curculionidae), *Insects*, 2021, 12 (6), 532 <https://doi.org/10.3390/insects12060532>
2. Leidy J. Nagles Galeano, Angie D. Torres García, Paula N. Ardila, Angie J. Botache Tobón, Luis E. Cuca Suárez, Eddy Herrera Daza, Juliet A. Prieto-Rodríguez and Oscar J. Patiño-Ladino. Toxic and behavioral effects of chemical constituents of essential oils against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae), **2021** (Sometido).

Así mismo ha sido aceptada e invitada en el siguiente congreso como ponente:

3. Nagles Galeano, Leidy J. Prieto Rodríguez Juliet, Luis E. Cuca-Suarez, Oscar J. Patiño-Ladino Estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presente en aceites esenciales sobre *Sitophilus zeamais*. XIV Congreso Colombiano de Fitoquímica. Sincelejo, Colombia, **aceptado 2020**. Participación en modalidad oral

Introducción

El aumento exponencial de la población mundial y los efectos del cambio climático han causado repercusiones en el acceso a los recursos alimenticios. Esta problemática se concentra, principalmente, en países en vía de desarrollo haciendo que los gobiernos generen políticas que promuevan el progreso agrícola sostenible, satisfaciendo las necesidades alimenticias de cada país [1]. En este sentido, se destacan los cereales al representar cerca del 40% del consumo per cápita a nivel mundial, siendo, la producción y almacenamiento de cereales uno de los mayores retos de la sociedad actual para garantizar la seguridad alimentaria [2]. Ya que los cereales son económicamente asequibles y constituyen una de las fuentes principales de nutrientes y vitaminas, que no se descomponen al almacenarse por largos periodos [3,4]. Dentro de los granos con mayor demanda y amplia gama de usos, se encuentra el maíz, dedicado principalmente a la industria de alimentos [5,6]. Esta tendencia también se observa en Colombia al presentar un constante aumento en el consumo de maíz con el transcurrir de los años, sin embargo, su producción ha bajado alrededor de un 16% desde hace 7 años (2012-2019), siendo incapaz de satisfacer su demanda interna [7], teniendo que importar cerca del 85% del maíz que se consume en el país [7,8]. Consecuentemente, los bajos rendimientos en la producción de cereales están relacionados con factores, presentes en las diferentes etapas de cultivo y postcosecha [9]. No obstante, las mayores pérdidas se le atribuyen al periodo de almacenamiento, puesto que sus condiciones brindan un ambiente propicio para la proliferación de plagas, generando detrimentos económicos [10,11].

Entre los insectos que generan los mayores daños se encuentra *Sitophilus zeamais*, una plaga cosmopolita que ocasiona pérdidas entre el 15 al 50% en granos almacenados, como maíz, arroz, trigo, etc. [9,12]. Estos insectos se caracterizan por su alta tasa de reproducción, además, sus adultos puede perforar los granos, permitiendo que sus larvas se alimenten y desarrollen dentro de éstos, causando cambios organolépticos, disminución del poder germinativo y del valor nutricional [13,14]. El método más utilizado para el control de este insecto es el químico, el cual utiliza sustancias insecticidas obtenidas por síntesis química, donde se destacan las fosfinas, organoclorados y organofosforados. Sin embargo, este tipo de principios activos se han venido restringiendo en las

prácticas agrícolas colombianas y a nivel mundial, como es el caso del DDT. Debido a que el uso de estas sustancias ha generado graves efectos secundarios como la afectación de organismos no objetivo, desarrollo de líneas de insectos resistentes, bioacumulación, daños a la capa de ozono, residuos tóxicos en los productos y riesgos para la salud humana [15,16]. No obstante, esta clase de principios activos se siguen comercializando en el país, lo que ha hecho que se promuevan estrategias como el manejo integrado de plagas (MIP), el cual se fundamenta en la implementación de diferentes prácticas de control, bajo un nivel económico aceptable, que al mismo tiempo preserve la inocuidad del grano y minimice el impacto ambiental [17,18]. Consecuentemente, con la intención de reemplazar los plaguicidas sintéticos, desde la década de los noventa se han realizado importantes estudios en la búsqueda de nuevos agentes fitosanitarios, derivados del metabolismo secundario de las plantas, para su aplicación a nivel agrícola [19–21].

Dentro de las sustancias producidas por las plantas con potencial para ser utilizadas en el control de insectos, se encuentran los aceites esenciales (AEs). Los cuales se caracterizan por ser mezclas complejas de metabolitos secundarios de carácter lipofílico y volátil, que pueden afectar de diferentes modos las funciones metabólicas, fisiológicas y comportamiento de los insectos. Entre las propiedades que presentan los AEs, se destaca su alta diversidad química, rápida degradación en el ambiente, y en varias ocasiones, especificidad frente a plagas objetivo [22–24]. En algunos estudios, se ha atribuido la actividad de los AEs y sus componentes al efecto sobre el sistema nervioso, incluyendo la modulación de receptores GABA y octopaminérgicos y la inhibición de acetilcolinesterasa (AChE) [25,26]. No obstante, son limitados los reportes de los efectos que ejercen los AEs o sus constituyentes, en la regulación de enzimas involucradas en procesos energéticos, de neurotransmisión y desintoxicación celular, lo que constituye un tema interesante y necesario de pesquisa para contribuir en la determinación de sustancias para el control de insectos plaga de productos almacenados.

En este sentido, el grupo de investigación QuiProNaB, inició en 2007 estudios enfocados en la búsqueda de sustancias con potencial aplicación para el control de plagas de almacén. Posteriormente, se unió el grupo de investigación GIFU, en conjunto han evaluado la actividad insecticida de más de 100 aceites esenciales provenientes de plantas nativas e introducidas en Colombia. En los estudios realizados se han encontrado diversos AEs con promisoría actividad por contacto, antialimentaria, fumigante y/o repelente sobre *S. zeamais*, en los cuales han realizado contribuciones de caracterización química de especies vegetales sin reporte o con reportes parciales, determinando 26 aceites con potencial acción insecticida fumigante y/o por contacto sobre el insecto

de estudio [27–29]. Los resultados obtenidos por el equipo de investigación concuerdan con reportes científicos, los cuales señalan que la bioactividad de los AEs está directamente relacionada con su composición química, la cual puede variar dentro de una misma especie debido a aspectos como las condiciones ambientales de crecimiento y el estado fenológico de la planta [30]. Por ende, las investigaciones sobre la actividad insecticida de los constituyentes químicos (CQs) de AEs son más cada vez más importantes, con el fin de identificar los compuestos responsables de la actividad y minimizar, la variabilidad en la composición de las sustancias bioactivas. No obstante, los efectos insecticidas de los metabolitos volátiles se han reportado con una amplia variedad de metodologías, dificultando su replicación. Si bien son numerosos los estudios de actividad insecticida de AEs con resultados prometedores frente a *S. zeamais*, no se ha hecho gran énfasis en establecer cuáles de sus constituyentes son los responsables de la bioactividad frente al insecto. Ni tampoco, se ha hecho hincapié en las posibles interacciones sinérgicas, aditivas y/o antagónicas entre los componentes del AEs. Las razones anteriormente mencionadas convierten al estudio de los efectos insecticidas de CQs de AEs y sus mezclas en un enfoque importante de investigación. Por consiguiente, con nuestro interés en propiciar la búsqueda de sustancias con efecto insecticida mediante una aproximación a los compuestos volátiles responsables de esta actividad, el presente trabajo hace parte del macroproyecto titulado “Estudio para potencializar la acción fumigante sobre *Sitophilus zeamais* y *Tribolium castaneum* de sustancias derivadas de aceites esenciales y aproximación a los mecanismos de acción”, financiado por Minciencias, la Universidad Nacional de Colombia y la Pontificia Universidad Javeriana en la convocatoria 745-2016 (contrato 382-2016).

Teniendo en cuenta los antecedentes de los AEs previamente estudiados por el equipo de investigación, la presente tesis de maestría se planteó con base en la composición química de los 26 AEs bioactivos y en reportes del efecto insecticida de constituyentes de AEs. Con el objetivo de *contribuir en la búsqueda de sustancias con potencial aplicación en el control de Sitophilus zeamais, mediante un estudio de la acción insecticida de mezclas de algunos constituyentes químicos bioactivos presentes en aceites esenciales y de su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en el insecto*. Para dar respuesta a este objetivo el presente trabajo abordó 3 objetivos específicos. En el primer objetivo, se evaluó la toxicidad fumigante y por contacto sobre *S. zeamais* de algunos CQs presentes en aceites bioactivos, seleccionando los compuestos más activos. Los compuestos volátiles seleccionados se agruparon de acuerdo con su actividad insecticida y estructura química, mediante un análisis cluster. En el segundo objetivo, se realizó un diseño de mezclas para potenciar el efecto insecticida de los compuestos activos, aplicando un modelo de superficie de respuesta (MSR) [31,32]. En el desarrollo de las mezclas, también se realizó un estudio de

interacción, mediante el índice de combinación, estableciendo los efectos sinérgicos, aditivos y/o antagónicos, entre sus componentes [33]. En el tercer objetivo, se evaluó el efecto de inhibición de las mezclas bioactivas y sus componentes, sobre la actividad catalítica de enzimas desintoxicantes (catalasa y glutatión-S-transferasa) y de función motora (acetilcolinesterasa) en *S. zeamais*, como aproximación a los mecanismo de acción [25,34]. Evaluación en la cual, también se estableció el tipo de interacción entre los componentes de las mezclas al inhibir las enzimas estudiadas.

1. Estado actual del tema

1.1 Generalidades de los cereales: cultivo de maíz

Los cereales son un alimento de alto impacto a nivel mundial debido a su contenido nutricional y a que pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo [4]. Dentro de estos se destacan productos como arroz, trigo y maíz, que representan alrededor del 50% de la fuente proteica en países en vía de desarrollo[2,6]. El maíz (*Zea mays L.*) es uno de los granos más antiguos que se conocen y debido a sus grandes bondades y múltiples usos, se ha convertido en uno de los cultivos más significativos en el mundo [35]. El papel sustancial del maíz se debe a su composición química, constituida en un 72.2% de carbohidratos, 13.8% de agua, 8.9% de proteína, 9.0% de lípidos y 2.0% de fibra, distribuidos entre el germen y el endospermo del grano. Además, a diferencia de otros cereales, el maíz contiene vitaminas como B2 y B3 y aminoácidos como el triptófano, encapsulados en partículas sólidas que no se degradan después del proceso de cocción [6,35]. Su alto impacto se evidencia en tendencias estadísticas presentadas por organizaciones como la OCDE, FAO y FENALCE, que muestran un constante aumento en su producción durante los últimos 11 años [2,5,8]. El aumento constante en la demanda de este producto agrícola también se debe a la creciente alza de su utilidad como pienso y fuente de biocombustibles. Dado que sus cosechas, normalmente, van dirigidas un 66% a la alimentación animal, 20% al consumo directo, 8% al uso industrial de alimentos y productos y 6% al mantenimiento de semillas. Incluso, en países desarrollados se procesa el almidón de maíz con hongos, para la producción de penicilina [2,11,35].

El cultivo de maíz es semestral y aunque puede darse en diferentes agroecosistemas, para alcanzar sus mejores rendimientos requiere de condiciones óptimas definidas, que involucran temperaturas entre 20 - 30 °C, suelos poco arcillosos con contenido de agua mayor o igual a 5 L/m² diarios y pH entre 6 - 7. En Colombia el consumo anual de maíz amarillo durante los años 2009 a 2019 ha oscilado entre los 3'791.767 hasta 6'189.141 ton/año, evidenciando mayor incremento en los últimos 4 años. Sin embargo, el país solo produce entre 762.000 a 1'000.000 ton/año, por lo que ha sido necesario realizar importaciones entre un 70 – 85% como se observa en la figura 1.1 [8]. Para cubrir la demanda

nacional, las importaciones se realizan principalmente de Estados Unidos al ser el mayor productor en el mundo, seguido de Argentina y Brasil. Por el mismo motivo de escasas en la producción interna, la utilidad del maíz en Colombia se ha priorizado solo al consumo humano (80%) y al alimento animal (20%) [2,7,8]. Los bajos rendimientos en la producción de maíz están relacionados con diversos factores bióticos y abióticos, presentes en las diferentes etapas de obtención, la mayoría se atribuyen a la no aplicación de buenas prácticas agrícolas. Entre los factores se encuentran, daño en suelos, cambio climático, difícil acceso a recuso hídrico, falta de tecnificación, desplazamiento por otros cultivos, presencia de plagas en campo y almacén y el uso indiscriminado de pesticidas. Mientras, que las altas importaciones, se deben a problemáticas como sobre población, producción de bioetanol y la falta de valor agregado, debido a los altos costos de producción, en comparación con los países importadores [11,35,36].

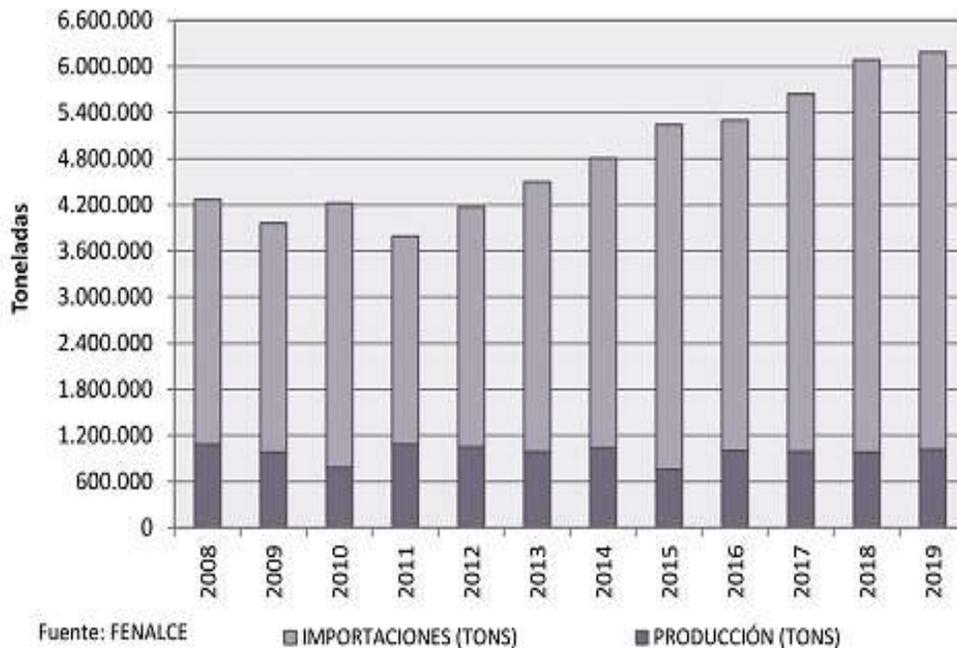


Figura 1.1: Consumo anual aparente de maíz amarillo en Colombia [8].

Las mayores pérdidas de los productos almacenados como el maíz se presentan en periodo de postcosecha, debido a factores abióticos como temperatura, humedad, escasa luz y asepsia inadecuada, que dan paso a factores bióticos. Uno de los factores más difíciles de controlar es la humedad ya que por encima de 65% facilita la producción de bacterias, hongos y la supervivencia

de otros agentes bióticos como aves, roedores e insectos. Para el caso de Colombia, en las etapas de postcosecha y almacenamiento se tienen pérdidas del 19.8 y 15.6 %, respectivamente. Esto significa que, en promedio, se están desperdiciando anualmente 1.8 millones de toneladas de cereales, lo que es equivalente a la producción nacional de arroz en un año [10]. De las infestaciones por insectos se estiman pérdidas anuales en aproximadamente 30%, encontrando más de 1000 especies plaga responsables del deterioro de los alimentos almacenados. Donde, sobresalen los insectos pertenecientes al orden coleóptera, debido a su alta tasa de reproducción y su excelente adaptabilidad a las condiciones de almacenamiento. *S. zeamais*, es uno de los insectos pertenecientes a este orden y es una de las 5 plagas cosmopolitas de mayor impacto en cereales, que puede ocasionar pérdidas entre el 20 al 90% del grano almacenado en climas tropicales. Este insecto aunque afecta principalmente al maíz, también se ha reportado su presencia en otros cereales como arroz, trigo, sorgo y en los productos de molienda [13,36–38].

1.2 Generalidades de *Sitophilus zeamais*

La especie *S. zeamais*, conocida popularmente como gorgojo o picudo del maíz es considerada una plaga primaria altamente destructiva, capaz de perforar granos enteros dado a la modificación de su cabeza conocida como *rostrum* y alimentarse dentro de este [13]. En el inicio de su ciclo de vida la hembra puede romper la cubierta de los granos abriendo un orificio en el que deposita un huevo (~ 0.70 mm) de color blanco translúcido que se vuelve opaco y cremoso con el tiempo. La hembra tapa el agujero del maíz con una secreción mucilaginosa, alcanzando a ovopositar entre 150 a 400 veces durante toda su vida. La eclosión ocurre a los 3 o 5 días presentando cuatro estadios larvales (2.50 – 2.75 mm), los cuales se caracterizan por sus mandíbulas fuertes, permitiéndoles alimentarse del endospermo del grano, etapa de vida en la que pueden presentar canibalismo. Después de este periodo se convierten en pupa (2.75 – 3.00 mm), durante aproximadamente 6 días, las cuales presentan color marrón oscuro y proboscis larga hacia el interior. Finalmente, emerge como adulto presentando color café oscuro o rojizo (2.50 – 4.50 mm), con manchas ovales en el dorso (élitros), cuerpo cilíndrico y alargado, alas funcionales, proboscis curva y delgada y antenas acodadas y de 8 segmentos. El desarrollo de este insecto desde el huevo hasta el adulto ocurre dentro del grano y puede tardar entre 30 a 45 días como se exhibe en la figura 1.2 [13,39–41].

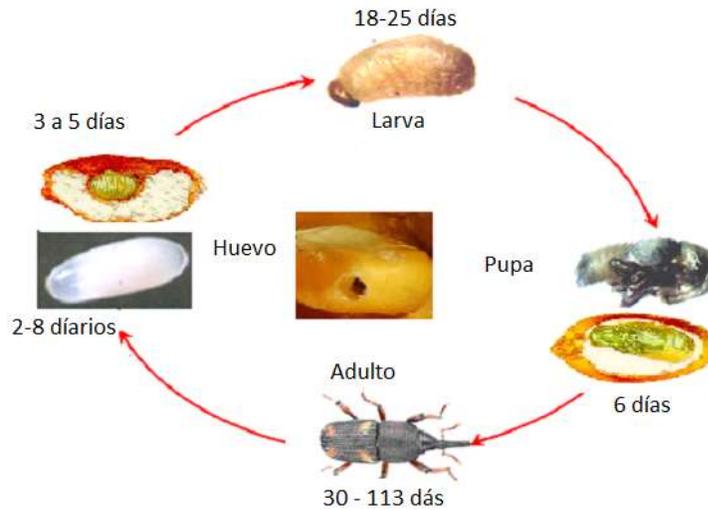


Figura 1.2: Estadios del ciclo de vida de la especie *Sitophilus zeamais* (modificado)[22,42]

Debido a las condiciones ambientales que presentan los productos almacenados, hacen que la tasa de reproducción de *S. zeamais* llegue a ser muy alta, ocasionando que una sola pareja infeste toneladas de maíz en pocos meses. La presencia de la plaga provoca aumentos en el gradiente de temperatura atribuidos a su actividad metabólica, que también conllevan al crecimiento del porcentaje de humedad. El aumento de gradiente en estos factores abióticos junto con la presencia de excremento e insectos muertos llevan a la producción de micotoxinas (*Aspergillus* y *Penicillium* son los más comunes). Todos estos factores ocasionan daños organolépticos (olor fétido, cambios de textura y color y sabor desagradable), degradación de carbohidratos, grasas y vitaminas, los cuales conllevan a la pérdida nutricional, de calidad y valor comercial del grano[13,39,43]. Las notables pérdidas de cereales ocasionadas por la presencia de *S. zeamais*, ha llevado al desarrollo de métodos para su control, con la finalidad de disminuir o eliminar las pérdidas y los daños que estos ocasionan.

1.2.1 Métodos de control de *S. zeamais*

Existen diversos tipos de técnicas para el manejo de las plagas de forma curativa o preventiva, las cuales se han implementado para el control de *S. zeamais*. Actualmente, los métodos de control que se suelen utilizar son de tipo culturales, físicos, biológicos, genéticos, etológicos y químicos, siendo este último el que más se utiliza hoy en día debido a su economía y fácil acceso. A continuación se describen los principales métodos de control y su aplicación sobre *S. zeamais*. [11,36,43].

- **Métodos culturales**

En este tipo de métodos se incluyen prácticas agrícolas para crear condiciones desfavorables al desarrollo de la plaga, pero favorables para el cultivo, como la preparación de suelo, ajuste de fechas de siembra, rotación de cultivos y actividades sanitarias. Un ejemplo para el manejo de *S. zeamais* en postcosecha es la implementación de asoleo periódico del grano. En Colombia también se utiliza la remoción de la capa de cera del insecto por desecación hasta su muerte, donde se mezcla el grano con polvos inertes. Entre las sustancias implementados se encuentran: 30% p/p ceniza de madera, 30% p/p de cal, 30% p/p de hoja de tabaco en polvo, arena seca 1:1 v/v (90% SiO₂) y aceite vegetal en proporción 8 mL / kg de grano. No obstante, la aplicación de estas sustancias hace que el maíz no se pueda utilizar en alimentos para humanos [11,40,43].

- **Métodos físicos**

Los métodos físicos hacen referencia al control de factores, como temperatura y humedad, el uso de sonido, radiación electromagnética y atmosferas controladas, con ayuda de ozono (O₃) y almacenajes herméticos. Dentro de estas técnicas se recomienda controlar la humedad en el grano por debajo del 12% para evitar la presencia de insectos, ácaros, hongos y bacterias. Un ejemplo de control contra *S. zeamais*, es el aumento de temperatura hasta 60 °C o disminución hasta -30 °C. Sin embargo, estas estrategias requieren equipos especializados, sofisticados y costosos, por lo que no se suele usar de manera común entre los agricultores [11,43,44].

- **Métodos biológicos**

En este sistema se utilizan enemigos naturales como depredadores, insectos parásitos, hongos, bacterias, nematodos, entre otros; para combatir las plagas. Dentro de las especies que atacan el género *Sitophilus* se encuentran *Anisopteromalus calandrae* Howard, *Chaetospila elegans* Westwood y *Lariphagus distinguendus* Foerster (Pteromalidae). Sin embargo, la capacidad de reproducción de estas y ciclo de vida es más corto que la de *Sitophilus* [40,43]. También, se encuentran estudios de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como agentes efectivos para el control de *S. zeamais*, donde *M. anisopliae* se distribuye comercialmente en Colombia, como Raxter®, insecticida biológico que ataca principalmente al orden Coleóptera [45].

- **Métodos genéticos**

Los métodos genéticos se refieren a la implementación de alteraciones genéticas logrando resistencia a plagas en el grano, como es el uso de ácido fenólico para endurecer las capas externas del núcleo del maíz, haciéndolo menos apetecible para *S. zeamais*. Este método posee un gran potencial en el diseño de sistemas de manejo integrado de plagas, aunque aún no se conocen sus efectos secundarios. Razones por las cuales su aplicación por parte de los agricultores es escasa, puesto que su implementación requiere del uso de otros controles y podría tener efectos adversos, desconocidos, en los consumidores [11,40].

- **Métodos etológicos**

Los métodos etológicos se refieren al uso de trampas (luz y color) y semioquímicos, generalmente para atraer o repeler a las plagas. Los semioquímicos, son intermediarios en las interacciones entre organismos, que alteran el comportamiento y las preferencias de las plagas, las cuales están subdivididos en aleloquímicos (alomonas, kairomonas y sinomonas) y feromonas [22]. Las feromonas son uno de los semioquímicos más utilizados, ya que pueden modificar el comportamiento reproductivo de los individuos. Se ha evidenciado que la combinación de compuestos volátiles provenientes de *Ceratonia siliqua* (algarroba) con la feromona 4S,5R-sitofilura ((4R,5S)-5-hidroxi-4-metil-3-heptanona), producida por *Sitophilus*, ejerce una mayor acción atrayente sobre especies de éste mismo género. Estos métodos suelen ser muy específicos para las plagas por lo cual resultan costosos, pero de alto interés en el estudio de efectos de repelencia y de interrupción de la reproducción, mediante la adaptación de los receptores antenales y habituación del sistema nervioso central. Sin embargo, aún no se conoce un producto o prototipo en el cual se implementen esta clase de sustancias para el control de *S. zeamais* [11,23,43].

- **Métodos químicos**

Estos métodos de control hacen referencia al uso de sustancias químicas como plaguicidas. Los plaguicidas utilizados actualmente se pueden catalogar en seis grupos, organofosforados, organoclorados, carbamatos y piretroides, los cuales actúan por afectación de la transmisión de impulsos nerviosos, y reguladores de crecimiento e insecticidas microbianos, que interfieren en el desarrollo y permeabilidad de la membrana plasmática de las células nerviosas. [43,46]. El control químico es el método más utilizado, debido a su bajo costo y alta efectividad, atacando no solo a los insectos plaga, sino también el entorno biótico y abiótico del agroecosistema y el ambiente en general

[42,43,46,47]. Inclusive, los métodos de control para *S. zeamais*, más utilizados en Colombia durante los últimos años han sido la fosfina y el diclorvos (organofosforados), sustancias de uso restringido por organizaciones como la EPA [48]. Sin embargo, aunque en Colombia se ha prohibido la aplicación de algunos principios activos organofosforados, el uso de estas dos sustancias aun es permitida en nuestro país [49,50]. La progresiva restricción de los organofosforados se debe, a que el uso y abuso de estos insecticidas sintéticos ha provocado, brotes de plagas secundarias, aparición de resistencia y acumulación en distintos eslabones de la cadena trófica, dado a su carácter liposoluble [40,51]. Incluso, su aplicación ocasionando deterioro en la salud de los seres humanos, atribuido en los efectos a largo plazo sobre mamíferos, como cáncer, malformaciones congénitas y esterilidad [50,52]. En este sentido, se hace necesario el desarrollo de métodos eficaces y seguros para el control de insectos plagas de productos de almacén.

1.3 Aceites esenciales como bioinsecticidas contra *Sitophilus zeamais*

En búsqueda de insecticidas para el control de *S. zeamais*, que sean amigables con el medio ambiente y los consumidores, se han enfocado las investigaciones hacia las plantas, dado que son un enorme grupo de seres vivos, que aún no ha sido totalmente catalogado. Al respecto, se resalta a Colombia, al ser en el segundo país con mayor biodiversidad de especies vegetales, con más de 30.033 especímenes identificados [53]. Además, las plantas son fuente potencial de metabolitos secundarios con una amplia diversidad estructural, que a menudo poseen un rol ecológico (aleloquímico), para su protección e interacción con otros seres vivos [54]. Lo cual, les permite ser utilizadas en numerosos ámbitos con extensa variedad de actividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, atrayente, repelente, antialimentaria, insecticida, entre otras [55,56]. Para el control de plagas como *S. zeamais*, se encuentran algunos principios activos aislados de plantas, en productos comerciales con potencial actividad insecticida. Tal es el caso de la rotenona, un flavonoide extraído de las raíces de *Derris elliptica*, que actúa a través de la inhibición de la fosforilación del ADP a ATP, el cual se ha utilizado como insecticida, mucho antes que se implementaran los compuestos organoclorados [50,57]. También se encuentra el extracto de las semillas de neem y su componente más activo, azadiractina, un tetranortriterpenoide con efecto antialimentario, que bloquea la síntesis y liberación de la hormona de muda y se distribuye comercialmente en Colombia como NeemAzal® [58]. También se encuentran estudios de piretrinas aisladas de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, y varios compuestos sintéticos derivados de estas, conocidos como piretroides

[59]. Los cuales, se asocian al bloqueo de los canales de sodio en los axones nerviosos, uno de los piretroides más utilizados a nivel comercial es la deltametrina, principio activo de los productos Obiol® EC25 y K-Obiol® ULV6, distribuidos en el país [60]. En este último producto, la deltametrina se encuentra combinada con butóxido de piperonilo, compuesto que causa la pérdida de señalización biológica e inhibe la enzima citocromo p-450, actuando como sinergista [61]. Actualmente, existe una gran cantidad de materias activas de origen natural para el control de plagas, registradas en diferentes países, siendo la tendencia actual, la elaboración de productos cada vez más sofisticados, que alteren más de un blanco molecular o más de una fase del ciclo normal del insecto [62]. Dentro de las investigaciones que se describen en la literatura sobre el usos de plantas y sus derivados, para el control de plagas de almacén, se observa una creciente tendencia hacia el estudio de aceites esenciales (AEs) [34,38,63,64]

Los AEs son mezclas complejas de metabolitos secundarios volátiles, biodegradables, generalmente compuestas por monoterpenoides, sesquiterpenoides, fenilpropanoides y derivados de ácidos grasos (cetona, aldehídos, hidrocarburos...) [65]. Estos aceites son producidos por las plantas, principalmente aromáticas, los cuales se centran en las cavidades lisígenas de la cutícula, en las células oleíferas, los canales esquizogénicos o en los tricomas glandulares, y se obtiene mediante procesos de destilación o expresión [22,66]. Muchos AEs y sus componentes son aleloquímicos, que se caracterizan por ser selectivos y tener un papel en la protección de las plantas, contra herbívoros y afecciones microbianas y micóticas. Algunos de estos AEs, también actúan como agentes atrayentes para polinizadores y dispersores de semillas, tal es el caso del efecto knock down de aceites de *Gaultheria* sobre ácaros, sin afectar a la abeja *Osmia cornifrons* [22,67,68]. Propiedades como variedad de principios activos, alta volatilidad y carácter lipofílico, permiten que los AEs puedan afectar por diversas vías de acceso al insecto (contacto, penetración por vía respiratoria e ingesta) o alterar su comportamiento (efecto antialimentario, repelente e inhibidor de la reproducción) y reducir la posibilidad de aparición de líneas resistentes. El efecto de los xenobióticos se clasifica, dependiendo de las tres vías principales de acceso al insecto, como son tóxicos por contacto, cuando el insecticida por su carácter lipofílico penetra la cutícula del insecto, hasta alcanzar el sitio blanco, o crea una película impermeable provocando muerte por asfixia. Tóxicos por inhalación (Fumigante), si el insecticida entra al cuerpo debido a su volatilidad, para la especie *S. zeamais* se cree que la forma de penetración serían los espiráculos por vía de revestimiento traqueal. Por ultimo tóxicos por ingestión, si es ingerido y se absorbe a través del intestino, provocando la intoxicación por inhibición enzimática o desintegración de las paredes celulares del intestino

[28,42,46]. No obstante, diferentes estudios consideran que la bioactividad de los AEs para el manejo de *S. zeamais*, está directamente relacionada con su composición química [64,69]. La cual a su vez se encuentra influenciada por diversos factores de su entorno, dependiendo de localización y época del año (clima, organismos benéficos, herbívoros, hongos, etc.), el estado fenológico de la planta y el órgano extraído [30].

En esta línea de investigación, se encuentran publicados diferentes estudios a nivel mundial del efecto de AEs de más de 112 taxones de plantas contra *S. zeamais*, evidenciado diversas actividades biológicas, como disuasión alimentaria, inhibición del crecimiento, repelencia, toxicidad por contacto y fumigante, este último en los 4 estadios. AEs que pertenecen a las familias Amaranthaceae, Anacardiaceae, Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Dipsacaceae, Ericaceae, Gomortegaceae, Hypericaceae, Illiciaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Monimiaceae, Myrtaceae, Piperaceae, Poaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Verbenaceae, Vitaceae y Zingiberaceae [22,27,29,64]. Dentro de los AEs con actividad repelente se encuentran como promisorias distintas especies vegetales como *Achillea millefolium* (93.7%), *Myrtus communis* (93.7%) y *Helichrysum italicum* (85.0%), los cuales coinciden en su composición, los compuestos 1,8 cineol, α -pineno, limoneno y linalool [70]. Además, se registran reportes de especies que presentan varias actividades sobre *S. zeamais*, como el AE de los frutos de *Carum carvi* con un fuerte efecto tóxico por contacto y fumigante ($DL_{50} = 3.07 \mu\text{g/adulto}$ y $CL_{50} = 3.37 \text{ mg/L}$). Actividad que se atribuye a sus componentes mayoritarios R-carvona (37.98%) y D-limoneno (26.55%), los cuales también evidencia toxicidad por contacto ($DL_{50} = 2.79$ y $29.86 \mu\text{g/adulto}$) y toxicidad fumigante ($CL_{50} = 2.76$ and 48.18 mg/L), sobre el insecto de estudio [69]. Incluso se encuentran reportes de la eficiencia del uso de prototipos de nanoformulaciones (18%), del AE de *Lipia sidoides* y su compuesto principal (timol – 68.5%). Su eficiencia se determinó en el manejo de poblaciones de *S. zeamais* con diferentes niveles de resistencia a insecticidas convencionales, al causar una disminución en el consumo del grano almacenado y la eliminación total de las poblaciones de insectos [71]. Adicionalmente, en la actualidad se registran algunos productos en el mercado para el control de plagas a base de AEs, como son Cinamite™ y Valero™ elaborados por Mycotech Corporation y algunos pesticidas patentados por EcoSMART Technologies, a base de mezclas de CQs de AEs [63,72]. Sin embargo, hasta el momento no se conoce ningún producto comercial a base de AEs para el control de plagas de productos almacenados.

Gran parte de los estudios de los efectos de AEs sobre *S. zeamais* en Colombia, han estado soportados por el grupo de investigación QuiProNaB, al contar con una gran trayectoria investigativa en este campo, desde el año 2007. Campo que se fue fortaleciendo y consolidando en el año 2008 con la financiación por parte de Colciencias mediante el proyecto de investigación titulado "Búsqueda de metabolitos secundarios con propiedades insecticidas pertenecientes a las familias Myristicaceae, Lauraceae y Rutaceae para el control de insectos plaga del género *Sitophilus* que atacan cereales como el maíz y el arroz". Las investigaciones por parte del grupo de investigación del efecto de AEs sobre *S. zeamais*, se han mantenido durante el transcurso de estos años, permitiendo la estandarización de ensayos de actividad fumigante, toxicidad por contacto, repelente, antialimentaria, inhibitoria de la acetilcolinesterasa y efectos sobre la reproducción. Los resultados de estos estudios se han consolidado en la ejecución del proyecto titulado "Estudio para potencializar la acción fumigante sobre *Sitophilus zeamais* y *Tribolium castaneum* de sustancias derivadas de aceites esenciales y aproximación a los mecanismos de acción" (Convocatoria 745 –2017, código: 120371250800), financiado por Colciencias. Este proyecto inició tomando como base, 30 AEs que presentaron promisorio actividad sobre *T. castaneum* y *S. zeamais*, adicionando 26 AEs, con el objetivo de incrementar la variabilidad química. De esta manera, se determinó la actividad fumigante, antialimentaria, tóxica por contacto y/o repelente de los 56 AEs sobre *S. zeamais*. Investigaciones que han permitido realizar la caracterización química de especies vegetales sin reporte o con reportes parciales y evaluar la actividad insecticida y repelente de algunas por primera vez, como es el caso de *Lippia stoechas*, *Satureja viminea* y *Minthostachys septentrionalis*. Este estudio permitió establecer que 26 de estos AEs, presentaron promisorio actividad para el control de *S. zeamais*, al tomar como criterio de selección, que causaran efectos fumigantes a bajas concentraciones y que afectaran a los insectos por otras vías, diferentes a la respiración [27–29].

Los 26 AEs seleccionados se presentan en la tabla del anexo A1, organizada a partir de un cluster realizado previamente por el equipo de investigación, clasificando los AEs en 4 grupos según los efectos causados sobre el insecto de estudio. Primero, fumigante-Repelente (azul), segundo, fumigante-NO contacto (verde), tercero, fumigante moderado-contacto-repelente (amarillo) y, por último, contacto-repelente (blanco). En la tabla se incluyen la composición química relativa de los AEs (40 CQs de los 116 edificados), su acción repelente (%R a 14 $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{aire}}$) y su toxicidad por contacto (%M a 0.15 $\mu\text{L}/\text{adulto}$) y fumigante (CL_{50} : $\mu\text{L}/\text{L}_{\text{aire}}$), a fin de relacionar el efecto insecticida

con los CQs de los aceites. Puesto que, a pesar de la gran cantidad de estudios de los efectos insecticidas y de comportamiento, de los AEs sobre *S. zeamais*, aún faltan realizar evaluaciones que determinen cuales son los componentes químicos responsables de la actividad, pesquisas sobre mecanismos de acción de los AEs y sus componentes y estudios sobre la potencialización de los efectos tóxicos sobre el insecto de estudio [25,73].

1.4 Compuestos químicos constituyentes de aceites esenciales para el control de *S. zeamais*

Con el fin de determinar el estado actual de las investigaciones sobre el potencial insecticida de los constituyentes químicos presentes en AEs frente a *S. zeamais*, se realizó una revisión descriptiva de literatura científica comprendida entre los años 1998 y 2020, mediante exploración en las plataformas Scopus, Springer, Science Direct, SciFinder y Google Scholar. Esta revisión se resume en la tabla del anexo A.2, en la cual también se registran los CQs de los AEs previamente estudiados por el equipo de investigación, identificados con 4 criterios de elección, **1-** compuestos mayoritarios en un AE bioactivo ($\geq 4.0\%$), **2-** componentes minoritarios en dos o más AEs bioactivos, **3-** compuestos minoritarios en al menos un AEs ($< 4.0\%$) y sin reportes bibliográficos y **4-** compuestos con reportes bibliográficos que presentan similitud estructural con los CQs de los AEs estudiados. La tabla se organizó por la primera columna, teniendo en cuenta el tipo de compuesto químico (terpenoide, fenilpropanoide y otros) y su función orgánica, codificando los compuestos del 1 al 75. En la segunda columna de la tabla, se describe la actividad biológica del AEs estudiado por el grupo de investigación, en el que, el componente químico es mayoritario. Adicionalmente, se reporta el porcentaje de abundancia de dicho compuesto dentro del aceite. En la última columna se resumen los reportes encontrados en la revisión descriptiva, de acuerdo con la actividad insecticida y la metodología empleada, además, de registrar el efecto reportado, junto con la variable de medida y la referencia bibliográfica.

En la revisión se encontraron 25 publicaciones científicas referente a la actividad insecticida de CQs de AEs frente a *S. zeamais*, de las cuales 18 involucran estudios de actividad fumigante, haciendo referencia en mayor proporción a componentes monoterpenoides (86%), siendo los compuestos más estudiados 1,8 cineol (7 reportes), seguido de linalool, limoneno y α -terpineno (4 reportes). De los estudios reseñados, se resaltan como los compuestos más efectivos, atribuido a su CL_{50} reportada a 24 h a 1,8-cineol (5.9 mg/L), Pulegona (11.81 mg/L), *R*-carvona (17.6 μ L/L), geraniol (19,2 mg/L),

timoquinona (13.8 $\mu\text{L/L}$), eugenol (15.9 mg/L) y anisol (14.8 mg/L), al garantizar la inhalación como única vía de acceso al insecto, durante el bioensayo [74–76]. En las investigaciones sobre el potencial insecticida sobre *S. zeamais*, se encontraron 17 de las publicaciones científicas que implicaron estudios de la actividad tóxica por contacto. Donde los componentes que se reportan en la mayor parte de las investigaciones son monoterpenoides (75%), seguidos de los artículos referentes a compuestos fenilpropanoides (38%), siendo los CQs más estudiados 1,8 cineol y linalool (6 reporte), contiguo de α -pineno (5 reportes) y seguido de β -pineno, alcanfor y terpinen-4-ol (4 reportes) [75,77–81]. Los constituyentes químicos a los cuales se les ha reportado una mayor toxicidad por contacto a 24 h (expresando sus DL_{50} en unidades de $\mu\text{g/adulto}$), corresponden a 1,8-cineol (15.8), linalool (34.0), geraniol (18.6), estragol (39.0) y eugenol (8.1), al garantizar que no influyen otros efectos de comportamiento como la repelencia mediante el uso del método tópico. Sin embargo, aunque también se reportan como compuestos activos a isoeugenol (30,7 $\mu\text{g/mg}$) y metil eugenol (29,4 $\mu\text{g/mg}$), al comparar las unidades de medida de su DL_{50} , estas serían mayor a los 8.0 mg/adulto, teniendo en cuenta que un adulto de *S. zeamais* puede pesar entre 255 a 300 mg, lo que es una dosis bastante alta para garantizar el cubrimiento de cada insecto en un silo infestado [75,80,82,83].

De la revisión de componentes de AEs se puede resaltar que los compuestos más activos, encontrados mediante el método fumigante, son las cetonas monoterpénicas monocíclicas (pulegona y R-carvona) y de la toxicidad por contacto los fenilpropanoides, como el eugenol. Sin embargo, faltan estudios de los efectos tóxicos de CQs de AEs que validen el potencial insecticida de algunos aceites. Como es el caso de carvacrol, citral, acetato de terpinilo, anetol y nonano, que, a pesar de encontrarse como componentes mayoritarios en AEs bioactivos ($\geq 4.0\%$), no se encuentran reportes de su actividad insecticida. Un caso similar se aprecia con algunos componentes minoritarios de los AEs con acción insecticida, como isopulegona, acetato de L-mentilo, α -farneseno, farnesol, decanal, nonal y metil isoeugenol, de los cuales no se encuentra ningún reporte del efecto tóxico sobre *S. zeamais*. Adicionalmente, la relación de la vía de acceso insecticida de los CQs, con el efecto tóxico causado por el AEs sobre el insecto, tampoco se puede precisar en todos los casos. Puesto a que se encuentran reportes parciales de componentes mayoritarios de AEs, como β -cariofileno [78], acetato de geranilo y fenchona [84] y de algunos compuestos como el metileugenol [80], que se encuentra como minoritarios. Esta dificultad para relacionar las vías de acceso insecticida también se debe a los estudios con metodologías que incluyen muchas variables, como el medio de cultivo, efectos tóxicos de inhalación, ingestión o contacto, comportamientos repelentes y atrayentes, dentro de un

mismo bioensayo. Como es el caso de safrol [85] y α -terpineol [84], los cuales se evalúan en periodos de 6 a 7 días, con medios de cultivo y sobre superficies que contiene el compuesto a evaluar.

1.5 Métodos para determinar el potencial insecticida de volátiles sobre *S. zeamais*.

Los investigadores han implementado distintos bioensayos para la evaluación de las diferentes vías de acceso y mecanismos de acción de compuestos químicos presentes en AEs sobre los insectos plaga, específicamente frente a *S. zeamais*, en este caso se describen los distintos bioensayos implementados para la evaluación insecticida (fumigante y tóxica por contacto) y enzimática

1.5.1 Bioensayos de la actividad Fumigante

Para la evaluación de esta vía de acceso en general, los bioensayos se llevan a cabo en condiciones de temperatura y humedad relativa controladas. Adicionalmente, la mayoría de estos se realizan con 10 insectos durante 24 h, ya que un día sería el tiempo máximo ideal para que la sustancia ejerza su efecto insecticida, sin embargo, también se implementan otras metodologías para observar efectos en periodos más prolongados, hasta el fin de la mortalidad de los insectos después de la exposición a las sustancias. En los ensayos también se suelen implementar algunos solventes para facilitar la medida de concentraciones muy bajas, que no soportan el instrumento de medida, los cuales se dejan evaporar antes de entrar en contacto con los insectos. Dentro de los bioensayos fumigantes se encuentran reportados diferentes técnicas que se pueden agrupar en 4 metodologías macro como son: sin evitar contacto, vial en vial (con y sin evita contacto), grasa de nailon y PTFE.

- **Método sin evitar contacto:**

En los bioensayos que utilizan el método sin evitar contacto pueden causar otros efectos en los insectos como la muerte por penetración de cutícula o por creación de películas impermeables que tapen los espiráculos del insecto. En este método aplican dosis del compuesto volátil o AE puro o diluido en etanol, acetona o n-hexano, en tiras (1,5 x 5,0 cm²) o en discos de papel filtro (1 a 2 cm de diámetro (D)). Este papel se coloca contra la pared o en el inferior de la tapa rosca de un vial de 24 a 30 mL, que contiene 10 o 20 insectos, con o sin medio de cultivo. La mortalidad se determina a las 24 h [82,83,85–87].

▪ **Método vial en vial (con o sin evitar contacto):**

El método de vial en vial utiliza un vial más pequeño para contener la sustancia volátil, sin embargo, muchos autores no implementan alguna barrera de contacto, lo cual es una limitante al tratarse de insectos trepadores. En este método aplican dosis del compuesto volátil o AE en discos de papel filtro ($D = 1$ a 2 cm), introducidos en un vial de cristal de 1.5 a 4.0 mL; este se coloca a su vez entre un vial de mayor tamaño (15 a 30 mL) sellado con tapa rosca. La mortalidad se determina a las 24 h [28,88]. Algunos autores han modificado esta metodología colocando una tela de visillo en el vial pequeño para evitar contacto directo del insecto con la sustancia a evaluar (método de vial en vial con barrera), garantizando que el bioensayo solo evalúe la vía tóxica por inhalación [27].

▪ **Método grasa de nailon:**

Este método utiliza grasa de nailon como barrera de contacto, la cual permite que la evolución de la sustancias sea únicamente tóxica por inhalación. En la cual dosis del compuesto volátil o AE (diluido en n-hexano para bajas concentraciones) se aplican en discos de papel filtro ($D = 2$ cm), ubicados en el inferior de la tapa rosca de viales de 30 mL, ajustando una pieza de grasa de nailon a 1 cm de bajo de la tapa rosca para evitar el contacto directo del insecto con la sustancia a ensayar. La mortalidad se determina a las 24 h [12,89].

▪ **Método PTFE:**

En esta metodología se utiliza una solución de Politetrafluoruro de etileno (PTFE) como barrera de contacto, de modo que solo se evalúe una vía de acceso tóxica al insecto. En la cual aplican dosis del compuesto volátil o AE diluido en n-hexano sobre discos de papel filtro ($D = 1$ a 2 cm), ubicados en la parte inferior de la tapa rosca de un vial (24 a 30 mL). En la salida del vial aplican una solución de PTFE para evitar el contacto directo del insecto con la sustancia volátil. A las 24 h se lee el ensayo o se pasan los 10 insectos a un vial limpio o con medio de cultivo durante 7 días hasta el punto final de mortalidad [69,75,90–94].

De acuerdo con los bioensayos reportados hay varios valores que pueden ser un falso positivo del modo de acción especificado, al no tener en cuenta el uso de una barrera para evitar el contacto directo del insecto con la zona de aplicación del compuesto (bioensayo sin evitar contacto y de vial en vial). Por ende, se recomienda utilizar los bioensayos de PTFE, nailon y vial en vial con barrera. Además de condiciones como: oscuridad y una muestra de 10 insectos por réplica, ya que estas serias

las condiciones para simular a pequeña escala una infestación por insectos en un silo, coincidiendo con los parámetros utilizados en la mayoría de los bioensayos para la actividad fumigante. Además, como las investigaciones enfocadas en la actividad insecticida de metabolitos secundarios, busca encontrar las sustancias más efectivas minimizando tiempos de acción y concentraciones aplicadas, se recomienda, valorar su acción a las 24 h para facilitar la replicación de estos datos en próximos estudios, ya que muchos de estos bioensayos se evaluaron con el fin de conocer el efecto de la sustancia hasta el fin de su mortalidad (7 días).

1.5.2 Bioensayos de actividad tóxica por contacto

En general para la evaluación de la toxicidad por contacto los ensayos se efectúan en condiciones de temperatura y humedad relativa controladas, realizando entre 3 a 8 réplicas y utilizando muestras 10 insectos, en la mayoría, las técnicas aplicadas se pueden agrupar en 3 métodos distintos, los cuales incluyen a los métodos tópicos, superficie de papel filtro y con medio de cultivo.

- **Método tópico:**

Los bioensayos que utilizan el método tópico para evaluar la toxicidad por contacto de los metabolitos volátiles precisan la vía de contacto, como la principal causa de muerte del insecto. En el cual aplican dosis de hasta 0.5 μ L/adulto del compuesto volátil o AE, puros o diluidos habitualmente en n-hexano (ocasionalmente en etanol o acetona), sobre el tórax dorsal de los insectos, transferidos a viales de vidrio con medio de cultivo (excepcionalmente sin medio). La mortalidad se determina a las 24 h o a los 7 días (punto final de mortalidad) [69,80–83,87,91–94].

- **Método de superficie con papel filtro:**

El método de superficie con papel filtro no garantiza la aplicación de una dosis específica sobre cada insecto y permite que los metabolitos volátiles causen otros efectos de comportamiento como la repelencia. En este método adicionan dosis del compuesto volátil o AE disuelto en acetona sobre discos de papel filtro Whatman (D = 7 o 9 cm), ubicados en una placa Petri (D = 9 o 10 cm), colocando 20 insectos. La mortalidad se determina a las 24 h y en varios casos después de este tiempo se transfiere a recipientes con medio de cultivo durante 6 días (N° días sin variación en la mortalidad). En algunos ensayos se utiliza tela de nailon en la parte superior para evitar la huida de los insectos [77–79,85].

▪ **Método con medio de cultivo:**

El método con medio de cultivo no garantiza la aplicación de una dosis específica sobre cada insecto y pueden intervenir otras causas de muerte como la ingestión e interferir otros factores en el bioensayo como la porosidad del tipo de grano utilizado. Por estas razones, es un método más recomendado para bioensayos simulados en el cual se evalúen sustancias que ya reporten toxicidad sobre la plaga. En este método se mezclan dosis del compuesto volátil o el AE diluido en 3 mL de acetona con 100g de maíz, el cual se deja 15 min en campana. Posteriormente se agregan 20 g de maíz en viales de 40 mL junto con los insectos. La mortalidad se determina a las 24 h [84,95].

Teniendo en cuenta los bioensayos efectuados para la actividad por contacto se resalta el método tópico, como el proceso más acertado para atribuir la muerte del insecto mediante esta vía. Debido a que en la metodología de papel filtro, no se garantiza el contacto de todos los insectos con la misma cantidad de sustancia y así mismo un efecto repelente también podría estar involucrado, más al tratarse de organismos trepadores. Las metodologías que emplean medio de cultivo con papel filtro o la aplicación en el mismo medio, resultan ser más acertadas para bioensayos simulados, en vista que incluyen muchos factores, como el hecho de que el grano absorba el compuesto o que la muerte del insecto no sea provocada por contacto sino por ingestión. De igual forma se recomienda utilizar 10 insectos por replica para facilitar el ensayo durante 24 h, a fin de determinar los compuestos más activos y efectivos para próximos estudios, aunque los datos registrados a mayor tiempo son un gran aporte de los efectos a largo plazo, teniendo en cuenta que los AEs tienden a ser biodegradables.

A la hora de llevar estos estudios a escalas más grandes, con un manejo óptimo de la plaga en un silo, se encuentran algunas complicaciones desde las investigaciones base, como es el hecho de que estas se enfocan principalmente a una sola etapa del ciclo de vida. Puesto que se ha identificado una mayor susceptibilidad en las etapas activas (adulto y larva) durante la fumigación, en comparación con las sedentarias (huevos y pupas), atribuido a las frecuencias respiratorias, siendo un enfoque de interés para estudios posteriores. Una de las peculiaridades que también sobre salen en los reportes de bioactividad, relacionada con la diversidad de los bioensayos, es que las dosis y concentraciones aplicadas suelen reportarse en una amplia variedad de unidades de medida, lo cual dificulta la comparación de los datos. En la actividad fumigante se encontraron unidades de $\mu\text{L/L}$, $\mu\text{L/cm}^3$, mg/L , mg/mL y mg/cm^2 , por consiguiente, se recomienda ser normalmente expresado en la cantidad

adicionada en mg por volumen de espacio (L) para AEs (mezclas) y en unidades de molaridad, (μM), para compuestos puros. En la actividad por contacto se reportan unidades de μg , μL , mg/adulto , $\mu\text{g/adulto}$, $\mu\text{g/g}$, mg/cm^2 , sin embargo, se sugiere reportar los datos como dosis aplicada (μg , mg) por individuo o por g de insecto. Las unidades sugeridas, facilitarían la réplica de los datos reportados y sus futuras aplicaciones como principios activos en la elaboración de productos fitosanitarios [96,97].

Aunque los insectos presentan diferentes blancos moleculares que pueden llevar a su muerte tal como se exhibe en la figura 1.3, uno de los mecanismos de acción más estudiados, son receptores del sistema nervioso y enzimas. No obstante, es mínimo lo que se conoce del mecanismo de acción de los AEs y sus componentes frente a *S. zeamais*. Dentro de lo poco que se conoce del efecto de estas sustancias sobre los receptores de los insectos se destaca el efecto de monoterpenoides de tipo fenol, como timol y carvacrol, que pueden actuar como moduladores alostéricos positivos de receptores GABA, y del eugenol y *R*-pulegona que causan un efecto activante sobre la octopamina [22,97,98].

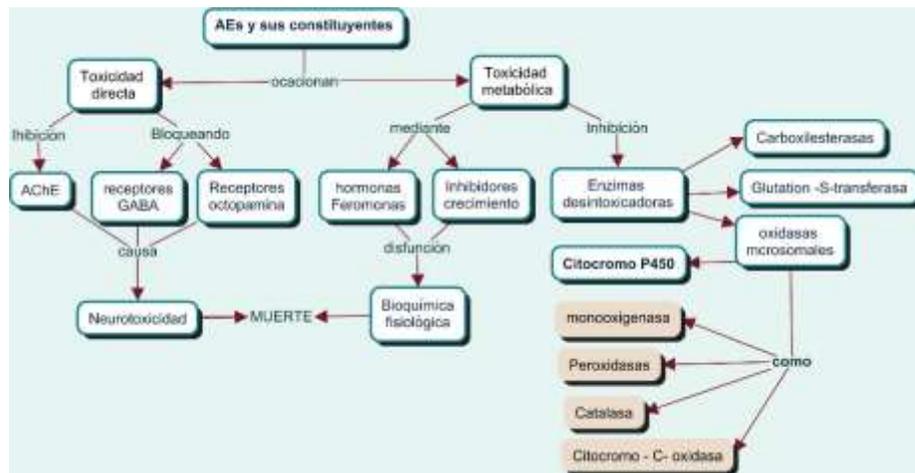


Figura 1.3: Mecanismos propuestos de toxicidad inducida por aceites esenciales y sus constituyentes sobre insectos, imagen modificada [25,34]

1.5.3 Bioensayos enzimáticos.

Las investigaciones acerca de la acción de insecticida de sustancias provenientes de planta se han enfocado, principalmente, en la evaluación enzimática, ya que al ser inhibidas pueden ocasionar la muerte de los insectos por problemas de locomoción y/o toxicidad celular. Debido a que el efecto

insecticida pueden estar directamente relacionado con la alteración del sitio blanco (acetilcolinesterasa, canales de sodio y receptores GABA) o con la acción metabólica, al inhibir o activar un sistema de detoxificación (oxidasas, peroxidasas y glutatión-S-transferasas) [47,99,100]. Por consiguiente, la determinación de la actividad catalítica de las enzimas desintoxicantes en insectos se estudia mediante procesos *in-vivo* e *in-vitro*, para comprender el mecanismo de acción o el proceso de desintoxicación de los xenobióticos [97,100–102].

▪ **Enzimas desintoxicantes**

Glutatión-S-transferasa (GST) - EC: 2.5.1.18

Pertenece a una familia multigénica de proteínas diméricas multifuncionales, se clasifican en microsomal o citosólica de acuerdo con su ubicación en la célula. Las cuales desempeñan un papel central en la desintoxicación de xenobióticos y compuestos endógenos como carbonilos insaturados, aldehídos, epóxidos e hidroperóxidos, producidos *in-vivo* por ruptura de macromoléculas, durante el período de estrés oxidativo, al destruir el equilibrio redox. Estas enzimas pueden metabolizar los insecticidas, al facilitar la deshidrocloración reductiva o mediante reacciones de conjugación con glutatión reducido (GSH). Esta conjugación se hace hacia los centros electrofílicos de compuestos lipofílicos, como las piretrinas, produciendo metabolitos solubles en agua que se excretan más fácilmente. Por consiguiente, también contribuyen a la eliminación de las especies tóxicas de radicales libres de oxígeno producidas por la acción de los plaguicidas [46,101,103].

Para determinar la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa se suele utilizar el método empleado por Habig, monitoreando espectrofotométricamente la conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) con glutatión reducido (GSH). Los cuales forman el conjugado 2,4-dinitrofenil-S-conjugado, como se observa en la figura 1.4, el cual tiene una longitud de onda de absorbancia máxima a 340 nm entre 25 a 30°C y un coeficiente de extinción es de 9.6 mM cm⁻¹ [104–106].

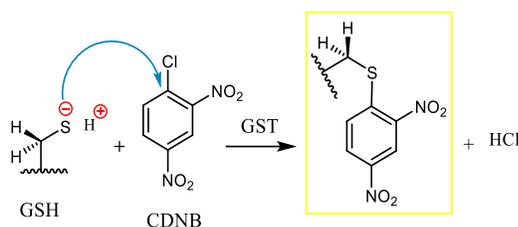


Figura 1.4: Reacción de conjugación de la actividad de Glutación-S-transferasa

Los estudios de compuestos volátiles sobre esta clase de enzimas son bastante escasos, puesto que sus primeros reportes se rastrean hasta después del 2008, como es el caso del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, el cual ocasiona una disminución en la actividad de las glutación-S-transferasas en *Sitophilus oryzae*. Además, los pocos reportes que se encuentran se enfocan en estudios genéticos que permiten establecer si los AEs y sus componentes pueden estar desintoxicándose mediante este mecanismo. Por tanto hasta la fecha se relacionan solo dos reportes, uno del AE de *Melaleuca alternifolia* y otro de los compuestos terpinen-4-ol y α -terpineol como sustancias inhibitorias de este sistema de estrés oxidativo, expresada en algunas partes de la codificación genética de la glutación-S-transferasa del insecto [104,107].

Oxido-reductasas

Son enzimas desintoxicantes no específicas que participan en la defensa antioxidante y catalizan las reacciones de oxidación-reducción, que tienen lugar a través de la transferencia de electrones o de átomos de hidrógeno u oxígeno de un dador (reductor) a un aceptor (oxidante). Los metabolitos polares producidos por este mecanismo como las hidroxilaciones de carbonos, nitrógeno y oxígeno y las desalquilaciones, resultan en productos desintoxicados, mientras que las epoxidaciones y desulfuraciones (órgano-tiofosforados), siempre producen metabolitos más tóxicos. A los insecticidas sintéticos como carbamatos, fosforados y al DDT, se les atribuye desarrollo de resistencia mediante este mecanismo de acción, al presentar mayor actividad oxidativa. Dentro de este sistema oxido-reductor participan varias enzimas de importancia en los insectos como son catalasa, peroxidasa, dehidrogenasa y las citocromo c-oxidasas [42,46,108].

Catalasa (CAT) – EC:1.11.1.6

Hace parte del grupo de las esterasas, una enzima primordial en el mecanismo de acción del sistema de defensa antioxidante, donde una de sus funciones principales, es la desintoxicación de xenobióticos. Es una enzima tetrámera que tiene en su estructura un grupo hemo, por lo cual pertenece a las enzimas ferroporfirínicas. Esta proteína tiene una doble función, en primer lugar, cataliza la eliminación de peróxido de hidrógeno, subproducto del transporte de electrones mitocondrial en la actividad de oxidasas, como la β -oxidación de ácidos grasos y la fotorrespiración (ecuación 1.2). En segundo lugar, participa en la oxidación con donores de hidrógeno (metanol, etanol, ácido fórmico, etc.) como se observa en la ecuación 1.3 [42,46,47].

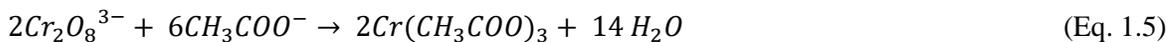
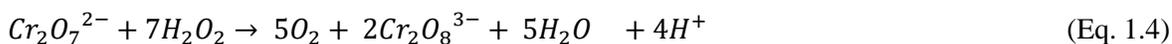


Reacción de eliminación de peróxido de Hidrógeno por medio de la catalasa



Reacción de donores de hidrógeno metabolizada por catalasa

Se conocen varios métodos para medir la actividad catalítica de CAT y su inhibición, utilizando una mezcla de reacción a 25 °C de buffer fosfato, enzima y H_2O_2 (1% – 2%). Una técnica es la medida del cambio de extinción a 240 nm y/o disminución de la absorbancia durante 1 a 2 min, o a través de medidas indirectas mediante ensayos de fluorescencia [109–112]. Otra opción es cuantificar el peróxido de hidrogeno transformado por la catalasa, mediante el método de Sinha, siguiendo las ecuaciones 1.4 y 1.5, método en el cual se determina la cantidad de peróxido no transformado, al utilizar una solución de dicromato de potasio en ácido acético (42.5 mM) como baño de parada de la actividad enzimática. Se forma un precipitado inestable azul (ácido percrómico), que al calentar a 100°C, produce acetato crómico de color verde, el cual es directamente proporcional a los μmol de H_2O_2 remanentes, que se lee a una λ 570 nm [113,114]. También se utilizan ensayos sencillos que permiten medir la actividad enzimática, con buffer fosfato (0,05M), H_2O_2 y Triton X-100 en tubos de ensayo. Mediante interpolación en una curva de calibración, construida con la altura de las burbujas de oxígeno generadas por la enzima atrapada en Triton X-100, las cuales se visualizan como espuma [115].



Reacción para medida la actividad enzimática de la catalasa mediante $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Acerca del efecto de componentes de AEs sobre plagas de productos almacenados, los estudios publicados se enfocan, principalmente, en la evaluación *in-vivo*, para determinar si dichos compuestos están inhibiendo o siendo desintoxicados mediante este mecanismo. En la literatura se hallan escasos reportes, de efectos de disminución de la actividad catalítica, como es el caso de mentona sobre la CAT en *T. castaneum* y *S. oryzae*. En contraste también se encuentran algunas publicaciones científicas que favorecen la actividad de la CAT en insectos, como es el caso de anetol, timol y pineno. Sin embargo, no se rastrearón registros acerca de la acción inhibitoria de los constituyentes de AEs, sobre la CAT en *S. zeamais* [97,116].

▪ Enzimas de función motora

Acetilcolinesterasa (AChE) - EC3.1.1.7

Es una proteína que puede hidrolizar el éster acetilcolina (ACh) produciendo colina y acetato, una enzima de función motora con un papel importante como mensajero en las funciones nerviosas, ya que a niveles muy bajos pueden aparecer problemas por sobreestimulación de la sinapsis colinérgica, llegando hasta la muerte del insecto. La AChE es el sitio activo para 90 productos insecticidas organofosforados y 30 carbamatos, los cuales evitan la hidrólisis de la ACh por fosforilación o carbamilación del residuo de serina (activa el grupo OH^-) que se localiza en el subsitio esteárico de su centro activo [15,117].

El método analítico más empleado para determinar la actividad catalítica de AChE y su inhibición, es de detención colorimétrica, basado en la reacción de Ellman. El cual emplea el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB, también llamado Reactivo de Ellman) utilizando como sustrato el yoduro de acetiltiocolina (AThChI). La hidrólisis de AThChI libera tiocolina, una molécula con un grupo $-\text{SH}$ libre capaz de reaccionar con el DTNB para dar un producto de sustitución y el 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB-2) de color amarillo con un pico de absorbancia a 37 °C de 412 nm (figura 1.5)

[117,118]. También se han desarrollado otros métodos que emplean esta reacción in vitro en combinación con técnicas de cromatografía en capa delgada (CCD) reveladas por autografía y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (CL-EM), para acetilcolina tetradeuterada. Sin embargo, estos métodos aún presentan inconvenientes, como falsos positivos [119].

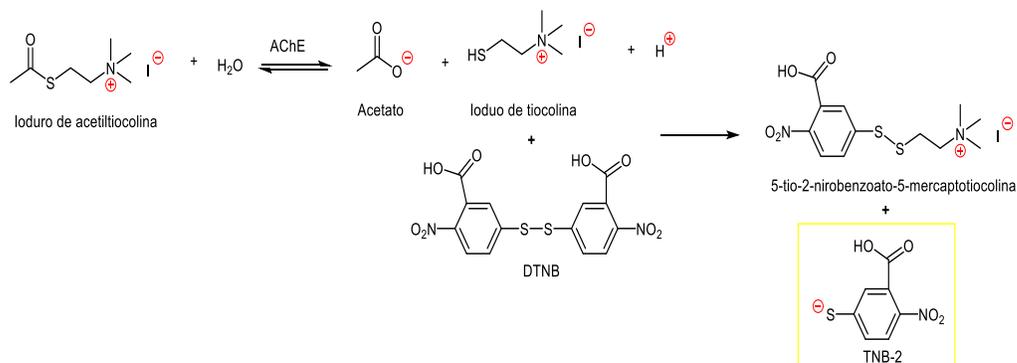


Figura 1.5: Reacción de medida de la actividad de acetilcolinesterasa

La AChE podría considerarse un blanco selectivo, ya que presenta un residuo de cisteína específico para insectos, siendo uno de los mecanismos de acción más evaluados en el efecto insecticida de AEs y algunos de sus constituyentes. El cual reporta diferentes estudios que han permitido establecer algunos acercamientos al mecanismo de acción de los metabolitos volátiles en insectos. Por ejemplo, algunos autores han establecido que dos monoterpenoides pueden unirse a una molécula de AChE a la vez y muchas veces la unión del primer compuesto favorece la unión del segundo, indicando que este tipo de sustancias pueden encontrar diversos sitios de unión con la enzima [25,34]. Adicionalmente, se registran algunos informes que indican a los monoterpenoides como causa de mortalidad, al inhibir la actividad de AChE en insectos.

Sin embargo, la mayor parte de los estudios hacen referencia al efecto causado sobre otras especies del género *Sitophilus*. En este caso diferentes publicaciones reportan la acción inhibitoria de algunos compuestos sobre su AChE a 0.05 M sobre *S. oryzae* (geraniol, (-) carvona y (-) fenchona). Encontrando que la mayor parte de los reportes datan el efecto inhibitorio en términos de la constante de disociación de inhibición de la AChE (KI: mM), para carvacrol (0.05 mM), 1,8 cineol (0.084), cimeno (0.05), eugenol (0.096), isoeugenol (0.11), isosafrol (0.71), limoneno (0.73), metil eugenol (0.051), mentol (0.048), mentona (0.39), α -pineno (0.44), β -pineno (0.0028), α -terpineol (3.94) y

timol (0.57). Incluso, se encontraron algunas publicaciones de CI_{50} (mM) de la enzima de este insecto a causa de (-) citronelal (18.4) *trans*-cinamaldehído (18.93), α -terpineno (73.68), terpinen-4-ol (54.81) y (-) mentona (26.78) [25,120,121]. Los datos reportados podrían ser una guía en el estudio del posible efecto neurotóxico de los metabolitos volátiles sobre *S. zeamais*, ya que solo se registra un del efecto de monoterpenoides de tipo cetona (etanol absoluto) y reporta las CI_{50} (mM) de *R*-carvona (1.459), *S*-carvona (2.183), dihidrocarvona (2.218), pulegona (0.839), alcanfor (0.434), piperitona (0.448) y mentona (0.516) sobre la AChE en *S. zeamais* [74].

El estudio del efecto causado sobre estos blancos moleculares es importante para llegar conocer el mecanismo de acción, por el cual están atacando las sustancias químicas al insecto y así mismo evitar la generación de resistencia [122]. Resistencia que según Miller (1998) retomado por *Rodríguez* [46], *Badii* [47] y *Bisset* [42], se puede diversificar en 4 categorías, como son comportamiento, de penetración y bioquímicamente, por alteración del sitio blanco o por acción metabólica, tal como se observa en la figura 1.6. Generalmente la aparición de resistencia se puede presentar por el uso indiscriminado de un solo compuesto que involucre un único blanco de acción, como es el caso de la resistencia que ha desarrollado *S. zeamais* frente a los controles químicos DDT, cipermetrina, diclorvos y fosfina. Por esta razón, el uso de AEs es una buena alternativa de control, al ser mezclas de metabolitos secundarios volátiles que han presentado muy buenos resultados en cepas de insectos resistentes a la fosfina, como es el caso de 1,8-cineol (*Eucalyptus sp*, fumigante), al no evidenciar alguna resistencia cruzada [22,97,98]. No obstante, recordemos que estas mezclas son complejas y su composición puede depender de muchos factores, por lo cual la elaboración de mezclas insecticidas es una línea de investigación cada vez más estructurada, acogida de la farmacología. La elaboración de mezclas se enfoca en disminuir la posible aparición de resistencia y las dosis implementadas, al utilizar combinaciones de compuestos, que puedan actuar por distintos mecanismos de acción, que afecten al insecto por diferentes vías de acceso o en diferentes estadios del ciclo de vida [15,96].

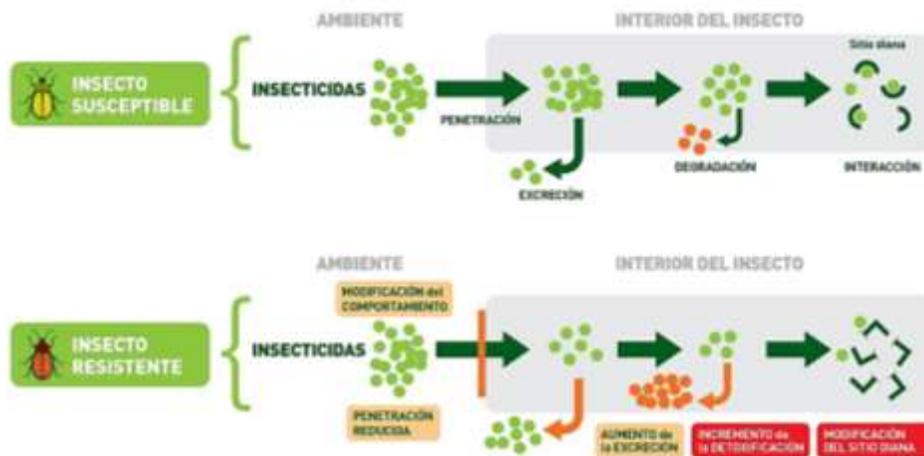


Figura 1.6: Cambios fisiológicos y de comportamiento asociados con la resistencia a insecticidas [123]

1.6 Diseños de mezclas de sustancias insecticidas

Una mezcla 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 [124]. Por lo tanto, el diseño de mezclas de productos insecticidas se enfoca en complementar el rango de actividad de componentes individuales, para controlar una gama de especies tan amplia como sea posible o para brindar niveles de control más altos y/o más consistentes contra la misma especie. Este último caso podría ser a través de efectos complementarios con dos o más sustancias, dirigidas a diferentes etapas de vida de la misma plaga, o mediante efectos sinérgicos, preferiblemente con diferentes vías de acceso insecticida, para dar un manejo apropiado a la resistencia. En este sentido, el diseño de mezclas con efecto sinérgico insecticida, busca inhibir la desintoxicación metabólica, inhibir diferentes dianas moleculares o aumentar la penetración del insecticida, mediante absorción en la cutícula, en el sistema respiratorio y/o digestivo [38,96].

Dentro de la revisión bibliográfica acerca de mezclas de constituyentes de AEs, solo se registran 2 reportes sobre *S. zeamais*, evaluando la actividad tóxica por contacto mediante el método de superficie con papel filtro. Uno de estos reportes refiere a las especies *Xylopiya aethiopica* y *Vernonia amigdalina*, a partir de las cuales se elaboraron mezclas de sus constituyentes mayoritarios (1,8 cineol + β -Pino + Mirtenal + linalool + α - pino + L-carveol). En las cuales se mantuvo la

proporción en que se encontraban en el AE, a la dosis mínima equivalente en la que los aceites presentaron el 100% de mortalidad. En general la mezcla mostró una efectividad del 100% incluso cuando no se adicionó en ensayos distintos, mirtenal, linalool y α - pineno. Del estudio, los autores resaltan el efecto sinérgico de β -Pineno, ya que al estar ausente en la mezcla solo se presentó una mortalidad del 42% y al evaluarse solo, acabó con el 37% de la población [77].

En el trabajo de Bekele & Hassanali, se utilizó la misma técnica de mezcla y bioensayo, con los componentes mayoritarios (alcanfor + limoneno + 4-terpineol + 1,8-cineol + camfeno + t-cariofileno) de los AEs de *Ocimum kilimandscharicum* y la *O. kenyense* (Labiatae), pero se evaluaron mezclas de 5, 4, 3 y 2 componentes. En la mezcla de todos los compuestos mayoritarios se evidenció el 100% de mortalidad, incluso cuando no se combinó a *trans*-cariofileno y canfeno en ensayos distintos. No obstante, al excluir de la mezcla al alcanfor, la mortalidad disminuyó considerablemente (22%) y en su evaluación individual presentó una mortalidad del 70%. Aun así, al combinar alcanfor con limoneno (23%) o con 1,8 cineol (47%), la actividad disminuyó de forma significativa. De lo anterior los autores que la acción tóxica por contacto se debe principalmente a la presencia del alcanfor, aunque para obtener una mortalidad del 100% necesita estar acompañado de otros componentes como secuela de sinergia o adición, incluso se afirmó que al mezclar alcanfor con 1,8 cineol se evidenció un efecto antagónico [78].

1.6.1 Modelos de mezclas

El estudio de los efectos sinérgicos es un campo fuerte en la combinación de fármacos que se ha ido aplicando a la agroindustria [96,125]. En estos estudios existen 3 clases de interacción: aditiva, si la respuesta de una combinación es justo lo que se esperaba de la relación dosis-respuesta de la mezcla; sinérgica, si la respuesta es mayor a la esperada y antagónica, si la respuesta es menor a la esperada [126]. Sin embargo, la definición de sinergismo todavía está en debate, ya que depende de un modelo de interacción cero o aditivo, para ser usado como referencia, en el cual se han enumerado hasta 13 enfoques y modelos. Aun así, históricamente se han usado 3 modelos principales de interacción cero, independencia de Bliss, aditividad de Loewe y el método de efecto mediano de la ley de acción de masas [125,127]. A pesar de que los 3 modelos son consistentes con el isoblograma clásico y su ecuación (índice de interacción de Berenbaum), este último es el más reciente y llamativo, ya que aunque el modelo de aditividad de Loewe es de referencia universal, el de acción de masas permite

la elaboración y linealización de curvas dosis-efecto con un mínimo de 2 puntos de concentración [33,126].

Después de escoger el modelo de interacción cero, se debe tener en cuenta que existen varios métodos para evaluar la interacción de componentes activos en una combinación, como son matriz diagonal, isobolas, superficie isobolar (combinación de tres compuestos), índice de interacción y superficie de respuesta. El análisis isobolográfico y el método del índice de interacción no son de aplicación universal y dependen del nivel de letalidad o efecto, una isobola o línea de aditividad se relaciona con un efecto único, y un índice de interacción solo con un par de dosis únicas. Para representar el conjunto completo de niveles de letalidad (desde DL_1 hasta DL_{99}), se pueden construir todas las isobolas en tres dimensiones, creando así una superficie de respuesta. La cual ilustra el efecto de la mezcla (eje Z) frente a las dosis de los componentes (x, y) y presenta una interacción completa en todos los pares de dosis [127]. Durante la última década, los estudios de interacción se han evaluado cada vez más sobre la base de un modelo de superficie de respuesta, una de las razones es la declaración de Berenbaum, quien asegura que las isobolas no son consistentes sobre combinaciones no probadas [31,125,127]. Por tanto, los enfoques para elegir un modelo de evaluación de interacción de componentes activos, son empíricos o funcionales y aún no está claro, si un modelo elegido es el mejor para aproximar la información de los datos, lo cual dependerá del criterio del investigador [127].

▪ **Modelo superficie de respuesta**

Esta metodología ya se ha utilizado para el desarrollo de fito-formulaciones de AEs con alta actividad acaricida y en la determinación de efectos de proporcionalidad de especies vegetales en plantaciones de conservación, sobre la aparición de artrópodos depredadores [32,128]. El MSR permite la predicción de proporcionalidad óptima con un mínimo de datos experimentales, fundamentado en el ajuste de ecuaciones matemáticas. Las cuales modelan la superficie de respuesta en todo el espacio del factor simplex, al cual se le debe probar la adecuación del modelo seleccionado, para asegurar que sea una buena herramienta de predicción. Aunque el modelo más recomendado es el cuadrático, se deben probar también el modelo lineal y cubico que se muestran en las ecuaciones 1.6, 1.7 y 1.8 seleccionando aquel que presente mejor coeficiente de ajuste (r), donde y es la respuesta predicha, b_i, b_{ij}, b_{ijk} son los coeficientes de regresión de la función y x_i es el compuesto individual [31,32].

Lineal $y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3$ (Eq. 1.6)

Cuadrático $y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3$ (Eq. 1.7)

Especial cubico $y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 + b_{123} * x_1 * x_2 * x_3$ (Eq 1.8)

La distribución uniformemente espaciada de puntos en un simplex (q), se conoce como lattice (m), donde q indica el número de componentes en la mezcla, siendo $q = 3$ correspondiente a un espacio factorial de un triángulo equilátero y de $q = 4$ a un tetraedro. Uno de los sistemas más sencillos es el diseño simplex-lattice $\{q, m\}$, con un espacio factorial de 3 componentes y un modelo de segundo grado, cuyas coordenadas se definen mediante las siguientes combinaciones: $x_i = 0, \frac{1}{m}, \frac{2}{m}, \dots, 1$. Es decir, la lista de las combinaciones para el modelo $\{3,2\}$ consiste en seis puntos en el límite del triángulo, donde los vértices corresponden a compuestos puros y los puntos medios en los bordes indican combinaciones binarias (figura 1.7). Para este modelo los valores positivos, del coeficiente de relación entre un término y la variable respuesta, indican sinergismo y los valores negativos, antagonismo [31,32].

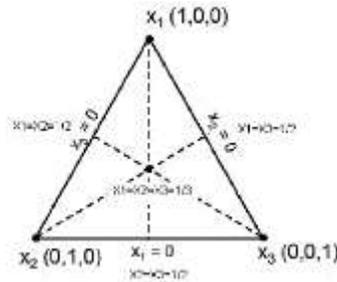


Figura 1.7: Diseño Simplex-lattice $\{3,2\}$

- **Modelo del efecto mediano de la ley de acción de masas**

El índice de combinación fusiona el principio fisicoquímico de la ley de acción de masas con el principio matemático de inducción y deducción, derivando la teoría general de dosis – efecto, con la teoría unificada de cuatro ecuaciones básicas en las ciencias biomédicas promovidas por Henderson-Hasselbalch, Michaelis-Menten, Hill y Scatchard. Además, de derivar no solo el teorema del índice de combinación (IC), sino también la ecuación del isoblograma y del índice de reducción de dosis (IRD). El modelo del efecto mediano de la ley de acción de masas puede utilizarse tanto para predecir

el efecto sinérgico con proporciones constantes y variables, como para verificar el sinergismo entre los componentes de una combinación dada [129].

El objetivo del índice de combinación es cuantificar el efecto de la mezcla de los compuestos y obtener un resultado que muestre la sinergia entre sus componentes. 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 individual [130]. El IC simula computacionalmente los efectos específicos de los componentes de la mezcla (sinergismo, aditividad y antagonismo), mediante la ecuación 1.9

$$IC = \frac{(D)_i}{(D_x)_i} + \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \frac{(D)_i}{CL_{50_i}[(f_{ax})_i/(1-(f_{ax})_i)]^{1/m_i}} + \frac{(D)_j}{CL_{50_j}[(f_{ax})_j/(1-(f_{ax})_j)]^{1/m_j}} + \dots \quad (\text{Eq. 1.9})$$

Donde, D_i es la concentración o dosis del compuesto i , D_j es la concentración o dosis del compuesto j , $(D_x)_i$ es para D_i “sola” que inhibe un $x\%$ del sistema, f_{ax} es la toxicidad fraccional a $x\%$ de mortalidad y m es el coeficiente de la sigmoidicidad de la curva dosis- respuesta [33]. Señalando que un componente posee efecto sinérgico sobre la actividad observada (fumigante o contacto) $f(x)$, si la dependencia del componente químico con respecto a la actividad demuestra super-aditividad, como se exhibe en la siguiente la ecuación 1.10

$$f(x_1 + x_2) \geq f(x_1) + f(x_2) \quad (\text{Eq. 1.10})$$

Chou [33], describe la interacción de los componentes de una mezcla con rangos de IC, tal como se expone en la tabla 1.1, cuya representación gráfica supera las limitaciones de los isobogramas, que solo puede aplicarse para mezclas binarias, al permitir representar la interacción en la combinación de 3 o más compuestos.

Tabla 1.1: Descripción y símbolos de sinergismo o antagonismo en estudios de combinación de compuestos activos con base en el método de índice de combinación [33]

Rango de índice de combinación (IC)	Descripción	Símbolos calificativos
< 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	sinergismo leve	+
0.90 - 1.10	casi aditivo	±
1.10 - 1.20	antagonismo leve	-
1.20 - 1.45	antagonismo moderado	--
1.45 - 3.30	antagonismo	---
3.30 - 10.0	antagonismo fuerte	----
> 10.0	antagonismo muy fuerte	-----

El IRD mide cuantas veces se puede reducir la dosis de cada compuesto en una interacción sinérgica a un efecto dado, en comparación con las dosis de cada uno de los componentes. Este índice también es beneficioso para efectos aditivos y antagónicos, donde el valor del IRD para cada compuesto está dado por las ecuaciones 1.11 y 1.12. Las cuales indican, reducción de dosis favorable para $IRD > 1$, la no reducción de dosis para $IRD = 1$ y reducción desfavorable de dosis para $IRD < 1$.

$$IC = \frac{(D)_i}{(IRD)_i} + \frac{(D)_j}{(IRD)_j} \dots \quad (\text{Eq. 1.11})$$

$$(IRD)_i = \frac{CL_{50i} [(f_{ax})_i / (1 - (f_{ax})_i)]^{1/m_i}}{(D)_i} \quad (\text{Eq. 1.12})$$

Dentro de la revisión del efecto sinérgico y/o antagónico con constituyentes de AEs contra *S. zeamais*, también se encontró un estudio de actividad fumigante en el que combinan diferentes cetonas monoterpénicas (*R*-(+)-pulegona, timo-quinona, *R*-carvona, *S*-carvona y dihidrocarvona), con butóxido de piperonilo (BOP), implementando el índice de combinación del modelo de efecto mediano de la ley de acción de masas, el cual indicó efectos antagónicos en todos los casos. Sus resultados sugieren que el BOP está inhibiendo la biotransformación de la pulegona en un derivado más tóxico, el mentofurano, al igual que en las otras cetonas a timol, carveol y dihidrocarveol. Este fenómeno fue determinado por un análisis de los compuestos volátiles formados como resultado del metabolismo del insecto, mediado por la enzima citocromo-P450 [12,33]. No obstante, también se

34 Estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora para *Sitophilus zeamais*

registran reportes del efecto sinérgico del BOP con mentopreno en la inhibición del crecimiento contra cepas resistentes de *S. zeamais* [38].

2. Metodología

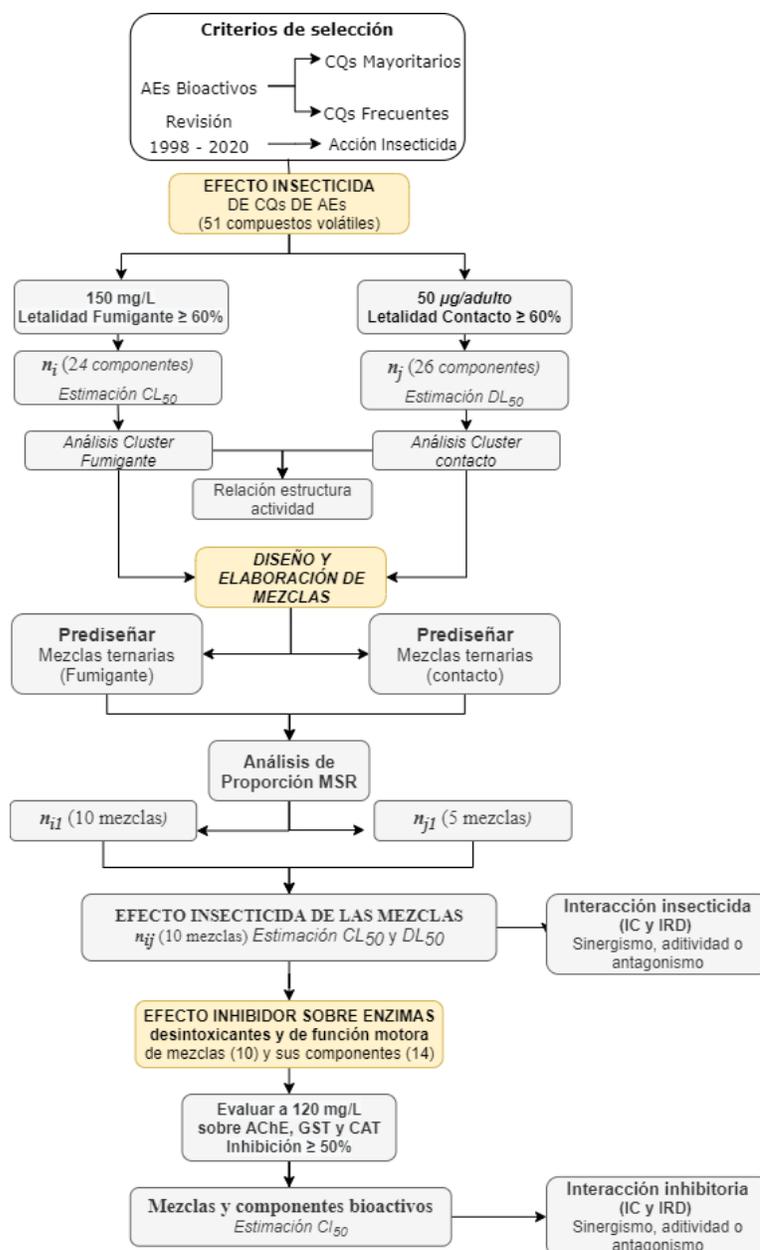


Figura 2.1 Diagrama metodológico del estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en AEs y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en *S. zeamais*

2.1 Toxicidad fumigante y por contacto sobre *S. zeamais* de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales bioactivos.

2.1.1 Selección y obtención de constituyentes químicos volátiles

A partir de los trabajos realizados previamente por el equipo de investigación y de una revisión bibliográfica previa (anexo A), se seleccionaron los compuestos objeto de estudio. Se tuvieron en cuenta cuatro criterios para seleccionar los compuestos volátiles, los cuales se describen a continuación:

1. Componentes mayoritarios ($\geq 4.0\%$) presentes en los AEs previamente caracterizados por el equipo de investigación (anexo A.1). Este criterio condujo a seleccionar 27 compuestos.
2. Constituyentes presentes en más de un AE bioactivo, sin importar si se encontraban en bajas concentraciones, seleccionado de esta forma 7 compuestos.
3. Componentes minoritarios en al menos un AE activo (fumigante y/o tóxico por contacto), que no presentan reportes previos de acción insecticida frente a *S. zeamais*, a excepción de *R*-(-)-terpinen-4-ol, que también reporta efectos genéticos en la inhibición de GST. La información se obtuvo a partir de la revisión descriptiva, consignada en el anexo A.2, por tanto, con este criterio se incluyeron 6 compuestos.
4. Compuestos que exhiben alguna relación estructural con los componentes escogidos. En este sentido, aprovechando la revisión descriptiva y que los componentes reportados con mayor potencial fumigante contienen la función orgánica cetona y que los de mayor potencial tóxico por contacto corresponden a fenilpropanoides, se incluyeron otros 10 compuestos.

Con los cuatro criterios descritos se seleccionaron 49 compuestos volátiles. No obstante, debido a que se pudo acceder a los enantiómeros *R* y *S* de pulegona y carvona por separado, la muestra inicial de estudio estuvo constituida por 51 compuestos. En la tabla 2.1 se presentan los nombres de los compuestos seleccionados, así como los datos relacionados con pureza y fuente de obtención. En la tabla se describe que 48 de los 51 componentes se obtuvieron de casas comerciales, mientras que los cuatro compuestos restantes fueron aislados de AEs o sintetizados a partir de precursores comerciales. En este caso los compuestos estragol y piperitona fueron aislados a partir de los AEs de las especies *Piper aduncum* y *Artemisia dracunculus*, respectivamente. Los compuestos 2*S*,5*R*-

isopulegona y *R*-pulegona fueron sintetizados a partir del *1R,2S,5R*-isopulegol. En el anexo B, se resume el proceso de aislamiento y síntesis de los compuestos, junto con sus respectivos espectros de identificación.

Tabla 2.1: Constituyentes químicos volátiles seleccionados

Cod	Criterio selección	Compuesto	Pureza (%)	Adquisición	Cod	Criterio selección	Compuesto	Pureza (%)	Adquisición
1	1	α -Pinoeno	97.0	Merck ©	38	1	Piperitona	96.0	Aislamiento
2	1	β -Pinoeno	98.0	Merck ©	39	3	2 <i>S,5R</i> -Isopulegona	97.0	Síntesis
3	1	Sabineno	75.0	Sigma Aldrich ©	41	4	α,β -Tujona (70:10)	79.9	Sigma Aldrich ©
5	1	δ -3-Careno	90.0	Sigma Aldrich ©	44	1	Acetato de geranilo	97.0	Sigma Aldrich ©
6	2	α -Terpineno	90.0	Sigma Aldrich ©	45	4	Acetato de linalilo	98.0	Sigma Aldrich ©
7	1	<i>R</i> -(-)- α -Felandreno	95.0	Sigma Aldrich ©	46	3	Acetato de L-mentilo	98.0	Sigma Aldrich ©
8	1	DL-Limoneno (1:1)	95.0	Merck ©	47	1	Acetato de terpinilo	96.0	Sigma Aldrich ©
9	1	γ -Terpineno	97.0	Sigma Aldrich ©	50	1	β -Cariofileno	80.0	Sigma Aldrich ©
10	1	Terpinoleno	85.0	Sigma Aldrich ©	52	2	Farneseno	97.0	Sigma Aldrich ©
14	1	p-Cimeno	90.0	Merck ©	53	4	Nerolidol	98.0	Merck ©
16	1	Timol	99.5	Sigma Aldrich ©	54	2	Farnesol	97.0	Merck ©
17	1	Carvacrol	98.0	Sigma Aldrich ©	55	2	Safrol	97.0	Sigma Aldrich ©
18	1	Linalool	97.0	Merck ©	56	2	Eugenol	99.0	Sigma Aldrich ©
19	1	α -Terpineol	96.0	Alpha Aesar ©	57	2	Metil eugenol	90.0	Merck ©
20	3*	<i>R</i> -(-)-Terpinen-4-ol	95.0	Sigma Aldrich ©	58	4	Isoeugenol	98.0	Merck ©
21	4	Geraniol	97.0	Alpha Aesar ©	59	3	Metil isoeugenol	98.0	Sigma Aldrich ©
28	4	<i>1R,2S,5R</i> -Isopulegol	98.0	Sigma Aldrich ©	60	1	Estragol	95.0	Aislamiento
29	1	1,8-Cineol	99.0	Sigma Aldrich ©	61	1	trans-Anetol	98.0	Merck ©
32	1	Citronelal	93.5	Merck ©	67	4	2-Nonanona	99.0	Sigma Aldrich ©
33	1	Citral	95.0	Sigma Aldrich ©	68	4	2-Decanona	98.0	Sigma Aldrich ©
34	1	<i>1R</i> -(-)-Fenchona	98.0	Sigma Aldrich ©	69	2	2-Undecanona	98.0	Alpha Aesar ©
35	1	Alcanfor	96.0	Sigma Aldrich ©	70	4	4-Undecanona	98.0	Alpha Aesar ©
36.a	1	<i>R</i> -(+)-Pulegona	90.0	Síntesis	71	3	Decanal	96.0	Alpha Aesar ©
36.b	1	<i>S</i> -(-)-Pulegona	98.0	Sigma Aldrich ©	72	1	n-Nonano	99.0	Merck ©
37.a	1	<i>S</i> (+)-Carvona	96.0	Sigma Aldrich ©	73	3	Nonanal	95.0	Sigma Aldrich ©
37.b	1	<i>R</i> -(-)-Carvona	98.0	Sigma Aldrich ©					

Criterios de selección: 1. Componentes mayoritario ($\geq 4.0\%$), 2. componentes minoritarios de dos o más AEs bioactivos, 3. componentes minoritarios sin reporte bibliográficos, 4. Componentes con similitud estructural a los compuestos seleccionados

*compuestos con reportes inhibitorios sobre una de las enzimas de interés del insecto.

2.1.2 Insectos

Para los ensayos de actividad insecticida se utilizaron adultos de *S. zeamais* entre 10 a 20 días de emergidos, los cuales se obtuvieron de una cría establecida en los laboratorios del equipo de investigación. Para renovar los pies de cría se realizaron mezclas de maíz harinoso ICA variedad 508 y maíz amarillo ICA variedad 105, sometidos a un pretratamiento que incluyó un almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 72 h., seguido de un lavado con agua y calentamiento a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta obtener el maíz seco. El maíz tratado se dispuso en cajas plásticas con selle hermético a las cuales se les hizo un pequeño orificio que fue cubierto con tela de visillo. En cada caja se adicionaron entre 20 - 30 adultos, los cuales se mantuvieron dentro de una cámara de cultivo en

oscuridad bajo condiciones de humedad ($70 \pm 5\%$ HR) y temperatura (28 ± 2 °C), tal como se muestra en la figura 2.2 [27,84].



Figura 2.2: Cámara de cultivo para las crías de *S. zeamais*

2.1.3 Ensayo de toxicidad fumigante

Los 51 compuestos fueron evaluados a una concentración de 150 mg/L (equivalente a una concentración entre 650 a 730 μ M), mediante el método PTFE que se esquematiza en la figura 2.3. En la parte superior de un vial ámbar de 22 mL se aplicó una solución de PTFE (politetrafluoruro de etileno) al 15% y se dejó secar por 5 minutos en campana. Posteriormente, se aplicaron dosis entre 3.0 a 5.0 μ L de cada compuesto en discos de papel filtro Whatman® de 1.5 cm de diámetro, que fueron ubicados en el orificio del vial que contenía 10 insectos sin sexar, y se cerró el vial con tapa rosca. El control negativo, se realizó de igual forma, pero sin la aplicación del compuesto y como control positivo se empleó diclorvos (Nuvan® 50 EC). Se efectuaron cinco réplicas en dos ensayos independientes para todos los tratamientos, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad (28 ± 2 °C y $70 \pm 5\%$ HR). Después de 24 h se determinó el número de insectos muertos en cada vial, al no registrar movimiento de patas o antenas al estereoscopio, después de 15 s de estimulación con alfiler entomológico [69,90–94]. Los porcentajes de mortalidad se calcularon con la fórmula de corrección de Abbot (ecuación 2.1), mientras que los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism 8 [131].

$$\%M = \left(\frac{\%M_{Compuesto} - \%M_{Control}}{\%M_{Control}} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 2.1})$$

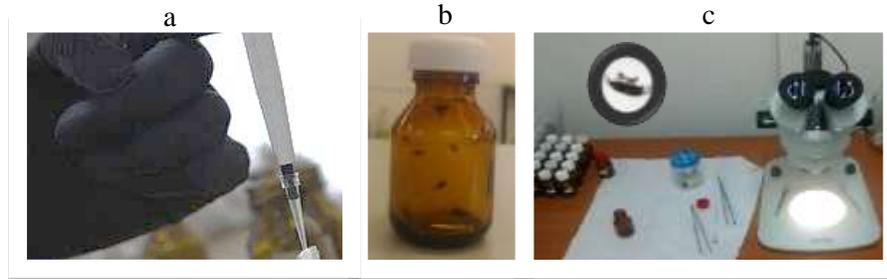


Figura 2.3: Imágenes del bioensayo de la actividad fumigante mediante el método PTFE.

A los compuestos volátiles que exhibieron mortalidades mayores o iguales al 60% a la máxima concentración evaluada, se probaron a diferentes concentraciones (6 a 8) para estimar algunos valores de concentraciones letales (CL_{30} , CL_{50} , CL_{75} y CL_{90}). Para este estudio se varió el volumen del vial, usando viales de 22, 140, 270 y/o 518 mL, con el fin de evitar el uso de solvente y minimizar errores del instrumento de medida en las dosis aplicadas. Para realizar la estimación de las concentraciones letales, se utilizó un diseño factorial y de efectos fijos, con distribución de probabilidad normal, en el software IBM SPSS Statistics, aplicando un modelo de regresión *Probit* [132]. En el cual, M_{ijk} es la proporción de individuos muertos, al aplicar el *íécimo* compuesto volátil, en el *k* *écimo* individuo de la *j* *écima* unidad experimental (10 insectos) y C_i es el efecto de la concentración de cada *i* *écimo* compuesto dosificado ($i: 1, 2 \dots 7 \text{ ó } 8$). De este modo, cada *i* tiene la π_{ijk} (probabilidad de proporción M_{ijk}). Por lo tanto, el modelo Probit ajustado para cada *i* *écimo* compuesto está dado por la ecuación 2.2. Donde: μ_i y β_i son el intercepto y la pendiente, respectivamente y ϕ^{-1} , es el inverso de la distribución normal estándar. Así, cuando $\pi_{ijk} = 0.5$ se utiliza para estimar la CL_{i50} y del mismo modo, se estiman las CL_{30} y CL_{90} [133].

$$\phi^{-1}(\pi_{ijk}) = \mu_i + \beta_i C_i \quad (\text{Eq. 2.2})$$

2.1.4 Análisis cluster de la toxicidad fumigante

Se implementó la metodología cluster en el software *Rstudio* con el fin de relacionar el potencial fumigante de los metabolitos volátiles, con parámetros asociados a rasgos fisicoquímicos y bioquímicos propios de los compuestos. Los parámetros que se utilizaron incluyen la presión de vapor (Pv), coeficiente de reparto octanol/agua (LogK_{ow}), el precursor biosintético, el número de insaturaciones, el tipo de cadena carbonada, el tipo de compuesto y su función orgánica (tipo y posición). En los clusters, el vector de variables incluyó la respuesta de letalidad (CL₃₀, CL₅₀, CL₉₀, β_i) como variable cuantitativa y el tipo de esqueleto carbonado, como variable categórica ordinal, teniendo en cuenta que este puede ser un aspecto estérico importante en la interacción con el sitio activo [134]. Las variables utilizadas en este análisis se resumen en el anexo C.1, organizadas en términos de su CL₅₀.

Los algoritmos de la metodología cluster se basaron en distancias euclidianas y se utilizó el método Ward's como medida de distancia entre grupos, al presentar el mejor coeficiente de aglomeración (R: 0.9977, anexo C.2). Este mismo método de aglomeración se utilizó para establecer el número de clusters (k) más apropiado para los datos, obteniendo un valor de $k=3$, mediante la aplicación de los índices Hubert y D-index, (anexo C.3) [135,136]. Después de establecer los parámetros de medida se efectuó el modelo por partición k -means (no supervisado definido por un centroide), puesto que se suele utilizar en el agrupamiento de estructuras químicas, para encontrar grupos ocultos sobre un conjunto de datos [137]. Esta metodología se implementó al obtener la mejor distribución de los compuestos volátiles, influenciada por la variable cualitativa (contrastado con el método agnes).

Finalmente, se realizó un análisis cualitativo de estructura actividad, a partir de un perfilado de los 3 grupos formados mediante la metodología cluster. Las características generales se plasmaron en un gráfico de frecuencias, con el objeto de identificar rasgos propios de los compuestos que conforman cada grupo. En el anexo C.1 se describen los parámetros utilizados y organizados en términos de la CL₅₀ de los compuestos activos, los cuales incluyeron función orgánica, esqueleto carbonado, precursor biosintético y presión de vapor (Pv).

2.1.5 Ensayo de toxicidad por contacto

La toxicidad por contacto se determinó por el método tópico ilustrado en la figura 2.4. Grupos de 10 insectos fueron inmovilizados sobre una caja de Petri al someterlos a baja temperatura (0°C). Con

una microjeringa biselada se aplicaron 0.20 μL de soluciones a 0.25 $\text{mg}/\mu\text{L}$ del compuesto en n-hexano sobre el tórax dorsal del insecto, para finalmente evaluar una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{adulto}$. Los adultos tratados se transfirieron a viales de vidrio ámbar de 22 mL. En el control negativo, se emplearon insectos sometidos al baño frío, a los cuales se les aplicaron 0.20 de n-hexano, y como control positivo se utilizó cipermetrina (Hawker® 25 EC). Para cada ensayo se realizaron 4 réplicas, manteniendo condiciones controladas de temperatura y humedad (28 ± 2 °C y $70 \pm 5\%$ HR). Transcurridas 24 h se determinó la mortalidad, considerando muertos a los insectos que no movían patas o antenas después de 15 s de estimulación con alfiler entomológico [27,83]. Los porcentajes de mortalidad se calcularon con la fórmula de corrección de Abbot (ecuación 2.1), mientras que los gráficos se realizaron en el software GraphPad Prism 8 [131].

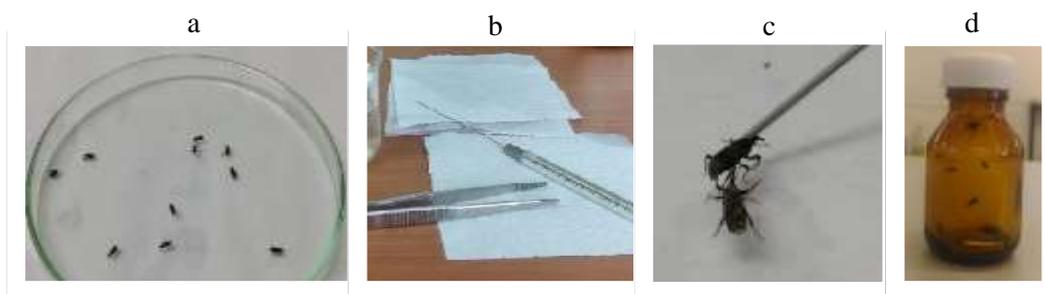


Figura 2.4: Imágenes del bioensayo de toxicidad por contacto empleando el método tópico.

Las sustancias que exhibieron mortalidades mayores o iguales al 60% se sometieron a una búsqueda de rango de dosis, evaluando entre 6 a 8 dosis de diluciones del compuesto en n-hexano. Los resultados obtenidos se sometieron a un modelo de regresión *Probit*, para estimar las dosis letales (DL_s) en el software IBM-SPSS [138]. Para realizar la estimación de las dosis letales, se implementó la misma metodología descrita en el apartado 2.1.3, para las CL_s del efecto fumigante, donde C_i será el efecto de la dosis de cada *i* éximo compuesto [133,138].

2.1.6 Análisis cluster de la toxicidad por contacto

Se implementó la metodología cluster en el software *Rstudio* con el fin de relacionar la eficiencia de los compuestos volátiles, con parámetros asociados a rasgos fisicoquímicos y estructurales propios de los compuestos, como se había mencionado en el análisis cluster de actividad fumigante. En los clusters, el vector de variables incluyó la respuesta de letalidad (DL_{30} , DL_{50} , DL_{90} , β_i), como variables

cuantitativas y el tipo de esqueleto carbonado, como variable categórica ordinal, las cuales se resumen en el anexo C.4

Los algoritmos de la metodología cluster se basaron en distancias euclidianas y se utilizó el método Ward's como medida de distancia entre grupos (anexo C.5), al presentar el mejor coeficiente de aglomeración ($R = 0.9162$). Este método de aglomeración también se utilizó para establecer el número de clusters (k) más apropiado para los datos, obteniendo un valor de $k=3$, mediante la aplicación de los índices Hubert y D-index, (anexo C.6) [135,136]. Después de establecer los parámetros de medida se efectuó el modelo jerárquico agnes (variables en función a su similitud), el cual se recomienda para clusters pequeños [136,139]. Esta metodología se implementó al obtener la mejor distribución de los compuestos volátiles (contrastado con k -means).

Finalmente, se realizó un análisis cualitativo de estructura actividad, a partir de un perfilado de los 3 grupos formados mediante la metodología cluster. Las características generales se plasmaron en un gráfico de frecuencias, con el objeto de identificar rasgos propios de los compuestos que conforman cada grupo. En el anexo C.4 se describen los parámetros utilizados y organizados en términos de la DL_{50} de los compuestos activos, los cuales incluyeron tipo de compuesto, tipo de esqueleto carbonado, función orgánica, precursor biosintético y coeficiente de reparto ($\text{Log}k_{ow}$).

2.2 Estudio para potencializar la acción insecticida frente a *S. zeamais* a partir del diseño de mezclas con metabolitos volátiles bioactivos.

2.2.1 Prediseño de Mezclas

En el prediseño de mezclas se propusieron combinaciones ternarias de los componentes bioactivos, de forma independiente para la actividad fumigante y por contacto. Para establecer los compuestos a mezclar se utilizaron los grupos formados en los análisis cluster, teniendo en cuenta las características estructurales de los miembros de cada grupo (función orgánica, esqueleto carbonado y precursor biosintético). Adicionalmente, algunas de las mezclas propuestas se fundamentaron en la composición química reportada de los AEs bioactivos, de los cuales se seleccionaron los compuestos volátiles (anexo A.1). En este sentido, se plantearon mezclas entre los compuestos

pertenecientes al mismo grupo y entre grupos distintos. Las mezclas prediseñadas para la toxicidad fumigante se codificaron como M1 a M20 y para la toxicidad por contacto se codificaron como MC1 a MC9, tal como se observa en la tabla 2.2.

Tabla 2.2: Mezclas ternarias prediseñadas de compuestos volátiles bioactivos.

Mezcla (Cod)	Mezclas ternarias (A + B + C)			Criterio para la combinación de compuestos
	Toxicidad fumigante			
M1	C1	C3	C4	Cetonas monoterpénicas del cluster G1, derivados del del catión α -terpinilo que difieren en la posición de la función orgánica principal y la estereoquímica (carvona)
M2	C1	C2	C3	cetonas monoterpénicas del cluster G1 que difieren en la posición de la función orgánica principal
M3	C1	C3	C7	monoterpenoides monocíclicos del cluster G1, derivados del del catión α -terpinilo que discrepan en sustituyente (cetona/alcohol).
M4	C1	C3	C5	monoterpenoides monocíclicos del cluster G1 que discrepan en el precursor biosintético y sustituyente (cetona/alcohol)
M5	C1	C3	C16	Monoterpenoides monocíclicos pertenecientes a los clusters G1 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>L. alba</i> (C3-C16) y <i>M. septentrionalis</i> (C1, C16) y difieren en sustituyente (sin sustituyentes/ cetona)
M6	C22	C3	C16	Monoterpenoides monocíclicos pertenecientes a los clusters G1 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>L. alba</i> y difieren en posición y tipo de sustituyente (sin sustituyentes/ cetona)
M7	C8	C3	C10	Monoterpenoides del grupo G1, que difieren en esqueleto carbonado, precursor biosintético y sustituyente (cetona/éter)
M8	C8	C7	C6	Monoterpenoides del grupo G1, que difieren en esqueleto carbonado, precursor biosintético y sustituyente (cetona/alcohol)
M9	C12	C9	C10	Compuestos pertenecientes a los clusters G1 y G2, que hacen parte de los constituyentes del AEs de <i>Xylopiya discreta</i> (C12, C10)
M14	C10	C16	C19	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>Eucalyptus sp.</i> y <i>Ocotea sp</i> (C19, C16)
M14	C10	C16	C19	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>Eucalyptus sp.</i> y <i>Ocotea sp</i> (C19, C16)
M12	C18	C21	C15	Monoterpenoides con función orgánica hidrocarburo, pertenecientes a los clusters G2 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>C. sempervirens</i> y <i>Z. monophyllum</i> (C18, C21)
M13	C14	C12	C16	Monoterpenoides con función orgánica hidrocarburo, pertenecientes a los clusters G2 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>P. el-metanum</i> y <i>C. album</i> (C12, C14)
M14	C10	C16	C19	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>Eucalyptus sp.</i> y <i>Ocotea sp</i> (C19, C16)
M15	C11	C12	C13	Compuestos pertenecientes a los clusters G2 y G3, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>C. sempervirens</i> (C12, C13)
M16	C10	C16	C18	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1, G2 y G3, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>Xylopiya discreta</i> y se basan en los resultados de M12, discrepando en sustituyente (sin sustituyente/ éter)

Mezcla (Cod)	Mezclas ternarias (A + B + C)			Criterio para la combinación de compuestos
M17	C10	C5	C18	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1, G2 y G3, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>Z. monophyllum</i> (C10, C18) y se basan en los resultados de M12, discrepando en el sustituyente (sin sustituyente/ alcohol/ éter)
M18	C1	C22	C18	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G2, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>M. septentrionalis</i> (C1, C18) y se basa en los resultados de M12 discrepando en el sustituyente (sin sustituyente/ cetona)
M19	C3	C15	C18	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G2, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>C. sempervirens</i> (C15, C18) y se basa en los resultados de M12, discrepando en el sustituyente (sin sustituyente/ cetona)
M20	C6	C23	C15	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G2, que se basa en los resultados de M12 y discrepa en el sustituyente (sustituyente/ cetona)
Toxicidad por contacto				
MC1	C1	C25	C26	Compuestos pertenecientes a los clusters G1 y G2, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>Lippia sp.</i> (C25, C26) y difieren, principalmente, en esqueleto carbonado (monocíclico/aromático)
MC2	C9	C25	C26	Compuestos pertenecientes a los clusters G1, G2 y G3, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>Lippia sp.</i> (C24, C25) y difieren, principalmente, en esqueleto carbonado (acíclico/aromático)
MC3	C1	C25	C34	Compuestos pertenecientes a los clusters G1 y G3, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>Lippia sp.</i> (C25, C26) y difieren, principalmente, en esqueleto carbonado (monocíclico/aromático)
MC4	C25	C26	C34	Compuestos pertenecientes a los clusters G1 y G3, que hacen parte de los constituyentes del AE <i>Lippia sp.</i> (C25, C26) y difieren, principalmente, en esqueleto carbonado (acíclico/aromático)
MC5	C1	C5	C10	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G3 que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>Z. monophyllum</i> (C5, C10) y <i>S. viminea</i> (C1, C10) y difieren en el precursor biosintético
MC6	C25	C37	C33	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G2 y G3 que hacen parte de los constituyentes del AE <i>C. nardus</i>
MC7	C27	C37	C28	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G3 que hacen parte de los constituyentes del AE <i>C. citratus</i>
MC8	C29	C11	C28	compuestos pertenecientes a los clusters G2 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AE <i>I. verum</i> (C29, C11) y <i>O. basilicum</i> (C11, C28)
MC9	C22	C10	C28	Monoterpenoides pertenecientes a los clusters G1 y G3, que hacen parte de los constituyentes de los AEs <i>P. asperiusculum</i> (C22, C10) y <i>P. aduncum</i> (C22, C28)

Una vez prediseñadas las mezclas, se evaluaron a la misma concentración o dosis (valores inferiores a CL₉₀ (fumigante) o DL₉₀ (contacto)) los componentes que integran cada mezcla y las posibles combinaciones binarias en proporciones 50:50 (tabla 2.2), teniendo en cuenta la vía de acceso al insecto por el cual fue predeterminada la mezcla (fumigante o contacto).

2.2.2 Modelo de superficie de respuesta para la predicción de mezclas

Para estimar la proporción en que los componentes generen la mejor respuesta de letalidad en las mezclas prediseñadas, se implementó un modelo de superficie de respuesta (MSR) basado en el diseño simplex-lattice {3,2}. En este modelo la descripción geométrica del espacio factorial, es un triángulo equilátero, con seis puntos en el límite del triángulo, en donde los vértices corresponden a CQs puros y los puntos medios en las aristas indican combinaciones binarias [31]. En este sentido se evaluaron las combinaciones a una dosis inferior a la CL₉₀ o DL₉₀ del componente más activo de la mezcla ternaria, para ajustar los datos experimentales al modelo cuadrático de la Eq 2.3. Puesto que este modelo presentó el mejor coeficiente de ajuste en todos los casos [32].

$$y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Donde, y es la respuesta predicha, b_i, b_{ij} son los coeficientes de la función de regresión, y x_i son los CQs individuales.

El modelo de distribución normal de cada una de las mezclas se determinó mediante el estadístico Anderson Darling y gráficos de probabilidad normal de los residuos, lo cual permitió un análisis de varianza (ANOVA), que permitió establecer si el modelo describe adecuadamente la superficie de respuesta real y si la ecuación polinómica sugerida es significativa. Durante este análisis mediante el estadístico de prueba F, se comparó si la varianza debida al modelo es significativamente diferente a la varianza debida al error aleatorio. Adicionalmente, para medir la eficiencia del modelo, se calculó la proporción de la variación alrededor de la media del MSR, mediante un coeficiente de determinación R^2 , que establece el ajuste del modelo a los datos. Se determinó un coeficiente de predicción (R^2_{pred}), el cual establece la habilidad del modelo para predecir una respuesta en nuevas observaciones y un coeficiente ajustado (R^2_{aju}), que ajusta los valores predichos a los grados de libertad, para verificar que los resultados de R^2 no exageran la habilidad del modelo para predecir la respuesta. Además, se incluyó el coeficiente de relación entre un término y la variable respuesta, ya que los términos de interacción significativos ($\rho \leq 0.05$) con valores positivos en los coeficientes de relación indican efectos sinérgicos, mientras que los valores negativos señalan efectos antagónicos.

Se realizaron gráficos de contornos y trazas de efectos Cox (gráficos de efectos de componentes) para representar la superficie de respuesta. Estos gráficos también se utilizaron para estimar los efectos de aumentar la proporción de un compuesto en relación con una mezcla de referencia (centroide, estimado por el modelo), mientras se mantienen constantes las proporciones relativas de

los otros dos componentes. Finalmente, se utilizó el modelo matemático cuadrático para determinar qué combinación de factores puede mejorar el rendimiento de la respuesta, mediante una optimización del máximo efecto insecticida en 10 adultos, seleccionando todas las predicciones que sugirieron la combinación de al menos dos compuestos. Además, los resultados experimentales de la proporción estimada se corrieron nuevamente en el MSR, como un punto adicional en la superficie triangular en busca de mejorar la predicción de proporcionalidad [32,130,140].

2.2.3 Estudio del potencial insecticida de las mezclas

Las mezclas estimadas mediante el MSR fueron preparadas en viales de cromatografía ámbar con insertos y sin uso de disolventes para ajustar la proporción estimada en términos de fracción molar. En primer lugar, se evaluó cada combinación predicha mediante el MSR a la CL_{50} (fumigante) o DL_{50} (contacto) del compuesto más activo de la mezcla, mediante el modo de acción por el que fueron estimadas (método tópico o PTFE). Como control positivo se utilizó el componente individual con mayor efecto insecticida (100%), así como diclorvos y cipermetrina (Hawker® 25 EC). A las mezclas que evidenciaron potencial insecticida al causar mortalidades mayores o iguales al 50 %, se les estimó su efecto tóxico tanto fumigante (CL_{50}) como por contacto (DL_{50}). Para lo cual se varió la concentración de cada mezcla y se aplicó un análisis *Probit* con la metodología descrita en los apartados 2.1.3 y 2.1.4. En cada ensayo se realizaron 4 repeticiones para cada tratamiento y control en 2 corridas independientes.

2.2.4 Efecto de la interacción insecticida de los componentes de las mezclas

Se determinó el tipo de interacción que pueden presentar los componentes (x_i, x_j, x_k) de cada combinación con un modelo de interacción aditiva correspondiente a un modelo de efecto mediano de la ley de acción de masas en el software CompuSyn. Se calculó el índice de combinación (IC), mediante la Eq. 2.4, empleando las dosis o concentraciones que causan el 30, 50, 75 y 90% de letalidad (estimadas previamente en el modelo *Probit*), representando las curvas dosis- efecto de forma lineal, mediante los gráficos del efecto mediano (Anexos D.2 y D.3). Este modelo se aplicó teniendo en cuenta que los compuestos combinados pueden excluirse mutuamente, ya que las mezclas se plantearon inicialmente para una misma vía de acceso al organismo [127,129,130].

$$IC = \frac{(D)_i}{(D_x)_i} + \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \frac{(D)_i}{CL_{50_i}[(f_{ax})_i/(1-(f_{ax})_i)]^{1/m_i}} + \frac{(D)_j}{CL_{50_j}[(f_{ax})_j/(1-(f_{ax})_j)]^{1/m_j}} + \dots \quad (\text{Eq. 2.4})$$

Donde, D_i es la concentración o dosis del compuesto i , D_j es la concentración o dosis del compuesto j , f_{ax} es la toxicidad fraccional a $x\%$ de mortalidad, m es el coeficiente de la sigmoidicidad de la curva dosis- respuesta y $(D_x)_i$ es para D_i “sola” la cual inhibe un $x\%$ del sistema [33]. De este modo las interacciones se categorizan como sinergismo si $IC(x_i, x_j) < 1$, aditividad Si $IC(x_i, x_j) > 1$ y antagonismo Si $IC(x, x_j) = 1$ [33].

Adicionalmente, se calcularon los índices de reducción de dosis (IRD) aplicando la ecuación 2.5, los cuales indica cuántas veces se puede reducir la dosis de cada compuesto de una interacción sinérgica al efecto medio (50%), en comparación con cada uno de los componentes de la mezcla. La escala de análisis de IRD usada es: reducción de dosis favorable para $IRD > 1$, no reducción de dosis para $IRD = 1$, y reducción desfavorable de dosis para $IRD < 1$. La cual se representó en los gráficos de Log IRD, donde los valores por encima de la línea de aditividad $\text{Log IRD} = 0$, indican reducciones de dosis favorables y los valores por debajo señalan reducciones desfavorables [129].

$$(IRD)_i = \frac{CL_{50_i}[(f_{ax})_i/(1-(f_{ax})_i)]^{1/m_i}}{(D)_i} \quad (\text{Eq. 2.5})$$

2.3 Efecto de las mejores mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en *S. zeamais*

2.3.1 Obtención del extracto enzimático

Se tomaron 8 g de adultos de *S. zeamais* para cada extracción (equivalente a 3125 insectos), los cuales se sumergieron en nitrógeno líquido y se prelavaron con el buffer de ensayo, fosfato de potasio 0.1 M (4 a 7 °C) a $\text{pH} \approx 7.2$, para así eliminar residuos de harina. Posteriormente, los insectos se homogenizaron en mortero con buffer de ensayo, en una proporción 1:10 y se centrifugaron a 13 000 Gx durante 60 min a 4°C, en una centrifuga Thermo scientific ®. Finalmente, el sobrenadante se filtró y se le adicionó benzamidina como inhibidor de proteasas quedando en el extracto a una concentración final de 20 mM, para almacenar en alícuotas de 5 mL a -20°C. En total se realizaron

3 extracciones, cada una utilizada de forma independiente para evaluar las 3 enzimas del presente estudio (AChE, CAT y GST) [141,142].

2.3.2 Caracterización del extracto enzimático sobre enzimas desintoxicantes y de función motora de *S. zeamais*.

▪ Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas del extracto enzimático se determinó empleando el método de Bradford, usando albumina de suero bovino (BSA) como estándar de calibración (5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 µg/mL), en la construcción de la curva que se presenta en el anexo E.1. Para la cuantificación de proteínas se utilizaron 50 µL de una solución al 12.5 % v/v del extracto proteico del insecto, los cuales fueron mezclados con 200 µL de reactivo de Bradford en una microplaca de 96 pozos. La mezcla se agitó por 1 min y se incubó por 9 min a temperatura ambiente y oscuridad, para posteriormente realizar lecturas de absorbancia a 595nm. Se realizaron 3 réplicas y 3 ensayos independientes para cada extracto enzimático [143].

▪ Actividad enzimática de la AChE en el extracto de *S. zeamais*

Para realizar los ensayos sobre la acetilcolinesterasa, se implementó el método directo de Ellman con modificaciones. Primero, se realizó una curva de calibración, con AChE de anguila eléctrica (0.02 a 1.00 U/mL, anexo E1) adquirida en Sigma-Aldrich (376 U/mg). Antes de iniciar la reacción, una mezcla de 50 µL de la enzima junto a 50 µL de buffer de ensayo (fosfato de potasio 0.1M, pH 7.2) se incubó durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) 2 mM y 50 µL de yoduro de acetiltiocolina (AThChI) 4mM, con un volumen total de 200 µL, para realizar lecturas de absorbancia a 412 nm cada 5 min durante 45 min. Adicionalmente, se llevó a cabo una titulación de la AChE presente en el extracto proteico adicionando 50 µL de distintas diluciones en % v/v del extracto $\left(\frac{1}{8}, \frac{1}{4}, \frac{1}{2}, \frac{3}{4}, 1\right)$, con el fin de establecer la actividad específica de la enzima en el extracto proteico, seleccionar el tiempo de reacción y la concentración de extracto más apropiada en el ensayo. Por último, se realizó una evaluación cinética de Michaelis Menten, utilizando 50 µL de la concentración de extracto enzimático seleccionada en la titulación, evaluando diferentes concentraciones de sustrato (0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.50, 1.00 y 2.50 mM), con el fin de elegir una concentración de AThChI apropiada, equivalente a 2 veces

la *km*. Para cada una de las metodologías se llevaron a cabo 3 ensayos independientes con 2 réplicas [117,118].

▪ **Actividad enzimática de la GST en el extracto de *S. zeamais***

Para realizar los ensayos sobre la glutatión-S-transferasa, se implementó el método directo de Habig con modificaciones [144]. Primero, se realizó una curva de calibración, con GST de hígado equino (0.1 a 0.8 U/mL, anexo E1) adquirida en Sigma-Aldrich (140 U/mg). Antes de iniciar la reacción, una mezcla de 50 μ L de la enzima junto a 50 μ L de buffer de ensayo (fosfato de potasio 0.1M, pH 6.5) durante 15 min a 25 °C [145]. Posteriormente, se adicionaron 50 μ L de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 4mM (CDNB) y 50 μ L de glutatión reducido 10 mM (GSH), para un volumen total de 200 μ L, al cual se le realizaron lecturas de absorbancia a 340 nm cada 30 s durante 8 min. Adicionalmente, se llevó a cabo una titulación de la GST presente en el extracto proteico, adicionando 50 μ L de distintas diluciones del extracto en %v/v $\left(\frac{1}{8}, \frac{1}{4}, \frac{1}{2}, \frac{3}{4}, 1\right)$, con el fin de establecer la actividad específica de GST en el extracto proteico, de seleccionar el tiempo de ensayo y la concentración de extracto más apropiada. Por último, se realizó una evaluación cinética de Michaelis Menten utilizando 50 μ L de la concentración de extracto enzimático seleccionada en la titulación, en la cual se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato (0.10, 0.25, 0.375, 0.50, 1.00, 2.50, 3.75 y 5.00 mM), con el fin de elegir una concentración de GSH apropiada, equivalente a 2 veces la *km*. Para cada una de las metodologías se llevaron a cabo 2 réplicas en 3 ensayos independientes [106].

▪ **Actividad enzimática de la catalasa en el extracto de *S. zeamais***

Para realizar los ensayos sobre catalasa se implementó el método indirecto de Sinha con modificaciones, en el cual la actividad enzimática de CAT va a ser proporcional a los μ mol de H₂O₂ transformados por la enzima en O₂ [114]. Antes de iniciar los ensayos se comprobó la concentración de sustrato cada día (H₂O₂) mediante lecturas de absorbancia a 240 nm ($\epsilon = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), debido a su inestabilidad. Para llevar a cabo la evaluación de esta enzima se requirieron dos curvas de calibración, una para establecer la cantidad de los μ mol de H₂O₂ necesarios para el ensayo y otra curva de la enzima comercial de CAT para determinar la actividad enzimática del extracto proteico.

En este sentido, primero se realizó la curva de calibración de H₂O₂ entre 5 a 90 μmol (anexo E.1), llevando a cabo la reacción en tubos eppendorf (2.0 mL), en los cuales se mezclaron 200 μL de buffer de ensayo a 37 °C (fosfato de potasio a 50 mM, pH 7.2, 1% BSA), junto con 200 μL de H₂O₂. Posteriormente, se adicionaron 600μL de una solución de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) 43 mM en ácido acético al 75%, para un volumen total de 1000 μL. Luego se incubo la reacción a 100°C en un baño termostático durante 10 min y transcurrido el tiempo a temperatura ambiente y se transfirieron 200 μL de la reacción a una placa de 96 pozos para realizar lecturas de absorbancia a 570 nm. En segunda instancia, se construyó una curva de calibración de CAT de hígado bovino (0.1 a 25 U/mL, anexo E1) adquirida en Sigma-Aldrich (4918 U/mg). En este ensayo se utilizó la misma metodología de la curva de calibración de H₂O₂, reemplazando 100 μL del buffer de ensayo por 100μL de la enzima comercial, por lo cual siempre se corrió un control de H₂O₂ para determina la actividad enzimática. Los 200 μL de la enzima diluida se incubaron durante 15 min a 37 °C. Luego se adicionaron 200 μL de H₂O₂ 400 mM (80 μmol) y se incubaron con agitación suave durante 2.5 min a 37°C. Posteriormente, se agregaron 600μL de la solución de K₂Cr₂O₇ 43 mM, para detener la reacción. Adicionalmente, se realizó una titulación de la CAT presente en el extracto proteico, adicionando 100 μL de distintas diluciones en %v/v del extracto proteico ($\frac{1}{8}, \frac{1}{4}, \frac{1}{2}, \frac{3}{4}, 1$), con el fin de establecer la actividad específica de la enzima en el extracto y la concentración de extracto más apropiada para el ensayo. El extracto usado para este ensayo se estabilizó con BSA al 0.1% en el momento del experimento. Por último, se realizó una evaluación de Michaelis Menten utilizando 100 μL de la concentración de extracto enzimático seleccionada en la titulación, en la cual se evaluaron diferentes concentraciones de sustrato. Esta última evaluación se hizo con el fin de elegir una concentración de H₂O₂ apropiada, alrededor de 2 veces la *km* y estuvieran dentro del rango lineal en la absorbancia de los μmol de H₂O₂. Para cada una de las metodologías se llevaron a cabo 2 réplicas en 3 ensayos independientes [113,114].

2.3.3 Efecto de las mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en *S. zeamais*

La inhibición de la actividad catalítica de las enzimas causada por las mezclas con acción insecticida y sus constituyentes, se determinó empleando la metodología descrita anteriormente para establecer su actividad específica, pero en este caso se reemplazó el volumen del buffer de ensayo por el de una solución de las mezclas o sus componentes. Las soluciones de los compuestos y las mezclas se prepararon en triton X-100 (0.5 % v/v) y se ensayaron a una concentración de 120 mg/L. Los

porcentajes de inhibición se calcularon mediante la Eq. 2.6. Las mezclas que causaron efectos de inhibición mayores o iguales al 50% se evaluaron a 15 mg/L, tanto la mezcla como sus componentes para poder establecer, posteriormente, los efectos inhibitorios de interacción. En los ensayos se empleó como control negativo triton X-100 0.5%v/v en buffer fosfato y como control positivo diclorvos (Nuvan® 50 EC) para AChE, quercetina para GST y azida de sodio para CAT, además siempre se corrió un blanco del extracto enzimático junto con el revelador de color (DTNB, CDNB y $K_2Cr_2O_7$) para evitar falsos positivos. Se realizaron 3 réplicas en 3 ensayos independientes para cada una de las enzimas. Las mezclas y compuestos promisorios se evaluaron en 8 a 10 puntos de concentración en los ensayos de inhibición enzimática para estimar la CI_{50} utilizando el software GraphPad Prism.

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \left(\frac{A_m - A_B}{A_C} \right) * 100 \quad (\text{Eq. 2.6})$$

Donde A_m , es la absorbancia de la muestra, A_B , la absorbancia del blanco (solución del compuesto + extracto enzimático + revelador, sin sustrato) y A_C , la absorbancia del control negativo de reacción, incluyendo el efecto del solvente sobre la actividad enzimática.

2.3.4 Efecto de la interacción inhibitoria de los componentes de las mezclas sobre enzimas desintoxicantes y de función motora.

Se verificó la interacción de los componentes de cada una de las mezclas que evidenciaron potencial inhibitorio frente a las enzimas evaluadas, a partir de las curvas dosis–respuesta empleando la metodología descrita en el numeral 2.25 para la interacción insecticida de los componentes de las mezclas. En este caso se utilizó únicamente al efecto del 50% de inhibición, junto con los resultados experimentales del efecto causado a 120 y 15 mg/L [33,127,129,130].

3. Resultados y Discusión

3.1 Toxicidad fumigante y por contacto de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales bioactivos sobre *S. zeamais*.

3.1.1 Constituyentes químicos con toxicidad fumigante promisoría

En la etapa inicial del estudio de actividad fumigante se evaluaron 51 constituyentes químicos (CQs) de AEs a una concentración de 150 mg/L (0.6 – 1.1 mM), encontrándose 24 compuestos promisorios que causaron un porcentaje de mortalidad igual o superior al 60%, conformando la submuestra n_i . Los resultados se ilustran en la figura 3.1, en donde se puede observar que entre los constituyentes bioactivos se encuentran, principalmente, monoterpenoides oxigenados (13 compuestos), y de tipo hidrocarburo (9 compuestos). Esta tendencia de la actividad fumigante para los monoterpenoides concuerda con lo reportado previamente en la literatura [74–76,97].

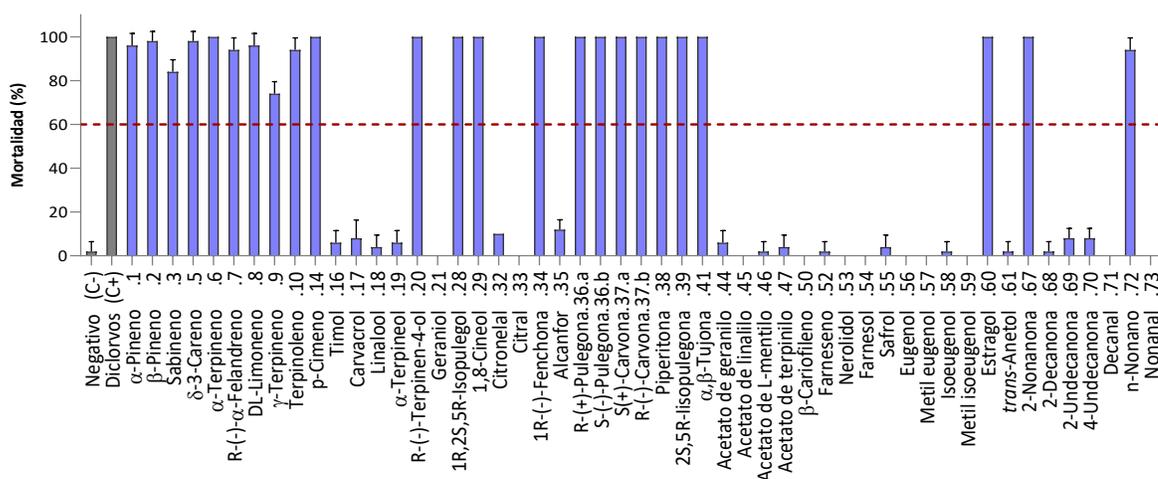


Figura 3.1: Mortalidad de *S. zeamais* por acción fumigante de compuestos químicos volátiles evaluados a 150 mg/L.

En este estudio se describe por primera vez la acción fumigante frente a *S. zeamais* de timol, carvacrol, citral, citronelal, nonanal, decanal, farneseno, farnesol, 4-undecanona, *trans*-anetol, isoeugenol, metil isoeugenol, acetato de geranilo, L-mentilo, linalilo y terpinilo. En cuanto a los compuestos que presentan estudios previos al comparar los resultados obtenidos a 150 mg/L, los únicos compuestos que no clasificaron como activos pero que presentan reportes son eugenol y geraniol que datan CL_{50} de 15.9 y 19.2 mg/L, respectivamente. Los cuales se evaluaron con las mismas condiciones de ensayo a excepción del uso de *n*-hexano (como solvente de los compuestos volátiles), quedando como un punto importante de investigación el efecto del solvente en los bioensayos [75].

Entre los compuestos volátiles seleccionados por ser constituyentes mayoritarios en AEs bioactivos, se estableció un efecto fumigante significativo para α -pineno, limoneno, β -pineno, *R*-(+) y *S*-(-)-pulegona, *n*-nonano, *R*-(-)- α -felandreno, γ -terpineno, *IR*-(-)-fenchona, δ -3-careno y *R*-(-) y *S*-(+) carvona, lo que conlleva a sugerir que estos compuestos pueden estar aportando significativamente a la actividad fumigante presentada por los AEs que los contienen. En este sentido, se podría atribuir la acción fumigante del AE de *Ocotea longifolia* (CL_{50} :280.5 μ L/L aire) a la presencia de terpinoleno (74.0%) y la de los AEs de *Minthostachys septentrionalis* (CL_{50} :304.4 μ L/L aire) y *Satureja viminea* (CL_{50} :483.6 μ L/L aire) a la presencia de pulegona (41.85% y 38.61%, respectivamente). Sin embargo, otros constituyentes mayoritarios como β -cariofileno (*M. septentrionalis*: 16.15%), acetato de terpinilo (*Eucalyptus* sp.: 12.2%), α -terpineol (*Ocotea* sp.: 44.29%) y alcanfor (*L. stoechas*: 27.99%, *R. officinalis*: 13.19%), no presentaron una alta acción fumigante en el cribado realizado, al ocasionar letalidades menores al 30%, lo cual sugiere que no aportan significativamente a la actividad exhibida por los AEs bioactivos que los contienen. El ensayo realizado también permitió determinar la acción fumigante sobre *S. zeamais* de *p*-cimeno, α -terpineno, *R*-(-)-terpinen-4-ol y piperitona [27], siendo estos constituyentes químicos minoritarios de varios AEs con acción fumigante. Consecuentemente, al considerar las razones anteriormente descritas se deduce que la capacidad fumigante de los AEs, no se debe únicamente a los constituyentes mayoritarios, sino también a la relación con sus constituyentes de menor porcentaje, estando de acuerdo con lo descrito en otras publicaciones [22,59].

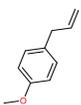
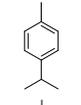
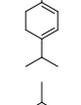
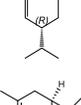
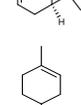
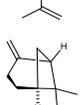
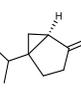
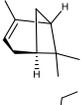
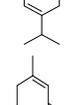
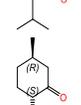
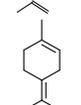
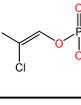
A los 24 compuestos bioactivos en el ensayo fumigante (submuestra n_i) se les evaluó el efecto generado en la mortalidad del insecto por variación de la concentración de cada compuesto, para así estimar sus concentraciones letales 50 y 90 (CL_{50} y CL_{90}). Los resultados de concentraciones letales

se resumen en la tabla 3.1, junto con los valores de pendiente (β_i) y significancia (ρ valor) de cada una de las ecuaciones que representan las regresiones *probit* aplicadas. Para facilitar la discusión de los resultados se asignó un código a cada constituyente potencialmente activo dese C1 hasta C24. Por consiguiente, con el objeto de estimar el rango de concentraciones necesario para efectuar un cambio apreciable en la mortalidad de *S. zeamais*, se determinó si los valores de pendiente son significativos en el modelo *probit*, formulándose las siguientes hipótesis: $H_0: \beta_i = 0$; $H_1: \beta_i \neq 0$. Los resultados obtenidos indicaron que todos los valores de significancia fueron inferiores al valor $\alpha = 0.05$, por lo que se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que todos los compuestos son significativos en el modelo.

Tabla 3.1: Toxicidad fumigante (CL) de compuestos volátiles bioactivos contra *S. zeamais*

Cod.	Compuesto volátil	Estructura	CL ₅₀ (95% LC)		CL ₉₀ (95% LC)		β_i (\pm SE)	ρ ($\alpha < 0.05$)
			mg L ⁻¹	μ mol L ⁻¹	mg L ⁻¹	μ mol L ⁻¹		
C1	R-(+)-Pulegona		0.58 (0.46 – 0.71)	3.81 (3.03 – 4.69)	0.92 (0.77 – 1.26)	6.07 (5.09 – 8.25)	3.73 (\pm 0.844)	9.90E-06
C2	S-(-)-Pulegona		0.97 (0.69 – 1.21)	6.37 (4.54 – 7.98)	1.68 (1.39 – 2.37)	11.06 (9.17 – 15.56)	1.79 (\pm 0.439)	4.50E-05
C3	S-(+)-Carvona		2.87 (1.99 – 3.75)	19.10 (13.26 – 24.99)	5.31 (4.26 – 8.25)	35.36 (28.356 – 54.951)	0.52 (\pm 0.141)	2.00E-04
C4	R-(-)-Carvona		1.42 (1.14 – 1.72)	9.48 (7.57 – 11.48)	2.17 (1.84 – 2.88)	14.42 (12.23 – 19.20)	1.73 (\pm 0.396)	1.30E-05
C5	R-(-)-Terpinen-4-ol		4.03 (3.27 – 4.91)	26.14 (21.22 – 31.82)	6.13 (5.18 – 8.46)	39.76 (33.56 – 54.87)	0.61 (\pm 0.149)	4.40E-05
C6	$\alpha\beta$ -Tujona		4.34 (3.49 – 5.30)	28.54 (22.90 – 34.79)	6.81 (5.75 – 8.94)	44.70 (37.75 – 58.73)	0.52 (\pm 0.108)	1.60E-06
C7	1R,2S,5R-Isopulegol		4.73 (3.86 – 5.68)	30.00 (25.05 – 36.84)	7.19 (6.13 – 9.43)	46.64 (39.75 – 61.17)	0.52 (\pm 0.113)	4.20E-06
C8	1R-(-)-Fenchona		10.59 (8.56 – 13.16)	69.59 (56.24 – 86.45)	17.06 (14.18 – 23.81)	112.05 (93.12 – 156.40)	0.20 (\pm 0.046)	1.50E-05
C9	2-Nonanona		9.09 (7.49 – 11.04)	63.92 (52.63 – 77.64)	13.73 (11.61 – 18.91)	96.54 (81.59 – 132.94)	0.28 (\pm 0.067)	3.70E-05
C10	1,8-Cineol		12.96 (10.38 – 16.10)	84.04 (67.31 – 104.36)	21.68 (18.02 – 29.56)	140.57 (116.82 – 119.66)	0.15 (\pm 0.031)	2.60E-06

56 Estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales
y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora para *Sitophilus zeamais*

Cod.	Compuesto volátil	Estructura	CL ₅₀ (95% LC)		CL ₉₀ (95% LC)		β_i (\pm SE)	ρ ($\alpha < 0.05$)
			mg L ⁻¹	μ mol L ⁻¹	mg L ⁻¹	μ mol L ⁻¹		
C11	Estragol		30.46 (22.40 - 39.81)	205.56 (151.13 - 268.62)	57.45 (45.99 - 87.88)	387.67 (310.36 - 593.03)	0.05 (\pm 0.012)	8.00E-05
C12	p-Cimeno		28.68 (23.08 - 35.59)	213.67 (171.95 - 256.12)	46.96 (39.01 - 65.39)	349.89 (290.68 - 487.22)	0.07 (\pm 0.016)	1.20E-05
C13	α -Terpineno		60.24 (47.80 - 72.75)	442.21 (350.86 - 533.98)	96.19 (81.75 - 125.28)	706.07 (600.09 - 919.60)	0.04 (\pm 0.007)	1.80E-06
C14	R(-)- α -Felandreno		88.87 (69.70 - 108.27)	652.36 (511.64 - 794.79)	142.53 (119.87 - 197.61)	1046.26 (879.93 - 1450.53)	0.02 (\pm 0.006)	4.50E-05
C15	δ -3-Careno		80.35 (64.09 - 97.18)	589.79 (470.47 - 713.38)	135.83 (114.92 - 178.25)	997.04 (843.60 - 1308.47)	0.02 (\pm 0.005)	8.70E-07
C16	DL-Limoneno		88.69 (74.72 - 103.70)	651.06 (548.49 - 761.24)	136.14 (117.96 - 171.69)	999.33 (865.87 - 1260.27)	0.03 (\pm 0.005)	3.10E-07
C17	β -Pineno		97.60 (77.15 - 116.76)	716.41 (566.36 - 857.12)	151.34 (129.39 - 198.56)	1.110.93 (949.79 - 1457.51)	0.02 (\pm 0.005)	1.10E-05
C18	Sabineno		68.65 (56.89 - 79.75)	503.92 (417.59 - 585.44)	102.10 (89.08 - 128.61)	749.50 (653.90 - 944.04)	0.04 (\pm 0.008)	2.70E-06
C19	α -Pineno		110.38 (90.76 - 130.60)	810.25 (666.22 - 958.70)	178.81 (152.92 - 235.051)	1312.53 (1122.51 - 1725.39)	0.02 (\pm 0.004)	3.50E-06
C20	n-Nonano		109.12 (86.72 - 127.88)	850.81 (676.19 - 997.02)	171.55 (147.92 - 228.44)	1337.49 (1153.25 - 1781.07)	0.02 (\pm 0.005)	4.10E-05
C21	γ -Terpineno		107.95 (82.31 - 146.97)	792.42 (604.23 - 1078.84)	187.96 (148.32 - 224.83)	1379.72 (1088.75 - 2384.44)	0.02 (\pm 0.005)	8.30E-04
C22	Piperitona		4.38 (3.72 - 5.35)	28.77 (24.45 - 35.13)	6.19 (5.26 - 8.89)	40.67 (34.54 - 54.43)	0.70 (\pm 0.193)	2.50E-04
C23	2S,5R-Isopulegona		2.37 (1.86 - 2.89)	15.57 (12.19 - 18.96)	3.88 (3.29 - 5.18)	25.46 (21.47 - 34.05)	0.85 (\pm 0.188)	6.20E-06
C24	Terpinoleno		52.13 (34.83 - 72.33)	337.92 (225.81 - 468.91)	88.83 (69.69 - 154.50)	575.86 (451.79 - 1001.61)	0.035 (\pm 0.012)	1.33E-03
C+	Diclorvos		2.17 (1.53 - 3.81)	9.84 (6.01 - 17.22)	4.57 (3.21 - 8.75)	20.68 (14.53 - 39.59)	0.51 (\pm 0.146)	4.40E-04

Los resultados del modelo Probit permitieron postular a los compuestos C1- C7, C22 y C23, como los de mayor potencial fumigante, ya que presentan CL_{50} inferiores a 30 μM y valores de " β_i " superiores a 0.50. De esta forma al hacer pequeños aumentos en la concentración de estas sustancias, su letalidad frente al insecto aumenta considerablemente. Dentro de este grupo se destacan los compuestos C1, C2, C4 y C23, por su alta acción fumigante ($CL_{50} < 15.6 \mu\text{M}$ y $CL_{90} < 25.5$), comparable con el control positivo, diclorvos (CL_{50} : 9.84 μM y CL_{90} : 20.68 μM). En contraste los constituyentes C19 - C21, exhibieron el menor efecto fumigante con CL_{50} cercanas a 800 μM y con los valores de pendiente más bajos (inferiores a 0.02), indicando que se requerirán altas cantidades de estos compuestos para aumentar considerablemente la mortalidad sobre el insecto de estudio.

Los resultados obtenidos constituyen el primer reporte de las concentraciones letales de toxicidad fumigante frente a *S. zeamais* para *S*-pulegona (C2), *1R,2S,5R*-isopulegol (C7), *1R*-(-)-fenchona (C8), *n*-nonano (C20) y *2S,5R*-isopulegona (C23). Adicionalmente, en este estudio se reporta por primera vez la toxicidad netamente fumigante para 2-nonanona (C9), *p*-cimeno (C12), estragol (C11), α -felandreno (C14), α -pineno (C19) y γ -terpineno (C21), ya que en los reportes previos no se evidencia el empleo de alguna barrera para impedir el contacto directo de las sustancias con el insecto. Sin embargo, las CL_{50} en mg/L estimadas para C12 (28.7), C13 (60.2), C14 (88.9) y C19 (110.4), son cercanos a los valores reportados en la literatura (23.3 mg/L [87], 56.2 mg/L [28], 72.7 mg/L [28], y 120 $\mu\text{L/L}$ [86], respectivamente), lo que sugiere que para estos compuestos predomina la vía tóxica por inhalación, más no la de contacto. Incluso, este trabajo presenta por primera vez la toxicidad fumigante de sabineno (C18) a 24h de evaluación, con un efecto mucho menor (CL_{50} : 68.65 mg/L) al reportado para ensayos de 7 días (CL_{50} : 9.12 mg/L), indicando que su efecto fumigante aumenta con el transcurrir del tiempo [94]. De los resultados obtenidos, los compuestos C4 (CL_{50} : 1.42) y C5 (CL_{50} : 4.03), mostraron una CL_{50} similar a los valores reportados para periodos de 7 días de evaluación, correspondientes a 2.76 y 4.79 mg/L, indicando que estos compuestos tienen una rápida acción fumigante [69,90].

De los compuestos volátiles evaluados en este trabajo, algunos presentan estudios previos de acción fumigante con barreras de contacto y en un periodo de 24h sobre *S. zeamais*, tal es el caso de C1, C3-C7, C10, C13, C15, C17, C18 y C22. No obstante, los resultados obtenidos para estos compuestos, difieren de lo reportado en la literatura, algunos, debido a las unidades de medida (mg/cm^2), ya que no se tomó en cuenta el espacio del vial sino el área del papel filtro utilizado en el ensayo [146]. Otras diferencias pueden deberse al uso de solvente utilizado en los reportes, ya que

podría llegar a interferir al potenciar o disminuir el efecto, o en este caso puede ser el cambio del volumen del vial (22, 140, 270 y 518 mL), el que ocasione una variación por el canje de instrumento de medida. Adicionalmente, las pequeñas variaciones se pueden atribuir a la temperatura y humedad, a la que se realiza el ensayo, el control en la edad de la población de insectos utilizada y el tiempo de renovación del pie de cría. Puesto que los bioensayos con insectos de un pie de cría sobre poblado dificultan la homogeneidad en las respuestas de letalidad, debido a la alta variedad que se presenta en la edad de los insectos adultos. Por lo cual se recomienda realizar las evaluaciones sobre adultos jóvenes, coincidiendo con los ensayos reportados para *S. zeamais*, al evaluar edades que oscilen entre los 15 a 30 días [74,80].

Al contrastar los resultados de los CQs bioactivos con los AEs de donde se seleccionaron, la toxicidad causada por los compuestos es mucho mayor ($CL_{50} \leq 111.0$ mg/L) y no es comparable con el efecto fumigante de los AEs ($CL_{50} \geq 180$ μ L/L). La excepción fue el AE de *Z. monophyllum* el cual presentó una acción fumigante (CL_{50} 68.0 mg/L) semejante a la de su constituyente mayoritario (C18 (27.7%) con CL_{50} de 68.65 mg/L). Esta respuesta de letalidad del AEs puede estar indicando que la combinación de los compuestos C18 y C10 opaca la efectividad de C10 (1,8 cineol), probablemente por una interacción aditiva [27,28]. En este análisis también se resalta al AEs de *S. viminea* ($CL_{50} \cong 437.66$ mg/L) clasificado previamente como un aceite con efecto fumigante moderado (anexo A.1), puesto que su único componente mayoritario es pulegona (38.61%), el compuesto con mayor toxicidad sobre *S. zeamais* de toda la submuestra n_i . Esta disminución en la toxicidad del AEs sobre las vía respiratorias del insecto, posiblemente se debe a un interacción antagonista del componente mayoritario con los otros constituyentes del aceite. Por consiguiente, la baja actividad fumigante de algunos AEs, probablemente está relacionada con la proporción en que se encuentra el compuesto dentro del AE y las distintas clases de interacción que se pueden presentar entre los diferentes tipos de constituyentes [26,96].

3.1.2 Análisis cluster para correlacionar la toxicidad fumigante de los compuestos activos

El análisis cluster de los compuestos volátiles con efecto fumigante, condujo a agruparlos en tres conglomerados mediante el modelo k -means como se indica en la figura 3.2. De este modo, en el primer clúster (G1-azul) se ubicaron los 12 compuestos volátiles más activos, con $CL_{50} < 13.0$ mg/L

y los valores de pendiente más altos, en donde se incluyeron: *R*-(+)-pulegona (C1), *S*-(-)-pulegona (C2), *S*-(+)-carvona (C3), *R*-(-)-carvona (C4), *R*-(-)-terpinen-4-ol (C5), $\alpha\beta$ -tujona (C6), isopulegol (C7), *1R*-(-)-fenchona (C8), 2-nonanona (C9), 1,8-cineol (C10), isopulegona (C23) y piperitona (C22). En el segundo cluster (G2-amarillo) se encuentran 6 compuestos que exhiben una capacidad fumigante intermedia-alta, con $28.0 < CL_{50} < 81.0$ mg/L, los cuales incluyen a estragol (C11), p-cimeno (C12), α -terpineno (C13), δ -3-careno (C15), sabineno (C18) y terpinoleno (C24). Finalmente, en el tercer cluster (G3-verde) quedaron establecidos los 6 compuestos restantes con $CL_{50} > 88.0$ mg/L y con las pendientes más pequeñas, en el cual se organizaron: *R*-(-)- α -felandreno (C14), limoneno (C16), β -pineno (C17), α -pineno (C19), *n*-nonano (C20) y γ -terpineno (C21). Teniendo en cuenta lo anterior, se pueden categorizar los compuestos de cada grupo como G1: fumigante alto, G2: fumigante moderado y G3: fumigante bajo.

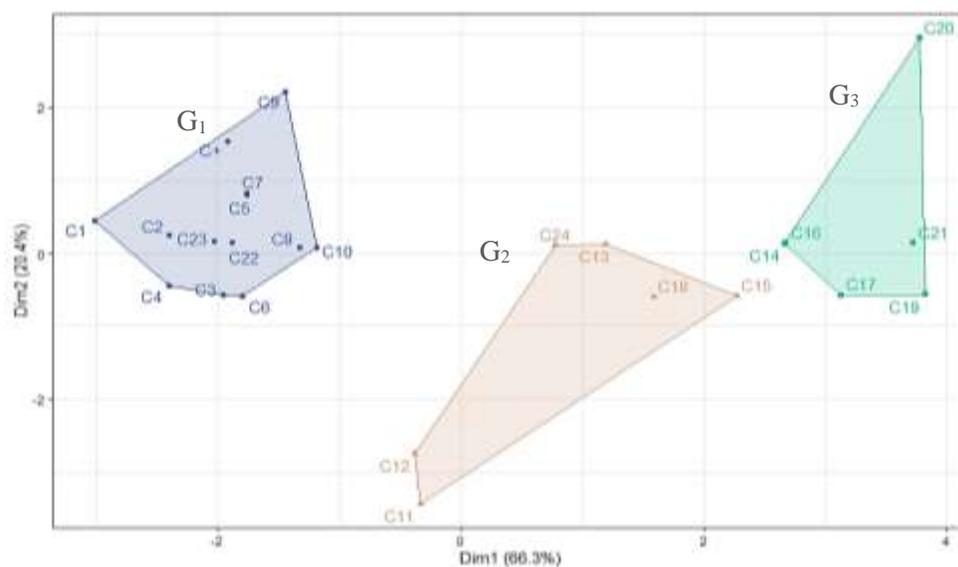


Figura 3.2: Diagrama de análisis cluster por el método *k*-means de los compuestos volátiles con acción fumigante sobre *S. zeamais*.

Cada uno de los grupos del diagrama de dispersión se caracterizaron teniendo en cuenta algunos rasgos fisicoquímicos y estructurales de los compuestos, descritos en el anexo C.1. La información obtenida se clasificó en un gráfico de frecuencias (figura 3.3), de tal manera que la categoría general correspondió a cada uno de los conglomerados. Los grupos se discriminaron inicialmente por las presiones de vapor de los compuestos volátiles ($P_v \geq 0.09$ o $P_v < 0.09$ KPa), seguido de las funciones orgánicas que constituyen las estructuras químicas (alcohol, cetona, éter e hidrocarburo) y el

esqueleto carbonado que conforma la molécula (acíclico, monocíclico, bicíclico y aromático). El gráfico de frecuencias también incluyó el tipo de metabolito (alifático, monoterpenoide y fenilpropanoide) y el precursor biosintético como variable sumativa y caracterizada por colores.

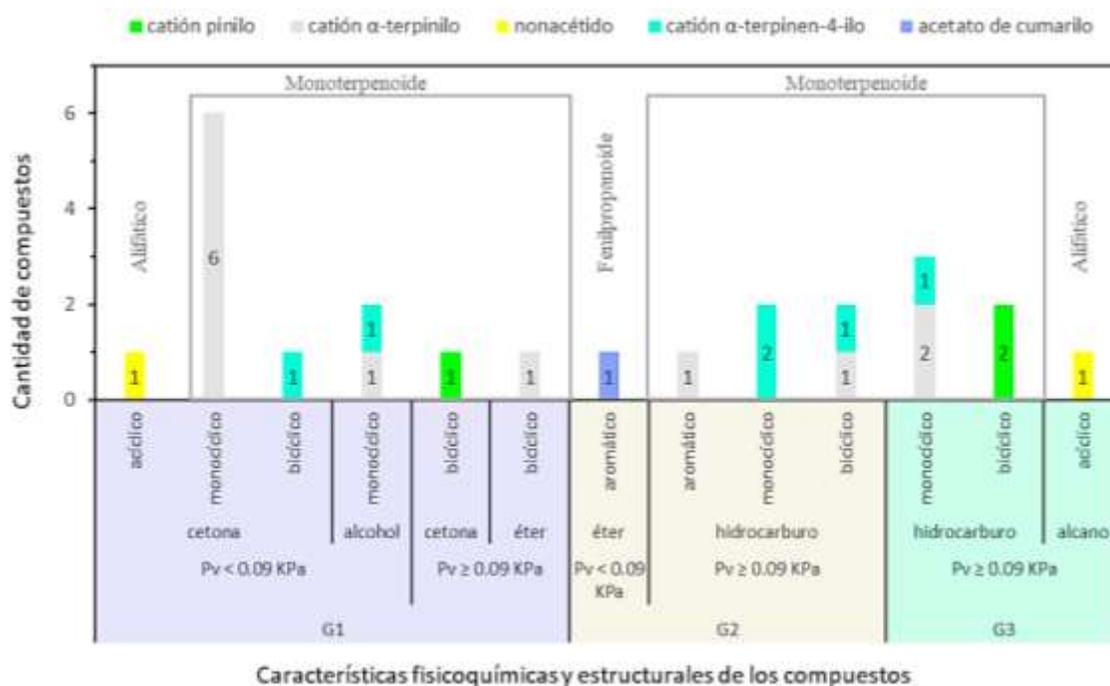


Figura 3.3: Diagrama de análisis cluster por el método *k-means* de los compuestos volátiles con acción fumigante sobre *S. zeamais*.

De manera general en el gráfico de frecuencias se observa que el cluster G1 contiene, principalmente, monoterpénoides monocíclicos (8 compuestos), derivados del cation α-terpinilo (8 compuestos) y con función orgánica cetona (9 compuestos). Adicionalmente, se observan presiones de vapor bajas para la mayor parte de los compuestos presentes en el grupo G1 (10 compuestos), sugiriendo que la actividad está más relacionada con su modo de acción en el insecto, que por su volatilidad. Los resultados mencionados concuerdan con algunos estudios descritos en la literatura para la actividad fumigante de monoterpénos, en donde sugieren que las funciones orgánicas de tipo cetona y alcohol pueden ser determinantes en la actividad fumigante, por la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno con moléculas de agua en la superficie de las traqueolas de los insectos, lo cual brinda un mejor acceso al blanco molecular [134].

En el mismo modo se observa para el cluster G2, principalmente, la presencia de monoterpenos de tipo hidrocarburo con precursores biosintéticos α - terpinilo (2 compuestos) y terpinen-4-ilo (3 compuestos). Este grupo señala la presencia de un fenilpropanoide (C11), el cual puede estar clasificado en el grupo, por su alta volatilidad ($P_v = 0.0226$ kPa) en comparación con la mayoría de los fenilpropanoides, de los cuales se suele reportar más, su toxicidad por contacto [80,85]. Es importante mencionar que *trans*-anetol isómero de posición del estragol, evidenció un efecto fumigante deficiente (2.0% de mortalidad a 150 mg/L), lo cual puede estar relacionado con su baja P_v (0.0093 kPa [147]) y por la posición del doble enlace en la cadena alquímica, pues en la literatura se ha descrito que la acción fumigante de los fenilpropanoides, tiende a disminuir con la proximidad de las insaturaciones al anillo aromático [34]. Así mismo, en el cluster G3 se evidencia que todos sus componentes son hidrocarburos, mayoritariamente, de tipo monoterpenoide insaturado (3 insaturaciones), a excepción de C20, principalmente, derivados del catión α - terpinilo (2 compuestos) y pinilo (2 compuestos). Esta agrupación indicó que la actividad fumigante presentada por los compuestos de tipo hidrocarburo se debe primordialmente a la facilidad con que la sustancia logra llegar al insecto, atribuida a sus altas presiones de vapor, concordando con publicaciones que han comprobado una mejor acción fumigante al aumentar las P_v de componentes de AEs [134]. No obstante, los compuestos de tipo hidrocarburo también tienen un alto carácter lipofílico, ocasionando una disminución de la actividad insecticida con el aumento de la lipofilidad, razón por cual esta clase de compuestos se agruparon en el cluster fumigante bajo. Efecto que coincide con algunos reportes de toxicidad sobre insectos plaga, en los cuales sugieren que la alta lipofilidad en los monoterpenos puede conducir a que se acumulen en la cutícula del insecto y esto inhiba su desplazamiento al sitio de acción [134,148].

Al comparar la actividad fumigante de los compuestos evaluados, se pudieron establecer algunas relaciones de estructura-actividad preliminar. En este sentido, el estudio sugiere que la presencia del núcleo monoterpenoide monocíclico es importante para la actividad fumigante, dado que 13 de los 24 compuestos bioactivos presentan estas características estructurales. Al comparar los valores promedio de CL_{50} para los monoterpenoides monocíclicos de tipo hidrocarburo (C13, C14, C16, C21 y C24) con los de tipo oxigenado (C1 a C5, C7, C22 y C23), se puede establecer, que la presencia de grupos oxigenados sobre el ciclo incrementa significativamente la actividad fumigante. De modo que la CL_{50} es prácticamente 18 veces menor cuando se coloca sobre el ciclo un grupo hidroxilo (C5 y C7) y 38 veces menor cuando el grupo es de tipo cetona (C1 a C4, C22 y C23). Aproximaciones que concuerdan con estudios de tipo QSAR del efecto fumigante de monoterpenos sobre plagas de

productos almacenados, en el cual los hexaciclos oxigenados han presentado una rápida acción insecticida [63,134,148]. Adicionalmente, al comparar las cetonas monoterpénicas se estableció que C1 y C2, son en promedio 3.7 veces más activas que C3, C4 y C22, lo que sugiere que la presencia del doble enlace exocíclico conjugado con el grupo carbonilo conduce a un aumento de la acción fumigante. Finalmente, se identificó que los monoterpénicos monocíclicos con configuración *-R-* (C1 y C4), son alrededor de 2 veces más tóxicos por vía respiratoria, que su enantiómero *-S-* (C2 y C3), siendo este la primera aproximación de relación estructura actividad referente a las insaturaciones y la enantioselectividad de la toxicidad fumigante sobre *S. zeamais*.

Al realizar comparaciones de otros compuestos con diferente esqueleto carbonado se observan algunas tendencias similares. En general los compuestos con función orgánica cetona tienden a ser más activos, puesto que los monoterpénicos bicíclicos con función orgánica cetona (C6 y C8) son en promedio 13.3 veces más tóxicos por inhalación, que los de tipo hidrocarburo (C15, C17, C18 y C19). El aumento de la conjugación y su posición en los monoterpénicos monocíclicos de tipo hidrocarburo favorece la actividad fumigante hasta llegar a uno esqueleto aromático. Dado que al comparar el promedio de la CL_{50} de C14 y C21, la actividad es 3.4 veces mejor en los esqueletos aromáticos (C12) y es cerca de dos veces mejor en la conjugación 1,3-hexadieno (C13). Adicionalmente, la presencia de dobles enlaces exocíclicos en este tipo de compuestos, también parece influenciar positivamente en el incremento de la toxicidad fumigante, y esto se observa al determinar que C24 es alrededor de 2 veces más efectivo que C16 y cerca de 1.13 más efectivo que C13. Sin embargo, la actividad fumigante de los monoterpénicos aromáticos se pierde cuando sobre el anillo se ubica un sustituyente oxigenado.

Los resultados también indicaron la clase de compuestos que no evidencian una acción fumigante significativa a 150 mg/L, como son los aldehídos en general, cetonas alifáticas de cadenas larga (mayor a 10 carbonos), sesquiterpenoides y fenilpropanoides a excepción de estragol. También se excluyeron los compuestos monoterpénicos con grupo acetato (ésteres), grupo fenol y grupo hidroxilo, sustituido fuera del ciclo. Esta exclusión de los alcoholes como linalool y α -terpineol, concuerdan con otros estudios, los cuales consideran que la baja acción fumigante de alcoholes volátiles acíclicos, se debe a su geometría molecular, que repercute en la baja interacción que presentan con receptores octopaminérgicos, en comparación con otros monoterpénicos oxigenados [149,150].

3.1.3 Constituyentes químicos con toxicidad por contacto promisoría

En la etapa preliminar del estudio de toxicidad por contacto se evaluaron 51 CQs de AEs a una dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{adulto}$, encontrándose 26 compuestos potencialmente activos que causaron un porcentaje de mortalidad mayor o igual al 60%, conformando la submuestra n_j . Los resultados se presentan en la figura 3.4, donde se puede observar que todos los compuestos que exhibieron una actividad significativa son oxigenados, de tipo fenilpropanoide (5 compuestos), monoterpenoide (17 compuestos) y cetonas alifáticas (4 compuestos). En este estudio se describe por primera vez la toxicidad por contacto frente a *S. zeamais* de *R*-(-)- α -felandreno, terpinoleno, γ -terpineno, timol, farneseno, farnesol y metil isoeugenol. Del mismo modo es el primer reporte del efecto tóxico a 24 h. de evaluación para sabineno, α -terpineno, p-cimeno y nerolidol, compuestos que presentaron una actividad leve (menor a 27.5% a 50 $\mu\text{g}/\text{adulto}$), pero que reportan una toxicidad alta a 7 día de evaluación, sugiriendo que el efecto tóxico se mantiene en el transcurrir del tiempo [87,93,94]. Adicionalmente, los resultados obtenidos son congruentes con los estudios encontrados para limoneno (1877.0 $\mu\text{g}/\text{adulto}$), α -pineno (347.0 $\mu\text{g}/\text{adulto}$) y metil eugenol (aprox. 76.4 $\mu\text{g}/\text{adulto}$), puesto que las DL_{50} reportadas son superiores a la dosis máxima evaluada en este estudio (50 $\mu\text{g}/\text{adulto}$) [80,82].

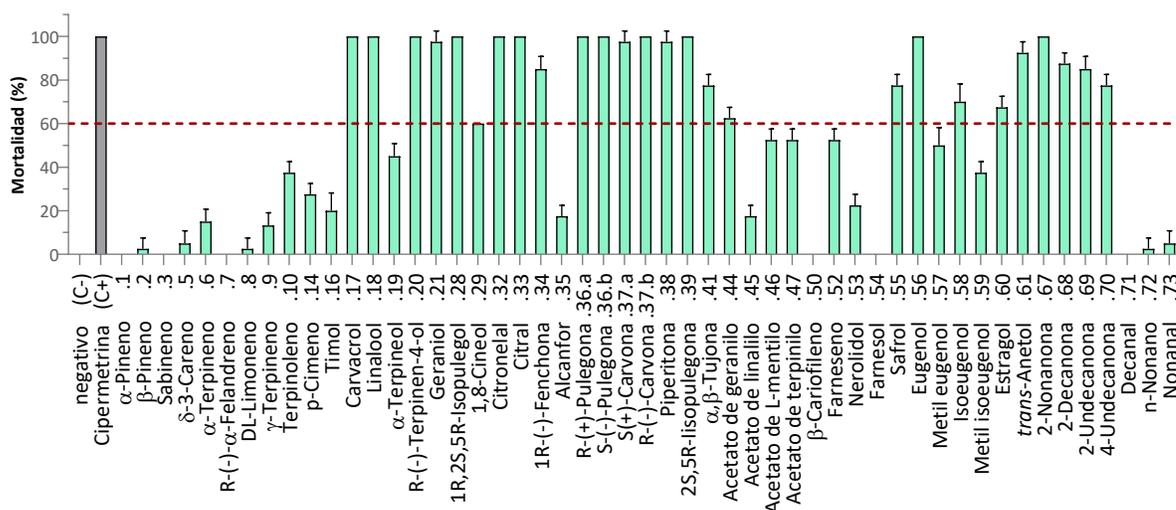


Figura 3.4: Mortalidad de *S. zeamais* por acción tóxica por contacto de compuestos químicos volátiles evaluados a 50 $\mu\text{g}/\text{adulto}$

Entre los compuestos volátiles seleccionados por ser constituyentes mayoritarios en AEs con toxicidad únicamente por contacto, se determinaron a *trans*-anetol, carvacrol, acetato de geranilo, citronelal, citral y linalool, como compuestos con significativa actividad por contacto y ausencia de efecto fumigante. Los resultados permitieron indicar que estos constituyentes químicos aportan significativamente a la acción por contacto que presentan los AEs que los contienen. De esta forma, para la actividad toxica por contacto (evaluada a 0.15 μ L/adulto) del AE de *I. verum* (96.7% de letalidad) es importante la presencia de *trans*-anetol (93.40%), para el AE de *C. citratus* (93.3% de letalidad) es necesaria la presencia de citral (44.62%) y para el AE de *Piper aduncum* (100% de letalidad) es importante la presencia de linalool (22.43%) y piperitona (45.46%) (anexo A1[27]). No obstante, en el estudio se determinó que algunos de los constituyentes mayoritarios presentes en el AE de *A. cumanensis*, constituido en su mayor parte por sesquiterpenos (76.34%) y *Coleonema álbum*, *Piper pertomentellum* y *Ocotea* sp, conformados mayoritariamente por monoterpenos de tipo hidrocarburo (mayor al 42%), al parecer no aportan significativamente a la acción por contacto exhibida por los AEs, debido a que este tipo de compuestos causaron letalidades menores al 40%. El ensayo realizado también permitió determinar la acción por contacto de safrol (*P. asperiusculum* 0.33%, *P. nubigenum* 0.28%), eugenol (*O. basilicum*: 0.33%, *C. nardus*: 1.14%, *Lippia* sp.: 0.22%), linalool (*C. citratus*: 1.35%, *P. pertomentellum*: 0.26%, *O. basilicum*: 2.17%) y 2-undecanona (*P. pertomentellum* 0.07%). Del estudio se resalta al compuesto linalool, al ser constituyente en 10 de los 19 AEs con efecto por contacto, indicando que puede estar potenciando el efecto toxico por contacto de los aceites. Por tanto, al considerar las razones anteriormente descritas se deduce que la acción tóxica por contacto no se debe únicamente a sus componentes mayoritarios, sino también a la relación con sus constituyentes minoritarios, de acuerdo con lo descrito en la literatura [22,59]. Finalmente, de los compuestos volátiles seleccionados por ser constituyentes mayoritarios en AEs con acción insecticida fumigante y por contacto, se establecieron como significativos los compuestos 1,8-cineol, *R*-(+)- y *S*-(-)-pulegona, *1R*-(-)-fenchona, piperitona, estragol, *R*-(-)- y *S*-(+)-carvona, para atacar al insecto por las dos vías de acción y a los compuestos *trans*-anetol, citronelal, citral, acetato de geranilo y carvacrol, como determinante en la toxicidad por contacto de estos AEs.

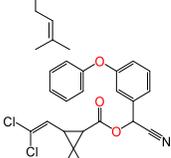
Los 26 compuestos bioactivos del ensayo tóxico por contacto (submuestra n_7), se sometieron a un estudio para determinar los efectos generados en la mortalidad del insecto por variación de la dosis de cada compuesto volátil, y así estimar las DL_{50} y DL_{90} . Los datos de las dosis letales para los compuestos bioactivos se enlistan en la tabla 3.2, junto con los valores de pendiente (β_i) y significancia (ρ valor), de cada una de las ecuaciones que representan las regresiones aplicadas en el

análisis probit. Para facilitar la discusión de los resultados, se continua con la codificación de la actividad fumigante (C), organizando los compuestos en términos de sus DL_{50} , a fin de correlacionar la totalidad de compuestos con acción insecticida sobre *S. zeamais*. Por consiguiente, con el objeto de estimar el rango de dosis necesario para efectuar un cambio apreciable en la mortalidad de *S. zeamais*, se determinó si los valores de pendiente son significativos en el modelo *probit*, formulándose las siguientes hipótesis: $H_0: \beta_i = 0$; $H_1: \beta_i \neq 0$. Los resultados obtenidos indicaron que todos los valores de significancia fueron inferiores al valor $\alpha = 0.05$, por lo que se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que todos los compuestos son significativos en el modelo y, por lo tanto, pueden incluirse en el mismo.

Tabla 3.2: Toxicidad por contacto (DL) de los compuestos volátiles contra *S. zeamais*

Cod.	Compuesto	Estructura	DL_{50} (95% LC)	DL_{90} (95% LC)	β_i \pm SE	ρ ($\alpha < 0.05$)
C1	<i>R</i> -(+)-Pulegona		4.85 (4.35 - 5.32)	7.40 (6.79 - 8.28)	0.51 ± 0.060	8.9E-17
C2	<i>S</i> -(-)-Pulegona		7.44 (7.00 - 7.89)	9.64 (9.05 - 10.54)	0.58 ± 0.075	6.7E-15
C25	Carvacrol		8.71 (7.92 - 9.56)	13.45 (12.19 - 15.38)	0.27 ± 0.033	5.9E-16
C22	Piperitona		9.45 (8.612 - 10.41)	14.70 (13.25 - 16.96)	0.70 ± 0.190	3.6E-15
C23	2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> -Isopulegona		11.14 (9.64 - 12.49)	18.48 (16.56 - 21.64)	0.45 ± 0.022	1.0E-17
C3	<i>S</i> -(+)-Carvona		12.68 (10.91 - 14.60)	23.24 (20.46 - 27.42)	0.12 ± 0.015	1.6E-16
C4	<i>R</i> -(-)-Carvona		16.89 (14.56 - 19.35)	28.45 (24.99 - 34.24)	0.11 ± 0.012	1.2E-19
C7	1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> -Isopulegol		18.99 (17.70 - 20.15)	26.65 (25.07 - 28.90)	0.17 ± 0.019	1.2E-18
C5	<i>R</i> -(-)-Terpinen-4-ol		19.64 (18.42 - 21.45)	24.82 (22.64 - 29.63)	0.25 ± 0.035	1.3E-12
C26	Eugenol		20.90 (19.22 - 22.65)	30.82 (28.35 - 34.42)	0.13 ± 0.015	5.2E-18
C27	Citral		21.42 (19.34 - 23.61)	32.68 (29.77 - 36.82)	0.11 ± 0.013	5.9E-19

66 Estudio de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales y su efecto sobre enzimas desintoxicantes y de función motora para *Sitophilus zeamais*

Cod.	Compuesto	Estructura	DL ₅₀ (95% LC)	DL ₉₀ (95% LC)	β_i \pm SE	ρ ($\alpha < 0.05$)
C28	Linalool		21.87 (19.09 – 24.23)	36.23 (33.20 – 40.64)	0.09 \pm 0.011	7.1E-16
C29	<i>trans</i> -Anetol		26.25 (22.85 – 29.37)	46.08 (41.56 – 52.95)	0.06 \pm 0.008	3.8E-15
C30	Geraniol		28.13 (25.70 – 30.49)	41.06 (37.98 – 45.41)	0.01 \pm 0.011	4.5E-18
C31	Isoeugenol		29.10 (24.40 – 34.21)	66.20 (57.28 – 80.01)	0.03 \pm 0.004	3.9E-16
C9	2-Nonanona		31.86 (30.27 – 33.17)	39.69 (38.01 – 42.15)	0.16 \pm 0.021	6.7E-15
C6	$\alpha\beta$ -Tujona		32.04 (29.44 – 34.42)	44.67 (41.56 – 49.34)	0.10 \pm 0.013	2.3E-14
C8	<i>1R</i> (-)-Fenchona		34.65 (32.19 – 37.08)	48.33 (45.12 – 52.78)	0.09 \pm 0.010	1.3E-20
C32	Safrol		36.31 (30.15 – 42.37)	83.04 (73.50 – 96.63)	0.03 \pm 0.003	1.7E-21
C33	Citronelal		36.94 (34.60 – 39.14)	50.64 (47.46 – 55.39)	0.09 \pm 0.012	5.9E-16
C34	4-Undecanona		37.05 (34.09 – 40.01)	53.95 (49.63 – 60.68)	0.08 \pm 0.010	2.4E-14
C35	2-Decanona		38.04 (35.29 – 40.84)	57.17 (52.97 – 63.12)	0.07 \pm 0.007	1.5E-21
C36	2-Undecanona		42.86 (40.60 – 45.30)	57.13 (53.43 – 62.83)	0.09 \pm 0.011	8.5E-16
C11	Estragol		45.59 (38.53 – 53.40)	79.66 (68.62 – 99.73)	0.038 \pm 0.005	8.8E-17
C10	1,8 Cineol		56.55 (53.14 – 60.22)	79.45 (73.78 – 87.99)	0.056 \pm 0.002	3.0E-150
C37	Acetato de geraniol		73.00 (65.98 – 81.05)	126.06 (112.84 – 146.08)	0.02 \pm 0.003	5.8E-18
C+	Cipermetrina		10.49 (0.10 – 19.96)	35.79 (21.98 – 84.37)	0.08 \pm 0.019	0.023

Este estudio presenta los primeros resultados del efecto tóxico por contacto frente a *S. zeamais* para los compuestos *1R,2S,5R*-isopulegol (C7), 2-nonanona (C9), *2S,5R*-isopulegona (C23), carvacrol

(C25), citral (C27), *trans*-anetol (C29), 4-undecanona (C34), 2-decanona (C35), 2-undecanona (C36) y de los enantiómeros de pulegona por separado (C1, C2). Igualmente, es el primer informe de una evaluación directa sobre el insecto y no sobre una superficie, para los compuestos *S*-(+)-carvona (C3), $\alpha\beta$ -tujona (C6), citronelal (C33), *IR*-(-)-fenchona (C8) y acetato de geranilo (C37). Es importante mencionar que los resultados no son comparables con los reportados en la literatura, puesto que implementan métodos de superficie con o sin medio de cultivo, que pueden exponer al insecto a otros efectos de comportamiento, como la repelencia o la disuasión alimentaria [74,84]. Asimismo, se presenta el primer reporte a 24h de evaluación de las DL_{50} ($\mu\text{g}/\text{adulto}$) para C4 (16.89), C11(45.59), C29 (26.25) y C33(36.94), los cuales son valores mayores a lo reportado previamente y en donde los ensayos se llevaron a cabo en periodos de 7 días, de 2.79, 17.62, 13.9 y 8.54 para C4, C11, C29 y C33, respectivamente, sugiriendo que el efecto tóxico de estas sustancias mediante la vía de contacto, sigue actuando durante varios días en el insecto [69,81,91].

3.1.4 Análisis cluster para correlacionar la toxicidad por contacto de los compuestos activos

El análisis cluster de los compuestos volátiles tóxicos por contacto, condujo a agruparlos en tres conglomerados mediante el modelo *agnes* como se indica en la figura 3.5. De este modo, en el primer cluster (G1 - azul), se ubican los nueve compuestos más activos, al presentar $DL_{50} < 20 \mu\text{g}/\text{adulto}$ y los valores de pendiente más altos, que corresponden a: *R*-(+)-pulegona (C1), *S*-(-)-pulegona (C2), *S*-(+)-carvona (C3), *R*-(-)-carvona (C4), *R*-(-)-terpinen-4-ol (C5), isopulegol (C7), piperitona (C22), isopulegona (C23) y carvacrol (C25). Los otros dos grupos presentan similitud en sus respuestas de mortalidad, donde las DLs de G2 (amarillo) presentan una distribución sesgada a la izquierda, haciendo que sus compuestos sean un poco más activos que los de G3. No obstante, la característica que realmente diferencia los dos clusters es el esqueleto carbonado, ubicando en el segundo cluster (G2 - amarillo) estructuras bicíclicas y aromáticas con actividad moderada ($20 < DL_{50} < 38 \mu\text{g}/\text{adulto}$), por lo que allí están presentes $\alpha\beta$ -tujona (C6), *IR*-(-)-fenchona (C8), estragol (C11), eugenol (C26), *trans*-anetol (C29), isoeugenol (C31) y safrol (C32). Finalmente, en el tercer cluster (G3 - verde) quedaron establecidos 10 compuestos con actividad moderada-leve, con las concentraciones letales 30 y 50 más altas ($21 < DL_{50} < 73 \mu\text{g}/\text{adulto}$), entre los que se encuentran: 2-nonanona (C9), 1,8-cineol (C10), citral (C27), linalool (C28), geraniol (C30), citronelal (C33), 4-undecanona (C34), 2-decanona (C35), 2-undecanona (C36) y acetato de geranilo (C37).

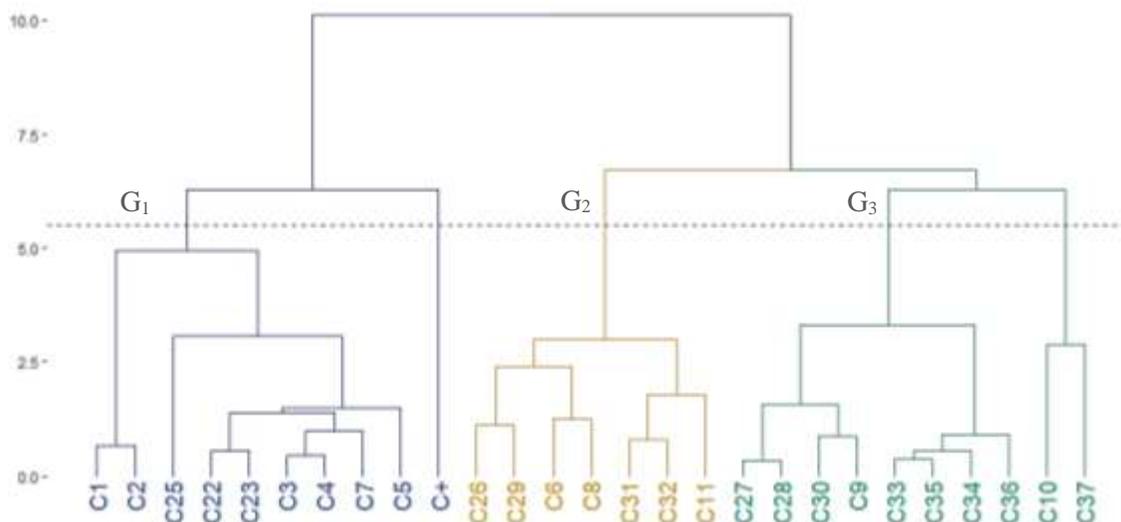


Figura 3.5: Dendrograma de análisis Cluster de los compuestos volátiles tóxicos por contacto.

El dendrograma muestra cómo las dos primeras subdivisiones de G1 (C1, C2 y C25), se distribuyen por ser los compuestos con mejor respuesta de mortalidad al contacto, debido a la altura jerárquica. Inclusive, estos compuestos presentan una toxicidad mayor que el C+, el cual se encuentra como un grupo unitario al presentar más de un ciclo en su estructura. Dentro del gráfico, se observan distancias cortas entre la pareja C1 y C2, debido a que son enantiómeros y entre los compuestos C10 y C37, debido a que son monoterpenoides pertenecientes al único éter y éster de tipo monoterpeno de la submuestra n_j , estas divisiones en parejas es una de las razones por las que no se seleccionó un mayor número de agrupaciones.

Cada uno de los grupos del diagrama de dispersión se caracterizaron teniendo en cuenta algunos rasgos fisicoquímicos y estructurales de los compuestos, descritos en el anexo C.1. La información se clasificó en un gráfico de frecuencias (figura 3.6), de tal manera que la categoría general fue cada uno de los conglomerados. Los grupos se discriminaron, inicialmente, en los logaritmos (Log) de los coeficientes de partición ($\text{Log}K_{ow} \geq 3.5$ o $\text{Log}K_{ow} < 3.5$), seguido del esqueleto carbonado que conforma la molécula (acíclico, monocíclico, bicíclico y aromático) y las funciones orgánicas que constituyen las estructuras químicas (cetona, alcohol, aldehído, éster y éter). El gráfico de frecuencias también incluyó el tipo de metabolito (alifático, monoterpenoide y fenilpropanoide) y el precursor biosintético como variable sumativa caracterizada con colores.



Figura 3.6: Grafico de frecuencias de las características fisicoquímicas y bioquímicas de los compuestos volátiles de los clusters de la toxicidad por contacto

De manera general en el gráfico de frecuencias se observa que el cluster G1 contiene principalmente monoterpenoides monocíclicos (8 compuestos), derivados del catión α -terpinilo (7 compuestos) y con función orgánica cetona (6 compuestos). Adicionalmente, todos los compuestos presentan bajos coeficientes de partición, indicando que la disminución en el carácter lipofílico de los metabolitos volátiles mejora su toxicidad por contacto. Este resultado concuerda con estudios del efecto insecticida de monoterpenos, el cual indica que las moléculas con mayores LogK_{ow} , se pueden estar reteniendo en la cutícula del insecto por su alta hidrofobicidad [134,148]. En el mismo modo se observa que el cluster G2, está conformado principalmente, fenilpropanoides con un grupo éter en su estructura (5 compuestos), algunos de ellos derivados del acetato de coniferilo (3 compuestos), y cetonas monoterpénicas bicíclicas (2 compuestos). Así mismo, en el cluster G3 se observa que está constituido principalmente por compuestos acíclicos (9 compuestos), varios de ellos con un carbono carbonilo en su estructura (5 compuestos). De acuerdo con lo anterior se puede deducir que las que las estructuras acíclicas tienden a disminuir el modo de acción por contacto.

Al analizar la actividad por contacto de los compuestos evaluados, se pudieron establecer algunas relaciones de estructura-actividad preliminar. Al respecto, el estudio sugiere que la presencia de

monoterpenoides oxigenados es importantes para la actividad tóxica por contacto, dado que 17 de los 26 compuestos bioactivos presentan este tipo de núcleo. Al comparar los valores promedio de CL_{50} de los monoterpenoides acíclicos con función orgánica alcohol (C28 y C30), se encontró que la CL_{50} es 1.3 veces mejor cuando el de esqueleto carbonado es monocíclico (C5 y C7). Por otro lado, al comparar la función orgánica cetona se determinó que la actividad es alrededor de 3.5 veces mayor cuando la estructura es del tipo monoterpenoide monocíclico (C1, C2, C3, C4, C22 y C23) en comparación con el promedio las cetonas alifáticas y monoterpénicas bicíclicas (C6, C8, C9, C34, C35 y C36). Del mismo modo al contrastar las cetonas alifáticas (C9, C35 y C36,) se identificó que la elongación progresiva de la cadena carbonada favorece el efecto insecticida. Adicionalmente, al contrastar los aldehídos monoterpénicos acíclicos, se identificó que el aumento en el número de insaturaciones favorece la toxicidad por contacto, al encontrar que C27 es alrededor de dos veces más activo que C33. Finalmente, al analizar la función orgánica éter presente como heterociclo, se encontró que C10 es aproximadamente 2 veces menos activo que los otros monoterpenoides bicíclicos oxigenados (C6, C8) y que el fenilpropanoide C32 es 1.5 veces menos letal que sus precursores biosintéticos C26 y C31. Lo cual sugirió que las estructuras heterocíclicas oxigenas disminuye el efecto insecticida por contacto sobre *S. zeamais*.

Consecuentemente, el estudio también expuso el tipo de compuestos que no exhiben potencial actividad por contacto, dentro de los cuales se encuentran principalmente monoterpenoides de tipo hidrocarburos, sesquiterpenoides, aldehídos e hidrocarburos alifáticos. La baja acción por contacto de los compuestos de tipo hidrocarburos probablemente puede estar relacionando a su mayor carácter lipofílico en comparación a los compuestos oxigenados y por lo que pueden estar quedando retenidos en la cutícula del insecto [134,148]. Finalmente, se puede resaltar que los monoterpenoides oxigenados pueden ser sustancias con acción toxica fumigante y contacto sobre *S. zeamais*. Adicionalmente, se destacan a los enantiómeros de pulegona (C1 y C2), como los compuestos con mayor acción insecticida, comparable con los controles positivos, tanto para la toxicidad fumigante como por contacto.

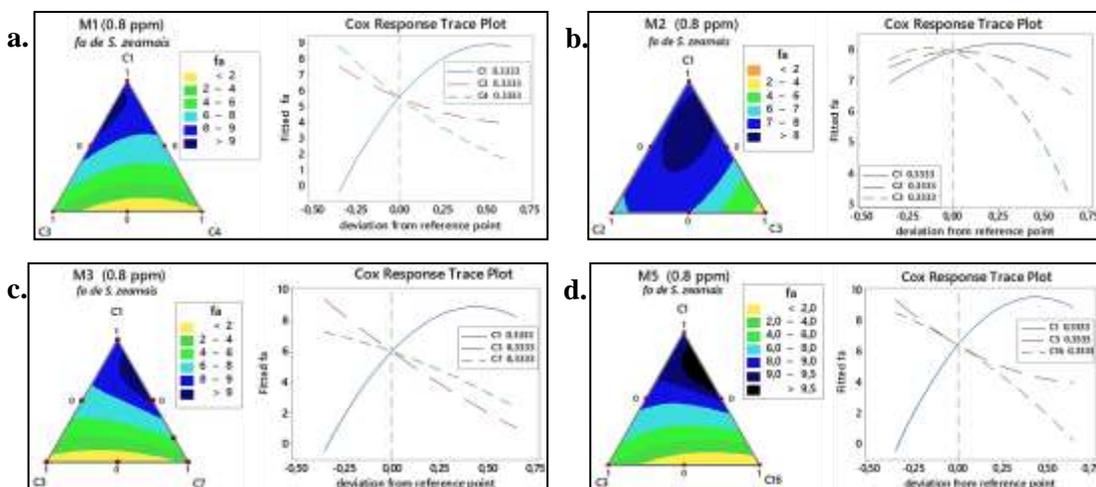
3.2 Potencialización de la acción insecticida a partir del diseño de mezclas con metabolitos volátiles bioactivos frente a *S. zeamais*

En el estudio de potencialización de la actividad insecticida de los compuestos volátiles bioactivos mediante el diseño de mezclas, inicialmente se plantearon combinaciones ternarias de dichos compuestos como un prediseño, de forma independiente para la actividad fumigante y por contacto. El prediseño se realizó de forma manual, basándose en los resultados de los análisis cluster para la acción fumigante y por contacto, descritos en las secciones 3.1.2 y 3.1.3 (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En este sentido, se propusieron mezclas entre compuestos del mismo grupo y entre compuestos de grupos distintos y algunas de las mezclas se fundamentaron en la composición química de los AEs bioactivos. Finalmente, la metodología cluster permitió prediseñar 20 mezclas ternarias en la toxicidad fumigante (M1 a M20) y 9 en la toxicidad por contacto (MC1 a MC9) (Tabla 2.2).

Las mezclas resultantes se analizaron por un modelo de superficie de respuesta (MSR) mediante un diseño simplex-lattice {3,2}, con el fin de establecer la proporción en que los compuestos causan la respuesta de letalidad más efectiva. Los modelos generales (cuadráticos) del MSR fueron altamente significativos ($\rho < 0.001$ y $F > 10.00$) y la variación no interfirió con la precisión del modelo ($R^2 > 0.850$). Adicionalmente, la eficiencia de las respuestas se vio fortalecida al encontrar una diferencia menor a 0.10 entre los tres coeficientes de determinación (R^2 , R^2_{pred} y R^2_{adj}), descritos en los ANOVA del anexo D.1. Los ANOVA permitieron rechazar las hipótesis nulas ($H_0: \mu_i = 0$), excepto en las combinaciones binarias cuadráticas que no exhibieron una varianza significativa. Este es el caso de C10 + C19 en **M14** ($F = 0.18$; $\rho = 0.70$), C22 + C16 en **M6** ($F = 0.00$; $\rho = 1.00$), C28 + C29 en **MC8** ($F = 0.03$; $\rho = 0.86$), C22 + C18 ($F = 0.00$; $\rho = 1.00$) y C1 + C22 en **M18** ($F = 0.16$; $\rho = 0.70$), combinaciones que no se ajustaron de forma significativa al modelo y por lo tanto fueron rechazadas (anexo D1) [151]. El MSR también rechazó las combinaciones cuadráticas (binarias) con valores negativos en los coeficientes de relación (anexo D1), los cuales indican antagonismo a causa de una respuesta no predicha por la combinación aditiva del modelo lineal. Este comportamiento se observó en las combinaciones C3 + C4 en **M1** (Coef= -11.00) y C1 + C26 (Coef= -6.29) y C25 + C26 (Coef= -1.60) en **MC1**. De esta manera, aunque se prediseñaron mezclas ternarias el modelo MSR rechazó algunas interacciones entre dos compuestos, lo que condujo a que el modelo predijera también algunas mezclas binarias. A partir de las 20 mezclas prediseñadas para el efecto fumigante, el MSR predijo como potencialmente tóxicas a 2 mezclas ternarias (M2 y M12) y 8 binarias (M1, M3, M4,

M5-M7, M14, M16, M18 y M20) (submuestra n_{i1}). A partir de las 9 mezclas prediseñadas por acción tóxica tóxica, el modelo MSR postuló 4 mezclas binarias (MC1, MC6-MC8) y una ternaria (MC9) (submuestra n_{j1}), todas sucintas en la tabla 3.3.

En la figura 3.7 se presentan las gráficas de contornos de superficie que permiten estimar la eficacia insecticida de las combinaciones, en los cuales se codifica el rango de la fracción afectada (fa) en colores, extendiéndose desde negro (fa > 9.5) hasta naranja (fa < 2.0). Adicionalmente, en la figura también se presentan las gráficas de trazas de efectos Cox, las cuales permiten identificar la efectividad de cada componente dentro de la mezcla. En este sentido, se observa tanto para el efecto fumigante como tóxico por contacto, que en las mezclas donde se encuentra *R*-(+)-pulegona (C1) como componente, la pendiente de la gráfica de efectos Cox, asociada a este compuesto siempre es prominentemente positiva, lo que indica que este componente tiene una alta efectividad en la mezcla. Consecuentemente, en los diagramas de contornos de las mezclas en las que está presente C1, se aprecia que el color negro y azul oscuro tienden a ubicarse hacia su vértice, sugiriendo que las mezclas que contienen altas proporciones de C1 tendrán un mayor efecto insecticida (figura 3.7 a, b, c, g y k). El mismo comportamiento se observó por la presencia de C3 en las mezclas M6 y M7, de C10 en M14, de C23 en M20 y de C26 en MC6, ya que presentan pendientes prominentemente positivas en el gráfico de trazas Cox.



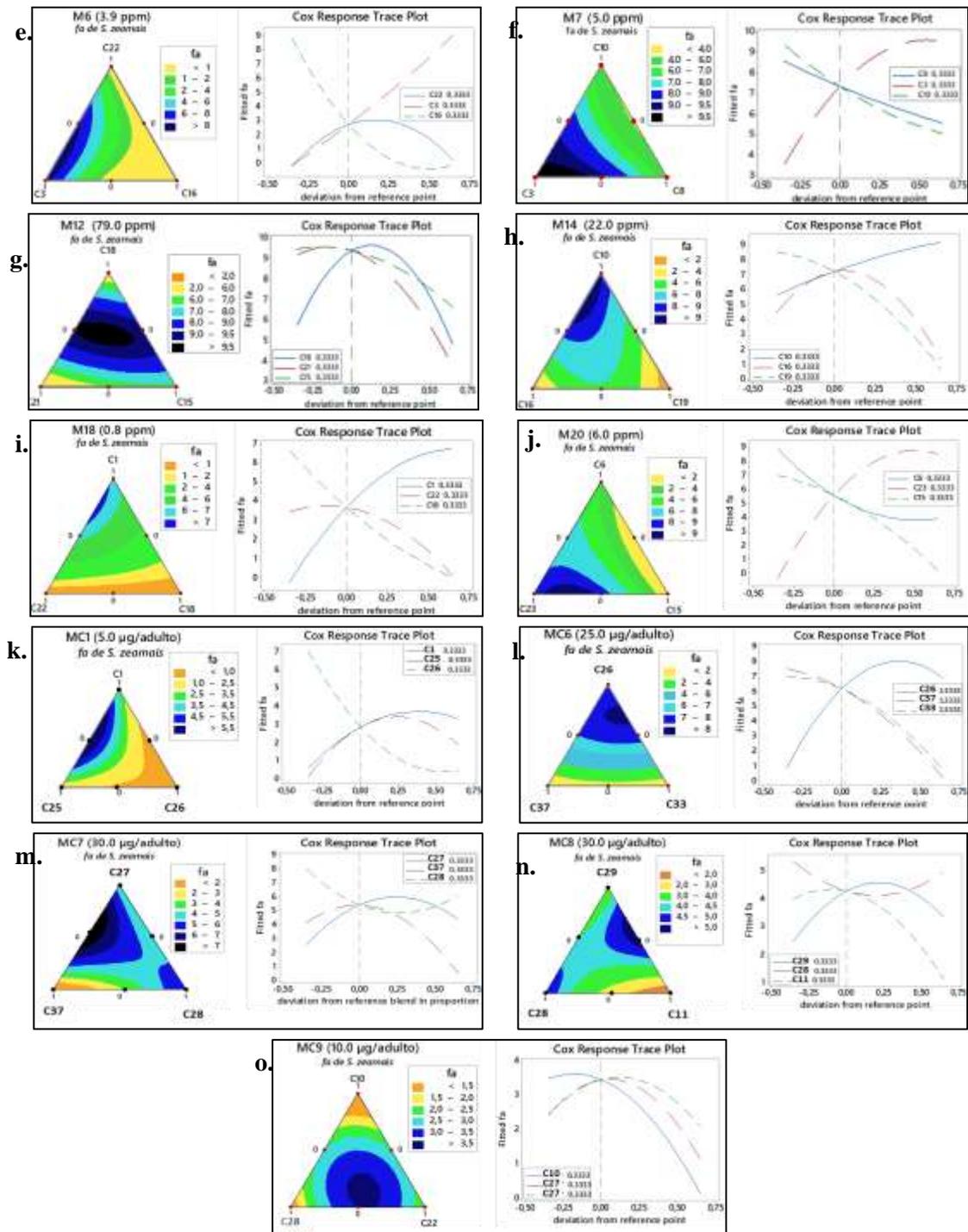


Figura 3.7: Gráficos de superficie de respuesta que muestran la influencia de la proporcionalidad, de los compuestos volátiles en la toxicidad fumigante y por contacto sobre *S. zeamais*. Mezclas tóxicas fumigantes **a)** M1 (C1 + C3 + C4), **b)** M2 (C1 + C2 + C3), **c)** M3 (C1 + C3 + C7), **d)** M5 (C1 + C3 + C16), **e)** M6 (C3 + C16 + C22) **f)** M7 (C10 + C3 + C8), **g)** M12 (C18 + C15 + C21) **h)** M14 (C10 + C16 + C19), **i)** M18 (C1 + C18 + C22), **j)** M20 (C6 + C15 + C23). Mezclas tóxicas por contacto **k)** MC1 (C1 + C25 + C26), **l)** MC6 (C26 + C33 + C37), **m)** MC7 (C27 + C28 + C37), **n)** MC8 (C29 + C11 + C28) y **o)** MC9 (C10, C22, C28).

En el gráfico de contornos para M12 se observa que el color negro se concentra en el centro del triángulo, lo que sugiere que los tres componentes de la mezcla son responsables de potenciar el efecto fumigante sobre *S. zeamais* y por esta razón el MSR optimiza la respuesta de mortalidad a las proporciones de mezcla de C18, C21 y C15 a 0.46:0.31:0.23. Un comportamiento similar se observa para las mezclas M2 y MC9. El análisis del gráfico de contornos para M5 permite establecer que la eficacia de la mezcla es mayor cuando se combinan los componentes C1 y C16 en proporción 0.74:0.26, pues la zona de color negro se concentra hacia la arista que conecta los vértices correspondientes a los compuestos C1 y C16. Este caso corresponde a un ejemplo de predicción de mezclas binarias por el modelo MSR, cuando este rechaza algunas interacciones entre dos componentes y elimina a uno de los compuestos de la mezcla ternaria prediseñada. Esta misma tendencia se observa para las mezclas M1, M3, M4, M6, M7, M14, M16, M18, M20, MC1, MC3, MC6, MC7 y MC8. En la tabla 3.3 se resumen los resultados predichos por el modelo MSR de los componentes a mezclar y sus proporciones, en la cual también se observa que las mezclas M8, M15, M17 y MC5, evidenciaron una respuesta de letalidad antagónica, al presentar efectos tóxicos mucho menores al compuesto individual. Esta interacción antagónica también la predice el modelo, al obtener valores negativos en los coeficientes de relación, para todas las interacciones binarias de cada una de estas mezclas en el ANOVA, razón por la que no se consideraron potenciales.

Tabla 3.3: Efecto insecticida de las mezclas predichas por MSR

Toxicidad fumigante							Toxicidad por contacto						
Cod	Mezclas prediseñadas (A + B + C)			Mezclas estimadas por MSR			Cod	Mezclas prediseñadas (A + B + C)			Mezclas estimadas por MSR		
	Componentes (Proporción)	ppm mg/L ^a	Mortalidad (%) ± S	Componentes (Proporción)	µg/adulto ^b	Mortalidad (%) ± SE							
M1	C1	C3	C4	C1 : C3 0.73 : 0.27	0.6	67.5 ± 5.0	MC1	C1	C25	C26	C1 : C25 0.79 : 0.21	5.0	73.3 ± 5.8
M2	C1	C2	C3	C1 : C2 : C3 0.65 : 0.14 : 0.21	0.6	87.5 ± 5.0	MC2	C9	C25	C26	C1 1.00		ND
M3	C1	C3	C7	C1 : C7 0.67 : 0.33	0.6	52.5 ± 5.0	MC3	C1	C25	C34	C1 : C25 0.79 : 0.21		ND
M4	C1	C3	C5	C1 : C3 0.73 : 0.27		ND	MC4	C25	C25	C34	C25 1.00		ND
M5	C1	C3	C16	C1 : C16 0.74 : 0.26	0.6	60.0 ± 8.2	MC5	C1	C5	C10	C1 : 1.00 (al combinar C10)*	0.6	ND
M6	C22	C3	C16	C3 : C22 0.80 : 0.20	2.9	35.0 ± 5.7	MC6	C26	C37	C33	C26 : C33 0.70 : 0.30	20.0	57.5 ± 9.6
M7	C8	C3	C10	C8 : C3 0.1 : 0.90	2.9	7.5 ± 5.0	MC7	C27	C37	C28	C27 : C37 0.59 : 0.41	22.0	37.5 ± 5.0
M8	C8	C7	C6	C9 -1.00 (toda combinación)*		ND	MC8	C29	C11	C28	C29 : C11 0.60 : 0.40	22.0	50.0 ± 8.2
M9	C12	C9	C10	C9 : 1.00		ND	MC9	C22	C10	C28	C10 : C28 : C22 0.65 : 0.14 : 0.21	9.5	40.0 ± 8.2
M10	C20	C19	C17	C17 : 1.00		ND							
M11	C14	C19	C16	C16 : 1.00		ND							

M12	C18	C21	C15	C18 : C21 : C15 0.46 : 0.31 : 0.23	66.4	97.0 ± 5.8
M13	C14	C12	C16	C12 : 1.00		ND
M14	C10	C16	C19	C10 : C16 0.75 : 0.25	13.0	7.5 ± 5.0
M15	C11	C12	C13	C11- 1.00 (toda combinación)*		ND
M16	C10	C16	C18	C10 : C16 0.75 : 0.25		ND
M17	C10	C5	C18	C5:1.00 (al combinar C5)*		ND
M18	C1	C22	C18	C1 : C22 0.75 : 0.25	0.6	40.0 ± 5.0
M19	C3	C15	C18	C3 : 1.00		ND
M20	C6	C23	C15	C23:C15 0.74 : 0.26	2.9	70.0 ± 8.2

^aConcentración a la que se evaluó la mezcla para verificar la predicción del MSR, correspondiente a la CL₅₀ del componente más activo de esa combinación.

^bDosis a la que se evaluó la mezcla para verificar la predicción del MSR, correspondiente a la DL₅₀ del componente más activo de esa combinación.

*Mezclas con respuestas de letalidad desfavorables (antagónicas) en una o varias de las combinaciones binarias.

ND. No se determinó la actividad insecticida, debido a que fue rechazada por el modelo al presentar efecto antagónico y/o porque la predicción no correspondió a una mezcla.

Al contrastar las combinaciones de los compuestos con los AEs que los contienen, la toxicidad siempre fue mayor en las mezclas diseñadas por el MSR, apreciando una interacción sinérgica que coincide en cierto modo con la proporción en que se encuentran en algunos AEs. Un caso es la mezcla M12, en la cual se ve potenciado el efecto fumigante al combinar 3 de los CQs que se encuentran en mayor porcentaje en el aceite de *C. sempervirens* (C18: 9.39%, C21: 58.9%, C15: 11.93%). M12 fue la única mezcla constituida exclusivamente por compuestos con efecto insecticida por inhalación (hidrocarburos), atribuyendo su potencial fumigante a la combinación de las estructuras bicíclicas provenientes de los cationes α -terpinen-4-ilo (C18) y α -terpinilo (C15). Esta atribución se hace con base a los resultados de otras mezclas constituidas únicamente por compuestos de tipo hidrocarburo, que no incluían a C18 y C15, como el caso de las predicciones de M10, compuesta por los CQs mayoritarios de los AEs de *H. mexicanum* e *H. myricariifolium*, (C20, C19 y C17) y de M11 conformada por los CQs mayoritarios del AE de *P. el-metanum* (C19: 8.48%, C16:19.36%, C14: 43.47%). Las combinaciones M10 y M11 sugirieron que la acción insecticida de estos AEs, probablemente se debe más al efecto individual de los compuestos que se encuentran en mayor porcentaje o a su interacción con otros compuestos minoritarios. En este sentido, también se identificó que C28, constituyente químico de 10 de los 19 AEs tóxicos por contacto, siempre mostró un mejor efecto individual a altas proporciones, tal como se representa en MC7 y MC8 (figuras 3.7-m, n). Esta aproximación se basa en el comportamiento cóncavo de C28 en los gráficos Cox y al color azul oscuro en su vértice en los gráficos de contornos, sin embargo, el color negro en estos

gráficos se presenta en la arista opuesta a su vértice (proporción cercana a cero). Lo cual indica que el efecto tóxico por contacto de C28 es mejor de forma individual, pero en bajas proporciones juega un papel sinergista dentro del AE, potenciando la actividad de otros CQs [77].

Para verificar las combinaciones predichas por el MSR, se prepararon las 10 mezclas fumigantes y las 5 mezclas por contacto, en la proporción estimada y se evaluó su efecto sobre *S. zeamais* a una concentración equivalente a la CL_{50} o DL_{50} del componente más activo de la mezcla. Los resultados de actividad insecticida de las mezclas preparadas se presentan en la tabla 3.3, la cual muestra que 6 mezclas fumigantes (M1, M2, M3, M5, M12 y M20) y 3 mezclas tóxicas por contacto (MC1, MC6 y MC8) causaron un efecto insecticida igual o superior al de sus componentes individuales, ocasionando mortalidades $\geq 50\%$.

Las 9 mezclas que alcanzaron o superaron el 50% de letalidad sobre *S. zeamais* se sometieron a un estudio para determinar los efectos generados en la mortalidad del insecto por variación de la concentración y de la dosis de cada mezcla, con el fin de comprobar, si la interacción de sus componentes también potencia la otra vía de acceso insecticida evaluada. Adicionalmente, en este estudio se incluyó la mezcla M21 constituida por los enantiómeros de la pulegona (C1 y C2), obteniendo un total de 10 mezclas para evaluar como potenciales insecticidas (submuestra n_{ij}). Los resultados del estudio del efecto fumigante y tóxico por contacto de las mezclas seleccionadas son presentados en la tabla 3.4.

Tabla 3.4: Toxicidad fumigante y por contacto de las mezclas de compuestos volátiles sobre *S. zeamais*

Cod.	Mezclas A+B / A+B+C (proporción)			Toxicidad Fumigante			Toxicidad por contacto		
				CL_{50} (LC-95%) mg/L	CL_{90} (LC-95%) mg/L	$\beta_i \pm DE$	DL_{50} (LC-95%) $\mu\text{g/adulto}$	DL_{90} (LC-95%) $\mu\text{g/adulto}$	$\beta_i \pm DE$
	M1	C1 (0.73)	C3 (0.27)	0.54 (0.38 – 0.73)	1.05 (0.83 – 1.82)	2.54 \pm 0.78	9.17 (4.09 – 13.97)	17.21 (12.92 – 39.84)	0.16 \pm 0.60
M2	C1 (0.65)	C2 (0.14)	C3 (0.21)	0.48 (0.35 – 0.55)	0.68 (0.576 – 0.951)	5.84 \pm 1.55	6.36 (3.85 – 9.31)	10.50 (8.12 – 21.29)	0.31 \pm 0.11
M3	C1 (0.67)	C7 (0.33)		0.63 (0.45 – 0.81)	1.01 (0.83 – 1.61)	3.36 \pm 1.02	9.01 (6.00 – 12.74)	14.76 (11.53 – 26.22)	0.22 \pm 0.71
M5	C1 (0.74)	C16 (0.26)		0.65 (0.52 – 0.70)	0.99 (0.83 – 1.36)	3.74 \pm 0.91	9.33 (6.39 – 13.58)	15.00 (121.65 – 28.22)	0.23 \pm 0.07
M12	C18 (0.46)	C21 (0.31)	C15 (0.23)	39.22 (30.85 – 49.13)	61.30 (50.87 – 85.88)	0.06 \pm 0.01	-	-	-

M20	C23 (0.74)	C15 (0.26)	2.06 (1.18 - 2.92)	4.05 (3.12 - 6.45)	0.64 ± 0.17	15.61 (10.83 - 23.00)	24.94 (19.09 - 50.06)	0.14 ± 0.05
M21	C1 (0.50)	C2 (0.50)	0.63 (0.45 - 0.83)	1.16 (0.93 - 1.77)	2.43 ± 0.65	8.17 (4.88 - 11.78)	13.88 (10.69 - 24.97)	0.23 ± 0.72
MC1	C1 (0.79)	C25 (0.21)	1.56 (0.86 - 2.40)	3.51 (2.60 - 6.14)	0.66 ± 0.18	7.25 (4.11 - 10.80)	12.23 (9.34 - 26.17)	0.26 ± 0.09
MC6	C26 (0.70)	C33 (0.30)	-	-	-	18.33 (10.79 - 23.95)	27.21 (22.04 - 42.22)	0.14 ± 0.05
MC8	C29 (0.60)	C11 (0.40)	48.87 (36.01 - 67.79)	80.50 (63.57 - 124.14)	0.06 ± 0.01	42.43 (22.16 - 60.30)	70.79 (54.66 - 108.23)	0.045 ± 0.02
C+	Diclorvos (fumigante) Cipermetrina (contacto)		2.17 (1.53 - 3.81)	4.57 (3.21 - 8.75)	0.51 ± 0.15	10.49 (0.10 - 19.96)	35.79 (21.98 - 84.37)	0.08 ± 0.02

Los resultados de toxicidad fumigante de las mezclas predichas para esta vía de exposición del insecto, muestran que las combinaciones M1, M2, M3, M5 y M21 presentaron las CL_{50} más bajas, inferiores a la del control positivo, diclorvos (2.47 mg/L). Estas mezclas se caracterizan por contener como componente a *R*-(+)-pulegona (C1), sin embargo, dichas concentraciones no son significativamente diferentes a la CL_{50} exhibida por C1 de manera individual (0.58 mg/L). A pesar de no observarse una potencialización significativa de la actividad fumigante en las mezclas que contienen C1, es importante resaltar que la mezcla racémica de pulegona no causó una pérdida en la actividad fumigante. Lo anterior podría ser aprovechado a nivel industrial en caso de lograrse obtener un agente fitosanitario para el control de *S. zeamais* basado en pulegona, pues el hecho de poder utilizar la mezcla de enantiómeros sería un factor positivo a nivel económico. Por otra parte, la mezcla M20 constituida por *2S,5R*-isopulegona (C23) y δ -3-careno (C15) también presentó un alto potencial fumigante, con una CL_{50} similar a la causada por el control positivo. En este caso se observó que la actividad insecticida de la mezcla fue mayor que la del componente más activo (C23), lo que indica que la combinación binaria potenció la actividad fumigante. De las mezclas predichas con el modelo fumigante, la M12 fue la única que exhibió una actividad insecticida mucho menor que el control positivo, no obstante, se resalta que la CL_{50} de la mezcla es aproximadamente 1.7 veces menor que la CL_{50} del componente más activo, hecho que conlleva a afirmar que esta mezcla ternaria permitió potenciar el efecto fumigante.

Al analizar los resultados de toxicidad por contacto de las mezclas predichas por MSR para esta vía de ingreso al insecto, se encuentra que en el caso de las mezclas MC1 y MC8 la dosis letal media fue muy superior a la del compuesto más activo, lo que indica que no se logró una potencialización del efecto tóxico por contacto. Contrario a lo anterior, en MC6 la DL_{50} de la combinación fue ligeramente menor que la del componente más activo, lográndose una potencialización del efecto

insecticida. De las mezclas predichas por el MSR para toxicidad por contacto, solo MC6 y MC8, presentaron una acción insecticida menor que el control positivo cipermetrina (DL₅₀: 10.49 µg/adulto). Adicionalmente, se logró determinar que 8 de las 10 mezclas exhibieron toxicidad por las dos vías de ingreso al insecto, siendo las mezclas MC6 y M12 activas solo en el modo de acción por el cual fueron establecidas. Estas mezclas están constituidas por compuestos activos de una sola vía de acceso insecticida, estando MC6 (DL₅₀: 18.33 µg/adulto) constituida por dos compuestos sin efecto fumigante, el fenilpropanoide C26 y el aldehído C33, y la mezcla M12 (CL₅₀: 39.22 µg/adulto) conformada por los hidrocarburos monoterpénicos C15, C21 y C18 (sin efecto por contacto). Así mismo, fue posible establecer que la mezcla con mayor potencial fumigante y contacto fue M2 (CL₅₀: 0.48 mg/L, DL₅₀: 6.36 µg/adulto), constituida por cetonas monoterpénicas con efecto multimodal, C1 (CL₅₀: 0.58 mg/L, DL₅₀: 4.85 µg/adulto), C2 (CL₅₀: 0.97 mg/L, DL₅₀: 7.44 µg/adulto) y C3 (CL₅₀: 2.87 mg/L, DL₅₀: 12.68 µg/adulto). Finalmente, se resalta que la mayoría de las mezclas, a excepción de M12, MC6 y MC8, presentaron una acción insecticida comparable con los controles positivos diclorvos (CL₅₀: 2.17 mg/L) y cipermetrina (DL₅₀: 10.49 µg/adulto).

Para verificar el tipo de interacción de los componentes de las mezclas optimizadas por el MSR, se implementó el modelo del efecto mediano de la ley de acción de masas. En el análisis de interacción se obtuvieron coeficientes de correlación lineal mayores a 0.97 para todas las mezclas y compuestos, comprobando que los datos se ajustaron al modelo. Lo cual permitió calcular los índices de combinación (IC) que se presentan en la tabla 3.5 y construir al mismo tiempo los gráficos de índice de combinación, para observar la interacción de los compuestos a cuatro diferentes niveles de dosis-efecto (CL₃₀, CL₅₀, CL₇₅ y CL₉₀). En estos gráficos los valores por debajo de la línea de aditividad (IC = 1) sugieren sinergismo y los valores por encima indican antagonismo para los dos efectos insecticidas evaluados (Anexos D.2 y D.3).

Tabla 3.5: Interacción de constituyentes químicos de AEs frente a *S. zeamais*, basado en el efecto mediano de la ley de acción de masas

Cod.	Mezclas A+B+C (Proporción)	Toxicidad Fumigante					Toxicidad por contacto				
		CL _{50i}	CL _{50i,j,k}	IRD	IC ₅₀	Interacción	DL _{50i}	DL _{50i,j}	IRD	IC ₅₀	Interacción
M1	C1 (0.73)	0.58		1.41		Sinergismo	4.85		0.70		
	C3 (0.27)	2.87	0.54	18.1	0.77	moderado	12.68	9.17	4.77	1.63	antagonismo
M2	C1 (0.65)	0.58		1.89			4.85		1.02		
	C2 (0.14)	0.97	0.48	14.3	0.64	sinergismo	7.44	6.36	7.43	1.10	aditivo
	C3 (0.21)	2.87		27.7			12.68		7.04		

M3	C1 (0.67) C7 (0.33)	0.58 4.73	0.63	1.31 21.9	0.81	sinergismo moderado	4.85 18.99	9.01	0.78 6.28	1.44	antagonismo moderado
M5	C1 (0.74) C16 (0.26)	0.58 88.69	0.65	1.17 511.1	0.86	sinergismo leve	4.85 -	9.33	0.68 123.4	1.47*	antagonismo
M12	C18 (0.46) C21 (0.31) C15 (0.23)	68.65 107.95 80.35	39.22	3.71 8.40 8.40	0.51	sinergismo	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
M20	C23 (0.74) C15 (0.26)	2.37 80.35	2.06	4.21 49.8	0.26	Sinergismo fuerte	11.14 -	15.61	0.92 27.3	1.09*	aditivo
M21	C1 (0.50) C2 (0.50)	0.58 0.97	0.63	1.77 2.90	0.91	aditivo	4.85 7.44	8.17	1.15 1.80	1.42	antagonismo moderado
MC1	C1 (0.79) C25 (0.21)	0.58 -	1.56	0.45 732.7	2.19*	antagonismo	4.85 8.71	7.25	0.83 5.54	1.40	antagonismo moderado
MC6	C26 (0.70) C33 (0.30)	- -	- -	- -	- -	- -	20.90 36.94	18.33	1.59 6.62	0.78	sinergismo moderado
MC8	C29 (0.60) C11 (0.40)	- 30.46	48.87	8.00 1.44	0.82*	Sinergismo leve	26.25 45.59	42.43	0.97 2.54	1.42	antagonismo moderado

*valor estimado con una $CL_{50} = 150$ mg/L para los componentes que no presentan toxicidad fumigante, o con $DL_{50} = 50$ μ g/adulto, para los componentes que no evidencian toxicidad por contacto

Los valores de los IC calculados indican que en seis de las siete mezclas fumigantes predichas se lograron obtener efectos sinérgicos desde leves hasta fuertes, encontrándose el mayor sinergismo en las combinaciones M12 (IC= 0.54) y M2 (IC= 0.64), mientras que para la mezcla M21, constituida por los enantiómeros de la pulegona, el valor de IC sugiere un efecto aditivo. Adicionalmente se encontró que para MC8 también se consiguió un sinergismo leve en el modelo fumigante, pese a que esta mezcla fue predicha por toxicidad tóxica. Es importante resaltar que en la mezcla MC1, a pesar de que su efecto insecticida fue muy prometedor (CL_{50} : 1.56 mg/L), el valor de IC (2.19) indica que el efecto de la combinación es antagonístico.

Por otra parte, se calcularon los índices de reducción de dosis (IRD), los cuales indican cuantas veces se puede reducir la dosis de cada compuesto de una interacción sinérgica en el efecto del 50%, en comparación con cada uno de los componentes de la mezcla (tabla 3.5). Además, para visualizar estos IRD en los cuatro niveles de dosis-efecto sometidos (30, 50, 75 y 90%), se construyeron los gráficos de Log IRD para los dos modos de acceso al insecto (anexos D.2 y D.3) [129]. En este sentido, para la mayoría de los compuestos presentes en las combinaciones que exhibieron efecto fumigante se encontraron valores de IRD superiores a 1, lo que indica que las reducciones de dosis son favorables. La única mezcla en la que se obtuvo un $IRD < 1$ fue en MC1, para su componente *R*-(+)-pulegona (C1, $IRD = 0.45$), aumentando progresivamente su efecto desfavorable hacia la CL_{90} (Anexo D.1– h). Sin embargo, para carvacrol (C25, $IRD = 732,7$) se obtuvo el mayor valor de índice

de reducción de dosis, indicando que su combinación con C1 es muy favorable para mejorar la actividad fumigante de este compuesto (C25). Teniendo en cuenta que comercialmente 1 kg de carvacrol (C25) se consigue por un precio similar al de 100 g de *R-(+)-* pulegona (C1), indicando que la combinación de estos dos compuestos es económicamente favorable para la elaboración de productos bioinsecticidas con base en esta mezcla (MC1). También se resaltan los resultados obtenidos para M5, una mezcla con efecto sinérgico que presentó el segundo mayor IRD fumigante en uno de sus componentes, el limoneno (C16, IRD = 511.1). Este compuesto es económico y de fácil acceso, ya que puede extraerse en altas cantidades del pericarpio del limón y la naranja por procesos de expresión o arrastre de vapor, hecho que puede ser una ventaja desde el punto de vista económico, para la fabricación de un producto basado en la combinación M5. Finalmente, es importante destacar a la mezcla enantiomérica de pulegona, M21, pues presenta un efecto aditivo en la acción fumigante con valores de IRD favorables para sus dos componentes, en todos los niveles de dosis evaluados (anexo D.2–g) y resulta ser más efectiva que el control positivo, confirmando que la separación de los enantiómeros no sería estrictamente necesaria para obtener una buena efectividad insecticida frente a *S. zeamais*.

En contraste con lo observado para la actividad fumigante, en la acción insecticida tópica, se encontró que para seis mezclas se obtuvieron valores de IC > 1.2, que indican una interacción antagónica insecticida mediante esta vía de acceso al insecto, mientras que para la mezcla MC6 (IC= 0.76) se logró un efecto sinérgico moderado y un efecto aditivo en las mezclas M2 (IRD= 1,10) y M20 (IC= 1,09), observándose que la interacción en M20 presenta una tendencia sinérgica progresiva hacia la efectividad del 90% (anexo D.3–e). En MC6 y M2 se evidenció una reducción favorable en las dosis de todos los componentes que las conforman, sin embargo, solo en MC6 se mantuvo la reducción de dosis favorable en todos los niveles de dosis-efecto evaluados (anexo D.3–h). Lo anterior sugiere que la toxicidad tópica sobre *S. zeamais*, solo se encuentra significativamente potenciada (sinergismo), con la combinación de compuestos volátiles que presentan efecto insecticida por la vía de contacto únicamente.

Teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, es posible proponer a las mezclas M2, M1, M20, M3 y M21 como las más prometedoras, ordenadas de manera descendente, pues presentaron los mejores efectos sobre *S. zeamais* por las dos rutas de exposición en el insecto (fumigante y contacto) y los mayores efectos sinérgicos en el modelo fumigante, a excepción de la mezcla enantiomérica de pulegona (M21) que presentó un efecto aditivo.

3.3 Efecto de las mejores mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora de *S. zeamais*

3.3.1 Caracterización del homogenizado proteico de *S. zeamais* en enzimas desintoxicantes y de función motora

Los 3 homogenizados de la extracción de proteínas de *S. zeamais* se caracterizaron de forma independiente para cada enzima, cuantificando el contenido de proteínas y la actividad enzimática específica de la enzima evaluada, el primero para AChE, el segundo para GST y el último para CAT. Los resultados obtenidos para cada uno de los extractos proteicos se resumen en la tabla 3.6, en la cual se observa que la catalasa es la enzima con mayor expresión dentro del insecto, al determinarse una actividad específica de 491.50 U/mg de proteína. convirtiéndola en un blanco molecular importante, ya que con pequeñas inhibiciones se lograría debilitar fisiológicamente al insecto.

Tabla 3.6: Caracterización de los homogenizados proteicos obtenidos de *S. zeamais*

Extracto proteico	Contenido de proteínas mg/mL	Enzima que se caracterizó	Caracterización enzimática	
			Actividad enzimática U/mL	Actividad específica U/mg de proteína
1	0.82 ± 0.04	AChE	2.50 ± 0.03	3.05 ± 0.04
2	0.84 ± 0.03	GST	29.18 ± 0.12	33.55 ± 0.03
3	0.84 ± 0.03	CAT	412.86 ± 0.05	491.50 ± 0.02

Después de determinar la actividad enzimática en cada uno de los homogenizados, se evaluaron diferentes diluciones en %v/v del extracto proteico, escogiendo la menor concentración que permitiera desarrollar los ensayos con éxito, para no subutilizar la enzima. El estudio cinético de las enzimas AChE y GST, que se resume en la figura 3.8, permitió seleccionar una concentración del 75% v/v al mantener una pendiente similar al del extracto al 100% (mayor a 0.020), equivalente a 0.31 U/mL de AChE y 0.59 U/mL para GST en ensayo. Además, se eligió un rango de tiempo de 35 min para la AChE y 8 min para GST, con el fin de obtener la mayor velocidad de reacción al trabajar en el curso de tiempo lineal del ensayo. En el caso de la catalasa se utilizó el extracto al 60% equivalente a 24.77 U/mL, en ensayo, al encontrarse dentro del rango lineal de detención, asegurando

una diferencia de absorbancia mayor a 0.25, entre los μmoles de H_2O_2 adicionados y los transformados por la catalasa [113,152].

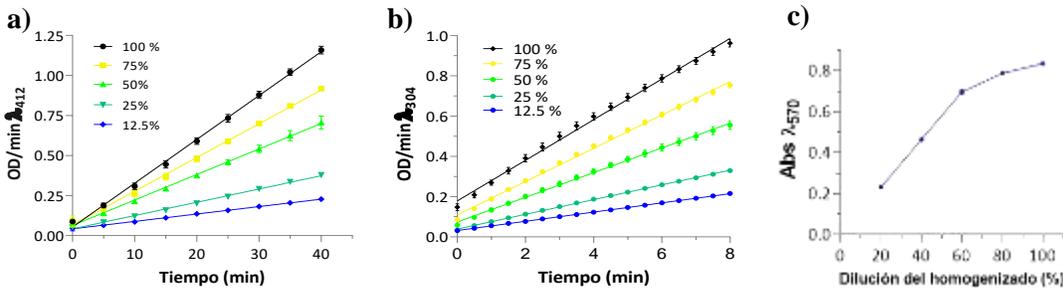


Figura 3.8: Estudio de algunas condiciones del ensayo de inhibición para cada una de las enzimas. a) Acetilcolinesterasa, b) glutatión-S-transferasa c) Catalasa.

Empleando la concentración de extracto seleccionada para cada enzima, se determinó gráficamente la constante de Michaelis-Menten (k_m), que corresponde a la concentración de sustrato ($[S]$) necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima (V_{\max}), tal como se representa en la figura 3.8. Los valores de las constantes determinados indican que la enzima AChE tiene la mayor afinidad por el sustrato empleado en el ensayo, mientras que la enzima catalasa presenta la menor afinidad por el sustrato, indicando que en este caso el complejo $[ES]$ es muy inestable y por eso los tiempos de ensayo son tan cortos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se eligió una $[S]$ equivalente a 2 veces la k_m , puesto que las enzimas funcionan mejor como catalizadores con $[S]$ cercana o superior a sus constantes de Michaelis, de lo contrario, su potencial catalítico sería subutilizado, además esta es la región de concentración donde el sistema exhibe un orden de reacción fraccional [141] o inhibir la enzima por sustrato a altas concentraciones de este [117]. Por tanto, se utilizó una concentración de $600 \mu\text{M}$ de yoduro de acetiltiocolina (AThChI), 1.6 mM de glutatión reducido (GSH) y 80 mM de H_2O_2 equivalente a $80 \mu\text{mol}$ en el ensayo (anexo E.1).

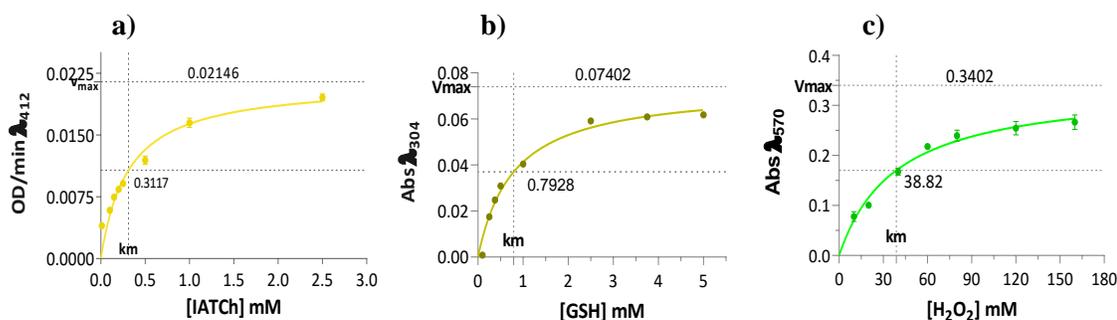


Figura 3.9: Evaluación cinética de Michaelis-Menten del extracto proteico de *S. zeamais* para cada una de las enzimas .

a) AChE con yoduro de acetilcolina, b) GST con glutatión reducido y c) CAT con peróxido de hidrógeno

3.3.2 Efecto de las mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en *S. zeamais*

Una vez caracterizados los extractos enzimáticos fuente de las enzimas AChE, GST y CAT, se evaluó la capacidad de las 10 mezclas insecticidas y sus 14 componentes para inhibir la actividad catalítica de estas enzimas, como una aproximación a los mecanismos de acción.

▪ Efecto de las mezclas y sus componentes sobre acetilcolinesterasa en *S. zeamais*

En la figura 3.10 se presentan los resultados del efecto inhibitorio sobre la actividad catalítica de la AChE de las mezclas y sus constituyentes evaluados a 120 mg/L y 15 mg/L. En el estudio del efecto inhibitorio preliminar a una concentración de 120 mg/L (barras de color azul) se observa que siete mezclas y ocho de sus componentes inhibieron significativamente la AChE de *S. zeamais*, al causar una disminución de la actividad igual o superior al 50%. Dentro de los compuestos que presentaron un efecto neurotóxico sobre la AChE se hallan los monoterpenoides oxigenados (C2, C3, C7, C29). No obstante, se encontró que el efecto promedio inhibitorio de C1, C2 y C3 es alrededor de 14 veces mayor que el de C23, sugiriendo que las cetonas moterpénicas con un doble enlace conjugado al carbonilo puede ser determinante en la inhibición enzimática. Adicionalmente, los resultados del tamizaje indicaron que la enzima presenta una estereoselectividad por el enantiómero -S- de pulegona (C2), pues este causa una inhibición de la actividad catalítica 2.3 veces mayor que C1. En el mismo modo, el estudio preliminar del efecto neurotóxico mostró que los monoterpenoides de tipo hidrocarburo derivados de catión α -terpinilo (C15 y C16) causaron en promedio un 20% más de inhibición que los provenientes del catión α -terpinen-4-ilo (C21 y C18). Un efecto similar se identificó en los fenilpropanoides derivados del acetato de cumarilo (C11 y C29), los cuales causan

una inhibición alrededor de 2.6 mayor que los provenientes del acetato de coniferilo (C26). Dentro de los compuestos que presentaron un efecto neurotóxico moderado a bajo, se encuentra C25 (46.85 %), compuesto que presenta reportes previos con $CI_{50} = 19.4 \mu M$ (aprox. 118 mg/L) sobre la AChE del insecto de estudio, valor que concuerda con este trabajo, dado que es muy cercano a la concentración implementada para el tamizaje [117]. Además, se logró establecer que a pesar de que C2 fue el único enantiómero de pulegona que actuó mediante este mecanismo de acción (75.53 %), su mezcla racémica M21 (75.70 %) mantiene inalterado el efecto de C2 sobre la AChE. En este sentido se puede inferir que, pese a que las mezclas que contienen a C1 son las de mayor efecto insecticida, las bajas inhibiciones sobre AChE que se obtienen con este compuesto (33.52 %), y la mayoría de las mezclas que lo contienen (M1: 43.49%, M2: 43.67 % y M3: 34.18 %), indican que la interacción con este blanco no es su mecanismo de acción principal. Lo anterior puede estar relacionado con la presencia de la insaturación exocíclica, puesto que un efecto similar se observó en C18 (29.11 %) que también posee este tipo de insaturación.

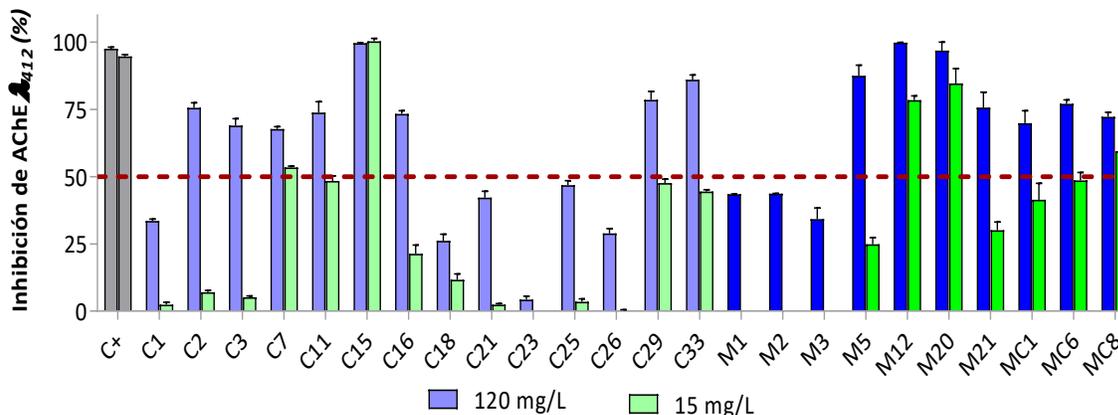


Figura 3.10: Efecto de las mezclas y sus componentes sobre la actividad de AChE en *S. zeamais*

Las mezclas que causaron efectos de inhibición mayores o iguales al 50% a 120 mg/L, se evaluaron a 15 mg/L, tanto la mezcla como sus componentes, ya que es una concentración intermedia entre las CL_{50} exhibidas por los compuestos de los grupos fumigante alto y fumigante medio-alto del análisis cluster. Además, la evaluación de esta concentración permite establecer un rango de 8 a 10 puntos en las curvas dosis-respuesta para estimar las CI_{50} . Por consiguiente, en los resultados obtenidos se

aprecia que las mezclas M12 y M20 presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 78% a las dos concentraciones evaluadas, probablemente, por incluir al compuesto C15 en su composición, el cual fue la única sustancia que causó una inhibición del 100% a las dos concentraciones evaluadas. Las razones anteriormente descritas sugirieron que la AChE es un mecanismo de acción esencial para el compuesto C15 (determinante en el efecto sinérgico insecticida) y sus mezclas.

Finalmente se resalta a este estudio como la primera descripción del efecto en la actividad catalítica de AChE en *S. zeamais* de los compuestos C7, C11, C15, C16, C21, C23, C26, C33, los enantiómeros C1 y C2 por separado y de todas las mezclas. Posteriormente a las 15 sustancias entre mezclas y compuestos puros, que presentaron potencial actividad inhibitoria sobre la actividad de AChE en *S. zeamais*, se les determinó la CI_{50} a partir de las curvas dosis-efecto que se muestran en el anexo E.2, presentando los resultados en la tabla 3.7.

Tabla 3.7: Efecto de las mezclas y sus componentes en la inhibición de AChE de *S. zeamais*

Cod	Componente (Proporción)	Efecto inhibitorio sobre AChE (mg/L)					
		Componentes			Mezcla		
		$CI_{50} \pm S$	$k_i \pm S$	Tipo inh	$CI_{50} \pm S$	$k_i \pm S$	Tipo inh
M5	C1 (0.74)	-	-	-	30.19 ± 5.78	207.85 ± 2.05	C
	C16 (0.26)	26.69 ± 2.90	79.64 ± 0.55	NC			
	C18 (0.46)	-	-	-			
M12	C21 (0.31)	-	-	-	0.81 ± 0.06	3.27 ± 0.06	NC
	C15 (0.23)	0.19 ± 0.06	2.85 ± 0.05	NC			
M20	C23 (0.74)	-	-	-	0.61 ± 0.05	1.44 ± 0.003	C
	C15 (0.26)	0.19 ± 0.06	2.85 ± 0.05	NC			
M21	C1 (0.50)	-	-	-	30.24 ± 4.60	159.15 ± 7.35	C
	C2 (0.50)	36.60 ± 3.29	50.27 ± 0.74	C			
MC1	C1 (0.79)	-	-	-	22.32 ± 6.78	94.46 ± 3.57	C
	C25 (0.21)	-	-	-			
MC6	C26 (0.70)	-	-	-	4.45 ± 0.68	30.45 ± 3.51	C
	C33 (0.30)	7.72 ± 0.78	198.55 ± 3.51	C			
MC8	C29 (0.60)	4.24 ± 0.36	43.65 ± 3.46	C	5.28 ± 0.72	44.61 ± 1.64	C
	C11 (0.40)	27.41 ± 1.64	159.17 ± 6.34	C			
C3	C3 (1.00)	66.27 ± 4.35	56.76 ± 0.18	C	-	-	-
C7	C7 (1.00)	18.15 ± 0.64	282.43 ± 4.14	C	-	-	-
C+	C+ (1.00)	9.60x10 ⁻³ ± 2.08x10 ⁻³	-	-	-	-	-

Tipo inh: tipo de inhibidor, C: inhibidor competitivo, NC: inhibidor no competitivo

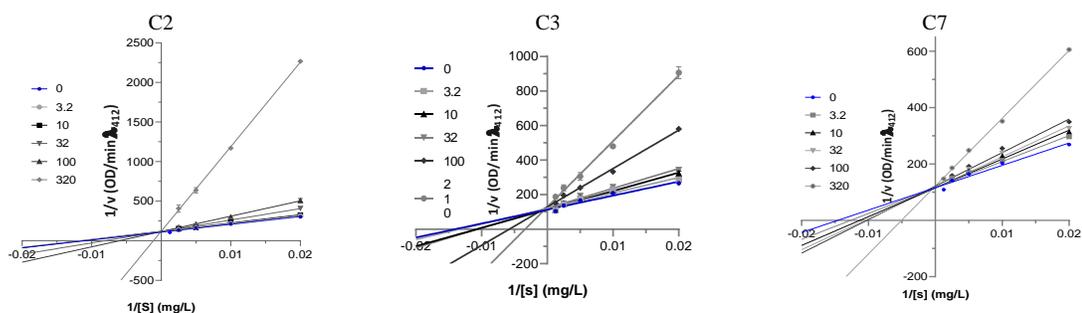
Las mezclas M12 (CI_{50} : 0.81 mg/L) y M20 (CI_{50} : 0.61 mg/L) fueron las combinaciones que evidenciaron mayor efecto neurotóxico, igualmente, los compuestos con mayor actividad inhibitoria

fueron C15 (CI₅₀: 0.19 mg/L), seguido de C29 (CI₅₀: 4.24 mg/L), resultados que se resumen en la Tabla 3.7. En la cual se aprecia que los isómeros de posición C29 (CI₅₀: 4.24 mg/L) y C11 (CI₅₀: 27.41 mg/L), coinciden con su actividad tóxica por contacto, ya que el isómero C29 (DL₅₀: 26.25 mg/L) también evidencia una mayor toxicidad, precisando, que las insaturaciones de tipo terminal parecen disminuir tanto la acción neurotóxica como la insecticida por contacto. En este sentido, el alto efecto inhibitorio de las mezclas M12 y M20 sobre la enzima de función motora se puede atribuir a su componente C15, al ser la sustancia evaluada con mayor actividad sobre la AChE en *S. zeamais*. Los efectos obtenidos también indicaron que la combinación de un monoterpeno con un carbono carbonilo y otro monoterpenoide con grupo fenol, potencia la acción inhibitoria sobre la AChE, como sucede en las mezclas MC1 (CI₅₀: 22.32 mg/L), compuesta por C1 y C25, y MC6 (CI₅₀: 4.45 mg/L) por C26 y C33. Caso contrario ocurre en la combinación entre monoterpenoides con función orgánica cetona y alcohol, viéndose opacada la actividad de compuestos como C7 (CI₅₀: 18.15 mg/L) perteneciente a la mezcla M3 y C3 (CI₅₀: 66.27 mg/L), perteneciente a las mezclas M1 y M2, mezclas que causaron una inhibición moderada a la máxima concentración evaluada (%inh < 43.7%).

Las mezclas M12 (CI₅₀: 0.81 mg/L) y M20 (CI₅₀: 0.61 mg/L) fueron las combinaciones que evidenciaron mayor efecto neurotóxico, mientras que los compuestos con mayor actividad inhibitoria fueron C15 (CI₅₀: 0.19 mg/L) y C29 (CI₅₀: 4.24 mg/L), sin embargo, ninguno de los compuestos y mezclas lograron causar una inhibición comparable con la del control positivo. El alto efecto inhibitorio de las mezclas M12 y M20 sobre la enzima de función motora se puede atribuir a su componente C15, al ser la sustancia evaluada con mayor actividad sobre la AChE en *S. zeamais*. Los efectos obtenidos también indicaron que la combinación de un monoterpeno con un carbono carbonilo y otro monoterpenoide con grupo fenol, potencia la acción inhibitoria sobre la AChE, como sucede en las mezclas MC1 (CI₅₀: 22.32 mg/L), compuesta por C1 y C25, y MC6 (CI₅₀: 4.45 mg/L) por C26 y C33. Caso contrario ocurre en la combinación entre monoterpenoides con función orgánica cetona y alcohol, viéndose opacada la actividad de compuestos como C7 (CI₅₀: 18.15 mg/L) perteneciente a la mezcla M3 y C3 (CI₅₀: 66.27 mg/L), perteneciente a las mezclas M1 y M2, mezclas que causaron una inhibición moderada a la máxima concentración evaluada (%inh < 43.7%). Finalmente, comparando los resultados de inhibición sobre AChE obtenidos para los isómeros de posición C29 (CI₅₀: 4.24 mg/L) y C11 (CI₅₀: 27.41 mg/L), es posible establecer que la extensión de la conjugación del anillo aromático en el compuesto C29 favorece la actividad inhibitoria, puesto que C29 es aproximadamente 6.5 veces más activo que C11, resultado que coincide con su toxicidad por contacto (C29 con DL₅₀: 26.25 mg/L), sugiriendo que la posición del doble enlace de la cadena

propenfílica de los fenilpropanoides también puede ser determinante en el mecanismo de acción neurotóxico.

Adicionalmente, se realizó un estudio cinético para estimar los tipos de inhibidor y las constantes de inhibición de interacción enzima-inhibidor (K_i), mediante los gráficos de Lineweaver-Burk (figura 3.11, tabla 3.7). Este estudio permitió establecer como inhibidores de tipo competitivo a todos los compuestos oxigenados que se seleccionaron por su alto efecto neurotóxico, independientemente si son de tipo monoterpenoide o fenilpropanoide, que incluyen a C2, C3, C7, C11, C29 y C33. De igual forma, las mezclas que contenían algún compuesto con sustituyentes oxigenados, sin discrepar en que dicho compuesto hubiese inhibido de forma significativa o no la AChE, también se determinaron como inhibidores de tipo competitivo, este fue el caso de M5 (*R*-(+)-pulegona + DL-limoneno). Estos resultados concuerdan con algunos reportes de literatura que señalan a los monoterpenoides con función orgánica cetona y alcohol como inhibidores de la actividad catalítica de la AChE de forma competitiva en otras especies de insectos plaga [25,74,153]. No obstante, el valor de la CI_{50} de C3 (0.441 mM) no coincide con publicaciones previas que presentan un efecto mucho menor al obtenido (2.183 mM), a pesar de que la mayor diferencia con el ensayo publicado es el uso de una concentración menor de sustrato (0.25 mM), lo cual podría dar prioridad en el equilibrio hacia la unión con el inhibidor, ocasionando que el efecto hubiese sido mayor al que se determinó en este trabajo. Por lo cual se espera que la divergencia en los resultados pueda deberse a las unidades de enzima implementadas en el ensayo, al método de extracción de proteínas, entre otros [74].



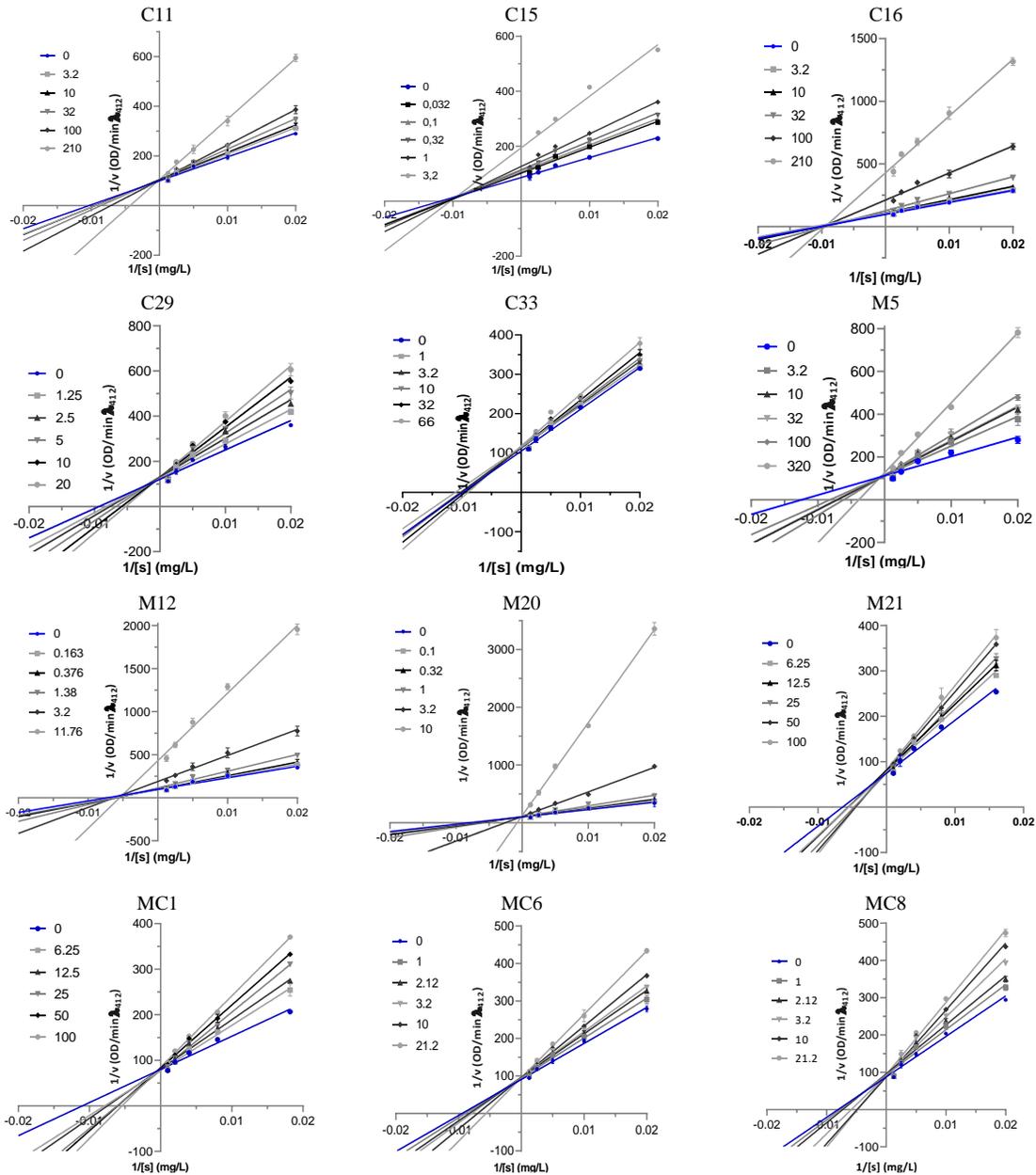


Figura 3.11: Gráficos Lineweaver-Burk del estudio cinético de las mezclas y sus componentes sobre AChE en *S. zeamais*

En contraste, para los monoterpenos de tipo hidrocarburo y las mezclas conformadas únicamente por esta clase de compuestos (C15, C16 y M21) se determinó que ejercen una inhibición de tipo no competitivo. Lo anterior sugiere que este tipo de sustancias se unen a un sitio alostérico o en la entrada del sitio activo de la enzima, ocasionando un cambio conformacional que impide la unión

con el sustrato. En este sentido cobra relevancia hacer un estudio más exhaustivo quizás de tipo computacional y/o genético, en el cual se pueda comprobar que el efecto neurotóxico está delimitado a insectos, ya que esta clase de compuestos (monoterpenos tipo hidrocarburos) podrían estar interactuando con el residuo de cisteína (específico para insectos), principalmente con su grupo tiol, dado que es un grupo muy reactivo y suele actuar como nucleófilo en reacciones enzimáticas. Quizás esta es una de las razones por la cual C15 y sus mezclas fueron las sustancias más efectivas del estudio de neurotoxicidad, puesto que la estructura bicíclica de C15, puede estar ocasionando algún efecto estérico, haciéndolo excepcionalmente activo sobre la AChE [25,154].

Finalmente, se construyeron las gráficas de IC e IRD que se muestran en el anexo E2, con el fin de verificar el tipo de interacción de los compuestos volátiles en las mezclas, sobre la inhibición de AChE, utilizando las CI_{50} estimadas, junto con los resultados experimentales del efecto causado a 120 y 15 mg/L. Todas las combinaciones evaluadas presentaron buena conformidad con el IC de la ley de acción de masas, al obtener valores de $r \geq 0.940$ [33]. En la Tabla 3.8 se resumen los resultados de interacción, exponiendo en general un mayor efecto neurotóxico en las mezclas, comparado con sus componentes individuales (menos las que contienen a C15). También se evidencia que en cinco de las siete mezclas estudiadas se lograron obtener interacciones sinérgicas, siendo solo las mezclas M12 (IC: 1.95) y M20 (IC: 2.31) las que presentaron una interacción antagonista, señalando que en M12 solo a dosis efectivas mayores al 90% se lograría una interacción sinérgica (anexo E3-b). Pese a que fueron las combinaciones que causaron las mayores inhibiciones sobre AChE. El efecto antagónico en estas mezclas está relacionado con el valor de IDR encontrado para C15, pues establece que la reducción de dosis de este compuesto no es favorable. Lo cual indica que la mezcla M20 debe estar actuando análogamente mediante otro mecanismo de acción al encontrarse subutilizado la combinación de C23 en este blanco molecular, el cual es un compuesto con alto efecto insecticida fumigante y por contacto. Además, los IRD de los otros componentes de M12 y M20 son los más altos en todas las combinaciones evaluadas (C23: 42279.60, C18: 4268.45), señalando que las reducciones de dosis para estos compuestos son muy favorables.

Tabla 3.8: Efecto de la interacción sinergista inhibitoria de los componentes de las mezclas sobre AChE en *S. zeamais*.

Cod	Componente (Proporción)	Efecto sobre AChE (mg/L)		Interacción de los componentes en las mezclas		
		Componentes	Mezcla	IRD ₅₀	IC ₅₀	Interacción
M5	C1 (0.74)	-	30.19 ± 5.78	109.80	0.21	sinergismo fuerte
	C16 (0.26)	26.69 ± 2.90		5.10		
M12	C18 (0.46)	-	0.81 ± 0.06	4 268.45	1.95	antagonismo
	C21 (0.31)	-		786.24		
	C15 (0.23)	0.19 ± 0.06		0.51		
M20	C23 (0.74)	-	0.61 ± 0.05	42 279.60	2.31	antagonismo
	C15 (0.26)	0.19 ± 0.06		0.43		
M21	C1 (0.50)	-	30.24 ± 4.60	162.21	0.29	Sinergismo fuerte
	C2 (0.50)	36.60 ± 3.29		3.53		
MC1	C1 (0.79)	-	22.32 ± 6.78	139.10	0.04	Sinergismo muy fuerte
	C25 (0.21)	-		28.14		
MC6	C26 (0.70)	-	4.45 ± 0.68	81.17	0.13	Sinergismo fuerte
	C33 (0.30)	7.72 ± 0.78		8.75		
MC8	C29 (0.60)	4.24 ± 0.36	5.28 ± 0.72	2.37	0.52	Sinergismo
	C11 (0.40)	27.41 ± 1.64		9.70		

Los resultados de interacción neurotóxica también señalaron que las mezclas entre monoterpenoides con carbono carbonilo y compuestos aromáticos potencian el efecto de inhibición catalítica sobre AChE, tal como se observa en la mezcla MC1 (CI₅₀: 22.32 mg/L) que evidencia sinergismo muy fuerte con IC: 0.04, conformada por C1 y C25, y MC6 (CI₅₀: 4.45 mg/L) que presenta sinergismo fuerte con IC: 0.36, constituida por C26 y C33 (CI₅₀: 7.72 mg/L). Este aumento de actividad en las mezclas podría estar relacionado con algunos estudios del efecto de CQs de AEs el cual sugiere que la unión del primer compuesto puede estar favoreciendo la unión del segundo, promoviendo una mayor inhibición de AChE [25,34]. Otras mezclas que presentaron un sinergismo fuerte en su efecto inhibitorio sobre la AChE son M5 (CI₅₀: 30.29 mg/L), M21 (CI₅₀: 30.24 mg/L) y MC1, que contienen en común a C1, exhibiendo un IC = 0.21 y 0.29, respectivamente, y reducciones de dosis favorables para todos sus componentes, a inhibiciones entre el 30 y 95%, tal como se muestra en el anexo E3. Adicionalmente, se pudo determinar que las combinaciones M5, M21 y MC1 evidenciaron una CI₅₀ mucho más altas que la CL₅₀ estimada (0.65, 0.63 y 1.56 mg/L respectivamente). por tanto, se espera que estas mezclas posean un efecto multidiana, ya que su efectividad insecticida también estaría relacionada otro mecanismo de acción.

▪ **Efecto de las mezclas y sus componentes sobre catalasa en *S. zeamais***

En la figura 3.12 se presentan los resultados del efecto inhibitor de las mezclas y sus constituyentes evaluados a 120 mg/L sobre la actividad catalítica de CAT, para hacer una aproximación a los efectos que tienen dichas sustancias sobre el sistema antioxidante de *S. zeamais*. En este trabajo se describe por primera vez el efecto en la actividad catalítica de CAT en *S. zeamais* de todos los compuestos y mezclas evaluados.

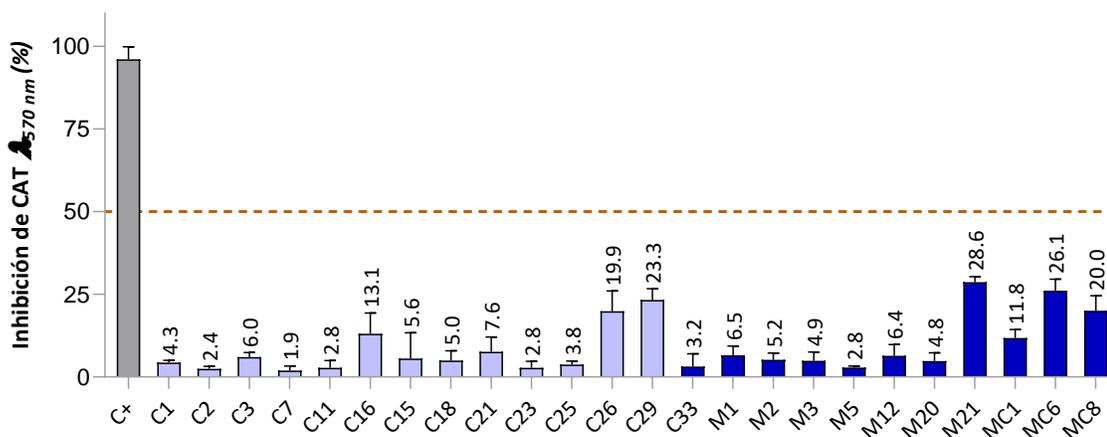


Figura 3.12: Efecto de las mezclas y sus componentes sobre la actividad de catalasa en *S. zeamais*

Durante el estudio 3 mezclas que contienen componentes oxigenados y 2 compuestos oxigenados presentaron los mayores efectos de inhibición de CAT en *S. zeamais*, al causar una disminución de la actividad entre el 19 y 29%. Los resultados obtenidos coinciden con estudios donde compuestos oxigenados como la mentona han causado una disminución alrededor del 30% de la actividad de CAT en *S. oryzae* [116]. Al analizar el efecto causado por los compuestos se encontró que C29 presenta una acción inhibitoria cerca de 8 veces mayor que su isómero C11, coincidiendo con los resultados obtenidos para AChE, sugiriendo que la insaturación de tipo terminal en los fenilpropanoides puede estar disminuyendo tanto la acción desintoxicante por CAT, la acción neurotóxica y la actividad insecticida por contacto. En general los resultados indicaron que el efecto inhibitor de este sistema antioxidante se debe principalmente a compuestos de tipo fenilpropanoide, como son C26 (19.9 %) y C29 (23.3 %) y las mezclas que los contienen, MC6 (26.1%) y MC8 (20.0 %). Al comparar el efecto de las mezclas con el de sus componentes individuales, se observa un efecto inhibitor muy similar, sugiriendo que estas mezclas podrían estar presentando efectos de

interacción aditivos sobre este blanco molecular. Las razones anteriormente descritas también indican que el mecanismo de acción que involucra a CAT debería estar directamente relacionado con la toxicidad por contacto, ya que fue el único método insecticida en el cual estos compuestos mostraron una letalidad significativa (mayor al 60%). La otra mezcla que evidenció una inhibición moderada sobre CAT fue la combinación enantiomérica M21 (28.6%), con un efecto sobre el sistema antioxidante alrededor de 6 veces mayor que sus componentes individuales C1 (4.3%) y C2 (2.4%). Estos resultados indican que la combinación de estos compuestos favorece la actividad inhibitoria sobre CAT, siendo una mezcla en la que se podría profundizar en los efectos causados sobre catalasa, para corroborar que esta potencialización inhibitoria se mantiene en otros niveles de dosis-efecto. En este sentido, el estudio indicó que la inhibición de esta enzima, encargada principalmente de la eliminación de H₂O₂ subproducto del transporte de electrones mitocondrial y de participar en la oxidación con donores de hidrógeno (R-OH), probablemente, se encuentra relacionada con la mortalidad del insecto mediante contacto. A pesar de que la CAT no sería el principal mecanismo de acción por el que estas sustancias bioactivas afectan al organismo, si parece ser un aspecto importante en la reducción de posible generación de resistencia en el insecto.

▪ **Efecto de las mezclas y sus componentes sobre glutatión-S-transferasa en *S. zeamais***

Los resultados del efecto de inhibición metabólico de las mezclas y sus constituyentes a 120 mg/L sobre el sistema de desintoxicación GST en *S. zeamais* se resume en la figura 3.13. El presente estudio describe por primera vez el efecto en la actividad catalítica de GST en *S. zeamais* de todos los compuestos y mezclas evaluados.

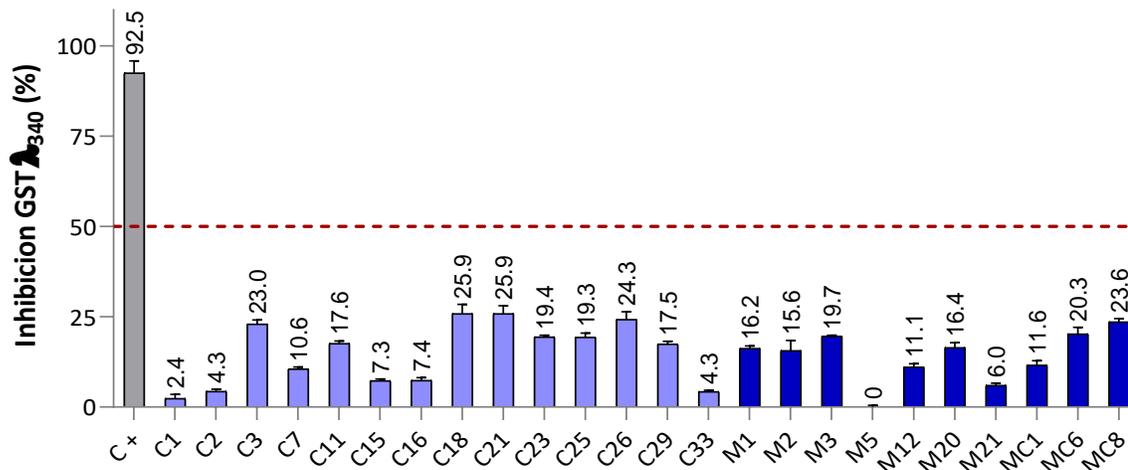


Figura 3.13: Efecto de las mezclas y sus componentes sobre la actividad de glutatión-S-transferasa en *S. zeamais*

En el estudio se encuentra que 2 mezclas y 5 compuestos presentaron los mayores efectos de inhibición de GST en *S. zeamais*, al causar una disminución de la actividad catalítica entre el 19 y 26 %, evidenciando una posible disminución metabólica en la desintoxicación de xenobióticos del insecto. Al analizar los resultados obtenidos se encontró que C3 y C23 fueron en promedio 2.5 veces más activas que C1 y C2, indicando que la insaturación exocíclica conjugada al carbonilo disminuye el efecto inhibitor sobre GST. Contrario a los resultados encontrados en el efecto fumigante, los monoterpenoides de tipo hidrocarburo derivados del catión α -terpinen-4-ilo (C21, C18), en promedio mostraron una inhibición aproximadamente 3.5 veces más alta que los provenientes biosintéticamente del catión α -terpinilo (C15 y C16). Del mismo modo se identificó que el efecto de C11 (17.6%) y C29 (17.5%) es muy similar, indicando que la posición del doble enlace en la cadena propenilica de los fenilpropanoides, no interviene en su interacción con la GST. Pese a los resultados obtenidos, este blanco molecular evidencia una relación nula con alguna de las vías de acceso insecticidas evaluadas, puesto que las sustancias que mostraron algún efecto moderado sobre la actividad catalítica de GST, incluye compuestos que fueron tóxicos solo por una de las vías de acceso insecticida. Entre estos compuestos se encuentran C18 (22.0 %) y C21 (25.9 %) que son tóxicos por inhalación y C26 (24.3 %) y C29 (17.5 %) que son tóxicos por contacto. Durante el estudio del efecto de este sistema antioxidante se encontró que las combinaciones MC6 (20.3%) compuesta por C26 (24.3%) y C33 (4.3%) y MC8 (23.6%) conformada por C11 y C29, exhibieron los mayores porcentajes de inhibición, atribuido principalmente a los compuestos de tipo fenilpropanoide. No

obstante, el efecto causado por las mezclas fue muy cercana al de los componentes individuales, indicando que no hay una potencialización en la actividad, a la concentración evaluada. Adicionalmente, se identifica que el compuesto C23 (19.4%), presenta un efecto inhibitorio leve sobre la GST, el cual es muy semejante al de su mezcla M20 (16.4%), sugiriendo que a pesar de que este no es el mecanismo insecticida principal de estas sustancias, su efecto sobre la GST si puede estar aportando en la reducción de posible generación de resistencia. En general ninguna de las mezclas causó un efecto mayor en comparación con sus componentes individuales, sobre este sistema desintoxicante, por el contrario, la actividad de compuestos con C3, C7, C18 y C21 se vio opacada en las diferentes combinaciones.

A pesar de que el estudio no muestra altos porcentajes de inhibición sobre GST, las pequeñas inhibiciones obtenidas pueden ser resultados favorables por la importancia de este blanco molecular. Se ha investigado extensamente la importancia de GST como sistema antioxidante, pues cataliza la conjugación de una amplia variedad de electrófilos con glutatión reducido (GSH) para formar sustancias menos tóxicas solubles en agua, que se pueden excretar fácilmente, no solo en insectos sino también en mamíferos y humanos, además, es una enzima propuesta como un indicador de estrés oxidativo. No obstante, para hacer un acercamiento sobre la baja toxicidad de estas sustancias se requiere de más estudios sobre una enzima de GST homologa a la de los seres humanos y además de otros estudios de toxicidad, bioacumulación y persistencia.

En este sentido, al analizar la toxicidad de los componentes de las mezclas más promisorias para ser utilizadas como bioinsecticidas, correspondientes a M2 (C1 + C2 + C3) y M20 (C18 + C23), se encuentran algunos estudios de sus compuestos individuales. En M2 los compuestos C1 y C2 se encuentran categorizados como no carcinógenos o bioacumulativos en niveles superiores o iguales al 0,1% según el IARC y la EPA con una $DE_{50} = 24.4$ mg/L a 48.h en *Daphnia pulex*, apoyados por el HSDB con una dosis letal en humanos mayor a 15 mL (250 mg/Kg) [155]. A diferencia, en el caso de C3, sus estudios de toxicidad son escasos a pesar de que su uso como aromatizante y adyuvante en la industria alimenticia es permitido [156]. Para el caso de la mezcla M20, se encuentra información acerca de C15, que indica su baja toxicidad al ser utilizado y permitido como aromatizante y adyuvante en la industria alimenticia según el CFSAN [156], sin embargo los efectos tóxicos de C23 son nulos. De este modo, las dos mezclas que evidenciaron la mejor acción insecticida con una interacción sinérgica se resaltan como potenciales principios activos de bioinsecticidas, destacando a la mezcla M20, al indicar un efecto multidiana, debido a los resultados

de interacción en el IRD, obtenidos en el efecto neurotóxico y al presentar una pequeña disminución de la actividad catalítica de GST.

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

El presente estudio hace un aporte a la búsqueda de sustancias con potencial aplicación en el control de *Sitophilus zeamais*, mediante la evaluación de la acción insecticida de constituyentes químicos presentes en aceites esenciales y un estudio de potencialización tóxica mediante la elaboración de mezclas, con una aproximación a los mecanismos de acción sobre enzimas desintoxicantes y de función motora. Los resultados obtenidos permiten concluir:

- Este estudio contribuye a la caracterización de la actividad tóxica fumigante y por contacto sobre *S. zeamais* de algunos constituyentes químicos presentes en aceites esenciales bioactivos.
- La acción insecticida fumigante y por contacto contra *S. zeamais* de metabolitos volátiles, se encuentra mayormente influenciada por compuestos de tipo monoterpenoide monocíclicos con función orgánica cetona e insaturación exocíclica, resaltando como los compuestos con mayor actividad a los enantiómeros de pulegona con $CL_{50} < 7.0 \mu\text{M}$ y $DL_{50} < 7.5 \mu\text{g/adulto}$, mejores que los controles diclorvos y cipermetrina.
- La presente investigación describe un estudio de potencialización del efecto insecticida sobre *S. zeamais* de compuestos volátiles, empleando el modelo de superficie de respuesta, estableciéndose varias mezclas con acción insecticida de doble vía de acceso y con efectos sinérgicos fumigantes. Se destacan las mezclas M2 (*R*-(+)-pulegona, *S*-(-)-pulegona, *R*-(-)-carvona), M20 (isopulegona, δ -3-careno) y M5 (*R*-(+)-pulegona, DL-limoneno), al presentar un mayor efecto fumigante que sus componentes individuales y los controles positivos.
- El estudio de las mezclas y sus componentes sobre enzimas desintoxicantes y de función motora en *S. zeamais* permitió determinar que el principal mecanismo de acción no está relacionado con la inhibición de las enzimas CAT y GST, al no superar el 30% de afectación a la máxima

concentración evaluada. Sin embargo, algunas mezclas y sus componentes presentan una inhibición de tipo competitiva y no competitiva, importante, sobre la AChE.

- Las mejores mezclas con acción insecticida fumigante y por contacto sobre *S. zeamais* corresponden a M2 y M20, pues además del potencial efecto fumigante y la interacción aditiva por contacto, exhiben un alto efecto neurotóxico sobre la AChE y una inhibición leve de la GST. No obstante, las dos mezclas indican mecanismos de acción multidiana atribuidos a sus resultados de índice de combinación (IC) e índice de reducción de dosis (IRD) del estudio neurotóxico.

4.2 Recomendaciones

- Evaluar las enzimas metabólicas antioxidantes mediante ensayos *in-vivo*, con el fin de establecer efectos inductivos de actividad, reveladores de mecanismos de resistencia que se pueden estar generando frente a los compuestos establecidos como activos insecticidas.
- Evaluar otros mecanismos de acción importantes en los insectos como la citocromo-c-oxidasa, citocromo P450, moduladores de receptores GABBA y del sistema octopaminérgico, con el fin de hacer una mejor aproximación a los mecanismos de acción de las mezclas activas y sus componentes.
- Evaluar otros efectos de las mezclas sobre los insectos como la actividad repelente y antialimentaria, así como probar metodologías de encapsulación para desarrollar ensayos en silo simulado
- Realizar un estudio de estabilidad sobre las mejores mezclas preparando varios lotes para al menos dos condiciones de almacenamiento y realizar pruebas de toxicidad en mamíferos.

5. Bibliografía

1. IICA; CEPAL; FAO *Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe 2019-2020*; San José, Costa Rica, 2019;
2. OCDE-FAO *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*; Paris, 2020; ISBN 9789264317673.
3. Prosekov, A.Y.; Ivanova, S.A. Food security: The challenge of the present. *Geoforum* **2018**, *91*, 73–77, doi:10.1016/j.geoforum.2018.02.030.
4. Sarwar, M.; Sarwar, M.; Sarwar, M.; Qadri, A.; Moghal, S. The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review. *J. Cereal. Oilseeds* **2013**, *4*, 32–35, doi:10.5897/JCO12.023.
5. FAO *Crop Prospects and Food Situation, Quarterly Global Report No. 1, March 2020*; 2020;
6. Gil, A.; Sánchez, F. Cereales y Productos derivados. In *Tratado de nutrición Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos*; Médica-Panamericana, 2010; pp. 97–138 ISBN 8498353475.
7. MADR (ministerio de agricultura y desarrollo rural) *Informe de rendición de cuentas 2018-2019*; 2019;
8. FENALCE *Indicadores Cerealistas*; 2019;
9. García, S.; Bergvinson, D.J. Programa integral para reducir pérdidas poscosecha en maíz. *Agric. Técnica en México* **2007**, *33*, 181–189.
10. FAO *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos.*; 2019; Vol. 32; ISBN 9789251318546.
11. Gobernación de Antioquia *Manual Técnico del Cultivo de Maíz bajo Buenas Prácticas Agrícolas*; Ospina, J., Ed.; Fotomontajes S.A.S.: Medellín, Colombia, 2015; ISBN 9789588711737.
12. Herrera, J.M.; Goñi, M.L.; Gañan, N.A.; Zygadlo, J.A. An insecticide formulation of terpene ketones against *Sitophilus zeamais* and its incorporation into low density polyethylene films. *Crop Prot.* **2017**, *98*, 33–39, doi:10.1016/j.cropro.2017.03.008.

13. Rees, D. *Insects of stored products*; CSIRO Pub: Australia, 2004; ISBN 9780643069039.
14. Trematerra, P.; Savoldelli, S. Pasta preference and ability to penetrate through packaging of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Dryophthoridae). *J. Stored Prod. Res.* **2014**, *59*, 126–132, doi:10.1016/j.jspr.2014.06.008.
15. Sparks, T.C.; Nauen, R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2015**, *121*, 122–128, doi:10.1016/j.pestbp.2014.11.014.
16. Zaka, S.M.; Iqbal, N.; Saeed, Q.; Akrem, A.; Batool, M.; Khan, A.A.; Anwar, A.; Bibi, M.; Azeem, S.; Rizvi, D. e. N.; et al. Toxic effects of some insecticides, herbicides, and plant essential oils against *Tribolium confusum* Jacquelin du val (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae). *Saudi J. Biol. Sci.* **2019**, *26*, 1767–1771, doi:10.1016/j.sjbs.2018.05.012.
17. Meza, J.L.; Camacho, J.R.; Cortes, E.M. Manejo integrado de plagas en granos almacenados. In *Tecnologías de Granos y Semillas. Libros técnicos: serie agricultura*; García, C., Martínez, R., Rojo, G.E., Ramírez, B., Eds.; México, 2009; pp. 109–128 ISBN 963-734-412-7.
18. S.Gaviria, L.Mejia, M.Castro, E.Gómez, F.C. Pérdida y Desperdicio de alimentos en Colombia. *Dep. Nac. Planeación* **2016**, *39*, 116.
19. Khare, A.; Singh, A.; Singh, A. Use of Vegetable Oils as Biopesticide in Grain Protection - A Review. *J. Biofertilizers Biopestic.* **2012**, *03*, 1–9, doi:10.4172/2155-6202.1000114.
20. Soujanya, P.L.; Sekhar, J.C.; Kumar, P.; Sunil, N.; Prasad, C.V.; Mallavadhani, U. V. Potentiality of botanical agents for the management of post harvest insects of maize: a review. *J. Food Sci. Technol.* **2016**, *53*, 2169–2184, doi:10.1007/s13197-015-2161-0.
21. Cantrell, C.L.; Dayan, F.E.; Duke, S.O. Natural products as sources for new pesticides. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1231–1242, doi:10.1021/np300024u.
22. Preedy, V. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; 2015; ISBN 978-0-12-416641-7.
23. Cox, P.D. Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation, Review. *J. Stored Prod. Res.* **2004**, *40*, 1–25, doi:10.1016 / S0022-474X (02) 00078-4.
24. Regnault-Roger, C.; Vincent, C.; Arnason, J.T. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Annu. Rev. Entomol.* **2011**, *57*, 405–424, doi:10.1146/annurev-ento-120710-100554.
25. Jankowska, M.; Rogalska, J.; Wyszowska, J.; Stankiewicz, M. Molecular targets for

- components of essential oils in the insect nervous system—a review. *Molecules* **2018**, *23*, 1–20, doi:10.3390/molecules23010034.
26. Tripathi, A.K.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P.R. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J. Pharmacogn. Phyther.* **2009**, *1*, 052–063.
27. Patiño, W. Aceites esenciales como potenciales agentes fitosanitarios para el control de *Sitophilus zeamais*, Tesis Maestría, Universidad Nacional de Colombia, 2018.
28. Prieto, J.A. Estudio fitoquímico de *Compsonura capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus* sp., Universidad Nacional de Colombia, 2012.
29. Prieto, J. a.; Pabón, L.C.; Patiño, Ó.J.; Delgado, W. a.; Cuca, L.E. Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género *Ocotea* (Lauraceae). *Rev. Colomb. Química* **2010**, *39*, 199–209.
30. Angioni, A.; Sarais, G.; Melis, M.; Russo, M.T.; Schirra, M.; Daquino, S. Postharvest applications of clove essential oils on dry seeds stored under simulated warehouse conditions. *J. Essent. Oil Res.* **2016**, *28*, 15–21, doi:10.1080/10412905.2015.1076743.
31. Cornell, J. *Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data*; tercera.; Jhon Wiley & Sons: New York, 2002; ISBN 0471393673.
32. Lazcano Díaz, E.; Padilla Camberos, E.; Castillo Herrera, G.A.; Estarrón Espinosa, M.; Espinosa Andrews, H.; Paniagua Buelnas, N.A.; Gutiérrez Ortega, A.; Martínez Velázquez, M. Development of essential oil-based phyto-formulations to control the cattle tick *Rhipicephalus microplus* using a mixture design approach. *Exp. Parasitol.* **2019**, *201*, 26–33, doi:10.1016/j.exppara.2019.04.008.
33. Chou, T.C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 621–681, doi:10.1124/pr.58.3.10.
34. Mossa, A.T.H. Green Pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *J. Environ. Sci. Technol.* **2016**, *9*, 354–378, doi:10.3923/jest.2016.354.378.
35. López, S.; García, G.; Ibarra, B. El maíz (*Zea mays* L .) y la cultura Maya. *Rev. Ciencias Biológicas y la Salud* **2012**, *XIV*, 3–8.
36. FAO *Maize Post-harvest Operations*; 2003;
37. Rodríguez, R.; Herrera, F.J. Insectos y hongos en los granos almacenados en Yucatán. *Rev. la Univ. Autónoma Yucatán* **2003**, 48–53.

38. Boyer, S.; Zhang, H.; Lempérière, G. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bull. Entomol. Res.* **2012**, *102*, 213–229, doi:10.1017/S0007485311000654.
39. Langsi, J. Potentials of Fractionated Extracts of *Ocimum canum* (Lamiaceae) and *Laggera pterodonta* (Compositae) for the Protection of Maize against the Infestation of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **2014**, 10–22, doi:10.13140/RG.2.2.15879.50083.
40. García, D. Evaluación de insecticidas de cuatro grupos toxicológicos para el control de *Sitophilus zeamais* motschulsky, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Tesis de pregrado, 2009.
41. Rita Devi, S.; Thomas, A.; Rebijith, K.B.; Ramamurthy, V. V Biology , morphology and molecular characterization of *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera : Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* **2017**, *73*, 135–141, doi:10.1016/j.jspr.2017.08.004.
42. Bisset, J. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Rev Cbana Med Trop* **2002**, *54*, 202–219.
43. Jiménez, E. *Métodos de Control de Plagas*; 1°.; Universidad Nacional Agraria: Managua, Nicaragua, 2009;
44. Arias, C. Los granos y su Calidad |Consrvación y protección de los granos almacenados. In *Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural*; FAO, Ed.; Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe: Santiago, Chile, 1993.
45. Archuleta-Torres, A.; García-Gutiérrez, C.; Ruelas, R.D.; Gaxiola-Castro, L.A.; López, M.Á. Aislamiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con medio selectivo y pruebas de toxicidad contra el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*. *Rev. Entomol. Mex.* **2012**, *11*, 266–269.
46. Rodríguez, M. Estudio de la Resistencia a Insecticidas en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)., Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, 2008.
47. Badii, M.; Garza, V. *CULCyT*. 2007, pp. 9–25.
48. Environmental Protection Agency (EPA) Restricted Use Product Summary Report. *United States* **2020**, 1–56.
49. ICA Subgerencia Protección y Regulación Agrícola Restricciones, Prohibiciones y Suspensión de Registros Restricciones, Prohibiciones y Suspensión de Registros. *Inst. Colomb. Agropecu.* **2016**, *10*.
50. Idrovo, A.J. Vigilancia de las intoxicaciones con plaguicidas en Colombia. *Rev. salud pública* **2000**, *2*, 36–46.

51. Pimentel, M.A.G.; Faroni, L.R.D.A.; Guedes, R.N.C.; Sousa, A.H.; Tótola, M.R. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* **2009**, *45*, 71–74, doi:10.1016/j.jspr.2008.09.001.
52. Ensley, S. *Pesticides and Herbicides*; 1st ed.; Elsevier Ltd., 2015; ISBN 9780123849533.
53. Gómez, M.F.; Moreno, L.A.; Andrade, G.I. *Biodiversidad 2018. Estado y tendencias de la biodiversidad continental de Colombia*; Humboldt, . Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von, Ed.; Panamericana Formas e Impresos S.A. Citación: Bogotá, D. C. Colombia, 2019; ISBN 9789585418639.
54. Dewick, P.M. Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach. **2009**, 400–412.
55. Brahmachari, G. *Bioactive Natural Products*; Brahmachari, G., Ed.; Wiley - VCH, 2006; ISBN 9783527321483.
56. Crozier, A.; Clifford, M.; Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.*; 2006; ISBN 9781405125093.
57. Lawana, V.; Cannon, J.R. Rotenone neurotoxicity: Relevance to Parkinson’s disease. In *Neurotoxicity of Pesticides*; Aschner, M., Costa, L., Eds.; Academic Press: United States, 2020; Vol. 4, pp. 209–254 ISBN 9780128223222.
58. Thakare, R.; Rathod, D.; Rai, M. Role of Medicinal Plants and their Metabolites for the Management of Plant Pathogens. In *Sustainable Crop Disease Management using Natural Products*; Sangeetha, G., Kurucheve, V., Jayaraj, J., Eds.; CAB International: Boston, 2015; Vol. 16, pp. 131–143 ISBN 9781780643236.
59. Sangeetha, G.; Anandan, A.; Kurucheve, V. Natural Products and Elicitors of Natural Origin for the Postharvest Management of Diseases of Fruits and Vegetables G. In *Sustainable Crop Disease Management using Natural Products*; Sangeetha, G., Kurucheve, V., Jayaraj, J., Eds.; CAB International: Boston, 2015; pp. 49–73 ISBN 9781780643236.
60. Bayer CropScience, S.L. K-Obiol® ULV6 Available online: www.es.bayer.es (accessed on Apr 18, 2021).
61. Haddi, K.; Mendonça, L.P.; Dos Santos, M.F.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E. Metabolic and behavioral mechanisms of indoxacarb resistance in *sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* **2015**, *108*, 362–369, doi:10.1093/jee/tou049.
62. Alonso, O. Los insecticidas botánicos: una opción ecológica para el control de plagas. *Pastos y Forrajes* **1999**, *22*, 1–16.
63. Ripathi, A.K.; Upadhyay, S.; Bhuiyan, M.; Bhattacharya, P.R. *A review of essential oils as biopesticide in insect-pest management*; 2009; Vol. 1;.

64. Ebadollahi, A.; Jalali Sendi, J. A review on recent research results on bio-effects of plant essential oils against major Coleopteran insect pests. *Toxin Rev.* **2015**, *34*, 76–91, doi:10.3109/15569543.2015.1023956.
65. Zheljaskov, V.D.; Shiwakoti, S.; Jeliaskova, E.A.; Astatkie, T.; States, U. *Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization. ACS Symposium Series; American Chemical Society.* 2016, pp. 145–166.
66. Stashenko, E. *Aceites Esenciales*; UIS: Bucaramanga, Colombia, 2009; ISBN 9789584459442.
67. Nerio, L.S.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 372–378, doi:10.1016/j.biortech.2009.07.048.
68. Mahajan, A.; Shelke, U.; Gadhave, P.; Bhalerao, K. Essential Oils: At a Glance. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *4*, 718–738.
69. Fang, R.; Jiang, C.H.; Wang, X.Y.; Zhang, H.M.; Liu, Z.L.; Zhou, L.; Du, S.S.; Deng, Z.W. Insecticidal activity of essential oil of *Carum Carvi* fruits from china and its main components against two grain storage insects. *Molecules* **2010**, *15*, 9391–9402, doi:10.3390/molecules15129391.
70. Bertoli, A.; Conti, B.; Mazzoni, V.; Meini, L.; Pistelli, L. Volatile chemical composition and bioactivity of six essential oils against the stored food insect *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera Dryophthoridae). *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 2063–2071, doi:10.1080/14786419.2011.607453.
71. Oliveira, A.P.; Santana, A.S.; Santana, E.D.R.; Lima, A.P.S.; Faro, R.R.N.; Nunes, R.S.; Lima, A.D.; Blank, A.F.; Araújo, A.P.A.; Cristaldo, P.F.; et al. Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Ind. Crops Prod.* **2017**, *107*, 198–205, doi:10.1016/j.indcrop.2017.05.046.
72. Tanu, B.; Harpreet, K. Benefits of essential oil - Review. *J. Chem. Pharm. Res.* **2016**, *8*, 6, 143–149, doi:10.1017/S0952675714000244.
73. Bustos, G. Acción insecticida conjunta de mezclas de los aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **2016**, 52.
74. Herrera, J.M.; Zunino, M.P.; Dambolena, J.S.; Pizzolitto, R.P.; Gañan, N.A.; Lucini, E.I.; Zygadlo, J.A. Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *70*, 435–442, doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.074.

75. Quan, M.; Liu, Q.Z.; Liu, Z.L. Identification of insecticidal constituents from the essential oil from the aerial parts stachys riederi var. Japonica. *Molecules* **2018**, *23*, doi:10.3390/molecules23051200.
76. Herrera, J.M.; Zunino, M.P.; Massuh, Y.; Pizzollito, R.P.; Dambolena, J.S.; Gañan, N.A.; Zygadlo, J.A. Fumigant toxicity of five essential oils rich in ketones against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *AgriScientia* **2014**, *31*, 35–41, doi:10.31047/1668.298x.v31.n1.9839.
77. Asawalam E. F; Emosairue S. O.; Hassanali A. Contribution of different constituents to the toxicity of the essential oil constituents of *Vernonia amygdalina* (Compositae) and *Xylopia aetiopica* (Annonaceae) on maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *African J. Biotechnol.* **2008**, *7*, 2957–2962, doi:10.5897/AJB08.121.
78. Bekele, J.; Hassanali, A. Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum kilimandscharicum* and *Ocimum kenyense* (Labiatae) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 385–391, doi:10.1016/S0031-9422(01)00067-X.
79. Huang, Y.; Ho, S.H. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *J. Stored Prod. Res.* **1998**, *34*, 11–17, doi:10.1016/S0022-474X(97)00038-6.
80. Huang, Y.; Ho, S.H.; Lee, H.C.; Yap, Y.L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Stored Prod. Res.* **2002**, *38*, 403–412, doi:10.1016/S0022-474X(01)00042-X.
81. Suthisut, D.; Fields, P.G.; Chandrapatya, A. Contact toxicity, feeding reduction, and repellency of essential oils from three plants from the ginger family (zingiberaceae) and their major components against *sitophilus zeamais* and *tribolium castaneum*. *J. Econ. Entomol.* **2011**, *104*, 1445–1454, doi:10.1603/EC11050.
82. Kim, S. Il; Lee, D.W. Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. *J. Asia. Pac. Entomol.* **2014**, *17*, 13–17, doi:10.1016/j.aspen.2013.09.002.
83. Long Liu, Z.; Hua Jiang, G.; Zhou, L.; Zhi Liu, Q. Analysis of the essential oil of *dipsacus japonicus* flowering aerial parts and its insecticidal activity against *sitophilus zeamais* and *tribolium castaneum*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2013**, *68*, 13–18, doi:10.1515/znc-2013-1-203.
84. Yildirim, E.; Emsen, B.; Kordali, S. Insecticidal Effects of Monoterpenes on *Sitophilus*

- zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2013**, *86*, 198–204, doi:10.5073/JABFQ.2013.086.027.
85. Huang, Y.; Ho, S.H.; Kini, R.M. Bioactivities of Safrole and Isosafrole on *Sitophilus zeamais*(Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum*(Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* **1999**, *92*, 676–683, doi:10.1093/jee/92.3.676.
86. Suthisut, D.; Fields, P.G.; Chandrapatya, A. Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *J. Stored Prod. Res.* **2011**, *47*, 222–230, doi:10.1016/j.jspr.2011.03.002.
87. Chu, S.S.; Feng Hu, J.; Liu, Z.L. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Manag. Sci.* **2011**, *67*, 714–718, doi:10.1002/ps.2112.
88. Pascual, M.J.; Ballesta, M.C.; Soler, A. Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz. *Boletín Sanid. Veg. Plagas* **2004**, *30*, 279–286.
89. Herrera, J.M.; Dambolena, S.; Pizzolitto, R.P.; Zunino, M.P.; Zygadlo, J.A. Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize. *J. Stored Prod. Res.* **2015**, *62*, 74–80, doi:10.1016/j.jspr.2015.04.006.
90. Chu, S.S.; Du, S.S.; Liu, L.Z. Fumigant compounds from the essential oils of Chinese *Blumea balsamifera* leaves against maize weevil (*Sitophilus zeamais*). *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1–7, doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/289874.
91. Chu, S.S.; Wang, C.F.; Du, S.S.; Liu, S.L.; Liu, Z.L. Toxicity of the essential oil of *Illicium difengpi* stem bark and its constituent compounds towards two grain storage insects. *J. Insect Sci.* **2011**, *11*, 1–10, doi:10.1673/031.011.15201.
92. Liu, Z.L.; Chu, S.S.; Jiang, G.H. Toxicity of *Schizonpeta multifida* essential oil and its constituent compounds towards two grain storage insects. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 905–909, doi:10.1002/jsfa.4263.
93. Yang, K.; Zhou, Y.X.; Wang, C.F.; Du, S.S.; Deng, Z.W.; Liu, Q.Z.; Liu, Z.L. Toxicity of *rhododendron anthopogonoides* essential oil and its constituent compounds towards *sitophilus zeamais*. *Molecules* **2011**, *16*, 7320–7330, doi:10.3390/molecules16097320.
94. Wang, C.F.; Yang, K.; Zhang, H.M.; Cao, J.; Fang, R.; Liu, Z.L.; Du, S.S.; Wang, Y.Y.; Deng, Z.W.; Zhou, L. Components and insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves. *Molecules* **2011**, *16*, 3077–3088, doi:10.3390/molecules16043077.

95. Kouninki, H.; Hance, T.; Noudjou, F.A.; Lognay, G.; Malaisse, F.; Ngassoum, M.B.; Mapongmetsem, P.M.; Ngamo, L.S.T.; Haubruge, E. Toxicity of some terpenoids of essential oils of *Xylopiya aethiopica* from Cameroon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *J. Appl. Entomol.* **2007**, *131*, 269–274, doi:10.1111/j.1439-0418.2007.01154.x.
96. Oepp, B.; Bulletin, E. Insecticide co-formulated mixtures. *EPPO Bull.* **2012**, *42*, 353–357, doi:10.1111/epp.2608.
97. Rajendran, S.; Sriranjini, V. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *J. Stored Prod. Res.* **2008**, *44*, 126–135, doi:10.1016/j.jspr.2007.08.003.
98. Usha, P. Fumigant and contact toxic potential of essential oils from plant extracts against stored product pests. *J. Biopest* **2008**, *5*, 120–128.
99. Wu, H.; Liu, X. ru; Yu, D. dong; Zhang, X.; Feng, J. tao Effect of allyl isothiocyanate on ultra-structure and the activities of four enzymes in adult *Sitophilus zeamais*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2014**, *109*, 12–17, doi:10.1016/j.pestbp.2014.01.001.
100. Konuş, M. Malathion resistance mediated by detoxification enzymes in *sitophilus zeamais* (motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). *Fresenius Environ. Bull.* **2015**, *24*, 2146–2151.
101. Enayati, A.A.; Ranson, H.; Hemingway, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. Review. *Insect Mol. Biol.* **2005**, *14*, 3–8, doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x.
102. Fang, S.M. Insect glutathione S-transferase: A review of comparative genomic studies and response to xenobiotics. *Bull. Insectology* **2012**, *65*, 265–271.
103. Ketterman, A.J.; Saisawang, C.; Wongsantichon, J. Insect glutathione transferases. *Drug Metab. Rev.* **2011**, *43*, 253–265, doi:10.3109/03602532.2011.552911.
104. Kiran, S.; Prakash, B. Toxicity and biochemical efficacy of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis*. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *74*, 817–823, doi:10.1016/j.indcrop.2015.05.073.
105. Habig, S. Dosage de la Glutathion S-transfèrase (GST). **1974**, 1974–1976, doi:10.1016/j.jneuroim.2003.12.019\rS0165572804000025 [pii].
106. Vontas, J.G.; Enayati, A.A.; Small, G.J.; Hemingway, J. A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2000**, *68*, 184–192, doi:10.1006/pest.2000.2512.
107. Liao, M.; Xiao, J.-J.; Zhou, L.-J.; Liu, Y.; Wu, X.-W.; Hua, R.-M.; Wang, G.-R.; Cao, H.-Q. Insecticidal Activity of *Melaleuca alternifolia* Essential Oil and RNA-Seq Analysis of *Sitophilus zeamais* Transcriptome in Response to Oil Fumigation. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–19.

108. Scott, J.G.; Wen, Z. Cytochromes P450 of insects: The tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57*, 958–967, doi:10.1002/ps.354.
109. Zamora, H. *Métodos selectos de bioquímica experimental*; Bogotá, 2012; ISBN 9789587195354.
110. Bolter, C.J.; Chefurka, W. The effect of phosphine treatment on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in the granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1990**, *36*, 52–60, doi:10.1016/0048-3575(90)90020-3.
111. Shahriari, M.; Zibae, A.; Sahebzadeh, N.; Shamakhi, L. Effects of α -pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2018**, *150*, 40–47, doi:10.1016/j.pestbp.2018.06.015.
112. Claiborne, A. Catalase Activity. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*; Greenwald, R., Ed.; CRC Press, 2018; pp. 283–284 ISBN 9781315893822.
113. Hadwan, M.H. New method for assessment of serum catalase activity. *Indian J. Sci. Technol.* **2016**, *9*, 1–5, doi:10.17485/ijst/2016/v9i4/80499.
114. Sinha, A.K. Colorimetric assay of catalase. *Anal. Biochem.* **1972**, *47*, 389–394, doi:10.1016/0003-2697(72)90132-7.
115. Iwase, T.; Tajima, A.; Sugimoto, S.; Okuda, K.I.; Hironaka, I.; Kamata, Y.; Takada, K.; Mizunoe, Y. A simple assay for measuring catalase activity: A visual approach. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1–4, doi:10.1038/srep03081.
116. Rajkumar, V.; Gunasekaran, C.; Christy, I.K.; Dharmaraj, J.; Chinnaraj, P.; Paul, C.A. Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of *Mentha piperita* L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2019**, *156*, 138–144, doi:10.1016/j.pestbp.2019.02.016.
117. Rodriguez, A.M.; Zunino, M.P.; Dambolena, J.S. Optimización de ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.). *Rev. la Fac. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.* **2018**, *5*, 51.
118. Ellman, G.; Courtney, D.; Andres, V.; Featherston, R. A new and rapid colorimetric of acetylcholinesterase determination. *Biochem. Pharmacology* **1961**, *7*, 88–95.
119. Su, J.; Liu, H.; Gou, K.; Chen, L.; Yang, M.; Chen, Q. Research Advances and Detection Methodologies for Microbe-Derived Acetylcholinesterase Inhibitors: A Systemic Review. *Molecules* **2017**, *22*, 1–24, doi:10.3390/molecules22010176.
120. Saad, M.M.G.; Abou-Taleb, H.K.; Abdelgaleil, S.A.M. Insecticidal activities of

- monoterpenes and phenylpropenes against *Sitophilus oryzae* and their inhibitory effects on acetylcholinesterase and adenosine triphosphatases. *Appl. Entomol. Zool.* **2018**, *53*, 173–181, doi:10.1007/s13355-017-0532-x.
121. Abdelgaleil, S.A.M.; Mohamed, M.I.E.; Badawy, M.E.I.; El-Arami, S.A.A. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *sitophilus oryzae* (L.) and *tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 518–525, doi:10.1007/s10886-009-9635-3.
122. Ribeiro, B.M.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, E.E.; Santos, J.P. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera : Curculionidae). *J. Stored Prod. Res.* **2003**, *39*, 21–31.
123. IRAC- Argentina Resistencia de Insectos Available online: <http://irac-argentina.org/resistencia-a-insectos/> (accessed on Sep 25, 2018).
124. Hurtado, M. *Operaciones básicas del proceso, mezclas y disoluciones*; Malaga: España, 2012; ISBN UF0227.
125. Tallarida, R.J. Drug synergism: Its detection and applications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298*, 865–872.
126. Tang, J.; Wennerberg, K.; Aittokallio, T. What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 1–5, doi:10.3389/fphar.2015.00181.
127. Lee, S. II Drug interaction: Focusing on response surface models. *Korean J. Anesthesiol.* **2010**, *58*, 421–434, doi:10.4097/kjae.2010.58.5.421.
128. Patt, J.M.; Tarshis Moreno, A.M.; Niedz, R.P. Response surface methodology reveals proportionality effects of plant species in conservation plantings on occurrence of generalist predatory arthropods. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–23, doi:10.1371/journal.pone.0231471.
129. Chou, T. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 440–447, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1947.
130. Cedergreen, N.; Svendsen, C.; Backhaus, T. Chemical Mixtures : Concepts for Predicting Toxicity. *Encycl. Environ. Manag.* 2013, 2572–2581.
131. Abbott, W.S. the Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. *Econ. Entomol.* **1925**, *18*, 265–267.
132. Montgomery, D. *Diseño y análisis de experimentos*; Segunda.; México D.F., 2004; ISBN 968-18-6156-6.
133. Bhattacharyya, B.B.; Daganzo, C. Multinomial Probit: The Theory and its Application to Demand Forecasting. *J. Am. Stat. Assoc.* **2006**, *77*, 691, doi:10.2307/2287751.

134. Dambolena, J.S.; Zunino, M.P.; Herrera, J.M.; Pizzolitto, R.P.; Areco, V.A.; Zygadlo, J.A. Terpenes: Natural Products for Controlling Insects of Importance to Human Health - A Structure-Activity Relationship Study. *Psyche (Stuttg)*. **2016**, *17*, doi:10.1155/2016/4595823.
135. Charrad, M.; Ghazzali, N.; Boiteau, V.; Niknafs, A. Nbclust: An R package for determining the relevant number of clusters in a data set. *J. Stat. Softw.* **2014**, *61*, 1–36, doi:10.18637/jss.v061.i06.
136. Fraley, C.; Raftery, A. How Many Clusters? Which Clustering Method? Answers Via Model-Based Cluster Analysis. *Comput. J.* **1998**, *41*, 578–588, doi:10.1093/comjnl/41.8.578.
137. Holliday, J.D.; Rodgers, S.L.; Willett, P.; Chen, M.Y.; Mahfouf, M.; Lawson, K.; Mullier, G. Clustering files of chemical structures using the fuzzy k-means clustering method. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 894–902, doi:10.1021/ci0342674.
138. Sakuma, M. Probit analysis of preference data. *Appl. Entomol. Zool.* **1998**, *33*, 339–347, doi:10.1303/aez.33.339.
139. Murtagh, F. Ward's Hierarchical agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *J. Classif.* **2014**, *31*, 274–295, doi:10.1007/s00357.
140. Bezerra, M.A.; Lemos, V.A.; Novaes, C.G.; de Jesus, R.M.; Filho, H.R.S.; Araújo, S.A.; Alves, J.P.S. Application of mixture design in analytical chemistry. *Microchem. J.* **2020**, *152*, doi:10.1016/j.microc.2019.104336.
141. Punekar, N.S. *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*; Springer Nature Singapore Pte Ltd.: Singapore, 2018; ISBN 9789811307843.
142. Zamora, H. *Métodos selectos de bioquímica experimental*; Universidad Nacional de Colombia: Bogotá, 2012;
143. Valipour Nouroozi, R.; Valipour Nouroozi, M.; Ahmadizadeh, M. Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate Protein Quantification Assay. *Int. Electron. J. Med.* **2015**, *4*, 11–17, doi:10.31661/iejm158.
144. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130–7139.
145. Dowd, A.J.; Steven, A.; Morou, E.; Hemingway, J.; Vontas, J.; Paine, M.J.I. A simple glutathione transferase-based colorimetric endpoint assay for insecticide detection. *Enzyme Microb. Technol.* **2009**, *45*, 164–168, doi:10.1016/j.enzmictec.2009.05.008.
146. Wang, J.L.; Li, Y.; Lei, C.L. Evaluation of monoterpenes for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Nat. Prod. Res.* **2009**, *23*, 1080–

- 1088, doi:10.1080/14786410802267759.
147. Environmental Protection Agency (EPA) Chemicals Available online: <https://comptox.epa.gov/dashboard> (accessed on Apr 21, 2020).
148. Jang, Y.S.; Yang, Y.C.; Choi, D.S.; Ahn, Y.J. Vapor phase toxicity of marjoram oil compounds and their related monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7892–7898, doi:10.1021/jf051127g.
149. U, E.E. Insecticidal activity of essential oils : octopaminergic sites of action. **2001**.
150. Patiño, Á. Control de insectos de granos almacenados mediante volátiles provenientes de bacterias marinas del caribe colombiano. **2019**, 60–68.
151. Crespo, Y.A.; Bravo Sánchez, L.R.; Quintana, Y.G.; Cabrera, A.S.T.; Bermúdez del Sol, A.; Mayancha, D.M.G. Evaluation of the synergistic effects of antioxidant activity on mixtures of the essential oil from *Apium graveolens* L., *Thymus vulgaris* L. and *Coriandrum sativum* L. using simplex-lattice design. *Heliyon* **2019**, *5*, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01942.
152. Hamza, T.; Hadwan, M.H. New Spectrophotometric Method for the Assessment of Catalase Enzyme Activity in Biological Tissues. *Curr. Anal. Chem.* **2020**, *16*, 1–16, doi:10.20944/preprints201910.0323.v1.
153. López, M.D.; Pascual-Villalobos, M.J. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Ind. Crops Prod.* **2010**, *31*, 284–288, doi:10.1016/j.indcrop.2009.11.005.
154. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T.L.; Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *187*, 10–22, doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042.
155. National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Summary for CID 442495 Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pulegone>. (accessed on Nov 15, 2020).
156. FDA 3-carene Available online: <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=FoodSubstances&id=CARENE> (accessed on Nov 14, 2020).
157. Zunino, M.P.; Herrera, J.M.; Pizzolitto, R.P.; Rubinstein, H.R.; Zygadlo, J.A.; Dambolena, J.S. Effect of Selected Volatiles on Two Stored Pests: The Fungus *Fusarium verticillioides* and the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7743–7749, doi:10.1021/acs.jafc.5b02315.
158. Lwande, W.; Hassanali, P.; Mcdowell, P.G.; Moreka, L.; Nokoe, S.K.; Waterman, P.G.

- Constituents of *Commiphora rostrata* and some of their analogues as maize weevil, *Sitophilus zeamais* repellents. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **1992**, *13*, 679–683, doi:<https://doi.org/10.1017/S174275840000789X>.
159. Oviedo S, J.S. Efectos insecticidas y bioquímicos de aceites esenciales obtenidos de plantas colombianas sobre el gorgojo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), Pontificia Universidad Javeriana, 2019.
160. Seomoon, D.; Lee, K.; Kim, H.; Lee, P.H. Inter- and intramolecular palladium-catalyzed allyl cross-coupling reactions using allylindium generated in situ from allyl acetates, indium, and indium trichloride. *Chem. - A Eur. J.* **2007**, *13*, 5197–5206, doi:[10.1002/chem.200601338](https://doi.org/10.1002/chem.200601338).
161. Malosh, C.F.; Ready, J.M. Catalytic cross-coupling of alkylzinc halides with α -chloroketones. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10240–10241, doi:[10.1021/ja0467768](https://doi.org/10.1021/ja0467768).
162. Corey, E.J.; Ensley, H.E.; Suggs, J.W. A Convenient Synthesis of (8-(-)-Pulegone from (-)-Citronellol. *J. Org. Chem* **1976**, *41*, 39–40, doi:[10.1021/jo00864a047](https://doi.org/10.1021/jo00864a047).
163. Cheallaigh, A.N.; Mansell, D.J.; Toogood, H.S.; Tait, S.; Lygidakis, A.; Scrutton, N.S.; Gardiner, J.M. Chemoenzymatic Synthesis of the Intermediates in the Peppermint Monoterpenoid Biosynthetic Pathway. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 1546–1552, doi:[10.1021/acs.jnatprod.7b01026](https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b01026).
164. Heather, E.; Shimmon, R.; McDonagh, A.M. Organic impurity profiling of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) synthesised from catechol. *Forensic Sci. Int.* **2015**, *248*, 140–147, doi:[10.1016/j.forsciint.2014.12.021](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.12.021).
165. French, L.G. Isolation of (R)-(+)-Pulegone from the European Pennyroyal Mint, *Mentha Pulegium*. *Chem. Educ.* **2002**, *7*, 270–277, doi:[10.1007/s00897020599a](https://doi.org/10.1007/s00897020599a).

6. Anexos

A. Anexo: Revisión de constituyentes químicos de AEs con actividad insecticida frente a *S. zeamais*

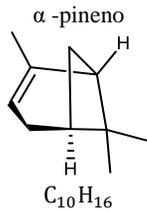
Anexo A.1 AEs bioactivos sobre *S. zeamais* estudiados por el equipo de investigación

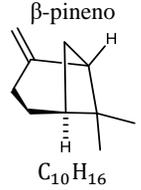
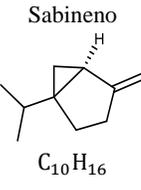
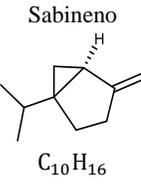
Aceite Esencial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
	<i>Eucalyptus</i> sp.	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Lippia alba</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Mintostachys septentrionalis</i>	<i>Xylopiya discreta</i>	<i>Citrus</i> sp.	<i>Hypericum mexicanum</i>	<i>Hypericum myricarifolium</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>	<i>Piper el-metanum</i>	<i>Zanthoxylum monophyllum</i> (Frutos)	<i>Ocotea longifolia</i>	<i>Satureja viminea</i>	<i>Coleonema album</i>	<i>Ocotea</i> sp.	<i>Piper</i> cf. <i>asperiusculum</i>	<i>Ambrosia cumanensis</i>	<i>Illicium verum</i>	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Piper nubigenum</i>	<i>Piper aduncum</i>	<i>Piper pertomentellum</i>	<i>Cymbopogon nardus</i>	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>Lippia</i> sp.	
% Repelencia 14 µL/L aire	53.3	73.3	70	83.3	80	83.3	86.7	90	83.3	73.3	100.0	18	38.0	76.7	80.0	96.7	66.7	76.7	20.0	40.0	73.3	80.0	96.7	80.0	90.0	80.0	
% Mortalidad Contacto 0,15 µL/adulto	90.0	63.3	100.0	96.0	100.0	63.3	36.7	0.0	33.0	26.7	33.0	20.0	13.0	100.0	56.7	100.0	66.7	93.3	96.7	73.3	80.0	100.0	33.3	100.0	93.3	100.0	
Fumigante CL 50 - µL/L aire	184.3	243.7	254.1	303.4	304.4	422.3	427.8	223.5	463.1	481.6	643.9	73.3	280.5	483.6	593.0	642.6											
Nonano	-	-	-	-	-	-	-	53.08	1.59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-Pineno	6.60	23.20	0.08	2.80	0.69	24.71	0.29	25.28	45.52	16.89	8.48	3.10	4.00	0.18	7.12	24.01	2.00	0.66	0.26	0.03	0.90	6.14	0.81	-	-	0.14	

Aceite Esencial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Sabineno	-	0.16	-	0.19	0.33	5.08	0.29	0.32	-	9.39	0.46	25.70	-	0.12	3.62	-	-	0.45	-	0.05	0.23	-	0.18	-	-	-
β -Pinoeno	0.11	4.87	-	0.54	0.80	36.04	-	3.60	2.86	0.46	0.27	-	-	0.26	11.42	3.19	1.22	5.33	0.02	0.09	2.01	0.34	1.55	-	-	1.73
α -Felandreno	-	2.89	-	0.07	-	1.71	-	-	-	0.51	43.47	1.00	4.70	-	2.02	-	0.86	-	0.08	-	0.28	2.48	-	-	-	0.07
α -Terpineno	-	0.69	-	0.09	-	-	-	-	0.07	4.85	0.21	1.40	-	-	0.39	0.16	0.11	-	0.05	-	5.10	0.36	-	-	-	0.92
p-Cimeno	0.76	0.55	-	0.50	-	3.40	-	0.14	0.55	1.90	4.96	-	-	-	1.20	1.90	0.06	-	0.10	-	0.55	4.73	-	-	-	12.26
Limoneno	6.50	3.72	53.10	1.73	1.84	3.04	91.22	0.28	1.90	6.58	19.36	-	0.90	1.05	-	5.93	2.82	1.48	2.33	0.07	0.61	6.59	0.24	5.94	-	0.56
1,8-Cineol	66.65	23.22	-	17.12	-	10.06	-	-	-	-	-	9.20	-	0.14	-	1.74	6.30	-	0.27	0.26	-	-	-	-	-	-
Terpinoleno	0.03	0.82	-	0.33	0.07	0.06	-	-	0.21	6.58	2.87	2.50	74.0	0.22	0.15	3.67	0.07	-	-	-	2.34	0.09	-	0.08	-	0.08
γ -Terpineno	-	1.59	-	0.09	-	-	0.05	-	0.23	5.72	0.24	2.50	0.70	-	0.47	0.21	0.20	-	0.09	-	9.81	0.39	-	-	-	2.93
Fenchona	-	-	-	27.77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalool	0.04	0.09	0.07	3.55	-	-	1.17	-	-	-	-	-	-	0.64	2.22	-	-	-	-	2.17	-	22.43	0.26	-	1.35	-
β -Careno	-	-	-	3.99	-	0.03	-	-	-	11.93	-	-	3.60	-	-	-	0.20	-	0.22	-	0.24	0.07	0.03	-	-	-
β -Cariofileno	-	6.47	0.12	-	16.51	0.14	-	2.01	13.59	0.26	0.17	1.00	4.90	2.17	1.02	-	0.50	1.99	-	-	7.09	-	4.78	-	-	4.76
Alcanfor	-	13.19	-	27.99	-	-	-	-	-	0.21	-	-	-	-	-	1.36	0.08	0.41	-	-	-	0.10	-	-	-	-
α -Terpineol	1.91	0.92	-	0.68	-	-	-	-	-	-	-	3.50	-	0.16	-	44.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estragol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.16	81.78	-	-	-	-	-	-
Decanal	-	-	-	-	-	-	0.63	-	0.54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-	0.21	-	-
Pulegona	-	-	-	-	41.85	-	-	-	-	-	-	-	-	38.61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvona	-	-	27.94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-	-
Acetato de terpinilo	12.20	-	-	-	-	0.09	-	-	-	2.81	-	-	-	-	-	1.83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piperitona	-	-	0.89	-	0.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.57	-	-	-	-	45.46	-	-	-	-
Geranial	-	-	-	-	-	-	0.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.08	44.62	-
Citronelal	-	-	-	-	-	-	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39.41	-	-
Anetol	-	-	-	-	0.76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	93.40	0.07	-	-	-	-	-	-
2-undecanona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.07	-	-	-

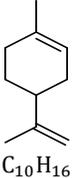
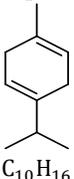
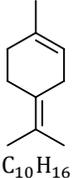
Aceite Esencial	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Safrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.03	-	-	-	0.28	-	-	-	-	-
Timol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52.17
Carvacrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.85
Eugenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.33	-	-	-	1.14	-	0.22
Acetato de geranilo	0.08	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15.93	0.52	-
Metil eugenol	-	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	0.07	-	-	-	-	-
Terpinen-4-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Farneseno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.43	-	-	-	-	-	-	-	-	0.55	-	-	-	-	-	-
Isopulegona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de mentilo	-	-	-	-	1.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-E Farnesol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neral	-	-	-	-	-	-	0.28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.47	30.75	-
Nonanal	-	-	-	-	-	-	0.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil isoeugenol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-
Miristicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38.12	1.16	-	-	36.68	-	-	-	-	-
α -Tujeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cluster	Fumigante - Repelente							Fumigante - No contacto						Fumigante moderado - Contacto - Repelente					Contacto - Repelente							

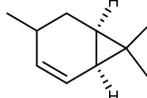
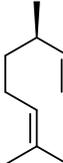
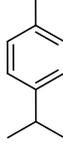
Anexo A.2 Potenciales constituyentes químicos de AEs con actividad insecticida frente a *S. zeamais*

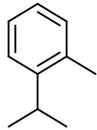
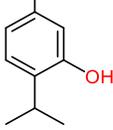
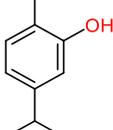
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
MONOTERPENOIDES - HIDROCARBURO						
I.  $C_{10}H_{16}$	1,2	<i>Xylopiya discreta</i> (24,71%)	Fumigante: A (CL50 422,3 μ L/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 μ L/L aire)	Fumigante: vial en vial Sin evitar contacto (medio)	CL_{50} 56,2 mg/L 120 μ L/L CL_{90} 170 μ L/L CL_{50} 264 mg/L	[28] [86]
		<i>Cupressus sempervirens</i> (16,89%)	Fumigante: B (CL50 481,6 μ L/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire)	Sin evitar contacto Contacto: Tópico (etanol) 24 h Papel con medio Tópico (etanol) 7 días	DL_{50} 0,347 mg/adulto 32,40 μ L 227 μ g/mg DL_{90} 1223 μ g/mg	[82] [84]
		<i>Hypericum mexicanum</i> (25,28%)	Fumigante: A (CL50 223,5 μ L/L aire) Contacto: D (%M 0% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 90,0% - 14 μ L/L aire) AChE: B (CI50 620 ppm)	Papel filtro 24h Medio de cultivo	%M 0 % 0 %	[77] [95]
		<i>Hypericum myricarifolium</i> (45,52%)	Fumigante: A (CL50 463,1 μ L/L aire) Contacto: C (%M 33,0% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 μ L/L aire)			
		<i>Rosmarinus officinalis</i> (23,20%)	Fumigante: A (CL50 243,7 μ L/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire)			
		<i>Ocotea sp</i> (24,01%)	Fumigante: C (CL50 642,6 μ L/L aire) Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 96,7% - 14 μ L/L aire)			
		<i>Piper el-metatum</i> (8,48%)	Fumigante: C (CL50 643,9 μ L/L aire) Contacto: C (%M 33,0% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 100% - 14 μ L/L aire)			
		<i>Eucalyptus sp.</i> (6,60%)	Fumigante: A (CL50 184,3 μ L/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: B (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire)			

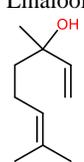
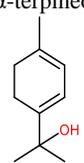
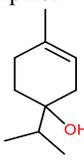
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>				
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.		
2.  β-pineno C ₁₀ H ₁₆	1,2	<i>Piper aduncum</i> (6,14%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μL/L aire)					
		<i>Coleonema álbum</i> (7,12%)	Fumigante: B (CL50 593,0 μL/L aire) Contacto: B (%M 56,7% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μL/L aire)					
		<i>Xylopiya discreta</i> (36,04%)	Fumigante: A (CL50 422,3 μL/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 μL/L aire)				Fumigante: Sin evitar contacto (medio) <i>CL</i> ₅₀ 172 μL/L <i>CL</i> ₉₀ 262 μL/L Vial en vial con barrera <i>CL</i> ₅₀ 172 mg/cm ²	[86] [146]
3.  Sabineno C ₁₀ H ₁₆	1,2	<i>Coleonema álbum</i> (11,42%)	Fumigante: B (CL50 593,0 μL/L aire) Contacto: B (%M 56,7% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μL/L aire)					
		<i>Ambrosia cumanensis</i> (5,33%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 93,3% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 76,7% - 14 μL/L aire)				Contacto: Papel con medio <i>DL</i> ₅₀ 26,365 μL Tópico (etanol) 7 días 113 μg/mg	[84] [81]
		<i>Xylopiya discreta</i> (5,08%)	Fumigante: A (CL50 422,3 μL/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 μL/L aire)				Papel filtro <i>DL</i> ₉₀ 853 μg/mg Medio de cultivo %M 46% (0,27 mg/cm ²) 50% (0,38 mL/100g)	[77] [95]
3.  Sabineno C ₁₀ H ₁₆	1,2	<i>Cupressus sempervirens</i> (9,39%)	Fumigante: B (CL50 481,6 μL/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μL/L aire)					
		<i>Zanthoxylum monophyllum</i> (Fruto) (25,70%)	Fumigante: A (CL50 73,3 μL/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 μL/adulto) Repelente: D (%RP 18,0% - 0,126 μL/cm ²) Antialimentario: D (IDA 8,7% - 500ppm)				Contacto: PTFE <i>CL</i> ₅₀ 9,12 mg/L Tópico (etanol) 7 días <i>DL</i> ₅₀ 23,98 μg/adulto	[94]

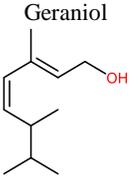
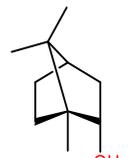
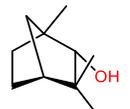
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
4. Canfeno <chem>C10H16</chem>	2	<i>Rosmarinus officinalis</i> (8,71%)	Fumigante: A (CL50 243,7 µL/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 µL/L aire)	Fumigante: Sin evitar contacto (medio)	CL_{50} 95,0 µL/L CL_{90} 125,0 µL/L	[86]
5. δ -3-careno <chem>C10H16</chem>	1,2	<i>Cupressus sempervirens</i> (11,93%)	Fumigante: B (CL50 481,6 µL/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 µL/L aire)	Fumigante: Vial en vial Vial en vial con barrera	CL_{50} 57,6 mg/L CL_{50} 3,69 mg/cm ²	[28] [146]
6. α -terpineno <chem>C10H16</chem>	1,2	<i>Cupressus sempervirens</i> (4,85%)	Fumigante: B (CL50 481,6 µL/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 µL/L aire)	Fumigante: Vial en vial Vial en vial con barrera Sin evitar contacto(medio)	CL_{50} 56,2 mg/L CL_{50} 1,31 mg/cm ² 5,46 mg/L 46,76 mg/L	[28] [146] [87] [107]
7. α -Felandreno <chem>C10H16</chem>	1,2	<i>Piper el-metanum</i> (43,47%)	Fumigante: C (CL50 643,9 µL/L aire) Contacto: C (%M 33,0% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 100% - 14 µL/L aire)	Fumigante: Vial en vial	CL_{50} 72,7 mg/L	[28]
8. Limoneno <chem>C10H16</chem>	1,2	<i>Eucalyptus sp.</i> (6,50%)	Fumigante: A (CL50 184,3 µL/L aire) Contacto: A (%M 90,0% - 0,15 µL/adulto) Repelente: B (%RP 53,3% - 14 µL/L aire)	Fumigante Vial en vial	CL_{50} 41,42mg/L	[28] [82]

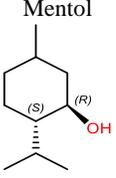
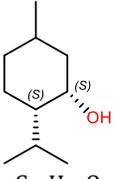
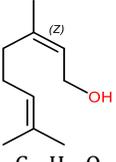
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
 $C_{10}H_{16}$		<i>Lippia alba</i> (53,10%)	Fumigante: A (CL50 254,1 μ L/L aire) Contacto: A (%M 100 % - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 70,0% - 14 μ L/L aire)	Sin evitar contacto PTFE	122 mg/L 48,18 mg/L	[94]
		<i>Citrus sp.</i> (91,22%)	Fumigante: A (CL50 427.8 μ L/L aire) Contacto: C (%M 36,7% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 86,7% - 14 μ L/L aire)	Contacto Tópico etanol 24h Papel con medio Papel filtro 24 h.	DL_{50} 0,187 mg/adulto 15,062 μ L %M 0% (1,44 mg/cm ²)	[82] [84] [78]
		<i>Cupressus sempervirens</i> (6,58%)	Fumigante: B (CL50 481,6 μ L/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire)	Fumigante PTFE (medio)	D-limoneno CL_{50} 48,18mg/L	[69]
		<i>Ocotea sp.</i> (5,93%)	Fumigante: C (CL50 642,6 μ L/L aire) Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 96,7% - 14 μ L/L aire)	Contacto Tópico 7 días	DL_{50} 29,86 μ g/adulto DL_{90} 44,86 μ g/adulto	
9	1,2	<i>Cupressus sempervirens</i> (5,72%)	Fumigante: B (CL50 481,6 μ L/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire)	Fumigante Vial en vial Sin evitar contacto (medio)	CL_{50} 45,9 mg/L 32,58 mg/L	[28] [107]
 $C_{10}H_{16}$		<i>Piper nubigenum</i> (9,81%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 80,0% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire)	Contacto Sin reporte		
10.	1,2	<i>Cupressus sempervirens</i> (6,58%)	Fumigante: B (CL50 481,6 μ L/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire)	Fumigante Vial en vial con barrera	CL_{50} 1,3 mg/cm ²	[146]
 $C_{10}H_{16}$		<i>Ocotea longifolia</i> (74,0%)	Fumigante: A (CL50 280,5 μ L/L aire) Contacto: D (%M 13,0% -) Repelente: C (%RP 38,0% - 0,126 μ L/cm ²) Antialimentario: C (IDA 27,5% - 500ppm)			

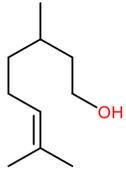
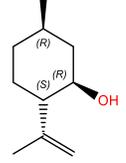
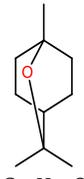
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
11. δ -4-careno  $C_{10}H_{16}$				Fumigante: Sin evitar contacto CL_{50} 14,02 mg/L Contacto: Tópico 7 días DL_{50} 3,55 μ g/g		[87]
12. β -citroneleno  $C_{10}H_{18}$				Contacto: Papel con medio $\%M$ 28,856 μ g		[84]
13. β -Mirceno  $C_{10}H_{16}$	2			Fumigante: Sin evitar contacto CL_{50} 14,02 mg/L Contacto: Tópico (etanol) 24h Papel con medio DL_{50} 0,372 mg/adulto 53,801 μ L		[82] [84]
MONOTERPENOIDES - AROMÁTICO						
14. p-cimeno  $C_{10}H_{14}$	1,2	<i>Lippia sp.</i> (12,26%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μ L/L aire)	Fumigante: Sin evitar contacto CL_{50} 23,28 mg/L Contacto: Tópico 7 días DL_{50} 23,18 μ g/g		[87]

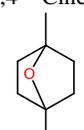
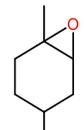
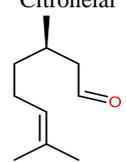
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
15. o-cimeno  C ₁₀ H ₁₄				Fumigante Grasa de nailon	CL ₅₀ 42,3 µL/L	[76]
				Contacto Papel filtro 24h.	CL ₅₀ >200 µg/ cm ²	[74]
MONOTERPENOIDES - FENOL						
16. Timol  C ₁₀ H ₁₄ O	1	<i>Lippia sp.</i> (52,17%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 µL/L aire)	Sin reportes		
17. Carvacrol  C ₁₀ H ₁₄ O	1	<i>Lippia sp.</i> (7,85%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 µL/L aire)	Sin reportes		
MONOTERPENOIDES - ALCOHOL						

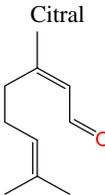
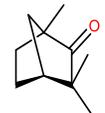
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
18. Linalool  <chem>CC1=CC(C=C(C1)O)C</chem> $C_{10}H_{18}O$	1,2	<i>Piper aduncum</i> (22,43%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μ L/L aire)	Fumigante Sin evitar contacto PTFE Contacto Tópico (etanol) 24h. Tópico 24h. Papel con medio Tópico 7 días	CL_{50} 16,0 mg/L 10,02 mg/L 10,46 mg/L 10,02 mg/L DL_{50} 0,034 mg/adulto 24,88 μ g/adulto 2,445 μ L/petri 24,88 μ g/adulto 13,9 μ g/adulto	[82] [83] [94] [91] [82] [83] [84] [91] [94]
19. α -terpineol  <chem>CC1=CC(C=C(C1)O)C</chem> $C_{10}H_{16}O$	1,2	<i>Ocotea sp.</i> (44,29%)	Fumigante: C (CL50 642,6 μ L/L aire) Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 96,7% - 14 μ L/L aire)	Fumigante PTFE Sin evitar contacto (medio) Contacto Papel con medio	CL_{50} 7,45 mg/L CL_{90} 12,18 mg/L CL_{50} 4,1 mg/L DL_{50} 7,680 μ g	[90] [107] [84]
20. terpinen-4-ol  <chem>CC1=CC(C=C(C1)O)C</chem> $C_{10}H_{18}O$	3*	<i>Zanthoxylum monophyllum</i> (Fruto) (3,50%)	Fumigante: A (CL50 73,3 μ L/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: D (%RP 18,0% - 0,126 μ L/cm ²) Antialimentario: D (IDA 8,7% - 500ppm)	Fumigante PTFE Sin evitar contacto (medio) Contacto Papel con medio Tópico (etanol) 7 días Medio de cultivo Papel filtro 24 h	CL_{50} 4,79 mg/L CL_{90} 8,37 mg/L CL_{50} 45,0 μ L/L CL_{90} 61,0 μ L/L CL_{50} 3,22 mg/L %M 100% (10 μ L/petri) DL_{50} 10,0 μ g/mg DL_{90} 21,0 μ g/mg %M 2,0 % (0,05 mL) 0,0 % (1,44 mg/cm ²)	[90] [86] [107] [84] [81] c [78]

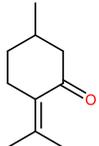
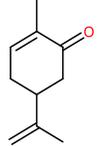
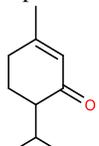
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
21. Geraniol  C ₁₀ H ₁₈ O	4			Fumigante PTFE 24h. Sin evitar contacto	<i>CL</i> ₅₀ 19,2 mg/L 15,11 mg/L	[75] [83]
22. Isoborneol  C ₁₀ H ₁₈ O				Fumigante: Sin evitar contacto (medio)	<i>CL</i> ₅₀ 73,0 µL/L <i>CL</i> ₉₀ 133,0 µL/L	[86]
23. Borneol  C ₁₀ H ₁₈ O				Contacto Papel con medio	<i>DL</i> ₅₀ 8,992 µg	[84]
24. Fenchol  C ₁₀ H ₁₈ O				Contacto Papel con medio	<i>DL</i> ₅₀ 7,395 µL/petri	[84]

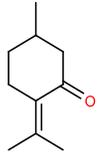
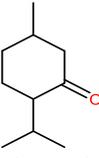
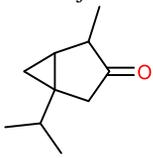
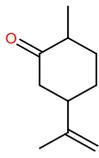
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
24. Mentol  <chem>CC1=C(C)C(C(C)C)C(O)C1O</chem> $C_{10}H_{20}O$				Contacto Papel con medio	DL_{50} 7,521 µg/petri	[84]
25. Isomentol  <chem>CC1=C(C)C(O)C(O)C1</chem> $C_{10}H_{20}O$				Contacto Papel con medio	DL_{50} 6,903 µL/petri	[84]
26. Nerol  <chem>CC(=C/C=C/C=C/O</chem> $C_{10}H_{18}O$				Contacto Papel con medio	DL_{50} 28,207 µL/petri	[84]

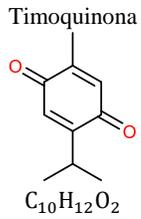
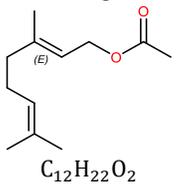
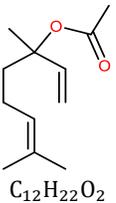
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
27. β- Citronelol  C ₁₀ H ₂₀ O				Contacto Papel con medio	<i>DL</i> ₅₀ 21,939 μL/petri	[84]
28. Isopulegol  C ₁₀ H ₂₀ O	4			Sin reportes		
MONOTERPENOIDES – ÉTER / EPÓXIDO						
29. 1,8-cineol  C ₁₀ H ₁₈ O	1,2	<i>Eucalyptus sp.</i> (66,65%)	Fumigante: A (CL50 184,3 μL/L aire) Contacto: A (%M 90,0% - 0,15 μL/adulto) Repelente: B (%RP 53,3% - 14 μL/L aire)	Fumigante Vial en vial Vial en vial con barrera PTFE	<i>CL</i> ₅₀ 28,3 mg/L <i>CL</i> ₅₀ 1,57 mg/cm ² 2,96 mg/L	[28] [146] [90]
		<i>Rosmarinus officinalis</i> (23,22%)	Fumigante: A (CL50 243,7 μL/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μL/L aire)	PTFE 24h. Sin evitar contacto Sin evitar contacto (medio)	<i>CL</i> ₉₀ 5,46 mg/L <i>CL</i> ₅₀ 5,90 mg/L <i>CL</i> ₅₀ 2,96 mg/L <i>CL</i> ₉₀ 48 μL/L <i>CL</i> ₉₀ 63 μL/L	[75] [83] [86]
		<i>Lavandula stoechas</i> (17,12%)	Fumigante: A (CL50 303,3 μL/L aire) Contacto: A (%M 96,0% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 μL/L aire) AChE: B (CI50 569 ppm)	Contacto Tópico 24h.	<i>DL</i> ₅₀ 16,34 μg/adulto 15,8 μg/adulto	[83] [75]
		<i>Xylopiya discreta</i> (10,06%)	Fumigante: A (CL50 422,3 μL/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 μL/L aire)	Papel con medio. Tópico 7 días Papel filtro 24h.	1,989 μL/petri 48,0 μg/mg <i>DL</i> ₉₀ 123,0 μg/mg %M 54,0 % (0,46mg/cm ²)	[84] [81] [77]

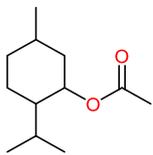
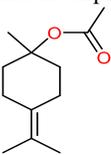
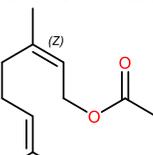
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
		<i>Zanthoxylum monophyllum</i> (Fruto) (9,20%)	Fumigante: A (CL50 73,3 µL/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 µL/adulto) Repelente: D (%RP 18,0% - 0,126µL/cm ²) Antialimentario: D (IDA 8,7% - 500ppm)		0,0 % (0,10 mg/cm ²)	[78]
30. 1,4 - Cineol  C ₁₀ H ₁₈ O				Fumigante PTFE <i>CL</i> ₅₀ 21,43 mg/mL Contacto Tópico 7 días <i>DL</i> ₅₀ 50,86 µg/adulto		[93]
31. Óxido de limoneno  C ₁₀ H ₁₆ O				Contacto Papel con medio. <i>DL</i> ₅₀ 3,235 µL		[84]
MONOTERPENOIDES - ALDEHÍDO						
32. Citronelal  C ₁₀ H ₁₈ O	1	<i>Cymbopogon nardus</i> (39,41%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 µL/L aire)	Contacto Papel con medio <i>DL</i> ₅₀ 8,086 µL		[84]

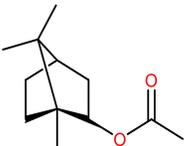
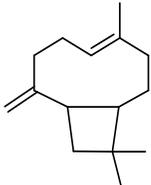
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
33. Citral  C ₁₀ H ₁₈ O	1	<i>Cymbopogon citratus</i> (44.62 %)	Fumigante: D Contacto: A (%M 93,0% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 90,0% - 14 µL/L aire)	No reportes		
MONOTERPENOIDES - CETONA						
34. Fenchona  C ₁₀ H ₁₆ O	1	<i>Lavandula stoechas</i> (27,77%)	Fumigante: A (CL50 303,3 µL/L aire) Contacto: A (%M 96,0% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 µL/L aire) AchE: B (CI50 569 ppm)	Contacto Papel con medio.	DL ₅₀ 2,445 µL	[84]
35. Alcanfor  C ₁₀ H ₁₆ O	1,2	<i>Rosmarinus officinalis</i> (13,19%)	Fumigante: A (CL50 243,7 µL/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 µL/L aire)	Fumigante Sin evitar contacto (medio)	CL ₅₀ 78,0 µL/L CL ₉₀ 153,0 µL/L	[86]
		<i>Lavandula stoechas</i> (27,99%)	Fumigante: A (CL50 303,3 µL/L aire) Contacto: A (%M 96,0% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 µL/L aire) AchE: B (CI50 569 ppm)	PTFE Grasa de nailon Contacto Papel con medio Tópico (etanol) 7 días Papel filtro 24h.	CL ₅₀ 21,67 mg/L CL ₉₀ 43,54 mg/L CL ₅₀ >600,0 µL/L DL ₅₀ 4,867µg 137,0 µg/mg DL ₉₀ 555,0 µg/mg CL ₅₀ >200 µg/cm ² %M 70,43 % (0,07 mg/cm ²)	[90] [74] [84] [81] [74] [78]
36. Pulegona	1	<i>Minthostachys septentrionalis</i> (41,85%)	Fumigante: A (CL50 304,4 µL/L aire) Contacto: A (%M 100% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 µL/L aire) AchE: C (CI50 720 ppm)	Fumigante Grasa de nailon PTFE 7 días	CL ₅₀ 11,81 µL/L CL ₅₀ 3,47 mg/mL	[76] [92]

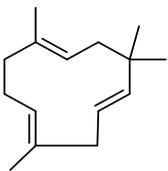
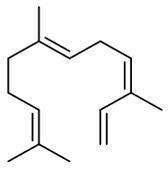
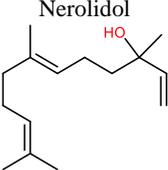
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
 <chem>CC1=CC(=O)CC(C)C1</chem> $C_{10}H_{16}O$		<i>Satureja viminea</i> (38,61%)	Fumigante: B (CL50 483,6 μ L/L aire) Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 76,7% - 14 μ L/L aire)	Contacto Tópico 7 días Papel filtro 24h.	DL_{50} 33,47 μ g/adulto CL_{50} 53,60 μ g/cm ²	[74]
37. Carvona  <chem>CC1=CC(=O)CC(C)C1</chem> $C_{10}H_{14}O$	1	<i>Lippia alba</i> (27,94%)	Fumigante: A (CL50 254,1 μ L/L aire) Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 70,0% - 14 μ L/L aire)	Contacto Papel con medio Fumigante Grasa de nailon PTFE Contacto Tópico 7 días Fumigante Grasa de nailon Contacto Papel filtro 24h.	%M 100% R-Carvona CL_{50} 17,56 μ L/L 2,76 mg/L CL_{90} 4,56 mg/L DL_{50} 2,79 μ g/adulto DL_{90} 3,93 μ g/adulto S-Carvona CL_{50} 28,10 μ L/L CL_{50} 25,5 μ g/cm ²	[84] [76] [69] [69] [76] [74]
38. Piperitona  <chem>CC1=CC(=O)C(C)C=C1</chem> $C_{10}H_{16}O$	1	<i>Piper aduncum</i> (45,46%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μ L/L aire)	Fumigante Grasa de nailon Contacto Papel filtro 24h.	CL_{50} 70,3 μ L/L CL_{50} 29,4 μ g/cm ²	[74]

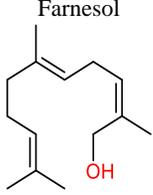
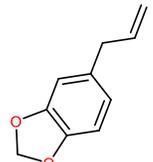
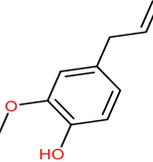
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
39. Isopulegona  C ₁₀ H ₁₆ O	3	<i>Satureja viminea</i> (0,04%)		Sin Reportes		
40. Mentona  C ₁₀ H ₁₈ O				Fumigante PTFE Grasa de nailon Contacto Papel filtro 24h. Tópico 7 días Papel con medio	<i>CL</i> ₅₀ 10,32 mg/mL 85,46 µL/L <i>CL</i> ₅₀ 87,6 µg/ cm ² <i>DL</i> ₅₀ 14,46 µg/adulto %M 100 % (10 µL/petri)	[92] [76] [74] [92] [84]
41. α -tujona  C ₁₀ H ₁₆ O				Fumigante Grasa de nailon Contacto Papel filtro 24h.	<i>CL</i> ₅₀ 65,53 µL/L <i>CL</i> ₅₀ 165,0 µg/ cm ²	[76] [74]
42. Dihidrocarvona  C ₁₀ H ₁₆ O				Fumigante Grasa de nailon Contacto Papel filtro 24h. Papel con medio	<i>CL</i> ₅₀ 30,5 µL/L <i>CL</i> ₅₀ 71,3 µg/ cm ² %M 100 % (10 µL/petri)	[74] [84]

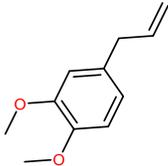
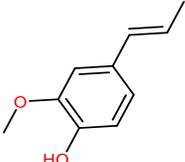
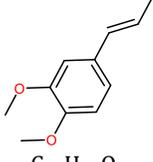
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
43. Timoquinona  $C_{10}H_{12}O_2$				Fumigante Grasa de nailon CL_{50} 13,8 $\mu L/L$ Contacto Papel filtro 24h. CL_{50} 16,5 $\mu g/cm^2$		[74]
MONOTERPENOIDES – ESTER (ACETATO)						
44. acetato de geranilo  $C_{12}H_{22}O_2$	1	<i>Cymbopogon nardus</i> (15,93%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 $\mu L/adulto$) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 $\mu L/L$ aire)	Contacto Papel con medio DL_{50} 11,831 $\mu L/petri$		[84]
45. acetato de linalilo  $C_{12}H_{22}O_2$	4			Contacto Papel con medio DL_{50} 35,024 $\mu L/petri$		[84]

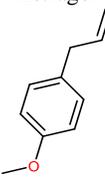
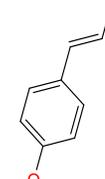
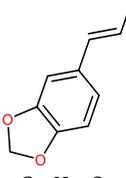
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
46. acetato de mentilo  $C_{12}H_{22}O_2$	3	<i>Minthostachys septentrionalis</i> (1,84%)	Fumigante: A (CL50 304,4 μ L/L aire) Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μ L/L aire) AchE: C (CI50 720 ppm)	Sin reportes		
47. acetato de terpinilo  $C_{12}H_{20}O_2$	1	<i>Eucalyptus sp.</i> (12,20%)	Fumigante: A (CL50 184,3 μ L/L aire) Contacto: A (%M 90,0% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: B (%RP 53,3% - 14 μ L/L aire)	Sin reportes		
48. Acetato de nerilo  $C_{12}H_{22}O_2$				Contacto Papel con medio DL_{50} 7,364 μ L		[84]

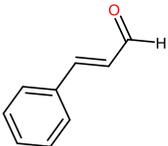
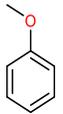
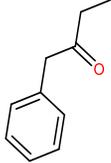
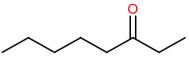
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
49. Acetato de bornilo  $C_{10}H_{18}O$				Contacto Papel con medio DL_{50} 9,161 μ L/petri		[84]
SESQUITERPENOIDES - HIDROCARBURO						
50. β -cariofileno  $C_{15}H_{24}$	1,2	<i>Minthostachys septentrionalis</i> (16,51%) <i>Hypericum myricarifolium</i> (13,59%) <i>Piper nubigenum</i> (7,09%) <i>Piper pertomentellum</i> (4,78%) <i>Lippia sp.</i> (4,76%)	Fumigante: A (CL50 304,4 μ L/L aire) Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μ L/L aire) AchE: C (CI50 720 ppm) Fumigante: A (CL50 463,1 μ L/L aire) Contacto: C (%M 33,0% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 83,3% - 14 μ L/L aire) Fumigante: D Contacto: A (%M 80,0% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire) Fumigante: D Contacto: C (%M 33,3% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 96,7% - 14 μ L/L aire) Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μ L/L aire)	Contacto Papel filtro 24h.	$\%M$ 0% (0,04 mg/cm ²)	[78]

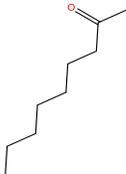
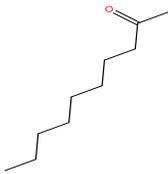
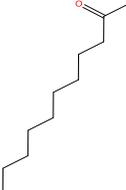
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
51. α -Humeleno  $C_{15}H_{24}$				Fumigante Sin evitar contacto $CL_{50} >382$ mg/L Contacto Tópico (etanol) 24h DL_{50} 0,040 mg/adulto Tópico (etanol) 7 días 20,0 μ g/mg	[82] [81]	
52. α -farneseno  $C_{15}H_{24}$	2	<i>Piper el-metanum</i> (1,43%)	Fumigante: C (CL50 643,9 μ L/L aire) Contacto: C (%M 33,0% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 100% - 14 μ L/L aire)	Sin reportes		
SESQUITERPENOIDES - ALCOHOL						
53. Nerolidol  $C_{15}H_{26}O$	4			Fumigante PTFE CL_{50} 353,0 mg/L Contacto Tópico 7 días DL_{50} 29,30 μ g/adulto	[93]	

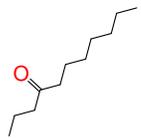
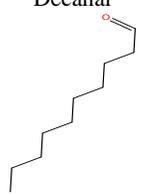
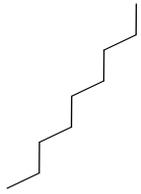
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
54. Farnesol  C ₁₅ H ₂₄ O	2	<i>Zanthoxylum monophyllum</i> (Fruto) (1,30%)	Fumigante: A (CL ₅₀ 73,3 μL/L aire) Contacto: D (%M 26,7% - 0,15 μL/adulto) Repelente: D (%RP 18,0% - 0,126μL/cm ²) Antialimentario: D (IDA 8,7% - 500ppm)	Sin reportes		
FENILPROPANOIDES						
55. Safrol  C ₁₀ H ₁₀ O ₂	2	<i>Piper nubigenum</i> (0,28%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 80,0% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μL/L aire)	Fumigante Sin evitar contacto (medio) PTFE 7 días	CL ₅₀ 36,42 mg/L 32,96 mg/L	[85] [91]
				Contacto Tópico 7 días Papel filtro 6 días	DL ₅₀ 8,54 μg/adulto CL ₅₀ 0,74 mg/cm ²	[91] [85]
56. Eugenol  C ₁₀ H ₁₀ O ₂	2	<i>Cymbopogon nardus</i> (1,14%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 100% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μL/L aire)	Fumigante PTFE 24h	CL ₅₀ 15,9 mg/L	[75]
				Contacto Tópico 24h	DL ₅₀ 8,1 μg/adulto 31,0 μg/mg DL ₉₅ 47,6 μg/mg	[80]

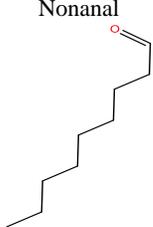
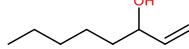
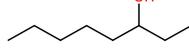
Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
57. metil eugenol  $C_{11}H_{14}O_2$	2	<i>Rosmarinus officinalis</i> (0,13%)	Fumigante: A (CL50 243,7 μ L/L aire) Contacto: B (%M 63,3% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 73,3% - 14 μ L/L aire)	Contacto Tópico 24h DL_{50} 29,4 μ g/mg DL_{95} 51,9 μ g/mg	[80]	
58. Isoeugenol  $C_{10}H_{10}O_2$	4			Contacto Tópico 24h. DL_{50} 30,7 μ g/mg DL_{95} 47,6 μ g/mg	[80]	
59. Metil isoeugenol  $C_{11}H_{14}O_2$	3	<i>Coleonema álbum</i> (0,15%)	Fumigante: B (CL50 593,0 μ L/L aire) Contacto: B (%M 56,7% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: A (%RP 80,0% - 14 μ L/L aire)	Sin reportes		

Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
60. Estragol  $C_{10}H_{12}O$	1	<i>Ocimum basilicum</i> (81,78%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 73,3% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: C (%RP 40,0% - 14 μ L/L aire)	Fumigante Sin evitar contacto CL_{50} 4,00 mg/L CL_{50} 14,10 mg/L Contacto Tópico (etanol) 24h Tópico (etanol) 7 días	DL_{50} 0,039 mg/adulto 17,63 μ g/mg	[82] [94] [82] [94]
61. Anetol  $C_{10}H_{12}O$	1	<i>Illicium verum</i> (93,40%)	Fumigante: D Contacto: A (%M 96,7% - 0,15 μ L/adulto) Repelente: D (%RP 20,0% - 14 μ L/L aire)	Sin reportes		
62. Isosafrol  $C_{10}H_{10}O_2$				Fumigante Sin evitar contacto (medio) CL_{50} 32,66 mg/L Contacto Papel filtro 6 días CL_{50} 0,22 mg/cm ²		[85]

Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
63. Cinamaldehído  C ₉ H ₈ O				Contacto Papel filtro 6 días	CL ₅₀ 0,66 mg/cm ²	[79]
OTROS - AROMÁTICOS						
64. Anisol  C ₇ H ₈ O				Fumigante PTFE 24h Contacto Tópico 24h	CL ₅₀ 14,8 mg/L DL ₅₀ >150 µg/adulto	[75]
65. 4-fenil-butanona  C ₁₀ H ₁₂ O				Contacto Tópico 7 días	DL ₅₀ 6,98 µg/adulto	[93]
66. 3-octanona  C ₈ H ₁₆ O				Fumigante Grasa de nailon	CL ₅₀ 219,7 µL/L CL ₉₅ 378,2 µL/L	[89]

Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
67. 2-nonanona  C ₉ H ₁₈ O	4			Fumigante Vial en vial	CL ₅₀ 251,1 μmol/L	[150]
68. 2-decanona  C ₁₀ H ₂₀ O	4			Fumigante Vial en vial Grasa de nailon	%M 0% (90,1 μL/L) CL ₅₀ 0,26 mmol/L	[150] [157]
69. 2-undecanona  C ₁₁ H ₂₂ O	2	<i>Piper pertomentellum</i> (0,07%)	Fumigante: D Contacto: C (%M 33,3% - 0,15 μL/adulto) Repelente: A (%RP 96,7% - 14 μL/L aire)	Fumigante Vial en vial	%M 0% (90,1 μL/L)	[150]

Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
70. 4-undecanona  C ₁₁ H ₂₂ O	4					
71. Decanal  C ₁₀ H ₂₀ O	3	<i>Citrus sp.</i> (0,63%)	Fumigante: A (CL50 427,8 µL/L aire) Contacto: C (%M 36,7% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 86,7% - 14 µL/L aire)	Repelente A 5 µL/disco	%RP 74,0%	[158]
72. Nonano  C ₉ H ₂₀	1	<i>Hypericum mexicanum</i> (53,08%)	Fumigante: A (CL50 223,5 µL/L aire) Contacto: D (%M 0% - 0,15 µL/adulto) Repelente: A (%RP 90,0% - 14 µL/L aire) AChE: B (CI50 620 ppm)	Sin reporte		

Código compuestos bioactivos	Determinadas por el equipo de investigación			Reportes del compuesto frente a <i>S. zeamais</i>		
	Criterio selección	% abundancia en la especie donde se encuentra	Actividad del AE donde se encuentra el compuesto frente a <i>S. zeamais</i>	Actividad y metodología	Efecto reportado	ref.
73. Nonanal  C ₉ H ₁₈ O	3			Repelente: A 5 µL/disco	%RP 62,4%	[158]
74. 1-octen-3-ol  C ₈ H ₁₆ O				Fumigante Grasa de nailon	CL ₅₀ 27,7 µL/L CL ₉₅ 42,4 µL/L	[89]
75. 3-octanol  C ₈ H ₁₈ O				Fumigante Grasa de nailon	CL ₅₀ 43,2 µL/L CL ₉₅ 60,2 µL/L	[89]

Clasificación: **A:** muy activo (%M = 70-100) (CL₅₀ o CI₅₀ = 0.1 – 470 µL*L⁻¹), **B:** moderadamente activo (%M = 50 -69) (CL₅₀ o CI₅₀ = 480 - 600 µL*L⁻¹), **C:** poco activo (%M = 15 -49) (CL₅₀ o CI₅₀ > 610 µL*L⁻¹) y **D:** sin reportes.

Criterios: 1. Componentes mayoritario (≥ 4.0 %), 2. componentes minoritarios en dos o más AEs bioactivos, 3. componentes minoritarios sin reporte bibliográficos, 4. Componentes con similitud estructural a los compuestos seleccionados

*compuestos con reportes inhibitorios sobre una de las enzimas de interés del insecto.

B. Anexo: Aislamiento y síntesis de algunos constituyentes químicos presentes en AEs

Anexo B.1 Estragol aislado de Artemisia dracunculus.

El aceite esencial proveniente de las partes aéreas de Artemisia dracunculus (Estragol al 88.5%) [159], fue adquirido comercialmente de la empresa Suaga Organic Herbest, ubicada en Ubaté, Cundinamarca. Del aceite esencial se tomó 1 g y este fue sometido a fraccionamiento mediante cromatografía flash (CF) utilizando como fase estacionaria silica gel P60 (40-63 μm , SiliCycle® Inc, Canada) y como sistema de elución n-hexano. Obteniéndose 40 fracciones que fueron finalmente reunidas en 4, de acuerdo con el estudio realizado en cromatografía en capa delgada (CCD) con placas de aluminio cubiertas con silica gel 60 F254 (SiliCycle® Inc, Canada). La fracción 3 (880 mg) correspondió al estragol obtenido como un aceite de color amarillo (rendimiento del 88%), el cual fue identificado por análisis de sus espectros RMN y comparación con los datos de literatura [160].

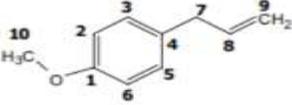
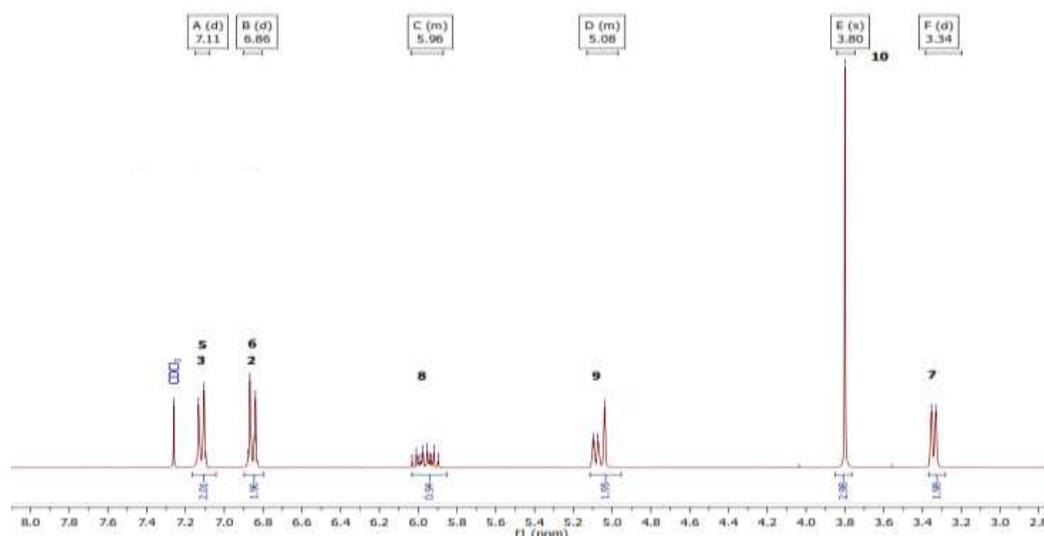
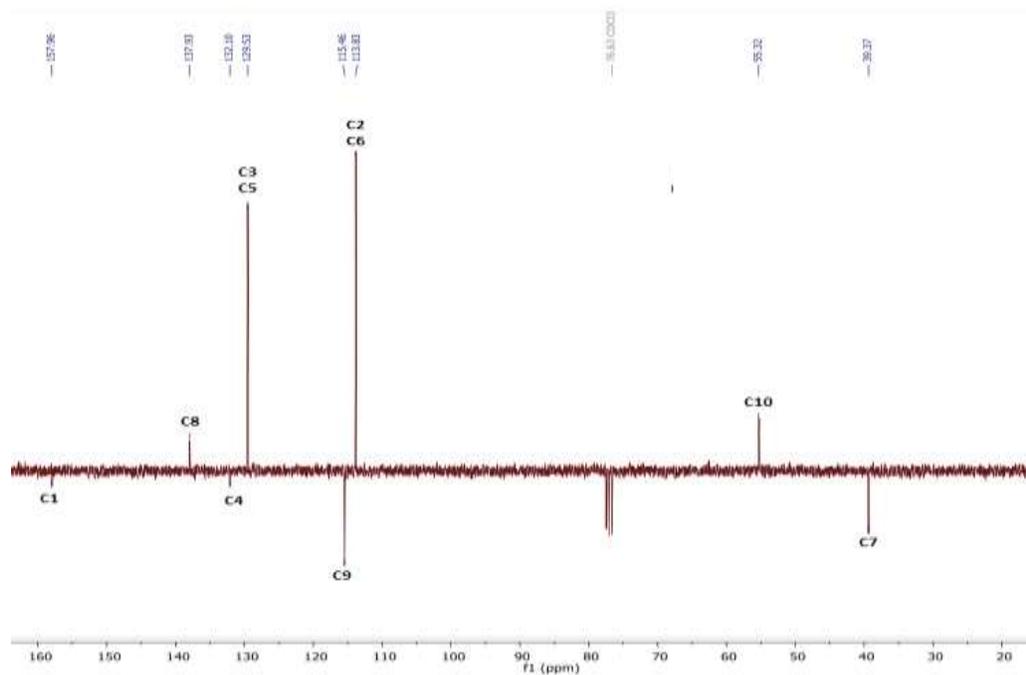
	Nombre	Estragol
	Estado Físico	Líquido
	Formula molecular	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$
	Masa molecular	148.2 g/mol
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.11 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H-3 y H-5), 6.86 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H-2 y H-6), 5.96 – 6.06 (m, 1H, H-8), 5.08 - 5.14 (m, 2H, H-9), 3.81 (s, 3H, OCH_3) y 3.34 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, H-7).		
APT (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 113.8 (CH-2, CH-6), 129.5 (CH-3, CH-5), 132.1 (C-4), 158.0 (C-1), 39.4 (CH ₂ -7), 115.4 (CH ₂ -9) y 137.9 (CH ₂ -8).		
Datos descritos en la literatura [160]		

Figura 6.1: Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de estragol**Figura 6.2:** Espectros de APT (100 MHz, CDCl_3) de estragol

Anexo B.2 Aislamiento de piperitona proveniente del AE de *Piper aduncum*

El aceite esencial de hojas frescas de *Piper aduncum* previamente extraído por el equipo de investigación mediante la técnica de arrastre con vapor (2 h.), especie colectada en La Sierra (Cundinamarca) con número de colección COL595171 (piperitona al 45.46%) [27]. Del AEs se tomó un 1 g y este fue sometido a fraccionamiento mediante cromatografía flash (CF) utilizando como fase estacionaria sílica gel P60 (40-63 μm , SiliCycle® Inc, Canada) y como sistema de elución n-hexano/acetona 9:1. En total se obtuvieron 50 fracciones que fueron reunidas en 3, de acuerdo con el estudio realizado en cromatografía en capa delgada (CCD), con placas de aluminio cubiertas con sílica gel 60 F254 (SiliCycle® Inc, Canada). La fracción 2 (550mg) se purificó por CF utilizando como fase estacionaria sílica gel R60 (20-45 μm , SiliCycle® Inc, Canada) y el mismo sistema de elución, obteniendo 3 fracciones de acuerdo con el estudio por CCD. La fracción 1 (390 mg) correspondió al compuesto piperitona, un aceite amarillo claro, translúcido, el cual fue identificado por análisis de sus espectros RMN y comparación con los datos de literatura 39.0 %.

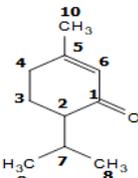
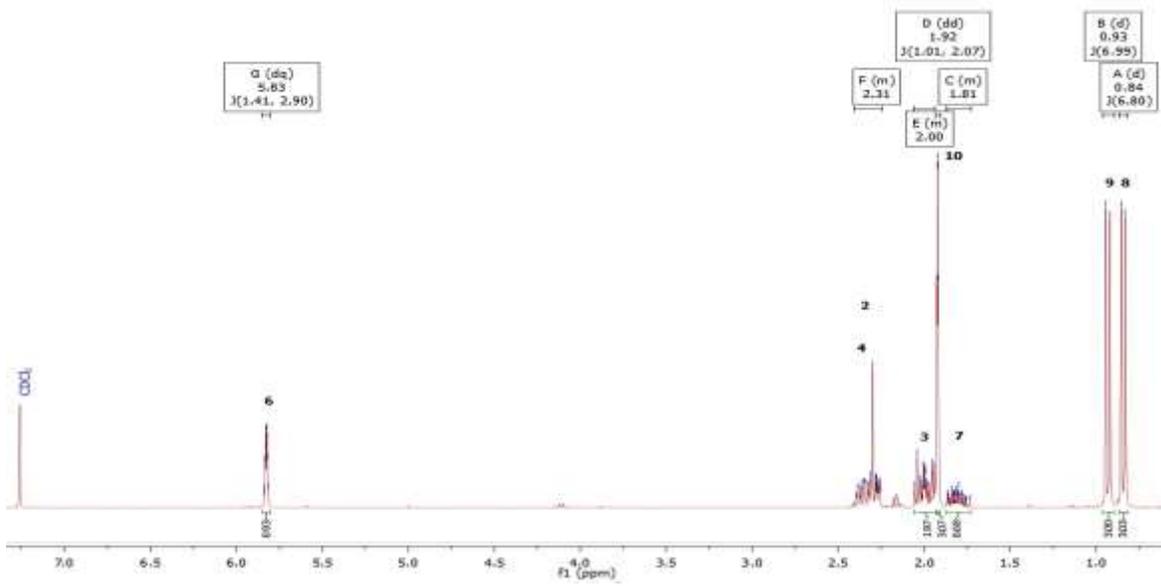
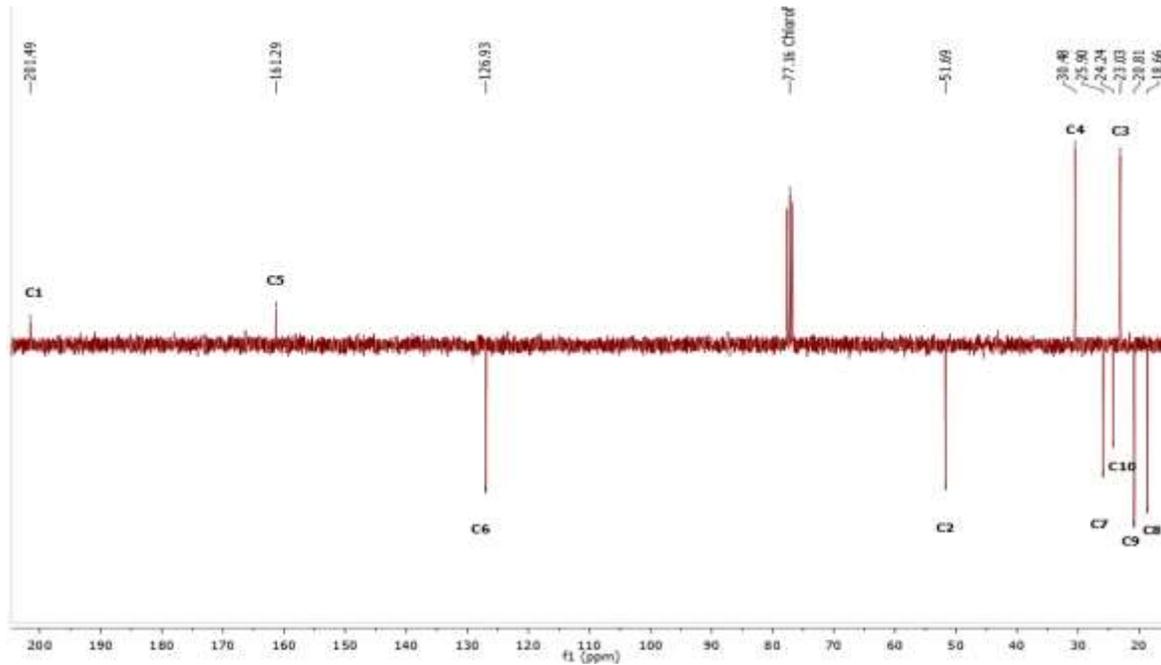
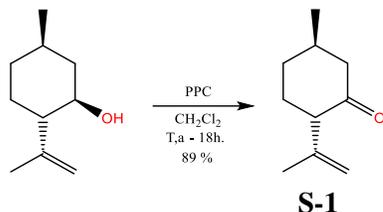
	Nombre	Piperitona
	Estado Físico	Líquido incoloro
	Formula molecular	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$
	Masa molecular	152.23 g/mol
RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 5.83 (dq, J = 2.9, 1.4 Hz, 1H, H-6), 2.40 – 2.23 (m, 3H H-2 y H-4), 2.04 – 1.93 (m, 2H, 3-H), 1.91 (dd, J = 2.1, 1.0 Hz, 3H, H-10), 1.86 – 1.72 (m, 1H, H-7), 0.93 (d, J = 7.0 Hz, 3H, H-8) y 0.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H, H-9).		
APT (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 201.5(C=O), 161.3(C-7), 126.9(C-8), 51.7 (C-6), 30.5 (C-2), 25.9(C-3),24.2 (C-4), 23,0(C-5), 20,8 (C-9) y 18.7 (C-10).		
Datos descritos en la literatura [161]		

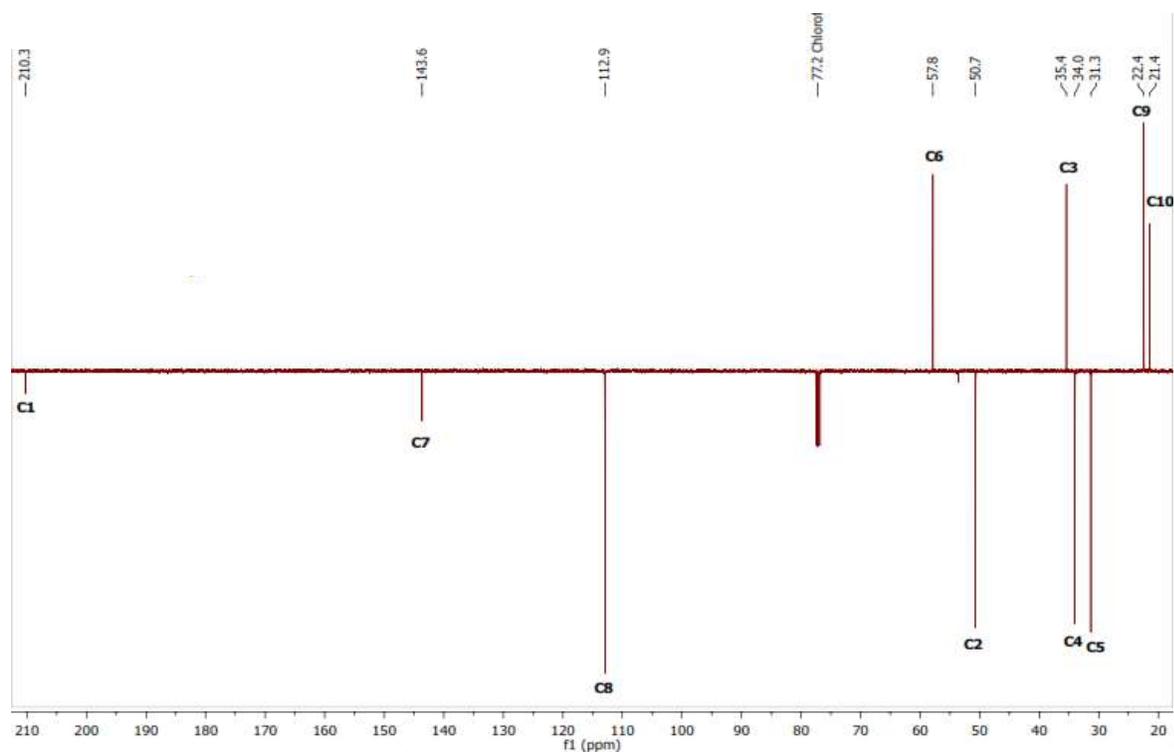
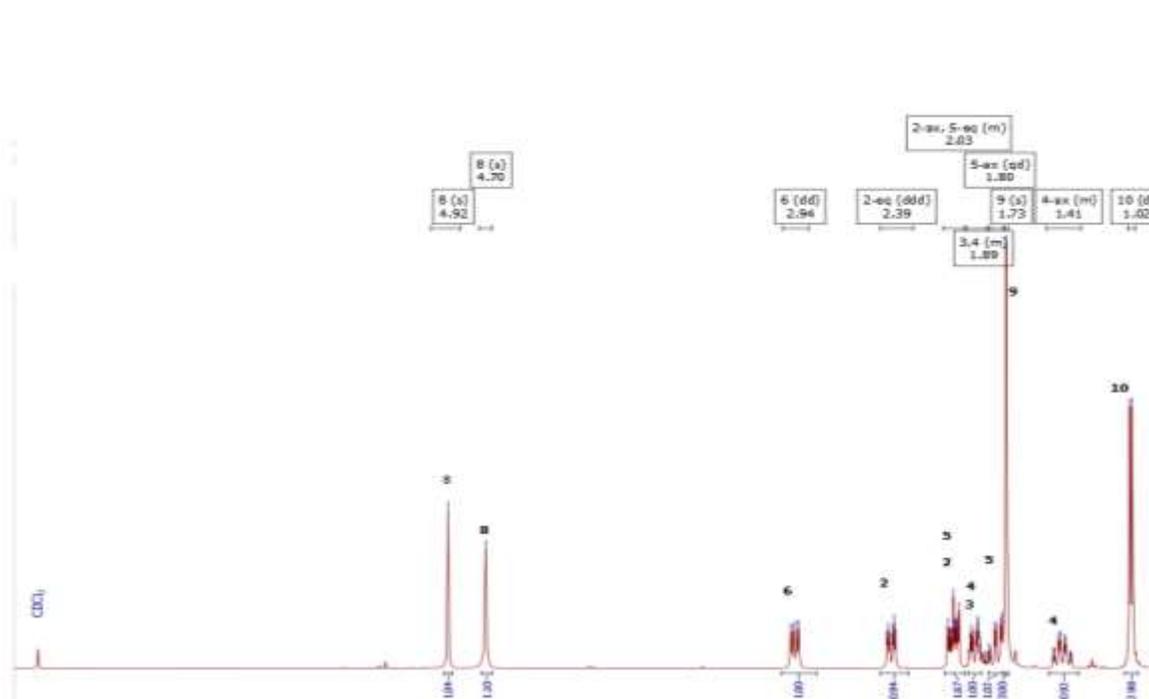
Figura 6.3: Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de piperitona**Figura 6.4:** Espectros de APT (100 MHz, CDCl_3) de piperitona

Anexo B.3 Síntesis de isopulegona S-1 a partir del isopulegol

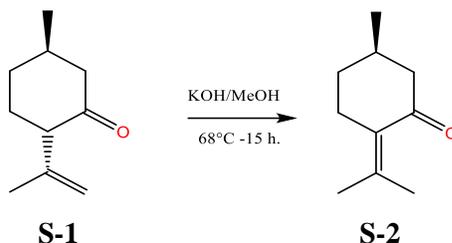


Para la síntesis de **S-1** se adicionó (1R,2S,5R)-Isopulegol (1.00 g, 6.54 mmol) a una suspensión de clorocromato de piridina (PCC) (2.10 g, 9.72 mmol) en 30 mL de diclorometano seco. La mezcla resultante se agitó durante 18 h a 25 °C y en atmósfera de nitrógeno. Transcurrido este tiempo se filtró a través de Celita y la fase orgánica resultante fue eliminada mediante destilación a presión reducida. El crudo resultante (1.12 g), se purificó mediante CF utilizando CH₂Cl₂ como sistema de elución, lo que condujo a la obtención de un aceite incoloro correspondiente a isopulegona S-1 (880.0 mg, 89.2%), el cual fue identificado pro análisis de sus espectros RMN y comparación con los datos de literatura [162,163].

	Nombre	Isopulegona
	Estado Físico	Líquido incoloro
	Formula molecular	C ₁₀ H ₁₆ O
	Masa molecular	152,23 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.92 (s, 1H, H-8), 4.70 (s, 1H, H-8), 2.94 (dd, J 13.1, 5.4 Hz, 1H, H-6), 2.40 (ddd, J =13.3, 3.6, 2.4, 1H, H _{ec} -2), 2.09 – 1.97 (m, 2H, H _{ax} -2 y H _{ec} -5), 1.96 – 1.83 (m, 2H, H _{ec} -4 y H-3), 1.80 (qd, J 13.1, 3.3, 1H, H _{ax} -5), 1.73 (s, 3H, CH ₃ -9), 1.49 – 1.30 (m, 1H, H _{ax} -4) y 1.02 (d, J 6.24, 3H, CH ₃ -10).		
APT (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) (101 MHz, CDCl ₃) δ = 210.3 (C=O), 143.6 (C-7), 112.9 (C-8), 57.8 (C-6), 50.7 (C-2), 35.4 (C-3), 34.0 (C-4), 31.3 (C-5), 22.4 (C-9) y 21.4 (C-10).		
Datos descritos en la literatura [163].		

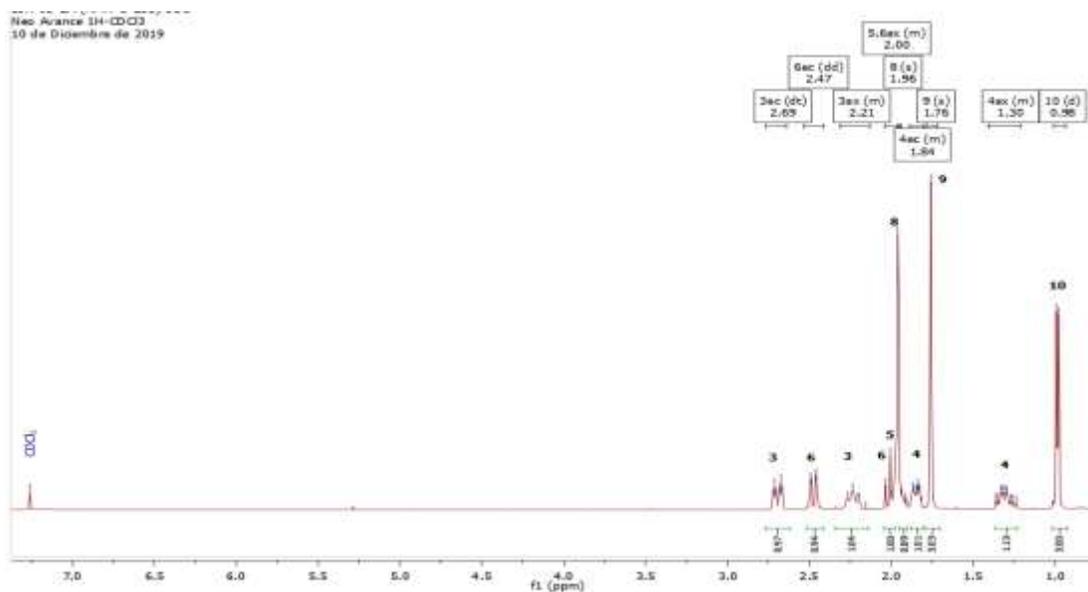
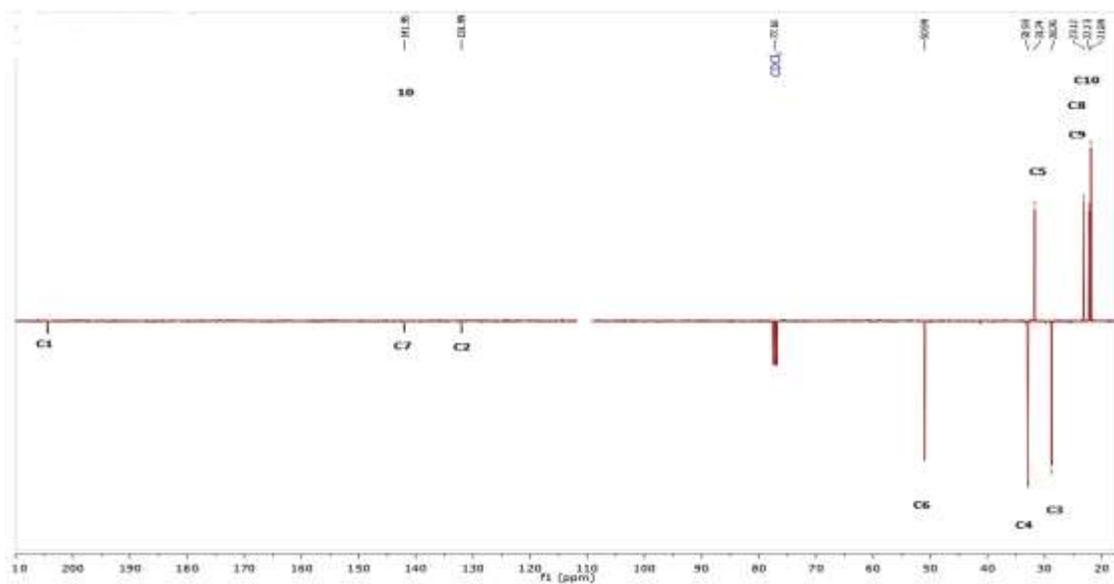
Figura 6.5: Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de isopulegona**Figura 6.6:** Espectros de APT (100 MHz, CDCl_3) de isopulegona

Anexo B.4 Síntesis de pulegona S-2 a partir del isopulegona S-1



Para la síntesis de **S-2**, se disolvió S-1 (0.66 mmol) en 4.6 mL de KOH (4.58 mmol, en metanol 1 M). La mezcla resultante se agitó durante 15 horas a 70°C en reflujo. Transcurrido este tiempo se adicionaron 3 mL de HCl 1.6 M. El producto se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x10 mL), se lavó con salmuera (3 x10 mL), se secó sobre sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) y la fase orgánica resultante se eliminó mediante destilación a presión reducida. El crudo resultante se purificó mediante CF utilizando CH₂Cl₂ /n-hexano 7:3, como sistema de elución. Lo que condujo a la obtención de un aceite amarillo claro, correspondiente a R-pulegona **S-2** (50.1 mg, 49.87%), el cual fue identificado por análisis de sus espectros RMN y rotación óptica, al comparar con los datos de literatura [163,164].

	Nombre	Pulegona
	Estado Físico	Líquido incoloro
	Formula molecular	C ₁₀ H ₁₆ O
	Masa molecular	152,23 g/mol
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 2.69 (dt, J 15.3, 4.1, 1H, H-3 _{ec}); 2.47 (dd, J 2.0, 1H, H-6 _{ec}); 2.31–2.13 (m, 1H, H3 _{ax}) 2.04-2.95 (m, 2H, H-6 _{ax} y H-5); 1.90 (s, 3H, CH ₃ -9); 1.88-1.80 (m, 1H, H-4 _{ec}); 1.76 (s, 3H, CH ₃ -8); 1.41-1.21 (m, H4 _{ax}) y 0.98 (d, 3H, CH ₃ -10).		
APT (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 204.41 (C=O -), 141.96 (C-7), 131.99 (C-2), 50.99 (C-6), 32.93 (C-4), 31.74 (C-5), 28.76 (C-3), 23.12 (C-9), 22.23 (C-8) y 21.89 (C-10).		
Rotación óptica [α]_D + 22.5°		
Datos descritos en la literatura [165]		

Figura 6.7: Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de pulegona**Figura 6.8:** Espectros de APT (100 MHz, CDCl_3) de pulegona

C. Anexo: Análisis cluster

Anexo C.1 Parámetros para el análisis cluster de la toxicidad fumigante

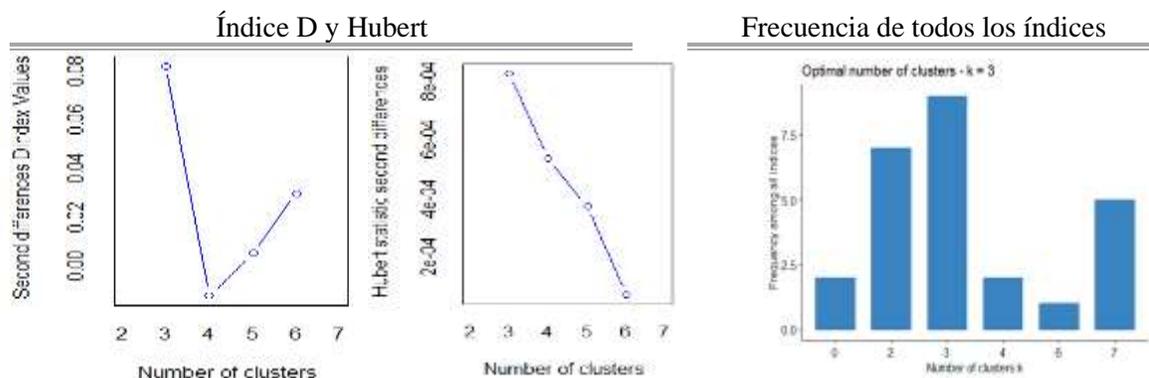
Compuesto	C	Parámetros para establecer los clusters				Rasgos de caracterización para los clusters				
		CL ₃₀	CL ₅₀	CL ₉₀	β_t	Esqueleto carbonado	Precursor biosintético	Tipo de compuesto	Función orgánica	Presión vapor (Pa)
		(mg/L aire)								
<i>R</i> -(+)-Pulegona	C1	0.44	0.58	0.93	3.72	monocíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	cetona	16.4
<i>S</i> -(-)-Pulegona	C2	0.68	0.97	1.68	1.80	monocíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	cetona	16.4
<i>R</i> -(-)-Carvona	C4	1.12	1.42	2.16	1.73	monocíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	cetona	13.7
2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> -Isopulegona	C23	1.76	2.37	3.88	0.85	monocíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	cetona	18.7
<i>R</i> -(-)-terpinen-4-ol	C5	1.04	2.82	7.15	0.30	monocíclico	catión α -terpinen-4-ilo	monoterpenoide	alcohol	6.2
<i>S</i> -(+)-Carvona	C3	1.87	2.87	5.32	0.52	monocíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	cetona	13.3
$\alpha\beta$ -tujona	C6	3.64	4.38	6.19	0.52	bicíclico	catión α -terpinen-4-ilo	monoterpenoide	cetona	54.9
Piperitona	C22	1.04	4.73	7.15	0.71	monocíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	cetona	15.9
1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,5 <i>R</i> -Isopulegol	C7	7.19	9.09	13.73	0.52	monocíclico	nonacético	alifático	alcohol	9.3
2-Nonanona	C9	3.33	4.34	6.81	0.28	acíclico	catión α -terpinen-4-ilo	monoterpenoide	cetona	83.2
1 <i>R</i> -(-)-Fenchona	C8	7.95	10.59	17.06	0.20	bicíclico	catión pinilo	monoterpenoide	cetona	108.9
1.8-Cineol	C10	9.4	12.97	21.69	0.15	bicíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	éter	253.3
P-cimeno	C12	21.2	28.68	46.96	0.07	aromático	catión α -terpinilo	monoterpenoide	aromático	96.3
Estragol	C11	19.42	30.47	57.46	0.05	aromático	acetato de cumarilo	fenilpropanoide	éter	22.7
Terpinoleno	C24	45.53	60.24	96.19	0.03	monocíclico	catión α -terpinen-4-ilo	monoterpenoide	hidrocarburo	98.7
α -Terpineno	C13	37.11	52.12	88.83	0.04	monocíclico	catión α -terpinen-4-ilo	monoterpenoide	hidrocarburo	145.3
Sabineno	C18	50.93	66.43	104.3	0.03	bicíclico	catión α -terpinen-4-ilo	monoterpenoide	hidrocarburo	351.0
δ -3 Careno	C15	57.81	80.44	135.75	0.02	bicíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	hidrocarburo	464.0
DL-Limoneno	C16	69.28	88.69	136.14	0.03	monocíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	hidrocarburo	206.6
<i>R</i> -(-)- α -Felandreno	C14	66.91	88.87	142.53	0.02	monocíclico	catión α -terpinilo	monoterpenoide	hidrocarburo	186.7
β -Pino	C17	75.6	97.6	151.34	0.02	bicíclico	catión pinilo	monoterpenoide	hidrocarburo	390.6
γ -Terpineno	C21	75.92	106.97	182.86	0.02	monocíclico	catión α -terpinen-4-ilo	monoterpenoide	hidrocarburo	145.3
n-Nonano	C20	83.7	108.98	170.75	0.02	acíclico	nonacético	alifático	alcano	593.3
α -Pino	C19	82.38	110.38	178.81	0.02	bicíclico	catión pinilo	monoterpenoide	hidrocarburo	633.3

Dato de presión de vapor (Pv), tomado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> y <http://www.chemspider.com/>

Anexo C.2 Coeficiente de aglomeración en el análisis cluster tóxico fumigante

Método de aglomeración	promedio	único	completo	Ward's
Coefficiente de aglomeración	0.9175499	0.8695218	0.9544167	0.9768186

Anexo C.3 Determinación del número de clusters en la toxicidad fumigante



Anexo C.4 Parámetros para el análisis cluster de la toxicidad por contacto

Compuesto	C	Parámetros para establecer los clusters				Rasgos de caracterización para los clusters				
		DL ₃₀	DL ₅₀	DL ₉₀	β_i	Esqueleto carbonado	Función orgánica	Tipo compuesto	Precursor	Log K _{ow}
		μg/adulto								
R-(-)-Pulegona	C1	3.81	4.85	7.40	0.50	monocíclico	cetona	monoterpenoide	catión α-terpinilo	3.08
S-(+)-Pulegona	C2	6.54	7.44	9.64	0.58	monocíclico	cetona	monoterpenoide	catión α-terpinilo	3.08
Carvacrol	C25	6.76	8.71	13.45	0.27	monocíclico	alcohol	monoterpenoide	catión α-terpinen-4-ilo	3.49
Piperitona	C22	7.31	9.45	14.70	0.24	monocíclico	cetona	monoterpenoide	catión α-terpinilo	2.85
2S,5R-Isopulegona	C23	8.19	10.99	17.83	0.19	monocíclico	cetona	monoterpenoide	catión α-terpinilo	2.57
S-(-)-Carvona	C3	8.36	12.68	23.24	0.12	monocíclico	cetona	monoterpenoide	catión α-terpinilo	2.71
R-(-)-Carvona	C4	12.16	16.89	28.44	0.11	monocíclico	cetona	monoterpenoide	catión α-terpinilo	2.71
1R,2S,5R-Isopulegol	C7	17.50	18.99	24.94	0.17	monocíclico	alcohol	monoterpenoide	catión α-terpinilo	2.36
R-(-)-terpinen-4-ol	C5	17.50	19.66	24.94	0.24	monocíclico	alcohol	monoterpenoide	catión α-terpinen-4-ilo	3.26
Eugenol	C26	16.85	20.90	30.82	0.13	aromático	éter/ alcohol	fenilpropanoide	acetato de coniferilo	2.49
Citral	C27	16.83	21.43	32.68	0.11	acíclico	aldehído	monoterpenoide	catión geranilo	2.76
Linalool	C28	16.00	21.87	36.23	0.09	acíclico	alcohol	monoterpenoide	catión nerilo	2.97
trans-Anetol	C29	18.13	26.25	46.08	0.07	aromático	éter	fenilpropanoide	acetato de cumarilo	3.13
Geraniol	C30	22.83	28.14	41.13	0.10	acíclico	alcohol	monoterpenoide	catión geranilo	3.56
Isoeugenol	C31	13.92	29.10	66.20	0.04	aromático	éter/ alcohol	fenilpropanoide	acetato de coniferilo	3.04

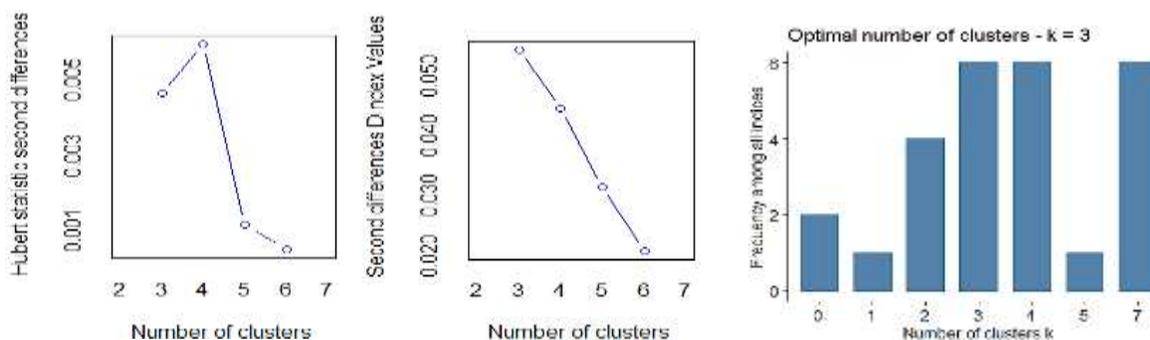
Compuesto	C	Parámetros para establecer los clusters				Rasgos de caracterización para los clusters				
		DL ₃₀	DL ₅₀	DL ₉₀	β_i	Esqueleto carbonado	Función orgánica	Tipo compuesto	Precursor	Log K _{ow}
		µg/adulto								
2-Nonanona	C9	28.65	31.85	39.69	0.16	acíclico	cetona	alifático	nonacético	3.14
$\alpha\beta$ -Tujona	C6	26.88	32.04	44.67	0.10	bicíclico	cetona	monoterpenoide	catión α -terpinen-4-ilo	2.52
<i>IR</i> -(-)-Fenchona	C8	29.05	34.65	48.33	0.09	bicíclico	cetona	monoterpenoide	catión pinilo	3.52
Safrol	C32	17.19	36.31	83.04	0.03	aromático	éter	fenilpropanoide	acetato de coniferilo	3.02
Citronelal	C33	31.33	36.94	50.64	0.09	acíclico	aldehído	monoterpenoide	catión geranilo	3.58
4-Undecanona	C34	30.13	37.04	53.95	0.08	acíclico	cetona	alifático	nonacético	4.05
2-Decanona	C35	30.20	38.03	57.17	0.07	acíclico	cetona	alifático	nonacético	3.73
2-Undecanona	C36	37.01	42.86	57.13	0.09	acíclico	cetona	alifático	nonacético	4.09
Estragol	C11	31.11	45.07	79.17	0.04	aromático	éter	fenilpropanoide	acetato de cumarilo	3.47
1.8-Cineol	C10	47.51	56.82	79.58	0.06	bicíclico	éter	monoterpenoide	catión α -terpinilo	2.74
Acetato de geranilo	C37	51.28	73.00	126.10	0.02	acíclico	éster	monoterpenoide	catión geranilo	4.04
Cipermetrina	C+	4.16	8.55	19.27	0.12	bicíclico	-	piretroides	Sintético	6.6

Dato de coeficientes de partición (Log Kow), tomado de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> y <http://www.chemspider.com/>

Anexo C.5 Coeficiente de aglomeración del análisis cluster tóxico por contacto

Método de aglomeración	promedio	único	completo	Ward's
Coeficiente de aglomeración	0.8185494	0.6821570	0.8899411	0.9161978

Anexo C.6 Determinación del número de clusters en la toxicidad por contacto



D. Anexo: Elaboración y acción insecticida de las mezclas

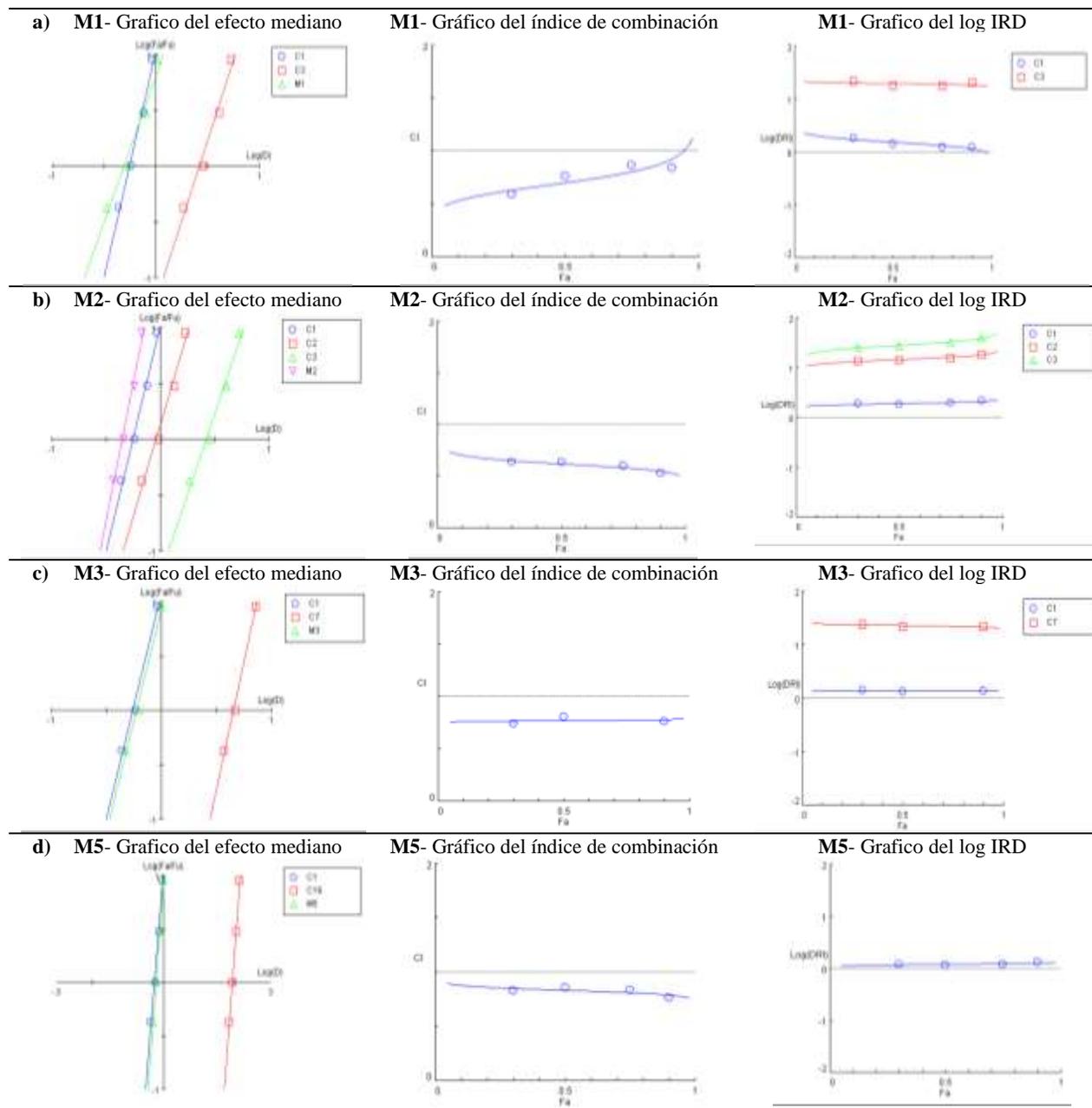
Anexo D.1 Análisis de varianza del MSR cuadrático, incluidas estadísticas de diagnóstico para la fracción afectada de *S. zeamais* de matrices con tres compuestos

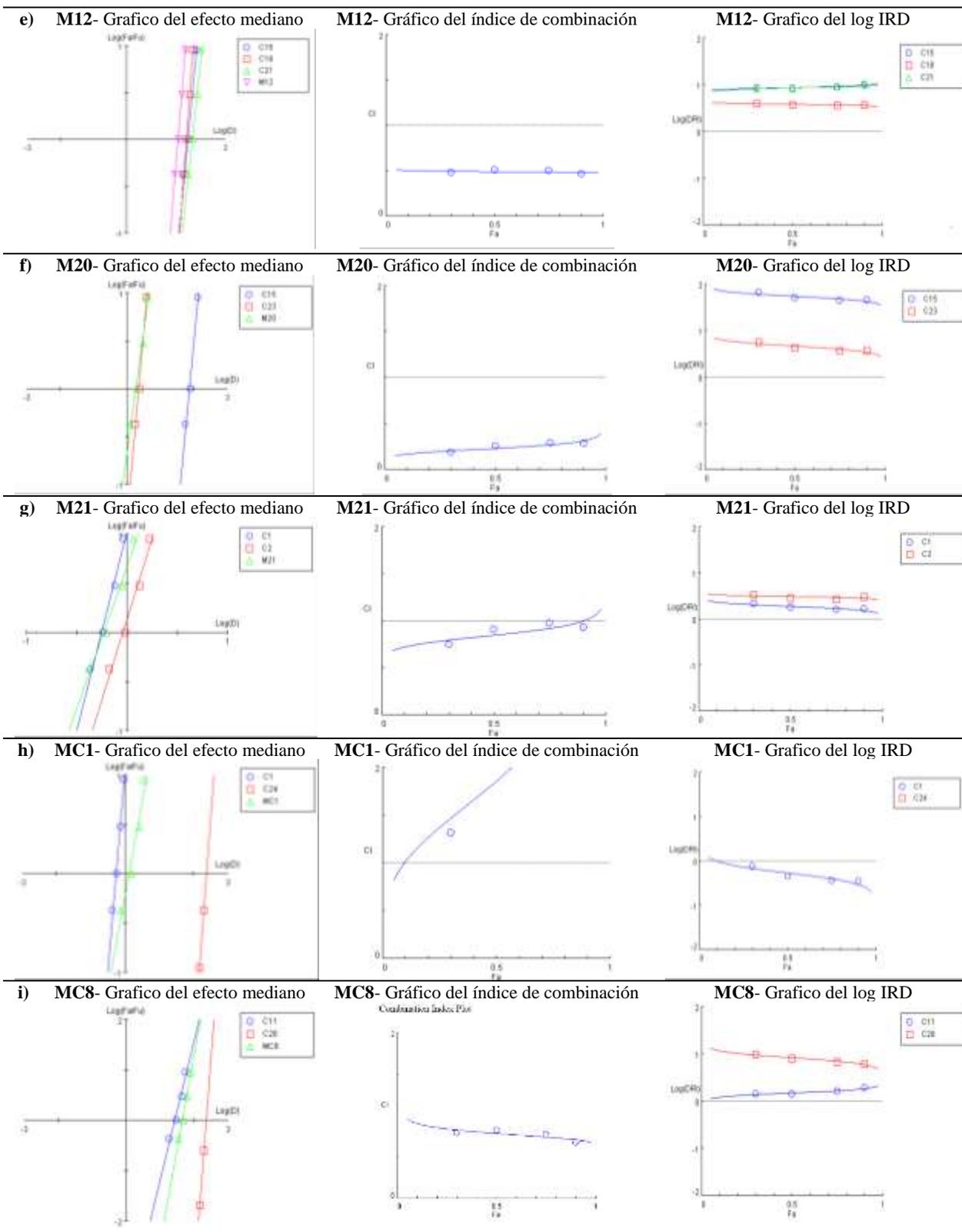
Toxicidad fumigante															
ANOVA								ANOVA							
M	Fuente	gl	SC	CM	F	ρ	Coef	M	Fuente	gl	SC	CM	F	ρ	Coef
M1	Modelo	5	290.33	56.64	271.88	0.000		M7	Modelo	5	121.33	24.27	97.07	0.000	
	Lineal	2	231.63	54.25	260.40	0.000			Lineal	2	100.23	24.33	97.33	0.000	
	Cuadrática	3	58.70	18.49	88.76	0.000			Cuadrática	3	21.10	7.03	28.13	0.000	
	C1 * C3	1	16.51	12.04	57.80	0.000	9.50		C8 * C3	1	8.93	8.17	32.67	0.000	7.00
	C1 * C4	1	22.01	15.04	72.20	0.000	9.50		C8 * C10	1	8.00	6.00	24.00	0.000	-6.00
	C3 * C4	1	20.16	20.16	96.80	0.000	-11.00		C3 * C10	1	4.17	4.17	16.67	0.001	5.00
	E. Residual	18	3.75	0.20					E. Residual	18	4.50	0.25			
	Cor Total	23	293.83						Cor Total	23	125.83				
	R ²		0.987						R ²		0.964				
	R ² _{pred}		0.977						R ² _{pred}		0.936				
R ² _{aju}		0.986					R ² _{aju}		0.954						
M2	Modelo	5	66.33	13.27	68.23	0.000		M12	Modelo	5	119.21	23.84	49.05	0.000	
	Lineal	2	44.43	24.25	124.71	0.000			Lineal	2	16.23	9.33	19.20	0.000	
	Cuadrática	3	21.90	7.30	37.54	0.000			Cuadrática	3	102.96	34.32	70.61	0.000	
	C1 * C2	1	0.00	1.04	5.36	0.030	2.50		C18 * C21	1	65.09	80.67	165.94	0.000	22.00
	C1 * C3	1	8.400	12.04	61.93	0.000	8.50		C18 * C15	1	35.22	37.50	77.14	0.000	15.00
	C2 * C3	1	13.50	13.50	69.43	0.000	8.33		C21 * C15	1	2.67	2.67	5.49	0.031	4.00
	E. Residual	18	3.50	0.194					E. Residual	18	8.75	0.49			
	Cor Total	23	69.83						Cor Total	23	127.96				
	R ²		0.950						R ²		0.932				
	R ² _{pred}		0.911						R ² _{pred}		0.878				
R ² _{aju}		0.936					R ² _{aju}		0.913						
M3	Modelo	5	329.19	65.84	25.75	0.000		M14	Modelo	5	268.71	53.74	227.61	0.000	
	Lineal	2	247.91	60.59	23.70	0.000			Lineal	2	179.43	96.58	409.06	0.000	
	Cuadrática	3	81.27	27.09	10.60	0.000			Cuadrática	3	89.27	29.76	126.04	0.000	
	C1 * C3	1	15.62	18.94	7.41	0.012	10.65		C10 * C16	1	20.09	30.37	128.65	0.000	13.50
	C1 * C7	1	58.20	46.61	18.23	0.000	15.99		C10 * C19	1	2.52	0.042	<u>0.18</u>	<u>0.697</u>	-0.50
	C3 * C7	1	7.44	7.44	2.91	0.102	-6.60		C16 * C19	1	66.67	66.67	282.35	0.000	20.00
	E. Residual	17	56.24	2.56					E. Residual	18	4.25	0.24			
	Cor Total	27	385.43						Cor Total	23	272.96				
	R ²		0.854						R ²		0.984				
	R ² _{pred}		0.795						R ² _{pred}		0.972				
R ² _{aju}		0.821					R ² _{aju}		0.980						
M5	Modelo	5	381.33	76.27	305.07	0.000		M18	Modelo	5	213.21	42.64	161.59	0.000	

Toxicidad fumigante															
ANOVA								ANOVA							
M	Fuente	gl	SC	CM	F	ρ	Coef	M	Fuente	gl	SC	CM	F	ρ	Coef
	Lineal	2	288.03	76.75	307.00	0.000			Lineal	2	186.13	60.75	230.21	0.000	
	Cuadrática	3	93.30	31.10	124.40	0.000			Cuadrática	3	27.07	9.02	34.20	0.000	
	C1 * C3	1	8.23	12.04	48.17	0.000	8.50		C1 * C18	1	27.03	26.04	98.68	0.000	12.50
	C1 * C16	1	74.40	63.37	253.50	0.000	19.50		C1 * C22	1	0.04	0.04	0.16	0.696	0.50
	C3 * C16	1	10.67	10.67	42.67	0.000	-8.00		C22 * C18	1	0.00	0.00	<u>0.00</u>	<u>1.000</u>	-0.00
	E. Residual	18	4.50	0.25					E. Residual	18	4.75	0.26			
	Cor Total	23	385.83						Cor Total	23					
	R ²		0.988						R ²		0.978				
	R ² _{pred}		0.979						R ² _{pred}		0.961				
	R ² _{aju}		0.982						R ² _{aju}		0.972				
M6	Modelo	5	421.208	84.242	404.36	0.000		M20	Modelo	5	323.21	64.64	150.14	0.000	
	Lineal	2	304.933	114.083	547.60	0.000			Lineal	2	248.03	72.33	168.00	0.000	
	Cuadrática	3	116.275	38.758	186.04	0.000			Cuadrática	3	75.17	25.06	58.20	0.000	
	C22 * C3	1	57.604	40.042	192.20	0.000	15.50		C6 * C23	1	0.43	1.50	3.48	0.078	3.00
	C22 * C16	1	1.63	0.000	<u>0.00</u>	<u>1.000</u>	5.7x10 ⁻¹⁶		C6 * C15	1	20.74	10.67	24.77	0.000	-8.00
	C3 * C16	1	57.04	57.042	273.80	0.000	-18.50		C23 * C15	1	54.00	54.00	125.42	0.000	18.00
	E. Residual	18	3.75	0.208					E. Residual	18	7.75	0.43			
	Cor Total	23	424.96						Cor Total	23	330.96				
	R ²		0.991						R ²		0.977				
	R ² _{pred}		0.984						R ² _{pred}		0.958				
R ² _{aju}		0.989					R ² _{aju}		0.970						

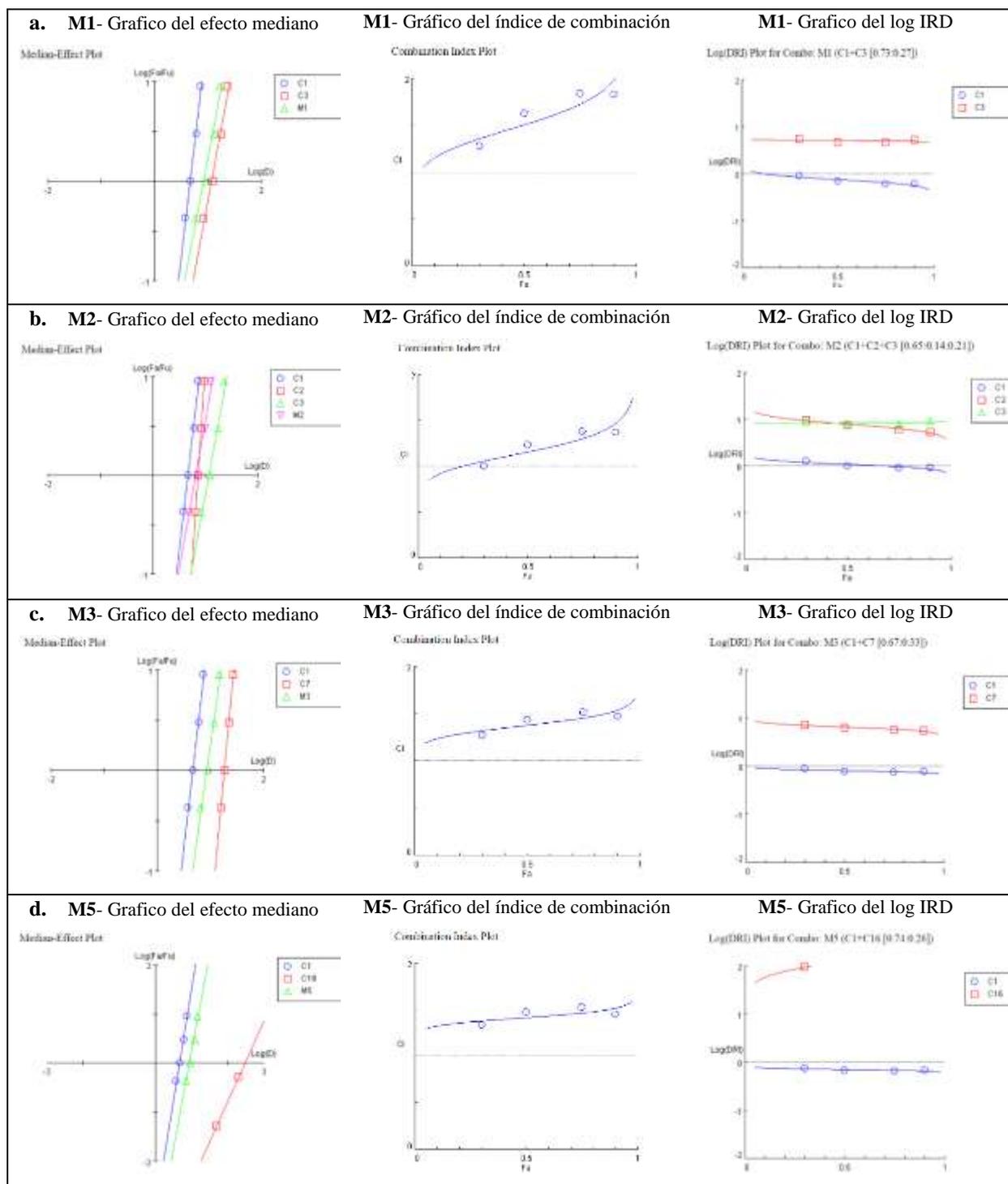
Tóxico por contacto															
ANOVA								ANOVA							
M	Fuente	DF	SC	CM	F	ρ	Coef	M	Fuente	DF	SC	CM	F	ρ	Coef
MC1	Modelo	5	152.33	30.47	49.85	0.000		MC7	Modelo	5	164.37	32.87	52.60	0.000	
	Lineal	2	67.26	7.58	12.41	0.000			Lineal	2	48.66	49.33	78.93	0.000	
	Cuadrática	3	85.07	28.36	46.40	0.000			Cuadrática	3	115.72	38.57	61.72	0.000	
	C1 * C24	1	78.45	67.43	110.35	0.000	17.14		C26 * C36	1	101.46	81.87	130.99	0.000	22.42
	C1 * C25	1	6.19	6.57	10.75	0.004	-6.29		C26 * C27	1	11.44	13.14	21.03	0.000	-3.92
	C24 * C25	1	0.42	0.43	<u>1.00</u>	<u>0.414</u>	-1.60		C36 * C27	1	2.82	2.82	4.52	0.000	-1.97
	E. Residual	18	11.00	0.61					E. Residual	18	11.25	0.62			
	Cor Total	23	163.33						Cor Total	23	175.62				
	R ²		0.933						R ²		0.936				
	R ² -pred		0.880						R ² -pred		0.886				
R ² -adj		0.914					R ² -adj		0.918						
MC6	Modelo	5	257.83	51.57	36.40	0.000		MC8	Modelo	5	51.50	10.30	21.81	0.000	
	Lineal	2	193.43	56.58	39.94	0.000			Lineal	2	22.35	16.08	34.06	0.000	
	Cuadrática	3	64.40	21.47	15.15	0.000			Cuadrática	3	29.16	9.72	20.59	0.000	
	C25 * C36	1	24.01	35.04	24.74	0.000	14.50		C28 * C27	1	0.73	0.014	<u>0.03</u>	<u>0.865</u>	-0.29
	C25 * C32	1	37.72	40.04	28.26	0.000	15.50		C28 * C11	1	28.05	26.04	55.15	0.000	12.50
	C36 * C32	1	2.67	2.67	<u>1.88</u>	<u>0.187</u>	4.00		C27 * C11	1	0.38	0.38	<u>0.81</u>	<u>0.379</u>	-0.52
	E. Residual	18	25.50	1.42					E. Residual	18	8.50	0.47			
	Cor Total	23	283.33						Cor Total	23	60.00				
	R ²		0.910						R ²		0.858				
	R ² -pred		0.840						R ² -pred		0.748				
R ² -adj		0.885					R ² -adj		0.819						

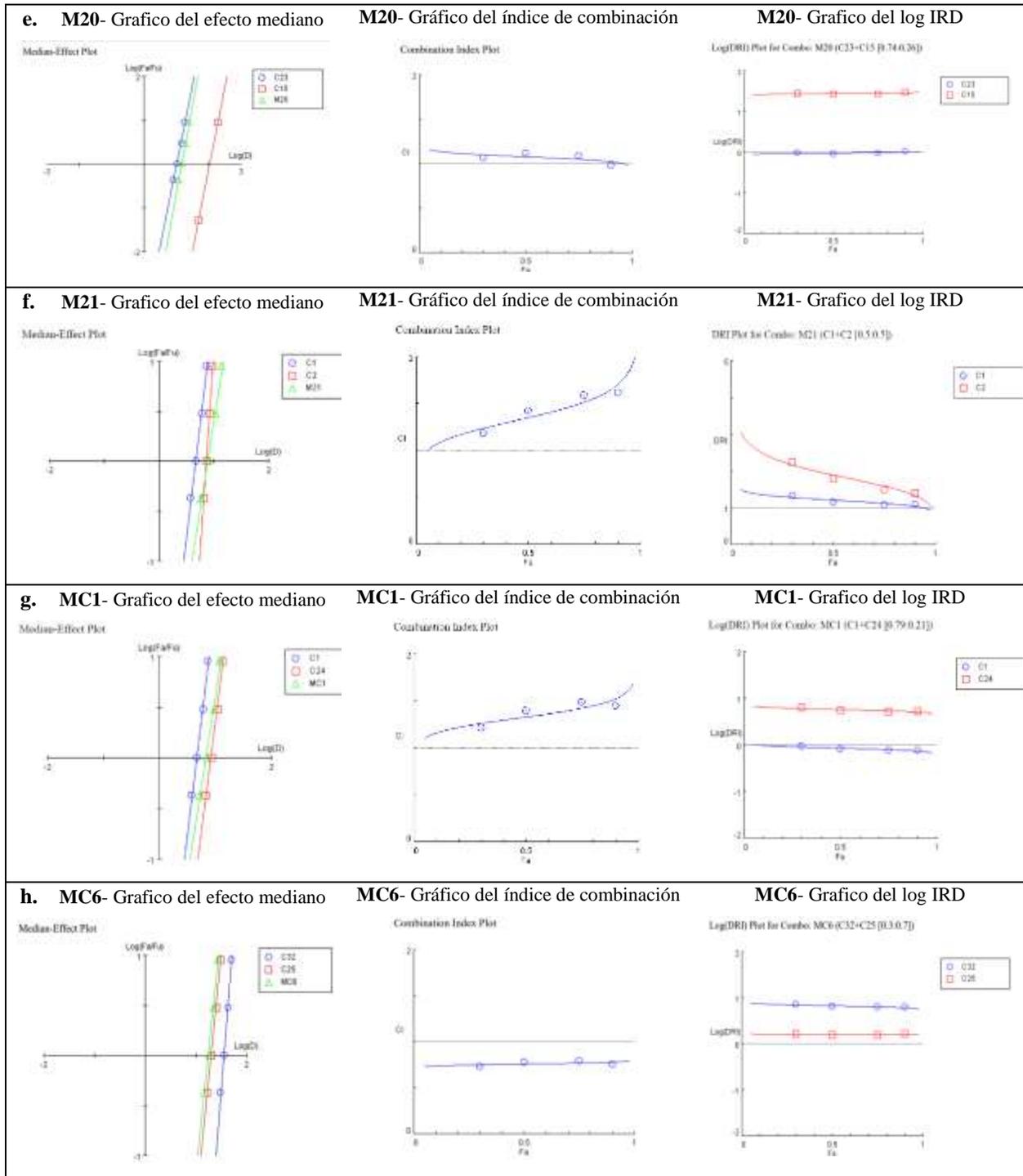
Anexo D.2 Gráficos de la interacción fumigante de los componentes de las mezclas.





Anexo D.3 Gráficos de la interacción fumigante de los componentes de las mezclas.



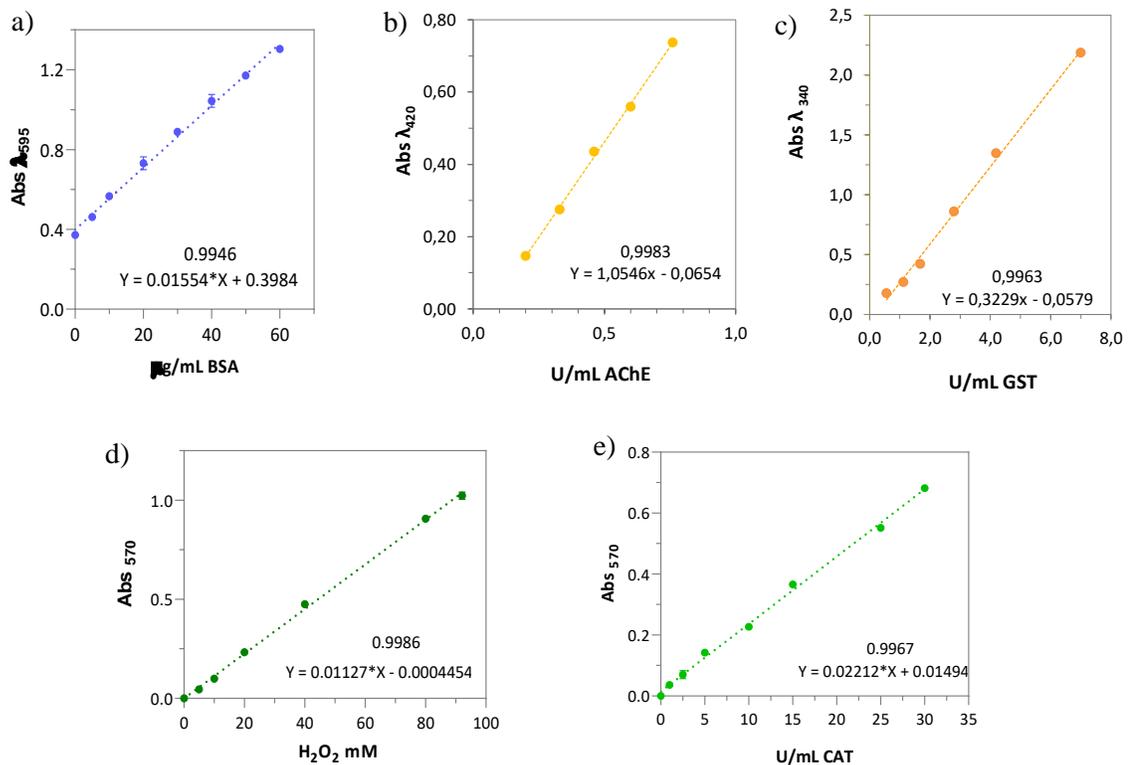


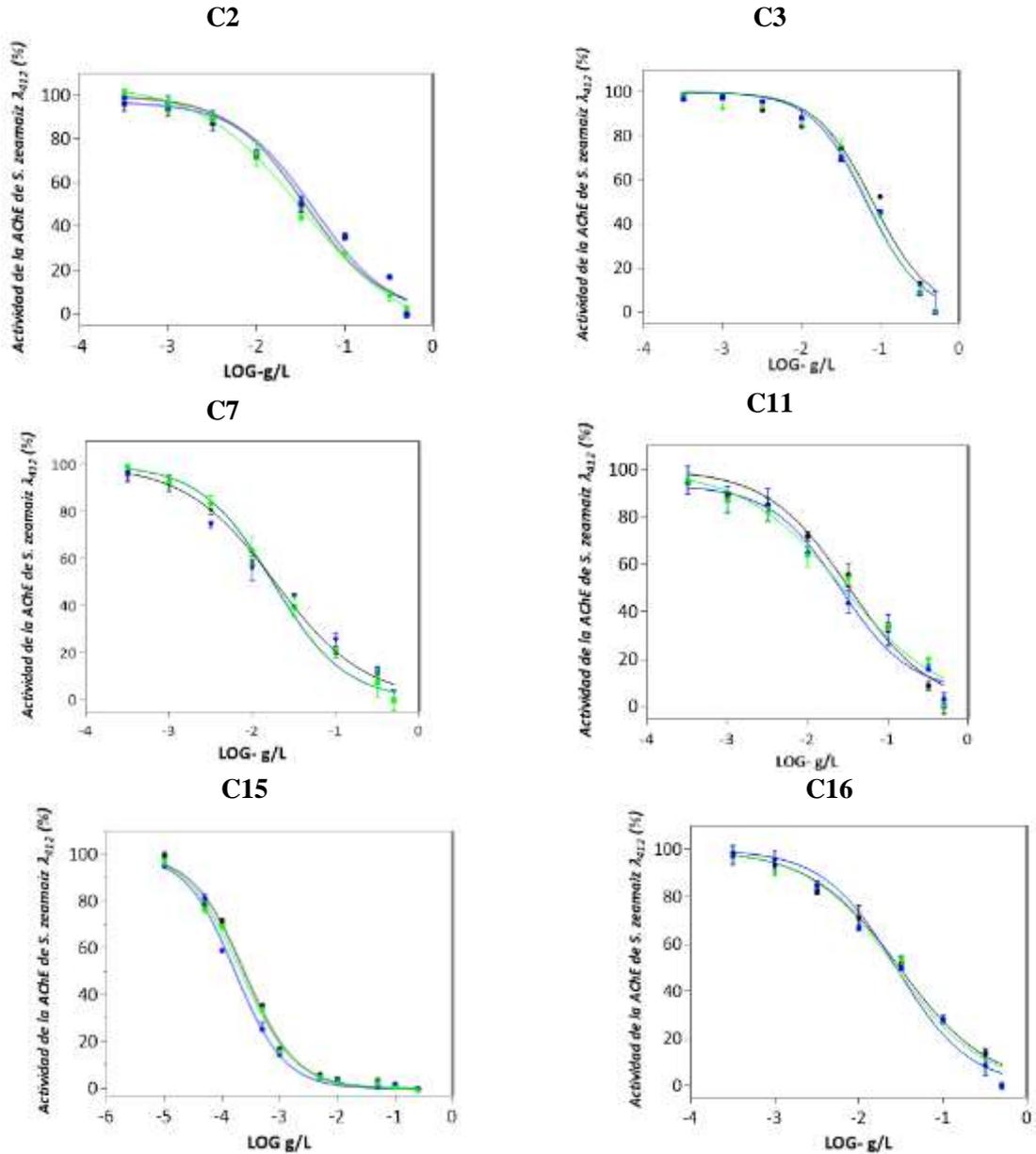


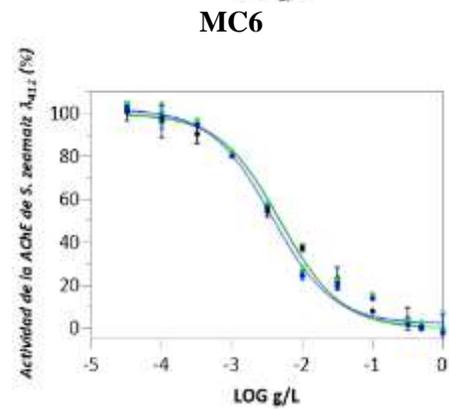
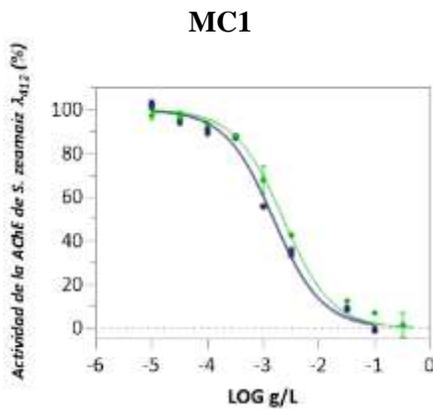
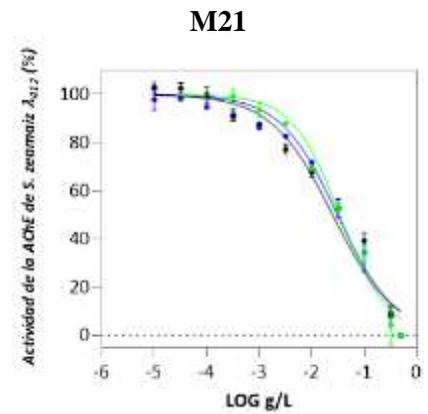
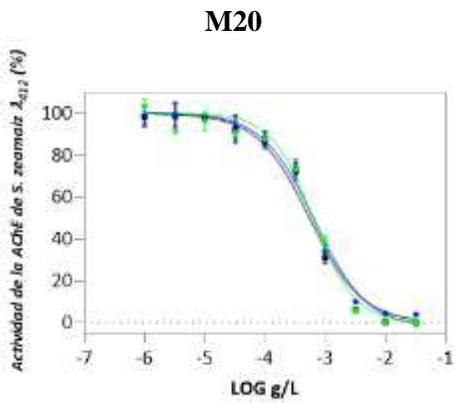
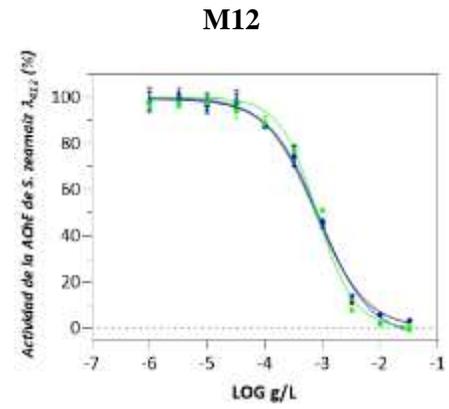
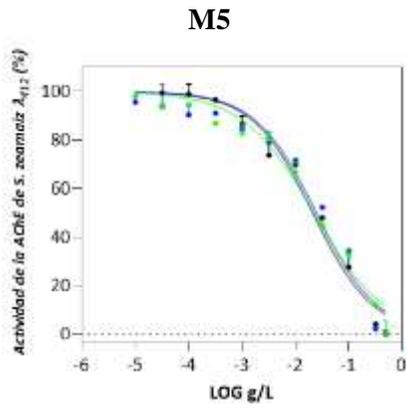
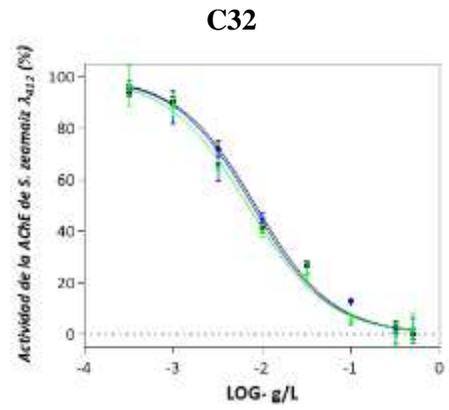
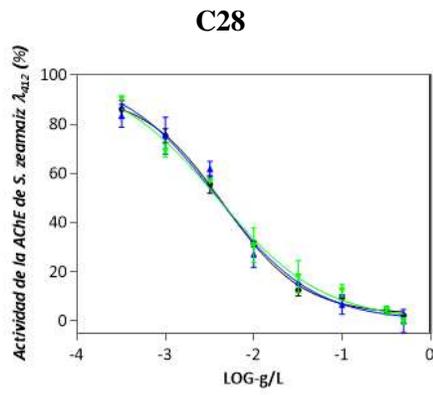
E. Anexo: enzimas desintoxicantes y de función motora

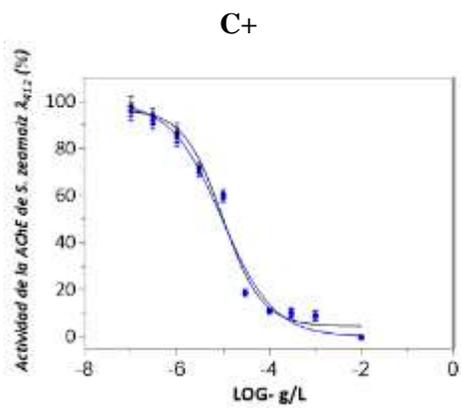
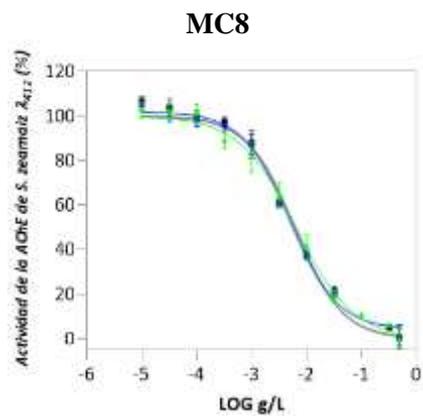
Anexo E.1 Curvas de calibración para caracterizar el extracto proteico de *S. zeamais*

a) Proteínas con BSA, b) acetilcolinesterasa, c) glutatión-S-transferasa, d) Peróxido de hidrógeno y e) catalasa

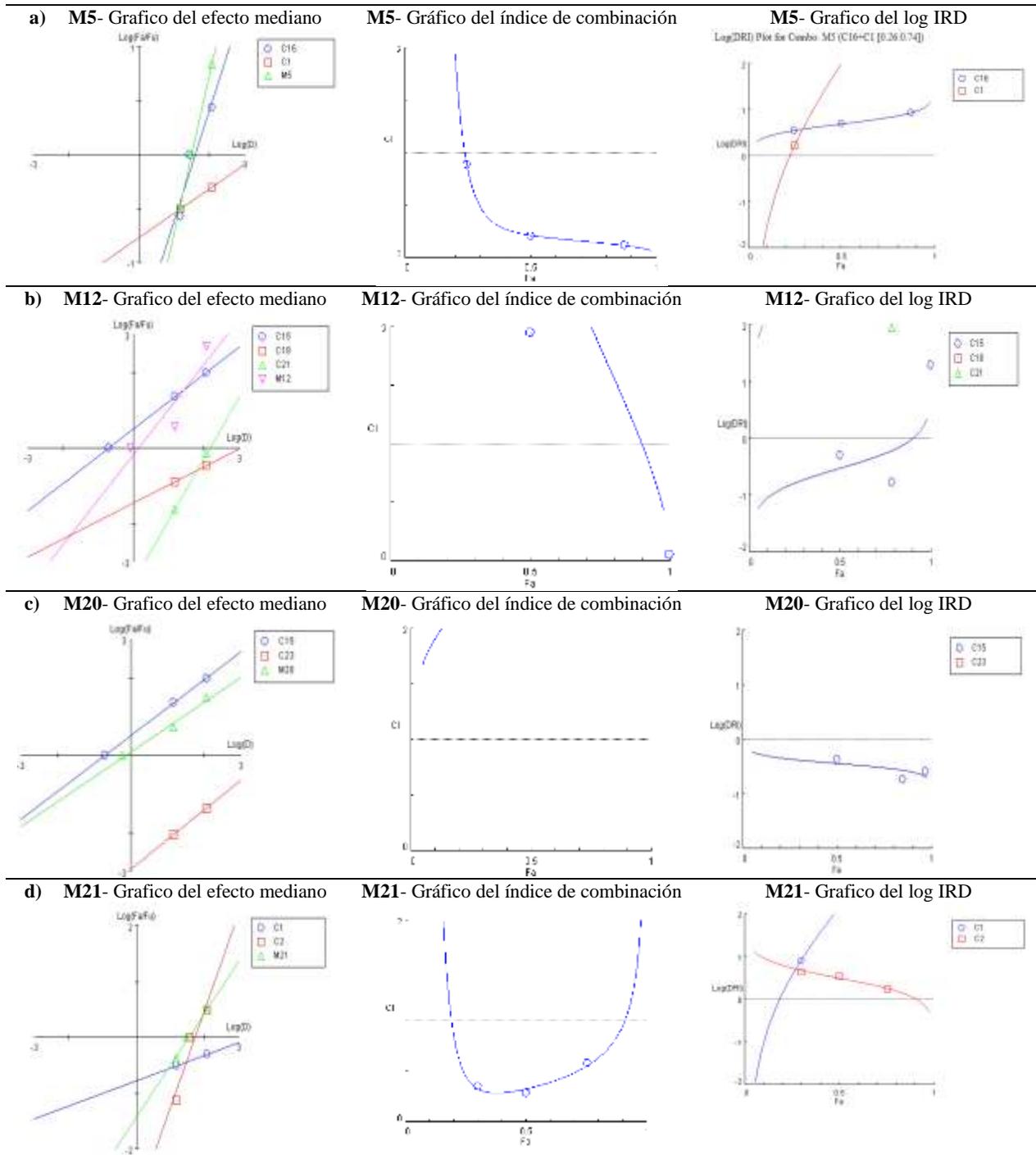


Anexo E.2 Curvas dosis-efecto de inhibición de la AChE de *S. zeamais* de las mezclas y sus componentes

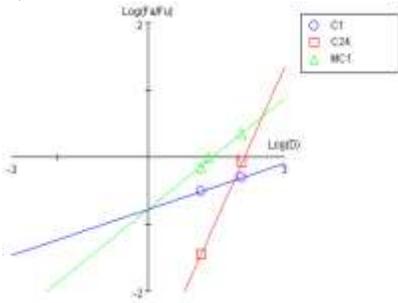




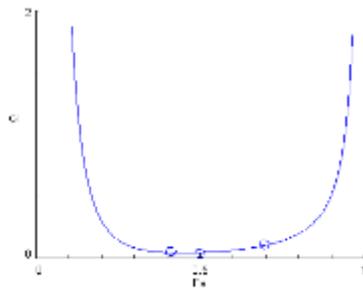
Anexo E.3 Gráficos de la interacción de los componentes de las mezclas frente la inhibición de AChE



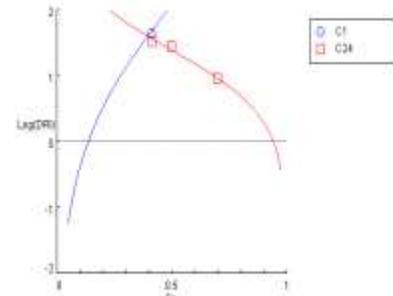
e) MC1- Grafico del efecto mediano



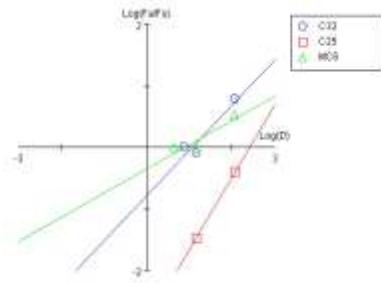
MC1- Gráfico del índice de combinación



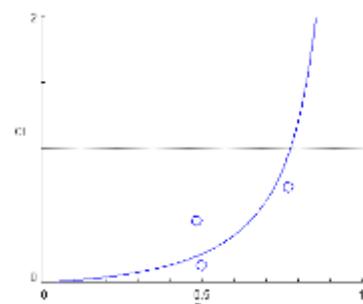
MC1- Grafico del log IRD



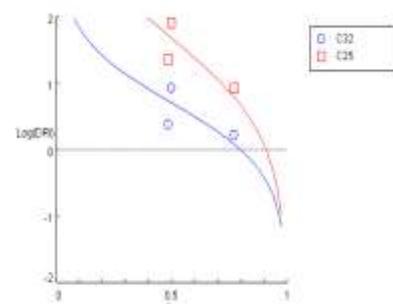
f) MC6- Grafico del efecto mediano



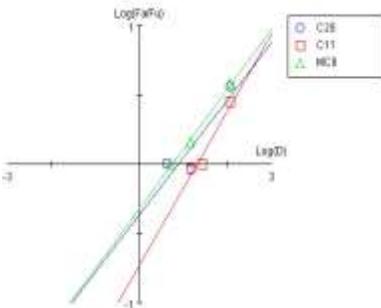
MC6- Gráfico del índice de combinación



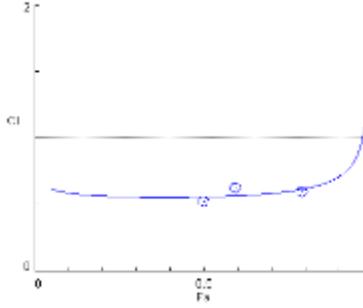
MC6- Grafico del log IRD



g) MC8- Grafico del efecto mediano



MC8- Gráfico del índice de combinación



MC8- Grafico del log IRD

