



Universidad de Murcia
Facultad de Química
Dept. de Química Agrícola, Geología y Edafología



**Instituto de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario**
Equipo de Fitoquímicos Naturales

TESIS DOCTORAL

**TOXICIDAD VOLÁTIL DE MONOTERPENOIDES
Y MECANISMOS BIOQUÍMICOS EN INSECTOS
PLAGA DEL ARROZ ALMACENADO**

MARÍA DOLORES LÓPEZ BELCHÍ

Licenciada en Química

Murcia, 2008

Me gustaría destacar lo difícil que puede resultar escribir esta parte, ya que la realización de este trabajo ha implicado a muchas personas de manera directa así como de un modo más indirecto.

En primer lugar quiero mostrar mi enorme gratitud a mi directora de tesis, la doctora María Jesús Pascual Villalobos, por sus valiosos consejos y supervisión que han sido imprescindibles para la realización de este trabajo así como por su atención, dedicación y por supuesto, por la confianza depositada en mí para llevarlo a cabo.

Asimismo deseo agradecer al doctor Ramón Madrid Vicente su colaboración y apoyo incondicional en todo lo relacionado con este trabajo.

Del mismo modo querría agradecer al departamento de "Biotecnología y Protección de Cultivos" y en el nombre de éste al doctor Alfredo Lacasa Plasencia el buen trato y la buena acogida en este grupo.

A la doctora Josefina Contreras por su inestimable asesoramiento y ayuda con el tema de resistencias así como por la buena predisposición que siempre ha tenido hacia mi trabajo.

A la doctora M^a José Jordán por su orientación y apoyo con el cromatógrafo de gases y todos los conocimientos transmitidos sobre identificación de compuestos.

Como no podía ser de otra manera, me gustaría hacer una mención especial para mis compañeros del "Equipo de Fitoquímicos Naturales" que de una manera u otra han

estado implicados en esta tesis, Sílvia Andujar (por su apoyo tanto en este trabajo como de manera personal), Luis Losana (por su buen humor siempre, gane o pierda el Real Murcia) y Miguel Ocaña (por su ayuda continua durante todos estos años), a todos ellos quiero agradecerles la ayuda prestada y el buen ambiente en el laboratorio.

Continuando con amigos del IMIDA, me gustaría agradecer y dedicar esta tesis a David Walker, Juan Gabriel, Robles, Fina, Olaya, Antonio, Eva, Sara, al resto de los de cítrí (tanto a los que estuvieron y ya no están como a todas las nuevas incorporaciones), a Santí por su ayuda con la búsqueda bibliográfica, a la gente de administración por animar todas las comidas y celebraciones y al resto de gente del centro que no he nombrado pero que han hecho que los años dedicados a esta tesis hayan resultado inolvidables.

Por supuesto quiero dedicar esta tesis a mis amigos que ya estaban antes de que comenzara este trabajo y seguirán aquí siempre, a Azu, Eva, Carmen, Pilar, M^a del mar, Carlos, M^o Jesús, Esther, Patricia, Nuria, Nacho, David(eoi), Javi, Barty, Agustín, Rubén, Jose Luis, Canky, M^a José, Mario, David, Asu, Pedro y Juan.

Hay muchísima gente que me hubiera gustado mencionar pero no lo he hecho por no resultar cansada, así que a todos esos amigos que he podido conocer gracias a la realización de esta tesis, “muchísimas gracias por estar ahí”.

Y como no podía ser de otra manera esta tesis va dirigida especialmente a mi hermana Ana y a mis padres porque son ellos quienes realmente han hecho posible todo esto.

**TOXICIDAD VOLÁTIL DE MONOTERPENOIDES Y
MECANISMOS BIOQUÍMICOS EN INSECTOS PLAGA DEL
ARROZ ALMACENADO.**

INDICE.....	i
Resumen.....	v
Abstract.....	ix
1. Introducción.....	1
1.1. Insecticidas de origen natural.....	3
1.2. Metabolitos secundarios de las plantas. Monoterpenoides y fenilpropanoides.....	9
1.3. Taxonomía y descripción de <i>Coriandrum sativum</i> (Umbelliferae), <i>Carum carvii</i> (Umbelliferae) y <i>Ocimum basilicum</i> (Labiatae).....	22
1.4. Plagas de almacén del arroz: <i>Sitophilus oryzae</i> L. (Coleoptera: Curculionidae), <i>Rhyzopertha dominica</i> Fabricius (Coleoptera: Bostrichidae) y <i>Cryptolestes pusillus</i> Schönherr (Coleoptera: Cucujidae).....	27
1.5. Modos de acción de insecticidas. Acetilcolina en insectos.	32
1.6. Resistencia de insectos a insecticidas y mecanismos implicados.....	37
2. Objetivos.....	41
3. Materiales y Métodos.....	45
3.1. Fraccionamiento de aceites esenciales de origen vegetal.	47

3.1.1. Material vegetal y obtención de aceites esenciales.....	47
3.1.2. Cromatografía en columna.....	53
3.1.3. Reagrupación de fracciones utilizando cromatografía en capa fina.....	56
3.2. Bioensayo de actividad volátil.....	58
3.2.1. Crías de insectos.....	58
3.2.2. Bioensayo.....	60
3.2.3. Análisis Probit.....	61
3.3. Cromatografía de gases-masas.....	61
3.4. Monoterpenoides para el estudio de mecanismos bioquímicos.....	65
3.5. Inhibición de la Acetilcolinesterasa. Método Ellman.....	67
3.6. Selección de resistencia en laboratorio a cada monoterpenoide en <i>Sitophilus oryzae</i>, <i>Rhizopertha dominica</i> y <i>Cryptolestes pusillus</i>.	69
3.7. Bioensayo de aplicación de sinergistas para estudiar los mecanismos de resistencia a monoterpenoides en las poblaciones seleccionadas.	71
3.8. Detección de residuos de monoterpenoides en el arroz.....	74
4. Resultados.	77
4.1. Fraccionamiento biodirigido de los aceites esenciales.	79
4.1.1. Fracciones obtenidas de <i>Coriandrum sativum</i>	79
4.1.2. Fracciones obtenidas de <i>Carum carvii</i>	82
4.1.3. Fracciones obtenidas de <i>Ocimum basilicum</i>	86

4.2. Toxicidad volátil de los aceites esenciales y sus fracciones en plagas de almacén del arroz.....	95
4.2.1. Actividad del aceite y las fracciones de <i>Coriandrum sativum</i>	95
4.2.2. Actividad del aceite y las fracciones de <i>Carum carvii</i>	97
4.2.3. Actividad del aceite y las fracciones de <i>Ocimum basilicum</i>	99
4.3. Identificación y cuantificación de los compuestos activos. ...	105
4.4. Concentraciones letales (CL₅₀) de monoterpenoides en plagas de almacén del arroz.....	124
4.5. Estudio sobre la inhibición de la acetilcolinesterasa como un posible modo de acción de estos monoterpenoides.....	128
4.6. Selección de resistencia en laboratorio a cada monoterpenoide en <i>Sitophilus oryzae</i>, <i>Rhizopertha dominica</i> y <i>Cryptolestes pusillus</i>.....	146
4.7. Mecanismos de resistencia a monoterpenoides en las poblaciones de insectos seleccionadas.....	157
4.8. Residuos de monoterpenoides en el arroz.....	167
5. Discusión.....	171
5.1. Actividad insecticida volátil de los aceites esenciales y sus fracciones en las plagas de almacén del arroz.....	173
5.2. Identificación y cuantificación de compuestos activos.	176
5.3. Concentraciones letales (CL₅₀) de monoterpenoides en las plagas de almacén del arroz.....	180

5.4. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa como un posible modo de acción.....	181
5.5. Estudio de resistencia, y de mecanismos implicados, a cada monoterpenoide en <i>Sitophilus oryzae</i> , <i>Rhizopertha dominica</i> y <i>Cryptolestes pusillus</i>	184
5.6. Consideraciones generales.	187
6. Conclusiones.	189
7. Bibliografía.....	195
8. Lista de Abreviaturas y fórmulas utilizadas.....	217
9. Índice Figuras	223
10. Índice Tablas	227
11. Índice Fotos.....	230

RESUMEN

Algunas plagas causan daños importantes en productos y granos almacenados, lo cual conlleva consecuentemente a pérdidas de producción y calidad en estos productos.

Las principales plagas del arroz almacenado en España son, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Bostrichidae), y *Cryptolestes pusillus* Schönherr (Coleoptera: Cucujidae). Las dos primeras son plagas primarias que atacan directamente el grano y resultan bastante destructivas debido a que sus larvas se alimentan y desarrollan dentro de él. *C.pusillus* es, sin embargo, una plaga secundaria que se beneficia de granos que ya están dañados y rotos.

Actualmente, el uso de fumigantes e insecticidas de síntesis sigue siendo el principal método de lucha para controlar las plagas de almacén, si bien recientemente (dadas las continuas restricciones al uso de agroquímicos) existe un gran interés en la utilización de otras alternativas tales como el control biológico, el almacenamiento a bajas temperaturas, o los tratamientos con calor entre otros.

Igualmente muchos productos obtenidos principalmente de plantas y que derivan del metabolismo secundario de las mismas ofrecen una fuente de bioinsecticidas que podrían representar una alternativa ecológica frente a los insecticidas de síntesis ya que su uso masivo e indiscriminado ha ocasionado problemas tales como la aparición de resistencias en determinadas especies de insectos frente a diferentes materias activas, desequilibrios ecológicos y problemas medioambientales sin olvidar el riesgo que entrañan para la salud humana.

Con este trabajo se ha pretendido estudiar la actividad plaguicida de los aceites esenciales extraídos de tres plantas: *Coriandrum sativum* L. (Umbelliferae), *Carum*

carvii L. (Umbelliferae) y *Ocimum basilicum* L. (Labiatae) y su posterior fraccionamiento para identificar dentro de estos aceites los compuestos químicos responsables de esta actividad insecticida sobre tres plagas de almacén de arroz (*S. oryzae*, *R.dominica* y *C.pusillus*).

La extracción de los aceites esenciales de cada una de las plantas fue llevado a cabo mediante una destilación al vapor Clavenger seguido de un fraccionamiento en columna cromatográfica que dio lugar a una serie de fracciones que fueron ensayadas sobre los insectos mediante un bioensayo volátil para determinar cuales tenían actividad insecticida. Las fracciones bioactivas fueron analizadas mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas para identificar los compuestos con actividad insecticida.

Del estudio de estos monoterpenoides, linalol, *S*-carvona y estragol resultaron tener una alta actividad insecticida sobre estas plagas. Sin embargo el *E*-anetol fue más selectivo para *R.dominica* y *C.pusillus*, así como el limoneno, γ -terpineno, geraniol y eucaliptol sólo resultaron activos frente a *C.pusillus*.

Algunos monoterpenoides podrían actuar de sinergistas potenciando la actividad de otros, como podría ser el caso del alcanfor, acetato de geraniol y *E*-anetol con linalol en *R.dominica* y *C.pusillus*, o el caso del metoxicinamaldehído, *p*-anisaldehído y linalol que pueden tener efecto sinergista sobre el estragol.

Este trabajo también abarcó el estudio de un posible modo de acción de estos monoterpenoides, la inhibición de la acetilcolinesterasa, para alcanzar un mayor entendimiento del comportamiento de estas sustancias en el interior del insecto.

Para ello se llevó a cabo una reacción química donde intervenía la enzima acetilcolinesterasa, un sustrato (el ioduro de acetiltiocolina), el reactivo de Ellman y los

monoterpenoides que actuaban como inhibidor. La inhibición que producía cada monoterpenoide fue determinada mediante un espectrofotómetro a 412 nm.

Así se pudo observar como la mayoría de monoterpenoides estudiados inhibían en cierta medida esta enzima, siendo fenchona, *S*-carvona y linalol los monoterpenoides que mayor inhibición originaron.

Del mismo modo se observó como fenchona, γ -terpineno, geraniol y linalol inhibían competitivamente la acetilcolinesterasa, mientras que *S*-carvona, estragol y alcanfor producían una inhibición mixta para esta enzima.

Sin embargo no se observó inhibición de la acetilcolinesterasa por parte del *E*-anetol a las concentraciones de monoterpenoides ensayadas.

Para completar este trabajo se examinó de igual forma la capacidad que tenían estos bioinsecticidas de generar resistencia en estas tres plagas así como el mecanismo de resistencia implicado en el desarrollo de este proceso. Para ello se fueron seleccionando las poblaciones de insectos mediante la aplicación de los diferentes monoterpenoides a dosis crecientes durante 7 generaciones. De este modo se pudo calcular el factor de resistencia en cada una de las plagas y para cada uno de los monoterpenoides comparando las concentraciones letales 50 de las poblaciones seleccionadas con las poblaciones iniciales (sensibles).

A continuación se analizaron tres posibles sistemas de detoxificación enzimáticos gracias al uso de sinergistas para estudiar el mecanismo de resistencia que podría estar involucrado.

De tal forma se observó como estos monoterpenoides inducían lentamente resistencias resultando ventajosos en un futuro para el control de estas plagas.

Esta Tesis ha englobado un estudio íntegro y profundo de estos insecticidas ecológicos desde la extracción de los aceites esenciales, seguido de la identificación de compuestos puros (CG-EM) con actividad insecticida junto con el estudio de un modo de acción de estos insecticidas, la selección de resistencia en las poblaciones de insectos y los posibles mecanismos de resistencia que pudieran estar implicados en este proceso.

Palabras clave: Linalol, *S*-Carvona, Estragol, *E*-Anetol, Fenchona, Insecticidas de origen natural, *Ocimum basilicum*, *Carum carvii*, *Coriandrum sativum*, *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes pusillus*, Coleoptera, Acetilcolinesterasa, Resistencia a monoterpenoides.

ABSTRACT

Some pests cause serious damage to stored grains and stored products and consequently production and quality losses in these products.

The rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Bostrichidae) and *Cryptolestes pusillus* Schönherr (Coleoptera: Cucujidae) were the main damaging pests found in stored rice in Spain.

S.oryzae and *R.dominica* are primary pests attacking directly the intact grain and are quite destructive because their larvi feed and develop inside the grain whereas *C.pusillus* is a secondary pest which benefits from grains previously damaged.

At the present time, organic synthetic pesticides are still the main method to control stored grain pests, however, recently (due to restriction in agrochemicals use) there is a great interest in using other altenatives such as biological control, storage at low-temperatures, or heat treatment.

Likewise, many products obtained mainly from plants and derived from secondary metabolism have insecticidal activity against insects, such as monoterpenoids, which present a broad variety of bioinsecticide products which could turn out to be an ecologic alternative to synthetic pesticides since the majority of alternative products are not harmful for the human healthy and they become less environmentally damaging, exhibiting a low impact on the environment.

In addition, it cannot be ignored the different difficulties related to resistance due to several active compounds from organic pesticides found in some species of insects.

With this work, we have considered remarkable to study the insecticide activity of essential oils extracted from three plants: *Coriandrum sativum* L. (Umbelliferae), *Carum carvii* L. (Umbelliferae) and *Ocimum basilicum* L. (Labiatae) and carry out a bioassay-guided fractionation of their essential oils to identify which compounds were responsible for the volatile toxicity shown on three stored rice pests (*S. oryzae*, *R. dominica* and *C. pusillus*).

Essential oils were obtained by steam distillation, using a Clavenger-type apparatus and each essential oil was separated in fractions by means of a chromatographic column obtaining several fractions which were tested through a volatile bioassay to determine the insecticidal activity.

Afterwards the essential oils and fractions were analysed using a gas chromatograph (GC) and a mass spectrometry (MS) detector.

Linalool, *S*-carvone and estragole turned out to have a high insecticide activity on these pests.

Nevertheless *E*-anetol was more selective to *R. dominica* and *C. pusillus*, being only active on *C. pusillus* limonene, γ -terpinene, geraniol and eucalyptol.

Some monoterpenoids were found as synergists, increasing the activity of the other ones, like for instance, camphor, geranyl acetate and *E*-anethole with linalool in *R. dominica* and *C. pusillus* or metoxycinnamaldehyde, *p*-anysaldehyde and linalool which could activate to estragole.

In this work, the inhibition of acetylcholinesterase as a possible mode of action was studied as well, to reach a clear understanding about the action of these products inside the insects.

A chemical reaction with enzyme acetylcholinesterase, a substrate (acetylthiocholine iodide), the Elman's reagent and each monoterpenoid as inhibitor, was carried out.

The majority of monoterpenoids inhibited the enzyme acetylcholinesterase being fenchone, *S*-carvone and linalool the monoterpenoids that produced a higher inhibition.

Furthermore, it was observed how fenchone, γ -terpinene, geraniol and linalool showed a competitive inhibition whereas *S*-carvone, estragole and camphor produced a mixed inhibition for this enzyme.

However the enzyme acetylcholinesterase was not inhibited by *E*-anethole.

To finish up this work, the selection for monoterpenoid resistance on these pests as well as the metabolic mechanisms implicated was studied.

The resistant strains were selected from susceptible insect populations and survivors were reared separately for each monoterpenoid and successive generations were treated with higher concentrations. These populations were selected until seven times.

As a result we could calculate the resistance factor on each pest (comparing lethal concentration 50 values of susceptible and resistant strains).

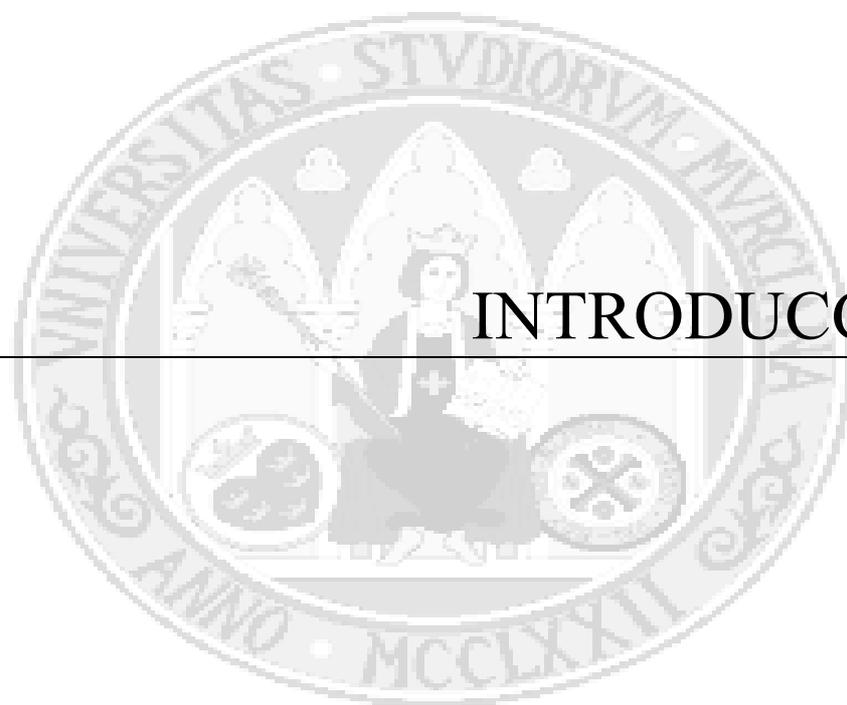
Next, three enzymatic systems detoxifying these monoterpenoids were analysed to study the metabolic mechanism implicated.

In this way we could realize that all monoterpenoids induced resistance slowly, concluding that these pesticides will be appropriated to control these pests in the future.

This Thesis has concerned a study in depth about ecological insecticides from extraction of essential oils, identification of compounds (GC-MS) with insecticide

activity, mode of action and study of resistance and mechanism of insecticide resistance involved in this process.

Keywords: Linalool, *S*-Carvone, Estragole, *E*-Anethole, Fenchone, Botanical Insecticides, *Ocimum basilicum*, *Carum carvii*, *Coriandrum sativum*, *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica*, *Cryptolestes pusillus*, Coleoptera, Acetylcholinesterase, Monoterpenoid Resistance.



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. INSECTICIDAS DE ORIGEN NATURAL.

Durante mucho tiempo el hombre ha luchado por combatir plagas de insectos que compiten por alimento o dañan nuestros cultivos o afectan a la salud pública.

Los plaguicidas químicos de síntesis han ocupado un lugar preferencial desde mitad del siglo XX. Sin embargo su uso continuo y discriminado ha tenido un negativo impacto ambiental, incluyendo pérdidas de calidad de las aguas, contaminación del hábitat natural, resistencias de las especies que eran el objeto de control (Bourguet *et al.*, 2000; Bouvier *et al.*, 2001) junto con problemas de seguridad y exposición del consumidor a los residuos de pesticidas en el alimento, en el aire y en el suelo.

A lo largo de la historia de la humanidad, se han utilizado principios activos o extractos procedentes de las plantas como insecticidas, aún sin saber cuales eran los compuestos responsables que tenían estas propiedades.

Durante mucho tiempo, éstos jugaron un papel importante en la actividad agrícola y fueron la base de antiguas observaciones que estructuraron las disciplinas derivadas de la biología (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

Hoy en día, la pérdida de las cosechas y de su calidad por la acción de las plagas de insectos sigue siendo uno de los principales problemas con los que se encuentra la agricultura mundial.

Todo esto nos plantea la necesidad de desarrollar nuevos métodos y estrategias para el control de plagas que permitan mantener los rendimientos de producción, que no conlleven un elevado coste medioambiental y que sean compatibles con una agricultura sostenible.

Los productos naturales con su diversidad estructural proporcionan una importante fuente de nuevos y efectivos métodos para el control de plagas (Álvarez-Castellanos *et al.*, 2001; Cantín *et al.*, 2001).

Numerosos productos químicos que funcionan en algún grado como insecticidas se producen en la naturaleza. La mayoría están presentes en organismos vivos, desde las algas azul-verdes hasta los hongos y las angiospermas.

Las plantas de diferentes familias contienen compuestos químicos secundarios que se creen que resultan de la coevolución de las plantas y de los insectos. Éstos

resultan ser una excelente fuente de productos naturales biológicamente activos lo cual es señalado por diversos autores (Regnault-Roger *et al.*, 1993; Don-Pedro, 1996; Ngoh *et al.*, 1998; Obeng-Ofori y Reichmuth, 1999; Isman, 2000; Clemente *et al.*, 2003) ya que producen mas de 100.000 sustancias de bajo peso molecular conocidas como metabolitos secundarios; estos metabolitos secundarios resultan no esenciales para el proceso metabólico básico de la planta, entre ellos podemos encontrar terpenos, lignanos, alcaloides, esteroides, etc; actualmente se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un papel importante en el mecanismo defensivo de las plantas (Jacobson, 1989; Pascual-Villalobos, 1996a).

El fraccionamiento biodirigido para el descubrimiento de nuevos productos naturales es un proceso muy importante que resulta lento y requiere grandes esfuerzos (Pascual-Villalobos *et al.*, 1997).

Existen muchos ejemplos de productos naturales de plantas los cuales demuestran actividad como insecticidas (Benner, 1993) y tienen efectos protectores tan variados que van desde repelencia (Obeng-Ofori, *et al.*, 1998; Lwande *et al.*, 1999; Pascual-Villalobos y Ballesta-Acosta, 2003; García *et al.*, 2005), inhibición de la alimentación (González-Coloma *et al.*, 1999; Tripathi *et al.*, 2003a; Tripathi *et al.*, 2003b; Ertürk, 2006.), oviposición (Regnault-Roger y Hamraoui, 1994, Regnault-Roger y Hamraoui, 1995, Pascual-Villalobos y Ballesta-Acosta, 2003), toxicidad aguda e interferencia con el crecimiento y desarrollo (Pascual-Villalobos, 1998; Barra *et al.*, 2007).

A lo largo de la historia, uno de los principales compuestos aislados de plantas para fines insecticidas fue la rotenona, un flavonoide que se extrae de las raíces de una planta llamada derris (*Derris elliptica* y *Lonchocarpus utilis*, Fam. Leguminosae). Es un insecticida que puede actuar tanto por contacto, ingestión o repelente. Su modo de acción implica una inhibición del transporte de electrones a nivel mitocondrial bloqueando la fosforilación del ADP a ATP. Los insectos sufren ataxia lo que les provoca convulsiones y conduce finalmente a la parálisis y muerte por paro respiratorio (Silva *et al.*, 2002).

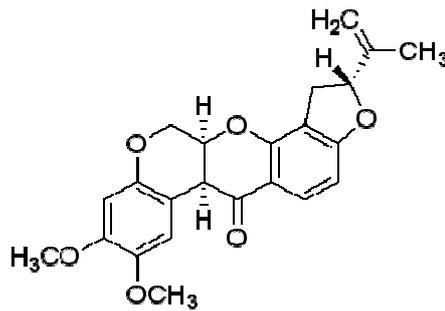


Figura 1. Estructura molecular de la Rotenona

Otros de los compuestos extraídos de las plantas fueron las piretrinas, que son ésteres con propiedades insecticidas obtenidas de las flores del piretro (*Chrysanthemum cinaerifolium*, Fam. Compositae). Estos ésteres están formados por la combinación de ácidos como el crisantémico y pirétrico y alcoholes como la piretrolona, cinerolona y jasmolona. Estos compuestos atacan tanto al sistema nervioso central como al periférico, taponando las entradas de los iones sodio a los canales, generando que dichos canales sean afectados, alterando la conductividad del ión en tránsito. Su característica más importante es su alto efecto “Knock down”. Actualmente se encuentran en el mercado la síntesis química y modificación de moléculas en laboratorio que ha dado origen a los piretroides.

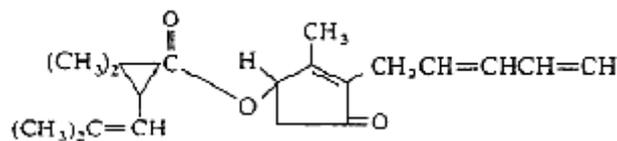


Figura 2. Estructura molecular de Piretrina

Dentro de este recorrido por los compuestos aislados de las plantas, no podemos olvidar mencionar a la nicotina. La nicotina es un alcaloide derivado principalmente de tabaco (*Nicotiana tabacum*, Fam. Solanaceae). Este compuesto no se encuentra en la planta de forma libre sino formando maleatos y citratos y es básicamente un insecticida de contacto poco persistente. Su modo de acción consiste en mimetizar la acetilcolina al combinarse con su receptor en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular. La actividad de la nicotina ocasiona la generación de nuevos impulsos que provocan contracciones espasmódicas, convulsiones y finalmente la muerte.

Hoy en día podemos encontrar en el mercado un grupo de insecticidas conocidos como neonicotinoides que son la síntesis de la nicotina o derivados de su estructura, tal como Imidacloprid, Thiacloprid, Nitenpiram, Acetamiprid y Thiamethoxam entre otros.

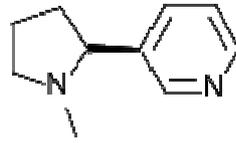


Figura 3. Estructura molecular de la Nicotina

La *Anabasis aphylla* (Fam. Chenopodiaceae) es otra de las plantas utilizada como insecticida. Su principio activo, anabasina o neonicotina, es similar a la nicotina y actúa de manera similar. Esta planta crece en Asia Central (Duke, 1990).

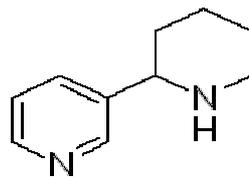


Figura 4. Estructura molecular de la Anabasina

La rianodina se obtiene de los tallos y raíces de una planta originaria de América del Sur conocida como *Ryana speciosa* (Fam. Flacourtiaceae). De aquí se obtienen diferentes alcaloides, siendo el más importante la rianodina. Este alcaloide actúa por contacto y vía estomacal afectando directamente a los músculos impidiendo su contracción y ocasionando parálisis.

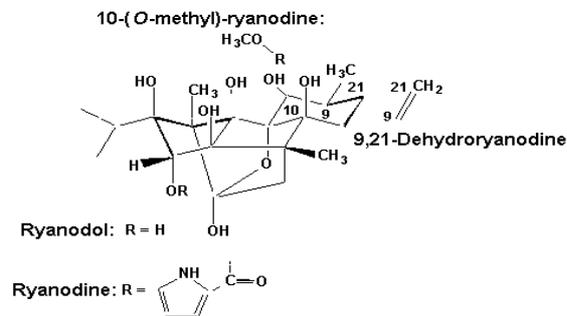


Figura 5. Estructura molecular de la Rianodina

Otro compuesto extraído de las plantas que en la actualidad se puede utilizar en agricultura ecológica para combatir plagas es la azadiractina, que es un tetraterpenoide característico de la familia Meliaceae pero principalmente extraído del árbol Neem (*Azadirachta indica*), originario de la India. Este compuesto se encuentra en la corteza, hojas y frutos de este árbol pero la mayor concentración se ubica en las semillas. En el extracto se han identificado varios compuestos entre los que destacan salanina, meliantrol y azadiractina que es el que se encuentra en mayor concentración. Muestra diferentes acciones insecticidas, antialimentaria, reguladora del crecimiento, inhibidora de la oviposición y esterilizante (Kurmar y Parmar, 1996, Govindachari *et al.*, 2000).

Actualmente se pueden encontrar formulaciones comerciales de Neem llamadas Neem Gold, Neemazal, Econeem, neemark, Neemcure, Align y Azatín entre otros.

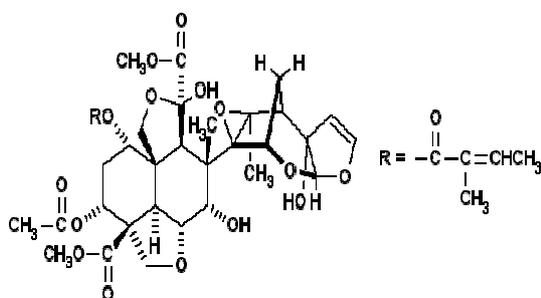


Figura 6. Estructura molecular de la Azadiractina

También en el caso de otras plantas como *Melia azedarach* (Fam. Meliaceae), también llamada “Paraíso” sus frutos maduros y sus hojas amarillas suelen ser usados como insecticidas y como inhibidores de la alimentación sobre diferentes tipos de plagas. Este extracto tiene un potencial insecticida similar al del extracto de Neem. Autores como Valladares *et al* (1997) demostraron que este extracto era capaz de inhibir la alimentación y afectaba negativamente al desarrollo y supervivencia de distintas plagas que atacaban a diversos cultivos. El compuesto activo aislado es un limonoide llamado meliartenin.

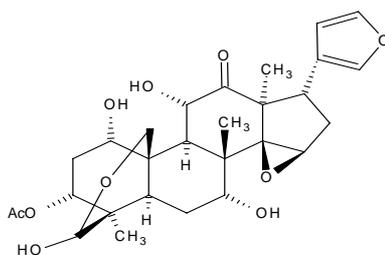


Figura 7. Estructura molecular del Meliartenin

De *Schoenocaulon officinale* (Fam. Liliaceae) se extrae un compuesto llamado sebadilla. Las semillas de esta planta han demostrado tener cantidades importantes de alcaloides que les confieren las propiedades tóxicas. El polvo de estas semillas es uno de los insecticidas vegetales de menor toxicidad para mamíferos, pero no así si se aíslan sus alcaloides los cuales pueden llegar a ser altamente tóxicos.

Asimismo, el aceite esencial producido en las partes aéreas de *Artemisa annua* (Fam. Asteraceae) más conocida como ajeno dulce, es usado contra el ataque de insectos de productos almacenados (Tripathi *et al.*, 2000; Tripathi *et al.*, 2001). Uno de los principales compuestos activos de esta planta es la artemisina conocido especialmente por su efecto antimalárico. Este principio activo provoca un efecto neurotóxico en el que los insectos comienzan a realizar movimientos descoordinados, temblores y colapso.

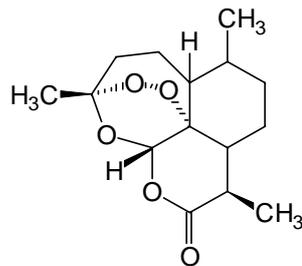


Figura 8. Estructura molecular de la Artemisina.

Entre las hortalizas, como por ejemplo el tomate, la berenjena, etc. pertenecientes a la Familia Solanaceae, se producen alcaloides como la chaconina, solanina, tomatina, atropina y escopolamina, los cuales poseen un efecto insecticida importante para la mayoría de plagas, aunque cabe mencionar que muchas de estas han desarrollado características para tolerar estas toxinas.

Las curcubitacinas u otros semioquímicos (triterpenos y esteroides) podrían ser productos enfocados a un futuro próximo, ya que sirven como atrayentes de insectos y por lo tanto podrían utilizarse promoviendo la comunicación entre las plagas y la planta huésped y usadas en combinación con tóxicos para controlar plagas mediante el uso de cebos.

La naturaleza nos proporciona una gran variedad de productos para la protección de cultivos. Entre las plantas encontramos una serie de especies utilizadas desde la

antigüedad y por diferentes culturas como la Equinácea, Hisopo, Lavanda, Salvia, Romero, Toronjil, Ajo, Frijol, Caléndula, y muchas más donde el conocimiento de sus propiedades insecticidas ha sido difundido de boca en boca.

En la actualidad se van desarrollando conocimientos mas exhaustivos de las propiedades de estas plantas entre las cuales encontramos algunas que han sido estudiadas científicamente y otras que aún siguen entre la sabiduría popular.

Las modernas tecnologías serán la clave en la protección vegetal ya que se podrán utilizar propiedades encontradas en las plantas en la mejora genética de cultivos, aunque será el tipo de metabolito activo el que determinará en último término la posibilidad de manipulación y la complejidad en la aplicación de estas técnicas (Pascual-Villalobos, 1996a).

Sería un propósito interesante para un futuro realizar una selección de plantas que contengan metabolitos secundarios los cuales sean capaces de ser utilizados como insecticidas naturales, de fácil cultivo, con compuestos activos potentes, con alta estabilidad química y de óptima producción. Todo ello tiene que ser objeto de una investigación científica aplicada a la agricultura.

1.2. METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS. MONOTERPENOIDES Y FENILPROPANOIDES.

Metabolitos secundarios de las plantas.

Las plantas presentan diferentes vías metabólicas, no existentes en los animales, por las cuales se producen grandes cantidades de compuestos químicos que en principio no representan un rol específico o esencial en la planta.

Al conjunto de estas vías metabólicas se les conoce como metabolismo secundario.

Los metabolitos secundarios de las plantas son aquellos compuestos químicos sintetizados por éstas que cumplen funciones no esenciales en ellas y donde su ausencia no entraña un riesgo para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario.

Estos metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente.

Además, a diferencia de los metabolitos primarios, estos metabolitos tienen una distribución restringida a veces a solo una especie o un grupo de ellas. La principal función de algunos de estos metabolitos se cree que es la protección contra el ataque de predadores y patógenos, asimismo actuando como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), aunque otros también actúan como atrayentes de insectos para la polinización y dispersión del fruto y de la semilla. Sin embargo muchas de las funciones de los metabolitos secundarios aún nos son desconocidas.

Suelen acumularse en grandes cantidades sin efectos negativos y sin representar un inconveniente en las células o en la planta. Estos metabolitos tienen la propiedad de formar glicósidos y de esta forma encontrarse de forma soluble en la planta.

Muchos de estos metabolitos tienen efectos sobre los animales y los humanos a bajas dosis, y pueden ser empleados como medicinas, drogas, venenos, aromas, materiales industriales, etc.

Durante muchos años estos metabolitos fueron considerados como productos finales de procesos metabólicos, sin función específica o directamente como productos de desecho de las plantas.

El estudio de estas sustancias fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX que estaban interesados en estas sustancias por su importancia como medicinas, venenos, aromatizantes, pegamentos, aceites, ceras y otros materiales utilizados en la industria. De hecho, el estudio de los metabolitos secundarios de las plantas estimuló el desarrollo de las técnicas de separación, la espectroscopía para dilucidar su estructura y metodologías de síntesis que hoy constituyen la base de la química orgánica contemporánea.

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides, en base a sus orígenes biosintéticos:

➤ **Terpenoides.**

Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario (Lehninger, 1995) como los más de 25.000 metabolitos secundarios, están contruidos por unidades múltiples del hidrocarburo de cinco átomos de carbono *isopreno* (2-metil-1,3-butadieno).

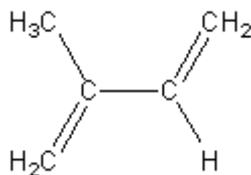


Figura 9. Estructura del isopreno

Esta unidad isoprenoide unida a un grupo fosfato activo forma el IPP (Isopentil difosfato o “5-carbono isopentil difosfato”) que se forma en la vía del ácido mevalónico. Sin embargo recientemente se ha propuesto que algunos terpenoides no se originan por esta ruta, sino por una ruta alternativa que puede involucrar piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (Sponsel, 1995; Adam *et al.*, 1998).

La biosíntesis de los terpenoides depende de un número variable de condensaciones consecutivas de los dos monómeros activos (*building blocks*). Son producidos principalmente por una gran variedad de plantas, aunque algunos insectos también emiten terpenos y algunos son producidos sintéticamente (De Liñán, 1997).

Los *hemiterpenos* consisten en una sencilla unidad de isopreno. El isopreno en si es considerado el único hemiterpeno, pero derivados que contienen oxígeno tales como el prenol y el ácido isovalérico son hemiterpenoides.

Los terpenos que contienen dos unidades de isopreno se llaman *monoterpenos* (10 carbonos), los que contienen tres unidades de isopreno se llaman *sesquiterpenos* (15 carbonos) y los que contienen cuatro, seis, ocho o mas unidades reciben el nombre de *diterpenos* (20 carbonos), *triterpenos* (30 carbonos), *tetraterpenos* (40 carbonos), y *politerpenos* (n carbonos) respectivamente (Ikan, 1991).

Los terpenos pueden ser moléculas lineales o cíclicas y algunos de ellos contienen estructuras de ambos tipos. Las sucesivas unidades de isopreno se hallan enlazadas por una ordenación de “cabeza con cola”, especialmente en los segmentos lineales, si bien a veces las unidades de isopreno aparecen dispuestas “cola con cola” (McMurry, 1994).

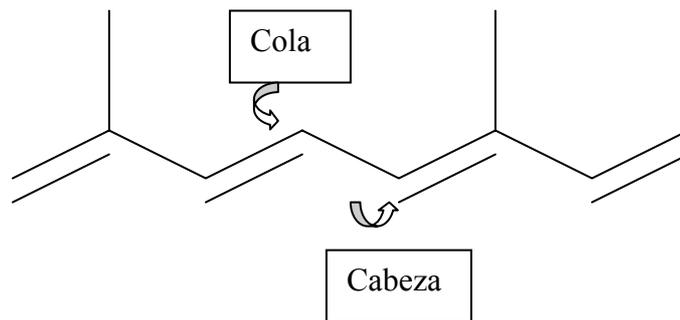
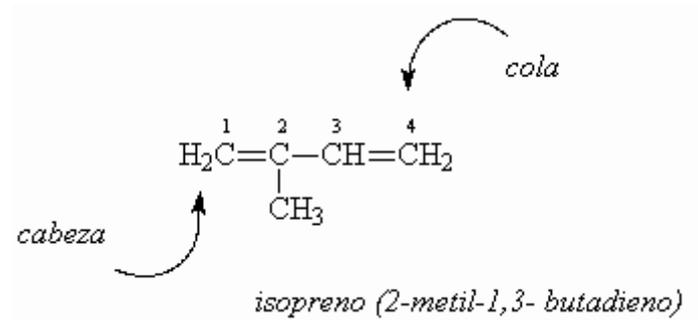


Figura 10. Ordenación de unidades de isopreno “cabeza con cola”.

Los terpenoides son los principales constituyentes de los aceites esenciales presentes en muchas familias de plantas, que son usados como aditivos, fragancias, insecticidas, etc.

➤ **Compuestos fenólicos.**

Los más de 8000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato. Son aquellos productos biosintetizados en las plantas que poseen la característica biológica de ser productos secundarios de su metabolismo y la característica química de contener al menos un grupo fenol (un anillo aromático unido al menos a un grupo funcional hidroxilo) en su estructura molecular.

La vía del ácido shikímico participa en la biosíntesis de la mayoría de los fenoles de las plantas superiores. Utiliza como sustratos la eritrosa-4-fosfato (de la vía de las pentosas fosfato) y el ácido fosfoenolpirúvico (proveniente de la glucólisis). Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, un aminoácido esencial el cual va del metabolismo primario de las plantas, y

entra en el secundario cuando la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la eliminación de un amonio convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico.

La vía del ácido malónico es una importante fuente de fenoles en bacterias y hongos y en las plantas superiores existe aunque no es tan utilizada como en aquellos. Su sustrato es el acetil-CoA.

Entre los compuestos fenólicos encontramos fenoles simples y complejos. Los simples pueden ser *fenilpropanoides simples* los cuales tienen un esqueleto básico de fenilpropanoide, es decir, un anillo unido a una cadena de 3 carbonos (ej: ácido trans-cinámico), *lactonas fenilpropanoides* (ésteres cíclicos), también llamadas cumarinas. Éstos también poseen un esqueleto fenilpropanoide pero el propano aquí está ciclado (ej: umbeliferona), o *derivados del ácido benzoico*, donde el esqueleto es un anillo aromático unido a un carbono (ej: la vainillina).

Dentro de los fenoles complejos encontramos la *lignina* y los *flavonoides*.

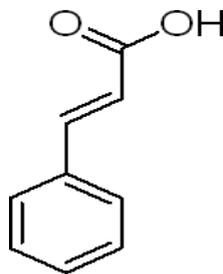


Figura 11. Estructura del ácido cinámico

➤ **Compuestos nitrogenados y alcaloides.**

Un alcaloide, es por definición, un compuesto químico que posee un nitrógeno heterocíclico. Se conocen alrededor de 12.000 alcaloides que contienen uno o más átomos de nitrógeno. Son sintetizados a partir de aminoácidos por medio de la vía del ácido shikímico o de la vía del acetato. Son compuestos alcalinos (excepto la colchicina) y poseen acción fisiológica intensa en los animales aún a bajas dosis con efectos psicoactivos. Ejemplos conocidos son la cafeína, la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina y la estricnina.

Generalmente actúan sobre el sistema nervioso central, si bien algunos afectan al sistema nervioso parasimpático y otras al sistema nervioso simpático.

Se clasifican según su naturaleza química y entre los principales grupos encontramos los *protoalcaloides*, que son derivados de la tirosina (ej: efredina, hordenina), los *isoquinolínicos*, los cuales son alcaloides muy fuertes que actúan sobre el sistema nervioso (ej: papaverina, morfina y codeína), también derivados de la tirosina, los *indólicos*, que son derivados del triptófano y de la fenilalanina (ej: estricnina, quinina, reserpina), los *piridínicos*, derivados de la ornitina y de la lisina (ej: nicotina y anabasina), los *quinolínicos* que son derivados de la lisina (ej: lupinina y esparteína), los *pirrólicos*, que son derivados de la ornitina (ej: higrina), los *tropánicos* también derivan de la ornitina (ej: atropina, cocaína e hyosciamina) y por último los *purínicos*, derivados de la glicina, la glutamina y el aspartato (ej: cafeína, teofilina y teobromina).

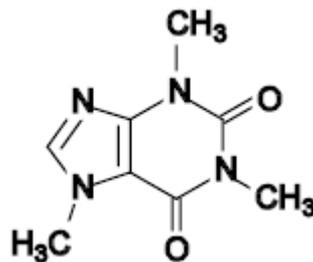


Figura 12. Estructura de la cafeína

Es importante tener en cuenta que la diferencia entre metabolitos primarios y secundarios es sólo funcional, no pueden ser en ocasiones claramente distinguidos en base a moléculas precursoras, ni estructura química, ni origen biosintético, por lo que la diferencia entre las vías bioquímicas es difusa y a veces un compuesto considerado primario, por la acción de una enzima se convierte en lo que se considera un metabolito secundario. Por otro lado en algunos casos también encontramos metabolitos secundarios que cumplen funciones primarias en las plantas.

volátiles de las flores y como parte de los aceites esenciales de hierbas y especias. Ellos forman parte de hasta el 5 % en peso de la planta seca.

Muchos monoterpenos son tóxicos para los insectos, como por ejemplo las piretrinas, las resinas de coníferas y algunos aceites esenciales que poseen actividades antibacterianas y antifúngicas.

Los monoterpenos son subdivididos dentro de tres grupos: acíclicos, monocíclicos y bicíclicos (Ikan, 1991).

A. Monoterpenos acíclicos.

- Hidrocarburos: Ocimeno, Mirceno

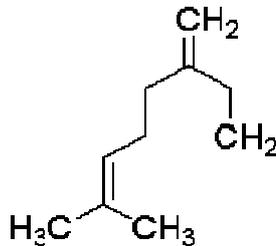


Figura 14. Estructura del Mirceno

- Aldehídos: Geranial, Neral

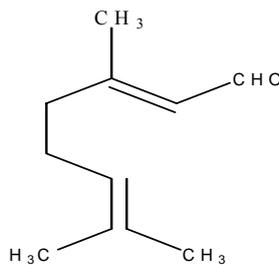


Figura 15. Estructura del Geranial.

- Alcoholes: Linalol y Geraniol

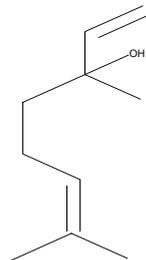


Figura 16. Estructura del Linalol

Se conocen numerosos ejemplos de monoterpenos acíclicos que produzcan compuestos alicíclicos o aromáticos. Algunos autores consideran los derivados del fenilpropano como resultado de algunas conversiones internas de la estructura carbonada de los monoterpenos que podría conducirlos a ellos, a pesar de que se biosinteticen por diferentes rutas metabólicas (ej: eugenol, anetol, metil chavicol y p-cimeno).

B. Monoterpenos monocíclicos.

- Hidrocarburos: γ -Terpineno, d-Limoneno.

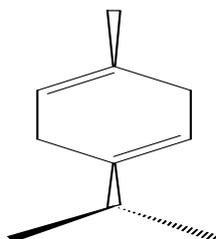


Figura 17. Estructura del γ -Terpineno

- Alcoholes: Mentol, Carveol.

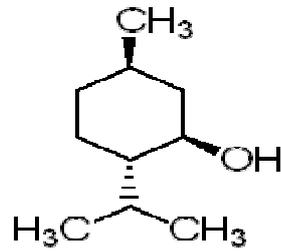


Figura 18. Estructura del Mentol

- Aldehídos. Perillaldehído, Felandral.

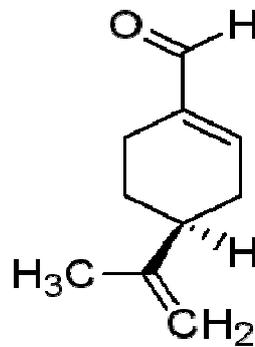


Figura 19. Estructura del Perillaldehído

- Cetonas: *R*-(-)-Carvona, *S*-(+)-Carvona, Mentona.

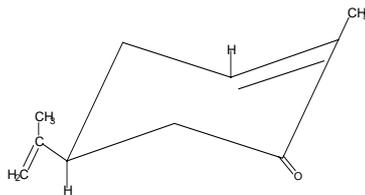


Figura 20. Estructura de *S*-(+)-Carvona

- Óxidos: 1,8-Cineol, Ascaridol

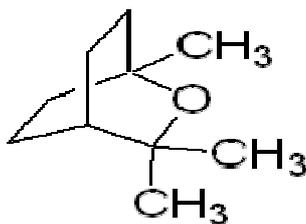


Figura 21. Estructura del 1,8-Cineol

C. Monoterpenos bicíclicos.

- Grupo Tuyano: Tuyona, Sabinol

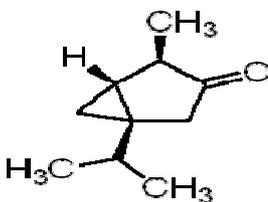


Figura 22. Estructura de la Tuyona

- Grupo Carano: Car-3-eno, Carona

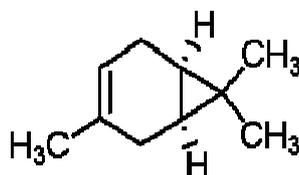


Figura 23. Estructura de Car-3-eno

- Grupo Pinano: Pineno, Mirtenal

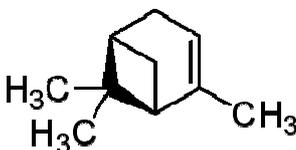


Figura 24. Estructura de α -Pineno

- Grupo Canfano: Alcanfor, Borneol

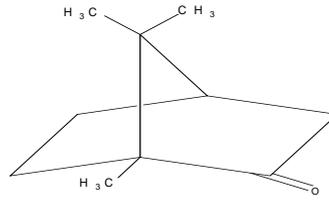


Figura 25. Estructura del Alcanfor

- Grupo Fenchano: Fenchona, Fencheno.

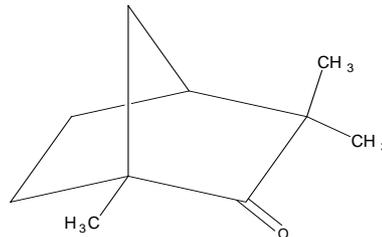


Figura 26. Estructura de la Fenchona

Fenilpropanoides.

Los fenilpropanoides son metabolitos secundarios de las plantas que son biosintetizados a partir del aminoácido fenilalanina. Ellos tienen una amplia variedad de funciones, incluyendo la defensa contra predadores, como componentes estructurales de la pared celular, como protección frente a la luz ultravioleta, como pigmentos y como moléculas indicadoras.

La fenilalanina es convertida primero, en ácido cinámico por la acción de la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL). Una serie de hidroxilaciones conducen al ácido cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, etc. La conversión de estos ácidos a sus correspondientes ésteres produce algunos de los componentes volátiles de las fragancias de hierbas y flores los cuales sirven entre otras funciones como atrayentes de polinizadores. El etilcinamato es un ejemplo común.

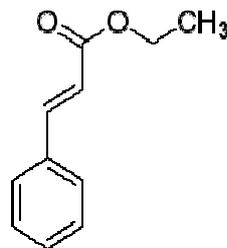


Figura 27. Estructura del etilcinamato

Dentro de los fenilpropanoides también encontramos a los aldehídos cinámicos, tales como el cinamaldehído, y los monolignoles, incluyendo el cumaril alcohol, el coniferil alcohol y el sinapil alcohol, los cuales son monómeros que son polimerizados para generar varias formas de lignina y suberinas, que son usadas como componentes estructurales de las paredes celulares.

Los fenilpropenos, incluyendo el eugenol, chavicol, safrol y estragol son también derivados de monolignoles y son constituyentes de los aceites esenciales.

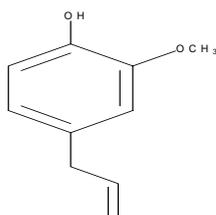


Figura 28. Estructura del Eugenol

Las cumarinas y flavonoides también derivan de los fenilpropanoides y se consideran todo un grupo de metabolitos secundarios de las plantas que comparten la misma vía biosintética y esqueleto químico.

En plantas, se encuentran en los tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas, y tallos, aunque la mayor concentración se encuentra en general en frutos y flores.

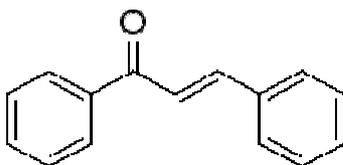


Figura 29. Estructura de la chalcona

Finalmente, dentro de los fenilpropanoides encontramos a los estilbenoides que son compuestos fenólicos formados a través de una ciclación alternativa de cinamoil-CoA o 4-cumaroyl-CoA.

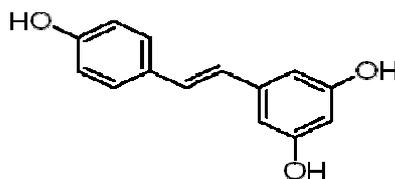


Figura 30. Estructura del Resveratrol

1.3. TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN DE *CORIANDRUM SATIVUM* (UMBELLIFERAE), *CARUM CARVII* (UMBELLIFERAE) Y *OCIMUM BASILICUM* (LABIATAE).

***Coriandrum sativum* L.**

El *Coriandrum sativum* (coriandro o cilantro) es una planta herbácea que desprende un olor característico y suele alcanzar una altura variable entre 0,20 y 1,40 m, con tallos numerosos, lisos, cilíndricos y ramificados en la parte superior, de corteza negruzca y con las ramitas jóvenes pubescentes.

Es originario del Sur de Europa, Norte de África y el Cáucaso. Es una hierba bianual perteneciente a la familia de las apiáceas, antes llamadas umbelíferas. Con frecuencia, el Culantro (*Eryngium foetidum* L. Apiaceae), una hierba bianual también utilizada ampliamente en el Caribe, Latinoamérica y en Oriente, es nombrada erróneamente como cilantro o coriandro (Ramcharan, 1998).

El coriandro posee flores pequeñas blancas o ligeramente rosadas, con cinco pétalos y normalmente en parejas a lo largo de las ramas floríferas con hojas compuestas con contorno aserrado.



Foto 1. *Coriandrum sativum*

Los frutos son ovalados y globulares con un diámetro de hasta 6 mm que contiene en su interior el aceite de semilla y en unos ductos externos se acumulan los aceites esenciales.

Según Diederichsen (1996), una clasificación infraespecífica del coriandro distingue dos variedades, *Coriandrum sativum* L. var. *sativum*, que proviene de Asia y del Norte de África, con frutos generalmente mas grandes y *Coriandrum sativum* L. var. *microcarpum* DC, que proviene de Europa y se caracteriza por tener frutos mas pequeños. Tanto en un caso como en otro existen variedades comerciales que se pueden cultivar como anuales.

La superficie mundial cultivada, está estimada aproximadamente en 550.000 ha anualmente y la producción de frutos de coriandro está en 600.000 t aproximadamente. Los principales productores son Ucrania, Rusia, y la India, si bien Marruecos, Argentina, México y Rumanía también cultivan esta especie.

Los rendimientos medios varían desde 442 Kg de semilla/ha en la India hasta los 1500 Kg/ha en Rusia.

Entre sus usos más frecuentes y conocidos, está el uso de sus frutos como condimento para sazonar muchas comidas, desde ensaladas hasta carnes. Sus hojas, con un fuerte olor característico, son usadas en sopas y ensaladas.

Los aceites vegetales suelen ser obtenidos por presión o extracción de los frutos y poseen cualidades características que los hacen adecuados como lubricantes en algunos procesos técnicos. Su principal componente es el ácido petroselénico que es adecuado para la fabricación de surfactantes o polímeros (Meier zu Beerentrup y Röbbelen, 1987), aunque también podría considerarse su uso para la fabricación de biocombustibles.

El aceite esencial de coriandro se usa como aromatizante de bebidas, en perfumería y debido a que su uso está teniendo un constante crecimiento en diferentes campos de la actividad humana, tal como la medicina, cosméticos e industria alimentaria, es aconsejable según Misharina (2001) un control en las condiciones de almacenaje del aceite esencial ya que podrían producirse transformaciones resultando una diferente composición química de los productos con pérdida de la calidad.

Otra utilidad del coriandro es la de producir una cantidad considerable de néctar y así atraer a diferentes insectos para la polinización de donde se obtiene un efecto externo ecológico y económico intercalando cultivos de coriandro con otros como por ejemplo la lechuga, y así aumentar el número de enemigos naturales y ayudar a

controlar algunas plagas como el pulgón de la lechuga (*Nasonovia ribisnigri*) (Pascual-Villalobos *et al.*, 2002).

De Almeida *et al.*, 2005, obtuvieron 4 fracciones de un extracto acuoso de coriandro y encontraron que todas estas fracciones presentaban actividad antioxidante; otro uso sería extraer su aceite esencial para combatir plagas de almacén (López y Pascual-Villalobos, 2007a).

***Carum carvii* L.**

Carum carvii (alcaravea, alcorobea, caros, alcarahueya, carvia, alcaravia o comino de prado) es una de las especies bianuales y herbáceas de Umbelíferas cultivadas mas antiguas conocidas por sus pequeñas semillas aromáticas.

Es una planta originaria de Europa donde se ha cultivado principalmente en los países de centro y norte de Europa (Evenhuis *et al.*, 1995), aunque también se ha cultivado considerablemente en Asia (China) y en el Norte de África (Egipto y Marruecos) si bien en la actualidad se cultiva en todo el mundo.

Los frutos tienen forma de elipses entre 4 y 6 mm de largo, cuenta con una raíz carnosa en forma de zanahoria y tiene las hojas divididas y las flores de color blanco y de tamaño bastante pequeño.

La pared de los frutos, exocarpo, contiene tubos donde se encuentra el aceite esencial, en el que mas del 50 % de éste consiste en enantiómeros de *S*-(+)-carvona, un monoterpenoide (Toxopeus *et al.*, 1995).



Foto 2. *Carum carvii*

La floración tiene lugar a partir del mes de mayo, produciendo unas inflorescencias que se disponen en umbelas constituidas por radios de dimensiones irregulares y en número de hasta doce.

La alcaravea se ha utilizado con fines medicinales, en casos de digestiones lentas y espasmos gastrointestinales y en la industria alimentaria, de hecho, es empleada habitualmente en la cocina, como condimento.

Debido a que su aceite esencial contiene en alta proporción un monoterpeno como la carvona, le confiere otras propiedades y otros usos como antimicrobianos (Farag *et al.*, 1989), nematocidas (Saxena *et al.*, 1987), antitumoral (Zheng *et al.*, 1992) y como regulador del crecimiento de algunas plantas (Reynolds, 1987).

Otros autores han considerado el uso del aceite esencial de esta planta, más propiamente el uso de la carvona, como inhibidor de la brotación de la patata (Hartmans *et al.*, 1995; Oosterhaven *et al.*, 1995).

Este cultivo podría tener un alto interés de desarrollo como cultivo no alimentario y para producir productos naturales insecticidas (Pascual-Villalobos, 1996b) dado que la alcaravea está autorizada para su uso en agricultura ecológica.

***Ocimum basilicum* L.**

El género *Ocimum* de la familia Labiatae está formado aproximadamente por unas 60 especies y diversas variedades, con características morfológicas distintas y diferentes quimiotipos. Este género comprende hierbas anuales, perennes y arbustos, donde su área de distribución natural abarca los trópicos y subtrópicos de Asia, África y América del Sur, aunque también es cultivado con frecuencia en Europa y América del Norte, debido a sus propiedades aromáticas y medicinales (Alburquerque y Andrade, 1998). Entre todas las especies de *Ocimum*, las más destacables son *O. basilicum*, *O. gratissimum*, *O. kilimandscharicum*, *O. minimum*, *O. americanum*, *O. campechiarum* y *O. sanctus*.

Darrah (1974), realizó un estudio de las especies cultivadas de *Ocimum* para determinar las interrelaciones de las muchas variedades que se encuentran bajo cultivo encontrando en muchos casos dificultades en su identificación o interpretación.

Viera y Simón, 2006 realizaron análisis de los componentes principales del aceite volátil de estas especies y no encontraron grandes diferencias por lo que

concluyeron que la taxonomía de *Ocimum* estaba basada en características morfológicas y no en los constituyentes volátiles del aceite.

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es una hierba conocida y usada desde la antigüedad. Sabemos que los egipcios se servían de ella como uno de los componentes del bálsamo usado para la momificación.

Algunos autores, sitúan el origen de la planta en diferentes lugares, ya sea en la India, en África o en Asia central ya que existe una dificultad para establecer si las plantas son autóctonas de un lugar determinado o si han sido introducidas en la antigüedad (Ryding, 1994).

La albahaca, es la especie mas cultivada en todo el mundo. Es una hierba anual o perenne de base leñosa que alcanza una altura de 30-100 cm, con tallos rectos y múltiples redondeados por debajo y cuadrangulares por arriba. Sus hojas ovaladas o lanceoladas, opuestas, de hasta 5 cm y largamente pecioladas tienen un color verde intenso en el haz y verde grisáceo en el envés. Sus flores son pequeñas de color blanco, rosado o púrpura, con los estambres blancos.

Existen mas de 40 variedades de albahaca que varían en la composición química del aceite esencial debido al polimorfismo de *O. basilicum* el cual es debido a la hibridación interespecífica, por ello algunos autores como Hasegawa *et al.* (1997), han estudiado los componentes característicos en diferentes variedades de *O. basilicum*.

En cambio para Ravid *et al.* (1997), la cantidad de los enantiómeros de uno de sus componentes mayoritarios como el linalol podría ser útil en la taxonomía interespecífica en el genero *Ocimum*, ya que el linalol aislado de cultivares de *O. basilicum*, consiste en (*R*)-(-)-linalol y por ejemplo en *O. sanctus*, el principal enantiómero es el (*S*)-(+)-linalol.

Marotti *et al.* (1996) señala que en ciertos casos existen relaciones entre las características morfológicas y los quimiotipos aunque no siempre es posible establecer una correlación estricta.

En cambio muchos autores clasifican las variedades de albahaca según el quimiotipo, como el caso de Goretti de Vasconcelos *et al.* (2003), donde el *O. basilicum* var. *minimum* presenta un quimiotipo estragol, mientras que *O. basilicum* var. *purpuraceus* puede ser considerado un quimiotipo linalol.



Foto 3. Flores de albahaca.

La albahaca es un cultivo anual que requiere unas temperaturas medias desde 7 a 27 °C, y suelos con pH entre 4,3 y 8,2 y con buen drenaje. Esta planta es susceptible a las heladas por lo que las mejores condiciones para este cultivo al aire libre son los días largos y soleados de primavera-verano en el hemisferio norte. Las hojas e inflorescencias deben recogerse en verano. El cultivo protegido tanto para uso ornamental (maceta) o condimento (hojas frescas o secas) permite producir plantas en otras épocas del año.

La albahaca, además de como planta condimentaria y ornamental es posible emplearla como fuente de pigmentos naturales (Simon *et al.*, 1998), como fuente de antioxidantes fenólicos para nuestra dieta (Juliani y Simon, 2001), o como insecticida (Pascual-Villalobos y Ballesta-Acosta, 2003; López y Pascual-Villalobos, 2007b).

1.4. PLAGAS DE ALMACÉN DEL ARROZ: *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Bostrichidae) y *Cryptolestes pusillus* Schönherr (Coleoptera: Cucujidae).

Sitophilus oryzae

Sitophilus oryzae, conocido vulgarmente como gorgojo del arroz (España y América del Sur), pertenece al orden de insectos llamados coleópteros y mas precisamente a la familia *Curculionidae* que es una familia numerosa de la cual se han descrito aproximadamente 40.000 especies y a la que pertenecen los llamados gorgojos, picudos o trompudos. Éstos pueden ser encontrados en diferentes hábitats, como

barrenadores o minadores de plantas, tallos, raíces, semillas, granos que ya han sido cosechados, madera, etc. Aproximadamente 30 especies de esta familia viven en granos y productos almacenados y de éstas, tres, [*Sitophilus granarius* L. (gorgojo de los graneros o del trigo), *Sitophilus oryzae* L. (gorgojo del arroz) y *Sitophilus zeamais* Motschulsky (gorgojo del maíz)] constituyen unas de las plagas más importante por la gran capacidad destructiva tanto del adulto como la larva, y por su amplia distribución mundial (FAO, 2008).

El adulto en *Sitophilus oryzae* puede llegar a alcanzar una longitud de 2,5 a 4,5 mm, con el cuerpo color castaño rojizo, alargado, de lados paralelos y casi sin vellosidad. La longitud del rostro es menor que la del protórax con antenas de bastante longitud y alas posteriores funcionales. La larva es ápoda, blanca y rechoncha (De Liñán, 1998).



Foto 4. *Sitophilus oryzae*

Este gorgojo, conocido desde la antigüedad, aunque se encuentra en todo el mundo, es muy común de las zonas cálidas donde se reproduce continuamente, desarrollándose a temperaturas entre los 17 y 34 °C, aunque es frecuente encontrarlo en países mas fríos como Lituania, Rusia, Ucrania, etc. (Ostrauskas y Taluntyté, 2004).

En el campo la puesta se realiza en las espigas de las plantas hospedantes, por lo que el grano entra al almacén infestado por el insecto en alguno de sus estados, mientras que en el almacén la hembra selecciona un grano y un punto adecuado donde abre una pequeña galería en cuyo fondo sitúa un único huevo que es cerrada inmediatamente mediante un líquido que se solidifica en contacto con el aire. La larva se transforma en

pupa dentro del grano y solo el adulto será quien lo abandone. El ciclo completo en condiciones óptimas tiene una duración de 26 días (De Liñán, 1998).

Los adultos suelen vivir entre 3 a 4 meses y su fecundidad media es de 300 a 400 huevos por hembra dependiendo de factores como el de la calidad del grano entre otros (Descamps *et al.*, 2004).

Rhyzopertha dominica

Rhyzopertha dominica es una plaga de la familia Bostrichidae conocida como bostrico o capuchino de los granos (España), pequeño barrenador del trigo (Chile), barrenador menor de los granos (Perú), taladro de los granos (Perú), coquito de los granos (Venezuela).

Los miembros típicos de la familia *Bostrichidae* se distinguen por el cuerpo más o menos cilíndrico y protórax en forma de capucha. Muchos además presentan protibias modificadas y ápices elitrales fuertemente declinados. Se asemejan a los *Scolytinae* de *Curculionidae* pero difieren de ellos por presentar una maza antenal con segmentos sueltos y ojos redondeados. Miembros menos típicos del grupo se incluyen en los *Lycetinae* y *Polycaoninae*, que tienen una cabeza más o menos prognata.



Foto 5. *Rhyzopertha dominica*

Los adultos de *Rhyzopertha dominica* tienen una longitud de 2 a 3 mm y su color pasa del rojizo al marrón oscuro hasta alcanzar el negro. Poseen un cuerpo delgado y cilíndrico con una cabeza oculta por un protórax abultado y granuloso con forma de

capuchón. Los élitros son más largos que anchos, estriados y punteados. Ostentan antenas amarillentas de 10 segmentos con los tres últimos grandes, triangulares, aplastados y de longitud superior a la del resto de la antena. Las larvas son blancas, de unos 5 o 6 mm de longitud, con gruesos cuerpos y arqueados (Koehler y Pereira, 1994).

Esta especie se desarrolla solo sobre sustancias amiláceas almacenadas y nunca sobre vegetales vivos, y donde la temperatura esté por encima de los 21 °C siendo la óptima 28 °C.

La hembra pone los huevos aislados o en pequeños grupos (entre 200 y 400 huevos) y a los pocos días eclosionan y las larvas neonatas recorren los granos alimentándose de la harina que desperdician otros gorgojos hasta que encuentran un grano con la epidermis rota, por donde penetrarán en su interior (De Liñán, 1998).

Este hecho causa una mayor preocupación por *Sitophilus oryzae* que por *Rhyzopertha dominica* ya que en el proceso de pulido del arroz sobreviven las larvas de *Sitophilus oryzae* mientras que los granos con larvas de *Rhyzopertha dominica* se rompen en este proceso (Lucas y Riudavets, 2000).

Las larvas alcanzan su máximo desarrollo a los 15 o 30 días y es entonces cuando empieza la pupación en el interior del grano, donde finalmente, a los 8 días aparecen los nuevos adultos.

A pesar de que *Sitophilus oryzae* suele ser una de las plagas más dañinas del arroz almacenado no es la más frecuente ya que de un estudio reciente (Pascual-Villalobos *et al.*, 2006) realizado en España se concluyó que *Rhyzopertha dominica* era la más abundante de las plagas primarias en los almacenes de arroz.

Cryptolestes pusillus

Cryptolestes pusillus es un insecto del orden de los coleópteros y de la familia Cucujidae cuyo nombre común es carcoma achatada de los granos.

En Calasparra (Murcia) es una plaga abundante, encontrándose tanto en el arroz cáscara como en subproductos, salvado, harina etc. (Pascual-Villalobos y Del Estal, 2004). No obstante es una plaga secundaria que no es capaz de dañar directamente al grano sino que ataca al grano agrietado o coloniza los subproductos.

Hay diversas especies de *Cryptolestes* como *Cryptolestes ferrugineus* que se confunden entre ellas. Para una correcta taxonomía ver Delobd y Tran (1983)

Los adultos tienen un cuerpo achatado, oblongo, de color rojizo marrón, miden de 1 a 2 mm de largo y presentan antenas largas y finas.



Foto 6. *Cryptolestes pusillus*

Las larvas que pueden llegar a medir 3-5 mm cuando están totalmente desarrolladas tienen un color blanco amarillento. Cuando han completado su desarrollo tejen un capullo para pasar a pupas.

Los adultos están a menudo asociados con los gorgojos del arroz, porque aparentemente no pueden sobrevivir en granos que no estén dañados. Los huevos muy pequeños son depositados sobre materiales harinosos, hendiduras o grietas de la cáscara de los granos y las larvas devoran solo el germen, lo cual hace que estas especies sean particularmente dañinas.

Solo pueden reproducirse en los productos harinosos muy húmedos (de un 75 % de humedad relativa) y a una temperatura de 35 °C, que contengan granos partidos o que hayan sido atacados por insectos.

El ciclo larval dura unas 3 semanas y los adultos suelen vivir de 6 a 12 meses.

Para repasar el inventario así como ver fotografías y acceder a información práctica recomendamos un mini CD “*Plagas del arroz almacenado en España*” realizado por Pascual-Villalobos y Del Estal (2006).

1.5. MODOS DE ACCIÓN DE INSECTICIDAS. ACETILCOLINA EN INSECTOS.

El modo de acción de un insecticida se puede definir como la respuesta bioquímica y fisiológica de los organismos que esta asociada con la acción de los pesticidas.

En términos generales y considerando los modos de acción, los insecticidas se clasifican en siete grupos: tóxicos físicos, venenos protoplásmicos, venenos nerviosos, inhibidores metabólicos, toxinas citolíticas, venenos musculares y agentes alquilantes.

La mayoría de los pesticidas están hechos para seleccionar ciertos organismos y todos intervienen en el bloqueo de algunos procesos metabólicos; sin embargo es difícil determinar el modo de acción y en algunas ocasiones no se conoce, ya que ciertos insecticidas presentan más de un modo de acción, lo que dificulta su clasificación (Forgash, 1984).

Una clasificación más exhaustiva de los insecticidas según sus modos de acción viene dada en la siguiente tabla (IRAC España, 2007).

Tabla 1. Clasificación de los modos de acción de insecticidas y acaricidas (IRAC, 2007).

CLASIFICACIÓN DE MODOS DE ACCIÓN DE INSECTICIDAS/ACARICIDAS			
GRUPO	PUNTO DE ACCIÓN PRIMARIO	SUBGRUPO QUÍMICO	
		O MATERIA ACTIVA REPRESENTATIVA	EJEMPLOS DE MATERIAS ACTIVAS (Esp)
1A	Inhibidores de la acetilcolinesterasa	Carbamatos	Formetanato, metiocarb, oxamilo
1B		Organofosforados	Clorpirifos, dimetoato, fosmet
2B	Antagonistas del receptor GABA (canal cloro)	Fenilpirazoles	Fipronil
3	Moduladores del canal sodio	Piretroides/Piretrinas	Acrinatrín, deltametrín, bifentrín

4A	Agonistas/antagonistas del receptor de nicotínico de la acetilcolina	Neonicotinoides	Imidacloprid, acetamiprid,
5	Agonistas/antagonistas del receptor de nicotínico acetilcolina(no grupo 4)	Spinosines	Spinosad
6	Activador canal de cloro	Abamectina	Abamectina
7B	Miméticos de	Fenoxicarb	Fenoxicarb
7C	hormonas juveniles	Piriproxifén	Piriproxifén
8A	Compuestos de modo	Bromuro de metilo	Bromuro de metilo
8B	de acción desconocido	Cloropicrina	Cloropicrina
8C	o no específico (fumigantes)	Fluoruro de Sulfurilo	Fluoruro de sulfurilo
9B	Compuestos de modo	Pimetrocina	Pimetrocina
9C	de acción desconocido o no específico (bloqueadores selectivos de la alimentación)	Flonicamid	Flonicamid
10A	Compuestos de modo	Clofentezin/hexitiazol	clofentezín, hexitiazox
10B	de acción desconocido o no específico (inhibidores del crecimiento de ácaros)	Etoxazol	Etoxazol
11A1	Disruptores	B.t. var. Israelensis	B.t. var. Israelensis
11B1	microbianos de las	B.t. var. Aizawai	B.t. var. Aizawai
11B2	membranas digestivas	B.t. var. Kurstaki	B.t. var. Kurstaki
11C	(incluye cultivos transgénicos que expresan toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>)	B.t. var. tenebrionensis	B.t. var. Tenebrionensis

12B	Inhibidores de la fosforilación oxidativa,	Acaricidas orgánicos de estaño	Cihexaestan, fenbutaestan
12C	disruptores de la formación de ATP (Inhibidores de la síntesis de ATP)	Propargita	Propargita
15	Inhibidores de la síntesis de quitina, tipo 0, Lepidópteros	Benzoilureas	Diflubenzurón, flufenoxurón
16	Inhibidores de la síntesis de quitina tipo 1, Homópteros	Buprofezín	Buprofezín
17	Disruptores de la muda, Dípteros	Ciromazina	Ciromazina
18A	Disruptores/agonistas de la ecdisona	Diacilhidracinas	Metoxifenocida, tebufenocida
18B		Azadiractina	Azadiractina
20B	Inhibidores del transporte de electrones punto II	Acequinocil	Acequinocil
21	Inhibidores del transporte de electrones punto I	Acaricidas METI	Fenazaquin, piridabén
22A	Bloqueadores del canal sodio dependiente del voltaje	Indoxacarb	Indoxacarb
22B		Metaflumizona	Metaflumizona
23	Inhibidores de la síntesis de lípidos	Derivados del ácido tetrónico	Espirodiclofén, espiromesifén
24A	Inhibidores del transporte de electrones punto IV	Fosfuro de aluminio	Fosfuro de aluminio
24B		Cianida	Cianida
24C		Fosfina	Fosfina
25	Inhibidores neuronales (modo de acción desconocido)	Bifenazato	Bifenazato
26	Inhibidores de aconitasa	Fluoroacetato	Fluoroacetato
27A	Sinergistas	Inhibidores de la P450 oxidasa	Butóxido de piperonilo

28	Moduladores del receptor Rianodin	Diamidas	Clorantraniliprol, diamidas
Unc	Compuestos de modo de acción desconocido	Dicofol	Dicofol
Und		Piridalil	Piridalil
ns	Compuestos de modo de acción no específico (multi-site)		Azufre, sulfato de bario, aceites minerales, aceites vegetales

El modo de acción de algunos insecticidas, como los organofosforados y carbamatos es inhibiendo la acetilcolinesterasa (AChE) en las uniones sinápticas por fosforilación o carbamilación, cerca o en su centro activo (Bisset, 2002).

Los tratamientos con determinados compuestos naturales (Awde y Ryan, 1992) como los aceites esenciales o sus compuestos puros (Ryan y Byrne, 1988; Keane y Ryan, 1999;) pueden causar síntomas que señalan un modo de acción neurotóxico, incluyendo hiperactividad, convulsiones y temblores seguido por parálisis (“Knock-down”), los cuales son muy similares a los producidos por insecticidas tales como los organofosforados y carbamatos (Kostyukovsky *et al.*, 2002).

La enzima acetilcolinesterasa, también llamada Colinesterasa de glóbulo rojo (CGR), colinesterasa eritrocítica, o acetilcolina acetilhidrolasa, se encuentra principalmente en sangre y sinapsis nerviosas. Cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina sobrante en el espacio sináptico en colina y ácido acético. Esta reacción es necesaria para permitir que la neurona colinérgica retorne a su estado de reposo después de la activación, evitando así una transmisión excesiva de acetilcolina que produciría una sobreestimulación del músculo y como consecuencia, debilidad y cansancio.

Muchos compuestos hidrofóbicos incitan la desactivación de proteínas y la inhibición enzimática, y la acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima que es particularmente susceptible a la inhibición hidrofóbica (Ryan *et al.*, 1992).

Los inhibidores de la colinesterasa se conocen como anticolinesterásicos, y debido a la función esencial de esta enzima, los productos químicos que interfieren con la acción de la colinesterasa son potentes neurotoxinas.

La acetilcolinesterasa en insectos ha sido menos estudiada que en los vertebrados a pesar de que el sistema nervioso en los invertebrados es menos complejo.

El sistema nervioso completo de los insectos comprende tres entidades estructurales: el sistema nervioso central, el sistema nervioso visceral y el sistema nervioso periférico.

En los insectos, el sistema nervioso central comprende el cerebro y los ganglios extracerebrales que incluyen aquellos en la cadena ventral; las propiedades de memoria, razonamiento e inteligencia son limitadas en insectos.

El sistema nervioso visceral, denominado también sistema simpático regula las funciones de la vida vegetativa y normalmente suele ir asociado con el tracto digestivo y el sistema nervioso periférico está formado por todos los nervios que irradian de los centros ganglionares de los sistemas nerviosos central y simpático.

Los insectos presentan células neurosecretorias localizadas en varias partes del cerebro con función endocrina, aunque, con excepción de su papel en la muda y metamorfosis, se conoce poco acerca de su actividad (Hickman *et al.*, 1990).

Cuando la acetilcolinesterasa es inhibida en insectos, las concentraciones sinápticas de acetilcolina aumentan entonces y ocurre una hiperexcitación del sistema nervioso central, donde están ubicadas virtualmente todas las sinapsis colinérgicas (Bloomquist, 1999).

En la figura 31 se muestra la acción de los insecticidas en los receptores sinápticos.

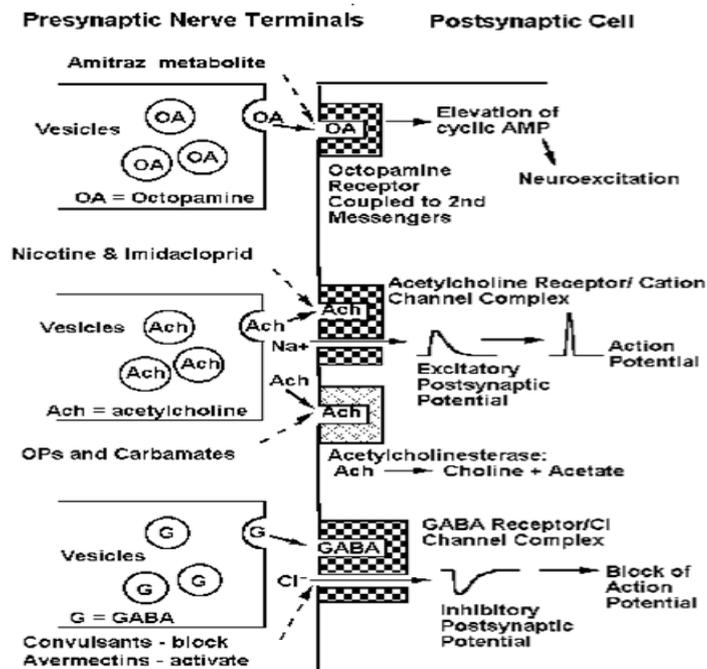


Figura 31. Acción de los insecticidas en los receptores sinápticos.

Cuando hablamos de inhibidores enzimáticos es necesario diferenciar entre cuatro tipos principales de inhibición reversible, competitivos (el inhibidor se une a la enzima), acompetitivos (el inhibidor se une a la enzima en un punto diferente al centro activo, pero sólo en el caso de que ésta esté unida al sustrato), mixto (puede combinarse tanto con la enzima libre como con el complejo enzima-sustrato sin afectar al sitio activo de la enzima), no competitiva (es similar a la inhibición mixta, pero en este caso ambas reacciones de inhibición están igual de favorecidas) (Rawn, 1989).

También es posible una inhibición mixta donde el inhibidor se una covalentemente a la enzima y la inactive de manera irreversible, como es el caso de la mayoría de organofosforados.

1.6. RESISTENCIA DE INSECTOS A INSECTICIDAS Y MECANISMOS IMPLICADOS.

Una definición general de resistencia viene dada por el *Insecticide Resistance Action Committee* (IRAC) que define la resistencia a insecticidas como la reducción en la sensibilidad de una población que se refleja en repetidos fallos de un producto que baja sus expectativas de control al ser usado a la dosis recomendada para la plaga determinada y donde los problemas de almacenamiento del producto, aplicación y factores climáticos poco frecuentes pueden ser eliminados.

Existen diferentes tipos de resistencias (Silva, 2003):

-Resistencia cruzada y múltiple: se produce resistencia a un grupo de compuestos tóxicos no necesariamente relacionados entre sí.

-Resistencia cruzada: una población de insectos adquiere resistencia a un grupo de insecticidas que aun no habiendo sido aplicados tienen un mecanismo de resistencia común.

-Resistencia múltiple: una población adquiere resistencia a varios insecticidas, tanto aquellos que han sido aplicados, como a otros que no han sido aplicados ya sean de diferentes grupos químicos o modos de acción.

-Resistencia cruzada negativa: se presenta cuando una población que ha adquirido resistencia a un insecticida, regresa a una susceptibilidad cercana a la original,

como consecuencia de la aplicación de otro insecticida que es toxicológicamente diferente.

Como bien señala Bielza (2005), hay algunas especies de plagas que tienen mayor tendencia a desarrollar resistencias, como son por ejemplo las especies polífagas, de rápido desarrollo y muchas generaciones, con mucha progenie y movilidad efectiva baja.

A diferencia de ciertos caracteres morfológicos los cuales requieran miles de años de selección, la resistencia a insecticidas evoluciona de forma relativamente rápida y es principalmente un fenómeno bioquímico.

La figura 32 muestra la secuencia en el desarrollo de la resistencia a plaguicidas.

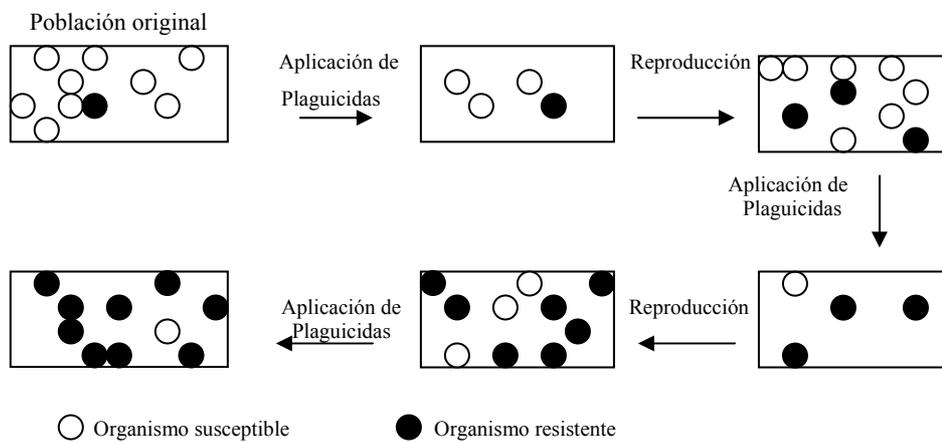


Figura 32. Secuencia en el desarrollo de la resistencia a plaguicidas (Hruska *et al.*, 1977).

La resistencia en plagas de almacén tales como *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Cucujidae), *Rhyzopertha dominica* o *Cryptolestes ferrugineus* por determinados insecticidas como los organofosforados, piretrinas o fosfinas ha sido publicada en la literatura (Collins, 1998).

Heather (1986) encontró una alta resistencia de *Sitophilus oryzae* a piretroides en laboratorio, demostrando que estas especies también tienen alto potencial para desarrollar resistencia. Asimismo Nayak *et al.* (2003) observaron resistencia a fosfina para este insecto.

La aparición de resistencias a insecticidas conlleva un gasto económico muy elevado aunque este no es el problema principal ni el más importante ya que constituye un inconveniente especialmente grave al promover un mayor número de tratamientos

y/o incremento de las dosis aplicadas (Torres-Vila, 2005), y una mayor contaminación ambiental.

La mayoría de insecticidas vegetales son extractos constituidos por un grupo de compuestos activos de diversa naturaleza química que difícilmente se encontrarán en las mismas concentraciones por lo que la presión de selección sobre la plaga no será siempre la misma, es decir, en general los insectos tardarán más en desarrollar resistencia a una mezcla de compuestos activos que a cualesquiera de sus componentes por separado (Silva, 2003).

Según Miller (1988), los mecanismos de resistencia a insecticidas se clasifican en 4 categorías:

1. Resistencia por comportamiento: el insecto no entra en contacto con el depósito del insecticida.
2. Resistencia a la penetración: donde la composición del exoesqueleto llega a ser modificada inhibiendo la penetración del insecticida.
3. Sitio insensible: el sitio químico de acción para el insecticida se modifica reduciendo la sensibilidad a la forma activa del insecticida.
4. Resistencia metabólica: la vía metabólica del insecto llega a ser modificada detoxificándose el insecticida o negando el metabolismo del compuesto aplicado en su forma tóxica. La forma más importante de resistencia metabólica incluye la multifunción oxidasa, las glutatión *S*-transferasas y las esterasas.

En los insectos los mecanismos más importantes son el sitio insensible y la resistencia metabólica. La resistencia fisiológica puede ser vista como resultado de una interacción de estos factores e incluye penetración disminuida, secuestro y excreción.

Para estudiar el papel de los mecanismos metabólicos en la resistencia se utilizan sinergistas con el fin de bloquear los sistemas específicos de enzimas que intervienen en la selección de resistencia y en las generaciones susceptibles.

Los sinergistas utilizados son PBO (butóxido de piperonilo) como inhibidor específico de P-450 monooxigenasa (Hodgson, 1999), DEF (*S,S,S*-tributilfosforotritioato) como inhibidor de esterasas (Jang *et al.*, 1992) y DEM (dietil maleato) como inhibidor de glutatión *S*-transferasas (Mulder y Ouwerkerk-Mahadevan, 1997).

Las oxidasas de función múltiple del retículo endoplasmático liso se encuentran en la fracción microsomal de las células. Entre las reacciones fundamentales aparecen las oxidaciones microsomales que requieren del oxígeno molecular y de la coenzima NADPH. Está comprobado que este sistema hidroxilante contiene, además del NADPH, una flavoproteína, una ferroproteína y un citocromo especializado, el citocromo P-450, el cual está implicado en muchos casos de resistencia metabólica a carbamatos y también detoxifican insecticidas organofosforados, piretroides y DDT entre otros (Casida, 1970).

Las esterasas son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis de ésteres carboxílicos (carboxiesterasas), amidas (amidases), ésteres de fosfato (fosfatasas), etc. Tanto insecticidas tipo como los organofosforados o los carbamatos tienen estructura química de ésteres y podrían ser, teóricamente, hidrolizados por estas enzimas. Hay diversos tipos de enzimas esterasas y con muy diferente distribución en tejidos y organismos. Las carboxiesterasas (esterasas tipo B): son un grupo de esterasas que en mamíferos hidrolizan, además de muchos compuestos endógenos, a xenobióticos con grupos éster, amida, tioéster, ésteres de fosfato (paratión, paraoxón) y anhídridos de ácido. En las esterasas A, los organofosforados interaccionan con el grupo funcional -SH y forman un enlace P=S que es fácilmente hidrolizado por H₂O. En las esterasas B, la interacción de los organofosforados con el -OH, forma un enlace P=O que no es hidrolizado por H₂O. Los organofosforados que se unen estequiométricamente a las esterasas B inhiben su actividad enzimática (Fournier *et al.*, 1987; Villani y Hemingway, 1987).

La glutatión *S*-transferasa tiene gran importancia en la detoxificación metabólica en todos los animales y son conocidas por estar involucradas en la resistencia de los insectos a insecticidas organofosforados. Se clasifican según la reacción que catalicen, así encontramos alquil, aril y epoxitransferasas (Terriere, 1984).

El estudio de los mecanismos de resistencia, nos brinda la posibilidad de elegir un insecticida alternativo en el que no esté implicado ese mecanismo de resistencia y así proporcionar la base para la selección de insecticidas que deban usarse en rotaciones o mezclas de insecticidas (Jensen, 2000).



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

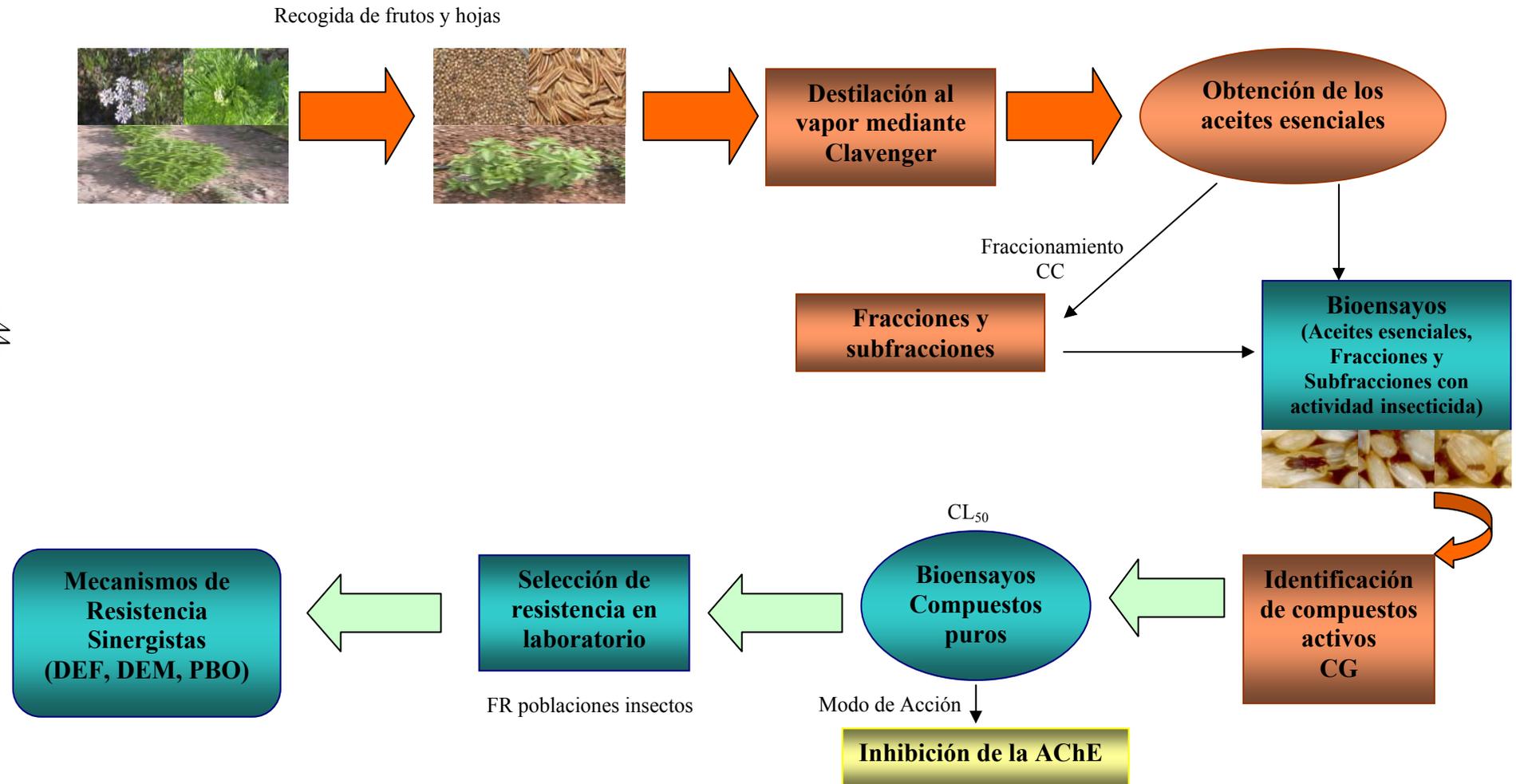
Los tratamientos llevados a cabo en el arroz almacenado conllevan efectos negativos ya sea dejando residuos tóxicos en el arroz o con la aparición de resistencias por parte de las plagas. Por este motivo en este trabajo se ha querido plantear como objetivo general, realizar un estudio en profundidad de algunos metabolitos secundarios, concretamente de monoterpenoides, extraídos de las plantas, *Coriandrum sativum*, *Carum carvii* y *Ocimum basilicum*, y ensayar su potencial como insecticidas en tres plagas de almacén de arroz, *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*.

Para abordar este fin nos propusimos los siguientes objetivos específicos.

- Obtener fracciones y subfracciones de diferentes aceites esenciales extraídos de tres plantas (*C. sativum*, *C. carvii* y *O. basilicum*) condimentarias.
- Examinar la actividad plaguicida de los aceites esenciales y de sus diferentes fracciones sobre tres plagas de almacén del arroz (*S. oryzae*, *R. dominica* y *C. pusillus*).
- Identificar compuestos activos.
- Estudiar la inhibición de la acetilcolinesterasa como un posible modo de acción de estos monoterpenoides en los insectos.
- Intentar seleccionar resistencia en laboratorio a cada monoterpenoide así como estudiar diferentes mecanismos de resistencia que pudieran estar implicados en las tres plagas.
- Determinar residuos de monoterpenoides en el arroz.

El plan de trabajo se ha representado esquemáticamente en la Figura 33.

Figura 33. Plan de trabajo.





MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. FRACCIONAMIENTO DE ACEITES ESENCIALES DE ORIGEN VEGETAL.

3.1.1. Material vegetal y obtención de aceites esenciales.

Las especies vegetales empleadas en este estudio fueron *Coriandrum sativum* L. (Umbelliferae), *Carum carvii* (Umbelliferae) y *Ocimum basilicum* L. (Labiatae). El origen de las semillas se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Origen del material vegetal.

Espe cie	Variedad	Banco de germoplasma o Universidad
<i>C. sativum</i>	microcarpum	Universidad de Göttingen (Alemania)
<i>C. carvii</i>	karzo	CPRO-DLO, Wageningen (Holanda)
<i>O. basilicum</i>	PI170579 USDA (OB7 IMIDA)	U.S. National Plant Germplasm System
<i>O. basilicum</i>	PI170581 USDA (OB8 IMIDA)	U.S. National Plant Germplasm System
<i>O. basilicum</i>	PI207498 USDA (OB17 IMIDA)	U.S. National Plant Germplasm System
<i>O. basilicum</i>	PI358467 USDA (OB25 IMIDA)	U.S. National Plant Germplasm System
<i>O. basilicum</i>	PI414200 USDA (OB43 IMIDA)	U.S. National Plant Germplasm System

Las semillas fueron sembradas en la finca experimental “Torreblanca” perteneciente al IMIDA. Dicha finca está ubicada en el Campo de Cartagena (Murcia) a 37°47’ de Latitud Norte, 0°53’ de Longitud Oeste y a 45 metros sobre el nivel del mar.

Se sembraron en febrero de 2003, en filas pareadas separadas 1,2 m. a una dosis de 1 g/m². Se regaron por goteo (recibiendo una dosis total de 200 mm de agua) hasta el momento de la recolección de los frutos y hojas.

No se llevaron a cabo tratamientos fitosanitarios ni abonado en las parcelas durante el cultivo.

Las semillas de *C. sativum* y *C. carvii* fueron recolectadas cuando los frutos estuvieron maduros (septiembre) y almacenadas hasta realizar su destilación.

Las hojas frescas de las diferentes variedades de *Ocimum basilicum*, OB7 (PI170579 USDA), OB8 (PI170581 USDA), OB17 (PI207498 USDA), OB25 (PI358467 USDA) y OB43 (PI414200 USDA) fueron recolectadas cuando las plantas se encontraban en floración y destiladas inmediatamente.

El aceite esencial se conservó en viales de cristal de color ámbar en el interior de una nevera (a 4 °C) hasta el momento de ser fraccionados.

En las fotos 7, 8 y 9 se muestran fotografías de las plantas.



Foto 7. *Coriandrum sativum*.



Foto 8. *Carum carvii*.



Foto 9. *Ocimum basilicum*.

Para la obtención de los aceites esenciales se realizaron destilaciones al vapor utilizando un aparato tipo Clavenger.

El aceite esencial de coriandro y alcaravea se extrajo a partir de las semillas de estas plantas mientras que el aceite esencial de las diferentes variedades de albahaca fue extraído de las hojas en fresco.

Se realizaron sucesivas destilaciones al vapor, en las que se colocaba en un matraz unos 250 gramos de frutos o de hojas, según destiláramos coriandro, alcaravea o albahaca, junto con unos 250 ml de agua destilada. El punto de ebullición del agua era alcanzado gracias al calor suministrado por una manta calefactora, y de esta manera el vapor de agua iba arrastrando los compuestos más volátiles. Finalmente se recogió el aceite esencial y se separó del agua utilizando sulfato sódico anhidro.

Las fotos 10, 11 y 12 muestran el material del que se partió para extraer el aceite esencial.



Foto 10. Frutos de *Coriandrum sativum*



Foto 11. Frutos de *Carum carvii*.



Foto 12. Hojas de *Ocimum basilicum*.

3.1.2. Cromatografía en columna.

A continuación se procedió al fraccionamiento del aceite esencial para trabajar con compuestos aislados o con mezclas simples en lugar de con mezclas muy complejas.

Este fraccionamiento se realizó mediante una cromatografía de adsorción, donde se utilizó una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. Así el soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas siendo necesaria la presencia de un disolvente (o mezcla de disolventes) para que exista una triple interacción entre soluto,

disolvente y adsorbente, pues éste es el fundamento de la separación de las moléculas de soluto.

De los diferentes tipos de cromatografía de adsorción conocidos, utilizamos la cromatografía en columna en fase directa y la cromatografía en capa fina.

Los primeros fraccionamientos de todos los aceites esenciales se realizaron en una columna cromatográfica (CC) de 500 mm de longitud y 30 mm de diámetro interno (Φ), rellena de sílice (Sílice Merck 7734, tamaño de partícula 0,063-0,200 mm) y eluyendo con los disolventes puros y mezclas de estos para conseguir la polaridad adecuada.

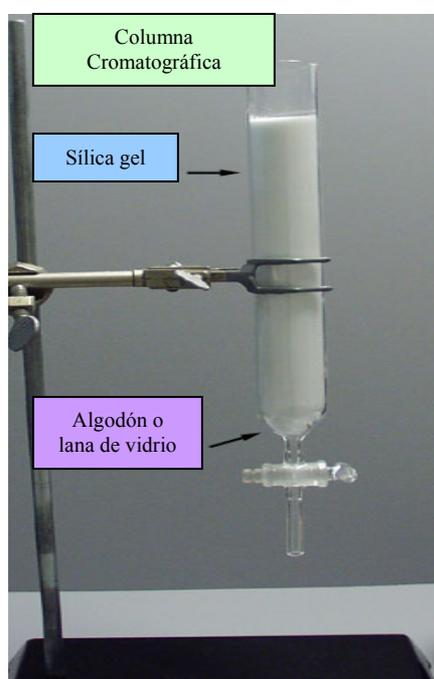


Foto 13. Columna cromatográfica.

Para el aceite esencial de coriandro se comenzó eluyendo por la columna el disolvente menos polar, el hexano 100 %, y progresivamente se iba aumentando la polaridad con una mezcla de hexano/diclorometano 50:50 inicialmente, seguido de mezclas de diclorometano/acetato de etilo 60:40 y acetato de etilo/etanol 50:50.

Una de las fracciones (F5C) fue subfraccionada utilizando una columna de las mismas dimensiones antes descritas y rellena de sílice (Sílice Merck 7734, tamaño de partícula 0,063-0,200 mm) y eluyendo progresivamente con disolventes de menor

polaridad a mayor polaridad (diclorometano 100%; diclorometano/acetato de etilo 90:10; diclorometano/acetato de etilo 75:25; diclorometano/acetato de etilo 50:50; diclorometano/acetato de etilo 25:75; acetato de etilo 100%).

Para el aceite esencial de alcaravea se comenzó eluyendo por la columna el disolvente menos polar, el hexano 100 %, y progresivamente se iba aumentando la polaridad con una mezcla de hexano/éter etílico 90:10, hexano/éter etílico 75:25, hexano/éter etílico 50:50, hexano/éter etílico 25:75, éter etílico 100%, éter etílico/acetato de etilo 75:25, éter etílico/acetato de etilo 50:50, éter etílico/acetato de etilo 25:75, acetato de etilo 100%, acetato de etilo/etanol 75:25, acetato de etilo/etanol 50:50, acetato de etilo/etanol 25:75 y finalmente etanol 100%.

Las fracciones F2A y F5A fueron subfraccionadas utilizando una columna de 500 mm de longitud y 15 mm de diámetro interno (Φ) y rellena de sílice (Sílice Merck 9385, tamaño de partícula 0,040-0,063 mm), mientras que para recromatografiar la fracción F6A se utilizó una columna de 500 mm de longitud y 30 mm de diámetro interno (Φ), rellena de sílice (Sílice Merck 7734, tamaño de partícula 0,063-0,200 mm).

Los disolventes empleados como eluyentes en el subfraccionamiento de F2A fueron hexano 100%, hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100% y diclorometano/acetato de etilo 50:50.

Los disolventes utilizados como eluyentes en el subfraccionamiento de F5A fueron hexano 100%, hexano/diclorometano 90:10, hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100%, diclorometano/acetato de etilo 50:50.

Los disolventes utilizados como eluyentes en el subfraccionamiento de F6A fueron hexano 100%, hexano/diclorometano 90:10, hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100%, diclorometano/acetato de etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75 y acetato de etilo 100%.

Para fraccionar los aceites esenciales de albahaca se seleccionaron una serie de variedades que correspondían a un perfil químico diferente. Los fraccionamientos

llevados a cabo para cada una de las variedades de albahaca seleccionadas fueron una mezcla de OB7 y OB8, OB17, OB25 y OB43.

Los fraccionamientos de la mezcla OB7-OB8, OB17 y OB25 se realizaron en una columna cromatográfica (CC) de 500 mm de longitud y 30 mm de diámetro interno (Φ), rellena de sílice (Sílice Merck 7734, tamaño de partícula 0,063-0,200 mm) y eluyendo con los disolventes puros y mezclas de estos para conseguir la polaridad adecuada, siempre comenzando por el disolvente menos polar y aumentando la polaridad gradualmente (Hexano 100 %, hexano/diclorometano 90:10, hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100 %, diclorometano/acetato de etilo 90:10, diclorometano/acetato de etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75, acetato de etilo 100 %, acetato de etilo/etanol 75:25, acetato de etilo/etanol 50:50, acetato de etilo/etanol 25:75 y etanol 100 %).

Una de las fracciones (F2B17) fue subfraccionada utilizando cromatografía en columna (CC) rellena de sílice (Sílice Merck 7734, tamaño de partícula 0,063-0,200 mm) y eluyendo con los disolventes de adecuada polaridad (hexano 100%; hexano/diclorometano 90:10; hexano/diclorometano 75:25; hexano/diclorometano 50:50; hexano/diclorometano 25:75 y diclorometano 100%).

El fraccionamiento de OB43 también fue llevado a cabo con columna cromatográfica rellena de sílice (Sílice Merck 7734, tamaño de partícula 0,063-0,200 mm) y eluyendo con los disolventes de menos polaridad a mayor polaridad (hexano 100%, hex/diclorometano 75:25, hex/diclorometano 50:50, hex/diclorometano 25:75, diclorometano 100%, diclorometano/acetato de etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75, acetato de etilo 100%, acetato de etilo/etanol 50:50, acetato de etilo/etanol 25:75 y etanol 100%).

3.1.3. Reagrupación de fracciones utilizando cromatografía en capa fina.

Desde la columna cromatográfica se iban recogiendo todas las fracciones en tubos a los cuales posteriormente se les hacía un seguimiento en cromatografía en capa fina con revelador de luz ultravioleta a 250 nm, ya que estos compuestos fraccionados

son invisibles a simple vista pero son visibles con luz ultravioleta a una determinada longitud de onda.

Los cromatofolios utilizados tenían una longitud de 8 cm y los disolventes utilizados para correr las capas finas fueron el acetato de etilo para las todas las fracciones y una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (1:1).

De esta manera los tubos que mostraban en capa fina el mismo patrón o perfil podían agruparse formando la fracción con la que se realizaban los bioensayos.

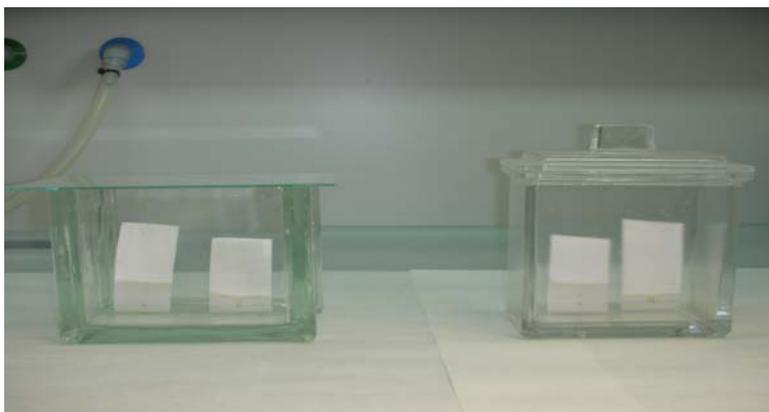


Foto 14. Cubetas para revelar las placas de cromatografía en capa fina.



Foto 15. Placa de cromatografía en capa fina.

De esta manera, finalmente, se tenían todas las fracciones agrupadas según su perfil químico y se podía realizar los bioensayos de actividad insecticida.

Según los resultados obtenidos de estos bioensayos se procedía seguidamente a subfraccionar aquellas fracciones que resultaban activas y con las que se contaba con una cantidad importante para poder volver a repetir el proceso.

3.2. BIOENSAYO DE ACTIVIDAD INSECTICIDA VOLÁTIL.

3.2.1. Crías de insectos.

Las tres especies de insectos objeto de nuestro estudio fueron *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* Fabricius (Coleoptera: Curculionidae), y *Cryptolestes pusillus* Schönherr (Coleoptera: Cucujidae).

Sitophilus oryzae y *Rhyzopertha dominica* fueron mantenidos sobre un sustrato de granos de arroz humedecido previamente (aproximadamente unos 10 ml de agua destilada en 130 gramos de arroz para *S. oryzae* y 5 ml de agua destilada en 130 gramos de arroz para *R. dominica*).



Foto 16. Crías de *Sitophilus oryzae*.



Foto 17. Crías de *Rhyzopertha dominica*.

Mientras que *Cryptolestes pusillus* fue mantenido sobre una dieta de harina blanca de trigo y levadura de cerveza al 5 % (95 gramos de harina blanca de trigo y 5 gramos de levadura de cerveza).



Foto 18. Crías de *Cryptolestes pusillus*.

Todas las crías fueron mantenidas en el interior de una cámara de cultivo (Sanyo MLR-350HT) a temperatura constante de 30 °C, 65 % de humedad relativa y oscuridad.



Foto 19. Cámara de cultivo (Sanyo MLR-350HT).

3.2.2. Bioensayo.

Se realizaron los bioensayos de actividad de los aceites esenciales de *Coriandrum sativum*, *Carum carvii* y *Ocimum basilicum* junto con sus fracciones y subfracciones.

En viales de cristal de 4 ml se colocaba un disco de papel de filtro de 2cm, en el cual se aplicaba una dosis de 1µl del aceite esencial, fracción o subfracción a ensayar. Este vial estaba en el interior de otro vial de mayor tamaño (15ml) tapado con un tapón de rosca, junto con 10 insectos de la especie a tratar (*S. oryzae*, *R. dominica* o *C. pusillus*). El control se realizó de la misma manera pero sin aplicación del bioinsecticida. Los viales fueron mantenidos en una cámara de cultivo (Sanyo MLR-350HT) a 30 °C, 65 % de humedad relativa y oscuridad. Se realizaron tres repeticiones por muestra y se anotó la mortalidad tanto a las 2 horas de realizar el bioensayo como a las 24 horas y así se estimó que fracciones o subfracciones tenían actividad insecticida.

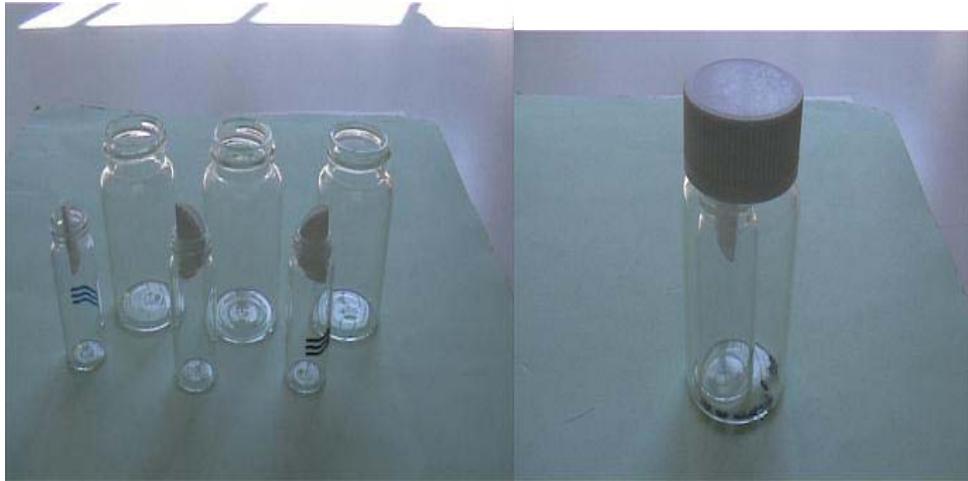


Foto 20. Detalle del bioensayo de actividad volátil.

Para *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus* el bioensayo mostraba la actividad insecticida volátil, mientras que en *Sitophilus oryzae* debido a que este insecto era capaz de alcanzar el disco de papel de filtro donde estaba depositado el aceite esencial, su fracción o su subfracción, se consideró que junto a la actividad volátil también se podría estar midiendo cierta acción tóxica por contacto o por ingestión.

Junto con estos bioensayos se realizaron también bioensayos control (sin producto) y los correspondientes a los disolventes que se habían utilizado para redissolver algunas de las fracciones (hexano y acetona) para descartar cualquier efecto negativo de los mismos.

La media y el error estándar de la media fueron calculados gracias al programa estadístico SPSS.

3.2.3. Análisis Probit.

La palabra Probit viene de la contracción de probability unit, aunque no son unidades de probabilidad sino de desviación estándar aumentadas en cinco para evitar el uso de números negativos.

Este análisis expresa la concentración o tiempo requerido para matar a un porcentaje establecido de insectos que se han ensayado (Thorne *et al.*, 1995).

Para obtener finalmente una línea recta es necesario en primer lugar transformar la dosis a la función \log_{10} dosis y de este modo conseguir una línea sigmoide y a continuación transformar ésta a unidades Probit.

Los datos que se obtienen de este análisis estadístico son las concentraciones letales: CL_{50} , CL_{95} etc., la pendiente y la ordenada en el origen de la recta y finalmente χ^2 (el test estadístico que compara los valores “observados” con los “esperados”).

Estos cálculos estadísticos se realizaron con el software POLO-PLUS (LeOra Software).

3.3. CROMATOGRAFÍA DE GASES-MASAS.

Los aceites esenciales, las fracciones y subfracciones fueron analizadas por cromatografía de gases (CG) empleando un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard 5890) y un espectrómetro de masas como detector (Hewlett-Packard Model 5972). La

columna empleada fue una cross-linked phenyl-methyl siloxane (HP-5MS 30m x 0.25 mm x 250 μ m), usando He como gas portador a presión constante con un flujo de 1ml/min.

Las condiciones operativas fueron: la temperatura del inyector a 250°C, la temperatura inicial del horno fue de 60°C durante 4 min. y fue subiendo gradualmente 3°C hasta llegar a 240°C.



Foto 21. Cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas.

Para la identificación de los compuestos, los aceites esenciales completos así como las fracciones y subfracciones activas fueron analizados por un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG/EM) que operó a las mismas condiciones y con idéntica columna al cromatógrafo de gases anteriormente descrito.

La ionización se produjo por impacto electrónico, E.I, a 70 eV. El barrido de masas fue de 45 a 500 u.m.a. La velocidad del barrido fue de 3,21 scan/seg.

Los picos individuales fueron identificados por tiempos de retención e índices de retención (relativo a C₆-C₇ n-alcenos) comparándolos con componentes estándar disponibles comercialmente (Acros Organics BUBA/SPRL, Fischer Scientific S.A. y Sigma Aldrich Química S.A.) y por comparación de espectros de masas, usando librería de compuestos y por los espectros de los estándares.

Los porcentajes de composición de las muestras fueron calculados de acuerdo al área de los picos cromatográficos.

La identificación de cada pico es inequívoca según su espectro de masas (ver Figura 34).

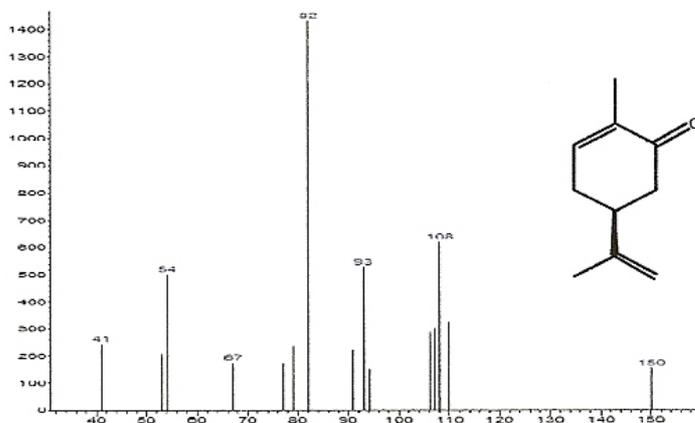


Figura 34. Espectro de masas de *S*-(+)-Carvona.

Además, se pretendió llevar a cabo un análisis más exhaustivo de lo descrito. Para ello se realizó la cuantificación de algunos de los compuestos identificados en los aceites, fracciones y subfracciones. La elección de estos compuestos vino determinada por la abundancia e importancia potencial como insecticida de estos componentes en los aceites esenciales estudiados.

Los compuestos cuantificados fueron los siguientes:

- Linalol
- Geraniol
- Alcanfor
- *E*-Anetol
- Fenchona
- γ -Terpineno
- Estragol
- *S*-(+)-Carvona
- Limoneno
- Eugenol
- Metil Eugenol

La cuantificación de estos compuestos fue llevada a cabo mediante cromatografía de gases (CG) empleando un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard 5890) y un espectrómetro de masas como detector (Hewlett-Packard Model 5972). La columna empleada fue una cross-linked phenyl-methyl siloxane (HP-5MS 30 m x 0,25 mm x 250 μ m), usando He como gas portador a presión constante con un flujo de 1 ml/min.

Las condiciones operativas fueron: la temperatura del inyector a 250 °C, la temperatura inicial del horno fue de 60 °C durante 4 min y fue subiendo gradualmente 3 °C hasta llegar a 240 °C.

Las rectas de calibrado para cada componente fueron representadas por 7 concentraciones diferentes que abarcaban todo rango de concentraciones, y su área correspondiente. Para cada monoterpenoide las concentraciones utilizadas para la recta de calibrado fueron diferentes, y fueron las correspondientes a la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de monoterpenoides seleccionadas para realizar la recta de calibrado.

	ppm										
	Linalol	Geraniol	Alcanfor	<i>E</i> -Anetol	Fenchona	γ -Terpineno	Estragol	<i>S</i> -Carvona	Limoneno	Eugenol	Metil Eugenol
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	100	10	10	10	10	1	1	10	10	1	10
3	500	50	100	100	100	10	10	100	100	10	50
4	1000	100	500	200	200	100	100	1000	500	50	100
5	2000	200	1000	500	500	500	200	1500	1000	100	200
6	3000	400	2000	1000	1000	1000	500	2000	2000	150	500
7	4000	500	2500	2000	1500	1500	1000	2500	3000	200	1000

A partir de las áreas obtenidas se realizó una recta de calibrado donde se obtuvieron la ordenada en el origen, la pendiente y el coeficiente de regresión para cada monoterpenoide y gracias a ésto se cuantificaron cada uno de estos componentes en los aceites esenciales, fracciones y subfracciones.

3.4. MONOTERPENOIDES PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS BIOQUÍMICOS.

Se seleccionaron una serie de monoterpenoides a partir de los análisis de identificación realizados a los aceites esenciales, fracciones y subfracciones para realizar un estudio de mecanismos bioquímicos implicados tanto en el modo de acción de estos insecticidas naturales como en el mecanismo de resistencia en insectos.

Previamente a estos estudios de mecanismos bioquímicos se realizó un estudio de toxicidad volátil de estos monoterpenoides para determinar la CL_{50} .

Estos monoterpenoides representaban los compuestos mayoritarios en las fracciones y subfracciones con alta actividad insecticida.

Los monoterpenoides seleccionados fueron linalol, geraniol, fenchona, γ -terpineno, *S*-carvona, *E*-anetol, estragol y alcanfor que fueron obtenidos de Aldrich Co (UK).

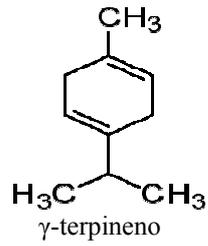
Los bioensayos se realizaron de la misma manera descrita en el apartado 3.2.2, pero en lugar de aplicar 1 μ l de las fracciones o subfracciones se aplicó diferentes concentraciones preparadas en acetona de cada uno de los monoterpenoides (4 concentraciones distintas para *Sitophilus oryzae* y *Rhyzopertha dominica*, y tres concentraciones para *Cryptolestes pusillus*).

Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y la mortalidad se observó a las 24 horas.

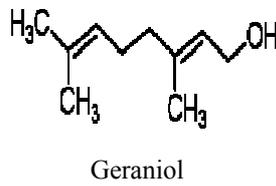
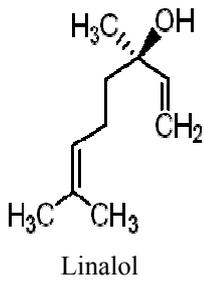
Los datos fueron analizados usando el programa POLO-PLUS para análisis Probit y fueron corregidos para la mortalidad observada en el control. Las concentraciones letales, CL_{50} y CL_{95} fueron calculadas con límites de confianza del 95 %.

En la figura 35 se muestran las estructuras químicas de los monoterpenoides estudiados.

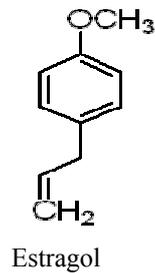
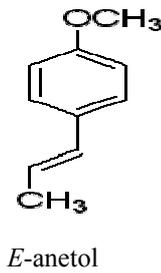
□ **Hidrocarburos:**



□ **Alcoholes:**



□ **Éteres:**



□ **Cetonas:**

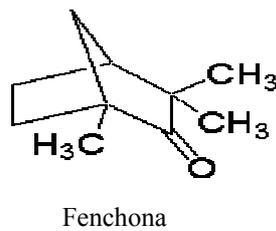
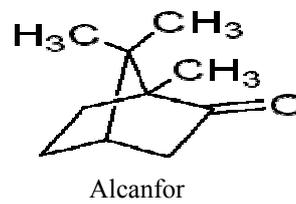
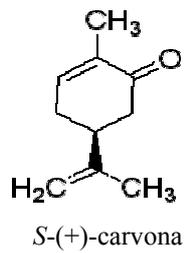


Figura 35. Monoterpenoides estudiados (estructuras según Ikan, 1991).

3.5. INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA. MÉTODO ELLMAN.

Para el estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa se siguió el método de Ellman (Ellman *et al.*, 1961).

Se ensayó la inhibición que provocan 8 monoterpenoides (linalol, geraniol, fenchona, γ -terpineno, *S*-carvona, *E*-anetol, estragol y alcanfor) sobre la enzima acetilcolinesterasa.

Se utilizó como sustrato el ioduro de acetiltiocolina (AcTCh) que por hidrólisis enzimática forma un mercaptano. Este mercaptano, en presencia del ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB) da lugar a dos compuestos; uno de ellos, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, es un cromóforo de intenso color amarillo que presenta su máximo de absorción a 412 nm.

Para medir el color se utilizó un espectrofotómetro uv-visible PharmaSpec uv-1700 Shimadzu.

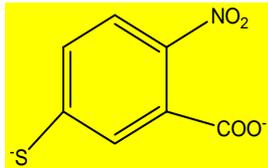
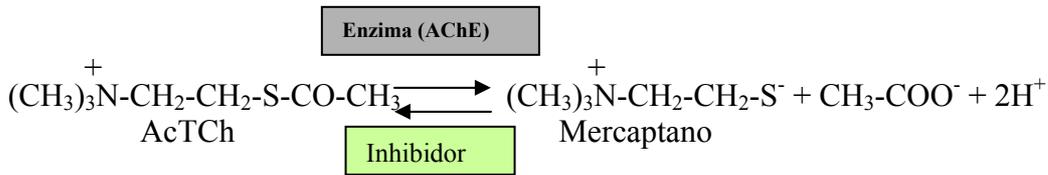
Cada cubeta contenía 1 ml de solución terpénica, 40 μ l de sustrato, 200 μ l de DTNB y 100 μ l de enzima.

Se midió en el espectrofotómetro con cubetas de cuarzo a 25 °C y 412 nm y se tomaron las medidas cada minuto durante 15 minutos desde el inicio de la reacción.

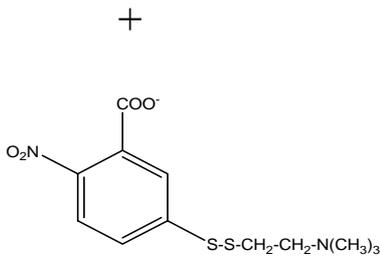
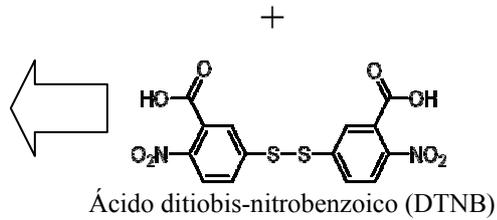
Los blancos se realizaron con disolvente (tampón fosfato a pH=8) en lugar de la disolución terpénica para comprobar que el etanol no estaba inhibiendo. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Todos los monoterpenos fueron obtenidos de Acros Organics y Sigma Aldrich Química S.A. El ioduro de acetiltiocolina (AcTCh), el DTNB, la buffer fosfato (pH=7,5, 0,1 M) y la acetilcolinesterasa (electric eel) fueron suministradas por Sigma Aldrich química S.A.

La reacción que tiene lugar es:



Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
Cromóforo
 $\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$



Los resultados obtenidos de este estudio se han interpretado por medio de gráficos donde se representaba el porcentaje de inhibición frente al tiempo, también se representaron curvas donde aparece la evolución de la concentración de sustrato. Para mayor conveniencia se linealizó la ecuación de Michaelis-Menten mediante Lineaweaver-Burk y con las inversas de la concentración de inhibidor se pudo calcular las constantes de inhibición.

3.6. SELECCIÓN DE RESISTENCIA EN LABORATORIO A CADA MONOTERPENOIDE EN *SITOPHILUS ORYZAE*, *RHYZOPERTHA DOMINICA* Y *CRYPTOLESTES PUSILLUS*.

Se intentó llevar a cabo una selección de resistencia en laboratorio a cada uno de los siguientes monoterpenoides, linalol, alcanfor, γ -terpineno, *E*-anetol, fenchona, estragol, *S*-carvona y geraniol, en *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*.

Para calcular la CL_{50} de la primera generación resistente seleccionada se procedió de igual modo a lo descrito en el apartado 3.4 donde diferentes concentraciones de cada monoterpenoide se aplicaban a los insectos para obtener una mortalidad que abarcara desde el 20 % al 80 %.

Los bioensayos se realizaron de manera similar a los descritos en el apartado 3.2.2 aplicando las dosis en un disco de filtro de 2 cm que se introducía en un vial de 4 ml. Éste a su vez se volvía a introducir en otro vial mayor, de 15 ml donde se encontraban 10 insectos para cada una de las plagas estudiadas. A las 24 horas se observaba la mortalidad.

Los viales donde la mortalidad superaba el 50%, se separaban y los insectos se colocaban en una nueva cría y eran considerados como parentales de posibles generaciones resistentes. Antes de un mes se separaban los parentales, para tener en la siguiente generación solo la descendencia.

Todos los viales eran mantenidos en una cámara de cultivo (Sanyo MLR-350HT) a 30 °C, 65 % de humedad relativa y oscuridad.

Así generación tras generación se iban aplicando dosis mas elevadas con el fin de conseguir generaciones más resistentes.

Se consiguieron siete generaciones para cada una de las plagas aunque en algunos tratamientos no fue posible alcanzarlas.

Para el cálculo de las nuevas CL_{50} mediante el programa PoloPlus, se aplicaron 5 concentraciones diferentes para cada monoterpenoide y se realizaron 3 repeticiones por cada concentración (10 viales para cada repetición).

A su vez se realizó el mismo procedimiento con una población sensible (la población inicial de partida), y así poder comparar las diferentes CL_{50} y calcular el factor de resistencia (FR).

El factor de resistencia (FR) fue calculado a partir de la concentración letal media de la población resistente comparada con la concentración letal media de una población sensible, utilizando la siguiente fórmula:

$$FR = CL_{50} \text{ población resistente} / CL_{50} \text{ población sensible}$$



Foto. 22. Selección de resistencia en laboratorio.

3.7. BIOENSAYO DE APLICACIÓN DE SINERGISTAS PARA ESTUDIAR LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA A MONOTERPENOIDES EN LAS POBLACIONES SELECCIONADAS.

Bielza y Contreras (2005), señalan la importancia de conocer los mecanismos de resistencia implicados para así establecer las estrategias “anti-resistencia” en el control de plagas.

Continuando el estudio anterior de selección de resistencias en laboratorio se investigó el mecanismo de resistencia implicado. Para ello nos centramos en tres posibles sistemas de detoxificación enzimáticos, esterasas, glutatión *S*-transferasas y citocromo P-450 monooxigenasa.

Los inhibidores utilizados en estas rutas metabólicas, para demostrar su participación en la resistencia de estos insectos, fueron el PBO (butóxido de piperonilo), un inhibidor específico de P-450 monooxigenasa, el DEF (SSS-tributilfosforotritioato) un inhibidor de las esterasas y por último el DEM (dietil maleato) un inhibidor de glutatión *S*-transferasas.

Como poblaciones de referencia se utilizaron la población SSSO para *Sitophilus oryzae*, SSRD para *Rhyzopertha dominica* y SSCP para *Cryptolestes pusillus*, las cuales eran tres poblaciones que nunca habían sido tratadas con algún monoterpenoide. Estas poblaciones eran mantenidas en una cámara de cultivo (Sanyo MLR-350HT) a 30 °C, 65 % de humedad relativa y oscuridad.

Las poblaciones resistentes utilizadas en este experimento correspondían a la generación séptima para todos los insectos y para cada uno de los monoterpénoides utilizados, excepto para algunas poblaciones de *Cryptolestes*: Tra6CP (*E*-anetol), Lin6CP (linalol), Alc6CP (alcanfor), Fen6CP (fenchona), y *Rhyzopertha*: Lin5RD (linalol), Tra5RD (*E*-anetol).

Los insecticidas utilizados fueron los mismos monoterpénoides, con los que se había intentado seleccionar resistencia en las plagas del arroz almacenado (*Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*): linalol, alcanfor, γ -terpineno, *E*-anetol, fenchona, estragol, *S*-carvona y geraniol.

PBO, inhibidor específico de P-450 monooxigenasa (Aldrich Sigma), DEF, inhibidor de esterasas (Chem Service Inc West Chester) y DEM inhibidor de glutatión

S-transferasas (Aldrich Sigma), fueron los inhibidores de las rutas metabólicas que se probaron para demostrar su intervención en la resistencia.

El tipo de bioensayo utilizado para la aplicación del sinergista fue tópico. Las dosis de los sinergistas fueron seleccionadas mediante ensayos previos de las poblaciones sensibles de referencia, SSSO, SSRD y SSCP, donde diluíamos diferentes concentraciones del sinergista en acetona, para finalmente aplicar la dosis más elevada que produjera una mortalidad menor al 15 %. Las dosis finales de los sinergistas fueron:

Sitophilus oryzae { PBO = 20.000 ppm
DEM = 15.000 ppm
DEF = 15.000 ppm

Rhyzopertha dominica { PBO = 15.000 ppm
DEM = 15.000 ppm
DEF = 10.000 ppm

Cryptolestes pusillus { PBO = 10.000 ppm
DEM = 10.000 ppm
DEF = 1.000 ppm

Los ensayos tópicos se realizaron aplicando 1 µl de cada sinergista en disolución (a la concentración indicada) sobre cada uno de los insectos (por medio de una jeringa Hamilton, ver Foto 23) y esperando 4 horas a temperatura ambiente para la aplicación del monoterpenoide. Previamente se había probado que esperar 4h era más efectivo que aplicar el insecticida inmediatamente después. La aplicación de los monoterpenoides fue idéntica a lo descrito en 3.2.2, es decir un bioensayo de toxicidad volátil. Se aplicaron tres concentraciones diferentes y un control con acetona (ya que éste fue el disolvente que se utilizó para preparar las disoluciones de PBO, DEM y DEF). Cada bioensayo estaba preparado con 10 insectos en cada vial y tres repeticiones.

Como los bioensayos descritos en anteriores apartados, el ensayo volátil se llevó a cabo depositando dentro del vial de 15 ml donde se encontraban los 10 insectos, un vial de 4 ml que contenía un disco de papel de filtro Whatman donde se habían aplicado los monoterpenoides. Estos viales fueron mantenidos en cámaras de cultivo (Sanyo MLR-350HT) a 30 °C, 65 % de humedad relativa y oscuridad y la mortalidad fue observada a las 24 horas.



Foto 23. Jeringuilla Hamilton.

Los datos fueron analizados usando el programa POLO-PLUS para análisis Probit y fue corregido para la mortalidad observada en el control. Las concentraciones

letales, CL_{50} y CL_{95} fueron calculadas con límites de confianza del 95 %. Finalmente se calculó el factor de resistencia de la manera descrita en el apartado 3.6 y el ratio de sinergismo (RS).

El ratio de sinergismo (RS) se calculó dividiendo la CL_{50} del monoterpenoide diluido en acetona entre la CL_{50} del monoterpenoide con cada uno de los sinergistas.

3.8. DETECCIÓN DE RESIDUOS DE MONOTERPENOIDES EN EL ARROZ.

Se estudió el efecto de los ocho monoterpenoides (Linalol, Geraniol, Alcanfor, Fenchona, γ -Terpineno, *S*-(+)-Carvona, *E*-Anetol y Estragol) ensayados sobre las plagas del arroz. El objetivo era ver si la aplicación volátil daba lugar a fenómenos de adsorción/desorción en el producto almacenado (arroz). Para ello se realizaron 3 bioensayos uno de adsorción y 2 de desorción.

Por ello se operó de manera similar a la empleada en los bioensayos volátiles, por lo que se aplicaron 1 μ l y 10 μ l de monoterpenoide sobre un disco de papel de filtro Whatman de 2 cm y se introdujo en un vial de 4 ml. Este vial fue a su vez insertado en un vial más grande de 15 ml que contenía 10 granos de arroz (diferenciando entre el arroz integral y arroz blanco).

Estos viales fueron mantenidos a temperatura ambiente (20 °C) en el laboratorio.

A los 4 días se retiró el vial más pequeño que contenía el monoterpenoide y se añadió 2 ml de hexano a los granos de arroz, para extraer el posible residuo que pudiera quedar. Transcurridos 3 días desde entonces se retiró el hexano y se analizó en el cromatógrafo de gases.

Al mismo tiempo se realizó un ensayo similar manteniendo los viales con el monoterpenoide hasta 2 meses.

Otro ensayo paralelo se llevó a cabo para examinar si una vez que el arroz adsorbía el monoterpenoide era capaz de liberarlo mas tarde, es decir, de desorberlo.

Para ello aplicamos 1 μ l y 10 μ l de monoterpenoide sobre un disco de papel de filtro Whatman de 2 cm y lo alojamos en un vial de 4 ml. Este vial fue a su vez introducido en un vial más grande de 15 ml que contenía 10 granos de arroz. Estos viales fueron mantenidos a temperatura ambiente en el laboratorio. A los 4 días se retiró el arroz y se depositaron los granos de arroz en un vial nuevo de 15 ml. En este nuevo

vial se insertó un vial más pequeño (4 ml) conteniendo 2 ml de hexano, evitando el contacto directo entre el arroz y el hexano. Se realizaron dos repeticiones por muestra.

Al igual que en el caso anterior se realizó un ensayo similar manteniéndolo dos meses.

Para realizar un segundo estudio sobre adsorción/desorción, concretamente con un solo monoterpenoide, el linalol, se aplicó 1 μ l y 10 μ l de este terpeno sobre muestras de 10 granos de arroz blanco y arroz integral para comprobar si estos granos son capaces de liberar el monoterpenoide adsorbido y cuanto tardarían en liberarlo.

Para ello se hizo un seguimiento semanal donde en un caso se mantenían los viales tapados y en otro caso los viales se encontraban sin tapón.

Los 10 granos de arroz (blanco e integral) fueron depositados en un vial de 15 ml, y dentro de éstos se introdujo un vial más pequeño (4 ml) que contenía un disco Whatman de papel de filtro de 2 cm donde se había aplicado 1 μ l y 10 μ l de linalol.

Estos viales se mantenían 4 días cerrados con tapón, mientras que paralelamente, el mismo procedimiento se aplicó a viales que quedaban abiertos (sin tapón).

A partir de esos 4 días se traspasó el arroz a viales nuevos de 15 ml y se introdujo un vial de 4 ml de hexano.

Este procedimiento se realizó semanalmente durante 5 semanas, con dos repeticiones por muestra.

Finalmente se retiró el hexano de todos los viales y se analizó mediante cromatografía gaseosa.

Para cuantificar los residuos de los monoterpenos en todos los casos realizamos una recta de calibrado con concentraciones conocidas de cada monoterpenoide y las condiciones de trabajo empleadas en el cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard 5890) y espectrómetro de masas (Hewlett-Packard Model 5972) fueron idénticas a las mencionadas en el punto 3.3.



RESULTADOS

4. RESULTADOS.

4.1. FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DE LOS ACEITES ESENCIALES.

4.1.1. Fracciones obtenidas de *Coriandrum sativum*.

A partir de la especie *Coriandrum sativum* y mediante una destilación al vapor con Clavenger de los frutos se obtuvo el aceite esencial. El rendimiento obtenido de este proceso fue de 0,5% (p/v).

Se llevó a cabo un primer fraccionamiento mediante cromatografía en columna y usando eluyentes de diferente polaridad (hexano100%; hexano/diclorometano 50:50, diclorometano/acetato de etilo 60:40; acetato de etilo/etanol 50:50), comenzando con el disolvente menos polar y aumentando su polaridad con el tiempo. Así a partir de 8,30010 gramos de aceite esencial de coriandro de obtuvieron 171 fracciones que según la cromatografía en capa fina se agruparon en ocho fracciones:

<i>Fracción</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F1C	0,36881
F2C	0,07630
F3C	0,19910
F4C	0,54302
F5C	4,78091
F6C	0,47330
F7C	0,02481
F8C	1,52310

A continuación se procedió a recromatografiar la fracción F5C, dado que fue la que mostró mayor actividad insecticida por medio del bioensayo volátil (ver resultados en apartado 4.2.1).

En este segundo fraccionamiento se partió de 3,20012 gramos y se realizó en una columna cromatográfica utilizando como eluyentes diclorometano 100%, diclorometano/acetato de etilo 90:10, diclorometano/acetato de etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75 y acetato de etilo 100%.

De esta columna se obtuvieron 139 subfracciones que según la cromatografía en capa fina se agruparon en siete subfracciones:

<i>Subfracción</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F51C	0,04948
F52C	0,06824
F53C	0,37036
F54C	2,23964
F55C	0,20213
F56C	0,17819
F57C	0,08961

En la Figura 36 se ha resumido el fraccionamiento por medio de un esquema donde se presentan los pasos llevados a cabo desde la obtención del aceite esencial a partir de las semillas de coriandro hasta la obtención de las diferentes fracciones y subfracciones.

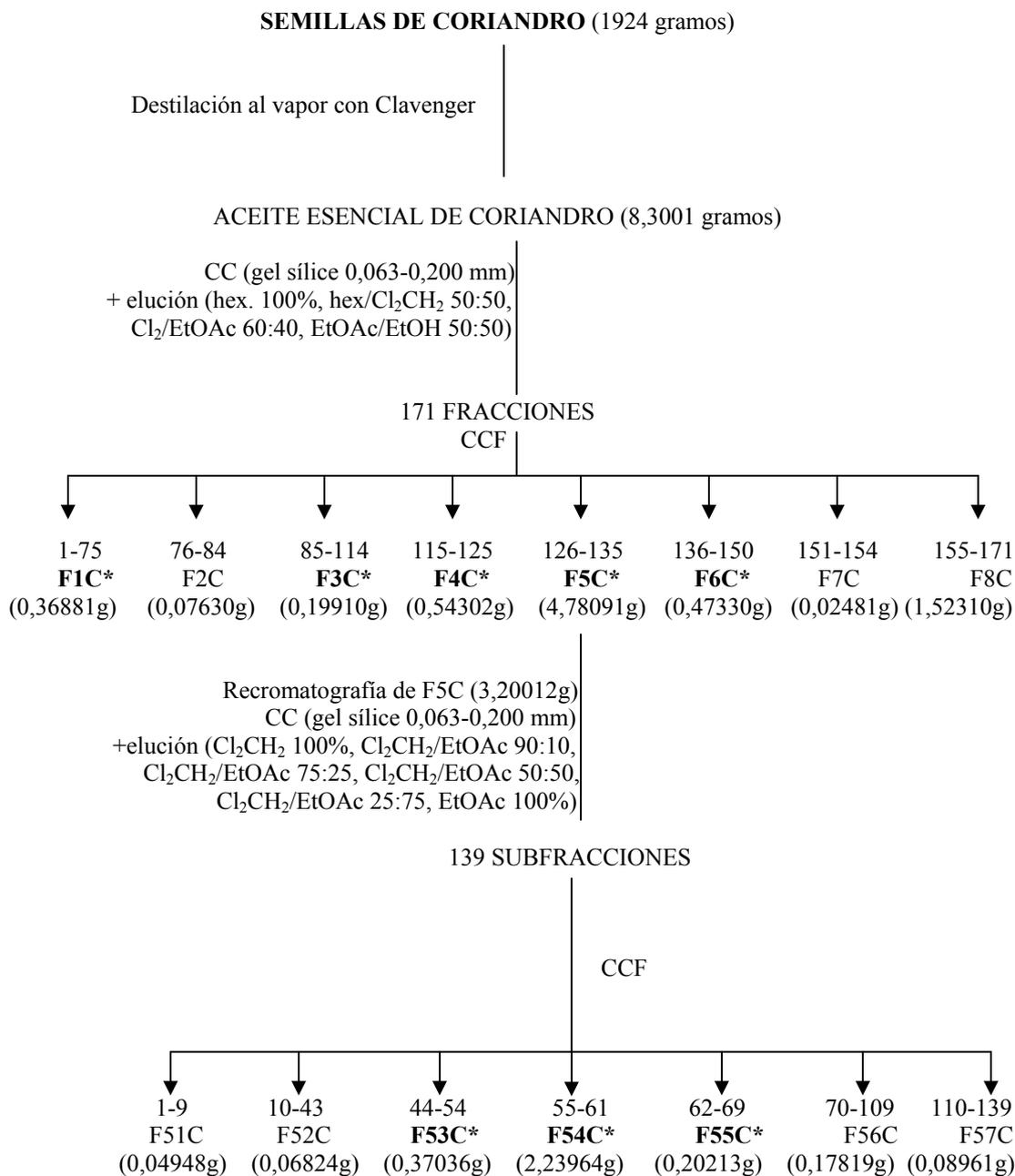


Figura 36. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de coriandro (* fracciones activas).

4.1.2. Fracciones obtenidas de *Carum carvii*.

A partir de la especie *Carum carvii* y a través de una destilación al vapor mediante Clavenger de los frutos se obtuvo el aceite esencial. El rendimiento de este proceso fue del 1 % (p/v).

Se llevó a cabo un primer fraccionamiento mediante cromatografía en columna y usando eluyentes de diferente polaridad (hexano 100%; hexano/éter etílico 90:10; hexano/éter etílico 75:25; hexano/éter etílico 50:50; hexano/éter etílico 25:75; éter etílico 100%; éter etílico/acetato de etilo 75:25; éter etílico/acetato de etilo 50:50; éter etílico/acetato de etilo 25:75; acetato de etilo 100%; acetato de etilo/etanol 75:25; acetato de etilo/etanol 50:50; acetato de etilo/etanol 25:75; etanol 100%), comenzando con el disolvente menos polar y aumentando su polaridad con el tiempo. Así a partir de 9,10102 gramos de aceite esencial de alcaravea se obtuvieron 151 fracciones que finalmente se agruparon en nueve fracciones:

<i>Fracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F1A	0,08693
F2A	1,36431
F3A	0,20446
F4A	0,04025
F5A	1,88128
F6A	4,25596
F7A	0,23279
F8A	0,64693
F9A	0,32407

A continuación se procedió a subfraccionar las fracciones activas (ver resultados del bioensayo en el apartado 4.2.2) F2A, F5A y F6A.

Partiendo de 1,06767 gramos de F2A se subfraccionó mediante una cromatografía en columna, utilizando como eluyentes hexano 100%,

hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100% y diclorometano/acetato de etilo 50:50.

De esta columna se obtuvieron después de reagrupar por CCF cinco subfracciones:

<i>Subfracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F21A	0,67713
F22A	0,04526
F23A	0,09552
F24A	0,01332
F25A	0,17604

La fracción F5A, partiendo de 1,35460 gramos, también se subfraccionó a través de una columna cromatográfica utilizando como eluyentes hexano 100%, hexano/diclorometano 90:10, hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100 % y diclorometano/acetato de etilo 50:50.

De esta columna se obtuvieron después de agrupar por CCF, cuatro subfracciones:

<i>Subfracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F51A	0,39215
F52A	0,19472
F53A	0,27804
F54A	0,36329

La fracción F6A (partiendo de 3,71341 gramos) también se subfraccionó, mediante cromatografía en columna utilizando como eluyentes hexano 100%, hexano/diclorometano 90:10, hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100%, diclorometano/acetato de

etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75, y acetato de etilo 100%.

De esta columna por medio de CCF se obtuvieron seis subfracciones:

<i>Subfracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F61A	0,09116
F62A	0,05585
F63A	0,91570
F64A	1,83968
F65A	0,35018
F66A	0,25041

El fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de alcaravea se ha esquematizado en la Figura 37.

Al igual que en el caso del coriandro, aquí también se presentan los pasos llevados a cabo desde la obtención del aceite esencial de alcaravea a partir de las semillas hasta la obtención de las diferentes fracciones y subfracciones.

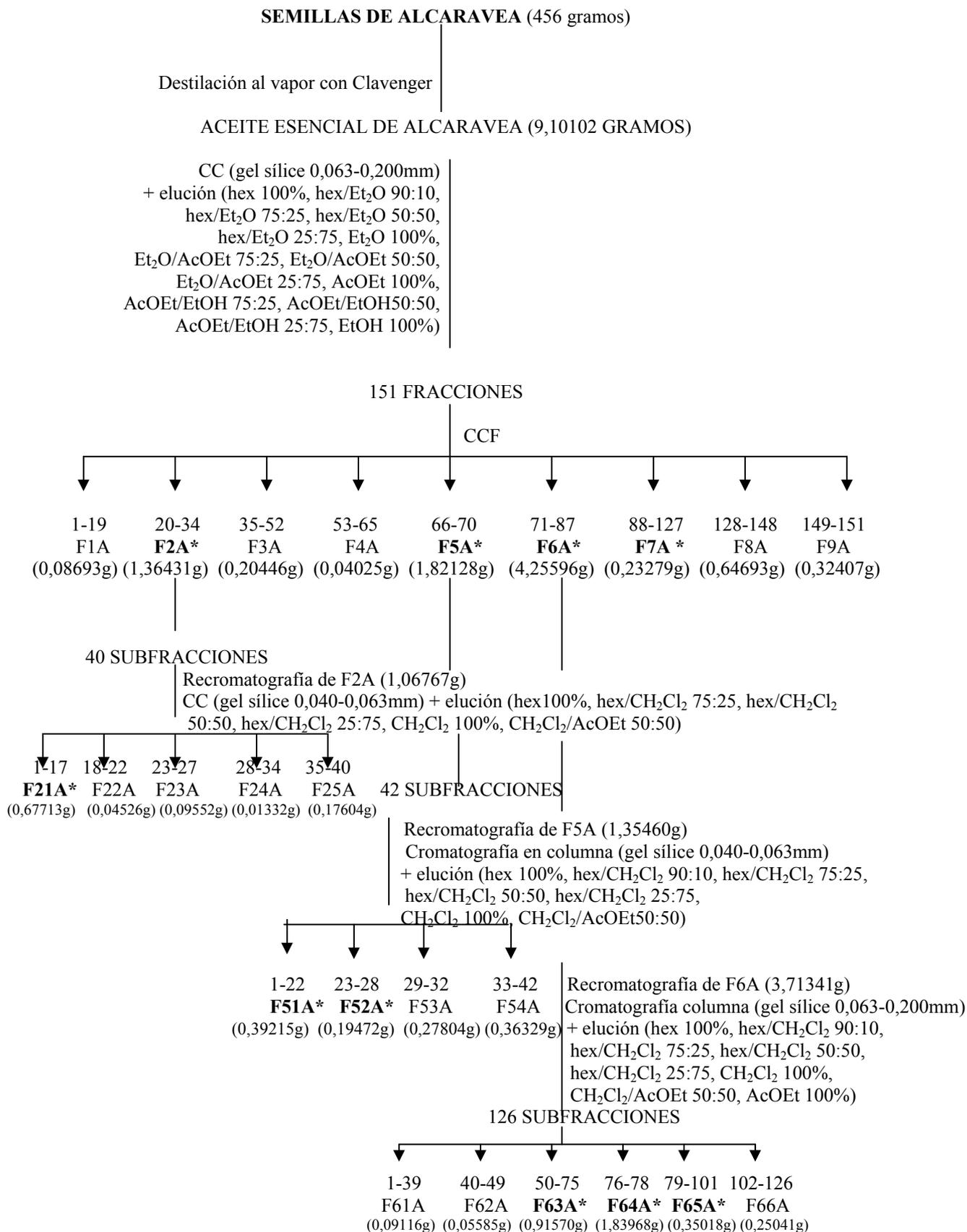


Figura 37. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de alcaravea (* fracciones activas).

4.1.3. Fracciones obtenidas de *Ocimum basilicum*.

A partir variedades de *Ocimum basilicum* (OB7, OB8, OB17, OB25 y OB43) y mediante una destilación al vapor con Clavenger de las hojas se obtuvo el aceite esencial de cada una de ellas. El rendimiento de este proceso estuvo entre el 0,5 y 1,0% (p/v).

Las variedades OB7 y OB8 se mezclaron en una proporción de 25:75 (dado que no se disponía de cantidad suficiente de cada una de ellas y según estudios previos son similares en su composición química), y se llevó a cabo un fraccionamiento mediante cromatografía en columna y usando eluyentes de diferente polaridad (hexano 100%; hexano/diclorometano 90:10, hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100%, diclorometano/acetato de etilo 90:10, diclorometano/acetato de etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75, acetato de etilo 100%, acetato de etilo/etanol 75:25, acetato de etilo/etanol 50:50, acetato de etilo/etanol 25:75, etanol 100% y acetona 100%), comenzando con el disolvente menos polar y al igual que en los casos anteriores aumentando su polaridad con el tiempo.

Así a partir de 8,2948 gramos de la mezcla de OB7-OB8 se obtuvieron por medio de CC y CCF (Figura 38) veintidós fracciones:

<i>Fracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F1B8	0,47823
F2B8	0,06378
F3B8	0,15268
F4B8	0,57194
F5B8	0,10228
F6B8	0,03747
F7B8	0,05170
F8B8	0,13863

F9B8	0,10687
F10B8	0,04734
F11B8	0,08988
F12B8	0,11571
F13B8	0,42435
F14B8	0,08196
F15B8	0,17968
F16B8	0,06841
F17B8	0,13670
F18B8	0,12188
F19B8	0,16256
F20B8	0,18007
F21B8	1,73697
F22B8	0,06506

El siguiente fraccionamiento que se llevó a cabo fue con la variedad de albahaca OB17.

Del mismo modo se llevó a cabo mediante cromatografía en columna y usando eluyentes de diferente polaridad (hexano 100%; hexano/diclorometano 90:10; hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100%, diclorometano/acetato de etilo 90:10, diclorometano/acetato de etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75, acetato de etilo 100%, acetato de etilo/etanol 50:50, acetato de etilo/etanol 25:75, y etanol 100%), comenzando con el disolvente menos polar y aumentando su polaridad con el tiempo.

Así a partir de 5,8188 gramos de aceite esencial OB17 se obtuvieron nueve fracciones después de reagrupar por CCF (ver Figura 39):

<i>Fracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F1B17	0,11709
F2B17	3,74489
F3B17	0,16548
F4B17	0,72943
F5B17	0,27694
F6B17	0,09480
F7B17	0,09356
F8B17	0,02948
F9B17	0,78385

Se recromatografió la fracción F2B17 al ser la más activa (ver resultados del bioensayo en el apartado 4.2.3), partiendo de 2,8880 gramos.

Este segundo fraccionamiento se realizó en columna cromatográfica utilizando como eluyentes hexano 100%, hexano/diclorometano 90:10, hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75 y diclorometano 100%.

De esta columna se obtuvieron cinco subfracciones por el procedimiento ya descrito:

<i>Subfracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F21B17	0,13063
F22B17	2,23700
F23B17	0,04987
F24B17	0,07386
F25B17	0,02179

El siguiente fraccionamiento que se llevó a cabo fue con el aceite esencial de la variedad de albahaca OB25 (Figura 40). Donde a partir de 10,2017 g y utilizando como eluyentes hexano 100%; hexano/diclorometano 90:10; hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100%, diclorometano/acetato de etilo 90:10, diclorometano/acetato de etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75, acetato de etilo 100%, acetato de etilo/etanol 75:25, acetato de etilo/etanol 50:50, acetato de etilo/etanol 25:75, etanol 100% y finalmente una mezcla de etanol/acetona 50:50, comenzando con el disolvente menos polar y aumentando su polaridad progresivamente, se obtuvieron las siguientes fracciones:

<i>Fracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F1B25	0,31255
F2B25	0,05745
F3B25	0,03577
F4B25	0,60505
F5B25	0,07477

F6B25	0,44670
F7B25	1,06737
F8B25	0,35452
F9B25	0,17020
F10B25	0,09208
F11B25	0,19525

El último fraccionamiento que se llevó a cabo fue con el aceite esencial de la variedad de albahaca OB43 (ver Figura 41). A partir de 2,6551 g y utilizando como eluyentes hexano 100%; hexano/diclorometano 75:25, hexano/diclorometano 50:50, hexano/diclorometano 25:75, diclorometano 100%, diclorometano/acetato de etilo 75:25, diclorometano/acetato de etilo 50:50, diclorometano/acetato de etilo 25:75, acetato de etilo 100%, acetato de etilo/etanol 50:50, acetato de etilo/etanol 25:75, y etanol 100%, comenzando con el disolvente menos polar y aumentando su polaridad poco a poco, se obtuvieron las siguientes fracciones:

<i>Fracciones</i>	<i>Peso (gramos)</i>
F1B43	1,33049
F2B43	0,31679
F3B43	0,14440
F4B43	0,19598
F5B43	0,11527
F6B43	0,12411

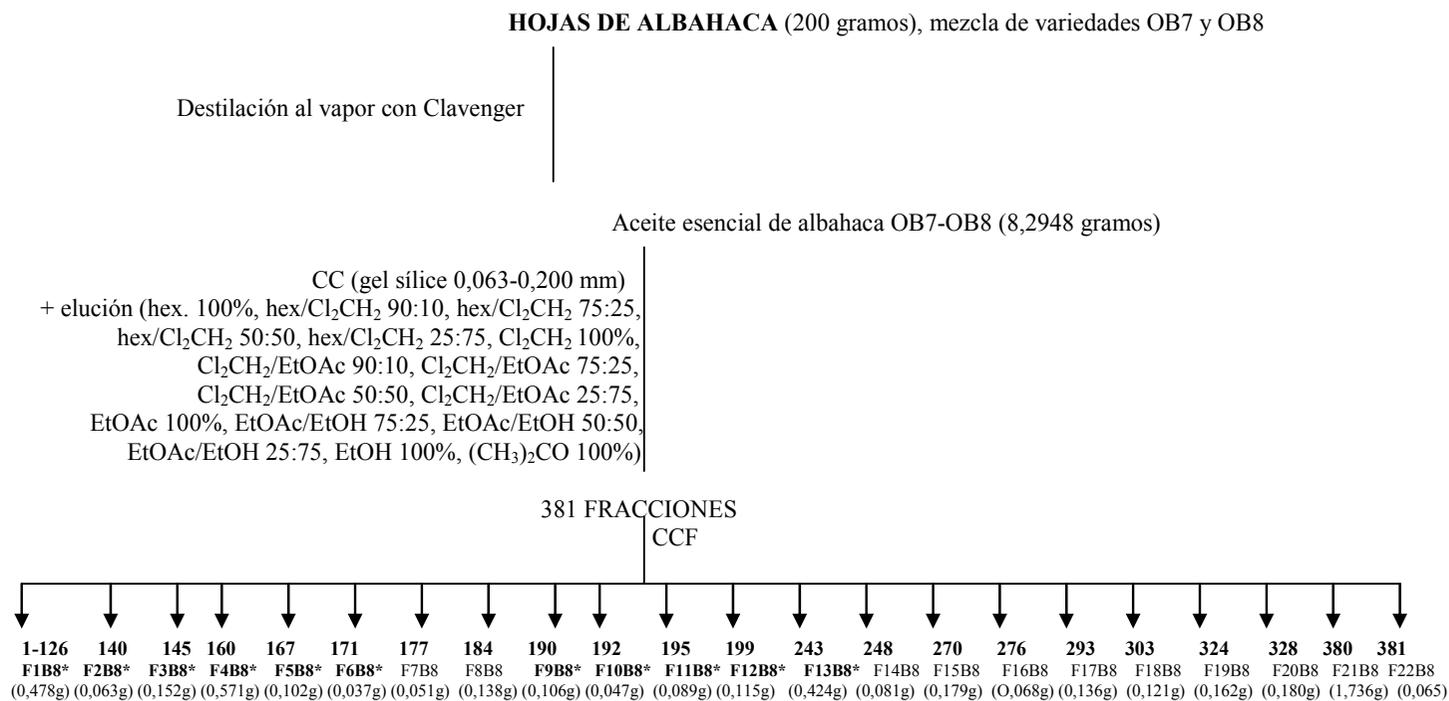


Figura 38. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de albahaca, mezcla de variedades OB7 y OB8 (* fracciones activas)

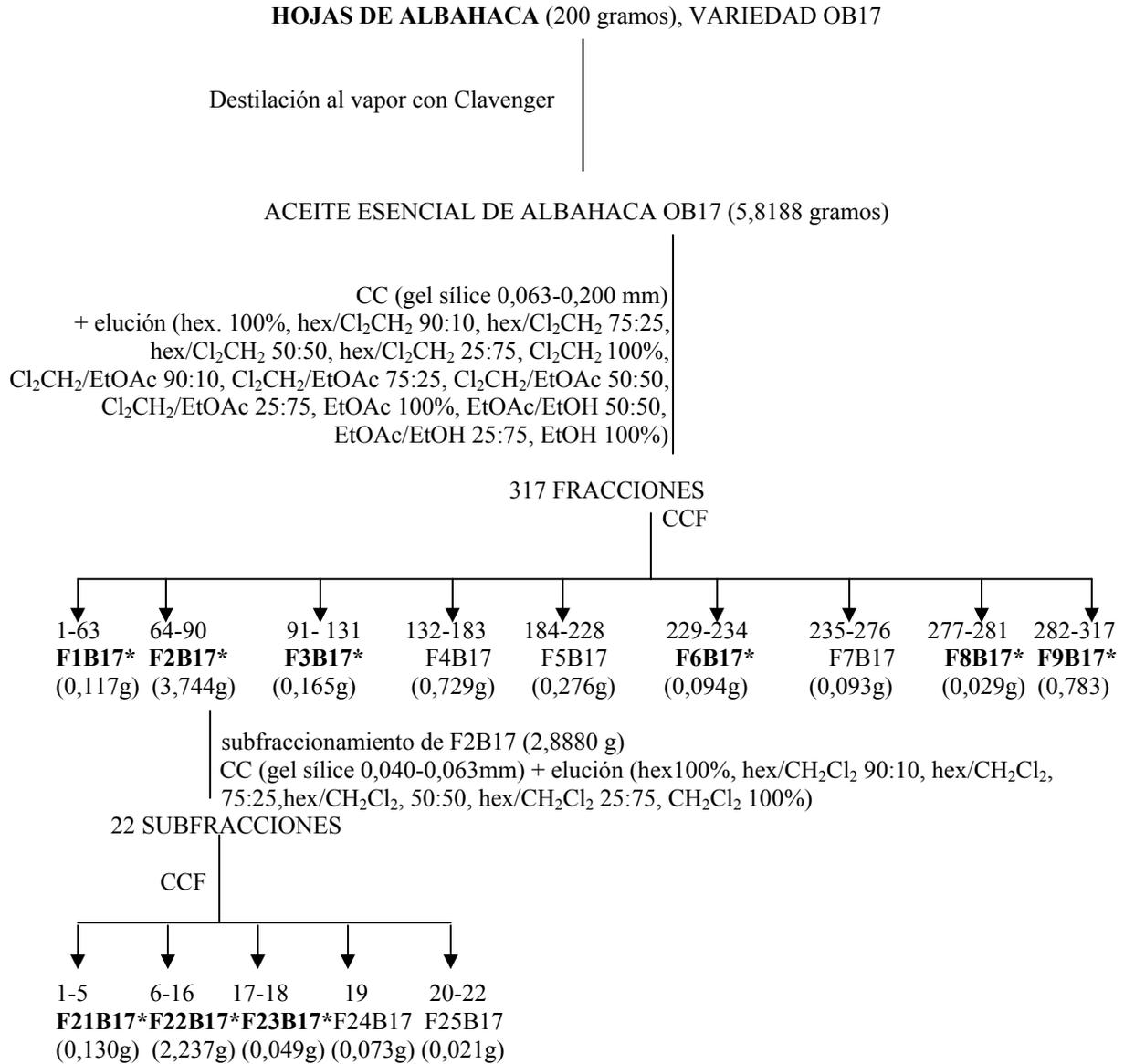


Figura 39. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de albahaca, variedad OB17 (* fracciones activas).

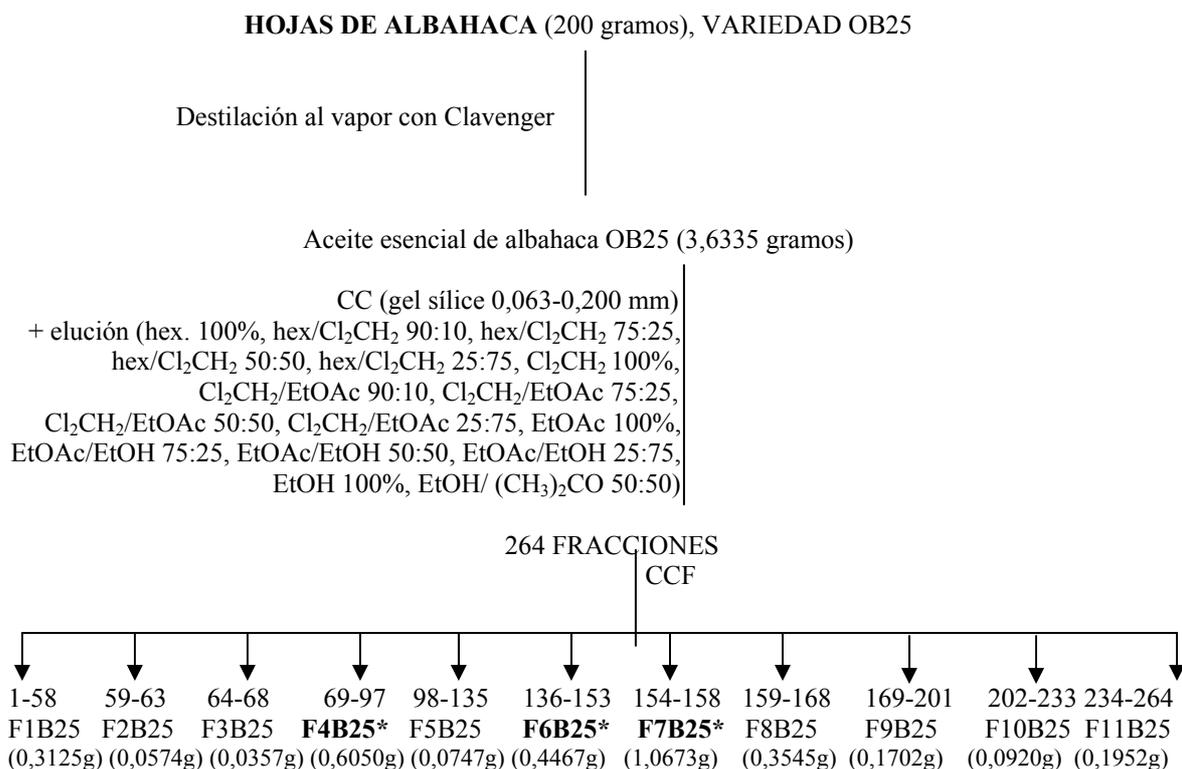


Figura 40. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de albahaca, variedad OB25 (* fracciones activas).

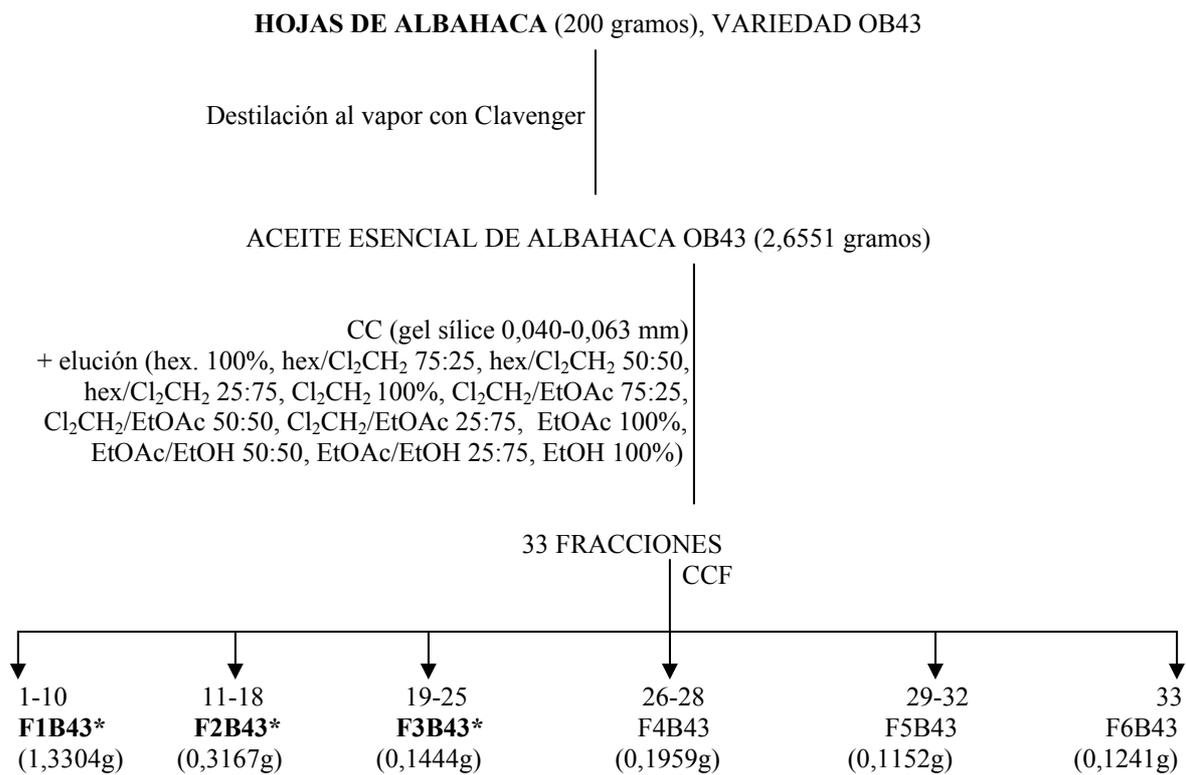


Figura 41. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de albahaca, variedad OB43 (* fracciones activas).

4.2. TOXICIDAD VOLÁTIL DE LOS ACEITES ESENCIALES Y SUS FRACCIONES EN PLAGAS DE ALMACÉN DEL ARROZ.

4.2.1. Actividad del aceite y las fracciones de *Coriandrum sativum*.

En los bioensayos con el aceite esencial de coriandro, se pudo observar que la aplicación volátil del aceite esencial, de sus fracciones y subfracciones no tuvo un efecto inmediato (a las 2 horas) ni para *Sitophilus oryzae* ni para *Rhyzopertha dominica*.

Por el contrario si se observo un efecto rápido con el aceite esencial y algunas fracciones y subfracciones en *Cryptolestes pusillus*.

A las 24 horas se observó que el aceite esencial presentaba una alta actividad insecticida en las tres plagas estudiadas (aproximadamente el 100 % de mortalidad para *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*), siendo menor esta actividad en *Sitophilus oryzae* (aproximadamente el 60 % de mortalidad).

Las fracciones y subfracciones F5C, F54C y F55C eran más tóxicas que el aceite esencial para *S. oryzae*.

Las fracciones y subfracciones F3C, F4C, F5C, F53C, F54C y F55C, todas causaban una mortalidad superior al aceite esencial (excepto F3C) en *R. dominica*.

Las fracciones y subfracciones F1C, F3C, F4C, F5C, F53C, F54C y F55C causaban el 100 % de mortalidad en *C. pusillus* mientras que F6C tenía una actividad mas baja.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla, 4.

Tabla 4. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de coriandro.

Fracción ^b CC	Mortalidad (n° insectos muertos de 10) ^a					
	<i>Sitophilus oryzae</i>		<i>Rhyzopertha dominica</i>		<i>Cryptolestes pusillus</i>	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
F1C	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33	8,3 ± 0,88	9,3 ± 0,66
F2C	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,66	0,6 ± 0,66	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F3C	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	2,0 ± 0,57	6,3 ± 1,20	8,6 ± 0,88	10,0 ± 0,00
F4C	0,0 ± 0,00	3,0 ± 2,08	2,3 ± 1,45	9,6 ± 0,33	9,0 ± 1,00	10,0 ± 0,00
F5C	0,0 ± 0,00	6,0 ± 1,52	0,6 ± 0,33	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
F51C	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,6 ± 0,33
F52C	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	3,3 ± 3,33	3,3 ± 3,33
F53C	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	1,6 ± 0,88	10,0 ± 0,00	9,6 ± 0,33	10,0 ± 0,00
F54C	0,0 ± 0,00	6,3 ± 3,18	2,3 ± 0,66	9,6 ± 0,33	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
F55C	0,0 ± 0,00	7,3 ± 2,18	2,0 ± 0,57	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
F56C	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	1,3 ± 0,88	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	3,0 ± 2,51
F57C	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F6C	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	7,3 ± 2,18
F7C	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33
F8C	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33
Aceite sin fraccionar	0,0 ± 0,00	5,6 ± 0,66	0,6 ± 0,66	9,0 ± 1,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
Control	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33

^aMedia ± Error estándar de 3 repeticiones.

^bFiC= cada una de las fracciones obtenidas del aceite esencial de coriandro; F5iC= cada una de las subfracciones obtenidas de la fracción F5C.

4.2.2. Actividad del aceite y las fracciones de *Carum carvii*.

Los bioensayos realizados con el aceite esencial de alcaravea, se advirtió que la aplicación volátil del aceite esencial, de sus fracciones y subfracciones no tuvo un efecto inmediato (a las 2 horas) para *Sitophilus oryzae* y solo ligeramente se observa en F6A para *Rhyzopertha dominica*.

Por el contrario si se observo un efecto rápido con el aceite esencial y algunas fracciones y subfracciones en *Cryptolestes pusillus*.

A las 24 horas se observó que el aceite esencial presentaba una alta actividad insecticida en las tres plagas estudiadas (aproximadamente el 100 % de mortalidad).

Entre las fracciones y subfracciones: F5A, F6A, F63A, F64A y F65A, eran más tóxicas para *S. oryzae*.

Las fracciones y subfracciones: F5A, F51A, F6A, F63A, F64A y F65A eran más activas en *R. dominica*, siendo ligeramente inferior la actividad de F2A.

Las fracciones y subfracciones F2A, F5A, F51A, F6A, F63A, F64A y F65A causaban 100 % de mortalidad en *C. pusillus*, encontrando una actividad menor (aproximadamente 50 % de mortalidad a las 24 h) en F21A y F52A.

Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de alcaravea.

Fracción ^b CC	Mortalidad (n° insectos muertos de 10) ^a					
	<i>Sitophilus oryzae</i>		<i>Rhizopertha dominica</i>		<i>Cryptolestes pusillus</i>	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
F1A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F2A	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	4,0 ± 0,57	6,0 ± 1,00	9,0 ± 0,57	9,0 ± 0,57
F21A	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33	2,0 ± 2,00	3,3 ± 3,33	5,3 ± 2,40
F22A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F23A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F24A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F25A	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33
F3A	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,66	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	1,0 ± 1,00	1,0 ± 1,00
F4A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33
F5A	0,0 ± 0,00	6,3 ± 2,72	0,0 ± 0,00	8,3 ± 0,88	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
F51A	0,3 ± 0,33	4,0 ± 2,51	0,0 ± 0,00	8,6 ± 0,66	7,0 ± 2,08	10,0 ± 0,00
F52A	0,0 ± 0,00	2,0 ± 0,57	0,0 ± 0,00	1,0 ± 0,57	6,0 ± 1,52	5,3 ± 2,40
F53A	0,3 ± 0,33	1,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33
F54A	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33
F6A	0,0 ± 0,00	7,3 ± 2,18	5,6 ± 1,20	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
F61A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F62A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F63A	0,3 ± 0,33	9,6 ± 0,33	1,0 ± 0,57	10,0 ± 0,00	7,6 ± 0,33	10,0 ± 0,00
F64A	0,3 ± 0,33	10,0 ± 0,00	2,3 ± 0,88	9,0 ± 1,00	7,6 ± 0,66	10,0 ± 0,00
F65A	1,0 ± 0,57	9,6 ± 0,33	1,6 ± 0,66	8,6 ± 0,88	6,0 ± 2,08	10,0 ± 0,00
F66A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F7A	0,0 ± 0,00	1,6 ± 0,88	1,6 ± 0,33	0,6 ± 0,33	2,0 ± 2,00	3,6 ± 3,18
F8A	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	1,0 ± 0,57	0,6 ± 0,33	0,3 ± 0,33	1,3 ± 0,88
F9A	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33
Aceite sin fraccionar	0,0 ± 0,00	9,0 ± 0,57	0,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
Control	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

^aMedia ± Error estándar de 3 repeticiones.

^bFiA= cada una de las fracciones obtenidas del aceite esencial de alcaravea; F2iA= cada una de las subfracciones obtenidas de la fracción F2A del aceite esencial de alcaravea; F5iA= cada una de las subfracciones obtenidas de la fracción F5A del aceite esencial de alcaravea; F6iA= cada una de las subfracciones obtenidas de la fracción F6A del aceite esencial de alcaravea.

4.2.3. Actividad del aceite y las fracciones de *Ocimum basilicum*.

En los bioensayos con la mezcla de los aceites esenciales de albahaca OB7 y OB8, se pudo observar que la aplicación volátil del aceite esencial y de sus fracciones no tuvo un efecto inmediato (a las 2 horas) para *Sitophilus oryzae* y solo se observó efecto a tan corto plazo en F9B8 y F10B8 para *Rhyzopertha dominica*. Por el contrario si se observó un efecto rápido con el aceite esencial y algunas fracciones en *Cryptolestes pusillus*.

A las 24 horas se observó que la mezcla de aceites esenciales presentaba una baja actividad insecticida en *Sitophilus oryzae* (aproximadamente del 30 % de mortalidad), seguido de un 70 % en *Rhyzopertha dominica* y de cerca de un 100 % en *Cryptolestes pusillus* (Tabla 6).

Entre las fracciones: F1B8, F2B8, F3B8, F4B8, F5B8 y F10B8 presentaban actividad a las 24h en *S.oryzae*.

Así como para *Rhyzopertha dominica* con F1B8, F2B8, F3B8, F4B8, F5B8, F6B8, F9B8, F10B8, F11B8, F12B8 y F13B8.

Mientras que las fracciones F1B8, F2B8, F3B8, F4B8, F5B8, F6B8, F9B8, F10B8, F11B8, F12B8 y F13B8 eran muy tóxicas en *C. pusillus* y algo menos la F18B8.

Al igual que para los aceites de las otras especies, el efecto tóxico para los insectos no se manifestaba a las 2h salvo para *C. pusillus*.

Por contrario a las 24 horas se observó que el aceite esencial presentaba una alta actividad insecticida en las tres plagas estudiadas (aproximadamente el 100 % de mortalidad para *Cryptolestes pusillus*), siendo menor esta toxicidad en *Sitophilus oryzae* y *Rhyzopertha dominica*.

Entre las fracciones y subfracciones: F2B17, F21B17, F6B17, F8B17 y F9B17 presentaban actividad insecticida a las 24h en *S. oryzae*.

Para *Rhyzopertha dominica*, a las 24 horas se observó actividad insecticida en las fracciones y subfracciones F2B17, F21B17, F22B17, F23B17 y F3B17 (Tabla 7).

Mientras que en *Cryptolestes pusillus*, a las 24 horas se producía un 100 % de mortalidad con las fracciones y subfracciones F1B17, F2B17, F21B17, F22B17, F23B17 y F3B17.

En los bioensayos con el aceite esencial de albahaca, OB25, se pudo observar que a las 24 horas el aceite esencial presentaba una alta actividad insecticida en *Sitophilus oryzae* (aproximadamente el 70 % de mortalidad), y en *Cryptolestes pusillus* (100 %), por el contrario para *Rhyzopertha dominica* el aceite esencial no presentó una actividad insecticida considerable (Tabla 8).

Las fracciones activas para *S. oryzae* según los resultados de los bioensayos eran: F4B25 y F7B25.

En *Rhyzopertha dominica*, las fracciones F4B25, F6B25 y F7B25 fueron más activas que el aceite esencial sin fraccionar.

Finalmente en *Cryptolestes pusillus*, a las 24 horas, las fracciones F4B25, F5B25, F6B25, F7B25 y F8B25 mostraron una alta actividad insecticida (\approx 100 % de mortalidad).

Para terminar, en los bioensayos con el aceite esencial de albahaca, OB43, y a las 24 horas se observó que el aceite esencial causaba un 50 %, 60 % y 100 % de mortalidad para *R. dominica*, *S. oryzae* y *C. pusillus* respectivamente.

Para las tres plagas, F1B43, F2B43 y F3B43 eran las fracciones más activas (Tabla 9).

Todos los resultados obtenidos de los bioensayos realizados de todas las fracciones y subfracciones sobre las tres plagas se presentan en las siguientes tablas.

Tabla 6. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de albahaca, mezcla de variedades OB7/OB8.

Fracción ^b CC	Mortalidad (n° insectos muertos de 10) ^a					
	<i>Sitophilus oryzae</i>		<i>Rhyzopertha dominica</i>		<i>Cryptolestes pusillus</i>	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
F1B8	1,0 ± 1,00	8,0 ± 2,00	1,0 ± 1,00	8,0 ± 1,53	7,0 ± 1,00	10,0 ± 0,00
F2B8	0,0 ± 0,00	8,3 ± 0,66	2,0 ± 0,57	6,0 ± 1,15	7,3 ± 0,33	10,0 ± 0,00
F3B8	0,0 ± 0,00	7,6 ± 1,85	2,0 ± 1,00	7,6 ± 0,33	5,6 ± 1,20	10,0 ± 0,00
F4B8	0,0 ± 0,00	8,3 ± 0,33	1,0 ± 0,57	9,3 ± 0,33	6,6 ± 0,88	10,0 ± 0,00
F5B8	0,0 ± 0,00	6,6 ± 0,66	1,3 ± 0,88	10,0 ± 0,00	6,3 ± 1,20	9,3 ± 0,66
F6B8	0,0 ± 0,00	3,3 ± 0,88	0,0 ± 0,00	9,3 ± 0,66	0,6 ± 0,33	9,3 ± 0,33
F7B8	0,0 ± 0,00	2,0 ± 1,15	1,0 ± 0,57	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	2,6 ± 1,66
F8B8	0,6 ± 0,33	0,6 ± 0,33	4,0 ± 0,57	1,6 ± 1,20	8,0 ± 0,57	2,0 ± 0,57
F9B8	0,3 ± 0,33	1,6 ± 1,20	5,3 ± 0,33	7,6 ± 1,85	8,6 ± 0,33	8,3 ± 0,33
F10B8	0,6 ± 0,66	5,3 ± 0,33	6,6 ± 0,66	7,6 ± 1,85	7,6 ± 0,88	10,0 ± 0,00
F11B8	0,3 ± 0,33	4,6 ± 1,20	2,3 ± 0,33	6,3 ± 0,33	9,6 ± 0,33	10,0 ± 0,00
F12B8	0,0 ± 0,00	4,6 ± 2,18	2,0 ± 0,57	9,0 ± 1,00	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
F13B8	0,0 ± 0,00	3,0 ± 0,00	3,0 ± 0,57	5,0 ± 1,53	8,3 ± 0,88	10,0 ± 0,00
F14B8	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	2,0 ± 0,57
F15B8	0,0 ± 0,00	1,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,66	2,0 ± 0,00
F16B8	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	3,6 ± 2,18
F17B8	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	3,0 ± 0,57
F18B8	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	5,6 ± 1,76
F19B8	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,3 ± 0,33	3,6 ± 1,20
F20B8	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	2,6 ± 1,45
F21B8	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	3,3 ± 0,33
F22B8	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,66	0,0 ± 0,00	3,0 ± 0,57
Aceite sin fraccionar	0,0 ± 0,00	3,0 ± 1,00	1,3 ± 0,66	7,3 ± 2,66	4,6 ± 1,45	9,3 ± 0,66
Control	0,3 ± 0,33	1,0 ± 0,57	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33

^aMedia ± Error estándar de 3 repeticiones.

^bFiB8= cada una de las fracciones obtenidas del aceite esencial de albahaca OB7-OB8.

Tabla 7. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de albahaca, variedad OB17.

Fracción ^b CC	Mortalidad (n° insectos muertos de 10) ^a					
	<i>Sitophilus oryzae</i>		<i>Rhizopertha dominica</i>		<i>Cryptolestes pusillus</i>	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
F1B17	0,0 ± 0,00	2,3 ± 2,33	0,6 ± 0,66	4,6 ± 2,18	3,6 ± 1,76	10,0 ± 0,00
F2B17	0,0 ± 0,00	8,0 ± 2,00	1,0 ± 0,57	8,0 ± 1,53	9,0 ± 0,57	10,0 ± 0,00
F21B17	0,0 ± 0,00	5,0 ± 2,51	0,0 ± 0,00	7,3 ± 0,66	7,3 ± 1,76	10,0 ± 0,00
F22B17	0,0 ± 0,00	4,3 ± 2,96	1,0 ± 1,00	8,6 ± 0,88	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
F23B17	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,3 ± 0,33	5,0 ± 0,57	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
F24B17	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	3,0 ± 3,00	4,0 ± 3,05
F25B17	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F3B17	0,0 ± 0,00	3,6 ± 2,73	0,3 ± 0,33	9,3 ± 0,66	8,6 ± 1,33	10,0 ± 0,00
F4B17	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33
F5B17	0,0 ± 0,00	3,0 ± 1,73	1,3 ± 0,88	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	3,0 ± 1,53
F6B17	0,3 ± 0,33	6,6 ± 0,33	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	1,3 ± 0,66
F7B17	0,0 ± 0,00	1,3 ± 1,33	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,66	1,6 ± 0,88
F8B17	0,6 ± 0,66	5,0 ± 1,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,66	0,6 ± 0,33
F9B17	0,0 ± 0,00	5,6 ± 0,88	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	1,3 ± 0,88
Aceite sin fraccionar	0,0 ± 0,00	6,3 ± 2,33	0,0 ± 0,00	8,6 ± 0,88	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
Control	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33

^aMedia ± Error estándar de 3 repeticiones.

^bFiB17= cada una de las fracciones obtenidas de la variedad de albahaca OB17; F2iB17= cada una de las subfracciones obtenidas de la fracción F2B17 de la variedad de albahaca OB17.

Tabla 8. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de albahaca, variedad OB25.

Fracción ^b CC	Mortalidad (n° insectos muertos de 10) ^a					
	<i>Sitophilus oryzae</i>		<i>Rhyzopertha dominica</i>		<i>Cryptolestes pusillus</i>	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
F1B25	0,0 ± 0,00	1,0 ± 0,57	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33	3,0 ± 2,51
F2B25	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
F3B25	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	1,0 ± 1,00
F4B25	0,0 ± 0,00	7,6 ± 1,20	1,0 ± 0,57	9,3 ± 0,33	3,3 ± 1,20	10,0 ± 0,00
F5B25	0,3 ± 0,33	1,6 ± 0,88	0,6 ± 0,33	2,6 ± 2,18	1,6 ± 0,33	10,0 ± 0,00
F6B25	1,0 ± 0,57	4,0 ± 3,05	1,3 ± 0,33	9,6 ± 0,33	3,6 ± 2,03	10,0 ± 0,00
F7B25	0,0 ± 0,00	7,3 ± 1,76	2,3 ± 0,33	9,6 ± 0,33	1,6 ± 0,88	10,0 ± 0,00
F8B25	0,0 ± 0,00	3,3 ± 0,88	4,3 ± 1,85	1,3 ± 0,33	1,6 ± 1,20	9,6 ± 0,33
F9B25	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	1,3 ± 0,88	1,6 ± 1,20	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,66
F10B25	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33
F11B25	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	1,0 ± 0,57
Aceite sin fraccionar	1,0 ± 0,57	7,3 ± 1,33	0,3 ± 0,33	3,6 ± 2,03	2,0 ± 1,15	10,0 ± 0,00
Control	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

^aMedia ± Error estándar de 3 repeticiones.

^bFiB25= cada una de las fracciones obtenidas de la variedad de albahaca OB25.

Tabla 9. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de albahaca, variedad OB43.

Fracción ^b CC	Mortalidad (n° insectos muertos de 10) ^a					
	<i>Sitophilus oryzae</i>		<i>Rhyzopertha dominica</i>		<i>Cryptolestes pusillus</i>	
	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas	2 horas	24 horas
F1B43	0,0 ± 0,00	6,6 ± 0,66	0,6 ± 0,33	8,6 ± 0,88	4,3 ± 1,76	10,0 ± 0,00
F2B43	0,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	9,6 ± 0,33	6,0 ± 1,53	10,0 ± 0,00
F3B43	0,0 ± 0,00	6,0 ± 1,73	3,6 ± 0,33	2,6 ± 0,66	1,0 ± 0,57	10,0 ± 0,00
F4B43	0,0 ± 0,00	2,6 ± 0,88	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	1,0 ± 0,57
F5B43	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,3 ± 0,33
F6B43	0,0 ± 0,00	0,6 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00
Aceite sin fraccionar	1,3 ± 0,33	6,3 ± 0,88	0,6 ± 0,66	5,6 ± 2,18	0,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00
Control	0,3 ± 0,33	1,6 ± 1,20	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,33	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00

^aMedia ± Error estándar de 3 repeticiones.

^bFiB43= cada una de las fracciones obtenidas de la variedad de albahaca OB43.

4.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS.

En la Tabla 10 se muestra la composición del aceite esencial, las fracciones y subfracciones de coriandro identificada mediante CG-EM.

En la fracción F1C se encuentran los compuestos menos polares de este aceite esencial, y aquí el compuesto mayoritario es el limoneno seguido del γ -terpineno y del eucaliptol. En las demás fracciones (F3C, F4C, F5C, F54C, F55C y F6C) el compuesto mayoritario es el linalol, excepto para la subfracción F53C donde el compuesto que encontramos en mayor proporción es el alcanfor.

Otros monoterpénoides encontrados en una importante proporción en estas fracciones son el alcanfor, el acetato de geranilo y el geraniol.

En la Figura 42 se presenta el cromatograma del aceite esencial de coriandro sin fraccionar.

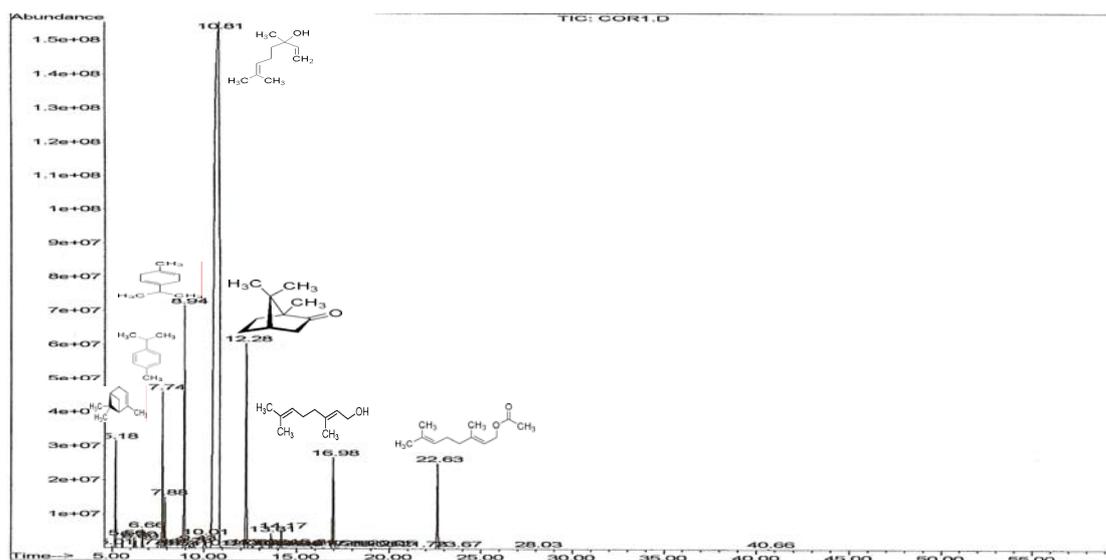


Figura 42. Cromatograma del aceite esencial de coriandro.

En la Tabla 11 se muestra la composición del aceite esencial, fracciones y subfracciones de alcaravea identificadas mediante CG-EM.

La fracción F2A y subfracción F21A resultan ser las fracciones menos polares donde el compuesto mayoritario es el limoneno, seguido del α -pineno.

En la fracción F5A y subfracciones F51A y F52A los compuestos encontrados en mayor proporción son el *E*-anetol, la fenchona y el estragol.

En la fracción F6A y subfracciones F63A, F64A y F65A los compuestos hallados en mayor proporción son la carvona y la fenchona. En estas fracciones se encuentra el componente principal del aceite esencial de alcaravea, la carvona.

Finalmente, en la fracción F7A el compuesto mayoritario es el *cis*-carveol, seguido del *p*-anisaldehído.

En la Figura 43 se presenta el cromatograma del aceite esencial de alcaravea sin fraccionar.

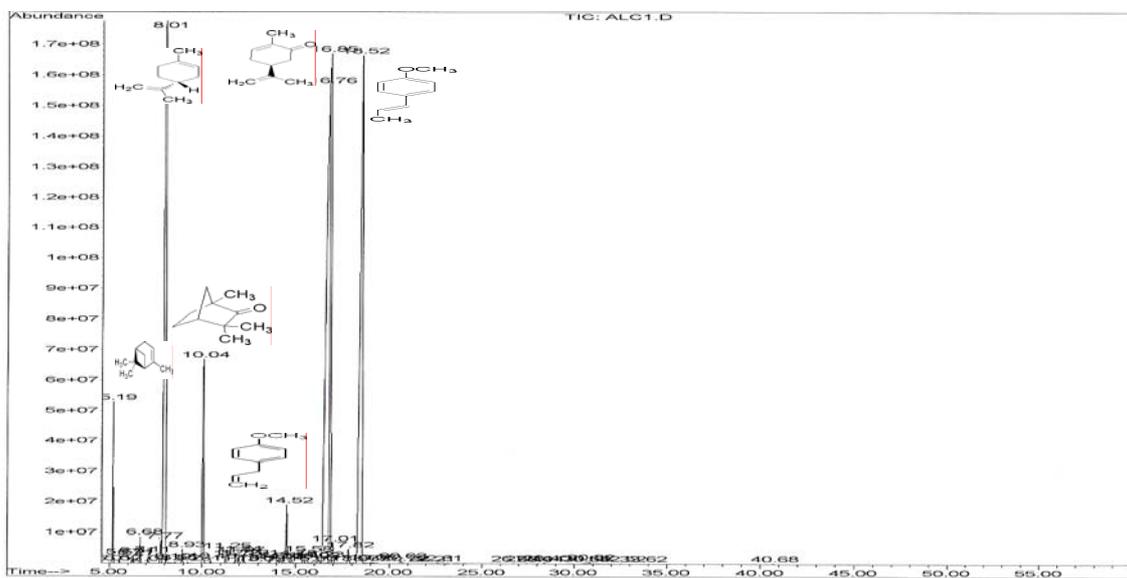


Figura 43. Cromatograma del aceite esencial de alcaravea.

En la Tabla 12 se muestra la composición del aceite esencial y fracciones de albahaca (mezcla OB7 y OB8) identificadas mediante CG-EM.

En la fracción F1B8, el compuesto mayoritario es el estragol, mientras que en las siguientes fracciones (F2B8, F3B8, F4B8, F5B8 y F6B8) los compuestos que aparecen en mayor proporción son eugenol, metil cinamato y eugenol metil éter.

En el resto de fracciones (F9B8, F10B8, F11B8, F12B8 y F13B8) el compuesto mayoritario es el linalol. En estas fracciones también se pueden encontrar compuestos como el terpinen-4-ol, el murelono o el eucaliptol.

En la Figura 44 se presenta el cromatograma del aceite esencial de albahaca (mezcla OB7 y OB8).

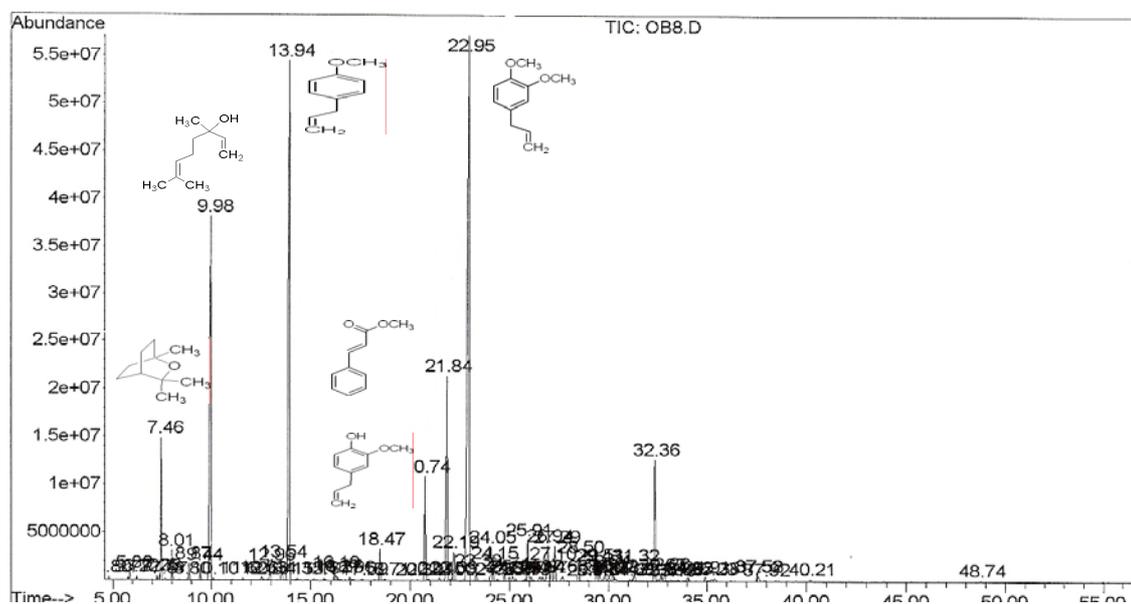


Figura 44. Cromatograma del aceite esencial de albahaca (mezcla de variedades OB7 y OB8).

En la Tabla 13 se muestra la composición del aceite esencial, fracciones y subfracciones de albahaca, variedad OB17, identificadas mediante CG-EM.

En las fracciones F1B17, F2B17, F3B17 y subfracciones F21B17, F22B17 y F23B17, resultó ser el compuesto mayoritario el estragol, al igual que en el aceite esencial sin fraccionar.

Sin embargo, en las fracciones F6B17, F8B17 y F9B17 los compuestos mayoritarios aparecieron a tiempos de retención muy elevados y no fueron identificados ya que se consideró que esos compuestos ya no eran tan volátiles y no podían ser los responsables de la actividad insecticida.

En la Figura 45 se presenta el cromatograma del aceite esencial de albahaca, variedad OB17, sin fraccionar.

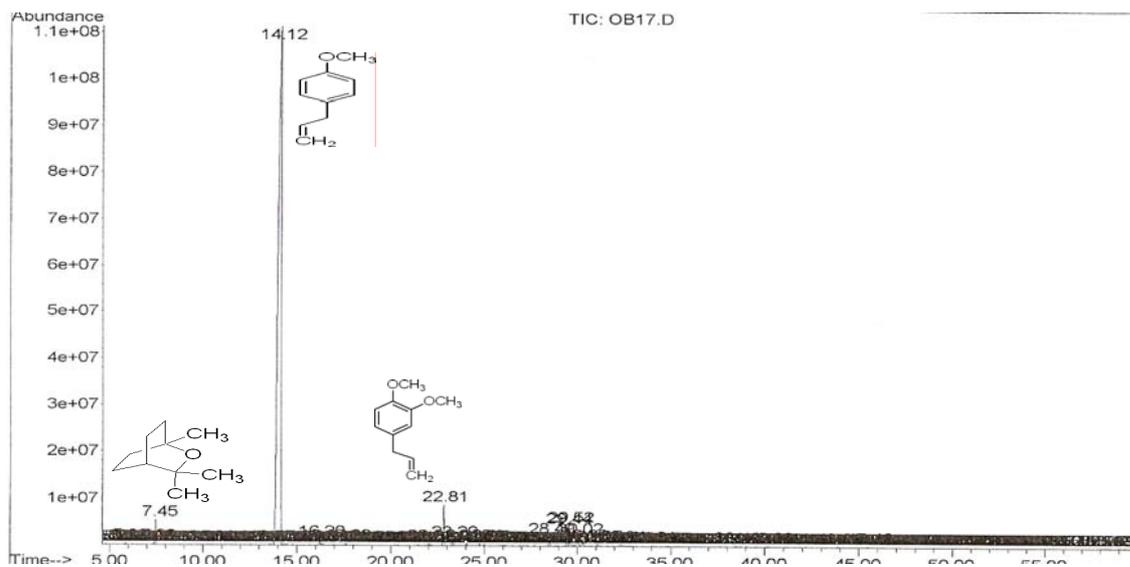


Figura 45. Cromatograma del aceite esencial de albahaca (variedad OB17).

En la Tabla 14 se muestra la composición del aceite esencial y fracciones de albahaca (variedad OB25) identificadas mediante CG-EM.

En la fracción F4B25 y F5B25, el compuesto mayoritario fue el estragol.

Mientras que en las fracciones F6B26 y F7B25 el compuesto que apareció en mayor proporción fue el linalol.

La fracción F8B25 determinó al chavicol como el compuesto principal, seguido del linalol.

En la Figura 46 se presenta el cromatograma del aceite esencial de albahaca, variedad OB25, sin fraccionar.

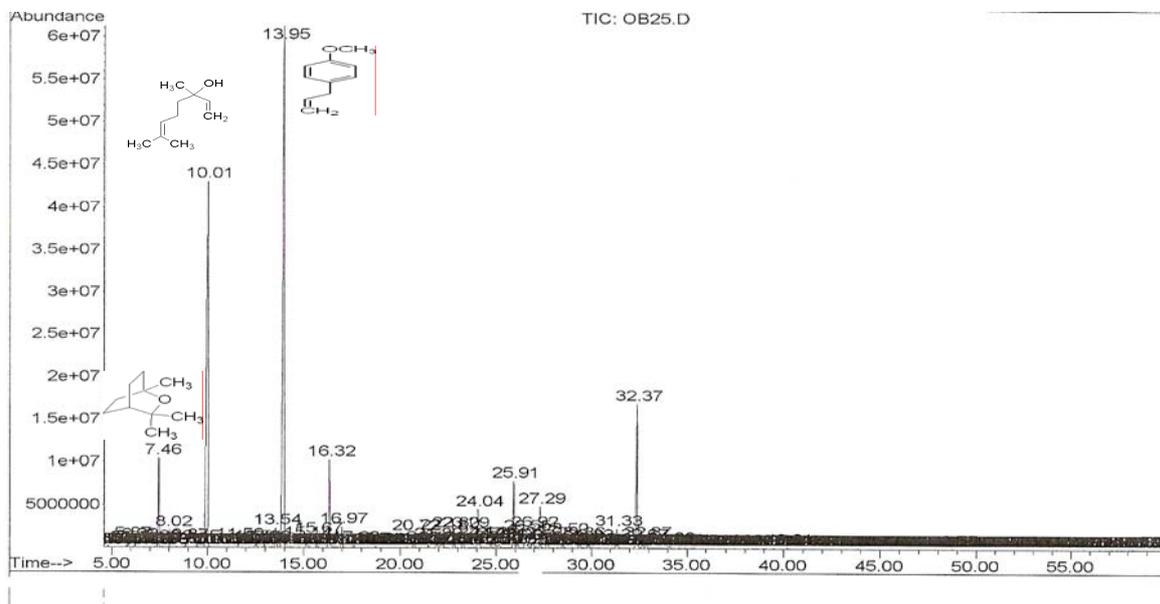


Figura 46. Cromatograma del aceite esencial de albahaca (variedad OB25).

Finalmente en la Tabla 14 también se muestra la composición del aceite esencial y fracciones de albahaca (variedad OB43) identificadas mediante CG-EM.

Tanto en el aceite esencial como en las fracciones F1B43 y F2B43 el compuesto mayoritario fue el estragol, mientras que en la fracción F3B43 el componente que se halló en mayor proporción fue el linalol.

En la Figura 47 se presenta el cromatograma del aceite esencial de albahaca (variedad OB43).

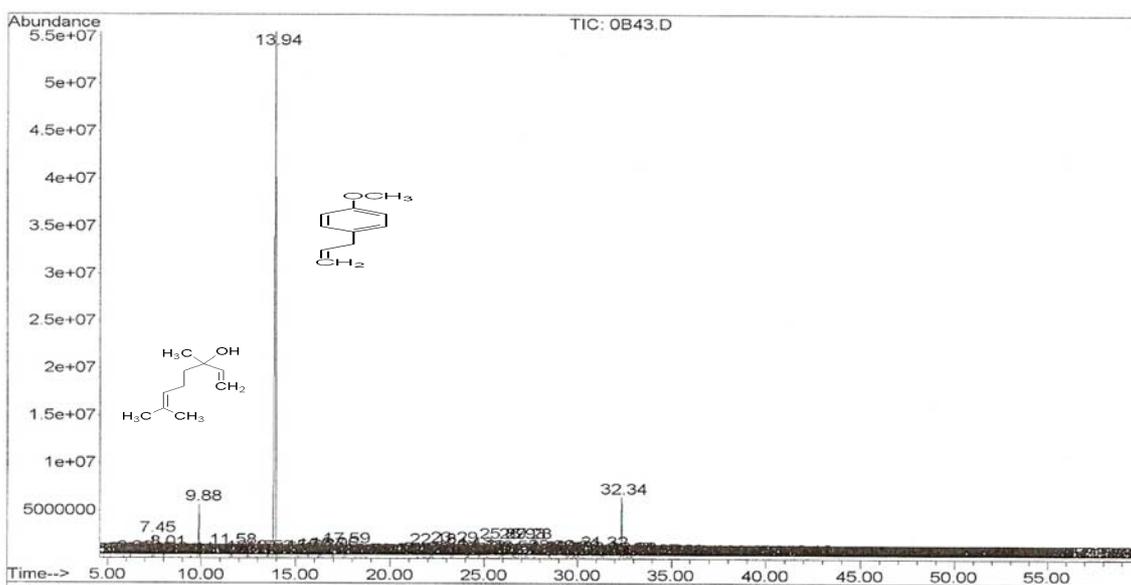


Figura 47. Cromatograma del aceite esencial de albahaca (variedad OB43).

En las Tablas 10, 11, 12, 13 y 14 se expresa la composición de los diferentes aceites esenciales con sus fracciones y subfracciones.

Tabla 10. Compuestos identificados en el aceite esencial de coriandro.

Compuesto ^a	TR ^b	I.R. ^c	Composición (%) en el aceite esencial o en cada fracción activa ^d								
			C								
			F1C	F3C	F4C	F5C	F53C	F54C	F55C	F6C	
α -Tuyeno	5,00	934	0,03	0,18							
α -Pino	5,18	941	1,52	8,14							
Camfeno	5,56	956	0,16	1,73							
Sabineno	6,20	979	0,16	1,24							
β -Pino	6,30	982	0,13	1,58							
Mirceno	6,67	995	0,32	3,92							
α -Terpineno	7,48	1022	0,03								
p-Cimeno	7,75	1031	3,13		0,12						
Limoneno	7,88	1035	0,98	35,06							
Eucaliptol	7,98	1038	0,03	12,04							
Cis-ocimeno	8,18	1044	0,01								
Trans-ocimeno	8,54	1055	0,01	0,11							
γ -Terpineno	8,94	1067	5,18	26,97	0,17						
Hidrosabineno	9,23	1075	0,11								
Z-Linaloloxido	9,43	1081	0,11				0,23				2,85
Terpinoleno	10,01	1097	0,37	2,24							2,78
Linalol	10,81	1119	75,97		44,95	69,11	87,51	28,92	96,94	96,61	27,01
Alcanfor	12,28	1156	5,27	0,12	15,80	14,86	5,95	64,98	2,29	0,50	0,42
Mentona	13,01	1173	0,02								
Isoborneol	13,12	1176	0,06								
Terpinen-4-ol	13,61	1188	0,36		0,22	0,44	0,55	0,12	0,57	0,38	0,18
α -Terpineol	14,17	1201	0,48				0,46				5,17
Mirtenol	14,42	1206	0,02								
Verbenol	14,98	1219	0,02								
Trans Carveol	16,23	1247			0,10						
Carvona	16,46	1252	0,03		0,20	0,25	0,13	1,25			
Geraniol	16,98	1264	2,68				2,29			0,42	18,11
Geranial	17,66	1279	0,01								0,70
Carvacrol	19,04	1309			0,32	0,16					0,32
Geranil acetato	22,63	1389	2,37		24,70	12,27	1,72	0,95			2,07
Acido mirístico	38,26	1751									19,08
Total % área identificada			99,58	93,34	86,58	97,08	98,86	96,22	99,80	97,92	78,72

^a compuestos ordenados según el orden de elución; ^b TR = tiempo de retención (min)

^c Índice Kovat (HP-5); ^dC= aceite esencial de coriandro; FiC or FiiC= fracción o subfracción del aceite esencial.

Tabla 11. Compuestos identificados en el aceite esencial de alcaravea.

Compuesto ^a	TR ^b	I.R. ^c	Composición (%) en el aceite esencial o en cada fracción activa ^d																	
			A	F2A	F21A	F5A	F51A	F52A	F6A	F63A	F64A	F65A	F7A							
α -Tuyeno	5,01	935	0,01																	
α -Pino	5,19	942	1,53	7,66	6,40															
α -Fencheno	5,52	954	0,01																	
Camfeno	5,57	956	0,07	0,52	0,40															
Sabineno	6,21	979	0,07	0,32	0,28															
β -Pino	6,31	983	0,10	0,68	0,61															
Mirceno	6,68	996	0,30	1,41	1,73															
α -Felandreno	7,11	1010	0,12		0,31															
p-Cimeno	7,77	1031	0,49	0,91	0,47															
Limoneno	8,01	1039	19,72	79,86	87,44	0,29	0,33													
Cis-ocimeno	8,14	1043	0,04																	
Trans-ocimeno	8,55	1055	0,02																	
γ -Terpineno	8,94	1067	0,19		0,81															
Fenchona	10,04	1098	3,72				7,25		77,78	4,24	10,26				0,16					
Linalol	10,45	1109	0,04	0,12																2,55
Limoneno oxidocis	11,79	1144	0,07	1,63	0,20				1,70	0,14	0,43									
p-Menta-2,8-dienol	11,88	1146																		6,45
Limoneno oxidotrans	11,97	1148	0,15	0,63			0,17		3,16	0,24	0,87									
Alcanfor	12,23	1155	0,11							0,23	0,57	0,16	0,15							0,87
Terpinen-4-ol	13,60	1187	0,07																	3,14
α -Terpineol	14,18	1201	0,06																	1,97
Dihidrocarvona cis	14,45	1207								0,36										
Estragol	14,52	1209	1,36	0,34			5,36	5,88	2,05	0,13	0,52									
Dihidrocarvona trans	14,77	1214	0,13							0,25										
Cis Carveol	15,58	1233	0,29																	17,12
Dihidrocarveol	16,03	1243	0,14																	6,05
Trans Carveol	16,23	1247	0,11																	
Carvona	16,77	1259	45,50	0,64	0,17					92,70	80,27	96,73	95,72							2,63
Cis-anetol	16,87	1261						0,50												

p-Anisaldehido	17,01	1264	0,37			1,42	1,75	1,72						12,20
Perillaldehido	17,82	1282	0,30						0,62	2,14				
<i>E</i> -anetol	18,52	1297	23,86			84,10	90,62	3,15	0,31	0,74				0,53
Timol	18,65	1300	0,01											
Carvacrol	19,06	1309	0,04							0,36				
α -Copaeno	22,21	1379	0,01											
Acetato de geranilo	22,62	1389	0,02											
Germacreno	26,68	1484	0,01											
Isoeugenol	27,44	1502	0,02											
Óxido de cariofileno	30,82	1585	0,05											
Total % área identificada			99,12	94,72	98,83	98,59	99,10	89,57	99,25	96,16	97,02	96,03	53,54	

^a compuestos ordenados según orden de elución.

^b TR = tiempo de retención (min)

^c Índice Kovat (HP-5)

^d A= aceite esencial de alcaravea; FiA or FiiA= fracción o subfracción del aceite esencial

Tabla 12. Compuestos identificados en el aceite esencial de albahaca: mezcla de las variedades OB7 y OB8.

Compuesto ^a	TR ^b	I.R. ^c	Composición (%) en el aceite esencial o en cada fracción activa ^d												
			OB7-OB8			F1B8	F2B8	F3B8	F4B8	F5B8	F6B8	F9B8	F10B8	F11B8	F12B8
p-Xileno	3,97	892								0,10					
α-Pineno	4,79	926	0,05												
β-Felandreno	5,76	963	0,05												
β-Pineno	5,86	967	0,14	0,13											
Mirceno	6,21	979	0,07												
p-Cimeno	7,24	1014	0,08	0,22											
Limoneno	7,37	1019	0,08	0,15											
Eucaliptol	7,45	1021	2,85							0,62	1,13	3,18	2,40	0,48	
Cis-ocimeno	8,01	1039	0,58	0,56											
Linaloloxidocis	8,86	1065	0,36										4,98	4,98	
Linaloloxidotrans	9,44	1081	0,36										3,42	3,42	
Linalol	9,98	1096	14,46							49,18	72,63	59,57	46,45	46,45	
Alcanfor	11,59	1139	0,06								0,16	0,13			
Borneol	12,53	1162	0,11										1,08	1,01	
Terpinen-4-ol	12,95	1172	0,41							2,37		2,66	1,26	1,26	
α-Terpineol	13,53	1186	0,57								2,41			5,18	
Estragol	13,93	1195	19,61	64,33											
Geraniol	15,16	1223	0,05												0,32
Neral	15,67	1235	0,05							0,37	0,15	0,33	0,32		
p-Anisaldehido	16,19	1246	0,22	0,25						0,93		1,01	1,06	0,62	
Lavandulol	16,27	1248	0,13											1,83	
Chavicol	16,34	1249	0,12			0,12				0,63		0,70	0,75		
Geranial	16,95	1263	0,10							0,70	0,30	0,64	0,62	0,21	
E-anetol	17,59	1277	0,05			0,32	0,16								
Propilanisol	18,21	1291				0,10									
Carvacrol	18,47	1296	0,88			17,56	3,87	0,20							
α-Cubebeno	20,34	1338	0,05			0,20									
Eugenol	20,73	1346	3,20			22,99	22,19	4,39	0,38						0,30
α-Copaene	21,45	1362	0,09	0,41											
E-Metilcinnamato	21,84	1371	7,20	0,23	40,88	41,93	11,92								
β-Elemeno	22,18	1379	0,85	3,41											
Metil eugenol	22,94	1396	29,01			9,70	30,20	82,53	95,09	94,93	1,73				

β - Caryofileno	23,30	1404			0,58	0,42		0,42						
α -Bergamoteno	24,04	1421							0,43		0,18			
α -Guaiano	24,14	1424	0,34	0,74										
α -Humuleno	24,74	1438	0,99	4,24										
β -Farneseno	24,97	1443	0,52	1,79										
Cinamato de etilo	25,29	1451	0,23	0,25										
γ -Muroloeno	25,78	1462	0,14	0,33										
Germacreno	25,90	1465	0,05	0,18										
α -Selineno	26,54	1480	1,33	0,60									0,67	
Butilatohidroxitolueno	26,67	1483	0,20	1,71										
β -Guaiano	26,96	1490		2,45										
β -Bisaboleno	27,12	1494	0,51	2,30										
α -Muroloeno	27,28	1498	1,10	3,43										
δ -Cadineno	27,68	1508	0,25	0,89				3,84						
γ -Bisaboleno	28,49	1528	0,71	0,96										
Metoxicinamaldehido	29,43	1551	0,57	1,09									2,44	
Aromandreno	29,68	1557									0,11			
Espatuleno	29,83	1560	0,35	0,11										1,90
Óxido de cariofileno	30,02	1565	0,20	0,44					1,03		0,60	0,56	0,32	
Sesquifelandreno	32,56	1627		0,14										
α -Cadineno	30,62	1580									0,40			
Muroloeno	31,64	1604						0,38			19,97			
β -Selineno	32,11	1616						0,17			0,52			
α -Cadinol	32,80	1632		0,23										
α -Bisabolol	34,01	1661	0,14	0,21						0,84	0,74	0,62	1,28	
Total(%) área identificada			89,47	91,77	92,45	98,77	99,04	95,09	99,80	58,40	97,93	69,57	72,15	72,75

^a los compuestos están ordenados según orden de elución.; ^b TR = tiempo de retención (min) ; ^c Índice Kovat (HP-5);

^dOB7-OB8 = aceite esencial de mezcla de albahacas OB7 y OB8; FiB8= fracción del aceite esencial.

Tabla 13. Compuestos identificados en el aceite esencial de albahaca: variedad OB17.

Compuesto ^a	TR ^b	I.R. ^c	Composicion (%) en el aceite esencial o en cada fracción activa ^d									
			OB17			F3B17	F6B17	F8B17	F9B17			
			F1B17	F2B17	F21B17	F22B17	F23B17					
Etilbenceno	3,85	887						0,35		1,77		
p-Xileno	3,97	892						0,63	1,28	4,24		
α -Pino	4,80	926	0,03	0,58								
β -Felandreno	5,76	963	0,02	0,54								
β -Pino	5,86	967	0,06	1,27								
Mirceno	6,21	979	0,02	0,44								
p-Cimeno	7,24	1014	0,02	0,72								
Limoneno	7,37	1019	0,07	2,02								
Eucaliptol	7,45	1021	0,88						2,58	1,21		
γ -Terpineno	8,39	1051	0,01									
Linaloloxido trans	9,44	1081	0,01									
Linalol	9,88	1094	0,02							30,70		
Fenchol	10,40	1108	0,02									
Alcanfor	11,60	1139	0,01									
Borneol	12,54	1162	0,03									
Terpinen-4-ol	12,96	1172	0,01									
α -Terpineol	13,56	1186	0,12							1,25		
Estragol	14,13	1200	88,77	43,51	99,46	96,71	99,22	100	96,12		4,88	
Fenchil acetato	14,79	1215	0,02						0,33			
Neral	15,68	1235	0,02									
Carvona	15,78	1237	0,01									
p-Anisaldehido	16,20	1246	0,32			0,14						
Chavicol	16,34	1249	0,12							3,97	1,81	8,60
Geranial	16,96	1263	0,04									
<i>E</i> -anetol	17,60	1277	0,13						0,14			
Timol	18,02	1286	0,04									
Propilanisol	18,20	1290	0,03									
Carvacrol	18,39	1295	0,02									
α -Cubebeno	20,34	1338	0,02	0,98								
α -Copaeno	21,45	1362	0,06	2,16								
β -Bourboneno	21,83	1371	0,03	0,87								

β -Elemeno	22,18	1379	0,01	0,70									
Metil eugenol	22,81	1393	2,21										
β - Cariofileno	23,29	1404	0,35	9,71									
α -Bergamoteno	24,03	1421	0,16	5,43									
α -Humuleno	24,72	1437	0,12	3,72									
β -Farneseno	24,97	1443	0,10	2,56									
Germacreno	25,89	1465	0,04	0,74									
α -Selineno	26,47	1479	0,02	0,50									
Butilato hidroxitolueno	26,67	1483							0,96	5,49	31,42		
β -Bisaboleno	27,09	1494	0,04	1,22									
α -Murolo	27,28	1498	0,06	0,71									
δ -Cadineno	27,67	1508	0,05	0,91									
γ -Bisaboleno	28,49	1528	0,50										
β -Bisabolol	28,51	1528		7,14									
3-Metoxicinamaldehido	29,44	1551	1,23	0,43	0,28	1,55	0,40						
Espatuleno	29,82	1560	0,04										
Óxido de cariofileno	30,02	1565	0,74	0,74									
Murolo	31,64	1604									8,63		
α -Bisabolol	34,01	1661	0,09										
Total % área identificada			99,68	87,69	99,73	98,41	99,62	100	96,59	8,49	50,37	50,90	

^a los compuestos estan ordenados según orden de elución.

^bTR = tiempo de retención (min)

^cIndice Kovat (HP-5)

^c OB17= aceite esencial de albahaca: variedad OB17; FiB17o FiiB17= fracción o subfracción del aceite esencial.

Tabla 14. Compuestos identificados en el aceite esencial de albahaca: variedades OB25 y OB43.

Compuesto ^a	TR ^b	I.R. ^c	Composición (%) en el aceite esencial o en cada fracción activa ^d							
			OB25					OB43		
			F4B25	F5B25	F6B25	F7B25	F8B25	F1B43	F2B43	F3B43
2-Hexeno	3,74	883					0,17			
α -Pino	4,80	926	0,05					0,05		
β -Felandreno	5,76	963	0,05					0,03		
β -Pino	5,86	967	0,18			0,15		0,09		0,16
Mirceno	6,21	979	0,14					0,17	0,25	
6-Metil-hepte-eno	6,23	980		0,19						
p-Cimeno	7,25	1015	0,03					0,03		
Limoneno	7,37	1019	0,10					0,12	0,20	
Eucaliptol	7,45	1021	2,66	4,26	8,27	5,58		1,36		5,24
Cis-ocimeno	8,02	1039	0,52					0,51	0,82	
γ -Terpino	8,39	1051	0,02					0,02		
Octanal	8,79	1062						0,03		
Linaloloxido cis	8,87	1065	0,16					0,06		
Fenchona	9,28	1077		0,30						
Linaloloxido trans	9,44	1081	0,14					0,14	0,14	
Linalol	10,01	1097	26,14	3,17	51,31	71,10	23,96	3,79		27,07
Fenchol	10,35	1106	0,02							
Alcanfor	11,59	1139	0,22	2,52	0,99	0,21		0,83		4,27
Borneol	12,54	1162	0,14					0,34		2,55
Terpino-4-ol	12,96	1172	0,13		0,33	0,31		0,09		0,65
α -Terpineol	13,54	1186	0,94					0,38		
Estragol	13,95	1196	32,60	96,31	16,61			63,18	74,32	53,44
Fenchil acetato	14,76	1214	0,02							
Geraniol	15,13	1222	0,38	0,13				0,21		0,38
Neral	15,67	1235	0,48		2,12	1,91	0,94	0,37		2,64
p-Anisaldeo	16,19	1246						0,16	0,57	0,20
Lavandulol	16,27	1248						0,65		
Chavicol	16,32	1249	4,30		0,75	1,03	44,17			0,42
Geraniol	16,97	1263	0,87		3,18	2,84	1,45	0,58		3,77
Bornil acetato	17,12	1267			1,57					0,22
E-anetol	17,59	1277	0,12		0,11			1,04		5,32
Timol	18,11	1288	0,01					0,02		

Propilanol	18,18	1290	0,01						0,03			
Carvacrol	18,46	1296							0,03		0,13	
Etil geraniato	18,82	1304		0,40								
α -Cubebeno	20,33	1337	0,05						0,06			
Eugenol	20,71	1346	0,64	12,54	1,64				0,03		0,17	
α -Copaeno	21,45	1362	0,14						0,12	0,21		
<i>E</i> -Metil cinamato	21,79	1370			0,44				0,25	0,12	1,06	
β -Bourboneno	21,89	1372	0,35									
β -Elemeno	22,18	1379	0,68						1,03	1,89		
Metil eugenol	22,95	1396	0,02	11,72	1,54				0,10		0,71	
β -Cariofileno	23,29	1404	0,82						1,21	2,24		
α -Bergamoteno	24,03	1421	1,72						0,16	0,32		
α -Humuleno	24,73	1437	0,36						0,50	0,94		
β -Farneseno	24,97	1443	0,22						0,10	0,24		
Etil cinamato	25,30	1451	0,05						0,04	0,11		
Germacreno	25,90	1465	3,22						1,68	3,10		
β -Selineno	26,53	1480							0,53	0,96		
α -Selineno	26,54	1480	0,88									
Butilatohidroxitolu	26,68	1484		0,47				0,17				
β -Bisaboleno	27,10	1494	0,07	0,95				0,64	0,06			
α -Muroleno	27,28	1498	1,98		0,13	0,11			1,64	2,70	0,22	
δ -Cadineno	27,68	1508	0,55	9,30					0,30	0,48		
γ -Bisaboleno	28,49	1528	0,52						0,50	0,96		
3-Metoxicinamalde	29,48	1552	0,01	1,91					0,45	0,13	0,19	2,23
Espatuleno	29,82	1560	0,32		0,13	0,68			0,52			3,37
Cariofileno oxido	30,02	1565	0,14		0,24	0,10			0,41		1,65	0,19
Muroleno	31,66	1605		14,68				0,68				
β -Selineno	32,12	1616		0,45								
α -Bisabolol	34,02	1661	0,09		0,25	0,25			0,24		0,15	0,84
Total % area identificada			83,32	98,35	84,78	70,91	81,92	69,80	84,24	90,11	79,33	38,54

^a compuestos ordenados según orden de elución.

^bTR = tiempo de retención (min)

^cIndice Kovat (HP-5)

^d OB25= aceite esencial de albahaca: variedad OB25; FiB25 fracción del aceite esencial OB25; OB43 = aceite esencial de albahaca: variedad OB43; FiB43 = fracción del aceite esencial OB43.

Como resumen de los resultados obtenidos integrando la cuantificación (CG-EM) de los compuestos activos así como la actividad en plagas de almacén del arroz de las mezclas presentes en las fracciones de aceites esenciales utilizadas en los bioensayos, se han elaborado las tablas 15 y 16.

Toda esta parte de la tesis ha sido sintetizada en un artículo científico (López *et al.*, 2008) publicado en la revista *Journal of Stored products Research*.

Tabla 15. Toxicidad del aceite esencial de coriandro y alcaravea en plagas del arroz almacenado.

Aceite esencial Fracción Subfracción ^a	Componentes Cuantificación (ppm) ^b	Componente principal (%) ^c	Mortalidad (%) después de 24 h ^d		
			<i>S.oryzae</i>	<i>R.dominica</i>	<i>C.pusillus</i>
C	Linalol(1617), Alcanfor(287), γ -Terpineno(228), Limoneno(215), Geraniol(134), Carvona(90)	62.90	56 \pm 6.6	90 \pm 10.0	100 \pm 0.0
F1C	Limoneno(1059), γ -Terpineno(793), Eucaliptol (363)*, Alcanfor(131)	45.14	0 \pm 0.0	3 \pm 3.3	93 \pm 6.6
F3C	Linalol(715), Alcanfor(436), Geranil acetato(393)*, γ -Terpineno(131), Carvona(91)	40.50	3 \pm 3.3	63 \pm 12.0	100 \pm 0.0
F4C	Linalol(1664), Alcanfor(642), Geranil acetato(295)*, Carvona(93)	61.76	30 \pm 20.8	96 \pm 3.3	100 \pm 0.0
F5C	Linalol(2003), Alcanfor(326), Geraniol(128), Carvona(91)	78.61	60 \pm 15.2	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
F53C	Alcanfor(1282), Linalol(486), Carvona(98)	68.70	3 \pm 3.3	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
F54C	Linalol(1723), Alcanfor(185)	90.30	63 \pm 31.8	96 \pm 3.3	100 \pm 0.0
F55C	Linalol(1450), Alcanfor(137), Geraniol(43)	88.95	73 \pm 21.8	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
F6C	Ácido mirístico (598)*, Geraniol(567), Linalol(563), Alcanfor(136)	32.10	3 \pm 3.3	0 \pm 0.0	73 \pm 21.8
A	Carvona(972), Limoneno(834), <i>E</i> -Anetol(365), Fenchona(280), Linalol(165), γ -Terpineno(136), Alcanfor(131), Estragol(90)	32.70	90 \pm 5.7	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
F2A	Limoneno(1467), Linalol(166), Carvona(96), Estragol(59)	82.10	3 \pm 3.3	60 \pm 10.0	90 \pm 5.7
F21A	Limoneno(1416), γ -Terpineno(141), Carvona(91)	85.92	3 \pm 3.3	20 \pm 20.0	53 \pm 24.0
F5A	<i>E</i> -Anetol(880), Fenchona(326), Limoneno(204), Estragol(159)	56.10	10 \pm 10.0	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
F51A	<i>E</i> -Anetol(860), Limoneno(204), Estragol(168)	69.80	40 \pm 25.1	86 \pm 6.6	100 \pm 0.0
F52A	Fenchona(554), Estragol(64), <i>E</i> -Anetol(64)	81.23	20 \pm 5.7	10 \pm 5.7	53 \pm 24.0
F6A	Carvona(1269), Fenchona(256), Alcanfor(134), <i>E</i> -Anetol(59), Estragol(57)	71.50	73 \pm 21.8	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
F63A	Carvona(1474), Fenchona(420), Alcanfor(152), Estragol(98), <i>E</i> -Anetol(65)	66.72	96 \pm 3.3	100 \pm 0.0	100 \pm 0.0
F64A	Carvona(1364), Alcanfor(131)	91.23	100 \pm 0.0	90 \pm 10.0	100 \pm 0.0
F65A	Carvona(1118), Fenchona(186), Alcanfor(130)	77.96	96 \pm 3.3	86 \pm 8.8	100 \pm 0.0
F7A	(<i>Z</i>)-Carveol(1350)*, <i>p</i> -Anisaldehydo(962)*, Linalol(205), Alcanfor(148), Carvona(115), <i>E</i> -Anetol(60)	47.53	16 \pm 8.8	6 \pm 3.3	36 \pm 31.8

^a C = aceite esencial de coriandro (*Coriandrum sativum*); A = aceite esencial de alcaravea (*Carum carvii*); FiC, FiiC, FiA, FiiA = fracciones o subfracciones activas del correspondiente aceite esencial. ^b los compuestos donde la cantidad fue estimada a partir de su porcentaje relativo se han marcado con *. ^c porcentaje del total de compuestos identificados. ^d media \pm error estándar de 3 repeticiones; cada repetición consistió en 10 insectos dentro de un vial de 15 ml expuesto a 1 μ l de vapores de aceite esencial (o fracción o subfracción), a 30°C en la oscuridad; la mortalidad del control a las 24h = 0 \pm 0.

Tabla 16. Toxicidad de los aceites esenciales de albahaca en plagas de arroz almacenado.

Aceite Esencial	Componentes		Mortalidad (%) después de 24 h ^d			
	Fracción Subfracción ^a	Cuantificación (ppm) ^b	Componente principal (%) ^c			
				<i>S.oryzae</i>	<i>R.dominica</i>	<i>C.pusillus</i>
OB7-OB8	Metil Eugenol(303), Linalol(258), Limoneno(197), Estragol(156), Alcanfor(126), <i>E</i> -Anetol(57), Geraniol(32)		26.83	30 ± 10.0	73 ± 26.6	93 ± 6.6
F1B8	Estragol(434), Limoneno(198)		68.67	80 ± 20.0	80 ± 15.2	100 ± 0.0
F2B8	<i>(E)</i> -Metilcinamato(615)*, Eugenol(346)*, Carvacrol(264)*, Metil Eugenol(146), <i>E</i> -Anetol(57)		43.06	83 ± 6.6	60 ± 11.5	100 ± 0.0
F3B8	<i>(E)</i> -Metilcinamato(644)*, Metil Eugenol(464), Eugenol(340), <i>E</i> -Anetol(57)		42.79	77 ± 18.5	77 ± 3.3	100 ± 0.0
F4B8	Metil Eugenol(1117), <i>(E)</i> -Metilcinamato(161)*		87.40	83 ± 3.3	93 ± 3.3	100 ± 0.0
F5B8	Metil Eugenol(1001)		100.00	67 ± 6.6	100 ± 0.0	93 ± 6.6
F6B8	Metil Eugenol(68)		100.00	33 ± 8.8	93 ± 6.6	93 ± 3.3
F9B8	Linalol(348), Metil Eugenol(48)		87.87	17 ± 12.0	77 ± 18.5	83 ± 3.3
F10B8	Linalol(186), Alcanfor(126), Muroleno(51)*		51.23	53 ± 3.3	77 ± 18.5	100 ± 0.0
F11B8	Linalol(563), Alcanfor(127)		81.59	47 ± 12.0	63 ± 3.3	100 ± 0.0
F12B8	Linalol(492)		100.00	47 ± 21.8	90 ± 10.0	100 ± 0.0
F13B8	Linalol(397)		100.00	30 ± 0.0	50 ± 15.2	100 ± 0.0
OB17	Estragol(579), Limoneno(197), Linalol(164), γ -Terpineno(129), Alcanfor(126), Carvona(89), Metil Eugenol(62), <i>E</i> -Anetol(57)		41.26	63 ± 23.3	87 ± 8.8	100 ± 0.0
F1B17	Estragol(224), Limoneno(206)		52.09	23 ± 23.3	47 ± 21.8	100 ± 0.0
F2B17	Estragol(642)		100.00	80 ± 20.0	80 ± 15.2	100 ± 0.0
F21B17	Estragol(587)		100.00	50 ± 25.1	73 ± 6.6	100 ± 0.0
F22B17	Estragol(632)		100.00	43 ± 29.6	86 ± 8.8	100 ± 0.0
F23B17	Estragol(55)		100.00	7 ± 3.3	50 ± 5.7	100 ± 0.0
F3B17	Estragol(613), <i>E</i> -Anetol(56)		91.63	37 ± 27.3	93 ± 6.6	100 ± 0.0
F8B17	Linalol(164)		100.00	50 ± 10.0	0 ± 0.0	7 ± 3.3
F9B17	Butilato hidroxitolueno(354)*, Chavicol(97)*, Estragol(55)		69.96	57 ± 8.8	3 ± 3.3	13 ± 8.8
OB25	Linalol(292), Limoneno(197), Estragol(182), γ -Terpineno(129), Alcanfor(128), <i>E</i> -Anetol(57), Chavicol(48)*, Metil Eugenol(39)		27.23	73 ± 13.3	37 ± 20.3	100 ± 0.0
F4B25	Estragol(699), Geraniol(34)		95.36	77 ± 12.0	93 ± 3.3	100 ± 0.0
F5B25	Estragol(120), Muroleno(107)*, Eugenol(91)		37.73	17 ± 8.8	27 ± 21.8	100 ± 0.0
F6B25	Linalol(466), Alcanfor(135), <i>E</i> -Anetol(57), Metil Eugenol(52)		65.63	40 ± 30.5	97 ± 3.3	100 ± 0.0
F7B25	Linalol(494), Alcanfor(127)		79.55	73 ± 17.6	97 ± 3.3	100 ± 0.0
F8B25	Chavicol(689)*, Linalol(374)		64.81	33 ± 8.8	13 ± 3.3	97 ± 3.3

OB43	Estragol(459), Limoneno(197), Linalol(172), γ -Terpineno(129), Alcanfor(129), <i>E</i> -Anetol(57), Metil Eugenol(39), Geraniol(32)	37.80	63 \pm 8.8	57 \pm 21.8	100 \pm 0.0
F1B43	Estragol(534), Limoneno(198)	72.95	67 \pm 6.6	87 \pm 8.8	100 \pm 0.0
F2B43	Estragol(394), Alcanfor(180), <i>E</i> -Anetol(73)	60.89	100 \pm 0.0	97 \pm 3.3	100 \pm 0.0
F3B43	Linalol(361), Geraniol(37)	90.70	60 \pm 17.3	27 \pm 6.6	100 \pm 0.0

^a OB7-OB8 = mezcla del aceite esencial de albahaca, variedades OB7 y OB8; OB17 = aceite esencial de albahaca, variedad OB17; OB25 = aceite esencial de albahaca, variedad OB25 ; OB43 = aceite esencial de albahaca, variedad OB43; FiB8, FiB17, FiiB17, FiB25 y FiB43 = fracción o subfracción activa del correspondiente aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*). ^b los compuestos donde la cantidad fue estimada a partir de su porcentaje relativo se han marcado con *. ^c porcentaje del total de compuestos cuantificados. ^d media \pm error estándar de 3 repeticiones; cada repetición consistió en 10 insectos dentro de un vial de 15 ml expuesto a 1 μ l de vapores del aceite esencial (o fracción o subfracción), a 30°C en oscuridad; la mortalidad de un control después de 24h = 0 \pm 0.

4.4. CONCENTRACIONES LETALES (CL₅₀) DE MONOTERPENOIDES EN PLAGAS DE ALMACÉN DEL ARROZ.

Las Concentraciones Letales 50 indican la dosis de producto que es necesario aplicar para producir mortalidad en el 50 % de la población del insecto.

La toxicidad volátil de los monoterpenoides. *E*-anetol, alcanfor, *S*-carvona, estragol, fenchona, geraniol, linalol y γ -terpineno contra *S. oryzae*, *R. dominica* y *C. pusillus* se muestran en las Tablas 17, 18 y 19 respectivamente.

Monoterpenoides tales como *S*-carvona (CL₅₀ = 2.74 mg.l⁻¹) y linalol (CL₅₀ = 4.89 mg.l⁻¹) tuvieron una alta actividad volátil contra *S. oryzae*, mientras que *S*-carvona (CL₅₀ = 6.60 mg.l⁻¹) y *E*-anetol (CL₅₀ = 8.90 mg.l⁻¹) tuvieron una acción similar contra *R. dominica*.

Para *C. pusillus*, fue con el estragol (CL₅₀ = 3.30 mg.l⁻¹), el alcanfor (CL₅₀ = 3.71 mg.l⁻¹), el linalol (CL₅₀ = 4.09 mg.l⁻¹) y la *S*-carvona (CL₅₀ = 4.75 mg.l⁻¹) los monoterpenoides con la más alta actividad.

Tabla 17. Concentraciones letales (CL₅₀) de monoterpenoides (a las 24 horas) en *S. oryzae*.

Compuesto	Dosis mg . l ⁻¹	Mortalidad (%)	CL ₅₀ (mg . l ⁻¹) (95 LF)	ordenada ± ES en origen	Pendiente± ES	χ ² (df)
<i>E</i> -Anetol	6.58	13				
	32.93	10		-2.84 ± 0.629	1.54 ± 0.397	35.95
	46.10	40				(10)
	65.86	80				
Alcanfor	46.42	23				
	92.85	46	91.14	-5.00 ± 1.042	2.55 ± 0.512	16.53
	139.28	73	(56.346-128.018)			(10)
	232.13	83				
<i>S</i> -Carvona	0.64	13				
	6.40	70	2.74	-0.85 ± 0.240	1.94 ± 0.294	31.95
	32.00	100	(0.804 - 7.006)			(10)
	64.00	100				
Estragol	6.43	26				
	32.16	30	26.71	-2.16 ± 0.444	1.52 ± 0.278	26.77
	64.33	76	(8.211-58.719)			(10)
	128.66	93				
Fenchona	6.32	3				
	18.96	23	25.59	-5.47 ± 0.910	3.88 ± 0.630	17.55
	31.60	63	(18.794 - 34.110)			(10)
	63.20	96				
Geraniol	29.30	13				
	58.60	33	151.29	-2.83 ± 0.678	1.29 ± 0.337	13.96
	117.20	50	(85.469-598.212)			(10)
	293.00	60				
Linalol	0.57	20				
	5.75	50	4.89	-0.69 ± 0.204	1.00 ± 0.176	28.19
	28.76	70	(0.702-16.239)			(10)
	57.53	93				
γ-Terpineno	56.66	13				
	113.33	33	186.89	-4.90 ± 1.112	2.16 ± 0.512	17.49
	170.00	43	(125.721-459.369)			(10)
	283.33	66				

Valores de χ² no fueron significativos (P > 0.05) excepto para alcanfor, γ-terpineno, geraniol y fenchona.

Tabla 18. Concentraciones letales (CL₅₀) de monoterpenoides (a las 24 horas) en *R. dominica*.

Compuesto	Dosis mg . l ⁻¹	Mortalidad (%)	CL ₅₀ (mg . l ⁻¹) (95 LF)	ordenada ± ES en origen	Pendiente± ES	χ ² (df)
<i>E</i> -Anetol	0.65	0				
	6.58	50	8.90	-1.77 ± 0.365	1.86 ± 0.293	13.32
	32.93	73	(4.639-14.551)			(10)
	65.86	100				
Alcanfor	23.21	6				
	32.49	33	38.14	-10.91 ± 1.872	6.89 ± 1.200	30.28
	46.42	70	(30.484 -52.941)			(10)
	92.85	100				
<i>S</i> -Carvona	0.64	3				
	6.40	36	6.60	-2.08 ± 0.431	2.53 ± 0.425	28.48
	32.00	100	(2.414-13.712)			(10)
	64.00	100				
Estragol	6.43	6				
	32.16	46	22.86	-4.68 ± 0.816	3.44 ± 0.533	27.72
	45.03	93	(11.277-33.444)			(10)
	64.33	100				
Fenchona	6.32	6				
	18.96	60	18.94	-3.99 ± 0.674	3.12 ± 0.493	24.18
	31.60	60	(11.474-27.801)			(10)
	63.20	100				
Geraniol	58.60	10				
	293.00	6	—	-1.71 ± 0.641	0.26 ± 0.232	24.45
	586.00	30				(10)
	2930.00	16				
Linalol	28.76	20				
	34.52	86	31.77	-20.07 ± 3.957	13.36 ± 2.592	22.56
	40.27	83	(26.832 -34.787)			(10)
	57.53	100				
γ-Terpineno	28.33	0				
	56.66	50	63.21	-9.42 ± 1.590	5.23 ± 0.874	10.94
	113.33	86	(52.051-76.254)			(10)
	283.33	100				

Valores de χ² no fueron significativos (P > 0.05) excepto para γ-terpineno, y *E*-anetol.

Tabla 19. Concentraciones letales (CL₅₀) de monoterpenoides (a las 24 horas) en *C. pusillus*.

Compuesto	Dosis mg . l ⁻¹	Mortalidad (%)	CL ₅₀ (mg . l ⁻¹) (95 LF)	ordenada ± ES en origen	Pendiente ± ES	χ ² (df)
<i>E</i> -Anetol	0.65	0				5.30
	19.76	76	10.30	-2.44 ± 0.929	2.41 ± 0.660	(7)
	65.86	96	(3.385-16.209)			
Alcanfor	0.46	3				
	23.21	93	3.71	-1.18 ± 0.369	2.07 ± 0.313	4.16
	46.42	100	(1.859-6.640)			(7)
<i>S</i> -Carvona	0.64	0				
	3.20	16	4.75	-3.81 ± 0.843	5.63 ± 1.233	11.08
	6.40	76	(3.587-6.509)			(7)
Estragol	0.64	3				
	6.43	76	3.30	-1.38 ± 0.362	2.66 ± 0.471	5.21
	32.16	100	(2.142-4.789)			(7)
Fenchona	6.32	20				
	12.64	76	9.51	-4.20 ± 0.851	4.30 ± 0.805	7.79
	18.96	86	(7.149-11.695)			(7)
Geraniol	5.86	0				
	29.30	46	32.391	-5.31 ± 1.323	3.51 ± 0.835	1.90
	58.60	80	(24.09640.460)			(7)
Linalol	0.57	0	4.09	-3.93 ± 0.806	6.43 ± 1.279	3.84
	2.89	16	(3.529-4.734)			(7)
	5.78	83				
γ-Terpineno	5.66	0				
	28.33	60	—	-7.47 ± 2.345	5.31 ± 1.544	7.96
	56.66	96				(7)

Valores de χ² fueron significativos (P < 0.05) para todos los monoterpenoides estudiados.

4.5. ESTUDIO SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA COMO UN POSIBLE MODO DE ACCIÓN DE ESTOS MONOTERPENOIDES.

Se estudió la inhibición de la acetilcolinesterasa, por algunos de los monoterpenoides, como un posible modo de acción de estos insecticidas ecológicos.

Los monoterpenoides seleccionados para realizar este estudio fueron: Fenchona, γ -Terpineno, Linalol, *S*-(+)-Carvona, Geraniol, *E*-Anetol, Estragol y Alcanfor.

Los siguientes gráficos representan la recuperación de la actividad enzimática después de 15 minutos, es decir, el progreso de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los ocho monoterpenoides antes mencionados, después de 15 minutos, a diferentes concentraciones de sustrato.

Desde la Figura 48 a la 55 se representa el progreso de inhibición de la enzima por los 8 monoterpenoides después de 15 minutos y a diferentes concentraciones de sustrato.

En la Figura 48 vemos como en general el % de inhibición disminuye al aumentar el tiempo, y la inhibición es menor cuando se aplica una menor concentración del monoterpenoide (fenchona 1mM).

En la Figura 49 el % de inhibición también disminuye con el tiempo a diferentes concentraciones del monoterpenoide (γ -terpineno). Además, cuando aplicamos una concentración del sustrato más alta (10 mM) el porcentaje de inhibición disminuye considerablemente.

Para el caso del linalol (Figura 50), el porcentaje de inhibición va disminuyendo durante los primeros minutos para luego aumentar ligeramente. Asimismo podemos ver que a mayor concentración del sustrato, menor inhibición a cualquier concentración del monoterpenoide, excepto a 100 mM. Para la *S*-carvona (Figura 51) se observa de manera general una leve disminución del porcentaje de inhibición con el tiempo.

Para el geraniol (Figura 52) de manera similar al γ -terpineno, el porcentaje de inhibición disminuye con el tiempo a diferentes concentraciones del monoterpenoide. Sin embargo a concentraciones de monoterpenoide más altas (50 mM y 100 mM) tiende a aumentar ligeramente a partir de los 10 minutos.

En la Figura 53 (*E*-anetol), el porcentaje de inhibición cae casi al 0 % desde el primer minuto de inhibición. Para el estragol (Figura 54) al igual que el linalol, el porcentaje de inhibición disminuye durante los primeros minutos para aumentar al final levemente. Finalmente, en la Figura 55 advertimos como al igual que para la *S*-carvona, se observa una ligera disminución del % de inhibición para cualquier concentración del monoterpenoide (alcanfor).

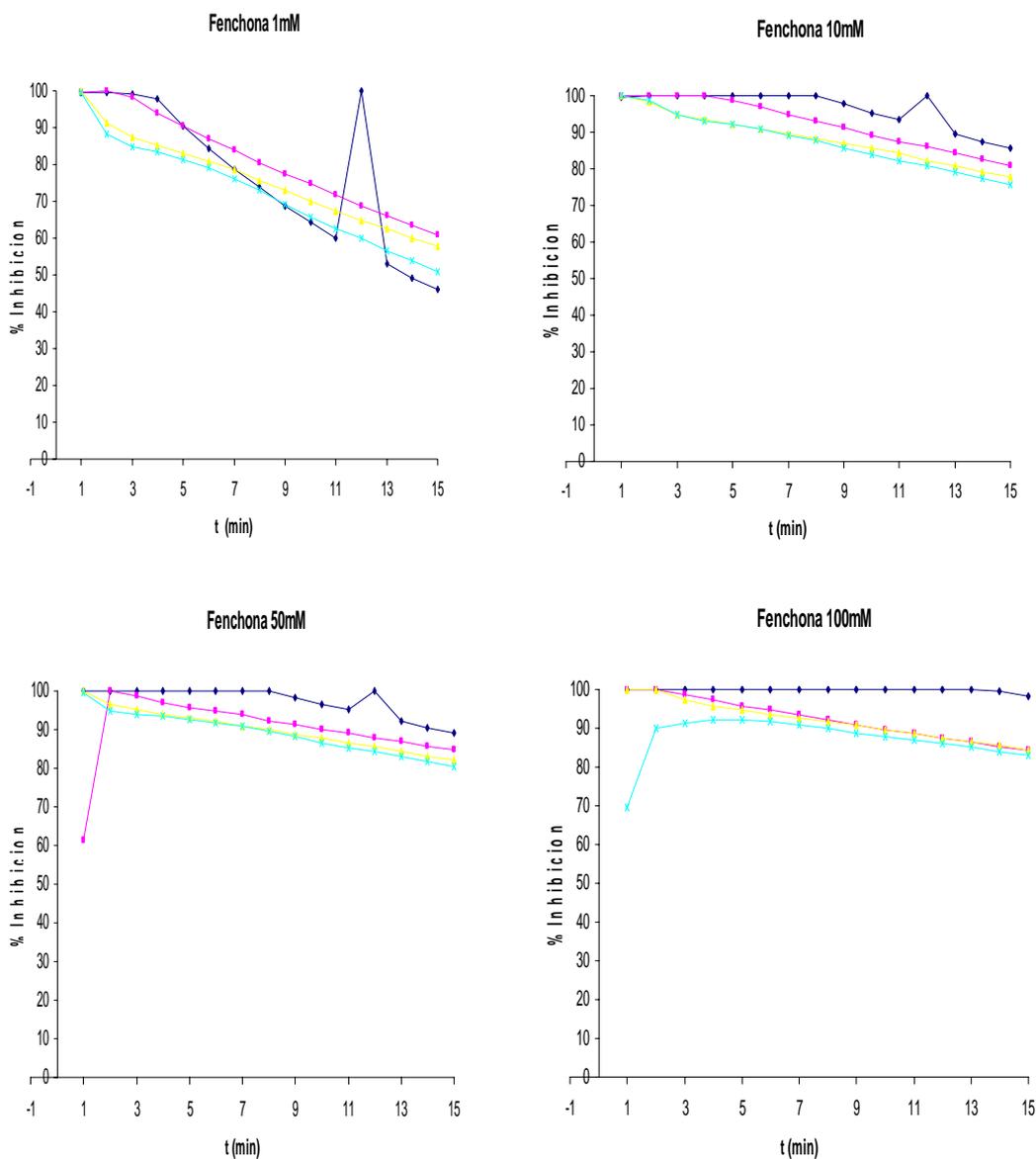


Figura 48. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por fenchedona (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetilcolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

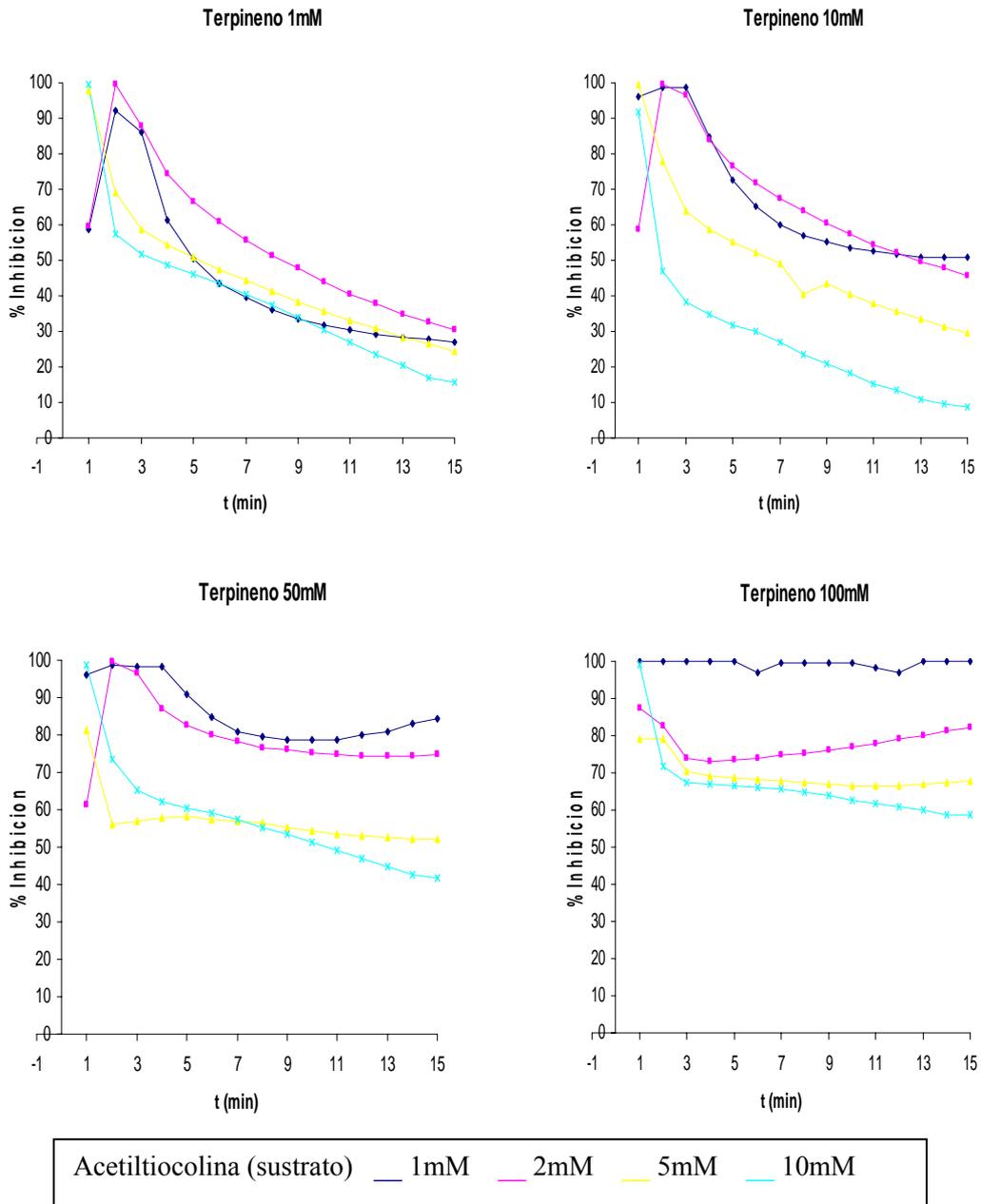


Figura 49. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por γ -terpineno (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetilcolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

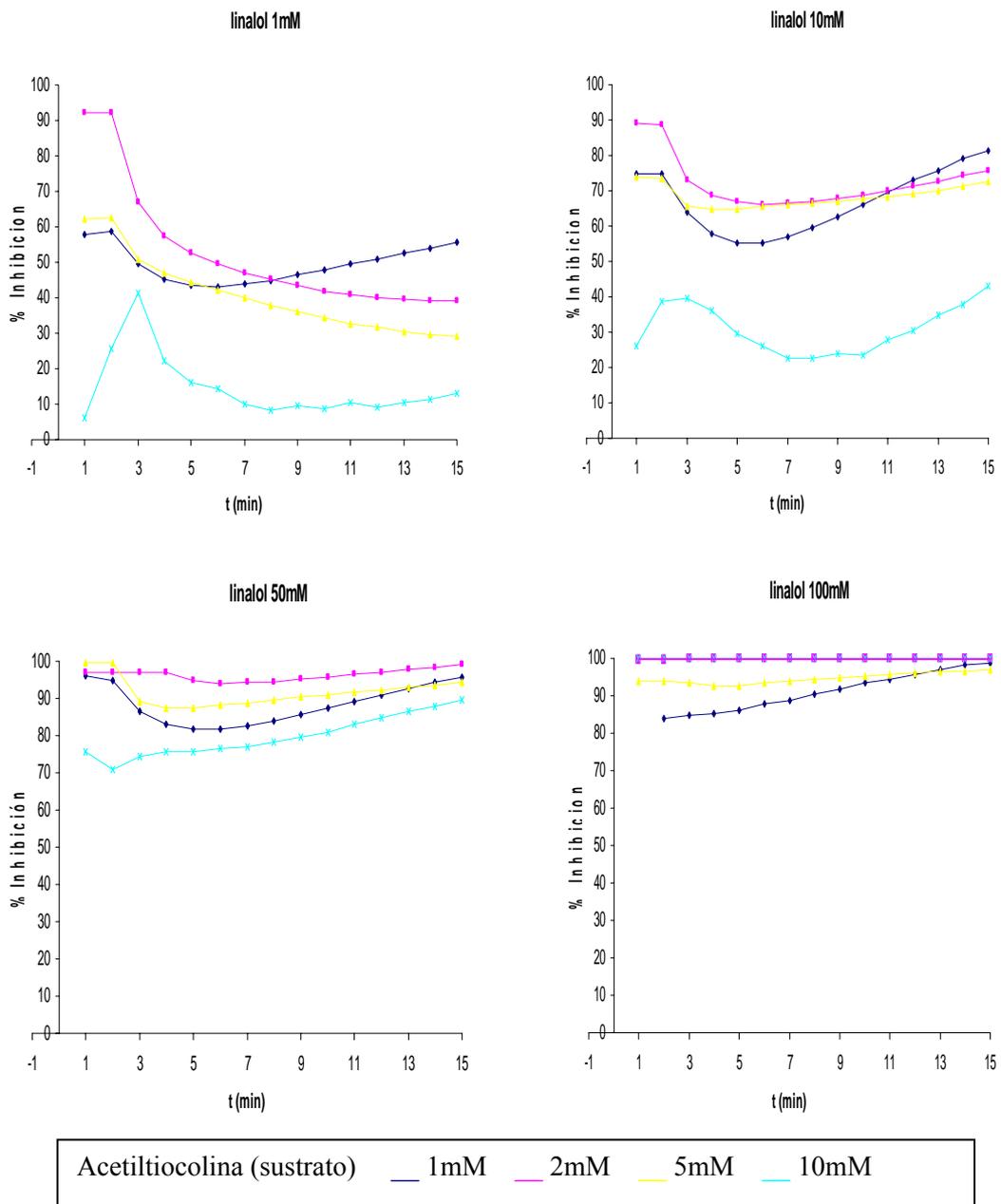


Figura 50. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por linalol (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetilcolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

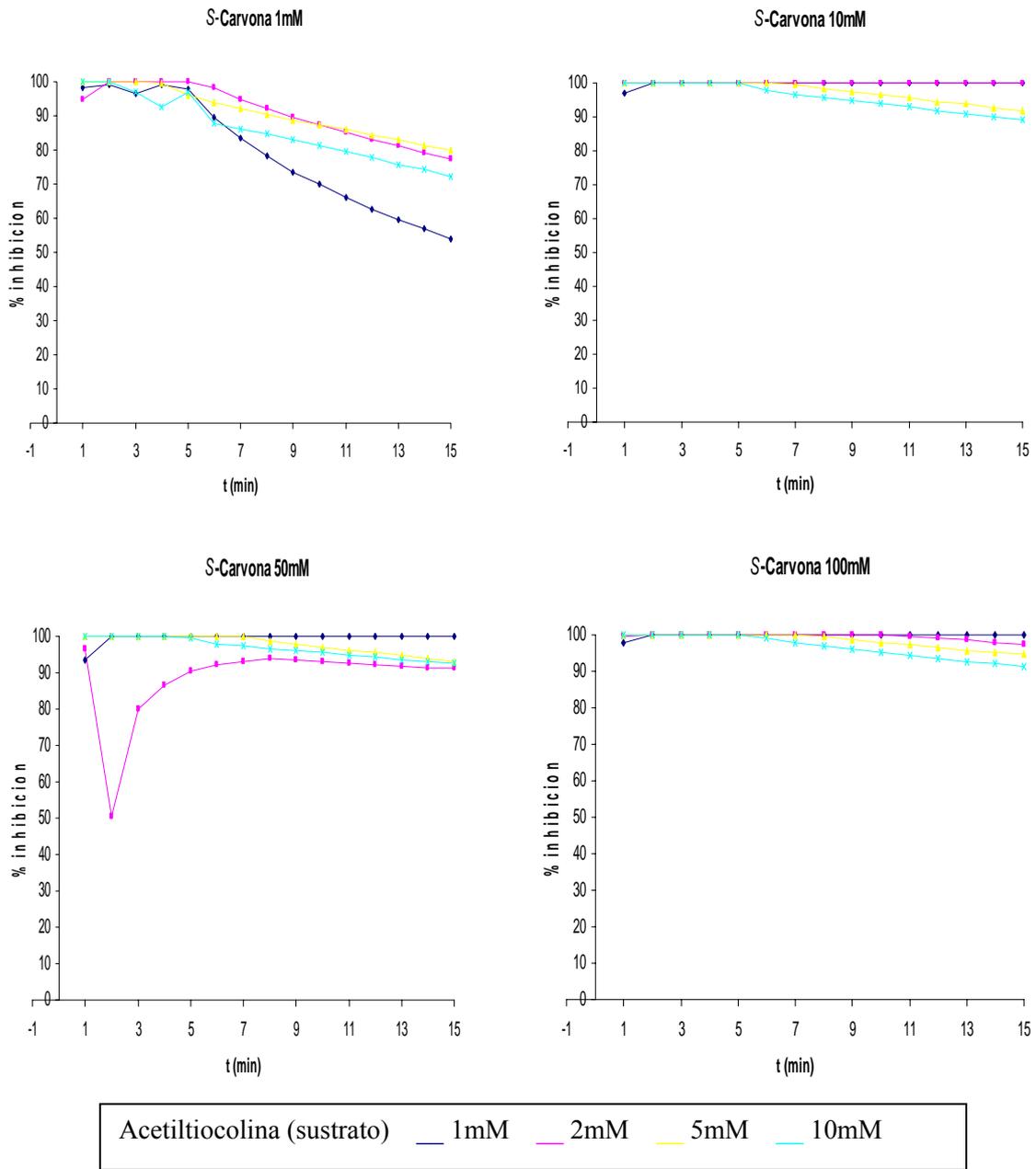


Figura 51. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por *S*-carvona (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetilcolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

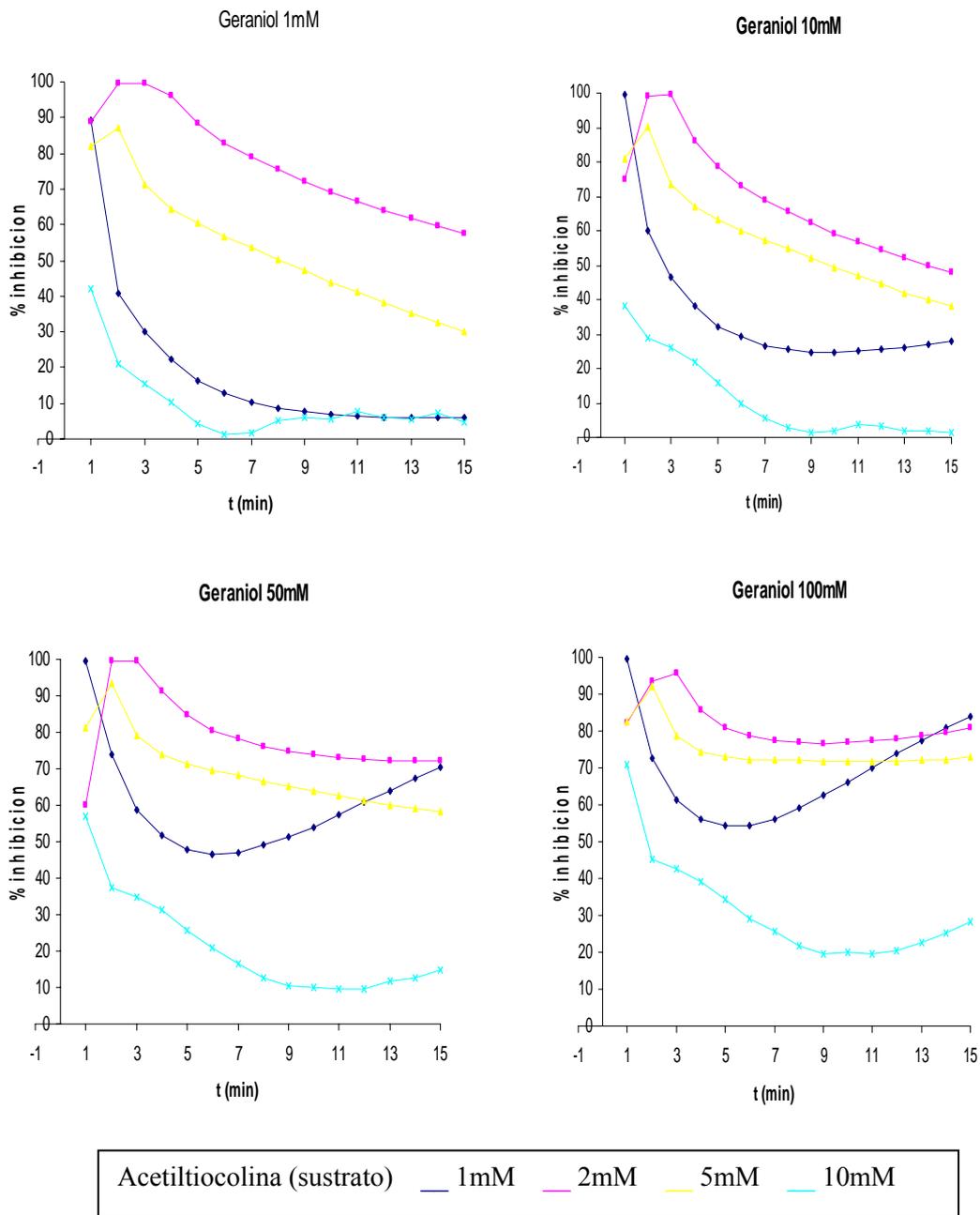


Figura 52. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por geraniol (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

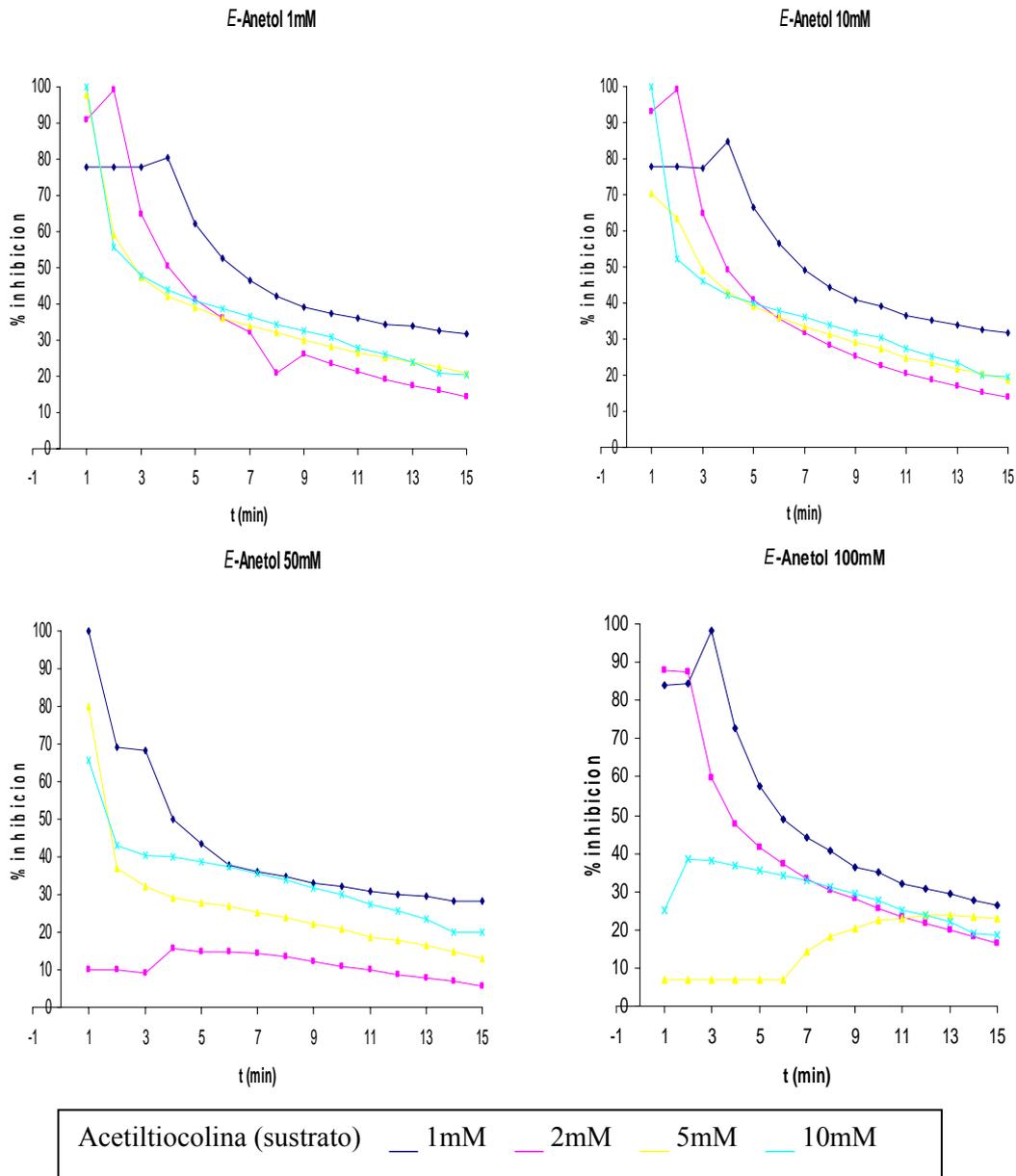


Figura 53. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por *E*-anetol (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetilcolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

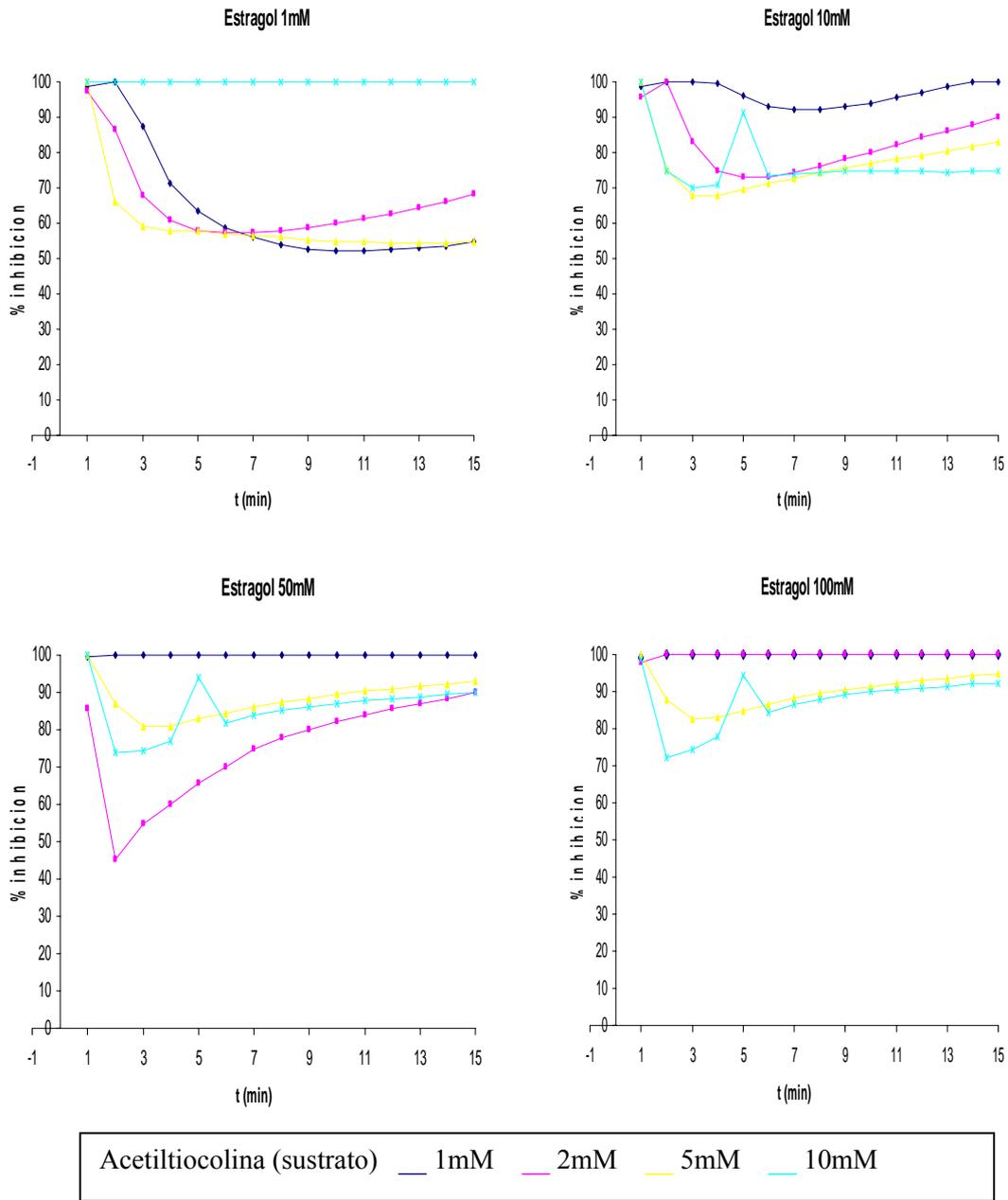


Figura 54. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por estragol (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetilcolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

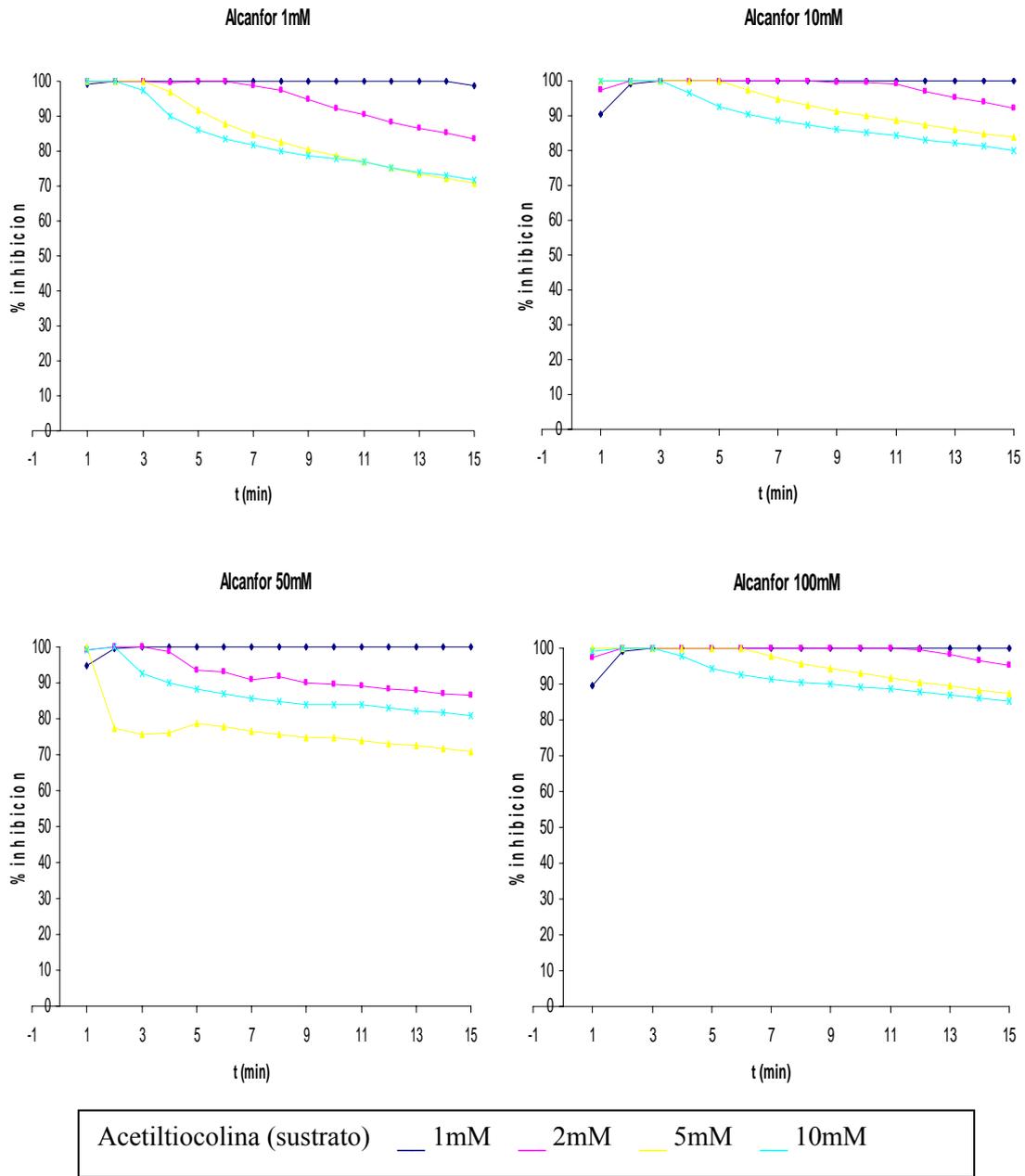


Figura 55. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por alcanfor (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetilcolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.

A continuación, en la Figura 56, se muestra el resultado de representar la velocidad frente a la concentración de sustrato, ya que siguiendo la ecuación de Michaelis-Menten, $V = V_M [S] / ([S] + K_m)$, se consiguen curvas donde al aumentar la concentración de sustrato aumenta también la velocidad. Al mismo tiempo conforme va aumentando la concentración de inhibidor se alcanza menor velocidad, es decir, al aumentar la concentración de inhibidor la actividad enzimática es menor.

Para la mayoría de los monoterpenoides vemos como las curvas están bien definidas y podemos observar claras diferencias entre el control y el inhibidor a diferentes dosis. Sin embargo para el γ -terpineno, *E*-anetol y geraniol no se observan estas diferencias tan claramente.

Para calcular los parámetros cinéticos de una enzima (V_M y K_m) es necesario linealizar la ecuación de Michaelis-Menten. Esto lo logramos con lineaweaver-Burk, $1/V = K_m/(V_M[S]) + 1/V_M$ que representando la inversa de la velocidad ($1/V$) frente a la inversa de la concentración de sustrato ($1/[S]$) nos permite calcular la velocidad máxima (V_M) y la constante de Michaelis (K_m).

Cuando existe inhibición enzimática se utilizan los valores aparentes de las constantes (K_m y V_M) hallados a partir de la ecuación de Michaelis-Menten. La única diferencia es que estos valores varían con la concentración del inhibidor, en lugar de permanecer constantes, ya que incluyen los correspondientes efectos de inhibición. Estas variaciones de las constantes de reacción, así como las representaciones gráficas de L.-Burk, permiten identificar el tipo de inhibición.

Los valores obtenidos de velocidad máxima y de la constante de Michaelis se presentan en la Tabla 20.

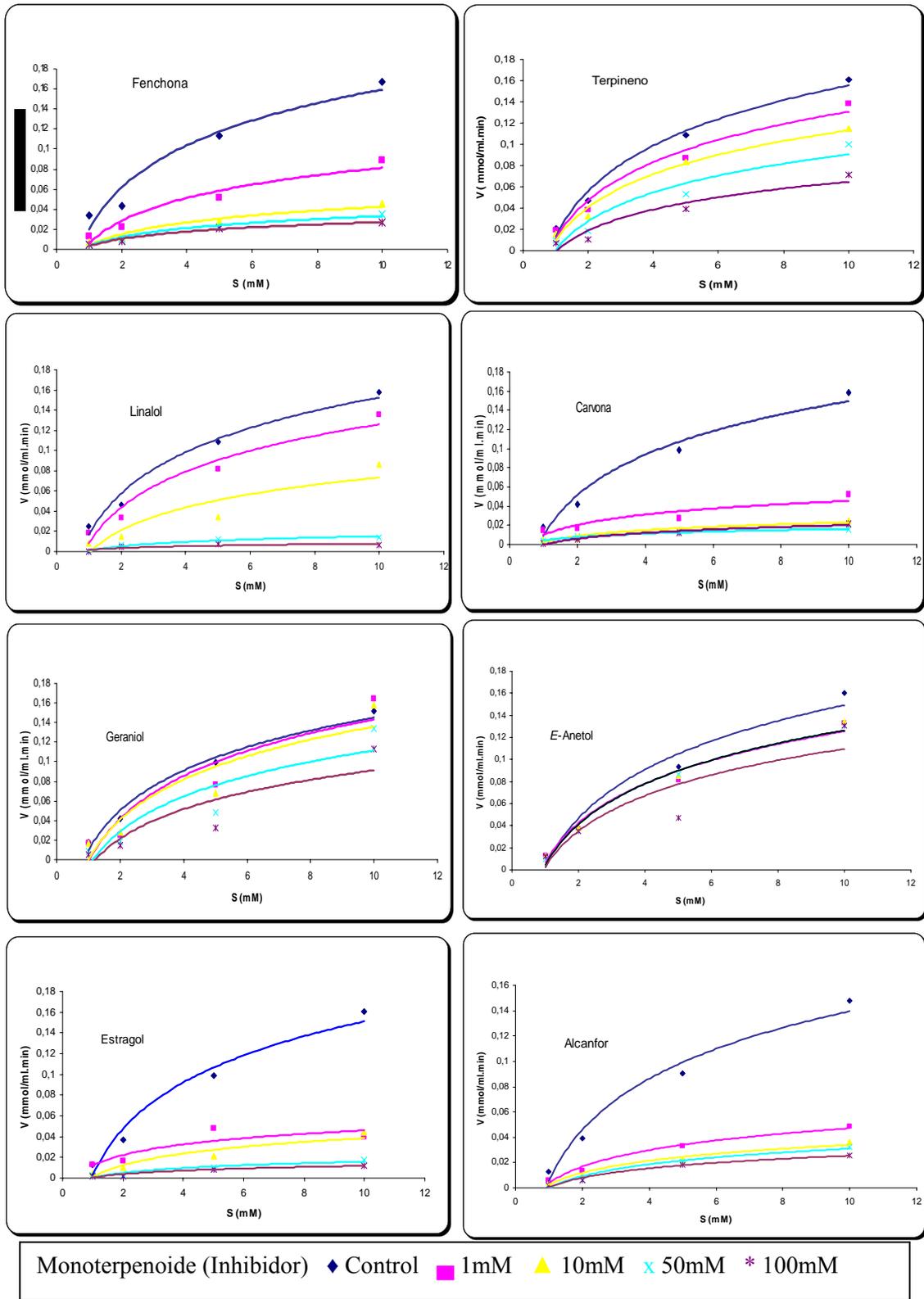


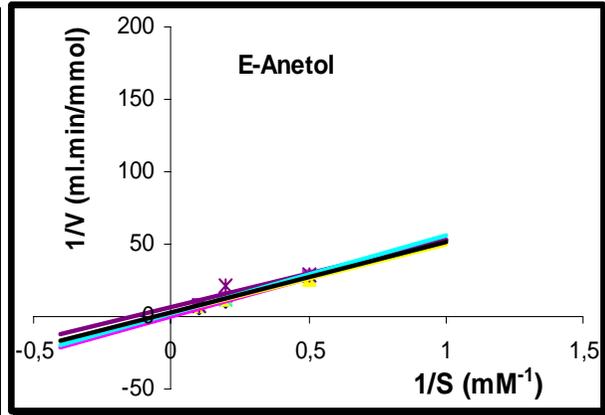
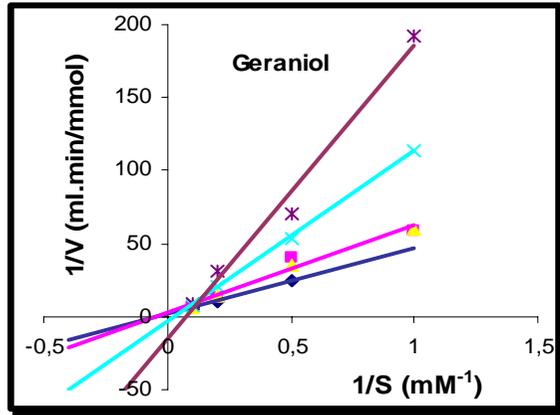
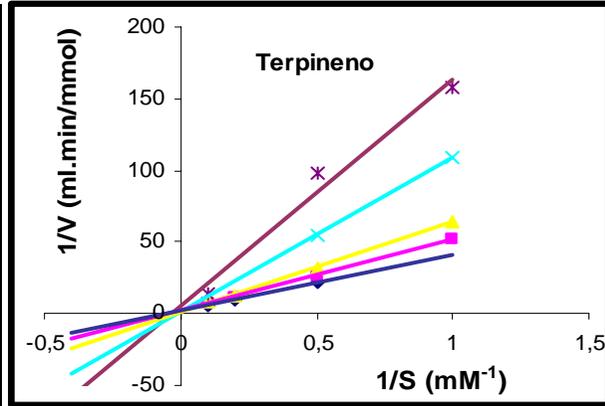
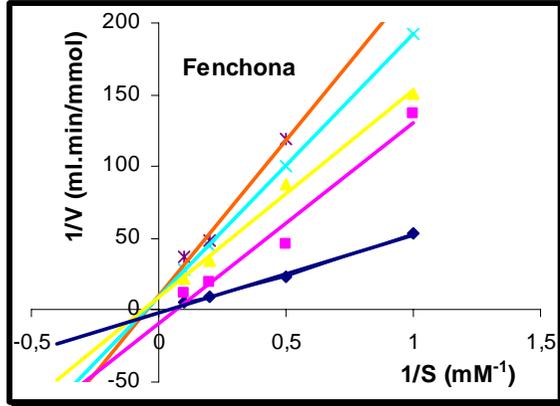
Figura 56. Velocidad frente a la concentración de sustrato para diferentes concentraciones de inhibidor.

Tabla 20. Velocidad máxima y valores de la constante de Michaelis para diferentes concentraciones de cada uno de los monoterpenoides [I].

[I] mM	Monoterpenoides															
	Fenchona		γ -Terpineno		Linalol		<i>S</i> -Carvona		Geraniol		<i>E</i> -Anetol		Estragol		Alcanfor	
	V_M	K_M	V_M	K_M	V_M	K_M	V_M	K_M	V_M	K_M	V_M	K_M	V_M	K_M	V_M	K_M
0	0,214	5,8	12,820	601,6	0,456	17,3	0,666	30,0	0,576	25,6	1,646	86,9	3,076	3,2	0,557	26,6
1	0,209	15,9	0,568	28,2	0,460	24,5	0,041	2,0	0,333	19,7	0,383	18,7	0,059	14,5	0,646	98,9
10	0,108	15,6	1,529	97,0	0,445	55,2	0,037	7,6	0,396	23,3	0,398	18,9	0,221	3,4	0,094	16,1
50	0,109	19,9	0,367	37,1	0,024	5,8	0,035	8,4	--	--	0,618	33,4	0,017	6,0	0,071	12,0
100	0,095	20,7	1,967	305,6	0,012	3,1	0,072	24,2	--	--	0,145	6,6	0,016	0,0	0,042	6,4

V_M = mmol/ml.min K_M = mmol/L

En todos los casos se presenta la V_M aparente y la K_M aparente, excepto para el control (0 mM) que son los valores reales.



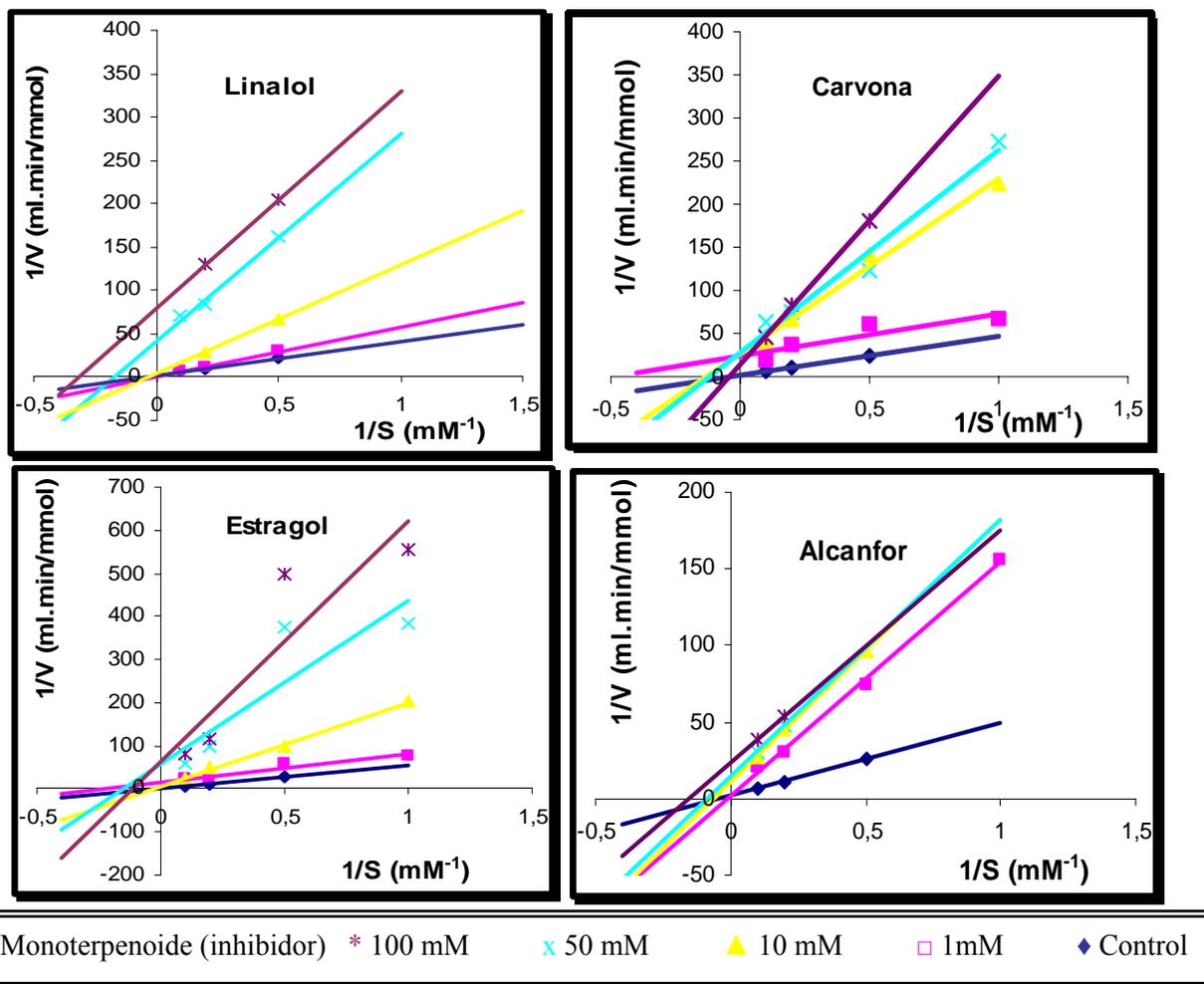


Figura 57. Inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato (acetiltiocolina) para diferentes concentraciones de inhibidor (monoterpenoides).

La Figura 57 muestra la inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato para diferentes concentraciones de cada uno de los monoterpenoides.

En general al aumentar la inversa de la concentración de sustrato ($[S]^{-1}$) aumenta la inversa de la velocidad (V^{-1}). El control presenta menor pendiente y en todos los casos conforme va aumentando la concentración de inhibidor va aumentando la pendiente. Para la Fenchona, γ -Terpineno, Linalol (excepto para las concentraciones de inhibidor de 50 y 100 mM) y Geraniol (excepto para las concentraciones de inhibidor de 50 y 100 mM) se da una inhibición competitiva, donde el inhibidor y el sustrato compiten por el acceso al sitio activo de la enzima (las rectas se cortan en el mismo punto en el eje y), ver Figura 57.

Para el caso del *E*-Anetol no se observan diferencias entre el control y las diferentes concentraciones de inhibidor por lo que posiblemente este compuesto no inhiba la acetilcolinesterasa o requiera concentraciones de inhibidor mucho más altas.

La *S*-Carvona, Estragol y Alcanfor dan una inhibición mixta ya que el inhibidor se puede unir tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato.

Para finalizar este ensayo hemos estimado conveniente profundizar en la inhibición de la acetilcolinesterasa por medio de estos monoterpenos considerando solamente las concentraciones de inhibidor que hemos utilizado al hacer los bioensayos, por ello hemos calculado la constante de inhibición para las concentraciones de inhibidor de 1mM y 10 mM, excepto para el Geraniol donde hemos utilizado las concentraciones de inhibidor de 1 mM y 50 mM.

Los resultados obtenidos para la constante de inhibición (K_i) se muestran en la siguiente Tabla.

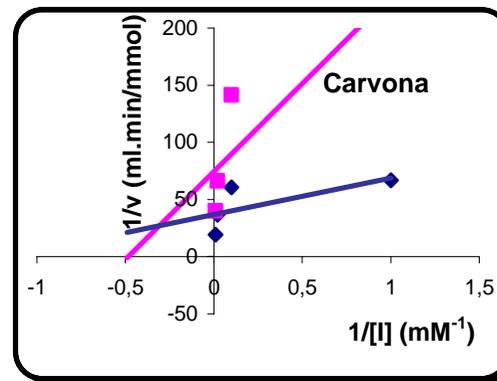
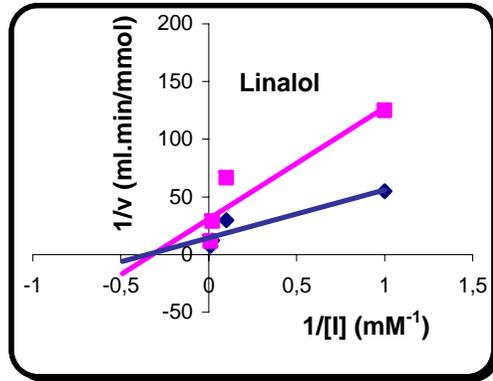
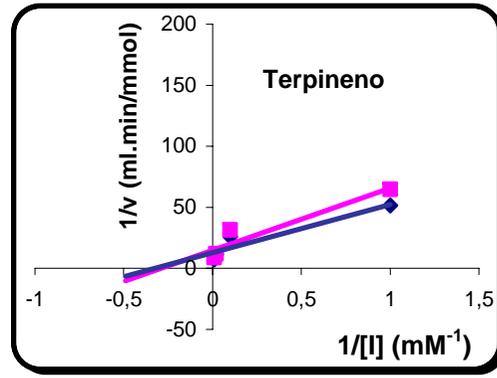
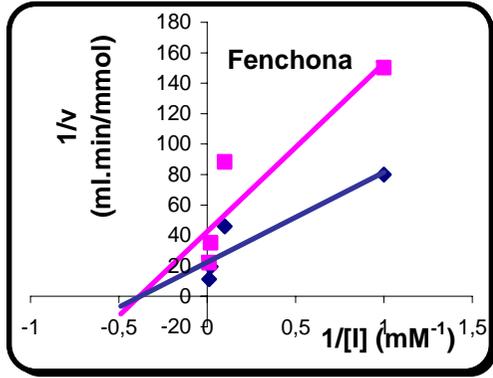
Tabla 21. Constantes de inhibición de monoterpenoides.

Monoterpenoides	K_i (mM)
Fenchona	0,40
γ-Terpineno	0,20
Linalol	0,30
<i>S</i>-Carvona	0,30
Geraniol	0,10
<i>E</i>-Anetol	--
Estragol	0,15
Alcanfor	0,05

Estas constantes se han calculado gracias a la representación de la inversa de la velocidad ($1/V$) frente a la inversa de la concentración de inhibidor ($1/[I]$) para dos concentraciones de sustrato $[S] = 1 \text{ mM}$ y $[S] = 10 \text{ mM}$ (excepto para el geraniol que se utilizó la $[S] = 50 \text{ mM}$) (Figura 11). Asimismo la escala utilizada para representar el *E*-anetol es mucho mas reducida que para el resto de monoterpenoides debido a la escasa inhibición que producía este compuesto.

Para el resto de monoterpenoides se observa como aumenta la velocidad al aumentar la concentración de inhibidor cuando usamos concentraciones mas bajas de sustrato (acetiltiocolina).

Todos estos resultados se muestran en las gráficas siguientes (Figura 58).



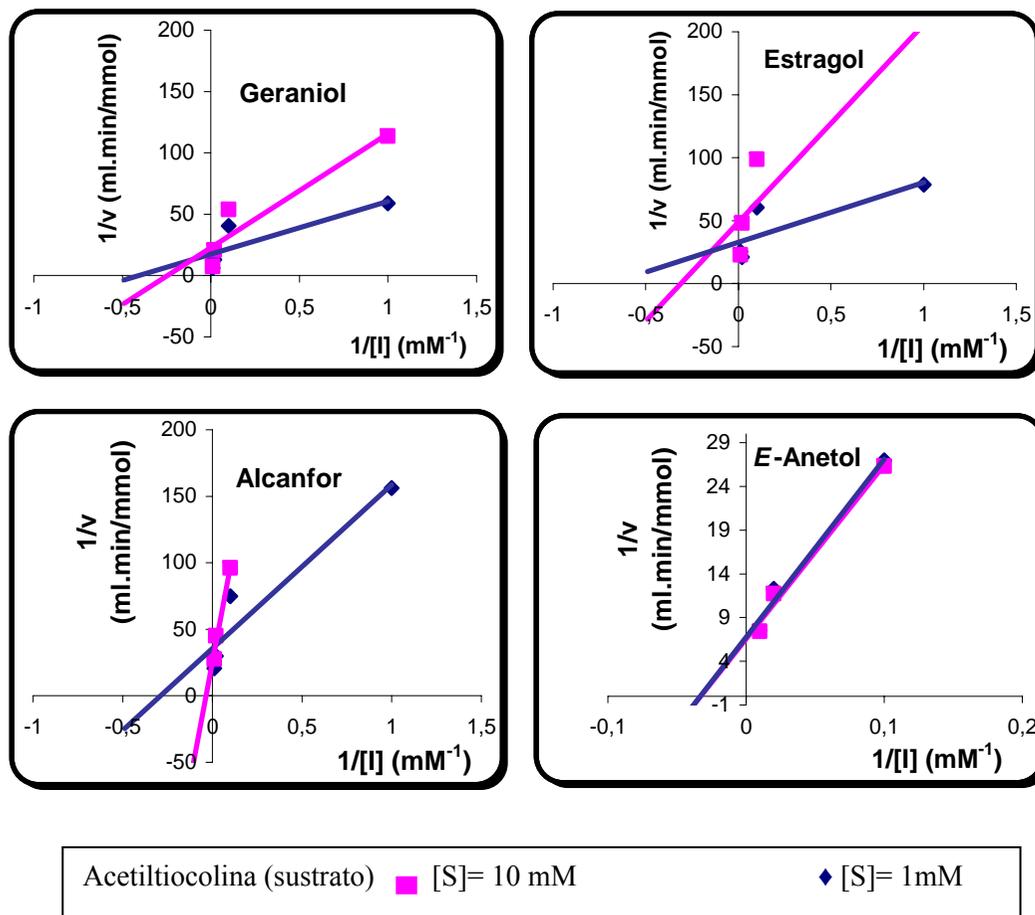


Figura 58. Inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de inhibidor (monoterpenoide) a dos concentraciones diferentes (10mM y 1mM) de sustrato (acetilcolina).

4.6. SELECCIÓN DE RESISTENCIA EN LABORATORIO A CADA MONOTERPENOIDE EN *SITOPHILUS ORYZAE*, *RHYZOPERTHA DOMINICA* Y *CRYPTOLESTES PUSILLUS*.

Inicialmente se comprobó qué rango de dosis de estos monoterpenoides producían una mortalidad entre el 20% y el 80% en las tres plagas.

Se observó de manera general, que al aumentar la dosis de monoterpenoides aumentaba la mortalidad para cada una de las plagas. Igualmente se advirtió que *Sitophilus oryzae* suele necesitar dosis mas altas que *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*.

Sin embargo se ve como en el caso del geraniol no se alcanza una alta mortalidad para *Rhyzopertha dominica* aún utilizando dosis muy altas, es decir, no hay una respuesta a la dosis.

Los resultados obtenidos hasta la generación 7 para los 8 monoterpenoides en *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus* se muestran a continuación (Tablas 22, 23 y 24).

Se realizó el análisis PROBIT de la generación 6 para *Sitophilus oryzae* (ya que no disponíamos de insectos suficientes en la generación 7) y de generación 5 para *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*, para finalmente poder calcular la CL_{50} de las poblaciones resistentes para cada uno de los monoterpenoides y para cada insecto.

Del mismo modo, también se calculo la CL_{50} para las poblaciones sensibles (las iniciales).

Las siguientes Tablas (desde 25 a 30) muestran los resultados obtenidos.

Al estudiar la generación 6 (5 para el caso de *R. dominica* y *C. pusillus*) de las tres plagas para cada uno de los monoterpenos y comparándolos con la población sensible, observamos que aunque de manera general tanto para *Sitophilus oryzae* y *Cryptolestes pusillus* se genera resistencia, ésta no alcanza valores elevados.

Por otro lado, la generación de resistencia en *Rhyzopertha dominica* es muy baja e incluso inexistente en algunos casos.

Si comparamos la CL_{50} sensible (SSSO) con la de la generación 6 para *S. oryzae* (Tabla 25 y 26), observamos que este valor es mayor para todos los monoterpenoides en la generación 6, excepto para la *S*-carvona.

De igual forma se presentan los valores del factor de resistencia, FR_{50} .

Las Tablas 27 y 28 muestran los valores de CL_{50} para *R. dominica* tanto para la población sensible (SSRD) como para la generación 5 respectivamente.

En todos los casos en los que ha sido calculada, la CL_{50} muestra valores mas elevados para la generación 5 que para la sensible, aunque como podemos ver el FR_{50} no es muy alto.

Comparando la CL_{50} sensible (SSCP) con la de la generación 5 para *C. pusillus* (Tablas 29 y 30), al igual que en los casos anteriores los valores de la concentración letal son más elevados en la generación 5, destacando al alcanfor donde se llega a alcanzar un FR_{50} de 13,70.

Además hay que hacer referencia a que la población resistente a estragol se extinguió antes de llegar a la generación 5 en *C. pusillus*, y éste es el motivo por el que no aparezca este monoterpeneoide en la Tabla 30.

Tabla 22. Selección de poblaciones resistentes de *Sitophilus oryzae* en laboratorio^a.

Linalol				E-Anetol				S-Carvona			
Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad
LIN1	340	28,76	64,1	TRA1	530	46,10	67,5	CAR1	330	19,20	73,9
LIN2	200	28,76	54,5	TRA2	250	46,10	57,6	CAR2	70	19,20	38,5
LIN3	100	28,76	68,0	TRA3	420	46,10	86,2	CAR3	290	19,20	81,4
LIN4	130	40,27	57,7	TRA4	110	46,10	64,5	CAR4	140	19,20	71,4
LIN5	420	115,06	82,3	TRA5	400	131,73	65,7	CAR5	640	64,00	97,2
LIN6	340	230,13	95,3	TRA6	180	263,46	72,7	CAR6	400	128,00	99,0
LIN7	900	287,66	86,3	TRA7	890	461,06	78,6	CAR7	100	128,00	97,0
Alcanfor				Fenchona				Geraniol			
Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad
ALC1	650	139,28	54,0	FEN1	430	31,60	63,7	GER1	490	117,20	53,2
ALC2	80	139,28	52,5	FEN2	50	31,60	68,0	GER2	170	117,20	44,1
ALC3	80	139,28	33,7	FEN3	20	31,60	45,0	GER3	60	117,20	50,0
ALC4	130	139,28	35,4	FEN4	70	31,60	58,5	GER4	130	175,80	50,7
ALC5	60	232,13	40,0	FEN5	210	63,20	90,0	GER5	40	293,00	50,0
ALC6	120	464,26	65,0	FEN6	700	126,40	98,0	GER6	10	586,00	30,0
ALC7	990	928,53	88,1	FEN7	1600	316,00	97,8	GER7	610	1172,00	52,1
γ-Terpineno				Estragol							
Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad				
TER1	530	170,00	67,2	MET1	980	64,33	78,5				
TER2	300	170,00	84,3	MET2	300	64,33	86,6				
TER3	300	170,00	71,6	MET3	200	64,33	76,5				
TER4	220	170,00	80,4	MET4	470	64,33	72,9				
TER5	270	283,33	83,7	MET5	630	128,66	84,6				
TER6	650	396,62	93,7	MET6	490	257,32	92,6				
TER7	900	566,60	37,1	MET7	890	450,31	80,2				

^aN° de insectos se refiere a los tratados

Tabla 23. Selección de poblaciones resistentes de *Rhyzopertha dominica* en laboratorio^a.

Linalol				E-Anetol				S-Carvona			
Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad
LIN1	660	28,76	63,7	TRA1	420	6,58	76,4	CAR1	120	6,40	43,3
LIN2	960	28,76	86,1	TRA2	130	6,58	65,3	CAR2	130	6,40	47,7
LIN3	100	28,76	83,0	TRA3	30	6,58	53,3	CAR3	20	6,40	55,0
LIN4	--	--	--	TRA4	--	--	--	CAR4	--	--	--
LIN5	418	57,53	99,1	TRA5	40	32,93	65,0	CAR5	45	32,00	26,6
LIN6	300	115,06	98,6	TRA6	80	32,93	88,7	CAR6	316	44,80	92,3
LIN7	210	287,66	95,2	TRA7	200	131,73	97,5	CAR7	500	64,00	96,8
Alcanfor				Fenchona				Estragol			
Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad	Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad
ALC1	830	23,21	79,5	FEN1	430	18,96	53,5	MET1	410	32,16	81,2
ALC2	420	23,21	61,2	FEN2	350	18,96	53,1	MET2	440	32,16	79,7
ALC3	100	23,21	94,0	FEN3	50	18,96	78,0	MET3	60	32,16	78,0
ALC4	--	--	--	FEN4	--	--	--	MET4	--	--	--
ALC5	180	42,42	67,7	FEN5	630	63,20	96,8	MET5	535	64,33	90,1
ALC6	300	92,85	94,0	FEN6	136	63,20	97,1	MET6	130	128,66	90,7
ALC7	350	232,13	91,1	FEN7	140	126,40	87,1	MET7	316	321,65	92,3
γ-Terpineno											
Generación	N° insectos	Dosis (ppm)	% Mortalidad								
TER1	600	56,66	65,3								
TER2	270	56,66	85,9								
TER3	20	56,66	65,0								
TER4	--	--	--								
TER5	40	113,33	60,0								
TER6	140	226,64	95,0								
TER7	150	396,62	95,3								

^aN° de insectos se refiere a los tratados.

El geraniol no aparece ya que en las pruebas realizadas no produjo ningún efecto sobre este insecto.

--: indica que no se realizaron bioensayos en esta generación.

Tabla 24. Selección de poblaciones resistentes de *Cryptolestes pusillus* en laboratorio^a.

Linalol				E-Anetol				S-Carvona			
Generación	N°	Dosis	%	Generación	N°	Dosis	%	Generación	N°	Dosis	%
insectos		(ppm)	Mortalidad	insectos		(ppm)	Mortalidad	insectos		(ppm)	Mortalidad
LIN1	50	5,75	40,0	TRA1	30	6,58	76,7	CAR1	20	3,20	55,0
LIN2	90	5,75	47,8	TRA2	50	6,58	76,0	CAR2	180	3,20	92,2
LIN3	30	5,75	46,7	TRA3	50	6,58	84,0	CAR3	40	3,20	50,0
LIN4	20	5,75	30,0	TRA4	15	6,58	53,3	CAR4	30	3,20	50,0
LIN5	50	28,76	82,0	TRA5	10	32,93	60,0	CAR5	40	6,40	77,5
LIN6	60	57,53	95,6	TRA6	68	65,86	95,6	CAR6	230	32,00	98,7
LIN7	2040	115,06	99,1	TRA7	730	132,00	99,2	CAR7	180	32,00	73,9
Alcanfor				Fenchona				Geraniol			
Generación	N°	Dosis	%	Generación	N°	Dosis	%	Generación	N°	Dosis	%
insectos		(ppm)	Mortalidad	insectos		(ppm)	Mortalidad	insectos		(ppm)	Mortalidad
ALC1	20	4,64	40,0	FEN1	40	12,60	40,0	GER1	100	58,60	57,0
ALC2	40	4,64	35,0	FEN2	270	12,60	74,4	GER2	260	58,60	56,2
ALC3	20	4,64	70,0	FEN3	210	12,60	79,5	GER3	190	58,60	79,5
ALC4	10	9,29	20,0	FEN4	20	12,60	30,0	GER4	30	58,60	40,0
ALC5	20	46,42	65,0	FEN5	10	63,20	50,0	GER5	25	117,20	48,0
ALC6	115	92,85	97,4	FEN6	104	126,00	98,1	GER6	30	234,40	56,7
ALC7	210	186,00	98,6	FEN7	2000	126,00	99,2	GER7	3200	586,00	97,0
γ-Terpineno				Estragol							
Generación	N°	Dosis	%	Generación	N°	Dosis	%				
insectos		(ppm)	Mortalidad	insectos		(ppm)	Mortalidad				
TER1	30	28,33	56,7	MET1	100	19,30	66,0				
TER2	190	28,33	83,2	MET2	10	19,30	50,0				
TER3	130	28,33	83,1	MET3	5	19,30	100,0				
TER4	40	28,33	65,0	MET4	--	--	--				
TER5	100	56,66	97,0	MET5	--	--	--				
TER6	360	113,33	97,2	MET6	--	--	--				
TER7	1100	226,00	98,0	MET7	--	--	--				

^aN° de insectos se refiere a los tratados.

--: indica que no se realizaron bioensayos en esta generación.

Tabla 25. Análisis probit. *Sitophilus oryzae*, población sensible a monoterpenoides (SSSO).

Compuesto	Dosis		%mortalidad 24h	CL ₅₀ (ppm)	Limites Fiduciales 95 %	Recta Probit ^a		χ^2 (gl)
	$\mu\text{l} / 15\text{ml}$	ppm				a \pm ee	b \pm ee	
Alcanfor	1,00	46,42	28,00	90,53	68,35-110,65	$-3,38 \pm 0,29$	$1,72 \pm 0,13$	743,39 (148)
	2,00	92,85	56,00					
	3,00	139,28	62,00					
	4,00	185,70	62,00					
	5,00	232,13	77,66					
E-Anetol	0,10	6,58	2,50	191,01	139,12-320,77	$-3,24 \pm 0,27$	$1,42 \pm 0,15$	167,71 (98)
	0,50	32,93	5,50					
	0,70	46,11	19,41					
	1,00	65,86	36,00					
	2,00	131,73	34,00					
S-Carvona	0,01	0,64	1,00	51,38	32,24-126,55	$-2,61 \pm 0,14$	$1,52 \pm 0,12$	841,41 (148)
	0,05	3,20	3,66					
	0,10	6,40	4,33					
	0,20	12,80	18,00					
	0,50	32,00	42,00					
Estragol	0,10	6,43	1,00	78,40	65,55-97,96	$-4,29 \pm 0,21$	$2,26 \pm 0,12$	666,88 (148)
	0,30	19,29	8,66					
	0,50	32,16	14,33					
	1,00	64,33	49,33					
	2,00	128,66	66,00					
Fenchona	0,10	6,32	2,66	38,55	31,25-53,04	$-6,36 \pm 0,31$	$4,01 \pm 0,20$	2949,00 (148)
	0,30	18,96	4,66					
	0,40	25,28	24,00					
	0,50	31,60	25,00					
	1,00	63,20	88,66					
Geraniol	0,50	29,30	1,66	--	--	$-2,27 \pm 0,30$	$0,20 \pm 0,13$	179,29 (148)
	1,00	58,60	3,00					
	2,00	117,20	4,33					
	5,00	293,00	4,00					
	10,00	586,00	3,66					
Linalol	0,01	0,57	1,00	42,67	34,11-56,07	$-2,60 \pm 0,12$	$1,59 \pm 0,09$	398,99 (148)
	0,05	2,87	3,66					
	0,10	5,75	6,00					
	0,50	28,75	33,33					
	1,00	57,33	63,00					
γ-Terpineno	1,00	56,66	4,33	285,52	252,34-328,88	$-6,82 \pm 0,32$	$2,77 \pm 0,13$	539,45 (148)
	2,00	113,33	6,33					
	3,00	170,00	35,33					
	5,00	283,33	45,00					
	10,00	566,66	82,66					

^a y = a \pm bx; ee= error estándar; χ^2 no significativo.

Tabla 26. Análisis probit. *Sitophilus oryzae* poblaciones resistentes (GEN6) a cada monoterpenoide.

Compuesto	Dosis		%mortalidad 24h	CL ₅₀ (ppm)	Límites Fiduciales 95 %	Recta Probit ^a			FR ₅₀ ^b
	µl / 15ml	ppm				a ± ee	b ± ee	χ ² (gl)	
Alcanfor	2,00	92,85	39,30	162,30	117,39-205,70	-3,15 ± 0,24	1,42 ± 0,09	538,40 (148)	1,79
	4,00	185,70	53,30						
	10,00	464,26	65,70						
	15,00	696,39	80,30						
	20,00	928,53	92,70						
E-Anetol	1,00	65,86	12,70	307,59	259,86-360,52	-3,34 ± 0,24	1,34 ± 0,10	318,50 (148)	--
	2,00	131,73	36,70						
	4,00	251,46	51,00						
	6,00	395,19	55,70						
	10,00	658,66	62,30						
S-Carvona	0,10	6,40	6,33	26,99	23,82-29,69	-4,19 ± 0,20	2,92 ± 0,20	335,89 (147)	--
	0,50	32,00	37,00						
	1,00	64,00	92,00						
	1,50	96,00	97,70						
	2,00	128,00	99,70						
Estragol	1,00	64,33	19,70	137,86	120,64-154,79	-5,84 ± 0,33	2,73 ± 0,15	562,39 (148)	--
	2,00	128,66	39,00						
	3,00	192,99	76,70						
	4,00	257,32	69,70						
	5,00	321,65	86,30						
Fenchona	0,50	31,60	3,33	61,72	57,49-65,79	-12,74 ± 0,62	7,11 ± 0,33	503,34 (148)	1,60
	1,00	63,20	46,70						
	1,50	94,80	99,70						
	2,00	126,40	96,00						
	3,00	189,60	100,00						
Geraniol	1,00	58,60	0,66	25924,00	7679,70- 433810,00	-3,72 ± 0,34	0,84 ± 0,13	268,28 (152)	--
	2,00	117,20	3,67						
	5,00	293,00	4,00						
	10,00	586,00	8,67						
	20,00	1170,00	13,00						
Linalol	1,00	57,53	17,00	160,80	136,42-186,92	-4,78 ± 0,26	2,16 ± 0,11	595,79 (147)	3,77
	2,00	115,06	37,00						
	4,00	230,13	63,70						
	6,00	345,19	70,70						
	8,00	460,26	88,00						
γ-Terpineno	2,00	113,33	2,00	411,94	374,96-454,04	-9,14 ± 0,42	3,49 ± 0,16	512,17 (148)	1,44
	4,00	227,00	23,70						
	6,00	340,00	36,00						
	10,00	567,00	59,00						
	15,00	850,00	92,70						

^a y = a ± bx; ee= error estándar; χ² no significativo.

^b FR=factor de resistencia; FR₅₀= CL₅₀ población resistente/ CL₅₀ población sensible.

Tabla 27. Análisis probit. *Rhyzopertha dominica*, población sensible a monoterpenoides (SSRD).

Compuesto	Dosis		%mortalidad 24h	CL ₅₀ (ppm)	Límites Fiduciales 95 %	Recta Probit ^a		χ^2 (gl)
	μ l / 15ml	ppm				a \pm ee	b \pm ee	
Alcanfor	0,50	23,21	25,00	35,68	27,38-43,53	$-6,91 \pm 1,06$	$4,44 \pm 0,66$	26,42 (13)
	0,70	32,49	50,00					
	1,00	46,42	66,66					
	1,50	69,60	90,00					
	2,00	92,90	96,66					
E-Anetol	0,01	0,66	0,00	--	--	$-1,99 \pm 0,34$	$0,97 \pm 0,29$	16,21* (13)
	0,05	3,29	10,00					
	0,10	6,58	13,33					
	0,30	19,80	16,66					
	0,50	32,93	25,00					
S-Carvona	0,01	0,64	3,33	--	--	$-1,46 \pm 0,25$	$0,59 \pm 0,24$	14,47* (13)
	0,05	3,20	10,00					
	0,10	6,40	15,00					
	0,20	12,80	32,50					
	0,50	32,00	40,00					
Estragol	0,10	6,43	0,00	--	--	$-6,25 \pm 1,84$	$4,18 \pm 1,18$	4,79* (3)
	0,30	19,30	10,00					
	0,50	32,20	80,00					
	0,70	45,00	60,00					
	1,00	64,30	90,00					
Fenchona	0,10	6,32	0,00	26,99	19,53-33,38	$-7,66 \pm 2,21$	$5,35 \pm 1,47$	0,89* (3)
	0,30	18,96	20,00					
	0,50	31,60	70,00					
	0,70	44,20	80,00					
	1,00	63,20	100,00					
Linalol	0,10	5,75	2,22	31,68	27,72-36,77	$-5,99 \pm 0,44$	$3,99 \pm 0,29$	413,99 (87)
	0,20	11,50	5,00					
	0,50	28,76	17,77					
	0,60	34,52	59,44					
	0,70	40,27	88,33					
γ-Terpineno	0,50	28,33	0,00	101,41	66,01-206,37	$-6,92 \pm 1,09$	$3,45 \pm 0,56$	21,03 (8)
	0,70	39,70	10,00					
	1,00	56,66	25,00					
	2,00	113,00	50,00					
	5,00	283,00	95,00					

^a $y = a \pm bx$; ee=error estándar; χ^2 no significativo, excepto para *E*-anetol, *S*-carvona, estragol y fenchona.

Tabla 28. Análisis probit. *Rhyzopertha dominica*, poblaciones resistentes (GEN5) a cada monoterpenoide.

Compuesto	Dosis		%mortalidad 24h	CL ₅₀ (ppm)	Limites Fiduciales 95 %	Recta Probit ^a		χ^2 (gl)	FR ₅₀ ^b
	μ l / 15ml	ppm				a \pm ee	b \pm ee		
Alcanfor	0,50	23,21	20,00	40,56	32,47-48,06	-6,82 \pm 0,71	4,24 \pm 0,41	73,75 (28)	1,14
	1,00	46,42	45,00						
	1,50	69,60	93,30						
	2,00	92,85	91,70						
	2,50	116,00	98,30						
E-Anetol	0,05	0,33	2,50	--	--	-2,78 \pm 0,28	1,89 \pm 0,18	-- (48)	--
	0,10	6,58	5,50						
	0,50	32,93	44,00						
	0,70	46,10	62,50						
	1,00	65,86	89,00						
S-Carvona	0,05	3,20	2,50	29,64	25,36-34,50	-3,55 \pm 0,22	2,41 \pm 0,14	251,92 (98)	4,49
	0,10	6,40	5,50						
	0,50	32,00	44,00						
	0,70	44,80	62,50						
	1,00	64,00	89,00						
Estragol	0,50	32,16	9,29	63,44	54,37-72,19	-9,74 \pm 0,63	5,41 \pm 0,33	348,76 (68)	2,78
	1,00	64,33	36,40						
	1,50	96,50	84,30						
	2,00	129,00	98,60						
	2,50	161,00	100,00						
Fenchona	0,50	31,60	8,00	52,55	48,09-57,16	-9,37 \pm 1,03	5,44 \pm 0,58	20,18* (22)	1,95
	0,70	44,20	38,00						
	1,00	63,20	70,00						
	1,50	94,80	90,00						
	2,00	126,00	98,00						
Linalol	0,50	28,76	10,00	44,50	33,50-54,37	-5,91 \pm 0,67	3,59 \pm 0,39	127,26 (32)	1,40
	0,70	40,27	67,10						
	1,00	57,53	98,60						
	1,50	86,30	72,90						
	2,00	115,00	92,50						
γ-Terpineno	1,00	56,66	14,00	119,95	99,85-139,71	-9,32 \pm 0,71	4,48 \pm 0,33	211,38 (48)	1,18
	2,00	113,33	29,00						
	3,00	170,00	74,00						
	4,00	227,00	96,00						
	5,00	283,33	96,00						

^a y = a \pm bx; ee=error estándar; χ^2 no significativo excepto para fenchona.

^bFR =factor de resistencia; FR₅₀= CL₅₀ población resistente/ CL₅₀ población sensible.

Tabla 29. Análisis probit. *Cryptolestes pusillus*, población sensible a monoterpenoides (SSCP).

Compuesto	Dosis		%mortalidad 24h	CL ₅₀ (ppm)	Límites Fiduciales 95 %	Recta Probit ^a		χ^2 (gl)
	μ l / 15ml	ppm				a \pm e	b \pm ee	
Alcanfor	0,01	0,46	3,33	3,71	1,86-6,64	-1,17 \pm 0,37	2,06 \pm 0,31	4,16* (7)
	0,50	23,21	93,33					
	1,00	46,42	100,00					
E-Anetol	0,01	0,65	0,00	10,30	3,38-16,21	-2,44 \pm 0,93	2,41 \pm 0,66	5,30* (7)
	0,30	19,76	76,66					
	1,00	65,86	96,66					
S-Carvona	0,01	0,64	0,00	4,75	3,58-6,51	-3,81 \pm 0,84	5,63 \pm 1,23	11,08* (7)
	0,05	3,20	16,66					
	0,10	6,40	76,66					
Estragol	0,01	0,64	3,33	3,30	2,14-4,78	-1,38 \pm 0,36	2,65 \pm 0,47	5,21* (7)
	0,10	6,43	76,66					
	0,50	32,16	100,00					
Fenchona	0,10	6,32	20,00	9,51	7,15-11,69	-4,20 \pm 0,85	4,29 \pm 0,80	7,79* (7)
	0,20	12,64	76,66					
	0,30	18,96	86,66					
Geraniol	0,10	5,86	0,00	32,39	24,09-40,46	-5,31 \pm 1,32	3,52 \pm 0,83	1,89* (7)
	0,50	29,30	46,66					
	1,00	58,60	80,00					
Linalol	0,01	0,57	0,00	4,08	3,52-4,73	-3,93 \pm 0,81	6,42 \pm 1,28	3,84* (7)
	0,05	2,89	16,66					
	0,10	5,78	83,33					
γ-Terpineno	0,10	5,66	0,00	--	--	-7,46 \pm 2,34	5,31 \pm 1,54	7,96* (7)
	0,50	28,33	60,00					
	1,00	56,66	96,66					

^ay = a \pm bx; ee = error estándar; χ^2 fue significativo para todos los monoterpenoides.

Tabla 30. Análisis probit. *Cryptolestes pusillus*, poblaciones resistentes (GEN5) a cada monoterpenoides.

Compuesto	Dosis		%mortalidad 24h	CL ₅₀ (ppm)	Límites Fiduciales 95 %	Recta Probit ^a			FR ₅₀ ^b
	µl / 15ml	ppm				a ± ee	b ± ee	χ ² (gl)	
Alcanfor	0,50	23,21	16,00	50,88	41,18-60,87	-6,80 ± 0,76	3,98 ± 0,43	54,73 (23)	13,70
	1,00	46,42	36,00						
	1,50	69,60	54,00						
	2,00	92,85	94,00						
	3,00	139,28	100,00						
E-Anetol	0,10	6,58	2,86	32,03	18,03-41,49	-6,69 ± 0,84	4,45 ± 0,51	215,67 (33)	3,11
	0,50	32,93	31,40						
	0,70	46,11	81,40						
	1,00	65,86	95,70						
	1,50	98,80	100,00						
S-Carvona	0,01	0,64	13,70	5,95	4,69-7,53	-1,54 ± 0,07	1,99 ± 0,08	924,22 (148)	1,25
	0,05	3,20	12,00						
	0,10	6,40	36,00						
	0,30	19,20	92,30						
	0,50	32,00	100,00						
Fenchona	0,10	6,32	8,33	15,97	14,16-17,82	-4,32 ± 0,22	3,59 ± 0,15	314,94 (148)	1,68
	0,50	31,60	82,30						
	0,70	44,24	94,30						
	1,00	63,20	100,00						
	2,00	126,40	100,00						
Geraniol	0,50	29,30	19,30	--	--	0,58 ± 0,19	-0,19 ± 0,09	-- (148)	--
	1,00	58,60	71,00						
	2,00	117,20	59,70						
	3,00	175,80	54,70						
	4,00	234,40	44,30						
Linalol	0,10	5,75	3,33	22,69	20,91-24,46	-5,75 ± 0,28	4,24 ± 0,19	381,73 (148)	5,55
	0,30	17,26	23,70						
	0,50	28,76	63,00						
	0,70	40,27	85,70						
	1,00	57,53	100,00						
γ-Terpineno	0,50	28,33	8,67	87,25	80,78-94,40	-7,71 ± 0,35	3,97 ± 0,18	444,39 (147)	--
	1,00	56,66	18,70						
	1,50	84,99	29,30						
	2,00	113,33	71,70						
	3,00	170,00	96,00						

^a y = a ± bx; ee=error estándar; χ² no significativo.

^bFR₅₀=factor de resistencia; FR= CL₅₀ población resistente/ CL₅₀ población sensible.

4.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA A MONOTERPENOIDES EN LAS POBLACIONES DE INSECTOS SELECCIONADAS.

Para *Sitophilus oryzae* los valores más elevados del FR₅₀ en acetona para la generación 7 los encontramos en linalol y geraniol (3,7 y 3,8 respectivamente).

Si nos fijamos en el sinergismo producido al aplicar PBO, DEF y DEM, observamos que de manera general *Sitophilus oryzae* alcanza un mayor ratio cuando se aplica DEF y PBO por ejemplo para linalol y alcanfor, en cambio para el *E*-anetol y el estragol el ratio es mayor cuando se aplica DEM. Para el resto de monoterpenoides no se observa efecto al aplicar sinergistas (Tabla 31).

Para *Rhizophorthera dominica* los valores del FR₅₀ para todos los monoterpenoides no ofrecen ninguna diferencia con el control (población sensible), por lo que prácticamente podemos asegurar que no se ha logrado resistencia alguna en las generaciones estudiadas.

Como ya se ha señalado anteriormente, al no observarse resistencia los ratios de sinergismo son próximos a uno o no existen diferencias destacables (Tabla 32).

Para *Cryptolestes pusillus* encontramos los valores más altos del FR₅₀ para el alcanfor y el geraniol (7,5 y 8,8 respectivamente), y los ratios (RS) más elevados los encontramos al aplicar PBO y DEM sobre el insecto cuando lo tratamos con linalol, alcanfor, *S*-carvona, geraniol y γ -terpineno aunque también se obtiene valores elevados al aplicar DEF tópicamente sobre los insectos que posteriormente se tratan con alcanfor y geraniol (Tabla 33).

Este ensayo, con el uso de sinergistas (PBO, DEF y DEM) nos da una idea indirecta de que mecanismo podría estar implicado en la generación de resistencias para cada una de las plagas estudiadas, siempre que se observara algún indicio de resistencia en los insectos tratados.

En las Tablas 31, 32 y 33 se muestra en mayor profundidad los valores correspondientes a la CL₅₀, el factor de resistencia y el ratio de sinergismo para cada uno de los monoterpenos estudiados en cada uno de los insectos, junto con los valores correspondientes a la CL₉₅, su factor de resistencia y su ratio de sinergismo para una población sensible (SSSO, SSRD o SSCP, según el insecto) y para las poblaciones resistentes (generación 7).

Tabla 31. Concentraciones letales de monoterpenoides, con y sin sinergistas para poblaciones sensibles (SSSO) y poblaciones resistentes (generación 7) de *Sitophilus oryzae* seleccionadas en laboratorio^a.

Población	Tratamiento ^b	Pendiente (± ES)	CL ₅₀ (ppm) ^c (LF, 95%)	FR ₅₀ ^d	RS ₅₀ ^e	CL ₉₅ (ppm) ^c (LF, 95%)	FR ₉₅ ^d	RS ₉₅ ^e
Linalol								
SSSO	+Acetona	0,85 (±0,29)	99(30-16384)	1,0	--	8713(511-)	1,0	--
	+PBO	1,11 (±0,31)	40(16-1139)	0,4	2,5	1198(154-5E+07)	0,1	7,2
	+DEF	4,21 (±0,75)	16(12-20)	0,2	6,2	38(28-65)	4E-03	229,3
	+DEM	2,62 (±0,71)	29(20-53)	0,3	3,4	122(61-974)	1E-02	71,4
Linalol								
Lin7SO	+Acetona	1,79 (±0,44)	366(251-711)	3,7	--	3042(1236-38014)	0,3	--
	+PBO	1,63 (±0,39)	85(23-146)	0,8	4,3	866(391-18108)	0,1	3,5
	+DEF	2,10 (±0,59)	37(9-60)	0,4	9,9	223(140-765)	0,1	13,6
	+DEM	1,38 (±0,42)	439(270-1489)	4,4	0,8	6735(1795-9E+06)	0,7	0,5
Alcanfor								
SSSO	+Acetona	2,11 (±0,53)	149(99-341)	1,0	--	864(364-37755)	1,0	--
	+PBO	2,14 (±0,59)	47(26-63)	0,3	3,1	274(177-800)	0,3	3,1
	+DEF	1,44 (±0,50)	55(15-86)	0,4	2,7	763(305-71515)	0,8	1,1
	+DEM	2,22 (±0,52)	146(109-230)	0,9	1,1	804(409-4598)	0,9	1,1
Alcanfor								
Alc7SO	+Acetona	2,18 (±0,41)	301(174-579)	2,1	--	1715(789-18704)	1,9	--
	+PBO	2,61 (±0,44)	117(84-159)	0,8	2,6	500(326-1076)	0,6	3,4
	+DEF	1,55 (±0,37)	55(14-98)	0,4	5,5	634(292-7655)	0,7	2,7
	+DEM	2,81 (±0,48)	271(162-475)	1,8	1,1	1045(562-5949)	1,2	1,6
S-Carvona								
SSSO	+Acetona	3,35 (±0,62)	18(11-29)	1,0	--	55(33-217)	1,0	--
	+PBO	1,43 (±0,31)	18(9-59)	1,0	1,0	261(74-16971)	4,7	0,2
	+DEF	3,11 (±0,71)	25(14-51)	1,4	0,7	84(44-1539)	1,5	0,6
	+DEM	1,09 (±0,31)	55(25-515)	3,0	0,3	1787(270-1.2E+06)	32,5	0,03

<i>S</i> -Carvona								
Car7SO	+Acetona	3,04 ($\pm 0,78$)	44(34-59)	2,4	--	153(95-591)	2,8	--
	+PBO	2,83 ($\pm 0,45$)	18(8-31)	1,0	2,4	67(37-407)	1,2	2,3
	+DEF	2,62 ($\pm 0,42$)	17(12-23)	0,9	2,6	72(44-192)	1,3	2,1
	+DEM	3,43 ($\pm 0,55$)	20(7-35)	1,1	2,2	61(35-401)	1,1	2,5
<i>E</i> -Anetol								
SSSO	+Acetona	3,24 ($\pm 0,70$)	92(65-171)	1,0	--	297(164-4496)	1,0	--
	+PBO	3,26 ($\pm 0,64$)	55(36-76)	0,6	1,7	177(113-745)	0,6	1,7
	+DEF	2,42 ($\pm 0,61$)	96(74-152)	1,1	0,9	461(240-2965)	1,5	0,6
	+DEM	2,99 ($\pm 0,65$)	85(61-139)	0,9	1,1	302(168-2506)	1,1	0,9
<i>E</i> -Anetol								
Tra7SO	+Acetona	1,84 ($\pm 0,46$)	58(11-101)	0,6	--	453(241-3840)	1,5	--
	+PBO	1,73 ($\pm 0,46$)	52(15-86)	0,6	1,1	459(262-2015)	1,5	0,9
	+DEF	1,70 ($\pm 0,38$)	295(197-466)	3,2	0,2	2727(1247-18089)	9,2	0,2
	+DEM	1,31 ($\pm 0,43$)	32(2-69)	0,3	1,8	576(284-7670)	1,9	0,8
Estragol								
SSSO	+Acetona	3,11 ($\pm 0,64$)	78(53-134)	1,0	--	263(146-3127)	1,0	--
	+PBO	4,87 ($\pm 0,83$)	76(59-99)	0,9	1,0	165(119-368)	0,6	1,6
	+DEF	4,13 ($\pm 0,73$)	54(36-77)	0,7	1,4	136(91-537)	0,5	1,9
	+DEM	3,15 ($\pm 0,67$)	92(74-125)	1,2	0,8	306(194-878)	1,2	0,8
Estragol								
Met7SO	+Acetona	4,26 ($\pm 0,71$)	132(100-178)	1,7	--	321(223-777)	1,2	--
	+PBO	2,91 ($\pm 0,63$)	91(43-138)	1,2	1,4	335(195-4048)	1,3	0,9
	+DEF	2,66 ($\pm 0,60$)	85(41-121)	1,1	1,5	352(209-2380)	1,3	0,9
	+DEM	2,97 ($\pm 1,03$)	44(10-63)	0,6	3,0	157(112-606)	0,6	2,0
Fenchona								
SSSO	+Acetona	8,67 ($\pm 1,51$)	42(37-48)	1,0	--	66(56-86)	1,0	--
	+PBO	2,36 ($\pm 0,55$)	47(31-99)	1,1	0,9	235(108-5307)	3,5	0,3
	+DEF	3,81 ($\pm 0,72$)	27(12-41)	0,6	1,5	72(46-472)	1,1	0,9
	+DEM	6,33 ($\pm 1,32$)	50(41-64)	1,2	0,8	92(69-217)	1,4	0,7

Fenchona								
Fen7SO	+Acetona	6,56 (±1,23)	42(30-58)	1,0	--	76(56-244)	1,2	--
	+PBO	7,84 (±1,41)	49(40-59)	1,2	0,8	80(65-133)	1,2	0,9
	+DEF	6,16 (±1,15)	43(36-52)	1,0	0,9	80(64-138)	1,2	0,9
	+DEM	11,07 (±1,87)	43(38-49)	1,0	0,9	61(53-77)	0,9	1,2
Geraniol								
SSSO	+Acetona	1,74 (±0,55)	336(215-1413)	1,0	--	2974(914-3E+05)	1,0	--
	+PBO	2,39(±0,60)	312(222-663)	0,9	1,1	1528(702-13980)	0,5	1,9
	+DEF	1,93(±0,57)	361(234-1304)	1,1	0,9	2570(883-1E+05)	0,8	1,2
	+DEM	2,21(±0,57)	299(211-665)	0,8	1,1	1657(719-19904)	0,5	1,8
Geraniol								
Ger7SO	+Acetona	1,51 (±0,43)	1294(800-4215)	3,8	--	16044(4671-1E+06)	5,4	--
	+PBO	1,20 (±0,34)	525(294-1055)	1,5	2,5	12431(3545-8E+05)	4,2	1,3
	+DEF	1,13 (0,33)	409(200-780)	1,2	3,2	11784(3243-1E+06)	3,9	1,4
	+DEM	1,18 (±0,34)	559(315-1186)	1,6	2,3	13923(3774-1E+07)	4,7	1,2
γ -Terpineno								
SSSO	+Acetona	2,90 (±0,62)	195(127-370)	1,0	--	721(377-14849)	1,0	--
	+PBO	4,21 (±0,75)	155(92-223)	0,8	1,3	380(253-1751)	0,5	1,9
	+DEF	2,31 (±0,51)	104(45-165)	0,5	1,8	532(275-9779)	0,7	1,3
	+DEM	2,27 (±0,61)	261(193-479)	1,3	0,7	1389(655-13775)	1,9	0,5
γ -Terpineno								
Ter7SO	+Acetona	2,76 (±0,48)	378(249-524)	1,9	--	1490(953-3932)	2,1	--
	+PBO	4,88 (±0,76)	231(178-302)	1,2	1,6	502(373-800)	0,7	2,9
	+DEF	3,75 (±0,58)	207(157-268)	1,1	1,8	568(415-935)	0,8	2,6
	+DEM	3,49 (±0,51)	265(198-339)	1,3	1,4	785(586-1226)	1,1	1,9

^a Poblaciones de *S.oryzae* resistentes a: linalol (Lin7SO), alcanfor (Alc7SO), *S*-carvona (Car7SO), *E*-anetol (Tra7SO), estragol (Met7SO), fenchona (Fen7SO), geraniol (Ger7SO) y γ -Terpineno (Ter7SO). ^b Los sinergistas se aplicaron disueltos en acetona, tópicamente a los insectos a dosis de 20.000 ppm para PBO (butóxido de piperonilo), 15.000 ppm para DEF (SSS-tributilfosforotritioato) y 15.000 ppm para DEM (dietil maleato). ^c CL: concentración letal calculada por análisis probit. ^d FR: factor de resistencia (CL₅₀ población resistente/ CL₅₀ población sensible). ^e RS: ratio de sinergismo (CL₅₀ acetona/ CL₅₀ sinergista).

Tabla 32. Concentraciones letales de monoterpenoides, con y sin sinergistas para poblaciones sensibles (SSRD) y poblaciones resistentes (generación 7) de *Rhyzopertha dominica* seleccionadas en laboratorio^a.

Población	Tratamiento ^b	Pendiente (± ES)	CL ₅₀ (ppm) ^c (LF, 95%)	FR ₅₀ ^d	RS ₅₀ ^e	CL ₉₅ (ppm) ^c (LF, 95%)	FR ₉₅ ^d	RS ₉₅ ^e
Linalol								
SSRD	+Acetona	9,49 (±1,69)	48(44-52)	1,0	--	71(62-92)	1,0	--
	+PBO	7,77 (±1,50)	36(30-41)	0,7	1,3	58(48-104)	0,8	1,2
	+DEF	12,57 (±3,36)	29(25-31)	0,6	1,6	39(35-51)	0,5	1,8
	+DEM	8,04 (±1,42)	43(38-49)	0,9	1,1	69(57-109)	0,9	1,1
Linalol								
Lin5RD	+Acetona	2,58 (±0,63)	34(11-49)	0,7	--	148(87-1838)	2,1	--
	+PBO	3,06 (±0,94)	22(8-30)	0,4	1,5	75(54-207)	1,1	1,9
	+DEF	4,13 (±1,01)	28(20-36)	0,6	1,2	73(56-138)	1,1	2,0
	+DEM	4,31 (±0,82)	39(23-53)	0,8	0,9	94(65-367)	1,3	1,6
Alcanfor								
SSRD	+Acetona	5,39 (±1,28)	27(22-31)	1,0	--	54(43-96)	1,0	--
	+PBO	2,96 (±0,55)	21(16-28)	0,8	1,3	77(53-160)	1,4	0,7
	+DEF	2,54 (±0,42)	11(4-21)	0,4	2,5	48(24-673)	0,9	1,1
	+DEM	2,55 (±0,48)	24(12-49)	0,9	1,1	106(51-3182)	1,9	0,5
Alcanfor								
Alc7RD	+Acetona	2,78 (±0,67)	25(8-37)	0,9	--	99(61-858)	1,8	--
	+PBO	2,77 (±0,70)	24(7-34)	0,9	1,1	93(59-673)	1,7	1,1
	+DEF	4,58 (±1,05)	26(19-30)	0,9	0,9	58(46-102)	1,1	1,7
	+DEM	3,58 (±0,81)	25(11-34)	0,9	1,0	72(49-343)	1,3	1,4
S-Carvona								
SSRD	+Acetona	4,54 (±1,28)	33(23-40)	1,0	--	77(59-178)	1,0	--
	+PBO	2,64 (±0,40)	13(5-23)	0,4	2,5	54(29-213)	0,7	1,4
	+DEF	1,89 (±0,31)	15(6-27)	0,5	2,2	109(51-718)	1,4	0,7
	+DEM	2,06 (±0,32)	12(7-17)	0,4	2,7	74(45-163)	0,9	1,1

		<i>S</i> -Carvona						
Car7RD	+Acetona	2,92 (±0,48)	31(20-42)	0,9	--	112(78-195)	1,5	--
	+PBO	2,44 (±0,36)	19(11-31)	0,6	1,6	89(51-245)	1,2	1,3
	+DEF	3,71 (±0,60)	20(13-30)	0,6	1,5	56(37-104)	0,7	2,0
	+DEM	3,71 (±0,60)	20(13-30)	0,6	1,5	56(37-104)	0,7	2,0
		<i>E</i> -Anetol						
SSRD	+Acetona	3,44 (±0,54)	20(15-25)	1,0	--	59(44-97)	1,0	--
	+PBO	3,39 (±0,52)	16(12-21)	0,8	1,3	50(37-83)	0,8	1,2
	+DEF	3,27 (±0,50)	15(10-21)	0,8	1,3	47(32-97)	0,8	1,3
	+DEM	2,42 (±0,41)	21(12-32)	1,1	0,9	100(56-408)	1,7	0,6
		<i>E</i> -Anetol						
Tra5RD	+Acetona	3,80 (±0,69)	25(15-35)	1,2	--	68(46-178)	1,2	--
	+PBO	3,54 (±0,61)	24(10-39)	1,2	1,1	70(42-415)	1,2	0,9
	+DEF	3,12 (±0,53)	25(18-32)	1,2	1,0	83(59-148)	1,4	0,8
	+DEM	3,66 (±0,60)	21(12-30)	1,1	1,2	58(±39-140)	0,9	1,2
		Estragol						
SSRD	+Acetona	3,88 (±0,74)	41(31-64)	1,0	--	110(68-596)	1,0	--
	+PBO	2,97 (±0,69)	38(26-63)	0,9	1,1	135(74-2364)	1,2	0,8
	+DEF	7,07 (±1,37)	28(25-32)	0,7	1,5	48(40-70)	0,4	2,3
	+DEM	8,91 (±1,71)	40(36-46)	0,9	1,1	61(52-84)	0,5	1,8
		Estragol						
Met7RD	+Acetona	5,36 (±0,95)	51(43-59)	1,3	--	103(82-154)	0,9	--
	+PBO	4,12 (±1,01)	33(22-40)	0,8	1,5	82(63-155)	0,7	1,3
	+DEF	4,81 (±1,07)	37(29-43)	0,9	1,4	81(64-136)	0,7	1,3
	+DEM	5,23 (±1,05)	41(34-48)	1,0	1,3	84(67-133)	0,8	1,2
		Fenchona						
SSRD	+Acetona	5,96 (±0,96)	36(28-50)	1,0	--	69(50-183)	1,0	--
	+PBO	4,08 (±0,88)	25(18-31)	0,7	1,4	63(45-177)	0,9	1,1
	+DEF	4,57 (±1,02)	23(16-28)	0,6	1,6	52(38-152)	0,7	1,3
	+DEM	4,65 (±0,90)	28(21-37)	0,8	1,3	63(45-213)	0,9	1,1

		Fenchona						
Fen7RD	+Acetona	4,98 ($\pm 1,03$)	39(32-46)	1,1	--	84(66-135)	1,2	--
	+PBO	2,41 ($\pm 0,84$)	18(2-29)	0,5	2,2	88(60-384)	1,3	0,9
	+DEF	3,85 ($\pm 0,93$)	33(22-40)	0,9	1,2	87(66-169)	1,3	0,9
	+DEM	3,24 ($\pm 0,85$)	30(10-41)	0,8	1,3	96(65-471)	1,4	0,9
		γ -Terpineno						
SSRD	+Acetona	2,84 ($\pm 0,55$)	131(87-212)	1,0	--	496(274-3716)	1,0	--
	+PBO	1,73 ($\pm 0,53$)	58(19-87)	0,4	2,2	520(266-6279)	1,1	0,9
	+DEF	2,21 ($\pm 0,53$)	88(58-118)	0,7	1,5	489(285-1996)	0,9	1,1
	+DEM	2,95 ($\pm 0,56$)	128(89-190)	0,9	1,1	463(273-2123)	0,9	1,1
		γ -Terpineno						
Ter7RD	+Acetona	4,32 ($\pm 0,71$)	97(77-118)	0,7	--	232(179-362)	0,5	--
	+PBO	5,88 ($\pm 0,95$)	102(74-138)	0,8	0,9	195(143-382)	0,4	1,2
	+DEF	4,09 ($\pm 0,68$)	93(74-114)	0,7	1,1	234(179-376)	0,5	1,0
	+DEM	4,15 ($\pm 0,68$)	100(79-122)	0,8	0,9	248(190-391)	0,5	0,9

^a Poblaciones de *R.dominica* resistentes a: linalol (Lin5RD), alcanfor (Alc7RD), *S*-carvona (Car7RD), *E*-Anetol (Tra5RD), estragol (Met7RD), fenchona (Fen7RD), y γ -Terpineno (Ter7RD).

^b Los sinergistas se aplicaron disueltos en acetona, tópicamente a los insectos a dosis de 15.000 ppm para PBO (butóxido de piperonilo), 10.000 ppm para DEF (SSS-tributilfosforotritioato) y 15.000 ppm para DEM (dietil maleato). ^cCL: concentración letal calculada por análisis probit. ^dFR: factor de resistencia (CL_{50} población resistente/ CL_{50} población sensible). ^dRS: ratio de sinergismo (CL_{50} acetona/ CL_{50} sinergista).

Tabla 33. Concentraciones letales de monoterpenoides, con y sin sinergistas para poblaciones sensibles (SSCP) y poblaciones resistentes (generación 7) de *Cryptolestes pusillus* seleccionadas en laboratorio^a.

Población	Tratamiento ^b	Pendiente (± ES)	CL ₅₀ (ppm) ^c (LF, 95%)	FR ₅₀ ^d	RS ₅₀ ^e	CL ₉₅ (ppm) ^c (LF, 95%)	FR ₉₅ ^d	RS ₉₅ ^e
Linalol								
SSCP	+Acetona	2,73 (±0,43)	12(9-16)	1,0	--	47(30-106)	1,0	--
	+PBO	3,60 (±1,02)	4(3-5)	0,3	3,0	11(7-39)	0,2	4,3
	+DEF	3,07 (±0,52)	8(5-24)	0,7	1,5	29(14-705)	0,6	1,6
	+DEM	5,83 (±1,40)	5(4-8)	0,4	2,4	10(7-53)	0,2	4,7
Linalol								
Lin6CP	+Acetona	3,12 (±0,54)	25(13-42)	2,1	--	84(48-635)	1,8	--
	+PBO	2,93 (±0,54)	8(5-12)	0,7	3,1	30(19-84)	0,6	2,8
	+DEF	3,32 (±0,60)	10(6-14)	0,8	2,5	30(19-75)	0,6	2,8
	+DEM	2,50 (±0,42)	11(6-17)	0,9	2,3	52(31-157)	1,1	1,6
Alcanfor								
SSCP	+Acetona	1,21 (±0,22)	4(1-18)	1,0	--	89(19-54590)	1,0	--
	+PBO	1,05 (±0,22)	2(1-6)	0,5	2,0	58(12-1,4E+06)	0,6	1,5
	+DEF	1,66 (±0,27)	8(2-43)	2,0	0,5	78(21-19858)	0,9	1,5
	+DEM	1,20 (±0,21)	4(1-20)	1,0	1,0	98(20-74660)	1,1	0,9
Alcanfor								
Alc6CP	+Acetona	7,80 (±1,44)	30(26-34)	7,5	--	48(41-66)	0,5	--
	+PBO	5,88 (±1,34)	26(21-30)	6,5	1,2	49(40-78)	0,6	0,9
	+DEF	6,75 (±1,39)	28(21-35)	7,0	1,1	49(38-116)	0,6	0,9
	+DEM	8,20 (±1,47)	30(23-41)	7,5	1,0	48(37-124)	0,5	1,0
S-Carvona								
SSCP	+Acetona	1,62 (±0,27)	6(2-15)	1,0	--	59(20-1652)	1,0	--
	+PBO	1,24 (±0,23)	4(1-11)	0,7	1,5	87(24-4903)	1,5	0,7
	+DEF	1,15 (±0,23)	3(1-8)	0,5	2,0	69(16-73990)	1,2	0,8
	+DEM	2,43 (±0,45)	7(2-15)	1,2	0,8	32(14-847)	0,5	1,8

<i>S</i> -Carvona								
Car7CP	+Acetona	3,73 ($\pm 0,70$)	9(6-14)	1,5	--	24(14-94)	0,4	--
	+PBO	3,44 ($\pm 1,17$)	3(1-4)	0,5	3,0	9(6-44)	0,2	2,7
	+DEF	2,51 ($\pm 0,60$)	5(2-7)	0,8	1,8	21(11-144)	0,4	1,1
	+DEM	4,62 ($\pm 1,01$)	9(7-14)	1,5	1,0	21(14-54)	0,4	1,1
<i>E</i> -Anetol								
SSCP	+Acetona	3,38 ($\pm 0,54$)	13(10-17)	1,0	--	39(28-69)	1,0	--
	+PBO	2,36 ($\pm 0,39$)	9(4-17)	0,7	1,4	46(22-350)	1,2	0,8
	+DEF	1,69 ($\pm 0,31$)	14(4-37)	1,1	0,9	127(43-18017)	3,2	0,3
	+DEM	3,35 ($\pm 0,59$)	12(7-20)	0,9	1,1	38(23-139)	0,9	0,9
<i>E</i> -Anetol								
Tra6CP	+Acetona	5,02 ($\pm 1,58$)	28(16-34)	2,1	--	60(48-130)	1,5	--
	+PBO	3,27 ($\pm 0,95$)	27(12-36)	2,1	1,1	85(63-210)	2,2	0,7
	+DEF	3,06 ($\pm 0,94$)	25(9-34)	1,9	1,1	86(62-237)	2,2	0,7
	+DEM	3,60 ($\pm 1,06$)	27(13-35)	2,1	2,1	77(58-178)	1,9	0,8
Fenchona								
SSCP	+Acetona	3,09 ($\pm 0,57$)	16(11-28)	1,0	--	55(31-454)	1,0	--
	+PBO	3,29 ($\pm 0,69$)	8(6-10)	0,5	2,0	27(19-55)	0,5	2,1
	+DEF	4,59 ($\pm 0,81$)	11(9-14)	0,7	1,5	26(20-42)	0,5	2,1
	+DEM	4,62 ($\pm 0,84$)	10(7-14)	0,6	1,6	23(16-78)	0,4	2,4
Fenchona								
Fen6CP	+Acetona	4,56 ($\pm 0,74$)	16(10-23)	1,0	--	37(26-73)	0,7	--
	+PBO	1,62 ($\pm 0,37$)	9(2-16)	0,6	1,8	92(41-2168)	1,7	0,4
	+DEF	2,94 ($\pm 0,50$)	10(5-17)	0,6	1,6	38(2-177)	0,7	0,9
	+DEM	3,48 ($\pm 0,53$)	15(9-23)	0,9	1,1	45(29-109)	0,8	0,8
Geraniol								
SSCP	+Acetona	1,73 ($\pm 0,41$)	5(1-9)	1,0	--	47(25-295)	1,0	--
	+PBO	2,09 ($\pm 0,44$)	7(2-11)	1,4	0,7	41(22-235)	0,9	1,1
	+DEF	2,47 ($\pm 0,48$)	8(3-13)	1,6	0,6	35(19-235)	0,7	1,3
	+DEM	1,84 ($\pm 0,52$)	3(1-7)	0,6	1,7	28(14-356)	0,6	1,7

		Geraniol						
Ger7CP	+Acetona	3,24 (±0,83)	44(34-58)	8,8	--	142(92-489)	3,1	--
	+PBO	4,54 (±1,28)	31(21-37)	6,2	1,4	70(54-163)	1,5	2,1
	+DEF	2,75 (±0,85)	30(16-40)	6,0	1,5	120(76-648)	2,5	1,2
	+DEM	3,71 (±1,27)	26(12-33)	5,2	1,7	73(53-302)	1,5	1,9
		γ -Terpineno						
SSCP	+Acetona	7,06 (±1,43)	35(30-40)	1,0	--	59(49-86)	1,0	--
	+PBO	1,33 (±0,35)	24(11-54)	0,7	1,5	404(118-82178)	6,8	0,1
	+DEF	1,88 (±0,37)	17(6-33)	0,5	2,1	123(51-5610)	2,1	0,5
	+DEM	2,42 (±0,42)	20(8-41)	0,6	1,7	97(45-2506)	1,6	0,6
		γ -Terpineno						
Ter7CP	+Acetona	4,52 (±0,67)	63(49-77)	1,8	--	146(115-207)	2,5	--
	+PBO	2,95 (±0,56)	35(21-49)	1,0	1,8	127(85-306)	2,1	1,2
	+DEF	4,41 (±0,78)	42(33-53)	1,2	1,5	98(73-168)	1,6	1,5
	+DEM	4,68 (±0,69)	61(45-78)	1,7	1,1	137(103-216)	2,3	1,1

^a Poblaciones de *C.pusillus* resistentes a: linalol (Lin6CP), alcanfor (Alc6CP), *S*-carvona (Car7CP), *E*-Anetol (Tra6CP), fenchona (Fen6CP), geraniol (Ger7CP) y γ -Terpineno (Ter7RD). ^b Los sinergistas se aplicaron disueltos en acetona, tópicamente a los insectos a dosis de 10.000 ppm para PBO (butóxido de piperonilo), 1.000 ppm para DEF (SSS-tributilfosforotritioato) y 10.000 ppm para DEM (dietil maleato). ^c CL: concentración letal calculada por análisis probit. ^d FR: factor de resistencia (CL_{50} población resistente/ CL_{50} población sensible). ^d RS: ratio de sinergismo (CL_{50} acetona/ CL_{50} sinergista).

4.8. RESIDUOS DE MONOTERPENOIDES EN EL ARROZ.

En la Tabla 34 se presentan los valores obtenidos en el estudio de adsorción de los diferentes monoterpenoides (linalol, geraniol, alcanfor, fenchona, γ -terpineno, *S*-carvona, *E*-anetol y estragol) a los 4 días y a los 2 meses en muestras de arroz blanco y arroz integral.

A los dos meses, en todos los casos, se adsorbe más monoterpenoide que a los dos días, excepto en algunos casos: cuando se aplica 1 μ l de fenchona, γ -terpineno y *S*-carvona en arroz blanco, o cuando se aplica 1 μ l de fenchona en arroz integral o 10 μ l de este monoterpenoide en arroz blanco. En todos estos casos descritos el valor obtenido fue 0,000 ppm lo cual no resulta un valor fiable ya que pensamos que cuando se realizó el análisis en el cromatógrafo de gases es posible que sufriera alguna pérdida de muestra o evaporación.

En una visión general, observamos como el arroz integral adsorbe en mayor cantidad que el arroz blanco, y en los casos donde esto no ocurre así los valores del arroz integral son similares a los del arroz blanco aunque ligeramente inferiores. Además la aplicación de 10 μ l del monoterpenoide conlleva mayor adsorción que cuando solo se aplica 1 μ l.

Si nos fijamos en la Tabla 35, se presentan los valores que se obtuvieron de un estudio de desorción de los monoterpenoides mencionados en la Tabla 34, en las mismas condiciones que el estudio anterior (a los 4 días y 2 meses, utilizando muestras de arroz blanco e integral).

A los 2 meses al igual que en el caso anterior se desorbe más monoterpeno que a los 4 días.

En algunos monoterpenoides (fenchona, *S*-carvona tanto a los 2 meses como a los 4 días y geraniol, alcanfor, γ -terpineno y *E*-anetol y estragol a los 4 días) obtenemos valores de 0,000 ppm que son debido, como lo mencionado en el caso anterior, alguna pérdida de muestra o evaporación.

Para la mayoría, el arroz integral libera mayor cantidad de monoterpenoide que el arroz blanco, al igual que este tipo de arroz también adsorbía más como veíamos en la Tabla 34.

Sin embargo, en la mayoría de monoterpenoides no se observan diferencias entre la cantidad aplicada, ya sea 1 μ l o 10 μ l, salvo para el linalol y estragol con arroz integral a los 2 meses, que muestran valores mas elevados al aplicar 10 μ l que 1 μ l.

Finalmente, en la Tabla 36 se muestran los datos obtenidos de un estudio de desorción realizado únicamente con linalol donde los viales se mantuvieron con dos condiciones diferentes, con tapón y sin tapón.

Se observa claramente que durante las tres primeras semanas los valores de desorción son más elevados cuando el vial se encuentra tapado. Sin embargo en la cuarta semana estos valores no son tan acusados, llegando incluso a invertirse la tendencia en algún caso (arroz integral, 1 y 10 μ l). En la quinta semana vuelven a surgir diferencias, aunque no tan extremas como en las tres primeras semanas. Al estar sin tapón, el arroz también desorbe, sin embargo estos volátiles se pierden en el aire por lo que no lo podemos medir. Comparando con o sin tapón podemos concluir que los residuos se pierden al “airear”.

En general, desde la primera hasta la cuarta semana los valores obtenidos van disminuyendo, sin embargo la quinta semana estos valores aumentan ligeramente. Esto se aprecia más cuando nos fijamos en los viales con tapón, ya que los viales sin tapón tienen valores más similares.

Para el estudio de viales con tapón podemos afirmar que el arroz blanco, en el caso del linalol, desorbe más que el arroz integral, sin embargo cuando mantenemos el vial sin tapón observamos que esta tendencia ya no se cumple tanto.

Asimismo cuando aplicamos 10 μ l siempre se desorben concentraciones mayores.

Tabla 34. Adsorción de monoterpenoides (ppm) en arroz^a.

Arroz	Dosis (μ l)	Linalol		Geraniol		Alcanfor		Fenchona		γ -Terpineno		S-Carvona		E-Anetol		Estragol	
		4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses
Blanco	1	2,889	4,341	0,565	1,635	0,777	0,846	0,846	0,000	1,039	0,000	1,793	0,000	0,289	1,951	1,286	3,561
Integral	1	2,259	10,372	0,511	2,117	0,361	1,138	1,332	0,000	1,598	1,870	1,575	46,689	1,317	2,144	2,328	25,533
Blanco	10	2,128	27,372	0,942	3,026	1,537	59,915	4,314	0,000	3,616	6,630	1,771	77,302	1,786	4,181	2,115	5,906
Integral	10	5,296	62,220	0,219	4,604	2,090	63,111	3,677	63,987	3,557	7,267	1,120	226,053	2,343	3,295	3,581	110,833

^a tiempo de exposición del arroz (dentro de viales tapados) a los vapores: 4 días o 2 meses.

Tabla 35. Desorción de monoterpenoides (ppm) en arroz^a.

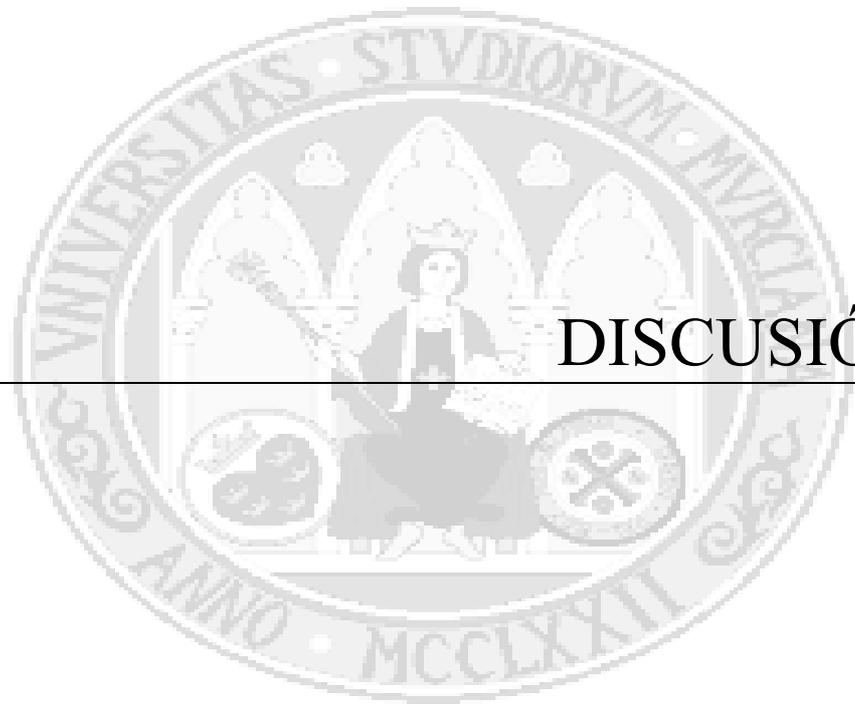
Arroz	Dosis (μ l)	Linalol		Geraniol		Alcanfor		Fenchona		γ -Terpineno		S-Carvona		E-Anetol		Estragol	
		4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses	4 días	2 meses
Blanco	1	0,766	0,896	0,000	1,943	0,000	2,249	0,000	0,000	0,000	1,096	0,000	0,000	0,000	2,819	0,000	1,578
Integral	1	0,564	2,955	0,000	2,314	0,000	1,089	0,598	0,000	0,000	4,348	0,000	0,000	0,000	1,758	0,000	2,487
Blanco	10	1,190	1,495	0,000	1,506	0,385	1,456	0,314	0,000	0,000	1,114	0,177	0,000	0,000	1,573	0,452	1,299
Integral	10	0,412	13,065	0,000	1,823	0,268	1,653	1,451	0,056	0,198	2,003	0,250	32,076	0,000	1,826	0,000	6,093

^a tiempo de exposición del arroz (dentro de viales tapados) a los vapores: 4 días o 2 meses.

Tabla 36. Desorción de linalol (ppm) desde el arroz^a.

Arroz	Dosis (µl)	1ª Semana		2ª Semana		3ª Semana		4ª Semana		5ª Semana	
		Con	Sin								
Blanco	1	76,566	2,376	26,566	3,210	23,193	2,304	1,037	0,765	4,112	0,846
	10	288,753	6,342	177,820	6,539	236,338	4,867	1,565	1,106	27,337	1,466
Integral	1	49,265	1,265	12,249	2,956	10,708	3,184	0,463	0,904	2,264	1,816
	10	183,406	2,506	55,182	7,017	53,319	7,217	1,340	1,603	7,412	2,479

^a tiempo de exposición al arroz (dentro de viales “con” o “sin” tapón) a los vapores: 4 días; tiempo de desorción: 1-5 semanas.



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN.

5.1. ACTIVIDAD INSECTICIDA VOLÁTIL DE LOS ACEITES ESENCIALES Y SUS FRACCIONES EN LAS PLAGAS DE ALMACÉN DEL ARROZ.

Isman (2000) señala que ciertos aceites esenciales de algunas plantas tienen un amplio espectro contra insectos, hongos, nematodos, etc. y pueden ser utilizados como alternativa al control de plagas, así están de acuerdo otros autores (Choi *et al.*, 2003; Regnault-Roger *et al.*, 1993).

Los aceites esenciales y fracciones de *Coriandrum sativum*, *Carum carvii* y *Ocimum basilicum* fueron seleccionados para ser estudiados como insecticidas de plagas de almacén de arroz.

Singh *et al.*, (2006) encuentra en la composición del aceite esencial de *Coriandrum sativum* propiedades antifúngicas y supresoras del crecimiento. Mientras que El-Zemity *et al.*, (2006), observa cualidades acaricidas para el aceite esencial de *Carum carvii*. Pascual-Villalobos y Ballesta-Acosta (2003) advirtieron efectos repelentes en diferentes aceites esenciales de distintas variedades de *Ocimum basilicum* contra *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).

Coriandrum sativum

El rendimiento obtenido de la destilación del aceite esencial de los frutos estuvo entre 0,3-0,5 %, sin embargo, Smallfield *et al.*, (2001) obtuvieron rendimientos más elevados con un mayor aplastamiento del fruto donde además se requeriría un menor tiempo de destilación.

Para *Coriandrum sativum* se obtuvieron 8 fracciones a partir del aceite esencial separadas gracias a cromatografía en columna.

De estas 8 fracciones resultó activa para las tres plagas estudiadas (*Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*), F5C.

Mientras que F3C y F4C fueron activas para *R. dominica* y *C. pusillus* y F1C y F6C solo resultó tener actividad insecticida sobre *C. pusillus*.

Pero de todas estas fracciones merece la pena destacar F5C, ya que de esta fracción se obtuvo una mayor cantidad (4,78091 gramos), por lo que se supuso que el linalol, componente mayoritario en el aceite esencial de coriandro como veremos en el apartado 5.2 debería encontrarse en esta fracción.

Gil *et al.*, (2002), también observaron que aún partiendo de cultivares diferentes, el mayor componente de este aceite esencial era el linalol y que las principales diferencias observadas en la composición del aceite esencial estaban relacionadas a la proporción relativa de los constituyentes y no a la presencia o ausencia de un componente particular.

En el fraccionamiento de F5C, llevado a cabo posteriormente, se obtuvieron 7 fracciones con diferente actividad insecticida cada una. Entre todas ellas, solo resultaron activas para las tres plagas F54C y F55C y para *R. dominica* y *C. pusillus*, F53C.

En general *C. pusillus* resulta mas susceptible a estos insecticidas ecológicos y se observa mayor mortalidad para esta plaga que para *R. dominica* y *S. oryzae*.

Para *S. oryzae* los resultados obtenidos con este aceite esencial y sus fracciones no resultan tan interesantes, ya que la mortalidad alcanzada por las fracciones activas para este insecto no es tan alta, y quizás sería recomendable complementarla con algún otro tratamiento, ya sea métodos mecánicos o biológicos recomendados por otros autores (Lucas y Riudavets, 2002) para el control de plagas de almacén.

Carum carvii.

El rendimiento obtenido de esta destilación fue del 1 %, si bien otros autores obtuvieron rendimientos mayores para los frutos de esta planta con condiciones de extracción diferentes ya fueran con aplastamiento de la semilla y extracción con ultrasonidos (Bailer *et al.*, 2001; Chemat *et al.*, 2004) o usando ondas microondas en la extracción (Chemat *et al.*, 2005; Ferhat *et al.*, 2007).

En el caso de *Carum carvii*, se obtuvieron 9 fracciones del aceite esencial, de las cuales resultó activa para las tres plagas de insectos, F6A.

Por otra parte, las fracciones F2A y F5A fueron activas contra *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*.

Así pues, las fracciones F2A (1,36431 g), F5A (1,82128 g) y F6A (4,25596 g) fueron subfraccionadas, obteniendo 5 fracciones desde F2A, 4 fracciones desde F5A y 6 fracciones desde F6A.

Una ligera actividad fue encontrada para F21A y F52A en *Cryptolestes pusillus*, y una actividad mas alta en F51A para *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*.

Asimismo F63A, F64A y F65A fueron las fracciones con mayor actividad insecticida para las tres plagas.

Al igual que en el fraccionamiento del aceite esencial de coriandro, el insecto mas sensible a las fracciones obtenidas de alcaravea fue *C. pusillus*.

Sin embargo a diferencia del caso anterior, las fracciones que resultaron activas contra *S. oryzae*, como fueron F6A, F63A, F64A y F65A, resultaron tener una alta actividad insecticida y se alcanzó con ellas una alta mortalidad.

Aún así, como ya señalan Bekele *et al.*, (1997), es mas difícil alcanzar una alta mortalidad con *S. oryzae* que con *R. dominica*.

La toxicidad del aceite esencial de *Carum carvii* ya fue estudiada por Choi *et al.*, (2004), sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) y *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseiidae) obteniendo una mortalidad de > 90 % en sus experimentos.

Ocimum basilicum.

El rendimiento obtenido de las destilaciones del aceite esencial para las diferentes albahacas estuvo entre 0,5 y 1 % en relación al peso de hoja dependiendo de la variedad.

Como veremos en el apartado 5.2 cada una de las variedades de albahaca estudiadas presentaban un perfil químico diferente, para así poder realizar un estudio más completo de qué variedad de albahaca sería la más adecuada como fuente de monoterpenoides con actividad insecticida.

Los efectos medioambientales pueden influir considerablemente en el contenido del aceite esencial de albahaca, como bien señalan Chang *et al.*, (2005) sin embargo, encontraron que un aumento en la temperatura podía aumentar el contenido de eugenol y en cambio no encontraron diferencias notables en el contenido de 1,8-cineol y linalol, uno de los quimiotipos de albahaca utilizados en este estudio como se verá en el apartado 5.2. (Chang *et al.*, 2007).

De la mezcla de las dos variedades de albahaca OB7 y OB8 se obtuvieron 22 fracciones de las cuales se encontró actividad insecticida para las tres plagas en F1B8, F2B8, F3B8, F4B8 F5B8 y F10B8.

También F6B8, F11B8, F12B8 y F13B8 fueron fracciones que resultaron activas para *Rhyzopertha dominica* y *Cryptolestes pusillus*.

Para la variedad OB17, F2B17 fue la fracción que resultó mas activa para las tres plagas estudiadas, mientras que F3B17 fue muy activa sólo para *C. pusillus* y *R. dominica*.

Sin embargo algunas de las fracciones sólo mostraron actividad insecticida para una de las plagas como ocurrió con F1B17 donde sólo encontramos una alta mortalidad a las 24 horas para *C. pusillus*, y F6B17, F8B17 y F9B17 donde existía una ligera mortalidad para *S. oryzae*.

Es interesante destacar como el subfraccionamiento llevado a cabo para la fracción F2B17 (3,7440 g) que había resultado anteriormente activa para las tres plagas, no mostró actividad insecticida alguna para *S. oryzae* con ninguna de sus subfracciones.

En cambio F21B17, F22B17 y F23B17 si que resultaron tener actividad sobre *R. dominica* y *C. pusillus*.

Cuando fraccionamos la variedad de albahaca OB25 encontramos que F4B25 y F7B25 eran activas para las tres plagas, F6B25 resultaba tener actividad insecticida tanto para *R. dominica* como para *C. pusillus*, mientras que F5B25 y F8B25 sólo mostraban actividad sobre *C. pusillus*.

Finalmente, para la variedad de albahaca OB43 hallamos actividad insecticida tanto en F1B43 como en F2B43 para las tres plagas, mientras que F3B43 no mostraba actividad para *R. dominica*.

En todos los casos la mortalidad es siempre mayor a las 24 horas lo que nos conduce a una mayor mortalidad al aumentar el tiempo de exposición, lo que esta en acuerdo con Kim *et al.*, (2003) donde utilizaron una serie de extractos y aceites esenciales y comprobaron que al transcurrir los días la mortalidad que observaban iba en aumento.

Sólo en *C. pusillus* se observó en algunas fracciones un rápido efecto insecticida (2 horas). Si bien podemos considerar en cualquier caso que el efecto a las 24h es también a bastante corto plazo.

5.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS.

En las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5 se muestra la composición química de cada aceite esencial, fracción y subfracción.

La inmensa mayoría de compuestos identificados en estas fracciones son monoterpénoides, hallándose también muchos sesquiterpenos en el aceite esencial de albahaca, en las fracciones y subfracciones de sus variedades.

En el aceite esencial de coriandro se determina principalmente el linalol (> 75 %), seguido de monoterpenoides tales como el alcanfor, γ -terpineno, geraniol, acetato de geranilo, α -pineno y limoneno, y fenilpropanoides tal como el *p*-cimeno.

Los resultados obtenidos de este aceite esencial son similares a los obtenidos por otros autores tales como Misharina (2001), y Gil *et al.*, (2002). Para Smallfield *et al.*, (2001) el contenido de camfeno y mirceno fue superior al obtenido en nuestro análisis.

Se identificaron un total de 28 compuestos para este aceite esencial, y en las fracciones se identificaron de 6 a 12 compuestos, mientras que en las subfracciones fueron identificados de 3 a 5 productos.

El menor contenido de compuestos identificados en los fraccionamientos y subfraccionamientos nos permite relacionar de manera más directa la composición química con la actividad insecticida.

El compuesto mas activo contra *S. oryzae*, *R. dominica* y *C. pusillus* fue el linalol, ya que las fracciones con mayor actividad fueron F54C (96,94 % de mortalidad) y F55C (96,60 % de mortalidad).

Además, F53C, F4C y F3C resultaron ser fracciones activas para *R. dominica* y *C. pusillus*, donde los componentes mayoritarios eran el alcanfor y el acetato de geranilo, y así pues mezclas de linalol, alcanfor y acetato de geranilo fueron tan activas para estas dos plagas como el linalol solo.

Rozman *et al.*, (2006) afirmaban que la toxicidad del alcanfor causaba el 100 % de mortalidad (1 μ l/7,2 ml (vol)), a dosis diferentes a las de nuestros ensayos (1 μ l/15 ml (vol)).

Además como ya se señaló en el apartado anterior, *C. pusillus* es mucho mas sensible a los aceites esenciales, fracciones y subfracciones utilizados que los otros dos insectos, así entre los productos encontrados, en las fracciones F1C y F6C, que resultaron tener actividad insecticida sólo para este insecto fueron limoneno, γ -terpineno, ácido mirístico, geraniol, y eucaliptol; los cuales resultaron inactivos en las otras especies de insectos.

Es interesante resaltar la presencia de ácido mirístico (19,08 %) en la fracción F6C, el cual es un componente de los ácidos grasos, en los frutos maduros de coriandro (Diederichen, 1996), que posiblemente fue extraído durante la destilación.

El análisis del aceite esencial de alcaravea, mostró a la carvona como principal componente (45,5 %), pero también al *E*-anetol y al limoneno (\approx 20 %) como productos principales de este aceite.

Bouwmeester *et al.*, (1995) y De Carvalho y Da Fonseca, (2006), hallan como principales componentes del aceite esencial de alcaravea a la carvona (50-60 %) y al limoneno (25-35 %), encontrando al *E*-anetol como un compuesto minoritario, lo cual nos indica que nuestras semillas de partida podrían estar contaminadas con hinojo (*Foeniculum vulgare*), que contiene en su aceite esencial altas cantidades de anetol.

Otros de los compuestos presentes en el aceite esencial, aunque en menos de un 4 % son la fenchona, el estragol y el α -pineno.

En los fraccionamientos obtenidos de este aceite esencial se han identificado entre 6 y 12 compuestos, aunque en las subfracciones F64A y F65A se obtiene casi en su totalidad carvona y se obtiene una mortalidad de las tres especies de insectos muy cercana al 100 %.

Sin embargo la actividad de las fracciones en las cuales tenemos mezcla de carvona con otros productos, siempre resultó ser mas baja.

En el resto de las fracciones ocurre algo similar, obteniendo en más de un 70 % alguno de estos compuestos, limoneno, *E*-anetol, fenchona o carvona, lo que resulta verdaderamente útil para asignar la toxicidad de un compuesto dado en cada una de las plagas estudiadas.

La fracción F5A y la subfracción F51A, compuestas principalmente por *E*-anetol, resultaron ser muy tóxica tanto para *R. dominica* como para *C. pusillus*.

Como en el caso anterior, *C. pusillus* mostró mayor sensibilidad a algunas fracciones inactivas para las otras dos especies de insectos, como fue el caso de F2A y F21A, donde se encontraba un alto porcentaje de limoneno (≈ 80 %).

Ibrahim *et al.*, (2001) revelan que el limoneno es usado como insecticida en preparaciones para animales domésticos. Por otro lado, el monoterpenoide fenchona a unas dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ (vol), causó el 100 % de mortalidad en *S. oryzae* (Lee *et al.*, 2003), y es considerado como uno de los componentes del aceite esencial de *Thuja occidentalis* L., el cual es un insecticida contra *C. maculatus* de acuerdo a Keïta *et al.*, (2001).

En el análisis del aceite esencial de albahaca identificamos entre 45 y 48 compuestos en las variedades estudiadas. Este aceite estaba compuesto principalmente por monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpropanoides, lo cual está en afinidad con los análisis publicados por otros autores (Gaydou *et al.*, 1989; Grayer *et al.*, 1996; Lachowicz *et al.*, 1996; Lachowicz *et al.*, 1997).

Los quimiotipos encontrados para la mezcla de las variedades de albahaca OB7 y OB8 señalan al metil eugenol y estragol como los componentes principales, siendo el metilcinamato, estragol y linalol los constituyentes principales encontrados en la variedad OB7 (PI170579 USDA) en análisis realizados por Simon *et al.*, (1990).

En la variedad OB17 encontramos un elevado porcentaje de estragol (88,97 %), mientras que en OB25 y OB43 los quimiotipos de estos aceites esenciales muestran una mezcla de estragol y linalol como principales componentes.

Entre las fracciones encontramos altas cantidades de metil eugenol en F4B8, F5B8 y F6B8, de estragol en F2B17, F22B17 y F23B17, y de linalol en F10B8, F8B17 y F8B25 entre otros.

En algunas fracciones se encontró una mayor cantidad de productos que en el aceite esencial se encontraban como componente minoritario, este fue el caso del metilcinamato en F2B8 y F3B8 y del chavicol en F8B25.

De los componentes químicos que causaron mayor mortalidad encontramos que el estragol fue un compuesto activo para *S.oryzae* (80 % de mortalidad) en fracciones tales como F1B8 (con un 64,33 % de estragol), o F2B17 (con un 99,46 % de estragol).

Metil eugenol, metilcinamato y eugenol resultaron mas tóxicos en mezclas que prácticamente puros para *S.oryzae* en las fracciones F2B8, F3B8, F4B8, F5B8 y F6B8, mientras que las fracciones que contenían un porcentaje elevado de metil eugenol (F5B8 y F6B8) fueron mas activas para *R.dominica* que otras fracciones con mezclas de compuestos.

Obeng-Ofori *et al.*, (1997 y 1998) atribuían la actividad de las diferentes especies de *Ocimum* al cineol, eugenol, estragol y alcanfor.

Las fracciones de las variedades OB17 (F22B17 y F3B17) y OB25 (F4B25) mostraban al estragol como el principal componente activo para *R.dominica* y *C.pusillus* alcanzando una mortalidad mayor del 80 %. Sin embargo otros compuestos minoritarios, tales como el metoxicinamaldehído o anisaldehído podrían tener un efecto sinergista sobre el estragol ya que la subfracción F23B17 que contenía el 100 % de estragol no resultó tan activa como F21B17, F22B17 o F4B25, para *S.oryzae* y *R.dominica*.

Aunque como se ve en la Tabla 7 la cuantificación muestra que la subfracción F23B17 contenía 55,22 ppm de estragol, una concentración menor que las otras fracciones mencionadas, a pesar de mostrar un valor del 100 % de porcentaje relativo, por lo que esto también podría explicar que su actividad insecticida fuera menor.

En el aceite esencial OB25, se distingue cómo combinaciones de estragol con linalol o con *E*-anetol (en la fracción F2B43) fueron más letales contra *S.oryzae* que estragol sólo.

En la fracción F8B25 se observa como el chavicol (44,17 %) en combinación con linalol tuvo actividad insecticida contra *C.pusillus*.

Del mismo modo que sucedía con los aceites esenciales y fracciones de coriandro y alcaravea, la mayoría de fracciones fueron mucho más activas para *C.pusillus*.

Si observamos la Tabla 6 vemos como para el aceite esencial de coriandro y sus fracciones se obtuvo un alto contenido de linalol (alcanzando en F5C 2003,2 ppm), de geraniol (566,6 ppm en F6C), de alcanfor (1281,97 ppm en F53C) y γ -terpineno (792,78 ppm en F1C).

Asimismo el aceite esencial de alcaravea y sus fracciones tuvieron altos contenidos de carvona (1474,25 ppm en F63A), limoneno (1467,4 ppm en F2A), *E*-anetol (879,77 ppm en F5A) y fenchona (553,59 ppm en F52A).

Las fracciones de las variedades de albahaca dieron las más elevadas concentraciones de estragol (698,65 ppm en F4B25) y de eugenol (1116,6 ppm en F4B8) dentro de las fracciones activas.

Lichtenstein *et al.*, (1974) encontraron que la carvona aumentaba la toxicidad de los insecticidas carbamatos y organofosforados produciendo un efecto sinérgico, mientras que el metil eugenol mejoraba la actividad de los piretroides (Huang *et al.*, 2002).

5.3. CONCENTRACIONES LETALES (CL₅₀) DE MONOTERPENOIDES EN LAS PLAGAS DE ALMACÉN DEL ARROZ.

En las Tablas 1, 2 y 3 se exponen los resultados obtenidos en la determinación de CL₅₀ de varios monoterpenoides y fenilpropanoides sobre las tres plagas estudiadas.

En general *S*-carvona, y linalol fueron los monoterpenoides con mayor actividad insecticida (es decir, menor CL₅₀) y a su vez son los componentes más abundantes en los aceites de alcaravea y coriandro.

Por ejemplo la CL₅₀ = 2,74 mg.l⁻¹ de *S*-carvona y para el linalol es de CL₅₀ = 4,89 mg.l⁻¹ en *S. oryzae*.

Lee *et al.*, (2001) encontraron a la mentona y linalol como los monoterpenoides más biológicamente activos contra *S.oryzae*, sin embargo Kim y Ahn (2001) afirmaron que el estragol y la fenchona eran agentes más potentes contra *S.oryzae* que *E*-anetol.

La toxicidad de *S*-carvona ($CL_{50} = 6,60 \text{ mg.l}^{-1}$) y *E*-anetol ($CL_{50} = 8,90 \text{ mg.l}^{-1}$) para *R. dominica* resulta bastante parecida.

Por otra parte, en *C.pusillus*, el estragol ($CL_{50} = 3,30 \text{ mg.l}^{-1}$) y el alcanfor ($CL_{50} = 3,71 \text{ mg.l}^{-1}$) así como la *S*-carvona ($CL_{50} = 4,75 \text{ mg.l}^{-1}$) y el linalol ($CL_{50} = 4,09 \text{ mg.l}^{-1}$) presentaron bajas CL_{50} .

Como podemos observar con estos resultados el efecto de los monoterpenoides sobre cada insecto depende de diferentes parámetros como la susceptibilidad de las especies, de los compuestos aplicados y del modo de aplicación, así, exceptuando *S*-carvona en *S.oryzae*, la mayoría de monoterpenoides mostraron una CL_{50} mucho menor para *C.pusillus* que para *R.dominica* y *S. oryzae*.

Tripathi *et al.*, (2003a y 2003b) estudiaron el efecto del limoneno y la carvona sobre coleópteros de productos de almacén y concluyeron que *R.dominica* era mas susceptible al limoneno ($CL_{50}= 3,61 \text{ mg/l aire}$) que *S.oryzae* ($CL_{50}= 5,95 \text{ mg/l aire}$), mientras que la carvona fue mas activa para ambas plagas ($CL_{50}= 2,42$ y $CL_{50}=3,5 \text{ mg/l aire}$ respectivamente).

Ojimelukwe y Alder (1999) afirmaban que la DL_{50} del estragol está en $0,05 \mu\text{l/cm}^2$ en un bioensayo de contacto y $0,1 \mu\text{l/cm}^2$ en un bioensayo volátil y del linalol en $0,21 \mu\text{l/cm}^2$ para *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae).

5.4.ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA ACETILCOLINESTERASA COMO UN POSIBLE MODO DE ACCIÓN.

Miyazawa *et al.*, (1998), estudiaron la inhibición de la acetilcolinesterasa que producían diferentes terpenoides que formaban parte del aceite esencial de algunas especies de mentas.

De modo similar Houghton *et al.*, (2006), estudiaron 183 compuestos obtenidos de plantas y hongos, entre los cuales se encontraban alcaloides y terpenos, los cuales inhibían la acetilcolinesterasa. Observaron como los alcaloides eran fuertes inhibidores de la acetilcolinesterasa, aunque algunos monoterpenoides fueron bastante activos también.

Para Rajendran y Sriranjini (2008) el estudio del modo de acción de monoterpenos sobre las plagas de almacén no implicaba necesariamente a la inhibición de la AChE como responsable de la mortalidad de estas plagas aunque tampoco lo descartaban ya que algunos monoterpenoides inhibían de manera notable ésta enzima.

En nuestro trabajo, la selección de monoterpenoides a estudiar como posibles inhibidores de la acetilcolinesterasa estuvo determinada por la bioactividad mostrada por algunos de estos compuestos sobre las tres plagas de insectos estudiadas.

Si nos fijamos en las Figuras desde la 1 a la 8 advertimos como de manera general el % de inhibición disminuye con el tiempo. Este proceso es mucho más acusado cuando la concentración del inhibidor es menor. Esto es debido a que al utilizar concentraciones más elevadas de monoterpenoide (inhibidor), el porcentaje de inhibición necesitaría un tiempo mayor (>15 minutos) al empleado en este estudio para que todo el inhibidor hubiera reaccionado con la enzima y el porcentaje de inhibición disminuyera hasta anularse.

En la Figura 3 y 7 (linalol y estragol respectivamente) vemos como el porcentaje de inhibición va disminuyendo durante los primeros minutos para aumentar ligeramente al final.

En las figuras 2, 5 y 6 (γ -terpineno, geraniol y *E*-anetol respectivamente) se muestra como el porcentaje de inhibición disminuye drásticamente desde los primeros minutos a concentraciones bajas de inhibidor. Esto es bastante más notorio en el caso del *E*-anetol ya que este suceso ocurre a cualquiera de las concentraciones de monoterpenoides utilizadas en este estudio.

Ryan *et al.*, (1992) observaron un efecto de disminución del porcentaje de inhibición con el tiempo como el que se ha presentado en estas Figuras para algunas feromonas que eran principalmente monoterpenoides como la verbenona.

En la Figura 9 se observan las diferentes curvas obtenidas de la representación de la ecuación de Michaelis-Menten, donde para los monoterpenoides fenchona, *S*-carvona, alcanfor y estragol existen claras diferencias entre el control (reacción sin monoterpenoide) y cuando se lleva a cabo la reacción con inhibidor.

Para el linalol las diferencias entre el control y las diferentes concentraciones de este inhibidor se notan más conforme aumenta la concentración del linalol. Sin embargo para el γ -terpineno y el geraniol solo se observan ligeras diferencias con el control sea cual fuere la concentración del monoterpenoide que utilizemos.

Aún así, el inhibidor donde prácticamente no encontramos diferencias es con el *E*-anetol, por lo que podemos afirmar que este monoterpenoide es el que produce en menor medida o incluso que no produce inhibición en la acetilcolinesterasa de todos los ensayados en este estudio.

En todos los casos se realizaron blancos con etanol para comprobar que este alcohol no estuviera inhibiendo la enzima, ya que como señalan Cabezas-Herrera *et al.* (1992), el etanol a bajas concentraciones produce una baja estimulación de la actividad de AChE, mientras que a altas concentraciones provoca una inhibición de esta enzima.

Si nos fijamos en las rectas que se presentan en la Figura 10 llegamos a la misma conclusión que en la figura anterior, se observan diferencias mas claras del control con fenchona, *S*-carvona, alcanfor y estragol, mientras que apenas se observan diferencias cuando se ensayó el *E*-anetol, por lo que podemos afirmar que este monoterpenoide no está inhibiendo la acetilcolinesterasa a las dosis utilizadas. Al fijarnos en estas gráficas hay que darse cuenta que linalol, *S*-carvona y estragol están representados en escalas diferentes al resto.

En todos los monoterpenoides encontramos una inhibición reversible, la cual resultaba ser competitiva para fenchona, γ -terpineno, geraniol y linalol, lo que está en acuerdo con los resultados obtenidos por Ryan y Byrne (1988). Sin embargo en *S*-carvona, estragol y alcanfor se obtuvo una inhibición reversible mixta que nos indica que el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato.

El estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa como un posible modo de acción se finalizó con el cálculo de las constantes de inhibición para cada uno de los monoterpenoides (Tabla 2).

La fenchona (Figura 11) fue el monoterpenoide que mayor inhibición produjo, seguido de la *S*-carvona y el linalol. Aún así los monoterpenoides estudiados no provocaron una inhibición tan notable como otros insecticidas provocan en esta enzima, incluso si los comparamos con otros monoterpenoides como ha publicado Picollo *et al.* (2008), donde se refleja como un monoterpenoide bastante potente inhibiendo la AChE es el 1,8-cineol.

El valor obtenido para la constante de inhibición cuando el monoterpenoide usado es el linalol difiere del obtenido por Keane y Ryan (1999). Esto puede ser debido a las diferentes condiciones utilizadas para medir la constante (diferente concentración del monoterpeno y diferentes concentraciones de sustrato).

Si intentamos relacionar la estructura química con la inhibición encontramos que la fenchona y la *S*-carvona son monoterpenos con un grupo cetónico mientras que el linalol tiene un grupo alcohol, ya Miyazawa *et al.*, (1997) señalaban que los monoterpenoides con cetonas como grupos funcionales mostraban una inhibición mas fuerte que los grupos alcoholes o los hidrocarbonados debido a la presencia de dobles enlaces conjugados que podrían estar relacionados con la inhibición de esta enzima.

Igualmente sería interesante estudiar mezclas de estos monoterpenoides y su efecto en la inhibición de la AChE ya que se podrían producir efectos sinergistas como señalan Hideyuki y Mitsuo (2001).

Por otra parte, como bien menciona Keane y Ryan (1999), la validación de una inhibición *in vitro* de la AChE debería ser adicionalmente demostrada por un apropiado efecto *in vivo* para los monoterpenoides evaluados. Además estos autores señalan la importancia de no excluir modos de acción adicionales para los monoterpenos.

Otros autores, como Perry *et al.* (2003), demostraron *in vivo* que algunos monoterpenoides como el alcanfor, 1,8-cineol, borneol, α - y β -pineno eran los responsables de la actividad anticolinesterásica del aceite esencial de *S. lavandulaefolia*.

Sin embargo la acción tóxica de los monoterpenoides podría ser considerada a través de otros modos de acción y otras rutas como por ejemplo los receptores GABA (Priestley *et al.*, 2003) y los receptores octopaminérgicos (Enan, 2001; Kostyukovsky *et al.*, 2002).

Lee *et al.* (2003), explicaban que los monoterpenoides son típicamente volátiles y como compuestos bastante lipofílicos pueden penetrar dentro de insectos rápidamente e interferir con sus funciones fisiológicas, por lo que sus modos de acción son difíciles de dilucidar.

5.5. ESTUDIO DE RESISTENCIA, Y DE MECANISMOS IMPLICADOS, A CADA MONOTERPENOIDE EN *SITOPHILUS ORYZAE*, *RHYZOPERTHA DOMINICA* Y *CRYPTOLESTES PUSILLUS*.

El aumento de la pérdida de eficacia de los insecticidas debido a la resistencia de los insectos ha favorecido la introducción de programas de control integrado de plagas (IPM) (Terry y Joyce, 2004).

Para poder seleccionar resistencia en laboratorio, en nuestro estudio las dosis aplicadas han variado para cada uno de los insectos, así como cada monoterpenoide.

Las dosis de monoterpenoides en *S. oryzae* resultaron mayores que en las otras dos plagas de insectos para todos los monoterpenoides a lo largo del periodo de selección (Tabla 3).

Para *R. dominica* se le aplicaron también dosis mayores de monoterpenoides que a *C. pusillus* para conseguir mortalidades >50 %, excepto para el *E*-anetol y la fenchona (Tablas 4 y 5). En la 4ª generación de *R. dominica* no se pudieron realizar bioensayos ya que los insectos se multiplicaban poco. En *C. pusillus*, ocurrió algo parecido a lo anteriormente descrito con el estragol y perdimos todos los insectos en la 3ª generación no consiguiendo terminar el estudio de resistencias.

Se aumentó la dosis aplicada gradualmente conforme se iban obteniendo generaciones nuevas (excepto en las primeras generaciones que se aplicó la misma dosis por precaución). Sin embargo, en *S. oryzae* cuando se le aplicó geraniol, a pesar de aplicar una dosis diez veces mayor entre la 1ª generación y la 7ª generación la mortalidad no superó el 52 %.

Las Tablas 6 a 11 muestran los resultados obtenidos del análisis PROBIT realizado a la generación sensible de cada una de las plagas de insectos y a la generación 6 de *S. oryzae* y 5 de *R. dominica* y *C. pusillus*.

Al comparar la CL₅₀ de la población sensible con la de la generación 6 para *S. oryzae* y 5 para *R. dominica* y *C. pusillus* observamos que en todos los casos el valor obtenido para la población sensible es siempre menor, excepto para *S*-carvona en la generación 6 de *S. oryzae*. Asimismo, en *R. dominica* a pesar de que los valores de CL₅₀ son mas elevados en la generación 5 que en la población sensible, no existen apenas diferencias.

En ninguna de las tres plagas se alcanza una resistencia importante (ver FR₅₀, Tablas 7, 9 y 11) exceptuando al alcanfor en *C. pusillus* donde obtuvimos para el FR₅₀ un valor de 13,70.

Otros autores como Ribeiro *et al.*, (2003) encontraron para *S. zmais* que la resistencia a algunos organofosforados y piretroides era probablemente causada por resistencia cruzada de otros insecticidas utilizados con anterioridad.

Al utilizar sinergistas (PBO, DEF y DEM) para el estudio de los mecanismos de resistencias debemos ser conscientes de que estos compuestos no son enteramente específicos para una sola detoxificación de una enzima (Ahmad y Hollingworth, 2004), ya que el PBO, aunque es un buen inhibidor del citocromo-P450 monooxigenasa, también es un inhibidor moderado de esterasas en algunos insectos (Gunning *et al.*,

1998; Young *et al.*, 2005). DEF es un inhibidor importante de las esterasas, pero también tiene una capacidad limitada para inhibir la P450 monooxigenasa (Sanchez-Arroyo *et al.*, 2001). DEM inhibe GSH S-transferasa indirectamente a través de la reducción del glutatión, y esta reducción puede tener otros efectos celulares los cuales provocan alteraciones de respuestas toxicológicas tales como el aumento del estrés oxidativo (Cnubben *et al.*, 2001). Además puede actuar como un inhibidor de la monooxigenasa microsómica (Anders, 1978).

Como podemos observar en las Tablas 12, 13 y 14 en ninguna de las tres plagas se ha obtenido una resistencia importante, siendo en *R. dominica* prácticamente nula la generación de resistencia.

Sin embargo de los mecanismos bioquímicos estudiados, a pesar de no existir diferencias elevadas entre los tres sinergistas, se observan comportamientos distintos entre las plagas estudiadas según los monoterpenoides utilizados.

Para *S. oryzae* los resultados parecen indicar una implicación de esterasas ya que los valores del ratio de sinergismo más altos son los calculados para el sinergista DEF, a excepción del *E*-anetol y estragol donde se observa una implicación del sinergista DEM, aunque como ya se ha comentado anteriormente las diferencias no son especialmente notables.

Para *R. dominica* las diferencias observadas entre los tres sinergistas son aún menos acentuadas que en el caso de *S. oryzae* y parece que los sinergistas que podrían estar implicados serían PBO y DEM, pero como ya se ha explicado, con los resultados obtenidos no se podría atribuir el mecanismo de resistencia a ninguna de las vías metabólicas estudiadas, también debido a que como ya se mostró en las Tablas 8 y 9 con *R. dominica* no se obtuvo una generación resistente.

Para los ensayos con *C. pusillus*, al igual que en los casos anteriores, tampoco sobresale mas un sinergista por encima de los otros y dependiendo del monoterpenoide podemos encontrar un valor del ratio de sinergismo mayor para PBO (linalol, *S*-carvona, fenchona y γ -terpineno), para DEM (alcanfor y geraniol) y DEF (*E*-anetol).

Con los resultados que se han obtenido no podemos atribuir con certeza ningún mecanismo de resistencia a ninguna de las plagas estudiadas por dos razones fundamentales; la primera es que en ningún caso se observó unos valores de resistencia realmente notables para ninguna de las plagas y la segunda razón es que el estudio de mecanismos de resistencia enzimáticos (indirectamente utilizando sinergistas) llevado a cabo en este trabajo no descarta otros mecanismos que pudieran darse ya que no hay

diferencias considerables entre estos tres sinergistas y no se podrían excluir otros mecanismos de resistencia (no enzimáticos).

Algo similar comentan Espinosa *et al.*, (2005), aunque ellos atribuyen como principal mecanismo de resistencia al espinosad observado en *Frankliniella occidentales*, al citocromo P450 monooxigenasa, y consideran que no se puede descartar otros factores tales como GST esterasas, alteraciones de AChE y penetración reducida.

Daglish (2004), mostraba que la generación de resistencia a fosfina para *R. dominica* y *S. oryzae* dependía de la concentración y el tiempo de exposición.

Price (1984) explicaba que el mecanismo de resistencia encontrado para *R. dominica* al usar fosfina estaba relacionado con una relación metabólica respiratoria y era bastante improbable que fuera debido a barreras físicas.

En las últimas décadas los estudios sobre las bases moleculares de la resistencia a insecticidas ha llevado a aprender como algunos genes son regulados, y esto nos ayudará en un futuro a un mejor entendimiento de cómo funcionan estos sistemas (Hemingway, 2000).

5.6. CONSIDERACIONES GENERALES.

Sabemos que aproximadamente 2,5 millones de toneladas de pesticidas son aplicados cada año en todo el mundo los cuales contribuyen significativamente a la producción de alimento, pero es importante determinar los costes adicionales que suponen sobre el medio ambiente y la salud (Pimentel *et al.*, 1992). En un estudio realizado por el IRRI, Bonifacio y Buff (1992) comentaban las pérdidas de las operaciones de postcosecha del arroz.

Los granos almacenados sufren de infestación por insectos y deterioro por mohos y bacterias. La alta temperatura y humedad de los granos, junto con el apilamiento y los granos partidos, proporcionan las condiciones que aceleran el desarrollo de los insectos y los mohos.

Las pérdidas ocasionadas por plagas que atacan productos almacenados suelen ocurrir por dos motivos fundamentales, ya sea porque estas plagas ocasionen pérdidas de alimentos que consumen los humanos o porque contaminen estos alimentos (falta de seguridad alimentaria) y todo esto se traduce en pérdidas económicas de gran cuantía, por lo que se considera necesario el uso de plaguicidas para combatir estas plagas.

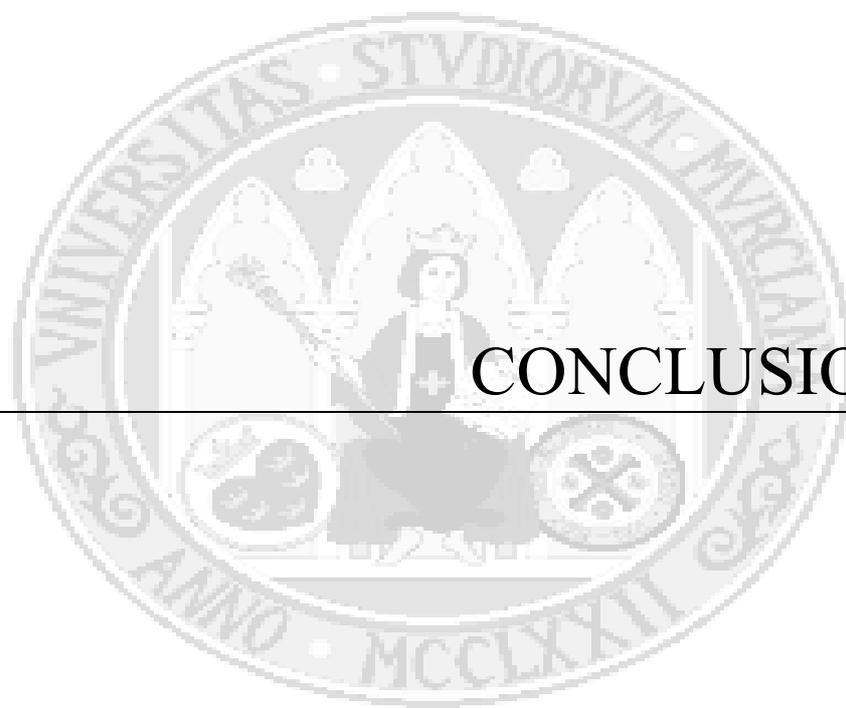
Pero el resultado de los residuos de plaguicidas sobre los productos alimentarios tiene un gran efecto negativo. Muchos autores han dedicado su tiempo a estudiar el impacto producido por estos residuos de plaguicidas de síntesis sobre productos alimentarios (Oliva *et al.* 1999; Navarro *et al.* 2007).

Ante esta perspectiva, se considera necesario encontrar alternativas a estos insecticidas y encontrar otros compatibles con la calidad alimentaria.

Nosotros, en este estudio hemos pretendido exponer las ventajas de los aceites esenciales y de los productos derivados de estos, ya sean monoterpenoides o fenilpropanoides.

Si bien las resistencias a insecticidas suele ser un problema muy frecuente en plagas agrícolas (Torres-Vila *et al.*, 2002), entre las ideas más interesantes que podemos extraer de esta Tesis Doctoral para una profunda consideración es que estos monoterpenoides tienen una baja velocidad para generar resistencia en los insectos estudiados.

En un futuro sería necesario profundizar en estos productos naturales y quizás encontrar una forma práctica de aplicación.



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES.

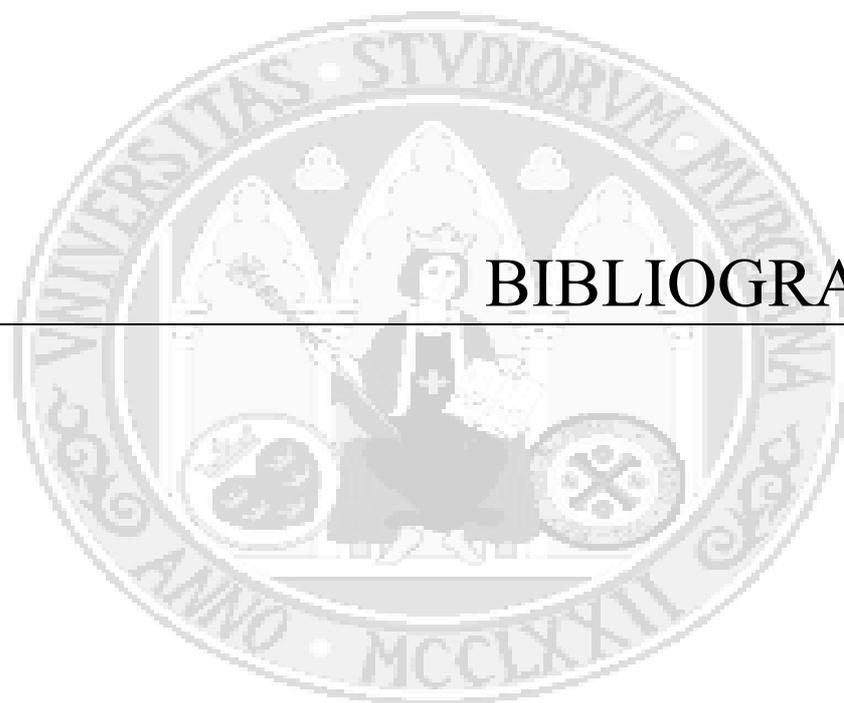
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se han alcanzado las siguientes conclusiones:

1. El fraccionamiento llevado a cabo de los aceites esenciales nos conduce en determinadas fracciones a porcentajes de mortalidad superiores a los que se obtienen con los aceites esenciales.
2. De las tres plagas estudiadas *C. pusillus* resulta más sensible a estos plaguicidas ecológicos, seguido de *R. dominica*.
3. Los compuestos más activos contra *S. oryzae*, *R. dominica* y *C. pusillus* fueron el linalol, *S*-carvona y estragol.
4. *E*-anetol resultó ser un compuesto tóxico más selectivo para *R. dominica* y *C. pusillus*.
5. Otros monoterpenoides como el limoneno, el γ -terpineno, geraniol y eucaliptol resultaron muy activos para *C. pusillus* exclusivamente.
6. Alcanfor, acetato de geraniol y *E*-anetol podrían actuar de sinergistas potenciando la actividad del linalol en *R. dominica* y *C. pusillus* ya que cuando aparecen mezclados con éste la mortalidad resulta más elevada que cuando actúa el linalol solo.
7. El metoxicinamaldehído, p-anisaldehído y linalol parecen tener un efecto sinergista sobre el estragol.
8. A veces los compuestos metil eugenol, metilcinamato y eugenol resultaron más tóxicos en mezclas para *S. oryzae* mientras que eran más efectivos los productos puros para *R. dominica* y *C. pusillus*.

9. Los monoterpenoides que más inhiben la acetilcolinesterasa *in vitro* son fenchona, *S*-carvona y el linalol.
10. Fenchona, γ -terpineno, geraniol y linalol inhiben competitivamente la acetilcolinesterasa.
11. *S*-carvona, estragol, y alcanfor produjeron una inhibición mixta para esta enzima.
12. No se observó inhibición de la acetilcolinesterasa por el *E*-anetol a las concentraciones de monoterpenoide utilizadas.
13. Cuando se intentó seleccionar en laboratorio poblaciones de insectos resistentes a monoterpenoides observamos que estas plagas del arroz no desarrollan una resistencia alta y rápida.
14. Los monoterpenoides que inducirían en mayor medida resistencia (caso de aplicaciones continuadas) serían linalol, *S*-carvona y estragol, que eran los más activos para las 3 plagas.
15. Para *R. dominica* la resistencia inducida a los monoterpenoides en las poblaciones seleccionadas es inapreciable.
16. Los tratamientos con alcanfor generarían una resistencia rápida para *C. pusillus*.
17. De las conclusiones anteriores se deduce que una estrategia anti-resistencia más conveniente para el control de plagas sería aplicar mezclas de productos (incluyendo a algunos menos activos y/o más selectivos).

18. Del estudio indirecto de mecanismos de resistencia enzimáticos implicados no se obtuvo ningún resultado concluyente sin embargo parece que las esterasas podrían estar implicadas en *S.oryzae* mientras que las P-450 monooxigenasas estarían involucradas para la mayoría de monoterpenoides, en las poblaciones seleccionadas de *R.dominica* y *C.pusillus*, no pudiendo descartar otros mecanismos.

19. En general, el arroz integral adsorbe mejor sobre su superficie a la mayoría de monoterpenoides estudiados aunque también es el que mejor desorbe estos monoterpenoides.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, K.P., Thiel, R., Zapp, J. y Becker, H. 1998. Involvement of the mevalonic acid pathway and the glyceraldehyde-pyruvate pathway in terpenoid biosynthesis of the liverworts *Ricciocarpos natans* and *Conocephalum conicum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 354: 181-187.
- Ahmad, M. y Hollingworth, R.M. 2004. Synergism of insecticides provides evidence of metabolic mechanisms of resistance in the obliquebanded leafroller *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Manag. Sci.* 60: 465-473.
- Albuquerque U.P. y Andrade L.H.C. 1998. El género *Ocimum* L. (Lamiaceae) en el nordeste de Brasil. *Anales Jard. Bot. Madrid* 56 (1): 43-64.
- Alvarez-Castellanos, P., Bishop, C.D., Pascual-Villalobos, M.J. 2001. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. *Phytochemistry* 57: 99-102.
- Anders, M.W. 1978. Inhibition and enhancement of microsomal drug metabolism by diethyl maleate. *Biochem. Pharmacol.* 27: 1098-1101.
- Awde, J.A., Ryan, M.F. 1992. Piperazine as a reversible competitive inhibitor of acetylcholinesterase. *Cienc. Biol. Ecol. Syst.*, 12: 37-42.
- Bailer, J., Aichinger, G.H., De Hueber, K., Dachler, M. 2001. Essential oil content and comparison in commercially available dill cultivars in comparison to caraway. *Industrial Crops and Products* 14: 229-239.
- Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., y Angioni, A. 2007. Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7093-7098.

- Bekele, A.J., Obeng-Ofori, D., Hassanali, A. 1997. Evaluation of *Ocimum kenyense* as a source of repellents, toxicants and protectants in storage against three major stored product insect pests. *J. Appl. Ent.* 121: 169-173.
- Benner, J.P. 1993. Pesticidal compounds from higher plants. *Pesticides Science* 39: 95-102.
- Bielza, P. 2005. La resistencia a insecticidas: de los mecanismos a las estrategias de manejo. *Phytoma España* 173: 36-38.
- Bielza, P. y Contreras, J. 2005. La resistencia a insecticidas en *Frankliniella occidentales* (Pergande). *Phytoma España* 173: 58-62.
- Bisset, J.A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 54, ISSN 0375-0760 versión on-line: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_serial&pid=0375-0760&ln.
- Bloomquist, J. 1999. Insecticidas: Chemistries and Characteristics. Department of entomology. Virginia polytechnic institute and state university. Blackslong Virginia. En: <http://ipmworld.umn.edu/chapters/bloomq.htm>.
- Bonifacio, E.P. y Duff, B. 1992. The impact of postharvest operations on rough rice and milled rice quality in the Philippines. En: Consumer demand for rice grain quality. L.J. Unnevehr, B. Duff and B.O. Juliano (eds.). IRRI y IDRC pp. 149-159.
- Bourguet, D., Genissel, A., Raymond, M. 2000. Insecticide resistance and dominance levels. *Journal of Economic Entomology* 93: 1588-1595.
- Bouvier, J.C., Buès, R., Boivin, L. B., Beslay, D., Sauphanor, B. 2001. Deltamethrin resistance in the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae): inheritance and number of genes involved. *Heredity* 87: 456-462.

- Bouwmeester, H.J., Davies, J.A.R., y Toxopeus, H. 1995. Enantiomeric composition of carvone, limonene, and carveol in seeds of dill and annual and biennial caraway varieties. *J. Agric. Food Chem.* 43: 3057-3064.
- Cabezas-Herrera, J., Campoy, F.J. y Vidal, C. 1992. Differential effects of ethanol on membrane-bound and soluble acetylcholinesterase from sarcoplasm reticulum membranes. *Neurochemical Research*, 17: 717-722.
- Cantín, A., Lull, C., Primo, J., Miranda, M.A. y Primo-Yúfera, E. 2001. Isolation, structural assignment and insecticidal activity of (-)-(1S,2R,3R,4S)-1,2-epoxy-1-methyl-4-(1-methylethyl)-cyclohex-3-yl acetate, a natural product from *Mintostachys tomentosa*. *Tetrahedron: Asymmetry* 12: 677-683.
- Casida, J.E. 1970. Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *J. Agric. Food Chem.* 18: 753.
- Chang, X., Alderson, P.G., Hollowood, T.A., Hewson, L. y Wright, C.J. 2007. Flavour and aroma of fresh basil are affected by temperature. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 1381-1385.
- Chang, X., Alderson, P.G., Wright, C.J. 2005. Effect of temperature integration on the growth and volatile oil content of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Horticultural science and Biotechnology* 80: 593-598.
- Chemat, S., Aït-Amar, H., Lagha, A., Esveld, D.C. 2005. Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. *Chemical Engineering and Processing*, 44: 1320-1326.
- Chemat, S., Lagha, A., Aït-Amar, H., Bartels, P.V., Chemat, F. 2004. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 188-195.

- Choi, W., Lee, E., Choi, B., Park, H. y Ahn, Y. 2003. Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera:Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 1479-1484.
- Choi, W., Lee, S., Park, H. y Ahn, Y. 2004. Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 553-558.
- Clemente, S., Mareggiani, G., Broussalis, A., Martino, V., Ferraro, G. 2003. Insecticidal effects of Lamiaceae species against stored products insects. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas* 29: 1-8.
- Cnubben, N.H.P., Rietjens, I.M.C.M., Wortelboer, H., Van Zanden, J. y Van Bladeren, P.J. 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10: 141-152.
- Collins, P.J. 1998. Resistance to grain protectants and fumigants in insect pests of stored products in Australia. En: Banks, H.J., Wright, E.J. y Damcevski, K.A., ed., *Stored grain in Australia*. Canberra, CSIRO *Stored Grain Research Laboratory*, 55-57.
- Daglish, G.J. 2004. Effect of exposure period on degree of dominance of phosphine resistance in adults of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Manag. Sci.* 60: 822-826.
- Darrah, H. 1974. Investigation of the cultivars of the basils (*Ocimum*). *Economic Botany*, 28: 63-67.
- De Almeida, E., Manzini, J., Barbosa, N. 2005. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 38: 15-19.
- De Carvalho, C.C.C.R., Da Fonseca, M.M.R. 2006. Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry*, 95: 413-422.

- De Liñán, C. 1997. Farmacología Vegetal. Ed. Agrotécnicas S.L. Madrid, 1196 p.
- De Liñán, C. 1998. Entomología Agroforestal. Ed. Agrotécnicas S.L. Madrid, 1029-1175.
- Delobd, A., Tran, M. 1983. Les coléoptères des denrées alimentaires entrepasées dans les régions chaudes. Orstom/CTA, Paris, 424p.
- Descamps, L.R., Reviriego, M.E., Suárez, A.A., Ferrero, A.A. 2004. Reproducción de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) y de *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae) en cultivares de trigo argentinos. *Bol. San. Veg. Plagas* 30: 171-176.
- Diederichsen A. 1996. Coriander (*Coriandrum sativum* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 3. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome (Italy). 83 p.
- Don-Pedro, K.N. 1996. Fumigant toxicity is the major route of insecticidal activity of citruspeel essential oils. *Pesticides Science* 46: 71-78.
- Duke, S.O. Natural pesticides from plants. 1990. En: J. Janick y J.E. Simon (eds.), *Advances in new crops*. Timber Press, Portland, Oregon, USA, pp.511-517.
- El-Zemity, S.R., Rezk, H.A. y Zaitoon, A.A. 2006. Acaricidal activity of some essential oils and their monoterpenoidal constituents against the parasitic bee mites, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Journal of Applied Sciences Research* 2: 1032-1036.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Valentino, A. J. y Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorometric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.

- Enan E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem Physiol*, 130:325.
- Ertürk, O. 2006. Antifeedant and toxicity effects of some plant extracts on *Thaumetopoea solitaria* Frey. (Lep.: Thaumetopoeidae). *Turk J. Biol.* 30: 51-57.
- Espinosa, P.J., Contreras, J., Quinto, V., Grávalos, C., Fernández, E., y Bielza, P. 2005. Metabolic mechanisms of insecticida resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentales* (Pergande). *Pest Management Science* 61: 1009-1015.
- Evenhuis, A., Verdam, B., Gerlagh, M. y Gooseen-Van de Geijn, H.M. 1995. Studies on major diseases of caraway (*Carum carvii*) in the Netherlands. *Industrial Crops and Products* 4: 53-61.
- FAO (2008). Insectos que dañan los granos de productos almacenados. www.fastonline.org/CD3WD_40/INPHO/VLIBRARY/X00535/ES/X0053500.HTM.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y. y Abo-Raya, S.H., 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxin in a synthetic medium. *J. Food Sci.* 54: 74-76.
- Ferhat, M.A., Tigrine-Kordjani, N., Chemat, S., Meklati, B.Y., Chemat, F. 2007. Rapid extraction of volatile compounds using a new simultaneous microwave distillation: solvent extraction device. *Chromatographia*, 65: 217-222.
- Forgash, A.J. 1984. History, evolution, and consequences of insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22: 178-186.
- Fournier, D., Bride, J.M., Mouches, C., Raymond, M., Magnin, M., Bege, J.B., Pasteur, N., Georghiou, G.P. 1987. Biochemical characterization of the esterases A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. Complex. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 27: 211-217.

- García, M., Donadel, O.J., Ardanaz, C.E., Tonn, C.E. y Sosa, M.E. 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribulium castaneum*. *Pest Management Science* 61: 612-618.
- Gaydou, E.M., Faure, R., Bianchini, J.P., Lamaty, G., Rakotonirainy, O., Randriamiharisoa. 1989. Sesquiterpene composition of basil oil. Assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of β-elemene with two-dimensional NMR. *J. Agric. Food Chem*, 37: 1032-1037.
- Gil A., De la Fuente, E., Lenardis A., López M., Suárez A., Bandoni A., Van Baren C., Di Leo Lira P., y Ghersa C.M. 2002. Coriander essential oil composition from two genotypes grown in different environmental conditions. *J. Agric. Food Chem*. 50: 2870-2877.
- González-Coloma, A., Gutierrez, C., Hübner, H., Achenbach, H., Terrero, D. y Fraga, B.M. 1999. Selective insect antifeedant and toxic action of ryanoid diterpenes. *J. Agric. Food. Chem*. 47: 4419-4424.
- Goretti de Vasconcelos Silva, M., De Abreu Matos, F.J., Lacerda Machado, M.I., Craveiro, A.A., 2003. Essential oils of *Ocimum basilicum* L., *O. basilicum* var. *minimum* L. and *O. basilicum* var. *purpurascens* Benth. grown in North-eastern Brazil. *Flavour Frag. J.* 18: 13-14.
- Govindachari, T.R., Suresh, G., Wesley, S.D. 2000. Insects antifeedant and growth regulating activities of neem seed oil- the role of major tetranortriterpenoids. *Journal of Applied Entomology* 124: 287-291.
- Grayer, R.J., Kite, G.C., Goldstone, F.J., Bryan, S.E., Paton, A., Putievsky, E. 1996. Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 43: 1033-1039.
- Gunning, R.V., Moores, G.D. y Devonshire, A.L. 1998. Inhibition of resistance-related esterases by piperonyl butoxide. En: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera:

- Noctuidae) and *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) in *Piperonyl butoxide*, ed. By Jones D.G., Academic Press, San Diego, USA, pp: 215-226.
- Hartmans, H.L., Diepenhorst, P., Backer, W. y Gorris, L.G.M. 1995. The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. *Industrial Crops and Products* 4: 3-13.
- Hasegawa Y., Tajima K., Toi N. y Sugimura Y. (1997). Characteristic components found in the essential oil of *Ocimum basilicum* L. *Flavour and Fragrance Journal* 12:195-200.
- Heather, N.W. 1986. Sex-linked resistance to pyrethroids in *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 22: 15-20.
- Hemingway, J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30: 1009-1015.
- Hickman, C.P., Roberts, L.S., Hickman, F.M. 1990. Zoología. Principios integrales. 8ª edición. Interamericana, McGraw-Hill, 1119 p.
- Hideyuk, T. y Mitsuo, M. 2001. Inhibition of acetylcholinesterase activity by essential oil from Bergamot. *Koryo, Terupen oyobi Seiyu Kagaku ni Kansuru Toronkai Koen Yoshishu*, 45: 435-436.
- Hodgson, E. 1999. Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: roles in synergism of pesticides and pesticide action. *Toxicol. Industrial Health* 15: 6-11.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 23: 186-99.
- Hruska, R.E., Huxtable, R.J., Yamura, H.I. 1977. Purification of [3H] taurine of high specific activity. *Anal. Biochem.* 79, pp. 568-570.

- Huang, Y., Ho, S.H., Lee, H.C., Yap, Y.L. 2002. 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.* 38: 403-412.
- Ibrahim, M.A., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tiilikala, K., Holopainen, J.K. 2001. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pest. *Agricultural and Food Science in Finland*, 10: 243-259.
- Ikan, R. 1991. Natural Products. A laboratory guide. Second Edition. Academia Press (Eds). 360 pp.
- IRAC España. 2007. Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas. www.irac-online.org/IRAC_Spain/Home.asp.
- Isman, M.B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608.
- Jacobson, M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future. En: Arnason, J.T., Philogène, B.S.R., Morand, P. (Eds). Insecticides of plant origin. A.C.S. Symposium series 387. American Chemical Society, Washington D.C. 1-10.
- Jang, H.H., Wu, S.Y. y Casida, J.E. 1992. Oxidative chemistry and toxicology of S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF defoliant). *J. Agric. Food Chem.* 40,: 1703-1709.
- Jensen, S.E. 2000. Mechanisms associated with methiocarb resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entom.* 93: 464-471.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J. 2002. Secondary plant compounds. Plant systematics: a phylogenetic approach. Second Edition. Sinauer Assoc, USA. Capítulo 4, Structural and Biochemical Characters.

- Juliani H. R. y Simon J.E. 2001. Antioxidant activity of basil. En: J. Janick y A. Whipkey (eds.). Proceedings of the Fifth National Symposium New Crops and New uses strength in diversity. Atlanta, Georgia, November 10-13, 2001. ASHS Press, Alexandria, VA, USA, 575-579.
- Keane, S., Ryan, M.F. 1999. Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 1097-1104.
- Keita, S.M., Vincent, C., Schmit, J.P., Arnason, J.T. 2001. Insecticidal effects of *Thuja occidentalis* (Cupressaceae) essential oil on *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Canadian Journal of Plant Science*, 81: 173-177.
- Kim, D.H., Ahn, Y.J. 2001. Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. *Pest Manag. Sci.*, 57:301-306.
- Kim, S., Park, C., Ohh, M., Cho, H., Ahn, Y. 2003. Contact and fumigant activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). *Journal of Stored Products Research*, 39: 11-19.
- Koehler, P.G. y Pereira, R.M. 1994. Lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera, Bostrichidae). University of Florida. Website <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., Shaaya, E. 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science* 58: 1101-1106.
- Kumar, J., Parmar, B.S. 1996. Physicochemical and chemical variation in Neem oils and some bioactivity leads against *Spodoptera litura* F. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2137-2143.

- Lachowicz, K.J., Jones, G.P., Briggs, D.R., Bienvenu, F.E., Palmer, M.V., Mishra, V., Hunter, M. 1997. Characteristics of plant extracts from five varieties of basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2660-2665.
- Lachowicz, K., Jones, G.P., Briggs, D.R., Bienvenu, F.E., Palmer, M.V., Ting, S.S.T., Hunter, M. 1996. Characteristics of essential oil from basil (*Ocimum basilicum* L.) grown in Australia. *J. Agric. Food Chem.* 44: 877-881.
- Lee, S.E.; Lee, B.H.; Choi, W.S.; Park, B.S.; Kim, J.G.; Campbell, B.C. 2001. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Pest Manag. Sci.*, 57:548-553.
- Lee, S., Peterson, C.J., Coats, J.R. 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. Stored Prod. Res.* 39: 77-85.
- Lehninger, A.L. 1995. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª Edición, ediciones Omega, S.A. Barcelona, 1117 p.
- Lichtenstein, E.P., Liang, T.T., Schulz, K.R. 1974. Insecticidal and synergistic components isolated from dill plants. *J. Agric. Food Chem.* 22: 658-664.
- López, M.D., Jordan, M.J., y Pascual-Villalobos, M.J. 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil against stored rice pests. *Journal of Stored Products research*, 44: 273-278.
- López, M.D., Pascual-Villalobos, M.J. 2007a. El coriandro, un cultivo alternativo para la producción de aceites. *Agrícola Vergel* 307: 326-330.
- López, M.D., Pascual-Villalobos, M.J. 2007b. La albahaca, un cultivo ornamental y condimentario. *Agrícola Vergel* 205: 230-233.

- Lucas, E., Riudavets, J. 2000. Lethal and sublethal effects of rice polishing process on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 1837-1841.
- Lucas, E., Riudavets, J. 2002. Biological and mechanical control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice. *Journal of Stored Products Research*, 38: 293-304.
- Lwande, W., Ndakala, A.J., Hassanali, A., Moreka, L., Nyandat, E., Ndungu, M., Amiani, H., Gitu, P.M., Malonza, M.M., Punyua, D.K. 1999. *Gynandropsis gynandra* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) repellents. *Phytochemistry* 50: 401-405.
- Marotti M., Piccaglia R. y Giovanelli E. 1996. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3926-3929.
- McMurry, J. 1994. Química orgánica. Ed. Interamericana. 197-198 pp.
- Meier zu Beerentrup, H. y Röbbelen, G. 1987. Screening for European Productions of Oilseed with Unusual Fatty Acids. *Angew. Botanik*, 61: 287-303.
- Miller, T.A. 1988. Mechanisms of resistance to pyrethroid insecticide. *Parasitology Today* 4: 8-12.
- Misharina T.A. 2001. Influence of the Duration and Conditions of Storage on the Composition of the Essential Oil from Coriander Seeds. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37 (6): 622-628.
- Mulder, G.J. y Ouwerkerk-Mahadevan, S. 1997. Modulation of glutathione conjugation in vivo: How to decrease glutathione conjugation in vivo or in intact cellular systems in vivo. *Chem. Biol. Interact.* 105: 17-34.

- Myazawa, M., Watanabe, H., y Kameoka, H. 1997. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a p-menthane skeleton. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 677-679.
- Myazawa, M., Watanabe, H., Umemoto, K., y Kameoka, H. 1998. Inhibition of Acetylcholinesterase activity by essential oils of mentha species. *J. Agric. Food Chem.* 46: 3431-3434.
- Navarro, S., Pérez, G., Navarro, G., Mena, L., y Vela, N. 2007. Influence of fungicide residues on the primary fermentation of young lager beer. *J. Agric. Food Chem.* 55: 1295-1300.
- Nayak, M.K., Collins, P.J. y Pavic, H. 2003. Developments in phosphine resistance in China and possible implications for Australia. En: E.J. Wright, M.C. Webb y E. Highley, ed., *Stored grain in Australia 2003. Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference, Canberra, 25-27 June 2003. CSIRO Stored Research Laboratory, Canberra.*
- Ngoh, S.P., Choo, L.E.W., Pang, F.Y., Huang, Y., Kini, M.R., Ho, S.H. 1998. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American Cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Pesticides Science* 54: 261-268.
- Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C.H. 1999. Plant oils as potentiation agents of monoterpenes for protection of stored grains against damage by stored product beetle pests. *International Journal of Pest Management* 45: 155-159.
- Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C.H., Bekele, A.J. y Hassanali, A. 1997. Biological activity of 1,8-cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* against stored product beetles. *J. Appl. Ent.* 121: 237-243.
- Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C.H., Bekele, A.J. y Hassanali, A. 1998. Toxicity and protectant potential of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum*

- kilimandscharicum*, against four stored product beetles. *Journal of Pest management* 44: 203-209.
- Ojimmelukwe, P.C., Alder, C. 1999. Potential of zimmtaldehyde, 4-allyl-anisol, linalool, terpineol and other phytochemicals for the control of the confused flour beetle (*Tribolium castaneum*, Tenebrionidae). *Anzeiger fuer Schaedlingskunde* 72: 81-86.
- Oliva, J., Navarro, S., Barba, A., Navarro, G., y Salinas, M.R. 1999. Effect of pesticide residues on the aromatic composition of red wine. *J. Agric. Food Chem.* 47: 2830-2836.
- Oosterhaven, K., Poolman, B., Smid, E.J. 1995. S-carvone as a natural potato inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products* 4: 23-31.
- Ostrauskas, H. y Taluntyté, L. 2004. Insect of stored plant products in Lithuania. *Ekologija* 4: 59-57.
- Pascual-Villalobos, M.J. 1996a. Plaguicidas naturales de origen vegetal: estado actual de la investigación. Colección Monografías INIA, nº 92, INIA, Madrid, 35p.
- Pascual-Villalobos, M.J. 1996b. Cultivo de *Carum carvii* para producción de carvona. *Agricultura*, 65: 692-694.
- Pascual-Villalobos, M.J. 1998. Repelencia, inhibición del crecimiento y toxicidad de extractos vegetales en larvas de *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bol. San. Veg. Plagas* 24: 143-154.
- Pascual-Villalobos, M.J., Ballesta-Acosta, M.C. 2003. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 673-679.

- Pascual-Villalobos, M.J., Carreres, R., Riudavets, J., Aguilar, M., Bozal, J.M., García, M.C., Soler, A., Baz, A., Del Estal, P. 2006. Plagas del arroz almacenado y sus enemigos naturales en España. *Bol. San. Veg. Plagas* 32: 223-229.
- Pascual-Villalobos, M.J., Del Estal, P. 2004. Plagas de almacén del arroz y enemigos naturales en Calasparra (Murcia). *Bol. San. Veg. Plagas* 30: 363-368.
- Pascual-Villalobos, M.J., Del Estal, P. 2006. Plagas del arroz almacenado en España. Mini CD. Pardo Comunicación S.L., Murcia.
- Pascual-Villalobos M.J., Lacasa A., González A., Varó P., Monserrat A., García M.J. 2002. Cultivo intercalado y control de plagas en horticultura ecológica. *Agrícola Vergel* 245: 268-272.
- Pascual-Villalobos, M.J., Robledo, A., Alburquerque, N., Pérez, P., Gallego, D. 1997. Prospección de especies vegetales de la flora de Murcia para evaluar actividad plaguicida. En: Insecticidas de origen natural y protección integrada y ecológica en agricultura. Coor: M.J. pascual-Villalobos. Serie Congresos 10, Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. CompoRapid, S.L., Murcia.
- Perry, N., Bollen, C., Perry, E. y Ballard, C. 2003. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75: 651-659.
- Picollo, M.I., Toloza, A.C., Mougabure Cueto, G., Zygadlo, J., Zerba, E. 2008. Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. *Fitoterapia*, 79: 271-278.
- Pimentel, D., Acquay, H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J., Lipner, V., Giordano, S., Horowitz, A. y D'Amore, M. 1992. Environmental and economic costs of pesticide use. *Bioscience*, 42: 750-760.

- Price, N.R. 1984. Active exclusion of phosphine as a mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *J. Stored Prod. Res.* 20: 163-168.
- Priestley, C.M., Williamson, E.M., Wafford, K.A., Satelle, D.B. 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA_A receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology*, 140: 1363–1372.
- Rajendran, S., Sriranjini, V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, 44: 126-135.
- Ramcharan C. 1998. Culantro: A much utilized, little understood herb. En: J. Janick (eds.), *Proceedings of the Forth National Symposium. New Crops and New Uses, Biodiversity and Agricultural Sustainability*. Phoenix, Arizona. November 8-11 1998. ASHS Press, Alexandria, VA, USA, 506-509.
- Ravid V., Putievsky E., Katzir I. y Lewinsohn E. 1997. Enantiomeric composition of linalool in the essential oils of *Ocimum* species and in commercial basil oils. *Flavour and Fragrance Journal* 12: 293-296.
- Rawn, 1989. *Bioquímica*. Editorial Interamericana McGraw-Hill, Madrid, 2 v.
- Regnault-Roger, C. y Hamraoui, A. 1994. Inhibition of reproduction of *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera), a kidney bean (*Phaseolu vulgaris*) bruchid, by aromatic essential oils. *Crop Protection* 13: 624-628.
- Regnault-Roger, C., Hamraoui, A. 1995. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera), a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Stored Prod. Res.* 31: 291-299.
- Regnault-Roger, C., Hamraoui, A., Holeman, M., Theron, E. y Pinel, R. 1993. Insecticidal effect of essential oils from mediterranean plants upon

- Acanthoscelides obtectus* SAY (Coleoptera, Bruchidae), a pest of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Chemical Ecology* 19: 1233-1244.
- Regnault-Roger, C., Philogène, B.J.R., Vincent, C. 2004. Biopesticidas de origen vegetal. Ed. Mundi-Prensa, 337 p.
- Reynolds, T. 1987. Comparative effects of alicyclic compounds and quinones on inhibition of lettuce fruit germination. *Ann. Bot. (London)* 60: 215-223.
- Ribeiro, B.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Santos, J.P. 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 39: 21-31.
- Rozman, V., Kalinovic, I., Liska, A. 2006. Bioactivity of 1,8-cineole, camphor and carvacrol against rusty grain beetle (*Cryptolestes ferrugineus* Steph.) on stored wheat. En: Lorini, I., Bacaltchuk, B., Beckel, H., Deckers, D., Sundfeld, E., Dos Santos, J.P., Biagi, J.D., Celaro, J.C., Faroni, L.R.D.A., Bortolini, L. de O.F., Sartori, M.R., Elias, M.C., Guedes, R.N.C., da Fonseca, R.G., Scussel, V.M. (Eds.), Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection. ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil, pp. 687-694.
- Ryan, M.F., Awde, J., Moran, S. 1992. Insect pheromones as reversible competitive inhibitors of acetylcholinesterase. *Invertebrate reproduction and development* 22: 31-38.
- Ryan, M.F. Byrne, O. 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology* 14: 1965-1975.
- Ryding, O. 1994. Notes on the sweet basil and its wild relatives (Lamiaceae). *Economic Botany* 48: 65-67.
- Sanchez-Arroyo, H., Koehler, P.G. y Valles, S.M. 2001. Effects of the synergists piperonyl butoxide and *S,S,S*-tributyl phosphorotrithioate on propoxur

- pharmacokinetics in *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.* 94: 1209-1216.
- Saxena, D.B., Goswami, B.K. y Tomar, S.S. 1987. Nematicidal activity of some essential oils against *Meloidogyne incognita*. *Indian Perfum* 31: 150-154.
- Silva, G. 2003. Resistencia a los insecticidas En: Silva, G y R. Hepp (Eds). Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción, Fundación para la Innovación Agraria 237-260.
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J.C., Rodríguez, D. 2002. Insecticidas vegetales. Una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. *Revista Manejo Integrado de Plagas (CATIE)* 66: 4-12.
- Simon J.E., Morales M.R., Phippen W.B., Vieira R.F. y Hao Z. 1998. Basil: A source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. En: J. Janick (eds.), Proceedings of the Fourth National Symposium New Crops and New Uses Biodiversity and Agricultural Sustainability. Phoenix, Arizona, November 8-11, 1998. ASHS Press, Alexandria, VA, USA, 499-505.
- Simon, J.E., Quinn, J., Murray, R.G., 1990. Basil: a source of essential oils. En: Janick, J., Simon, J.E. (Eds.), Advances in new crops. Timber Press, Inc., Portland, Oregon, USA, pp. 484-489.
- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M.P. y Catalan, C.A.N. 2006. Studies on essential oils, part 41. Chemical composition, antifungal, antioxidant and sprout suppressant activities of coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal* 21: 472-479.
- Smallfield B.M., Van Klink J.W., Perry N.B., y Dodds K.G. 2001. Coriander Spice Oil: Effects of fruit crushing and distillation time on yield and composition. *J. Agric. Food Chem.* 49: 118-123.

- Sponsel, V.M. 1995. The biosynthesis and metabolism of gibberellins in higher plants. P.66-97. In Davies, P.J. (ed). Plant hormones. Kluwer Academic Publishers Boston.
- Terriere, L.C. 1984. Induction of detoxication enzymes in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 29: 71-88.
- Terry, L.A., Joyce, D.C. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology*, 32: 1-13.
- Thorne, J., Weaver, D. y Baker, J. 1995. Probit analysis: assessing goodness-of-fit based on bock transformation and residuals. *Journal of Economic Entomology*, 85: 1513-1516.
- Torres-Vila, L.M. 2005. La resistencia insecticida de *Helicoverpa armigera* Hübner en España: un enfoque agroecológico. *Phytoma*, nº 173: 51-57.
- Torres-Vila, L.M., Rodriguez-Molina, M.C., Lacasa-Plasencia, A., Bielza-Lino, P. 2002. Insecticida resistance of *Helicoverpa armigera* to endosulfan, carbamates and organophosphates: the Spanish case. *Crop Protection*, 21: 1003-1013.
- Toxopeus, H., Lubberts, J.H., Neervoort, W., Folkers, W. y Huisjes, G. 1995. Breeding research and in vitro propagation to improve carvone production of caraway (*Carum carvi* L.). *Industrial Crops and Products* 4: 33-38.
- Tripathi, A.K., Prajapati, V., Aggarwal, K.K., Khanuja, S.P.S. 2000. Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles. *J. Econ. Entom.* 93: 43-47.
- Tripathi, A.K., Prajapati, V., Aggarwal, K.K., Kumar, S. 2001. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8-cineole from *Artemisia annua* on progeny of *Tribulium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entom.* 94: 979-983.

- Tripathi, A.K., Prajapati, V., Khanuja, S.P.S., y Kumar, S. 2003a. Effect of d-limonene on three stored-product beetles. *J. Econ. Entomol.* 96: 990-995.
- Tripathi, A.K., Prajapati, V., y Kumar, S. 2003b. Bioactivities of l-Carvone, d-Carvone and Dihydrocarvone toward three stored product beetles. *J. Econ. Entomol.* 96: 1594-1601.
- Valladares, G., Defagó, M.T., Palacios, S.M. y Carpinella, M.C. 1997. Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the Elm Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 747-750.
- Vieira R.F. y Simon J.E. 2006. Chemical characterization of basil (*Ocimum spp.*) based on volatile oils. *Flavour and Fragrances Journal* 21: 214-221.
- Villani, F. y Hemingway, J. 1987. The detection and interaction of multiple organophosphorus and carbamate insecticide resistance genes in field population of *Culex pipiens* from Italy. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 27: 218-228.
- Young, S.J., Gunning, R.V., y Moores, G.D. 2005. The effect of piperonyl butoxide on pyrethroids-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 61: 397-401.
- Zheng, G.Q., Kenney, P.M. y Lam, L.K. 1992. Effects of carvone compounds on glutathione S-transferase activity in A/J mice. *J. Agric. Food Chem.* 40: 751-755.

Lista de Abreviaturas y Fórmulas utilizadas



Lista de Abreviaturas y Fórmulas utilizadas

DISOLVENTES

H₂O: Agua

Hex: Hexano

CH₂Cl₂: Diclorometano

EtOAc: Acetato de etilo

EtOH: Etanol

Et₂O: Éter etílico

(CH₃)₂CO: Acetona

FRACCIONAMIENTO

FiC: fracciones obtenidas del aceite esencial de coriandro.

FiiC: subfracciones obtenidas del aceite esencial de coriandro.

FiA: fracciones obtenidas del aceite esencial de alcaravea.

FiiA: subfracciones obtenidas del aceite esencial de alcaravea.

FiB8: fracciones obtenidas del aceite esencial de albahaca (OB7 y OB8).

FiB17: fracciones obtenidas del aceite esencial de albahaca (OB17).

FiiB17: subfracciones obtenidas del aceite esencial de albahaca (OB17).

FiB25: fracciones obtenidas del aceite esencial de albahaca (OB25).

FiB43: fracciones obtenidas del aceite esencial de albahaca (OB43).

TÉCNICAS

CC: Cromatografía en columna.

CCF: Cromatografía en capa fina.

CG: cromatografía de gases.

EM: espectrometría de masas.

EI: energía de ionización.

uv-visible: ultravioleta-visible.

TR: tiempo de retención.

IR: Índice de Kovat.

λ_{\max} : longitud de onda máxima.

He: Helio

ANÁLISIS PROBIT

CL₅₀: concentración letal que produciría la muerte al 50 % de una población dada de insectos.

CL₉₅: concentración letal que produciría la muerte al 95 % de una población dada de insectos.

χ^2 : estadístico que determina la calidad del ajuste mediante comparaciones de distribuciones teóricas y distribuciones empíricas.

MODOS DE ACCIÓN

AChE: Acetilcolinesterasa.

AcTCh: Acetiltiocolinesterasa.

DTNB: ácido ditiobisnitrobenzoico.

V_M: velocidad máxima enzimática.

K_m: constante de Michaelis.

K_i: constante de inhibición.

[S]: concentración de sustrato.

[I]: concentración de inhibidor.

SELECCIÓN DE RESISTENCIAS

SSSO: Población sensible (a monoterpenoides) de *Sitophilus oryzae*.

SSRD: Población sensible (a monoterpenoides) de *Rhyzopertha dominica*.

SSCP: Población sensible (a monoterpenoides) de *Cryptolestes pusillus*.

Gen (i) : número de generación.

Lin (i): número de generación de insectos tratados con linalol y seleccionados por resistencia.

Alc (i): número de generación de insectos tratados con alcanfor y seleccionados por resistencia.

Car (i): número de generación de insectos tratados con *S*-carvona y seleccionados por resistencia.

Tra (i): número de generación de insectos tratados con *E*-anetol y seleccionados por resistencia.

Fen (i): número de generación de insectos tratados con fenchona y seleccionados por resistencia.

Met (i): número de generación de insectos tratados con estargol y seleccionados por resistencia.

Ter (i): número de generación de insectos tratados con γ -terpineno y seleccionados por resistencia.

FR: Factor de resistencia.

RS: Ratio de sinergismo.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la rotenona.-----	5
Figura 2. Estructura molecular de piretrina.-----	5
Figura 3. Estructura molecular de la nicotina.-----	6
Figura 4. Estructura molecular de la anabasina.-----	6
Figura 5. Estructura molecular de la rianodina.-----	6
Figura 6. Estructura molecular de la azadiractina.-----	7
Figura 7. Estructura molecular del meliartenin.-----	7
Figura 8. Estructura molecular de la artemisina.-----	8
Figura 9. Estructura del isopreno.-----	11
Figura 10. Ordenación de unidades de isopreno “cabeza con cola”.-----	12
Figura 11. Estructura del ácido cinámico.-----	13
Figura 12. Estructura de la cafeína.-----	14
Figura 13. Vías generales del metabolismo secundario de las plantas.-----	15
Figura 14. Estructura del mirceno.-----	16
Figura 15. Estructura del geranial.-----	16
Figura 16. Estructura del linalol.-----	17
Figura 17. Estructura del γ -terpineno.-----	17
Figura 18. Estructura del mentol.-----	18
Figura 19. Estructura del perillaldehído.-----	18
Figura 20. Estructura de <i>S</i> -(+)-carvona.-----	18
Figura 21. Estructura del 1,8-cineol.-----	19
Figura 22. Estructura de la tuyona.-----	19
Figura 23. Estructura de car-3-eno.-----	19
Figura 24. Estructura de α -pineno.-----	19

Figura 25. Estructura del alcanfor.-----	20
Figura 26. Estructura de la Fenchona.-----	20
Figura 27. Estructura del etilcinamato.-----	20
Figura 28. Estructura del eugenol. -----	21
Figura 29. Estructura de la chalcona.-----	21
Figura 30. Estructural del resveratrol. -----	21
Figura 31. Acción de los insecticidas en los receptores sinápticos. -----	36
Figura 32. Secuencia en el desarrollo de la resistencia a plaguicidas. -----	38
Figura 33. Plan de trabajo. -----	44
Figura 34. Espectro de masas de <i>S</i> -(+)-carvona. -----	63
Figura 35. Monoterpenoides estudiados. -----	66
Figura 36. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de coriandro. -----	81
Figura 37. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de alcaravea.-----	85
Figura 38. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de albahaca, mezcla de variedades OB7 y OB8. -----	91
Figura 39. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de albahaca, variedad OB17. -----	92
Figura 40. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de albahaca, variedad OB25. -----	93
Figura 41. Fraccionamiento biodirigido del aceite esencial de albahaca, variedad OB43. -----	94
Figura 42. Cromatograma del aceite esencial de coriandro.-----	105
Figura 43. Cromatograma del aceite esencial de alcaravea.-----	106
Figura 44. Cromatograma del aceite esencial de albahaca (mezcla de variedades OB7 y OB8). -----	107

Figura 45. Cromatograma del aceite esencial de albahaca (variedad OB17).----- 108

Figura 46. Cromatograma del aceite esencial de albahaca (variedad OB25).----- 109

Figura 47. Cromatograma del aceite esencial de albahaca (variedad OB43).----- 110

Figura 48. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por fenchona (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.----- 129

Figura 49. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por γ -terpineno (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.----- 130

Figura 50. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por linalol (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.----- 131

Figura 51. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por *S*-carvona (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.----- 132

Figura 52. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por geraniol (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.----- 133

Figura 53. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por *E*-anetol (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.----- 134

Figura 54. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por estragol (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.----- 135

Figura 55. Progreso de inhibición de Acetilcolinesterasa por alcanfor (1mM, 10mM, 50mM y 100mM) usando las siguientes concentraciones de sustrato acetiltiocolina: 1mM, 2mM, 5mM y 10mM.----- 136

Figura 56. Velocidad frente a la concentración de sustrato para diferentes concentraciones de inhibidor. ----- 138

Figura 57. Inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de sustrato (acetiltiocolina) para diferentes concentraciones de inhibidor (monoterpenoides). ----- 140

Figura 58. Inversa de la velocidad frente a la inversa de la concentración de inhibidor (monoterpenoide) a dos concentraciones diferentes (10mM y 1mM) de sustrato (acetiltiocolina). ----- 144

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los modos de acción de insecticidas y acaricidas. -----	32
Tabla 2. Origen del material vegetal. -----	47
Tabla 3. Concentraciones de monoterpenoides seleccionadas para realizar la recta de calibrado. -----	64
Tabla 4. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de coriandro. -----	96
Tabla 5. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de alcaravea. -----	98
Tabla 6. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de albahaca, mezcla de variedades OB7/OB8. -----	101
Tabla 7. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de albahaca, variedad OB17. -----	102
Tabla 8. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de albahaca, variedad OB25. -----	103
Tabla 9. Mortalidad en plagas de almacén del arroz al aplicar aceite esencial de albahaca, variedad OB43. -----	104
Tabla 10. Compuestos identificados en el aceite esencial de coriandro. -----	111
Tabla 11. Compuestos identificados en el aceite esencial de alcaravea. -----	112
Tabla 12. Compuestos identificados en el aceite esencial de albahaca: mezcla de las variedades OB7 y OB8. -----	114
Tabla 13. Compuestos identificados en el aceite esencial de albahaca: variedad OB17. -----	116
Tabla 14. Compuestos identificados en el aceite esencial de albahaca: variedades OB25 y OB43. -----	118

Tabla 15. Toxicidad del aceite esencial de coriandro y alcaravea en plagas del arroz almacenado. -----	121
Tabla 16. Toxicidad de los aceites esenciales de albahaca en plagas de arroz almacenado. -----	122
Tabla 17. Concentraciones letales (CL ₅₀) de monoterpenoides (a las 24 horas) en <i>S. oryzae</i> .-----	125
Tabla 18. Concentraciones letales (CL ₅₀) de monoterpenoides (a las 24 horas) en <i>R. dominica</i> . -----	126
Tabla 19. Concentraciones letales (CL ₅₀) de monoterpenoides (a las 24 horas) en <i>C. pusillus</i> .-----	127
Tabla 20. Velocidad máxima y valores de la constante de Michaelis para diferentes concentraciones de cada uno de los monoterpenoides. -----	139
Tabla 21. Constantes de inhibición de monoterpenoides.-----	142
Tabla 22. Selección de poblaciones resistentes de <i>Sitophilus oryzae</i> en laboratorio.-----	148
Tabla 23. Selección de poblaciones resistentes de <i>Rhyzopertha dominica</i> en laboratorio.-----	149
Tabla 24. Selección de poblaciones resistentes de <i>Cryptolestes pusillus</i> en laboratorio.-----	150
Tabla 25. Análisis probit. <i>Sitophilus oryzae</i> población sensible a monoterpenoides (SSSO). -----	151
Tabla 26. Análisis probit. <i>Sitophilus oryzae</i> poblaciones (GEN6) resistentes a cada monoterpenoide. -----	152
Tabla 27. Análisis probit. <i>Rhyzopertha dominica</i> población sensible a monoterpenoides (SSRD).-----	153

Tabla 28. Análisis probit. <i>Rhyzopertha dominica</i> poblaciones (GEN5) resistentes a cada monoterpenoide. -----	154
Tabla 29. Análisis probit. <i>Cryptolestes pusillus</i> población sensible a monoterpenoides (SSCP). -----	155
Tabla 30. Análisis probit. <i>Cryptolestes pusillus</i> poblaciones (GEN5) resistentes a cada monoterpenoide. -----	156
Tabla 31. Concentraciones letales de monoterpenoides, con y sin sinergistas para poblaciones susceptibles (SSSO) y poblaciones resistentes (generación 7) de <i>Sitophilus oryzae</i> seleccionadas en laboratorio. -----	158
Tabla 32. Concentraciones letales de monoterpenoides, con y sin sinergistas para poblaciones susceptibles (SSRD) y poblaciones resistentes (generación 7) de <i>Rhyzopertha dominica</i> seleccionadas en laboratorio.-----	161
Tabla 33. Concentraciones letales de monoterpenoides, con y sin sinergistas para poblaciones susceptibles (SSCP) y poblaciones resistentes (generación 7) de <i>Cryptolestes pusillus</i> seleccionadas en laboratorio.-----	164
Tabla 34. Adsorción de monoterpenoides (ppm) en arroz. -----	169
Tabla 35. Desorción de monoterpenoides (ppm) en arroz. -----	169
Tabla 36. Desorción de linalol (ppm) desde el arroz. -----	170

INDICE DE FOTOS

Foto 1. <i>Coriandrum sativum</i> . -----	22
Foto 2. <i>Carum carvii</i> . -----	24
Foto 3. Flores de albahaca. -----	27
Foto 4. <i>Sitophilus oryzae</i> . -----	28
Foto 5. <i>Rhizopertha dominica</i> . -----	29
Foto 6. <i>Cryptolestes pusillus</i> . -----	31
Foto 7. <i>Coriandrum sativum</i> . -----	49
Foto 8. <i>Carum carvii</i> . -----	50
Foto 9. <i>Ocimum basilicum</i> . -----	51
Foto 10. Frutos de <i>Coriandrum sativum</i> . -----	52
Foto 11. Frutos de <i>Carum carvii</i> . -----	53
Foto 12. Hojas de <i>Ocimum basilicum</i> . -----	53
Foto 13. Columna cromatográfica. -----	54
Foto 14. Cubetas para revelar las placas de cromatografía en capa fina. -----	57
Foto 15. Placa de cromatografía en capa fina. -----	57
Foto 16. Crías de <i>Sitophilus oryzae</i> . -----	58
Foto 17. Crías de <i>Rhizopertha dominica</i> . -----	58
Foto 18. Crías de <i>Cryptolestes pusillus</i> . -----	59
Foto 19. Cámara de cultivo (Sanyo MLR-350HT). -----	59
Foto 20. Detalle del bioensayo de actividad volátil. -----	60
Foto 21. Cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas. -----	62
Foto 22. Selección de resistencia en laboratorio. -----	70
Foto 23. Jeringuilla Hamilton. -----	73