

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Efectos insecticidas y bioquímicos de aceites esenciales
obtenidos de plantas colombianas sobre el gorgojo rojo
de la harina, *Tribolium castaneum* (Coleoptera:
Tenebrionidae)**

Juan Sebastián Oviedo Sarmiento

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de ciencias, Departamento de química
Bogotá-Colombia
2019

NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".
Artículo 23 de la Resolución N°13 de julio de 1946

**Efectos insecticidas y bioquímicos de aceites esenciales
obtenidos de plantas colombianas sobre el gorgojo rojo
de la harina, *Tribolium castaneum* (Coleoptera:
Tenebrionidae)**

Juan Sebastián Oviedo Sarmiento

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar
al título de: Magister en Ciencias Biológicas

Director (a):

PhD, Química. Juliet Angélica Prieto Rodríguez

Línea de Investigación:

Química de Productos Naturales Vegetales

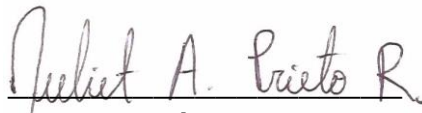
Grupo de Investigación:


Fitoquímica Pontificia Universidad Javeriana


Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2019

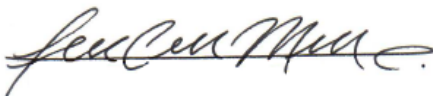
**Efectos insecticidas y bioquímicos de aceites esenciales
obtenidos de plantas colombianas sobre el gorgojo rojo
de la harina, *Tribolium castaneum* (Coleoptera:
Tenebrionidae)**

Juan Sebastián Oviedo Sarmiento


Juliet Angélica Prieto R.
Química, PhD
Directora


Karina R. Caballero G.
Ing. de Alimentos, PhD
Jurado 1


Elizabeth Gil Archila
Química, PhD
Jurado 2


Juan C. Marín L.
Químico Farmacéutico, PhD
Jurado 3

**Efectos insecticidas y bioquímicos de aceites esenciales
obtenidos de plantas colombianas sobre el gorgojo rojo
de la harina, *Tribolium castaneum* (Coleoptera:
Tenebrionidae)**

Juan Sebastián Oviedo Sarmiento



CONCEPCIÓN PUERTA B. PhD
Decana
Facultad de Ciencias



ALBA A. TRESPALACIOS. PhD
Directora de posgrados
Facultad de Ciencias

DEDICATORIA

*A Don Célino, para cuando nos
volvamos a ver sea un
motivo de orgullo y alegría.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por hacer posible que todos los momentos de mi vida sean una experiencia enriquecedora que me han hecho crecer como profesional y ser humano.

A mis padres Miryam Sarmiento y Célimo Oviedo, por su apoyo y amor incondicional ya que gracias a ellos he podido alcanzar todas las metas que me he propuesto. De igual manera a mis hermanos y hermanas que han sido un soporte tanto moral como espiritual en mi vida.

A mis amigos Ricardo y Diana por ser un soporte invaluable en mi vida.

A mi profesora y tutora de tesis Juliet Prieto por sus valiosas enseñanzas y por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo. También, por ser un ejemplo tanto profesional como personal en mi vida.

Al profesor Oscar Patiño por abrirme las puertas del Laboratorio del Grupo de Investigación en Productos Naturales Bioactivos en el que pude aprender y desarrollar mi trabajo de grado. De igual manera a todos los estudiantes que lo conforman por su invaluable apoyo, especialmente a mi amiga y colega Leidy Nagles.

A la profesora Eddy Herrera por su valiosa ayuda en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioensayos de la Pontificia Universidad Javeriana por su ayuda, ya que con ellos el tiempo de trabajo se hizo más ameno.

A la Pontificia Universidad Javeriana por ser parte fundamental de mi formación profesional. De igual manera, a la Universidad Nacional de Colombia por ayudarme a cumplir los objetivos de este trabajo.

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

RESUMEN

El uso de insecticidas sintéticos tradicionales para el control de *Tribolium castaneum* ha generado problemas de salud pública debido a su alta toxicidad y baja selectividad, haciéndose necesario el desarrollo de nuevos agentes fitosanitarios que sean seguros y eficientes. En esta investigación se determinó el potencial fumigante de algunos AEs obtenidos de especies aromáticas colombianas. Asimismo, se evaluaron los posibles mecanismos de acción a través de la inhibición de la actividad catalítica de enzimas vitales y desintoxicantes de *T. castaneum*. Por medio del método experimental desarrollado se logró evaluar la acción fumigante de 45 aceites esenciales (AEs) mediante el método de vial en vial. Los valores CL₃₀, CL₅₀ y CL₉₀ de los AEs más activos fueron determinados mediante un análisis PROBIT y se caracterizaron químicamente mediante GC-MS.

La letalidad y composición química de los AEs se utilizó para establecer grupos a través de un análisis clúster. El grupo de los AEs promisorios fue sometido a evaluación para determinar su efecto inhibitor sobre la actividad catalítica de las enzimas acetilcolinesterasa (AChE), glutatión-s-transferasa (GST) y catalasa mediante métodos espectrofotométricos. Como resultados se encontró que 23 de 45 AEs mostraron ser promisorios ya que tuvieron CL₅₀ entre 16.23 y 264.59 µL/L aire. La composición química de los AEs más activos fue muy variada, observándose principalmente aceites monoterpénicos y fenilpropánicos. El análisis clúster agrupó los 23 AEs en dos grupos principales, encontrándose que en el grupo uno están los AEs más activos y aquellos en los que los fenilpropanos son los componentes más significativos. En este grupo destacan el aceite de *Foeniculum vulgare* con CL₅₀ de 16.23 µL/L aire, seguido por *Artemisia dracuncululus* con CL₅₀ 22.78 µL/L aire. Con respecto al segundo grupo, los AEs son menos activos y del tipo monoterpénico, como el caso de *Citrus sinensis* y *Coleonema album* con valores de CL₅₀ de 138.32 y 264.59 µL/L aire, respectivamente. Estos resultados sugieren que la fumigancia de los AEs puede mejorar con un mayor contenido de fenilpropanos.

De igual manera, se cuantificaron las enzimas de importancia metabólica en homogenizados proteicos obtenidos de *T. castaneum*, donde se evidenció que en dicho extracto están, en diferentes proporciones, las enzimas de interés; destacándose en mayor proporción la catalasa. Para determinar la inhibición de la actividad catalítica de dichas enzimas, se usó una concentración de 500 ppm de cada uno AE promisorios. Como resultados se encontró que, para el caso de la AChE, los 23 AEs promisorios tuvieron

variados efectos de inhibición, sobresaliendo los AEs de *Piper nigrum* y *Rosmarinus officinalis* con porcentajes superiores al 60 %. Con respecto a la inhibición de la GST, los AEs tuvieron un rango de inhibición entre 10 y el 57 %, destacándose los AEs de *Citrus sinensis*, *Piper aduncum* y *Zanthoxylum monophyllum*.

Del mismo modo se evidenció una inhibición catalítica de la catalasa entre el 30 y el 80 %, por parte de los AEs promisorios sobresaliendo los de las especies de *Schinus molle*, *Lavandula angustifolia* e *Hypericum juniperinum*. Con base en estos resultados es posible concluir que los AEs evaluados en la presente investigación pueden llegar a tener variados mecanismos de acción relacionados con la mortalidad de *T. castaneum*, lo que los convierte en un buen reservorio de sustancias que, en primer lugar, controlen la plaga en cuestión y, en segundo, prevengan los inconvenientes de los insecticidas convencionales como la resistencia.

ABSTRACT

The use of synthetic insecticides for the control of *Tribolium castaneum* has generated public health issues such as high toxicity and low selectivity, making necessary the development of new phytosanitary agents that are safe and efficient. In this investigation, the fumigant potential of some essential oils extracted from Colombian aromatic species was determined. Likewise, the possible mechanisms of action were evaluated through the inhibition of vital and detoxifying enzymes catalytic activity from *T. castaneum*. Throughout the developed experimental method, it was possible to evaluate the fumigant action of 45 essential oils (AEs) through the "vial en vial" method. The CL30, CL50 and CL90 values from the most active AEs were determined by a PROBIT analysis and they were chemically characterized through GC-MS.

The AEs lethality and the chemical composition were used to establish activity groups by means of cluster analysis. The group of promising AEs was evaluated to determinate its inhibitory effect on catalytic activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), glutathione-s-transferase (GST) and catalase according to spectrophotometric methods. As results, 23 from the 45 AEs showed promising activity with CL50 values between 16.23 and 264.59 $\mu\text{L/L}$ air. The composition of the most active AEs was very varied, observing mainly monoterpenes and phenylpropanoids oils. The cluster analysis grouped these 23 AEs into two main groups finding that in the group number one are found the most active AEs and those in which the phenylpropanes are the most significant components. In this group, stand out the *Foeniculum vulgare* oil with CL50 of 16.23 $\mu\text{L/L}$ air, followed by *Artemisia dracuncululus* with CL50 of 22.78 $\mu\text{L/L}$. In regards the second group, the AEs are less active and monoterpenic type, such as *Citrus sinensis* and *Coleonema album* with CL50 values of 138.32 y 264.59 $\mu\text{L/L}$ air, respectively. These results suggest the AEs fumigant activity can be improved with a higher phenylpropanes content.

In the same way, the enzymes with metabolic importance were quantified in protein homogenates obtained from *T. castaneum*, where it was found that, in that extract there is activity of the enzymes of interest, in different proportions, being the catalase the one with prominent proportion. To determine the catalytic activity inhibition of these enzymes, a concentration of 500 ppm of each promising AEs was used. The results show that for the AChE case, the 23 promising AEs had different inhibition effects, with the AEs of *Piper*

nigrum and *Rosmarinus officinalis* standing out with percentages higher than 60%. Regarding the GST catalytic activity inhibition, the AEs had a range of inhibition between 10 and 57%, highlighting the AEs of *Citrus sinensis*, *Piper aduncum* y *Zanthoxylum monophyllum*.

Alike, an inhibition of catalytic activity of catalase between 30 and 80% was evidenced by the promising AEs especially those of *Schinus mole*, *Lavandula angustifolia* and *Hypericum juniperinum*. Based in these results, it is possible to conclude that the AEs evaluated in the present investigation may have various mechanisms of action related to the mortality of *T. castaneum*, which make them a good reservoir of substances that, in first place, control the plague indicated and secondly, prevent the inconveniences of conventional insecticides such as resistance.

CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vii
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I: Estado actual del tema.....	5
1.1. La importancia del almacenamiento de cereales y productos de su molienda.....	5
1.2. Pérdidas de los cereales como productos almacenados	7
1.3. Plagas como principales responsables de las perdidas en los productos almacenados...	10
1.4. <i>Tribolium castaneum</i> como plaga en los productos almacenados	12
1.5. Métodos de control de <i>T. castaneum</i>	15
1.5.1. Métodos artesanales o culturales	15
1.5.2. Control mecánico	16
1.5.3. Control físico	16
1.5.4. Control biológico	17
1.5.5. Interrupción del apareamiento.....	18
1.5.6. Control químico.....	18
1.5.7. Control con insecticidas botánicos.....	21
1.5.8. Resistencia en los insectos	24
1.5.9. Enzimas de importancia en <i>T. castaneum</i>	25
CAPITULO II: ACEITES ESENCIALES COMO INSECTICIDAS BOTÁNICOS PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE <i>T. castaneum</i>	29
2.1. INTRODUCCIÓN	29
2.2. METODOLOGÍA.....	30
2.2.1. Diseño experimental	30
2.2.2. Selección de los aceites esenciales con potencial actividad fumigante sobre <i>Tribolium castaneum</i>	31
2.2.3. Estimación de las concentraciones letales: Modelo de ajuste de respuesta de letalidad (Probit)	36

2.2.4.	Caracterización química de los AEs potencialmente activos	38
2.2.5.	Agrupamiento clúster.....	40
2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
2.3.1.	Selección de los aceites esenciales promisorios.	41
2.3.2.	Estimación de las concentraciones letales (CLs) de los AEs promisorios.....	46
2.3.3.	Caracterización química de los AEs promisorios.....	50
2.3.4.	Agrupamiento clúster.....	61
2.1.	CONCLUSIONES	69
CAPITULO III: EFECTOS DE ACEITES ESENCIALES SOBRE ENZIMAS DE IMPORTANCIA EN EL <i>T. castaneum</i>		
	70
3.1.	INTRODUCCIÓN	70
3.2.	METODOLOGÍA.....	72
3.2.1.	Diseño experimental	72
3.2.2.	Caracterización del homogenizado proteico de <i>T. castaneum</i>	73
3.2.3.	Estudio de la inhibición <i>in vitro</i> de la AChE, GST y catalasa	76
3.2.4.	Estimación de las Cl ₅₀	77
3.2.5.	Análisis estadístico de k-means (KNN)	77
3.2.6.	Análisis de componentes principales	78
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
3.3.1.	Caracterización del homogenizado proteico de <i>T. castaneum</i>	79
3.3.2.	Resultados de la inhibición catalítica de las enzimas.....	81
3.4.	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP).....	99
3.5.	CONCLUSIONES	103
4.	RECOMENDACIONES	105
5.	BIBLIOGRAFÍA	106
6.	ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: Estado actual del tema

Figura 1.1. "The food pipeline" que muestra las diferentes pérdidas que sufren los alimentos en su cadena de producción.	8
Figura 1.2. Distribución de pérdida y desperdicio por eslabón de la cadena alimentaria....	9
Figura 1.3. Participación de pérdida y desperdicio vs. participación de importaciones por grupos de alimentos.	10
Figura 1.4. Principales factores bióticos y abióticos que afectan la producción y almacenamiento de maíz	11
Figura 1.5. Fotografía del <i>T. castaneum</i>	13
Figura 1.6. Diferentes estadios del ciclo de vida del <i>T. castaneum</i>	13
Figura 1.7. Reacción para determinar la actividad catalítica de la AChE.....	26
Figura 1.8. Tripéptido responsable de la conjugación de xenobióticos en la GST.	27
Figura 1.9. Reacción para determinar la actividad catalítica de la GST	28

Capítulo II: Aceites esenciales como insecticidas botánicos promisorios para el control de *T. castaneum*.

Figura 2.1. Fotografías de la cámara de crecimiento empleada para la cría <i>T. castaneum</i>	35
Figura 2.2. Metodología de vial en vial para determinar los AEs más promisorios..	36
Figura 2.3. Porcentaje de mortalidad sobre <i>T. castaneum</i> de los 45 AEs evaluados a una concentración de 318 µL/L aire.....	43
Figura 2.4. Comportamiento de las CL30, CL50 y CL90 de los AEs promisorios usados contra <i>T. castaneum</i>	48
Figura 2.5. Dendograma de los AEs promisorios con base a la distancia euclidiana entre vecinos más cercanos.	63
Figura 2.6. Dendograma de los AEs promisorios con base a la distancia euclidiana entre vecinos más lejanos. Rojo: clúster 1. Verde: clúster 2.	65
Figura 2.7. Boxplot que compara a) la diversidad química de los AEs y b) las CLs de los AEs que hacen parte del clúster 1	66
Figura 2.8. Boxplot que compara a) la diversidad química de los AEs y b) las CLs de los AEs que hacen parte del clúster 2.....	67

Capítulo III: Efectos de aceites esenciales sobre enzimas de importancia en el *T. castaneum*.

Figura 3.1. Curvas de calibración realizadas en la presente investigación. a). Curva de calibración para la cuantificación de proteínas. Curvas de calibración para determinar la actividad enzima de b) AChE c) GST y d) catalasa.....	80
Figura 3.2. Porcentaje de inhibición de los AEs promisorios sobre la AChE.....	83

Figura 3.3. Perfil de los 3 grupos de AEs formados en el agrupamiento k-means en la inhibición de la AChE.....	88
Figura 3.4. Porcentaje de inhibición de los AEs promisorios sobre la GST.....	89
Figura 3.5. Perfil de los AEs formados en el agrupamiento k-means en la inhibición de la GST.	93
Figura 3.6.. Porcentaje de inhibición de los AEs promisorios sobre la catalasa.	94
Figura 3.7. Perfil de los AEs formados en el agrupamiento k-means en la inhibición de la catalasa.....	99
Figura 3.8. Gráfico BIPLLOT para el análisis de los efectos de los AEs sobre <i>T. castaneum</i>	100
Figura 3.9. Gráfico BIPLLOT de las variables y las observaciones activas relacionadas con los efectos de los AEs sobre <i>T. castaneum</i>	102

LISTA DE TABLAS

Capítulo I: Estado actual del tema

Tabla 1.1. Insecticidas utilizados para el control de <i>T. castaneum</i> y sus mecanismos de acción.....	19
--	----

Capítulo II: Aceites esenciales como insecticidas botánicos promisorios para el control de *T. castaneum*.

Tabla 2.1. Listado de plantas colectadas para la extracción de los aceites esenciales	32
Tabla 2.2. Propiedades físicas de los 23 AEs promisorios contra <i>T. castaneum</i>	45
Tabla 2.3. Concentraciones letales 30, 50 y 90 de los 23 AEs promisorios.....	46
Tabla 2.4. Reportes de actividad fumigante de los AEs promisorios.	49
Tabla 2.5. Composición química relativa de los AEs promisorios	51
Tabla 2.6. Parámetros utilizados para el agrupamiento clúster de los AEs promisorios....	62
Tabla 2.7. Resultados de la ANOVA para las variables descriptoras en el agrupamiento de los AEs entre vecinos más cercanos.	64
Tabla 2.8. Resultados de la ANOVA para las variables descriptoras en agrupamiento de los AEs entre vecino más lejano.....	68

Capítulo III: Efectos de aceites esenciales sobre enzimas de importancia en el *T. castaneum*.

Tabla 3.1. Características de las enzimas utilizadas como patrones en la presente investigación.....	73
Tabla 3.2. Resumen de las características del homogenizado proteico obtenido del <i>T. castaneum</i>	81
Tabla 3.3. Porcentajes de inhibición causados por los AEs sobre las enzimas AChE, GST y catalasa.....	81
Tabla 3.4. Concentración inhibitoria 50 de los AEs de <i>P. nigrum</i> y <i>R. officinalis</i> sobre la AChE de <i>T. castaneum</i>	85
Tabla 3.5. Tabla de parámetros de agrupación enzima AChE.....	86
Tabla 3.6. Agrupamiento k-means de los 23 AEs en función a sus características e inhibición de la AChE.....	87
Tabla 3.7. Variables que generan diferencias significativas entre los grupos formados de los 23 AE.....	87
Tabla 3.8. Concentración inhibitoria 50 de los AEs de <i>C. sinensis</i> , <i>P aduncum</i> y <i>Z monophyllum</i> sobre la GST de <i>T. castaneum</i>	90
Tabla 3.9. Tabla de parámetros de agrupación enzima GST.....	91
Tabla 3.10. Agrupamiento k-means de los 23 AEs en función a sus características e inhibición de la GST.....	92

Tabla 3.11. Variables que generan diferencias significativas entre los grupos formados de los 23 AE.....	92
Tabla 3.12. Concentración inhibitoria 50 de los AEs con una inhibición ≥ 50 % de la catalasa.....	95
Tabla 3.13. Tabla de parámetros de agrupación enzima catalasa	96
Tabla 3.14. Agrupamiento k-means de los 23 AEs en función a sus características e inhibición de la catalasa	97
Tabla 3.15.. Variables que generan diferencias significativas entre los grupos formados de los 23 AE.....	98
Tabla 3.16. Valores propios y de varianza que definen las componentes que describen los efectos de los AEs sobre <i>T. castaneum</i>	100
Tabla 3.17. Valores de coseno cuadrado de los descriptores de los AEs.....	101

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Término
®	Marca registrada
°C	Grados Celcius
µL/L aire	Microlitro sobre litro de aire
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ACP	Análisis de componentes principales
AEs	Aceites esenciales
ANOVA	Análisis de varianza
ATChI	Yoduro de acetiltiocolina
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CL ₉₀	Concentración letal para el 90 % de la población
CL ₃₀	Concentración letal para el 30 % de la población
CL ₅₀	Concentración letal para el 50 % de la población
cm/s	Velocidad lineal
DPN	Departamento nacional de planeación
DTNB	Ácido 5-(3-carboxi-4-nitrofenil)disulfanil-2-nitrobenzoico
EI	Impacto de electrones
EM	Espectrometría de masas
EROs	Especies reactivas de oxígeno
eV	Electrón voltios
FID	Detector de ionización de llama
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación S transferasa
HR	Humedad relativa
I _R	Índice de retención
KNN	Análisis estadístico de k-means
m/z	Relación masa/carga
MIP	Manejo integrado de plagas
ppm	Partes por millón
QUIPRONAB	Grupo de Investigación en Productos Naturales Bioactivos
SH	Grupo sulfhidrilo
TIC	Corrientes iónicas reconstruidas
t _R	Tiempo de retención
U/mg	Unidades sobre miligramo
U/mL.	Unidades sobre miligramo

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país con una ubicación privilegiada en la región tropical del planeta, por lo tanto, tiene el potencial de producir durante todo el año un sinfín de alimentos y convertirse en una nación superproductora. Esta potencialidad se ha venido aprovechando por los últimos gobiernos ya que, según cifras del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), para el año 2017 el producto interno bruto (PIB) de Colombia tuvo un crecimiento del 1,8% impulsado, principalmente, por el sector agropecuario que, para el mismo periodo de tiempo, creció un 4.9%. En particular, los cultivos con mayor crecimiento y que representan un renglón importante de este sector económico fue el de los cereales, con un incremento del 8.4% (DANE, 2018).

Por consiguiente, en Colombia la actividad agrícola de cereales se ha desarrollado en alto porcentaje del total del territorio nacional. Lo que ha conllevado a que el cultivo de maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo, entre otros haya tomado gran importancia, en primer lugar, por la extensión de tierra que se ha destinado a su producción, en segundo, porque son la base alimenticia del colombiano y, en tercero, porque hacen parte de la cultura gastronómica del país. Sin embargo, pese a lo anterior, el número de hectáreas para la siembra de cereales como el trigo, el sorgo y la cebada han disminuido sustancialmente en los últimos 45 años. Por ejemplo, según la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales (FINAGRO), para el año 1970 el área de siembra total de dichos cereales era de 800.000 hectáreas, en contraposición, para el año 2015 sólo llegaron a las 300.000 hectáreas. Siguiendo esta tendencia se encuentra el cultivo del maíz que pasó, en ese mismo periodo de tiempo, de 600.000 a 295.000 hectáreas sembradas (DANE, 2018).

Ahora bien, con respecto a su producción, los cereales en Colombia, también han tenido un descenso significativo, dado que entre los años 2012 al 2015 la producción pasó de 1.850.000 a 650.000 toneladas (FINAGRO, 2016). Esta disminución sustancial en la oferta ha llevado al aumento de las importaciones, debido a que la producción nacional no logra cubrir la demanda; por ende, el país ha tenido que comprar gran cantidad de cereales a otras regiones del mundo como Estados Unidos y Canadá. Solo en el periodo comprendido entre enero a diciembre del año 2016 entraron al país, aproximadamente, 7 millones de toneladas de cereales con unos costos de US\$850 millones (DANE, 2016).

Entre las causas de la producción insuficiente de cereales en Colombia están los altos costos que representa para los productores su cultivo, donde alrededor del 50% del costo total de producción es invertido en fertilizantes y plaguicidas, y sumado a esto, factores como el daño en los suelos, el cambio climático, la presencia de plagas en campo y almacén, muchas de ellas resistentes como resultado del abuso de insecticidas, hacen que la actividad agrícola enfocada al cultivo de cereales sea cada vez menos atractiva (FINAGRO, 2016). Así mismo, es importante destacar que la temporalidad que presentan los cultivos de cereales han conllevado a que los agricultores implementen técnicas de almacenamiento deficientes que generan grandes pérdidas para la producción, especialmente por el ataque de hongos, aves e insectos (García et al., 2007).

Así mismo, es importante destacar que el país tiene la necesidad de dar cumplimiento al objetivo de Desarrollo Sostenible suscrito en la Asamblea General de Naciones Unidas, que establece “reducir a la mitad el desperdicio de alimentos per cápita mundial en la venta al por menor y a nivel de los consumidores y reducir las pérdidas de alimentos en las cadenas de producción y suministro, incluidas las pérdidas posteriores a la cosecha” (DNP, 2016). Este tipo de convenios no son extraños de suponer ya que, en Colombia, para el año 2016, se perdieron 9,76 millones de toneladas de alimentos, lo cual equivale al 34% de la producción total. Es de acotar que, del total perdido o desperdiciado, el 64 % corresponde a pérdidas que se ocasionan en las etapas de producción, postcosecha, almacenamiento y procesamiento industrial. Particularizando en los cereales, en la postcosecha y almacenamiento se tienen pérdidas del 19,8 y el 15,6% respectivamente. Esto significa que, en promedio, se están perdiendo al año 1,8 millones de toneladas de cereales, lo que es equivalente a la producción nacional de arroz en un año (DNP, 2016).

Por lo tanto, es muy importante implementar estrategias que permitan lograr estos objetivos y reducir la pérdida, especialmente, en el almacenamiento debido a que las condiciones climáticas del país son idóneas para la proliferación de plagas en los almacenes y silos (Dubey et al., 2011). Una de las estrategias que pueden ser prometedoras para aumentar la producción y el rendimiento de los cereales involucran la disminución de pérdidas por el ataque de plagas y enfermedades y la reducción de los costos asociados a los plaguicidas (Ministerio de Agricultura, 2016).

En este orden de ideas, es necesario conservar la integridad de los granos almacenados, cuidando que factores abióticos como la temperatura y la humedad sean óptimos y, como

ya se mencionó, manteniéndolo a salvo de plagas como los insectos, que son las especies que han conseguido una mayor adaptación a las condiciones del almacén y que son los que causan los daños más cuantiosos (Dayan et al., 2009). Entre los insectos que mayores problemas generan en el almacenamiento se hallan los coleópteros (García et al., 2011; Boyer et al., 2012); por lo tanto, el control de éstos se hace prioritario, aunque desafortunadamente no es una tarea fácil, y más cuando dichos insectos tienen una tasa de reproducción relevante. Así pues, algunas especies de coleópteros se han clasificado según los daños que propician en los granos almacenados y en los productos de molienda (Prieto, 2012).

De igual manera están las especies primarias que, aunque pueden ser pocas, son capaces de dañar granos enteros y tienen gran importancia económica, como es el caso del *Sitophilus zeamais*, conocido también como el gorgojo del maíz (Talukder et al., 2009). Por otra parte, se encuentran las especies secundarias, aquellas que atacan granos partidos o que previamente han sido dañados por las primarias, las cuales se multiplican con facilidad en los productos obtenidos de la molienda de graneros. Tal es el caso de *Tribolium castaneum*; que es una plaga cosmopolita que se encuentra entre los insectos que propician mayor impacto negativo, en el procesamiento de granos e instalaciones de almacenamiento de productos alimenticios alrededor del mundo (FAO, 2016).

Existen diversos métodos para el control de este tipo de coleópteros, entre los que se destacan el control biológico, el control físico y el control químico, siendo este último el de mayor uso (Olmedo et al., 2015). El control químico se realiza mediante el uso de insecticidas sintéticos como la fosfina, el diclorvos y el bromuro de metilo. Sin embargo, dado a su uso indiscriminado a lo largo de los años, han generado graves efectos secundarios como: el desarrollo de líneas de insectos resistentes, la afectación de organismos no objetivo, pérdidas de la calidad del agua, daños a la capa de ozono y riesgos para la salud humana (Lorini et al., 2007). Es así, que desde la década de los noventa se han realizado importantes estudios en la búsqueda de nuevos agentes fitosanitarios para el uso agrícola que sean derivados del metabolismo secundario de las plantas; esto con el ánimo de reemplazar los plaguicidas sintéticos tóxicos (Dayan et al., 2009; Cantrell et al., 2012). Partiendo de este hecho, las plantas se convierten en una excelente alternativa para la búsqueda de estos nuevos agentes fitosanitarios que permitan el control de coleópteros como *T. castaneum* en los almacenes, graneros y molinos. Dicho control se puede atribuir a la coevolución que ha existido entre los insectos y las plantas a través de los años, lo que

ha generado una gran diversidad de metabolitos secundarios que les han permitido subsistir, ya sea mediante la producción de sustancias que atraigan insectos para la polinización o en la producción de sustancias que disuaden a los atacantes (Isman, 2006). Tal es el caso de los aceites esenciales (AE) que son mezclas complejas de dichos metabolitos que se caracterizan por su rápida acción neurotóxica sobre insectos, por su baja toxicidad en otros animales y, además, tienen una menor probabilidad de generar resistencia debido a que poseen distintos mecanismos de acción insecticida (Prieto, 2012).

Bajo esta óptica, el presente trabajo se planteó con el objetivo de contribuir en la búsqueda de aceites esenciales (AEs) que tengan un potencial uso, en el sector agrario de Colombia, para el control del insecto plaga *Tribolium castaneum* cuyos resultados harán parte de la investigación de un macroproyecto titulado: “Estudio para potencializar la acción fumigante sobre *Sitophilus zeamais* y *Tribolium castaneum* de sustancias derivadas de aceites esenciales y aproximación a los mecanismos de acción.”, financiado por Colciencias en convenio entre la Pontificia Universidad Javeriana y la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Por tales motivos, el trabajo está dividido en tres capítulos. El **capítulo I** describe el estado actual del tema sobre el cual se investigó. En el **capítulo II** se describe la selección de los AEs, su evaluación como sustancias con potencial actividad fumigante, la caracterización química de los constituyentes que los conforman y un agrupamiento bajo criterios de homogeneidad para facilitar su estudio, contribuyendo así a las investigaciones fitoquímicas y de actividad insecticida de las plantas utilizadas. Por último, en el **capítulo III** se aproximó a los posibles mecanismos de inhibición de la actividad catalítica de enzimas de importancia vital para el insecto como la acetilcolinesterasa, glutatión-S-transferasa y catalasa; y con esto hacer una aproximación a los mecanismos de acción, de los AEs, en la mortalidad del insecto en cuestión.

CAPÍTULO I: Estado actual del tema

El *T. castaneum* es una de las plagas más importantes que afecta a alimentos que pueden ser almacenados como es el caso de los cereales y productos de su molienda ya que genera cuantiosas pérdidas tanto a nivel nutricional como comercial. Por lo tanto, en el presente capítulo se hará un breve resumen de dichas implicaciones destacándose la necesidad de encontrar nuevas sustancias fitosanitarias para el control de dicho insecto y que replacen los insecticidas sintéticos tradicionales que tienen grandes desventajas por su inadecuada manipulación y abuso.

1.1. La importancia del almacenamiento de cereales y productos de su molienda

La agricultura es una actividad que ha permitido la pervivencia de la humanidad, de igual manera ha sido considerada como motor para su desarrollo social, político y económico. Actualmente, sigue siendo la principal fuente de recursos de los países en vía de desarrollo, ya que estos han fortalecido sus economías con la producción y comercialización de alimentos y productos derivados de estos (Dubey, et al., 2011). Sin embargo, en el planeta tierra existen limitantes para la producción de alimentos que impiden cumplir con la seguridad alimentaria del total de la población. Por un lado, están los factores asociados al clima y al cambio climático que, en las regiones frías y templadas del planeta, hacen que la producción de alimentos sea estacionaria e intermitente y, por otro lado, están los factores de índole social y económico que ocurren principalmente en las regiones tropicales que, a pesar de tener una producción de alimentos constante durante todo el año, pueden considerarse como las partes del planeta con mayores índices de pobreza y crecimiento poblacional (Augusto, et al., 2008). Por lo tanto, son consideradas como las regiones que tienen la mayor demanda de alimentos. Además, por sus características ambientales, son los lugares más propensos a que exista competencia con otras especies por los mismos recursos.

Lo anterior ha llevado a que los gobiernos alrededor del mundo traten de sobrellevar dichos problemas con planes y propuestas que propendan por la seguridad alimentaria de la población, comprendiendo este asunto como una obligación social y económica. Una

manera de materializar dichos planes ha sido la implementación de estrategias como el buen almacenamiento, que es una pieza fundamental en la producción de los alimentos ya que con este se garantiza su conservación y posterior uso. Un caso particular es el de los cereales y los productos derivados de su molienda (harinas) que son una fuente económica e importante de nutrientes que, además, poseen la enorme ventaja de que no pierden sus cualidades durante dicho periodo (García, et al., 2007).

Colombia se ha caracterizado por ser productor de cereales, especialmente de arroz y maíz con un 60%, y 36,8%, de la producción total. De igual manera se producen, aunque en menor proporción, el sorgo, el trigo y la cebada con 2.4, 0.7 y 0.2%. (FENALCE, 2018). No obstante, un amplio margen de esta producción se pierde por condiciones ineficientes de almacenamiento ya que hacerlo requiere de grandes esfuerzos, tanto técnicos como financieros, que no dependen exclusivamente del agricultor, sino de todos los eslabones que hacen parte de la cadena de su producción y comercialización; debido a que se debe evitar, en cualquier momento, que se pierda el carácter comercial, el aspecto estético y el valor nutricional de dichos alimentos (Hernández, 1998). Por consiguiente, en el almacenamiento deben primar unas condiciones generales que le permita a los cereales y harinas mantenerse protegidos. Para hacerlo, existen diferentes maneras como los son el **almacenamiento en sacos** que, como su nombre lo indica, es cuando el producto se almacena en bolsas fabricadas, usualmente, de fibras naturales como el fique, papel o de materiales sintéticos como la tela. Dichos empaques, aunque puedan ser económicos, no brindan una protección adecuada contra la humedad y algunas plagas pueden atravesarlos fácilmente.

Por otro lado, está el **almacenamiento al granel**, que se caracteriza por ser mecanizable y facilita la manipulación y control de los productos que se almacenan. Sin embargo, se requieren de amplios espacios para su implementación y la posibilidad de ataques o proliferación de roedores aumenta. Del mismo modo está el **almacenamiento hermético** que, de los métodos expuestos, es el que garantiza mejores resultados por la protección que brinda a los cereales y productos de molienda ya que evita el intercambio de agua y aire con el medio exterior. En este caso se aprovecha que, en la respiración del grano, harina u otros seres vivos, se consume todo el oxígeno presente dentro del contenedor, lo que causa, primero, la muerte de posibles plagas y segundo, que la actividad metabólica de dichos alimentos se reduzca; conllevando a que perduren por más tiempo que en otras

condiciones de almacenamiento. No obstante implementar este tipo de tecnologías es costoso y requiere de altos requerimientos tanto humanos como técnicos (García et al., 2007).

1.2. Pérdidas de los cereales como productos almacenados

El almacenamiento es la actividad de concentrar la producción de un cereal (o sus harinas) en lugares estratégicamente seleccionados, que cuentan con las condiciones físicas y ambientales pertinentes para la preservación del producto, de igual manera es el lugar en el que reposan dichos alimentos mientras se comercializan. Sin embargo, estos son material biológico que, bajo condiciones ambientales favorables, tienden a aumentar su actividad metabólica, como la respiración, que es el principal fenómeno responsable de su deterioro (FAO, 2016b). De igual manera, dichos productos se comportan como un ecosistema, donde interactúan varios factores que favorecen la proliferación de seres vivos como hongos y bacterias, que pueden generar la pérdida del vigor de las semillas, la pérdida de su capacidad de panificación, el incremento de la acidez, su endurecimiento entre otros problemas (Tripathi, Upadhyay, Bhuiyan, & Bhattacharya, 2009).

Las anteriores características han hecho que alimentos como cereales y productos de su molienda se vean afectados en toda su producción. No obstante, como se puede apreciar en la **Figura 1.1**, es en el almacenamiento donde se originan las mayores pérdidas por problemas referentes a aspectos biológicos y de conservación del producto (FAO, 2016b).

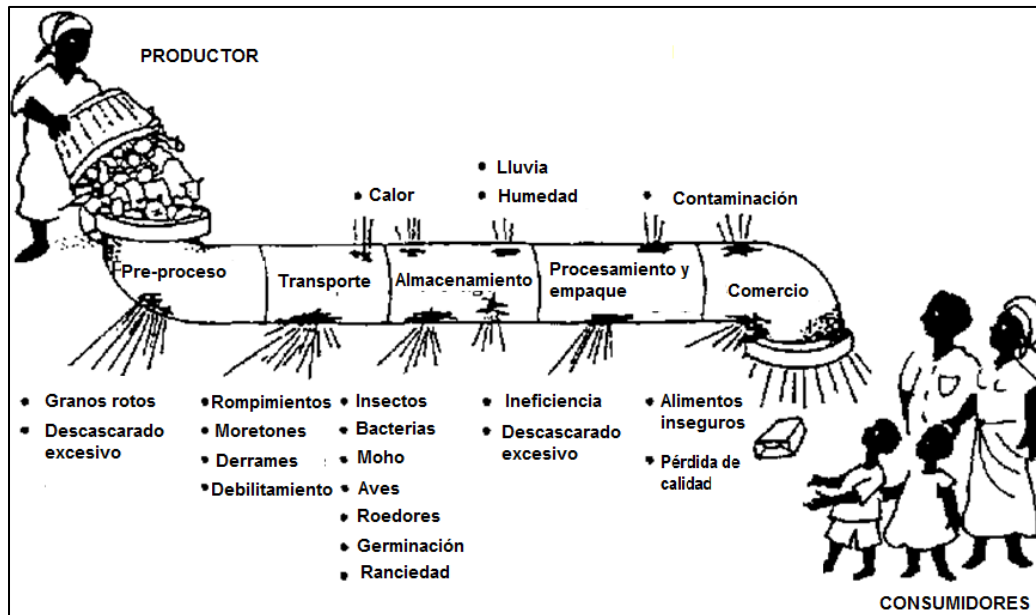


Figura 1.1. "La tubería del alimento" que muestra las diferentes pérdidas que sufren los alimentos en su cadena de producción. Tomada de: <http://www.fao.org/3/AC301S/ac301s03.htm>

Estas pérdidas se acentúan en países tropicales donde el 25 % de los cereales poscosecha se pierden a causa de la manipulación inadecuada, deterioro y plagas (FAO, 2017). Colombia no es ajena a esta situación, dado que anualmente se están perdiendo 9.76 millones de toneladas de alimentos, que equivalen a un 34 % de la producción total (28.5 millones de toneladas). Estos valores indican, grosso modo, que por cada 3 toneladas de producción de alimento se pierde o se desperdicia una tonelada (Departamento General de Planeación (DNP), 2016). De igual manera, la **Figura 1.2** muestra que en el almacenamiento y poscosecha se pierden casi un 20 % de los alimentos producidos, con un total de 1.93 millones de toneladas.

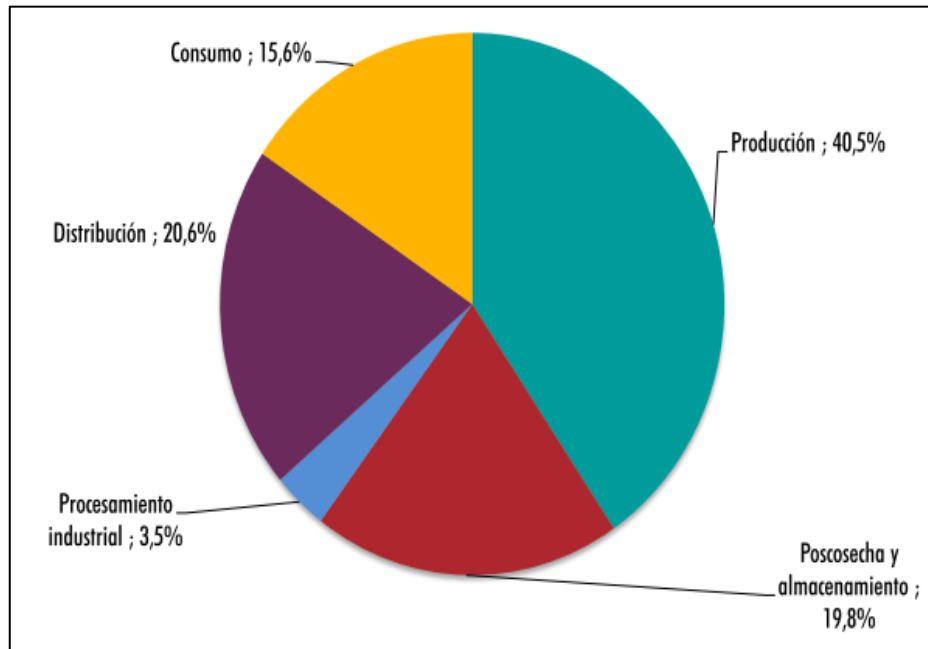


Figura 1.2. Distribución de pérdida y desperdicio por eslabón de la cadena alimentaria. Tomada de: https://mrv.dnp.gov.co/Documentos%20de%20Interes/Perdida_y_Desperdicio_de_Alimentos_en_colombia.pdf

Bajo esta misma tendencia se pueden apreciar las pérdidas por grupos de alimentos, ya que, de las 9.76 millones de toneladas perdidas y desperdiciadas, 772.000 corresponden a cereales (Departamento General de Planeación (DNP), 2016). No obstante, existe un agravante para estas pérdidas y es que Colombia no alcanza a satisfacer, con su producción interna, el consumo de algunos cereales representativos como el maíz amarillo, el trigo y la cebada; que para el año 2018 fueron de 521.347, 162.171 y 3.375 toneladas, respectivamente (FENALCE, 2018)

Lo que conlleva a que se estén importando dichos alimentos para satisfacer la demanda nacional tal y como se aprecia en la **Figura 1.3**. También, en dicha gráfica se aprecia, que las pérdidas en este reglón de la economía son altísimas, lo que permite inferir que se están perdiendo alimentos importados. Este tipo de situaciones se reflejan directamente en la parte económica ya que se está teniendo un sobrecosto para al país, debido a que una gran parte de los cereales no los está consumiendo la población nacional (Departamento General de Planeación (DNP), 2016).

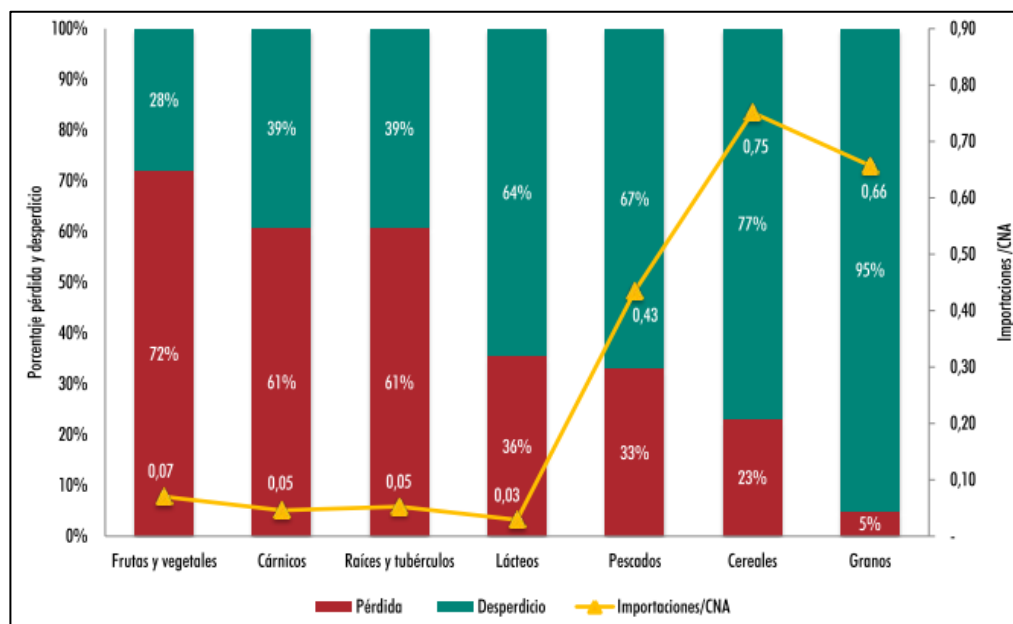


Figura 1.3. Participación de pérdida y desperdicio vs. participación de importaciones por grupos de alimentos. Tomado de: https://mrv.dnp.gov.co/Documentos%20de%20Interes/Perdida_y_Desperdicio_de_Alimentos_en_colombia.pdf

Por otro lado, es importante destacar el descenso que ha tenido el área de siembra de cereales en los últimos años. Solo entre el año 2016 y 2017 se pasó de 230.011 a 202.000 km² observándose una reducción del 11 %. Esta tendencia se sigue evidenciando en el año 2018 especialmente con los cereales que se denominan “menores” como es el caso del sorgo, el trigo y la cebada que tuvieron reducciones entre el 17 y el 60 % (FENALCE, 2017). Las anteriores cifras demuestran la importancia de preservar, tanto en cantidad como en calidad, los cereales que se producen en el país para evitar primero pérdidas económicas y segundo para garantizar la alimentación de la nación.

1.3. Las plagas como principales responsables de las pérdidas en los productos almacenados.

Como se mencionó anteriormente una gran parte de las pérdidas en la cadena de producción de alimentos se da por la proliferación de organismos vivos durante el periodo de almacenamiento. Por tal razón, una de las principales preocupaciones de los productores a la hora de conservar dichos alimentos, está en controlar la presencia de organismos plagas, ya que estos son las causantes del mayor índice de deterioro y pérdida (Augusto, et al., 2008). Se sabe que las principales plagas que pueden afectar los productos almacenados son los hongos, roedores, aves e insectos (FAO, 2017). En la **Figura 1.4** se

puede apreciar que estos últimos son los responsables de pérdidas de hasta el 20 % de la producción total de cereales, como es el caso del maíz que es un alimento base para la alimentación de un alto porcentaje de la población nacional y que es muy representativo de la idiosincrasia latinoamericana (García & Bergvinson, 2007).

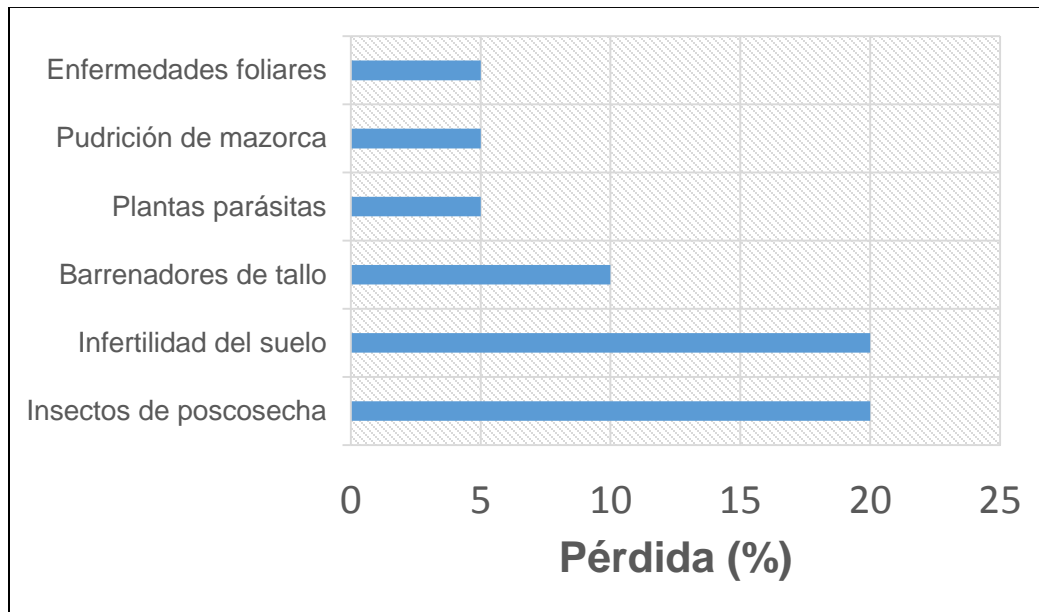


Figura 1.4. Principales factores bióticos y abióticos que afectan la producción y almacenamiento de maíz a nivel mundial. Tomado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0568-25172007000200008

Así pues, existen más de mil especies de insectos que infestan los productos almacenados en todo el mundo, estos pertenecen a órdenes muy diversos. Sin embargo, aquellos que han conseguido una mayor adaptación a las condiciones del almacén y que además causan cuantiosos daños, son los que pertenecen al orden Coleóptera, quienes a su vez son los que generan mayores problemáticas por infestación, demandando grandes esfuerzos en la búsqueda de alternativas para su control. Lo cual no ha sido una tarea fácil dado que dichos insectos se caracterizan por ser pequeños, atacan los granos o harinas en cualquiera de sus etapas de desarrollo, se alojan en grietas muy reducidas y en sitios oscuros, tienen una elevada capacidad de reproducción y, por lo tanto, pocos de ellos pueden formar una población considerable en muy poco tiempo (Caballero, et al., 2014).

Los coleópteros en su mayoría presentan cuatro estadios principales en su desarrollo estos son: huevo, larva, pupa y adulto (Triplehorn & Johnson, 2005). Los mencionados estadios

de desarrollo del insecto se conocen como metamorfosis y según en la etapa en la que se encuentren afectan de manera distintita los productos almacenados. De ahí que, en el estado de huevo y pupa los insectos son generalmente difíciles de controlar, porque están inactivos, no se están alimentando, se encuentran inmóviles y frecuentemente se localizan en lugares de difícil acceso como hendiduras. En los otros estadios de la metamorfosis, como son la larva, los insectos son pequeños, están activos y son vulnerables, por lo tanto, es la fase en la que se puede ejercer un mayor y mejor control. Finalmente, cuando los insectos se encuentran en la última fase, es decir adulto, debido a su tamaño, son fáciles de ver y es cuando causan mayor daño; son más resistentes a los insecticidas y podrían haber ya depositado huevos para producir una nueva generación.

Por otro lado, cabe destacar que algunas especies de coleópteros se han clasificado según los daños que propician en los alimentos almacenados, pueden ser especies primarias, que, aunque puedan ser pocas, son capaces de dañar granos enteros y tienen gran importancia económica. Ejemplo de este tipo de plagas es *Sitophilus zeamais* conocido también como el gorgojo del maíz. Las especies secundarias, son aquellas que atacan granos partidos o que previamente han sido dañados por las primarias y se multiplican con facilidad en los productos obtenidos de la molienda de graneros. Tal es el caso del *Tribolium castaneum*. Este insecto es una plaga cosmopolita y está entre las plagas de insectos más importantes de procesamiento de granos y otras instalaciones de almacenamiento alrededor del mundo (Bingham, et al., 2017).

1.3.1 *Tribolium castaneum* como plaga en los productos almacenados

Tribolium castaneum, conocido comúnmente como como el gorgojo rojo de la harina, es un insecto, perteneciente a la orden coleóptera. Dicho insecto en su fase adulta es delgado y mide de 3 a 4 mm de largo; es de un color que va de rojizo castaño a marrón negruzco cuyo ciclo de vida puede durar unas siete semanas. Dicho insecto se puede identificar, de otras especies del mismo género, por los últimos tres segmentos antenales, ya que estos son proporcionalmente más anchos y mejor definidos que los anteriores tal y como se puede observar en la **Figura 1.5**. La hembra pone de 300 a 500 huevos en el exterior de los productos que infestan y su desarrollo completo necesita 30 a 35 días en condiciones favorables como lo son una temperatura de 30 ± 2 °C y 60 ± 3 % de humedad relativa (HR) (Devi & Devi, 2015).



Figura 1.5. Fotografía del *T. castaneum*. Tomado de: <http://coleoptera.org.uk/node/21993>

Este escarabajo es holometábolo, por lo tanto, posee varias fases en su ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto, tal y como se muestra en la **Figura 1.6**. Los huevos recién puestos son pequeños y eclosionan en un periodo de 5 a 12 días; son blanquecinos y con frecuencia tienen trozos de harina pegados a su superficie haciéndolos difíciles de ver. En su fase de larva es de color blanco cremoso hasta tornarse amarillo marrón, y generalmente miden 10 mm de longitud en su último instar el cual está completamente maduro aproximadamente en 30 días (Devi & Devi, 2015).

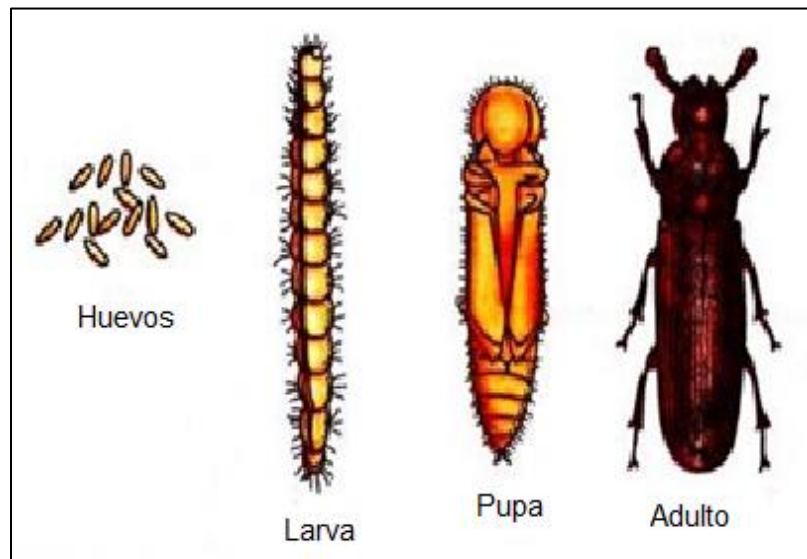


Figura 1.6. Diferentes estadios del ciclo de vida del *T. castaneum*. Tomado de: <http://www.notesonzoology.com/pest-management/12-major-insect-pests-occurring-in-india/10>

T. castaneum se puede reproducir muy fácilmente en instalaciones de procesamiento de alimentos, como molinos, plantas de manufactura y almacenes ya que se puede alimentar de cereales, harinas e incluso de granos rotos y deteriorados (Bingham, et al, 2017). Por tales razones, la infestación por *T. castaneum*, es una de las principales causas de la pérdida de cereales y de otros productos durante el almacenamiento, causando una pérdida cuantitativa de aproximadamente 20 a 30% (Rajendran, 2002).

No obstante, *T. castaneum* puede atacar un amplio espectro de otros productos como galletas, frijoles, especias, pastas, mezclas para pasteles, alimentos secos para mascotas, flores secas, chocolate y nueces lo que provoca terribles pérdidas económicas en varios renglones de la economía. De ahí que sea considerado una plaga devastadora de productos almacenados principalmente, en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, lugares privilegiados para su adaptabilidad (Abou-Taleb, et al., 2016; Hu, et al., 2019). Es importante destacar, que ésta se considera una plaga secundaria, que requiere una infestación previa por plagas primarias. Además, las larvas y los adultos se alimentan de polvo de grano y grano roto, y no de los granos enteros o no dañados y pasan todo el ciclo de vida fuera de los granos (Karunakaran, et al., 2004; Devi y Devi, 2015).

Entre otras características que hacen a dicho insecto una plaga importante, está su capacidad de volar lo que le permite proliferar fácilmente en otros ecosistemas donde las condiciones sean favorables y ser considerada como cosmopolita. De igual manera, su comportamiento caníbal hace que pueda resistir prolongados tiempos de inanición (Sreeramaju, et al., 2016). Otro fenómeno que se presenta en los lugares de infestación es la presencia de otros organismos como hongos y bacterias. De igual manera genera olores y colores desagradables en los productos debido a la secreción de benzoquinonas por las glándulas abdominales y a la gran cantidad de exuvias que libera en su metamorfosis (Rees, 2004). Además, *T. castaneum* tiene una tasa de reproducción muy alta, lo que conlleva a producir infestaciones severas en poco tiempo, haciendo que productos como las harinas se vuelvan grisáceas y con olor acre. Siendo estas últimas características organolépticas desagradables y no aptas para el consumo humano. (Prakash et al., 1987).

Otro aspecto importante de referenciar de *T. castaneum* es que éste es uno de los insectos plagas de mayor resistencia ante la implementación de diferentes insecticidas, utilizados actualmente para su control. Lo anteriormente expuesto, se logra evidenciar ya que en estudios recientes, se ha reportado que dicho insecto es inmune a aproximadamente a 33 insecticidas entre los que se destacan el malatión y la fosfina (Talukder, 2009). Por esta

razón se ha optado el control químico con altas concentraciones de insecticidas, que aumentan la contaminación y los riesgos para la salud humana, por tanto, se deben buscar nuevas alternativas que favorezcan un manejo integrado de esta plagas (Ringuelet, et al., 2014).

1.4. Métodos de control de *T. castaneum*

Desde el momento en que se comenzaron a almacenar los cereales, los seres humanos idearon estrategias para el control de los insectos y otras plagas, tal es el caso de los egipcios, que desde hace 4500 años ya usaban técnicas para su conservación (Bolívar, 2007). Aun cuando en muchas zonas del planeta se continúan implementando técnicas artesanales como las usadas por los egipcios; en la actualidad dichas técnicas han evolucionado y han derivado en la búsqueda de nuevas y mejores maneras para el control de plagas y con esto reducir el uso de sustancias químicas, que generan problemáticas ambientales. Dicha búsqueda ha permitido el desarrollo de un manejo integral de plagas (MIP) el cual permite destacar varios tipos de control para *T. castaneum*, como los métodos artesanales, mecánicos, físicos, biológicos y feromonas (ICA, 2009).

1.4.1. Métodos artesanales o culturales

Son métodos de fácil ejecución y se fundamentan principalmente en la deshidratación de los productos a tratar. Pese a esto, son los que tienen peores resultados en cuanto al control del insecto se refiere. Entre estos métodos se puede nombrar **1)** la exposición al sol que consiste en reducir la humedad de los granos colocándolos sobre superficies limpias y cementadas, aun así, no se controlan huevecillos y larvas que permanecen en el interior de los granos o semillas. **2)** mezclas con arena o ceniza que controle la presencia del insecto, generando también su muerte por asfixia. **3)** Ahumado donde se utiliza el humo y el calor para repeler los insectos que puedan presentarse (Hernández & Carballo, 2018).

1.4.2. Control mecánico

Son métodos que tienen amplia aceptación, ya que son amigables con el medio ambiente. A pesar de ello, este tipo de control es utilizado en áreas reducidas o en situaciones muy específicas (Navarro, 2014). En particular, contra el *T. castaneum*, se tienen barreras físicas como mallas o cedazos. De igual manera, se tienen medidas de protección como la reducción manual de semillas partidas en el endospermo y polvo de los granos (que son las fuentes de alimento predilectas del insecto), además de remover el insecto del producto infestado con limpiadoras o manualmente (Patiño, 2017).

1.4.3. Control físico

Estos métodos se caracterizan por controlar variables de tipo físicos o abióticos que son indispensables para el desarrollo y vida de los insectos que atacan los productos almacenados. No obstante, este método acarrea altos costos económicos y requieren grandes inversiones tanto en personal especializado - tecnificado como en infraestructura. Entre los factores físicos que se utilizan para el control de *T. castaneum* está **1) Controlar la temperatura:** es recomendable mantener los productos almacenados a una temperatura máxima de 15 °C ya que por debajo de esta el insecto no se pueden desarrollar – reproducir o, por el contrario, mantenerlos a una temperatura mayor a los 60°C ya que a las temperaturas elevadas se reducen su supervivencia y ovoposición (Navarro, 2014). **2) Controlar la humedad:** La humedad relativa óptima para el desarrollo del *T. castaneum* está entre el 60-90%. Controlar dicho parámetro permitirá que el insecto no se desarrolle del (FAO, 2016b). **3) Controlar el ambiente.** El uso de gases inertes y atmosferas controladas para provocar la muerte del insecto, pese a esto, la aplicación de gases tales como el dióxido de carbono o el nitrógeno son muy costosos; requieren de instalaciones herméticas, provisión de gas, etc., factores que hacen engorrosa su implementación (Patiño, 2017). **4) Implementar tierra de diatomeas:** Las diatomeas son antiquísimas y microscópicas algas, huecas y con carga eléctrica negativa que perforan los cuerpos queratinizados de los insectos de sangre fría, los cuales mueren por deshidratación (Prieto, 2012). **5) Uso de ozono:** se ha determinado que el ozono puede eliminar al *T. castaneum* en bajas dosis sin dañar la calidad de los granos o los alimentos tratados y además no daña el medio ambiente (Abdelghaffar, Garamoon, & Gad, 2017). **6) Uso de radiación electromagnética:** los distintos tipos de radiación permiten dar solución al problema de

plagas, por ejemplo, las microondas calientan el agua de los materiales que irradian, los insectos al tener mayor contenido de agua se ven perjudicados en mayor medida que los granos. Las radiaciones UV y visible afectan la visión de los insectos y además éstas son usadas como trampas cromáticas. Su elevado costo y peligrosidad son las principales limitantes de este método de control. Los rayos X, α , β y γ son radiaciones que tiene la facultad de ionizar tejidos. Los rayos γ han sido utilizados ampliamente para el control de plagas, pues provocan daños irreparables en el ADN y en los fosfolípidos de la membrana célula (Hallman, 2013).

1.4.4. Control biológico

El control biológico es realizado por los predadores o parásitos naturales de las plagas que afectan los productos almacenados (Navarro, 2014). Éste se caracteriza por no generar ningún tipo de efecto nocivo colateral hacia otros organismos, como tampoco se conocen casos de resistencia en su manejo. No obstante, dichos enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual no proveen una supresión inmediata y puede que en muchos casos no se cuente con organismos que cumplan dicha función de control (González, et al., 2009).

Investigaciones sobre el control biológico de plagas de almacén, han dado cuenta de la presencia de algunos agentes potenciales que pueden controlar eficientemente al *T. castaneum* como es el caso de *Adelina castana*, *A. palori*, *A. picei* que son parásitos protozoarios (González et al., 2009). De igual manera, existen reportes de control biológico del insecto utilizando hongos entomopatógenos como el hongo *Beauveria bassiana* (Pedrini, et al., 2010) y el parásito *Theocolax elegans* que han sido empleados para controlar diferentes plagas de almacén (Prieto, 2012). Otros reportes hablan de organismos depredadores que son ampliamente utilizados en control de plagas de almacén, entre ellos el *T. castaneum*, destacándose la *Cephalonomia tarsalis*, *Teretriosa nigrescens* y *Xolocoris flavipes*

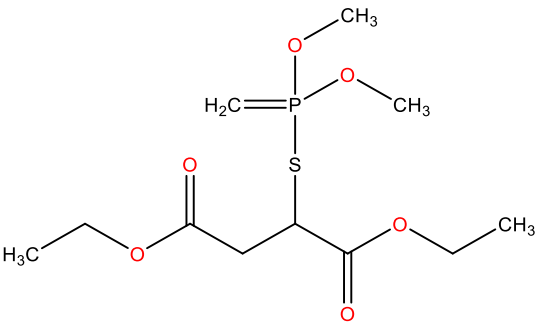
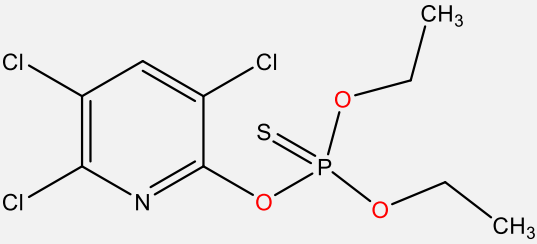
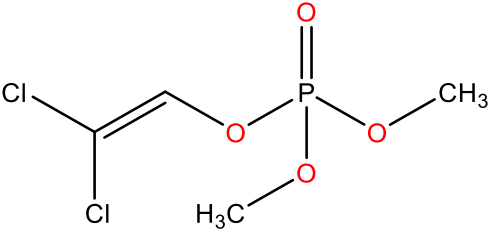
1.4.5. Interrupción del apareamiento.

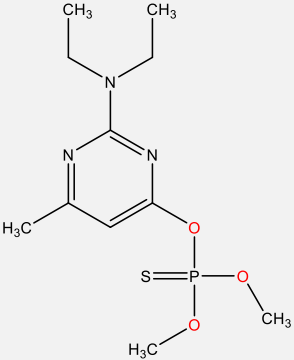
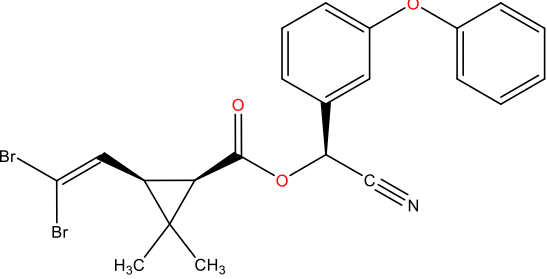
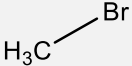
Este método se caracteriza por el uso de feromonas que evitan a los insectos machos encontrar hembras para aparearse. Las feromonas sexuales, son químicos liberados por un insecto hembra, para atraer machos (Navarro, 2014). El uso más extendido para las feromonas es en trampas ya que el insecto es atraído a papel corrugado previamente tratado con insecticidas. No obstante, existen también cámaras o recipientes cuyo diseño varía en función de la especie considerada. Dichas trampas también pueden estar sobre el producto almacenado o en el suelo, que al ser penetradas por los insectos estos mueren en su interior (Prieto, 2012). Para el caso de *T. castaneum* se tienen en el mercado productos comerciales de compañías como Econex® que es una compañía especializada en el biocontrol con feromonas y trampas.

1.4.6. Control químico.

En el almacenamiento se siguen utilizando los productos sintéticos para el control de insectos plaga como *T. castaneum* debido a que, en países en vía de desarrollo como Colombia, los métodos de control físicos y biológicos son poco utilizados ya que la gran mayoría de los productores carecen de los recursos para poder implementarlos. Además, los insecticidas sintéticos se han caracterizado por ofrecer alternativas rápidas y económicas para la protección de los alimentos (FAO, 2012). El amplio espectro de sustancias que se han utilizado para el control de plagas de almacén se puede agrupar gracias a sus características principales entre las que se destacan: **1)** Por sus modos de ingreso al insecto (Ingestión, inhalación o contacto). **2)** Por su toxicidad aguda (de extremadamente peligrosos a ligeramente peligrosos). **3)** Por su vida media (de no persistentes a permanentes). **3)** Por su estructura química (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, inorgánicos entre otros) y **4)** por sus mecanismos de acción (inhibición del sistema nervioso, inhibición del crecimiento y desarrollo, inhibición de la respiración, acción sobre el sistema digestivo y con mecanismos no especificados) (Ramírez & Lacasaña, 2001; IRAC, 2019). Algunos de los insecticidas más utilizados actualmente para el control de *T. castaneum* se muestran en la **Tabla 1.1**.

Tabla 1.1. Insecticidas utilizados para el control de *T. castaneum* y sus mecanismos de acción (Ramírez & Lacasaña, 2001; IRAC, 2019)

Nombre	Clasificación y estructura química	Modo de ingreso	mecanismo de acción	Toxicidad
Fosfina	Fosfuro PH ₃	Inhalación	Inhibidores del transporte de electrones.	Muy tóxico
Mercaptotion (Malatión)	Organofosforado 	Contacto, ingestión e inhalación	Inhibidores de la acetilcolinesterasa.	Muy tóxico
Clorpirifós	Organofosforado 	Contacto, ingestión e inhalación	Inhibidores de la acetilcolinesterasa.	Nocivo
Dichlorvos (DDVP)	Organofosforado 	Contacto, ingestión e inhalación	Inhibidores de la acetilcolinesterasa.	Muy tóxico
Pirimifós-metil	Organofosforado	contacto, ingestión e inhalación	Inhibidores de la acetilcolinesterasa.	Nocivo

				
Deltametrina	<p style="text-align: center;">Piretroide</p> 	<p style="text-align: center;">Contacto e ingestión.</p>	<p style="text-align: center;">Actúa sobre el sistema nervioso de los insectos, produciendo inactividad de movimientos.</p>	<p style="text-align: center;">Cuidado</p>
Bromuro de metilo	<p style="text-align: center;">Halogenuro de alquilo</p> 	<p style="text-align: center;">Inhalación</p>	<p style="text-align: center;">Bloquea procesos relacionados con la producción de ATP y otras reservas energéticas.</p>	<p style="text-align: center;">nocivo</p>

Sin embargo, el uso indiscriminado de dichas sustancias han generado graves efectos secundarios entre los que sobresalen la afectación a organismos no objetivo (aves, peces mamíferos y otros insectos), aumento de residuos tóxicos en los alimentos tratados, pérdidas en la calidad de agua y suelo lo que ha conllevado no solo a trastornos en la salud humana sino también afectaciones en los ecosistemas; como es el caso del bromuro de metilo que se está prohibiendo en diferentes países debido a sus efectos nocivos sobre la capa de ozono (Abdelgaleil et al., 2012; Olmedo et al., 2015). De igual manera, el uso de insecticidas sintéticos ha provocado otro serio problema y es la generación de líneas resistentes de *T. castaneum*. Tal es el caso para 33 insecticidas entre los que se encuentran los mostrados en la Tabla 1.1 y también BHC/ciclodienos, bioresmetrina, carbaril, clorpirifós, metil-clorpirifós, cianofos, ciflutrina, cihalotrina, cipermetrina, DDT, diazinón, 1,2-dibromoetano, fenitrotión, lindano, malatión, permetrina, fenotrina, phoxim,

promecarb, propoxur, spinosad, fluoruro de sulfurilo, temefos, tetraclorvinfos, (APRD, 2007).

1.4.7. Control con insecticidas botánicos

Los recurrentes problemas derivados del uso indiscriminado de insecticidas sintéticos han hecho que diferentes organismos internacionales como la FAO, la FDA y nacionales como el ICA, FENALCE y FEDECACAO recomienden que se mitigue el uso de dichas sustancias; sobre todo con el ánimo de promover un manejo integrado de plagas (MIP) y una agricultura sostenible. De igual manera, estas instituciones han venido promoviendo investigaciones para encontrar nuevas alternativas para reducir los efectos dañinos de plagas y enfermedades que afectan productos agrícolas sin que se alteren los ecosistemas (Upadhyay, et al., 2018; Abou-taleb, et al., 2015). Bajo esta panorámica, las plantas son una opción viable para encontrar estas alternativas ya que son una fuente promisoría de metabolitos especializados que pueden tener diversas actividades biológicas que la planta utiliza, en muchos casos, para su defensa. Lo que ha conllevado, en los últimos 20 años, a un aumento vertiginoso en la creación de insecticidas creados a partir de productos naturales derivados de plantas (Cantrell, et al., 2012; Boyer, et al., 2012).

Los insecticidas botánicos se consideran útiles porque tienen características opuestas a los sintéticos, es decir, son muy específicos para una plaga (selectividad), son más biodegradables, reducen la peligrosidad para el consumidor de los productos que se tratan y, también, reducen la probabilidad de generar resistencia (Cantrell, et al., 2012). Entre los insecticidas botánicos que están disponibles comercialmente para control de plagas de productos almacenados, entre ellos el *T. castaneum*, se destacan: **1) Productos derivados de la azadiractina.** Estos son obtenidos de las semillas del árbol del Neem (*Azadirachtina indica*) del cual pueden obtenerse diversos tipos de extractos. Sin embargo, para el caso del *T. castaneum* es el extracto que contiene el triterpeno azadiractina y sus análogos los que tienen mayores efectos insecticidas (Nassetta, et al., 1997) **2) Productos derivados de piretrinas.** Son uno de los insecticidas de uso doméstico más antiguos y tiene efectos *knockdown* en los insectos cuyo modo de acción es tanto por contacto como por ingestión. Se deriva de semillas o las flores de crisantemo, *Chrysanthemum cinerariaefolium* y tiene un amplio rango de actividad contra los escarabajos de productos almacenados. Pese a esto, tiene una actividad residual muy corta ya que se degrada rápidamente bajo la luz

solar, el aire y la humedad, por lo que requiere aplicaciones frecuentes (Singh, 2017). **3) productos derivados de la nicotina.** Se obtienen de *Nicotiana tabacum* y la mayoría de las plagas de productos almacenados se ven afectados ya que inhibe el sistema nervioso imitando la acetilcolina (ACh). Sin embargo, es uno de los químicos más tóxicos entre los insecticidas botánicos debido a la alta toxicidad en mamíferos (Dayan, et al., 2009). **4) Productos derivados de avermectinas.** Las avermectinas son un grupo de lactonas macrocíclicas de 16 miembros resultantes de la fermentación del suelo por un hongo (*Streptomyces avermitilis*). Su modo de acción en insectos es bloquear el neurotransmisor GABA, lo que detiene la alimentación y la ovoposición. Aun así, se ha descrito la aparición de resistencias al uso de avermectinas, lo cual sugiere que se use con moderación (Clark, et al., 1994) **5) Productos derivados de spinosads.** Se utiliza principalmente para los escarabajos que se alimentan de las hojas de cereales. Su modo de acción es bloquear la ACh en los receptores nicotínicos (Singh, 2017). **6) Productos derivados de rotenona.** Se derivan de las raíces de dos plantas leguminosas (*Lonchocarpus* sp. y *Derris* sp.) y tienen actividad insecticida en un amplio espectro de gorgojos, entre ellos *T. castaneum*. Estos compuestos presentan toxicidad moderada en mamíferos, mientras que toxicidad extrema en peces, además, tienden a ser más tóxicos para los mamíferos que el malatión (Pérez, 2012).

1.4.7.1. Aceites esenciales (AEs)

Entre los insecticidas botánicos existe otro grupo bastante amplio y es el constituido por los aceites esenciales (AEs). Estos se derivan de plantas aromáticas que, en el transcurso de la evolución, han desarrollado defensas del tipo químico que les ha permitido defenderse de toda clase de insectos (Regnault, 1997). En la actualidad, el mercado de AEs ha tenido el mayor crecimiento en comparación al resto de los pesticidas botánicos. Esto debido a su generalizado uso en distintas industrias (cosmética, farmacéutica, entre otras) que han aumentado la confianza en su seguridad. (Regnault, et al., 2012).

Los AEs están compuestos generalmente por mezclas complejas de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos, los cuales se caracterizan por su acción neurotóxica sobre insectos y por la baja toxicidad para mamíferos y otras especies. Dicho efecto tóxico está directamente relacionado por los metabolitos especializados (secundarios) que los componen y además por las propiedades físicas que poseen (Prieto, 2012; Patiño, 2017;

Campolo, et al., 2018). Con base en esto, los AEs pueden ser tóxicos para el insecto mediante cuatro vías: **1) Inhalación:** Provocada por su riqueza en compuestos volátiles; **2) Contacto:** Los insectos mueren como consecuencia de la formación de una película impermeable, provocando la asfixia del insecto; **3) Absorción:** Debido a su carácter lipofílico son absorbidos en la cutícula de los insectos; **4) Ingestión:** Los insectos sufren intoxicación tras ingerir alimento impregnado con el aceite (Isman, 2000). Además, existen amplios reportes en donde se evidencia que los AEs y sus componentes principales poseen una actividad insecticida prometedora con algunas ventajas frente a otros insecticidas, como son la baja toxicidad para los mamíferos, la biodegradación y la disponibilidad en los países en desarrollo (El-bakry, et al., 2016).

De igual manera, los AEs y sus compuestos como α -pineno, eugenol, limoneno, terpinol, citronelol, citronelal, alcanfor, 1,8-cineol y timol se caracterizan por su rápida acción tóxica sobre insectos (Pérez, 2012). Dicha acción se da por varios mecanismos al interior del insecto, entre los que se han podido estudiar están **1)** La interferencia con el neuromodulador octopamina **2)** el bloqueo de los canales del ácido gamma-aminobutírico (GABA) **3)** inhibición de acetilcolinesterasa, **4)** bloqueo de canales iónicos. **5)** inhibición de la cadena transportadora de electrones **6)** inhibición de la actividad catalítica de enzimas desintoxicadoras (Tripathi, et al., 2009; Pavela & Benelli, 2016). De la misma manera se ha establecido que los AEs tienen actividades sinérgicas que pueden afectar dichos mecanismos de importancia vital en el insecto de manera simultánea, lo que favorece a prevenir la resistencia en cualquiera de sus tipos (Prieto, 2012).

Otra ventaja que presentan los AEs es su gran potencial para convertirse en una nueva alternativa económica para la población rural de Colombia. Ya que, aunque el país es rico en especies de plantas aromáticas, tiene que importar todo tipo de fragancias y AEs. Por lo tanto, la producción y comercialización de los AE puede llegar a ser un nuevo renglón en una industria que, aunque incipiente ya tiene participación de algunas regiones colombianas (Stashenko, 2009), Por ejemplo, para el año 2016, los principales productores de plantas aromáticas medicinales condimentarias y afines fueron los departamentos de Antioquia y Cundinamarca con una participación del 21% cada uno. Cabe destacarse que este mercado está en un latente ascenso debido a que las personas, en los últimos años, han tomado muy en serio el hecho de utilizar nuevas alternativas botánicas y homeopáticas para

distintos tratamientos contra enfermedades y el sector agrícola. Esto se evidencia con el aumento en el área de siembra de especies aromáticas que, para el periodo comprendido entre los años 2012 y 2016, tuvo un crecimiento del 18 %. Siendo Cundinamarca uno de los mayores focos de producción con un total de 516 hectáreas sembradas y 3690 toneladas producidas para el año 2016.

Es importante destacar que Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad del mundo en cuanto a plantas aromáticas se refiere ya que posee un estimado de 400 especies. Muchas de estas especies son introducidas y han tenido una excelente adaptación a las condiciones de cultivo, tanto en invernadero como en campo, como es el caso de la albahaca, la menta, el cebollín el orégano, el tomillo, el laurel y el romero. Estas especies se exportan principalmente a países como Estados Unidos, Canadá e Inglaterra; no obstante, aunque estos países compran un aproximado de 188 millones de dólares anuales, Colombia solo tiene una participación del 1% del mercado global de las especies aromáticas. Por lo que se hace indispensable acogerse a políticas como “Colombia Siembra” del Ministerio de Agricultura que están enfocadas en aumentar la oferta nacional de productos agrícolas que, de forma competitiva y sostenible, se incremente su área de siembra y producción ([Ministerio de agricultura, 2016](#)).

1.4.8. Resistencia en los insectos

Sin duda alguna, una de las consecuencias más grandes del uso excesivo de insecticidas sintéticos es la generación de resistencia. Esta se define como un cambio heredable en la sensibilidad que posee una plaga y que se refleja en los repetidos fallos de un producto (insecticida) para alcanzar los niveles de control esperados al ser usado de acuerdo con las recomendaciones de la etiqueta ([IRAC, 2019](#)). Actualmente, se ha reportado que más de 500 especies de insectos entre los que destacan plagas de almacén como el *T. castaneum* han generado algún tipo de resistencia a estos compuestos ([Talukder, 2009](#)). La resistencia a los insecticidas es un cambio genético en respuesta a la presión de selección de tóxicos que impiden el control de plagas en el campo ([Trdan, 2016](#)). Por lo tanto, no ocurre a menos que ocurra un cambio genético estructural que sea hereditario.

Entre los diferentes mecanismos sobresalen cuatro tipos ([Pérez, 2012](#); [FAO, 2012](#); [IRAC, 2019](#)): **1) Resistencia por comportamiento**. En la que el insecto evita el contacto con el

insecticida, esta se presenta en especies muy hiperactivas y es un indicador de la preferencia para descansar en áreas no tratadas. **2) Resistencia morfológica.** En este mecanismo se forman estructuras cuticulares o tejidos que no permiten que el insecticida penetre la cutícula del insecto, la velocidad de penetración dependerá de las características moleculares del insecticida y de las propiedades del integumento del insecto, la cual varía considerablemente entre los estadios de vida del insecto. **3) Alteración del punto diana.** Donde se modifica el punto diana donde ataca el insecticida, este tipo de resistencia se da por la insensibilidad en el sitio de acción. Un ejemplo muy conocido de este tipo de resistencia es la acetilcolinesterasa modificada que es menos eficiente al hidrolizar el sustrato que una enzima normal. Debido a que la alteración del sitio activo ocasiona una disminución en la reactividad con el inhibidor. Estudios de inhibición sugieren que el acceso a los centros catalíticos está restringido por un cambio de conformación que se debe a una asociación con diferentes residuos de aminoácidos. **4) Desintoxicación mejorada.** En donde hay un mayor metabolismo del insecticida, para esto hay un incremento en la producción de sistemas enzimáticos, donde los insecticidas son transformados en productos menos tóxicos. Las enzimas responsables para la desintoxicación en los organismos son transcritas por esterases, oxidasas y Glutación S-Transferasas (Trdan, 2016).

1.4.9. Enzimas de importancia en *T. castaneum*

Algunas de las enzimas más estudiadas en la acción de los insecticidas sobre el *T. castaneum*, son acetilcolinesterasa, glutatión S-transferasa y catalasa y citocromo C oxidasa, ya que al inhibir su actividad catalítica pueden ocasionar la muerte de del insecto por problemas de locomoción, disminución en capacidad reproductiva y/o toxicidad celular. Además, la determinación de la actividad de dichas enzimas después de la aplicación de sustancias insecticidas, se ha estudiado ampliamente para comprender mejor los mecanismos de resistencia y la desintoxicación de los compuestos xenobióticos que los alteran (Kiran & Prakash, 2015).

1.4.9.1. Acetilcolinesterasa (AChE)

Es una proteína que puede hidrolizar el éster acetilcolina (ACh) produciendo colina y acetato. Esta enzima juega un papel importante como mensajero en las funciones nerviosas y en niveles muy bajos pueden aparecer problemas funcionales por

sobreestimulación de la sinapsis colinérgica, provocando la muerte del insecto. La AChE es el sitio activo para 90 productos insecticidas organofosforados y 30 carbamatos, los cuales compiten con la hidrólisis de la ACh por fosforilación o carbamilación del residuo de serina (activa por su grupo OH) que se localiza en el subsitio esteárico de su centro activo (Rodríguez, et al., 2018).

El método analítico que se suele emplear para la cuantificación, determinación e inhibición de la actividad catalítica de la AChE *in vitro* es de detección colorimétrica, basado en la reacción de Ellman. Esta utiliza como sustrato el yoduro de acetiltiocolina (AThChI) y el ácido 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) como revelador de la reacción. La hidrólisis de AThCh libera tiocolina, una molécula con un grupo -SH libre capaz de reaccionar con el DTNB para dar un producto de sustitución y el anión 5-tio-2-nitrobenzoato de color amarillo que presenta un pico de mayor absorbancia a 415 nm en el rango visible del espectro, tal como se muestra en la **Figura 1.7** (Ellman, et al., 1961).

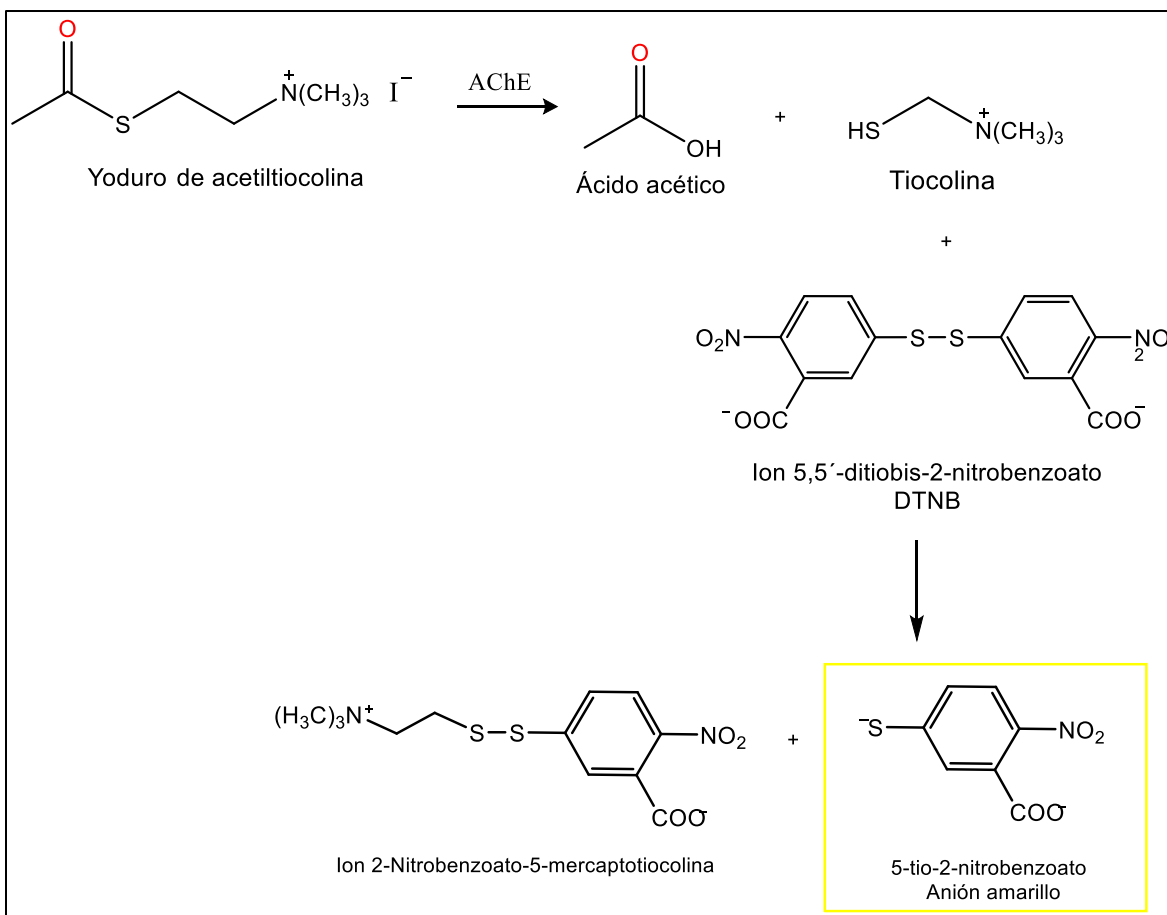


Figura 1.7. Reacción para determinar la actividad catalítica de la acetilcolinesterasa (AChE)

1.4.9.2. Glutación S transferasa (GST)

Las glutatión S-transferasas son enzimas importantes en la resistencia a los insecticidas ya constituyen una superfamilia de enzimas que existen tanto en los organismos procariotas como en los eucariotas, y participan en muchas actividades fisiológicas celulares, como la desintoxicación de compuestos xenobióticos y en la protección contra el estrés oxidativo (Shi et al., 2012). Esta desintoxicación se realiza principalmente a través de la conjugación del glutatión con xenobióticos (o endobióticos), convirtiéndolos en compuestos más solubles capaces de ser eliminados por el organismo. En la **Figura 1.8** se muestra el tripéptido, de la proteína, que es el responsable de dicha conjugación debido a que el grupo sulfhidrilo (SH) de la cisteína es altamente polarizable y es un buen nucleófilo para reacciones con compuestos químicos electrofílicos (Vontas et al., 2000).

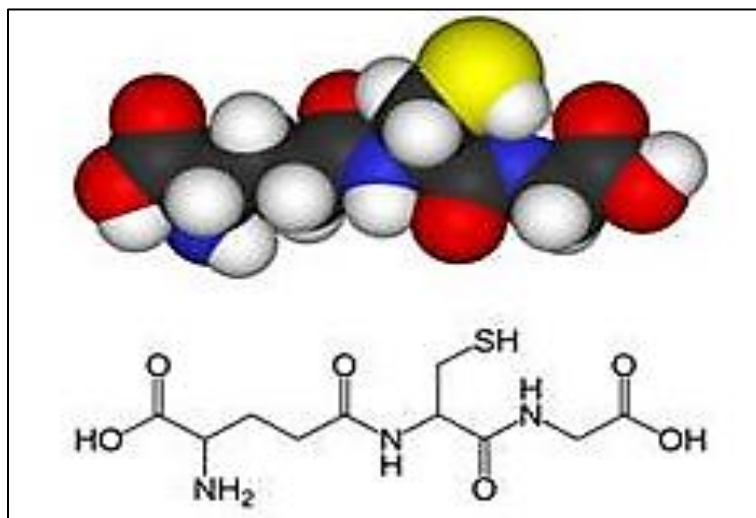


Figura 1.8. Tripéptido responsable de la conjugación de xenobióticos en la GST. Tomado de: <https://es.wikipedia.org/wiki/Glutati%C3%B3n>

El método analítico que se suele utilizar para determinar la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa se basa en monitorear espectrofotométricamente la conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) con glutatión reducido (GSH), que forman el conjugado 2,4-dinitrofenil-SG que absorbe a los 340nm a 37°C y cuyo coeficiente de extinción es 9,6 mM cm⁻¹ (Dowd et al., 2009). La anterior reacción se muestra en la **Figura 1.9**

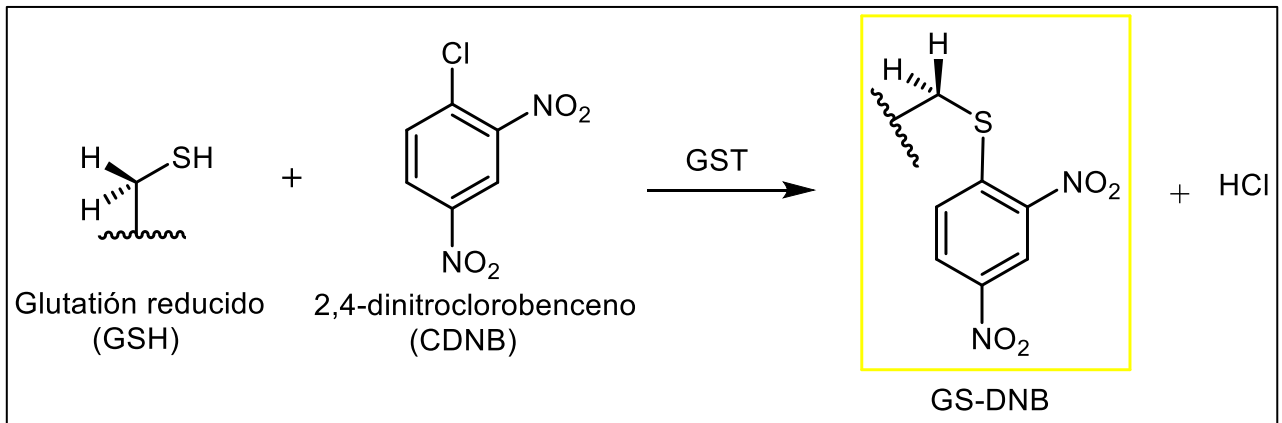
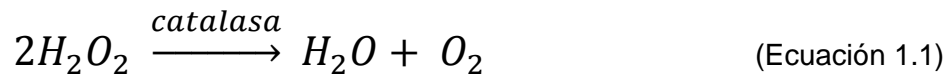


Figura 1.9. Reacción para determinar la actividad catalítica de la GST

1.4.9.3. Catalasa

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los organismos aerobios y cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. Esta enzima es fundamental en el sistema de defensa antioxidante ya que elimina las especies reactivas de oxígeno (EROs) producidas por la actividad de oxidasas en la β -oxidación de ácidos grasos, en la fotorrespiración, entre otros. Las EROs pueden dañar las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos (Badii & Garza, 2007). Entre los métodos que se emplean para medir la actividad de esta enzima, se pueden utilizar técnicas sencillas y económicas donde se relaciona la actividad de la enzima con la longitud de la columna de espuma producto de la reacción de la catalasa con peróxido de hidrógeno al 30%, tal y como ocurre en la reacción mostrada en la **Ecuación 1.1** (Iwase et al., 2013).



CAPITULO II: ACEITES ESENCIALES COMO INSECTICIDAS BOTÁNICOS PROMISORIOS PARA EL CONTROL DE *T. castaneum*.

2.1. INTRODUCCIÓN

Los AEs han sido objeto de estudio para ser implementados en diferentes campos de las ciencias biológicas ya que han demostrado tener un número variado de actividades farmacológicas, donde se destacan las actividades: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante e insecticida (Baser & Buchbauer, 2010). Particularmente, la actividad insecticida está relacionada con la coevolución entre las plantas y los insectos, ya que los AEs han sido los “mensajeros ecológicos” que las primeras generan, bien sea, para favorecer la polinización o para disuadir ataques por efectos repelentes o fumigantes (Regnault et al., 2012).

Dicha especificidad frente a los insectos ha permitido que los AEs hayan alcanzado una gran popularidad como insecticidas (Gahukar, 2018) debido a que son de bajo riesgo para otras especies animales como mamíferos, aves y peces, también a que tienden a ser de baja persistencia en el aire y en el agua, contrario a lo que ocurre con los insecticidas sintéticos como la fosfina, el diclorvos o compuestos de origen natural como los piretroides (Tripathi et al., 2009).

Entre otros factores que han permitido el auge de los AEs como fumigantes están, primero, la gran diversidad de compuestos que los conforman, ya que estos pueden afectar distintos puntos diana en el organismo, minimizando con ello la resistencia (Hu et al., 2019). Segundo, la gran volatilidad que presentan ya que sus constituyentes tienen bajas polaridades y presiones de vapor, lo que facilita su entrada al insecto en el proceso de respiración; lo que conlleva a su vez, a generar una muerte rápida (Boyer, Zhang, & Lempérière, 2012). Dichos compuestos, constan de diversas y muy variadas estructuras entre los que se destacan dos tipos: los terpenos y los fenilpropanos. No obstante, es importante aclarar que estos conjuntos de metabolitos pueden sufrir procesos de oxidación a tal punto de incorporar a sus esqueletos grupos funcionales como lo son alcohol, aldehído,

éster, éter, cetonas y ácidos carboxílicos, lo que genera graduaciones en los momentos dipolares de las moléculas a los cuales pertenecen y por lo tanto a que interactúen de maneras diferentes en *T. castaneum* (E. Stashenko, 2009).

Por lo tanto, la presente investigación pretende contribuir al estudio de la actividad insecticida de AEs de plantas colombianas y con ello fortalecer los estudios en este campo del conocimiento, ya que el país ha tenido una participación significativa en los últimos años, con un 3 % del total de los trabajos reportados sobre AEs en el control de plagas de insectos en productos almacenados (Campolo et al., 2018). En el presente capítulo se describe la selección de AEs potencialmente activos para el control de *T. castaneum*, la determinación de su potencia fumigante (CL_{30} , CL_{50} y CL_{90}) y su caracterización química mediante GC-MS. Adicionalmente, se presenta un estudio de interrelación entre los resultados de la actividad fumigante y la composición química de los AEs activos, para generar grupos por similitudes y establecer posibles casusas de la letalidad exhibida.

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. Diseño experimental

El diseño experimental que se desarrolló en el presente capítulo se dividió en dos fases, las cuales se citan a continuación:

Fase I

- i) Se hizo un tamizaje por actividad fumigante al conjunto de AEs (N= 44). El criterio utilizado se basó en la respuesta de los bioensayos de toxicidad fumigante. El criterio de selección fue con base a la letalidad mayor o igual al 60% de cada uno de los AEs.
- ii) Del grupo seleccionado en el numeral anterior se estableció la potencia fumigante mediante la estimación de las Concentraciones Letales (CLs).

Fase II

- i) Identificación de los compuestos presentes en los AEs del grupo seleccionado en el cribado preliminar a través de GC-MS.

- ii) Caracterización y clasificación de los compuestos encontrados en el numeral anterior.
- iii) Construcción de la tabla de parámetros.
- iv) Determinación de los grupos (clúster) a través de métodos jerárquicos de agrupamiento.
- v) Caracterización estadística de los grupos resultantes y construcción de los perfiles de los AEs en función de sus características.

2.2.2. Selección de los aceites esenciales con potencial actividad fumigante sobre *Tribolium castaneum*

2.2.2.1. Recolección material vegetal y preparación de muestras.

La **Tabla 2.1** muestra las 44 especies vegetales utilizadas en este estudio pertenecientes a 15 familias: Anacardiaceae, Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Hypericaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae y Zingiberaceae. Estas especies fueron recolectadas en diferentes regiones de Colombia y algunas se adquirieron en la plaza de mercado Samper Mendoza de la ciudad de Bogotá D.C. Un espécimen de cada muestra fue llevado al Herbario Nacional Colombiano, al Herbario JBB del jardín botánico de Bogotá, al Herbario de la Universidad de Antioquia o al Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana para su determinación taxonómica. Como criterios de selección del material vegetal que se tuvo en cuenta primero, su uso tradicional como fumigantes o repelentes de insectos, el segundo, fue el criterio químiotaxonomico enfocado una amplia variedad de componentes químicos presentes en los AEs, y finalmente, se tuvo en cuenta el criterio de facilidad de acceso al recurso

De las 44 plantas mostradas en la **Tabla 2.1**, 22 fueron colectadas en este trabajo y las restantes fueron previamente colectadas por el equipo de investigación (marcadas con un triángulo). De estas últimas ya se habían obtenido los AEs y se encontraban en stock en el laboratorio del Grupo de Investigación en Productos Naturales Bioactivos (QUIPRONAB) de la Universidad Nacional de Colombia.

Tabla 2.1. Listado de plantas colectadas para la extracción de los aceites esenciales

N°	Familia	Nombre científico	N° colección	Lugar de colecta	Órgano de extracción	Estado del material
1	Anacardiaceae	<i>Schinus molle</i> L [▲]	*	Universidad Nacional de Colombia- Bogotá	Hojas y ramas	Fresco
2	Annonaceae	<i>Xylopia discreta</i> [▲]	COL 518691	Barrancabermeja-Santander	Frutos	Secos
3	Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i>	•	Plaza de mercado Samper Mendoza	Hojas y ramas	Fresco
4		<i>Pimpinella anisum</i> L	COL 595400	Plaza de mercado Samper Mendoza	Semillas	Seco
5	Asteraceae	<i>Artemisia dracunculus</i>	•	Plaza de mercado Samper Mendoza	Hojas y ramas	Fresco
6		<i>Artemisia vulgaris</i>	•	Plaza de mercado Samper Mendoza	Hojas y ramas	Fresco
7	Cupressaceae	<i>Cupressus sp.</i>	ND	Universidad Nacional de Colombia- Bogotá	Hojas	Fresco
8	Fabaceae	<i>Copaifera officinalis</i> [▲]	ND	Leticia-Amazonas	Hojas y ramas	Fresco
9		<i>Copaifera sp</i> [▲]	ND	Acacias-Meta	Hojas y ramas	Fresco
10	Hypericaceae	<i>Hypericum juniperinum</i>	*	Usme - C/marca	Hojas y ramas	Fresco
11		<i>Hypericum mexicanum</i>	*	Usme vía Páramo de Sumpaz	Hojas y ramas	Fresco
12	Lamiaceae	<i>Lavandula angustifolia</i>	•	Plaza de mercado Samper Mendoza	Hojas y ramas	Fresco
13		<i>Ocimum basilicum</i>	•	Plaza de mercado Samper Mendoza	Hojas y ramas	Fresco
14		<i>Rosmarinus officinalis</i>	•	Plaza de mercado Samper Mendoza	Hojas y ramas	Fresco
15		<i>Mentha pulegium</i> [▲]	COL 583416	Granada-C/marca	Hojas	Fresco

16	Lauraceae	<i>Ocotea longifolia</i> ▲	COL 587616	Lérida-Tolima	Hojas	Fresco
17		<i>Aniba puchury-minor</i> ▲	COL 566444	Santa Bárbara	Hojas	Fresco
18		<i>Beilschmiedia costaricensis</i> ▲	COL 563246	La Vega- C/marca	Hojas	Fresco
19		<i>Aniba robusta</i> ▲	COL 587144	La Vega- C/marca	Hojas	Fresco
20		<i>Aniba puchury-minor</i> ▲	COL 544559	Santa Bárbara	Hojas	Fresco
21		<i>Aiouea dubia</i> ▲	ND	Chingaza-C/marca	Hojas	Fresco
22		Myristicaceae	<i>Eucalyptus sp</i>	ND	Usme - C/marca	Hojas
23	<i>Myristica fragrans</i>		.	Plaza de mercado Samper Mendoza	Semillas	Seco
24	<i>Syzygium aromaticum</i> ▲		.	Plaza de mercado Samper Mendoza	Semillas	Fresco
25	Piperaceae	<i>Piper aduncum</i> ▲	COL 593727	Universidad Nacional de Colombia- Bogotá	Inflorescencias	Fresco
26		<i>Piper aequale</i> ▲	COL 510622	Nocaima- C/marca	Hojas	Fresco
27		<i>Piper eriocladum</i> ▲	COL 517694	Granada-C/marca	Hojas	Fresco
28		<i>Piper nigrum</i>	ND	Plaza de mercado Samper Mendoza	Frutos	Fresco
29		<i>Piper crassinervium</i> ▲	COL 579924	Acacias - Meta	Hojas	Fresco
30		<i>Piper nubigenum</i> ▲	COL 595897	Cascajal	Hojas y ramas	fresco
31		<i>Piper holtonii</i> ▲	COL 593726	Mesitas del Colegio – C/marca	Hojas	Fresco
32		<i>Piper bogotense</i> ▲	COL 511095	Sopó-C/marca	Hojas	Fresco
33		<i>Piper bogotense</i> ▲	COL 511095	La Uvita- Boyacá	Hojas	Fresco
34		<i>Piper asperiusculum</i> ▲	COL 579924	San Mateo -Boyacá	Inflorescencias	fresco
35	Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> ▲	COL 595393	Fusagasugá- C/marca	Hojas	Fresco

36		<i>Cymbopogon nardus</i> [▲]	ND	Manizales-Caldas	Hojas	Fresco
37	Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	•	Bogotá	Cáscara del fruto	Fresco
38		<i>Coleonema album</i> [▲]	COL 526771	Plaza de mercado	Hojas y ramas	Fresco
39		<i>Zanthoxylum monophyllum</i>	*	Fusagasugá - C/marca	Frutos	Fresco
40		<i>Ruta graveolens</i>	•	Plaza de mercado	Hojas y ramas	Fresco
41	Verbenaceae	<i>Lippia alba</i> [▲]	COL 595394	Pacho- C/marca	Hojas	Fresco
42		<i>Lippia organoides</i>	*	Pacho- C/marca	Hojas	Fresco
43	Zingiberaceae	<i>Elettaria cardamomum</i>	•	Plaza de mercado	Semillas	Fresco

ND = No Depositado.

▲ = AE en stock en el Laboratorio del Grupo de Investigación en Productos Naturales Bioactivos.

• = Determinación taxonómica realizada por el herbario de la Pontificia Universidad Javeriana. Son especies comunes que no fueron depositadas.

* = Número de colección pendiente por asignar por parte del herbario de la Universidad de Antioquia.

2.2.2.2. Extracción de los aceites esenciales.

Se tomaron 3 Kg de material vegetal los cuales fueron triturados y sometidos a extracción por arrastre con vapor de agua durante un periodo de tres horas. Los AEs obtenidos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se almacenaron a una temperatura de 4 °C. Los rendimientos de los AEs estuvieron entre el 1 y 3%.

2.2.2.3. Cría de insectos.

Los insectos adultos de *T. castaneum* fueron tomados del pie de cría existente en el Laboratorio de Bioensayos de la Pontificia Universidad Javeriana, mantenidos en contenedores de plástico en una mezcla de harina de trigo y levadura de cerveza en proporción 95:5. Los contenedores se mantuvieron bajo condiciones de oscuridad, humedad relativa y temperatura controladas ($30 \pm 1^\circ\text{C}$ y $65 \pm 5\%$ HR) en una cámara de crecimiento en acero inoxidable (**Figura 2.1**).



Figura 2.1. Fotografías de la cámara de crecimiento empleada para la cría *T. castaneum*.

2.2.2.4. Ensayo de actividad fumigante para determinar los AEs más promisorios de una población inicial N=44

La **Figura 2.2** muestra, grosso modo, la metodología que se empleó, para determinar los AEs más promisorios. En esta se realizó un tamizado, a partir de su toxicidad volátil, de una población total de muestras N=44 utilizando el método “vial en vial” con algunas modificaciones (Pascual, et al., 2004). En primer lugar, se colocó, enroschado, en la boca de un vial de cristal de 2 mL un papel Wathman 1[®] de dos cm de diámetro (**Figura 2.2a**). Luego, se aplicó sobre el papel un volumen de 7 μ L del AE (**Figura 2.2b**). Posteriormente, este vial es introducido en un frasco ámbar de 22 mL de tapa rosca que contenía 10 insectos sin determinarse su sexo y finalmente se tapa el frasco para evitar la pérdida del aceite (**Figura 2.2b-c**). La concentración del AE dentro del frasco fue de 318.0 μ L/L aire. Cada ensayo se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones de cría de los insectos. Como control positivo se empleó Nuvan 50[®] que contiene diclorvos como ingrediente activo (50 μ L/L aire); y el control negativo se realizó de la misma manera, pero sin aplicar ninguna sustancia en el papel. La mortalidad de los insectos se determinó a las 24 horas; estos se consideraron

mueritos cuando no se observó movimiento de las patas o de las antenas después de estimulación con alfiler entomológico (**Figura 2.2e-f**).

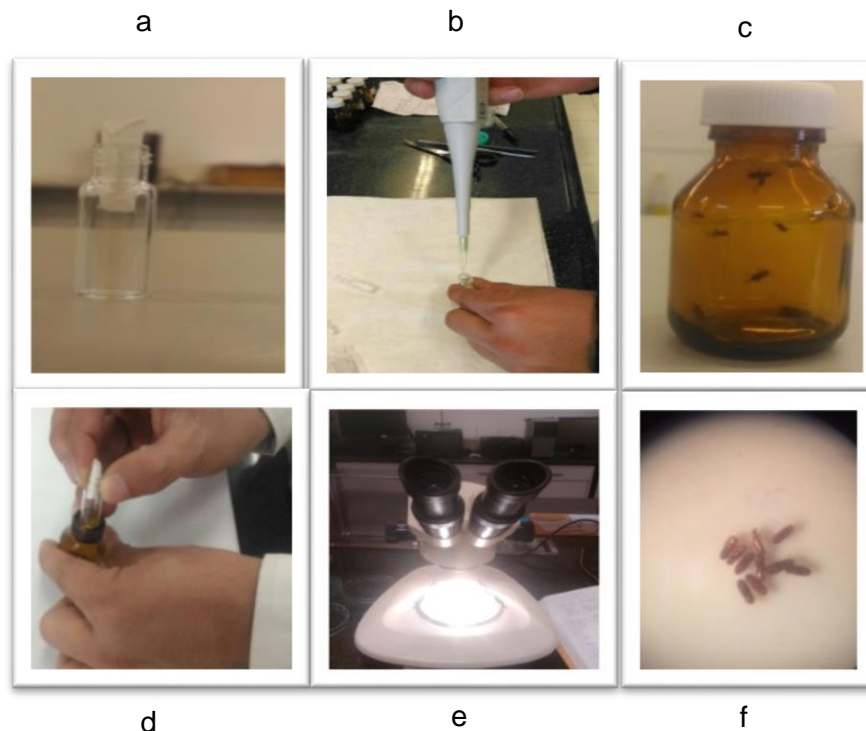


Figura 2. 2. Metodología de vial en vial para determinar los AEs más promisorios. a) Vial de 1 mL con el papel filtro enrollado dentro. b) Impregnación del respectivo AE en el papel filtro. c) Selección de los insectos en un frasco ámbar de 22 mL. d) Introducción del vial pequeño en el frasco ámbar. e) y f) Determinación de la mortalidad pasadas 24 horas a través de un estereoscopio.

El porcentaje de mortalidad se calculó empleando la fórmula de corrección de Abbott representada en la **Ecuación 2.1** (Abbott, 1925). Con los resultados de este ensayo fue posible seleccionar los AEs con potencial actividad fumigante, que corresponden a aquellos que causaron un porcentaje de mortalidad ≥ 60 %.

$$\% Mort. = \left(\frac{\% mortalidad AE - \% mortalidad control}{100 - \% mortalidad control} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

2.2.3. Estimación de las concentraciones letales: Modelo de ajuste de respuesta de letalidad (Probit)

Para estimar las Concentraciones Letales (CLs) se utilizó el método “vial en vial” descrito en el apartado anterior, pero utilizando rangos de concentración entre los 5 y 318 $\mu\text{L/L}$ aire.

Por cada concentración se hicieron cuatro replicas y se utilizó como control positivo Nuvan 50 ®. La mortalidad de los insectos se determinó a las 24 horas y los criterios de mortalidad fueron idénticos a los que se utilizaron en el tamizaje preliminar. Posteriormente, los datos obtenidos fueron analizados en el software SPSS versión 24 y el modelo utilizado fue una técnica no lineal, que permitió explicar una variable binaria en términos de otras variables cualitativas y cuantitativas. Dicho modelo está conformado por la variable dependiente “mortalidad” y las variables explicativas fueron “tipo de AEs” a diferentes niveles (concentraciones). De manera que:

Sean Y_j : La proporción de individuos (*T. castaneum*) muertos al aplicar la j ésimo especie, en la n_{kj} muestra de control de tamaño k .

C_{ij} : La concentración aplicada al individuo i de la especie j para cada k

Luego, para cada j se tiene π_{ij} : la probabilidad de que la proporción $Y_{ij} = y_{ij}$ el individuo i en cada ensayo k , con $\pi_{ij} = P(Y_{ij} = y_{ij} | E_j = 1)$.

Por lo tanto, el modelo Probit ajustado para j especie está dado por la **Ecuación 2.2**:

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

Donde:

\widehat{CL}_{j50} se define como la concentración letal de efectividad del 50% para cada especie j .

\widehat{CL}_{j30} se define como la concentración letal de efectividad del 30% para cada especie j .

\widehat{CL}_{j90} se define como la concentración letal de efectividad del 90% para cada especie j .

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

Donde μ_j y β_j son el intercepto y la pendiente en cada modelo

Además, $\Phi^{-1}(\cdot)$ es el inverso de la distribución normal estándar conocido como la función de enlace probit y cuando $\pi_{ij} = 0.5$ se utiliza para estimar la concentración letal de aproximadamente el 50%.

2.2.4. Caracterización química de los AEs potencialmente activos.

2.2.4.1. Preparación de muestras.

Para el análisis de cada muestra, se tomaron 25 μL del AE y se llevaron a un volumen final de 1 mL con n-hexano. De igual manera, se preparó una solución estándar de hidrocarburos (C7-C40) tomando 25 μL de un estándar a 1000 ppm y llevando a 1 mL con n-hexano. En caso de que los AEs no se disolvieran completamente y se viese turbidez en las soluciones, se agregaron de 2 a 5 gotas de diclorometano y se agitó hasta que la solución fuera translúcida.

2.2.4.2. Análisis por GC-FID en columna apolar.

Se usó para el análisis de los AEs un cromatógrafo de gases *Shimadzu* GC 2010 equipado con un detector de ionización de llama (FID). La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5% - fenil-poli(metilxilosano HP-5MS) de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 μm). El gas de arrastre fue helio (99.9995%) con una velocidad lineal de 25.5 cm/s y flujo constante de 1 mLmin⁻¹. La temperatura del horno fue programada de 40 °C (dos min) @ 4 °C/min hasta 125 °C (dos min), después @ 4°C/min hasta 160 °C (cinco min) y por último @ 5°C/min hasta 220 (ocho min). Se utilizó una velocidad lineal de 25.6 cm/s y flujo constante de 1 mL/min.

2.2.4.3. Análisis por GC-MS en columna apolar.

La separación de los componentes de cada AE se realizó empleando un cromatógrafo de gases marca *Shimadzu* serie GC 2010 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Shimadzu* TQ 8040. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar con fase estacionaria (f.e.) apolar de 5% - fenil-poli(metilxilosano) (HP-5MS) de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 μm). El gas de arrastre fue helio (99.9995%) con una velocidad lineal de 25.5 cm/s y flujo constante de 1 mLmin⁻¹. La temperatura del horno fue programada de 40 °C (dos min) @ 4 °C/min hasta 125 °C (dos min), después @ 4°C/min hasta 160 °C

(cinco min) y por último @ 5°C/min hasta 220 (ocho min). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones (EI) con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización, de la línea de transferencia y el cuadrupolo se mantuvieron a 250 °C, 270°C y 270°C respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de 30-600 m/z, con una velocidad de barrido de radiofrecuencia 1666 scans⁻¹.

2.2.4.4. Análisis por GC-MS en columna polar.

La separación de los componentes de cada AE se realizó empleando un cromatógrafo de gases marca *Shimadzu* serie GC 2010 *Plus* acoplado a un detector selectivo de masas *Shimadzu* TQ 8040. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna polar de sílice fundida HP-INNOWAX de 60 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 µm, df con fase estacionaria de polietilenglicol. El gas de arrastre fue helio (99.9995%) con una velocidad lineal de 25.6 cm/s y flujo constante de 1 mLmin⁻¹. La temperatura del horno fue programada de 45 °C (cuatro min) @ 3 °C/min hasta 120 °C (dos min), después @ 4°C/min hasta 250 °C (ocho min). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones (EI) con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización, de la línea de transferencia y el cuadrupolo se mantuvieron a 250 °C, 270°C y 270°C respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*), en el rango de masas de 45-500 m/z, con una velocidad de barrido de radiofrecuencia 1666 scans⁻¹.

2.2.4.5. Determinación de la composición química de los AEs promisorios.

La abundancia relativa de cada uno de los componentes de los AEs se determinó por GC-FID y se expresa como porcentaje, mientras que la identificación de los compuestos, presentes en cada uno de los AEs promisorios, se realizó por medio de sus índices de retención y por comparación de los espectros de masas obtenidos por GC-MS, con los espectros de masas que se encuentran consignados en bases de datos ([Adams, 2012](#)) y ([National Institute of Standards and Technology, 2018](#)). Los índices de retención lineal (IR) se calcularon con base a los tiempos de retención de una serie homologa de patrones de hidrocarburos de C7 hasta C40, que se analizaron en GC-MS bajo las mismas condiciones operacionales que los AEs.

Para el cálculo de los IR se usó la **Ecuación 2.4**:

$$IR = 100n + 100 \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

Donde:

n: número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés;

tRx: tiempo de retención del compuesto de interés;

tRn: tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés;

tRN: tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto de interés.

2.2.5. Agrupamiento clúster de los AEs con actividad fumigante sobre *T. castaneum*

Utilizando el software SPSS® versión 24 se hizo un análisis clúster de los AEs utilizados en la presente investigación, con el fin de identificar las características que pueden generar mortalidad en *T. castaneum* Para realizar dicho análisis se utilizaron los descriptores (características) de cada uno de los 23 AEs promisorios como su composición química y sus concentraciones letales (CL₃₀, CL₅₀ y CL₉₀).

Las técnicas de *clustering* que se emplearon en este capítulo fueron del **tipo jerárquico**, las cuales son **1)** el vecino más cercano y **2)** el vecino más lejano. En ambos casos se utilizó la distancia Euclidiana (**Ecuación 2.5**), que se refiere a la distancia entre los descriptores (características) de los AEs.

$$D(X_i, X_j) = \sqrt{\sum_{k=1}^{k=m} (X_{ik} - X_{jk})^2} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

Donde, *m* es la cantidad de descriptores utilizados.

La visualización del resultado de clasificación a través del método de *clustering*, se realiza a través de árboles de clasificación conocidos como dendogramas los cuales son una representación gráfica que resume el proceso de agrupación en un análisis de clúster. Para el presente caso, los AEs similares se conectan mediante enlaces cuya posición en el diagrama está determinada por el nivel de similitud/disimilitud entre los objetos.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Selección de los aceites esenciales promisorios.

Los 44 AEs que se utilizaron en este trabajo pertenecen a las familias Anacardiaceae (una especie), Annonaceae (dos especies), Apiaceae (dos especies), Asteraceae (dos especies), Cupressaceae (una especie), Fabaceae (una especie), Hypericaceae (dos especies), Lamiaceae (cuatro especies), Lauraceae (seis especies), Myristicaceae (tres especies), Piperaceae (10 especies), Poaceae (dos especies), Rutaceae (4 especies), Verbenaceae (dos especies) y Zingiberaceae (una especie).

En el estudio preliminar de actividad fumigante de los 44 AEs, empleando una concentración de 318 $\mu\text{L/L}$ aire, se encontró que 23 causaron un porcentaje de toxicidad fumigante igual o superior al 60% (Prieto, 2012). Los resultados se presentan en la **Figura 2.3**. En el tamizaje se observó que, de los 23 AEs activos, 19 causaron mortalidades del 100 %, y cuatro entre el 60 y el 98 %. Con base en estos resultados, los 23 AEs fueron considerados como promisorios y constituyeron la submuestra n_1 .

Los AEs promisorios pertenecen a 11 familias que son Piperaceae (con cuatro especies), Rutaceae, Lamiaceae (con tres especies cada una), Apiaceae, Hypericaceae, Myristicaceae, Verbenaceae (con dos especies cada una), Anacardiaceae, Annonaceae, Cupressaceae y Zingiberaceae (cada una con una especie). Para AEs obtenidos de estas familias existen varios reportes de fumigancia o repelencia contra *T. castaneum* (Campolo et al., 2018). Solo por nombrar algunos ejemplos se tiene el caso de la familia Piperaceae, donde hay estudios de repelencia con las especies *Piper dilatatum*, *P. aduncum*, *P.*

divaricatum y *P. sanctifelicis* (Jaramillo & Nayive, 2015); estudios de actividad fumigante y repelente con *P. nigrum* (Annis et al., 2008; Naseem & Khan, 2011) y de toxicidad por contacto con *P. auritum* y *P. multiplinerivium* (Caballero et al., 2014).

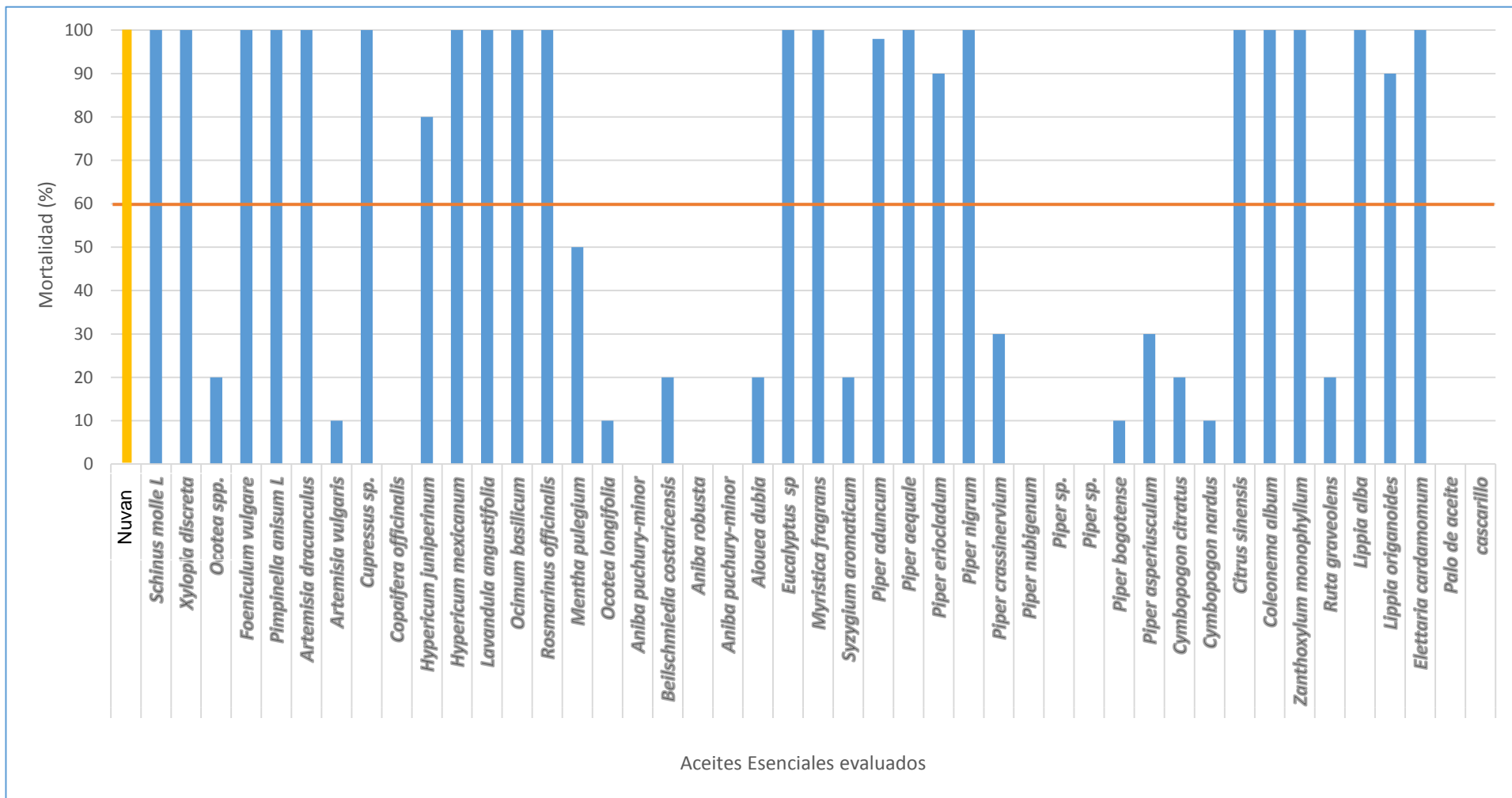


Figura 2.3. Porcentaje de mortalidad sobre *T. castaneum* de los 45 AEs evaluados a una concentración de 318 $\mu\text{L/L}$ aire. Se puede observar que solo 23 de los AE avaluados superaron el umbral de del 60% establecido para la presente investigación.

También, con respecto a la familia Rutaceae, se tienen investigaciones de actividad fumigante de algunos cítricos de interés comercial como *Citrus reticulata*, *C. sinensis*, *C. limonum* y *C. auratifolia* (Abou-Taleb et al., 2016; Saleem et al., 2013; Campolo et al., 2018) (Annis et al., 2008). De igual manera hay reportes de actividad fumigante sobre el insecto de interés para AEs de ejemplares del género *Zanthoxylum* como *Z. monophyllum*, *Z. rhoifolium* y *Z. fagara* (Prieto, et al., 2011). Bajo esta misma tendencia está la familia Lamiaceae donde se reporta actividad fumigante de especies aromáticas de amplio uso como *Rosmarinus officinalis*, *Lavandula officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum* y *Majorana hortensis* (Mohamed & Abdelgaleil, 2008; Annis, et al., 2008).

Igualmente, de la familia Apiaceae se cuenta con publicaciones de actividad fumigante de especies comerciales como *Pimpinella anisum* y *Foeniculum vulgare* (Orhan et al., 2008); de la familia Hypericaceae existen trabajos de actividad fumigante y antialimentaria de especies como *Hypericum perforatum* (Ashrafi & Ebadollahi, 2016) y de repelencia como los reportados para la especie *H. hemsleyanum* (Wagan et al., 2016). De la familia Myristicaceae se tienen reportes de especies como la *Myristica fragrans*. Por lo tanto, los anteriores reportes demuestran que la presente investigación se dirigió a familias y especies con potencial reconocimiento para ser utilizadas como posibles agentes fitosanitarios para el control de *T. castaneum*.

Posterior al tamizaje realizado se determinó la densidad e índice de refracción de los 23 AEs. De igual manera se complementó este análisis con la descripción de algunas características organolépticas como lo son la apariencia y el color, tal y como se muestra en la **Tabla 2.2**. Lo anterior con el ánimo de poseer la mayor información posible de cada AE debido a que dichos parámetros 1) son exigidos a nivel industrial y comercial para su uso; 2) Son necesarios para lograr la máxima reproducibilidad en de otros lotes de AEs que se quieran obtener para el mismo fin que los usados en la presente investigación y 3) para ceñirlos a criterios de calidad.

Tabla 2.2. Propiedades físicas de los 23 AEs promisorios contra *T. castaneum*.

Aceite esencial	Densidad absoluta (g/mL)*	Índice de refracción*	Características organolépticas
<i>A. dracuncululus</i>	0.990	1.5204	Color amarillo claro
<i>C. album</i>	0,802	1.4865	Color amarillo traslúcido
<i>C. sinensis</i>	0,844	1.4731	Traslúcida e incolora
<i>Cupressus sp.</i>	0,846	ND	Color amarillo claro muy tenue
<i>E. cardamomum</i>	0,990	1.4623	Completamente traslúcido e incoloro
<i>Eucalyptus sp.</i>	0,944	1.4654	Completamente traslúcido e incoloro
<i>F. vulgare</i>	0,938	1.5378	Completamente traslúcido e incoloro
<i>H. juniperinum</i>	0,864	1.4576	Completamente traslúcido e incoloro
<i>H. mexicanum</i>	0,764	1.4257	Completamente traslúcido e incoloro
<i>L. angustifolia</i>	0,908	1.4733	Color amarillo claro y translucido
<i>L. alba</i>	0,882	1.4935	Color amarillo claro y translucido
<i>L. origanoides</i>	0,964	1,4991	Color amarillo oscuro y traslúcido
<i>M. fragrans</i>	0,828	1.4743	Completamente traslúcido e incoloro
<i>O. basilicum</i>	0,890	1.4984	Color amarillo claro y translucido
<i>P. aduncum</i>	ND	1.4276	Color amarillo oscuro
<i>P. aequale</i>	0.998	1.5222	Color amarillo claro y translucido
<i>P. anisum</i>	0,976	1.5539	Traslucido con un olor muy fuerte
<i>P. eriocladum</i>	ND	ND	Color amarillo claro y translucido
<i>P. nigrum</i>	0,884	1.4808	Completamente traslúcido e incoloro
<i>R. officinalis</i>	0,888	1.4715	Completamente traslúcido e incoloro
<i>S. molle</i>	0,854	1.4814	Completamente traslúcido e incoloro
<i>X. discreta</i>	0,882	1.4738	Completamente traslúcido e incoloro
<i>Z. monophyllum</i>	0,846	1.4777	Completamente traslúcido e incoloro

ND= No Determinado por cantidades insuficientes del AE.

* Parámetros determinados a 20 °C.

2.3.2. Estimación de las concentraciones letales (CLs) de los AEs promisorios

Los 23 AEs pertenecientes a la submuestra n1 se sometieron a un estudio para determinar los efectos generados en la mortalidad del insecto por la variación de la concentración de cada AE, lo que permitió estimar las concentraciones letales 30, 50 y 90. En la **Tabla 2.3** se muestran los 23 AE organizados en función a sus CL₅₀, ubicándose al inicio los más activos y hacia el final los menos activos. Para facilitar la discusión de estos resultados, se asignó un código a cada AE con base en su actividad, teniéndose entonces el código **a1** para el aceite de *F. vulgare* (cuya CL₅₀ fue la más baja) y el código **a23** al aceite de *C. album* (con la CL₅₀ más alta).

Tabla 2.3. Concentraciones letales 30, 50 y 90 de los 23 AEs promisorios.

Aceite esencial	Cod.	CL ₃₀ [*] (μL/L aire)	CL ₅₀ [*] (μL/L aire)	CL ₉₀ [*] (μL/L aire)	Pendiente	Intercepto
<i>F. vulgare</i>	a1	12.013 (9.152-14.172)	16.234 (14.066- 18.346)	26.549 (23.744-30.877)	0.124	-2.017
<i>Z. monophyllum</i>	a2	12.279 (8.443-15.169)	18.537 (15.697-21.185)	33.829 (30.255-39.054)	0.084	-1.553
<i>A. dracunculus</i>	a3	14.726 (10.180-18.122)	22.775 (19.502-25.912)	42.447 (37.847-49.384)	0.065	-1.484
<i>E. cardamomum</i>	a4	24.050 (21.049-26.534)	29.371 (26.904-31.869)	42.373 (39.087-47.035)	0.099	-2.895
<i>L. angustifolia</i>	a5	12.99 (7.049-16.534)	34.144 (31.049-36.534)	85.842 (81.049-96.534)	0.079	-1.855
<i>P. aduncum</i>	a6	21.080 (4.128--32.703)	41.910 (30.280-58.715)	92.818 (71.497-144.980)	0.025	-1.055
<i>P. nigrum</i>	a7	24.657 (8.158-36.879)	43.906 (31.913-62.929)	90.948 (69.432-147.125)	0.027	-1.196
<i>P. eriocladum</i>	a8	19.994 (-11.548-40.483)	58.288 (37.598-83.231)	151.870 (117.038-228365)	0.014	-0.798
<i>H. juniperinum</i>	a9	40.706 (23.680-56.518)	67.269 (51.862-90.074)	132.184 (104.969-187.847)	0.020	-1.328
<i>P. anisum</i>	a10	47.934 (28.399-66.940)	79.162 (60.757-106.261)	155.477 (123.489-218703)	0.017	0.002
<i>L. origanoides</i>	a11	51.946 (31.186-71.219)	87.710 (68.600-113.582)	175.110 (142.228-234.916)	0.015	-1.268
<i>P. aequale</i>	a12	66.9 (47.5-88.8)	92.3 (72.8-122.8)	154.2 (123.4-216.7)	0.021	-1.91

<i>L. alba</i>	a13	78.528 (61.399-96.857)	107.691 (90.012-131.478)	178.961 (151.062-224.964)	0.018	-1.936
<i>M. fragrans</i>	a14	87.401 (75.086-100.308)	115.253 (102.226-131.069)	183.318 (162.999-211.795)	0.019	-2.17
<i>C. sinensis</i>	a15	116.237 (101.259-129.596)	138.325 (124.919-152.786)	192.303 (175.084-217.112)	0.024	-3.284
<i>cupressus sp.</i>	a16	128.647 (112.607-142.704)	152.298 (138.162-167.387)	210.098 (191.976-236.344)	0.022	-3.377
<i>S. molle</i>	a17	125.666 (109.954-141.174)	160.045 (144.438-177.804)	244.064 (221.263-274.773)	0.015	-2.441
<i>R. officinalis</i>	a18	148.782 (130.582-166.215)	191.491 (173.936-210.975)	295.865 (270.036-330.213)	0.012	-2.351
<i>H. mexicanum</i>	a19	179.509 (140.248-221.612)	229.065 (190.374-284.032)	350.170 (292.939-456.510)	0.011	-2.424
<i>Eucalyptus sp</i>	a20	200.521 (179.268-217.960)	232.759 (215.200-250.932)	311.543 (288.513-346.008)	0.016	-3.786
<i>O. basilicum</i>	a21	187.184 (166.401-207.482)	234.012 (213.498-258.084)	348.451 (316.290-394.054)	0.011	-2.621
<i>X. discreta</i>	a22	200.426 (179.347-218.878)	237.229 (218.776-257.435)	327.170 (300.984-365.814)	0.014	-3.38
<i>C. album</i>	a23	227.934 (204.849-246.986)	264.586 (245.505-286.152)	354.157 (325.519- 401.208)	0.014	-3.786
Nuvan	-	1.048 (0.048-1.976)	2.720 (1.520-6.152)	5.160 (4.739-9.511)	0.224	-1.78

* Entre paréntesis se encuentra el rango de Límite de Confianza del 95%

Con base en los resultados de la tabla anterior se puede observar que, de los 23 AE promisorios, los más activos fueron los de las especies *F. vulgare* (**a1**), *Z. monophyllum* (**a2**), *A. dracuncululus* (**a3**), *E. cardamomum* (**a4**), *L. angustifolia* (**a5**), *P. aduncum* (**a6**), *P. nigrum* (**a7**) ya que estos tuvieron las CL₅₀ más bajas con valores inferiores a los 50.0 µL/L aire y, además, dichas concentraciones fueron las más cercanas a la CL₅₀ del control positivo Nuvan 50 ® (2.72 ± 0.4 µL/L aire). Estos AEs también se caracterizaron por tener valores de pendiente, en cada ecuación de su recta, más altos que el resto del grupo (entre 0.027 y 0.124 unidades), lo que significa que al aumentar en una unidad su concentración, causan la mayor letalidad en *T. castaneum*. Por otro lado, puede observarse que para el caso de los aceites **a8 - a23** los rangos de variación de la pendiente no son tan amplios, con valores entre 0.011 y 0.020 indicando que se requiere de mayores concentraciones de éstos para generar una respuesta en el insecto y, por lo tanto, el gasto de aceite aumenta. Estos resultados también coinciden con sus respectivas CL₅₀ que estuvieron entre 58.28 y

264.58 $\mu\text{L/L}$ aire. En la **Figura 2.4** se pueden apreciar el comportamiento de las CL_{30} , CL_{50} y CL_{90} de cada AE promisorio.

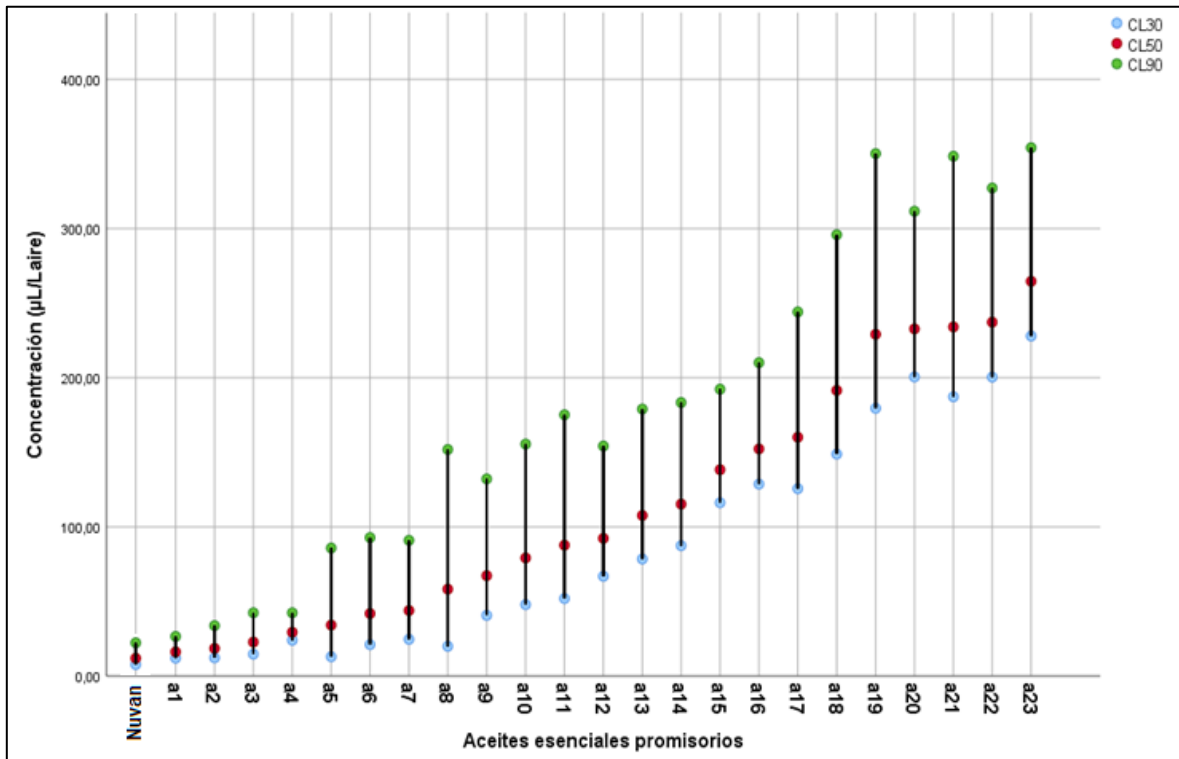


Figura 2.4. Comportamiento de las CL_{30} , CL_{50} y CL_{90} de los AEs promisorios usados contra *T. castaneum*.

De la **Figura 2.4** hay varios aspectos que valen la pena ser destacados. **1)** Algunos AEs requieren cambios muy leves entre sus CLs para producir un gran incremento en la mortalidad del insecto, tal como se aprecia con los aceites **a1-a4**. En contraste están los AEs que requieren cambios muy drásticos en su concentración para lograr el mismo efecto en la mortalidad que sus homólogos más activos. En este caso sobresalen los aceites **a5-a11** y **a18** **2)** Para todos los AEs el rango entre las CL_{30} y CL_{50} fue mucho menor que el comprendido entre las CL_{50} y CL_{90} . Esto evidencia una relativa estabilidad para el control del 50% de los organismos que para el total de ellos. **3)** El comportamiento de cada AE es bien diferenciado y gradual frente a la mortalidad de *T. castaneum*. Con este tipo de comportamientos se demuestra la gran versatilidad de los AEs evaluados en la presente investigación. **4)** Es importante destacar que no se evidencia una tendencia uniforme en las CL_{90} de cada AE, por lo tanto, en términos de reproducibilidad de los datos, es importante siempre optar por la concentración letal que afecta al 50% de los organismos.

Los resultados de CLs ya mencionados se compararon con la actividad fumigante que previamente se ha reportado para los AEs utilizados en la presente investigación como se muestra en la **Tabla 2.4**. Es importante tener en cuenta que los resultados de dicha actividad, reportados en la literatura, se presentan en diferentes unidades de concentración ($\mu\text{L/L}$, $\mu\text{L}/\text{cm}^3$, mg/L , mg/mL y %), lo cual dificulta su comparación.

Tabla 2.4. Reportes de actividad fumigante de los AEs promisorios.

Cod.	Aceite esencial	AF en esta investigación *	AF reportada	Referencia
a1	<i>F. vulgare</i>	16.234	CL ₅₀ = 2.8 $\mu\text{L/L}$ aire a 24 h CL ₅₀ = 91.28 $\mu\text{L/L}$ aire a 24	(Khorrami, et al., 2018) (Amini, et al., 2018)
a2	<i>Z. monophyllum</i>	18.537	CL ₅₀ = 69.8 $\mu\text{L/L}$ aire a 24 h	(Prieto, 2012)
a3	<i>A. dracuncululus</i>	22.775	CL ₅₀ = 67.2 $\mu\text{L/L}$ aire a 24 h	(Shojaei, et al., 2017)
a4	<i>E. cardamomum</i>	29.371	CL ₅₀ = 482.7 mg/cm^3 L aire a 24 h Mort. = 20 % con 20 $\mu\text{L/mL}$ a 48 h CL ₅₀ = 3.33 % a 72 h	(Abbasipour et al., 2011) (Alcala, et al., 2019) (Tarigan, et al., 2016)
a5	<i>L. angustifolia</i>	34.144	CL ₅₀ = 50 $\mu\text{L/L}$ aire a 7 días	(Shaaya, et al., 1997)
a6	<i>P. aduncum</i>	41.910	NR	-
a7	<i>P. nigrum</i>	43.906	15.2 $\mu\text{L/mL}$ aire a 24 h	(Padhyay, et al., 2007) (Chaubey, 2007)
a8	<i>P. eriocladium</i>	58.288	NR	-
a9	<i>H. juniperinum</i>	67.269	NR	-
a10	<i>P. anisum</i>	79.162	CL ₅₀ = 43.75 $\mu\text{L/L}$ aire a 24 h Mort. = 100 % con 128 $\mu\text{L/L}$ a 24 h	(Amini, et al., 2018) (Mikhaiel, 2011)
a11	<i>L. origanoides</i>	87.710	Mortalidad = 42 % con 20 $\mu\text{L/mL}$ a 48 h	(Alcala, et al., 2019)
a12	<i>P. aequale</i>	92.300	NR	-
a13	<i>L. alba</i>	107.691	CL ₅₀ = 28.7 $\mu\text{L/mL}$	(Peixoto et al., 2015)
a14	<i>M. fragrans</i>	115.253	CL ₅₀ = 14.23 μL	(Shukla, et at 2009)
a15	<i>C. sinensis</i>	138.325	CL ₅₀ = 24.5 mg/L aire a 24 h CL ₅₀ = 35 $\mu\text{L/L}$ a 28 h CL ₅₀ = 0.130 mg/cm^3 a 24 h	(Abdelgaleil, et al., 2012) (El-bakry et al., 2016) (Kim & Lee, 2014)
a16	<i>cupressus sp.</i>	152.298	35.81 mg/L aire a 24 h 38.07 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ a 24 h	Abdelgaleil, et al., 2015) (Hammoda et al., 2018)
a17	<i>S. molle</i>	160.045	CL ₅₀ = > 50 mg/L aire a 24 h	Abdelgaleil, et al., (2015)
a18	<i>R. officinalis</i>	191.491	CL ₅₀ = 31.24 mg/L aire a 24 h	(Abdelgaleil, et al., 2015)
a19	<i>H. mexicanum</i>	229.065	NR	-
a20	<i>Eucalyptus sp.</i>	232.759	NR	-
a21	<i>O. basilicum</i>	234.012	CL ₅₀ = 0.020 mg/cm^3 a 24 h Mort. = 100 % con 128 $\mu\text{L/L}$ a 24 h	(Kim & Lee, 2014) (Mikhaiel, 2011)
a22	<i>X. discreta</i>	237.229	NR	-
a23	<i>C. album</i>	264.586	NR	-

*AF: Actividad fumigante reportada en CL₅₀ ($\mu\text{L/L}$ aire) a 24 h

NR = No reportes en motores de búsqueda especializados como Scifinder y Scopus

Se encontró que, de los 23 AEs evaluados en la presente investigación, siete no tienen reportes de actividad fumigante sobre *T. castaneum* y corresponden a los AEs de las especies: *P. aduncum*, *P. eriocladum*, *H. juniperinum*, *P. aequale*, *H. mexicanum*, *Eucalyptus sp*, *X. discreta* y *C. album*, por lo tanto, en este trabajo se reporta por primera vez dicha actividad.

2.3.3. Caracterización química de los AEs promisorios

En la **Tabla 2.5** se muestra la composición química de los 23 AEs promisorios determinada mediante GC-MS. Dicho análisis permitió la identificación tentativa de un total de 123 compuestos, que conforman, aproximadamente, entre el 85 y 90% de la composición de los AEs analizados. En la tabla los compuestos están organizados con base al orden de elución en la columna HP-5MS. Se evidencia, además, que el 95 % de estos constituyentes pertenecen solo a dos grupos de metabolitos secundarios: Terpenos y fenilpropanos. El restante 5% son compuestos de diversa índole química como hidrocarburos, aldehídos, ésteres, cetonas entre otros. Cada tipo de compuesto se representa en la tabla con un color de fondo característico.

N	Compuesto	IR ^a	IR ^b	IR ^c	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	a13	a14	a15	a16	a17	a18	a19	a20	a21	a22	a23
24	eucaliptol	1037	1217	1031	-	-	-	30.8	71.9	-	-	-	-	1.07	0.9	-	-	0.32	-	-	-	17.1	-	43.9	0.88	12.5	-
25	trans-beta-ocimeno	1047	1259	1050	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10.3
26	γ-terpineno	1062	1253	1059	-	-	-	0.55	-	-	0.3	-	0.27	0.16	13.3	3.29	-	3.98	-	3.65	0.11	1.05	-	0.26	0.13	-	15
27	octanol	1073	1519	1068	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-	-	-	-	-	-
28	cis-hidrato de sabineno	1074	ne	1071	-	-	-	0.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.63	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-
29	terpinoleno	1089	1291	1088	-	-	-	0.12	-	-	0.1	-	0.09	0.17	-	1.95	-	1.6	-	-	-	0.67	-	-	-	-	-
30	fenchona	1095	1409	1086	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	linalol	1095	1555	1096	-	7.4	0.51	8.3	-	-	0.7	-	-	1.3	0.34	-	0.6	0.38	3.69	-	-	0.33	-	-	14.2	-	2.8
32	nonanal	1099	1402	1100	-	-	-	-	-	-	-	-	2.25	-	-	-	-	-	0.36	-	-	-	-	-	-	-	-
33	n-undecano	1100	ne	1100	-	-	-	-	-	-	-	-	0.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.12	-	-	-	-
34	ácido isovalérico	1103	1627	1101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.27	-	-	-
35	isovalerato de 2-metilbutilo	1110	ne	1112	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.28	-	-	-
36	fenchol	1115	1593	1116	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	-	-	-
37	canfonelal	1125	1503	1126	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-
38	trans-pinocarveol	1137	1641	1139	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.45	-	-	-
39	trans-sabinol	1143	1820	1142	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.17	-
40	trans-verbenol	1145	ne	1144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	-	-	-	0.1	-
41	citronenal	1150	1488	1153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-
42	alcanfor	1154	1532	1146	-	-	-	-	9.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11.5	-	-	-	-	-
43	pinocarvona	1163	1583	1164	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.01	-	-	-
44	δ-Terpineol	1167	1584	1162	-	-	-	0.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	borneol	1175	1685	1169	-	-	-	-	6.5	-	-	-	-	-	0.12	-	0.54	-	-	-	-	-	-	0.17	-	-	-
46	terpinel-4-ol	1186	1613	1177	-	-	-	2.16	-	-	-	-	-	0.71	1.17	-	-	6.61	-	-	0.09	-	-	0.39	0.09	0.21	0.32
47	α-terpineol	1188	1711	1188	-	-	-	3.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.52	-	-	-	1.26	-	1.17	0.14	-	0.51
48	mirtenol	1191	1767	1195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-
49	mirtenal	1196	1612	1195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	γ-terpineol	1199	1696	1199	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	trans- dihidrocarvona	1200	ne	1200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	estragol	1202	1696	1196	-	-	88.5	-	-	-	-	-	-	2.21	-	-	-	-	-	-	0.13	-	-	-	22.3	-	-
53	trans-piperitol	1205	1651	1208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	decanal	1207	1508	1201	-	-	-	-	-	-	-	-	3.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.24	-	-	-	-
55	cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	1225	ne	1227	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.67	-	-	-
56	cis-carveol	1229	ne	1229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.46	-	-	-	-	-	-	0.24	-	-	-

N	Compuesto	IR ^a	IR ^b	IR ^c	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	a13	a14	a15	a16	a17	a18	a19	a20	a21	a22	a23
57	β-citral	1240	1706	1235	-	-	-	0.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	acetato de linalol	1249	1555	1257	-	-	-	9.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	carvona	1250	1753	1243	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	3-carvomentenona	1252	ne	1252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	trans-geraniol	1255	1847	1252	-	1.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	p-anisaldehido	1266	2011	1250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	α-citral	1272	1748	1267	-	-	-	1.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-	-	-
64	acetato de bornilo	1285	1592	1288	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.13	-	-	-	5.89	-	-	-	0.17	-
65	anetol	1289	1846	1284	60.9	-	-	-	-	-	-	-	0.31	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	timol	1290	2199	1290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.54	-	-
67	2-undecanona	1291	ne	1294	-	-	-	-	-	-	-	-	1.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
68	safrol	1295	1898	1287	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	79.1	-	1.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	carvacrol	1298	2232	1299	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	α-longipineno	1334	1539	1352	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-
71	δ-elemeno	1338	1477	1338	-	-	-	-	-	-	1.87	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	trans-acetato de carvilo	1339	1759	1342	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
73	piperitona	1340	1944	1252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	acetato de α-terpinil	1350	1714	1349	-	-	-	27.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	α-cubebeno	1351	1463	1348	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	-	-	-	-	-	0.36	0.11	-
76	acetato de 2-Hidroxicineol	1358	ne	1362	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-	-
77	acetato de geraniol	1381	1768	1381	-	-	-	0.21	-	-	-	-	7.93	-	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
78	acetato de carvacrol	1381	1868	1370	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	ciclosativeno	1384	1470	1371	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.67	-	-	-	-
80	α-copaeno	1385	1500	1376	-	-	-	-	-	15.6	0.08	-	0.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.54	-	1.02	-	-
81	ácido cinámico	1389	ne	1454	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
82	β-bourboneno	1395	1542	1388	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.45	-	-	-	-	-	-	-	0.14	-	-
83	metileugenol	1399	2003	1403	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.56	-	-	-	-	-	-	0.08	-	0.16
84	β-elemeno	1406	1599	1390	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.38	-	-	-	-	-	0.27	-	4.7	-	-

N	Compuesto	IR ^a	IR ^b	IR ^c	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	a13	a14	a15	a16	a17	a18	a19	a20	a21	a22	a23	
85	β-copaeneo	1426	1500	1420	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4	-	-	
86	cis-β-farnesano	1428	1679	1442	-	-	0.16	-	-	42.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.13	-	-	
87	β-cariofileno	1428	1610	1419	-	-	0.61	-	-	-	24.4	-	13.6	0.15	3.73	-	-	0.25	3.65	-	1.73	5.84	2.48	1.28	1.07	0.19	2.15	
88	α-santaleno	1433	1581	1417	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.99	-	-	-	-	
89	aromadendreno	1439	1619	1441	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.74	-	-	-	
90	α-guaineno	1440	1650	1439	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.37	-	-	
91	β-calareno	1445	ne	1448	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.32	-	-	-	
92	trans-α-bergamoteno	1447	1594	1434	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.66	0.57	-	
93	cis-metilisoeugenol	1461	2070	1453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
94	alloaromandreno	1469	1661	1458	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.32	-	-	-	
95	α-cariofileno	1474	1641	1454	-	-	-	-	-	-	-	-	6.06	-	-	-	-	-	0.49	-	0.67	0.82	-	0.69	3.65	-	0.25	
96	γ-muuroleno	1477	1725	1479	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.45	-	-	-	-	0.12	-	
97	germacreno-D	1490	1726	1485	-	0.09	1.17	-	-	-	1.04	-	-	-	-	-	14.2	0.21	-	-	0.16	-	-	-	8.86	0.42	0.91	
98	curzereno	1496	1888	1499	-	-	-	-	-	-	1.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
99	cis-α-bisaboleno	1504	1741	1506	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.52	-	
100	ledene	1505	ne	1507	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.95	-	-	-	
101	azuleno	1508	1706	1298	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.75	-	-	
102	β-bisaboleno	1509	1740	1505	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09	0.34	-	
103	cubebol	1513	1929	1515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
104	γ-cadineno	1513	1770	1513	-	-	-	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.92	-	-	-	3.95	-	-	
105	miristicina	1518	2293	1518	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
106	δ-amorfeno	1519	1710	1512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.82	-	-	-	-	-	-	
107	isoledeno	1541	ne	1541	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.25	-	-	0.29	-	-	0.13	
108	(z)-nerolidol	1543	2030	1532	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
109	elemicina	1554	2226	1557	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.76	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
110	germacreno-B	1561	1847	1561	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.61	1.07	-	
111	espatulenol	1576	2138	1578	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.23	0.12	
112	globulol	1579	2104	1590	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.76	-	-	-	
113	oxido de cariofileno	1581	2006	1582	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.98	-	0.13	-	-	-	-	-	0.73	-	-	0.27	0.13	-
114	epóxido de humeleno	1606	ne	1608	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115	epicubenol	1627	2025	1628	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.96	-	1.85	
116	isoespatulenol	1631	ne	1629	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	-	
117	τ-Cadinol	1640	2187	1640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.6	-	-	

N	Compuesto	IR ^a	IR ^b	IR ^c	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	a12	a13	a14	a15	a16	a17	a18	a19	a20	a21	a22	a23
118	α-cadinol	1653	2224	1654	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.18
119	xantoxilino	1660	ne	1668	-	2.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	apiol	1674	2506	1678	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	-	-
121	α-bisabolol	1701	2235	1685	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	-	-
122	farnesol	1722	2315	1723	-	4.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
123	cembreno	1961	2207	1938	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.55	-	-	-	-
					<i>F. vulgare</i>	<i>Z. monophyllum</i>	<i>A. dracunculus</i>	<i>E. cardamomum</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>P. aduncum</i>	<i>P. nigrum</i>	<i>P. eriocladium</i>	<i>H. juniperinum</i>	<i>P. anisum</i>	<i>L. organoides</i>	<i>P. aequale</i>	<i>L. alba</i>	<i>M. fragrans</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>cupressus sp.</i>	<i>S. molle</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>H. mexicanum</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>	<i>O. basilicum</i>	<i>X. discreta</i>	<i>C. album</i>
	monoterpenos				21.8	89.6	6.2	96.7	96.0	38.6	57.2	95.9	22.3	10.1	78.7	15.6	73.8	87.6	77.7	96.5	38.9	84.9	26.1	73.5	16.4	79.1	82.1
	Fenilpropanos				60.9	0.0	88.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	77.4	2.5	79.1	0.0	8.4	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	24.1	0.0	0.2
	sesquiterpenos				0.0	8.4	1.9	0.1	0.0	58.1	28.5	0.0	19.8	0.3	5.6	0.0	17.3	0.6	4.1	0.0	15.0	7.4	5.0	17.4	43.9	10.9	5.6
	otros compuestos				0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	23.1	8.7	0.0	0.0	0.2	0.0	4.7	0.0	0.0	0.0	56.8	1.6	3.8	0.0	0.0
	diterpenos				0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	total				82.7	98.0	96.7	97.3	96.0	96.7	85.7	95.9	65.6	96.5	86.7	94.7	91.2	96.6	86.5	96.5	54.0	92.2	92.4	92.4	88.1	89.9	87.9

IR^a = índices de retención lineal calculados con la columna apolar HP-5MS

IR^b = índices de retención lineal calculados con la columna polar HP-INNOWAX

IR^c = índices de retención lineal teóricos obtenidos en "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy", 4ta Edición.

(Adams, 2012).

ne = no encontrado en la literatura

- = Ausente

Como se observa en la **Tabla 2.5** la composición química de los AEs promisorios es muy diversa, destacándose compuestos de tipo monoterpeno, sesquiterpeno, fenilpropano e hidrocarburo. Grosso modo, se puede establecer que del total de los AEs analizados el 65% son de naturaleza monoterpénica, con compuestos representativos como α -pineno, limoneno, sabineno, γ -terpineno, β -pineno y 1,8 cineol, los cuales han sido reportados con actividad fumigante sobre *T. castaneum* (Tripathi et al., 2009; Lee, et al., 2002). El 18% son de naturaleza fenilpropánica, en los que se pueden encontrar compuestos como estragol, anetol, apiol y miristicina; de los cuales, solo a los dos primeros se les ha reportado actividad fumigante contra *T. castaneum* (Olmedo et al., 2015). El 9% son de naturaleza sesquiterpénica, donde hay presencia de compuestos representativos como β -cariofileno, α -cariofileno, germacreno D, α -copaeno, α -cadinol y óxido de cariofileno los cuales tienen reporte de actividad fumigante contra el insecto mencionado (Khani & Heydarian, 2014). El restante 8% de los AEs están constituidos por otros compuestos donde se destacan hidrocarburos alifáticos y otros compuestos oxigenados de los cuales no se reporta actividad insecticida contra dicho insecto. Es importante aclarar que la composición química de los 23 AEs promisorios ya fue reportada previamente, y en gran medida coincide con los reportes en la literatura, estando de acuerdo con la quimiotaxonomía del género y la familia a la que pertenecen.

A continuación, se presenta una comparación donde se relacionan la composición química de los AE promisorios (**Tabla 2.5**) con los resultados de su actividad fumigante y se comparan, además, con algunos reportes en la literatura (**Tabla 2.4**).

En primer lugar, es posible realizar algunas apreciaciones de los AEs más activos (**a1-a7**). Estos son principalmente monoterpénicos con componentes mayoritarios típicos como α -pineno, limoneno, sabineno, γ -terpineno, β -pineno y 1,8 cineol, Sin embargo, entre estos AEs se encuentran los de las especies *F. vulgare* y *A. dracuncululus* (**a1** y **a3**) que tienen concentraciones importantes de fenilpropanos como el anetol y estragol, respectivamente.

Si bien, de las especies mencionadas se tienen reportes de actividad fumigante sobre *T. castaneum*, existen diferencias con los resultados expuestos en la presente investigación. Por ejemplo, para **a1** hay dos publicaciones recientes de actividad fumigante, en la primera se reporta una CL_{50} de 91.8 $\mu\text{L}/\text{L}$ aire (Amini, et al., 2018) valor mucho más alto que el encontrado en esta investigación que correspondió a 17.0 $\mu\text{L}/\text{L}$ aire. Dicha diferencia se puede deber a la variabilidad en la composición química entre ambos AEs, donde se encontró que el AE reportado por Amini y colaboradores tiene un contenido menor de

anetol. En el segundo reporte la actividad fumigante fue de 2.8 $\mu\text{L/L}$ aire (Khorrami, et al., 2018); mucho menor a la expuesta en el presente trabajo. No obstante, en la publicación de Khorrami, no se hace una caracterización química del AE utilizado por lo tanto no es posible hacer una comparación respecto a su composición.

De igual manera, para el caso de **a3** se tienen reportes de toxicidad fumigante con CL_{50} de 67.2 $\mu\text{L/L}$ aire (Shojaei, et al, 2017), esta contrasta con la CL_{50} que reportamos para este AE que fue de 22.7 $\mu\text{L/L}$ aire. Esta diferencia puede deberse a que el contenido de estragol en **a3** es mayor a la que se reportó por Shojaei y colaboradores, ya que entre mayor sea la concentración, tanto del anetol o del estragol, mayores serán los efectos sobre la mortalidad del insecto objeto de estudio (Olmedo, et al., 2015). Lo mismo ocurre con el AE de *P. anisum* (**a10**) cuyo componente mayoritario fue el anetol (75 %) y tuvo una CL_{50} de 79.2 $\mu\text{L/L}$ aire. Tanto la composición como la letalidad mostrada, para este AE, coinciden con reportes ya establecidos sobre *T. castaneum* (Mikhael, 2011).

Para el AE de *Z. monophyllum* (**a2**) se encontraron, mayoritariamente, compuestos como α -pineno (6.7 %), β -pineno (35.3 %), β -ocimeno (7.93 %) y linalol (10.8%) y se estimó una CL_{50} de 18.5 $\mu\text{L/L}$ aire. Este es el segundo reporte en Colombia para la actividad fumigante de *Z. monophyllum* contra *T. castaneum*, ya que se tiene uno previo donde la CL_{50} , fue casi tres veces mayor (69,8 $\mu\text{L/L}$ aire) (Prieto, 2012). Sin embargo, en el estudio de Prieto, la composición química del AE es muy diferente respecto al que se utilizó en esta investigación; dicha diferencia puede deberse a varios factores entre los que destacan la ubicación geográfica, la temporada de recolección, las condiciones medioambientales y el estado nutricional de la planta (Özcan & Chalchat, 2006).

Ahora bien, para el AE de *E. cardamomum* (**a4**) los componentes mayoritarios fueron 1,8-cineol (30,08%), acetato de linalol (9.24%) y acetato de α -terpineol (27.8%) Esta composición es similar con otros reportes realizados para el AE de la especie (Alcala, et al., 2019). Sin embargo, con respecto a su mortalidad sobre el insecto, hay diferencias importantes con nuestros resultados, ya que en el reporte de Alcala y colaboradores la actividad fumigante no fue muy buena (mortalidad del 10 % de los insectos tratados) mientras que en nuestro caso el AE estuvo entre los más activos (CL_{50} = 23.4 $\mu\text{L/L}$ aire). Por otro lado, se tiene otro reporte que mostró una menor actividad fumigante con una CL_{50} de 482.70 mg/cm^3 (Abbasipour, et al., 2011). Dicha diferencia en la actividad fumigante puede deberse a que la metodología del bioensayo utilizada por Abbasipour y

colaboradores ya que los insectos están en contacto directo con el AE, pareciéndose más a un ensayo de toxicidad por contacto que fumigante.

Por otro lado, el AE de *L. angustifolia* (**a5**) mostró una buena actividad fumigante con una CL_{50} de 34,1 $\mu\text{L/L}$ aire; la cual se corrobora en otro reporte en el que se concluyó que la CL_{50} fue de 15 $\mu\text{L/L}$ aire (Shaaya, et al., 1997). Con respecto a la composición el **a5** tuvo 1,8-cineol (71.9%), alcanfor (9.96%), limoneno (2.67) y borneol (6.5%) como constituyentes mayoritarios. No obstante, en el estudio de Shaaya y colaboradores no se hace especificidad sobre la composición del AE que utilizaron y por lo tanto se imposibilitó realizar una comparación entre ésta y la mortalidad del AE sobre el insecto. Sin embargo, existe el reporte de la actividad fumigante de dichos componentes mayoritarios evaluados individualmente sobre *T. castaneum*, en el cual se pudo evidenciar que sustancias como 1,8-cineol, borneol y alcanfor causaron, a 138 $\mu\text{L/L}$ aire, una baja mortalidad en *T. castaneum* (Rozman, et al., 2007). Lo que hace pensar que la actividad fumigante es mayor aplicando el AE que los compuestos individuales, lo que se puede deber a procesos de sinergismo que potencian la mortalidad en el insecto (Tripathi et al., 2009).

Para el AE de *L. origanoides* (**a11**) sus componentes mayoritarios fueron timol (30.1 %), β -mirreno (4.5%), p-cimeno (17.6%), γ -terpineno (13.3%) α -felandreno (25.4%). Esta composición coincide con la reportada para el AE quimiotipo timol, expuesta en otra investigación (Durán, et al., 2015). Con respecto a la actividad fumigante de **a11** se encuentra que tiene una CL_{50} de 85.71 $\mu\text{L/L}$ aire, constituyéndose en el primer reporte de actividad fumigante empleando la metodología de "vial en vial". Sin embargo, en otra investigación se concluyó que, para generar mortalidad en *T. castaneum*, la concentración y el tiempo de exposición de dicho AE deben ser muy altos (Caballero, et al., 2012), por lo que los autores del estudio consideraron que su toxicidad fue baja. No obstante, cabe aclararse que, la metodología del bioensayo de toxicidad utilizada por Caballero y colaboradores fue diferente en su estudio ya que se asemeja más a un bioensayo de toxicidad por contacto que fumigante.

En el AE de *P. nigrum* (**a7**) los componentes mayoritarios fueron β -cariofileno (24.4%), limoneno (15.3%), sabineno (13.7%), β -pineno (8.3%) y α -pineno (5.1%). La anterior caracterización es similar, tanto en componentes como en su abundancia, con diferentes AEs de pimienta negra (Orav, et al., 2004). Aunque se reportó una buena actividad fumigante para **a7** (CL_{50} de 43,90 $\mu\text{L/L}$ aire) sobre *T. castaneum*, existen estudios donde se reportan valores de CL_{50} inferiores (Ravi, et al, 2007; Chaubey, 2007).

Con respecto al AE de *L. alba* (**a13**) tuvo como componentes mayoritarios limoneno (20.5 %) y carvona (45.8%). Esta composición es bastante similar a la encontrada en estudios previos (Caballero, et al., 2011; Patiño, 2017). En relación con la actividad fumigante este AE tuvo una CL_{50} de 107.7 $\mu\text{L/L}$ aire. Dicha actividad es similar a otra reportada donde se tuvo una CL_{50} de 19.9 $\mu\text{L/mL}$ (Peixoto et al., 2015). Dicha letalidad puede deberse a la presencia mayoritaria del monoterpeno carvona que, en el mismo estudio de Peixoto y colaboradores, presentó una buena actividad fumigante ($CL_{50} = 8.8 \mu\text{L/mL}$).

El AE de *M. fragrans* (**a14**) α -pineno (12,4 %), sabineno (26,1 %), β -pineno (10 %) limoneno 10 % safrol (1,4 %) y miristicina (2.7 %). Esta composición coincide con otras previamente reportadas para la especie (Mughtaridi, et al., 2010; Jukic, et al., 2006). Con respecto a la actividad fumigante, este AE tuvo una CL_{50} de 115.253 $\mu\text{L/L}$ aire. No obstante, este AE no tiene reportes de actividad fumigante utilizando la metodología de vial en vial descrita en la presente investigación. Sin embargo, hay un reporte de actividad fumigante donde la CL_{50} de 14.23 μL (Shukla, et al., 2009). El anterior valor es discrepante en sus unidades ya que no se expresa el volumen en el que se encuentra el AE y, por lo tanto, no se puede interpretar como concentración. Además, de la publicación hecha por Shukla y colaboradores solo encuentra disponible su resumen, lo que dificultó hacer una comparación entre los dos trabajos.

Para el caso del AE de *C. sinensis* (**a15**) los componentes mayoritarios fueron limoneno (68.7%) β - mirceno (3.2 %) y linalol (3.7%). Dicha composición coincide con otros reportes hechos sobre este cítrico, en los cuales el componente predominante es limoneno (Abdelgaleil, et al., 2012; Abou-Taleb et al., 2016) . Sin embargo, la cantidad de dicho compuesto puede fluctuar con respecto a las condiciones ambientales y nutricionales con las que crece la planta (Durán, et al., 2012). Con relación a la actividad fumigante, dicho AE tuvo una CL_{50} de 138.3 $\mu\text{L/L}$ aire, la cual contrasta con otros estudios con reportes de CL_{50} de 24 $\mu\text{L/L}$ aire (Abou-Taleb et al., 2016) y 35 $\mu\text{L/L}$ aire (El-bakry et al., 2016). Dicha diferencia en la actividad fumigante puede deberse a que, en ambas investigaciones del 2016, la cantidad relativa de limoneno presente en los AEs fue mayor al 96 % y se sabe que la abundancia de dicho componente puede incidir sobre la mortalidad del *T. castaneum* (Kim & Lee, 2014).

Por su parte, para el AE de *S. molle* (**a17**) los componentes mayoritarios fueron α -felandreno (14%), p-cimeno (4.5%) y β -mirceno (6.7%). Dicha composición es similar a la

reportada previamente encontrándose algunas variaciones en la abundancia de los componentes mayoritarios (Abdel, et al., 2010; Abou-Taleb et al., 2016; Benzi, et al., 2009). La mayoría de reportes de actividad insecticida de *S. molle* sobre *T. castaneum* son por contacto (Abdel, et al., 2010); Sin embargo, en un estudio reciente se reportó la actividad fumigante con una CL_{50} mayor a los 50 mg/L aire (Abdelgaleil, 2017), hecho que se corrobora con la actividad obtenida en esta investigación ($CL_{50} = 160.045 \mu\text{L/L}$ aire).

De igual manera para el AE de *R. officinalis* (**a18**), constituido mayoritariamente por α -pineno (14.9%), alcanfor (11.5%), 1,8 cineol (17.1%), canfeno (9.3%). Esta composición coincide con reportes previos sobre el AE (Abdelgaleil, et al., 2017; Khoobdel, et al., 2017) (Caballero et al., 2011). Ahora bien, con respecto a la actividad fumigante de **a18**, se tuvo una CL_{50} de 191.49 $\mu\text{L/L}$ aire. Esta actividad es más baja en comparación a otro estudio en el que se obtuvo una CL_{50} de 31.24 mg/L aire (Abdelgaleil, et al., 2017). Esta diferencia se puede deber a que el AE usado por Abdelgaleil y colaboradores tiene un mayor contenido de 1,8 cineol y alcanfor, compuestos ampliamente reconocidos como fumigantes contra *T. castaneum* (Lee, et al., 2002).

Para el caso del AE de *O. basilicum* (**a21**) los componentes mayoritarios fueron linalol (14.2%), estragol (22.3%), germacreno D (8.9%) y β -farnesano (4.1%). Esta composición es similar a otras reportadas sobre el AE de esta especie (Kim & Lee, 2014). Con respecto a la actividad fumigante la CL_{50} fue de 234.012 $\mu\text{L/L}$ aire. Existen, reportes de actividad fumigante para éste AE donde la CL_{50} fue 128 $\mu\text{L/L}$ aire (Mikhaiel, 2011); la cual fue menor a la mostrada en nuestra investigación. Esta diferencia se puede deber a que los componentes mayoritarios, del AE utilizado en la investigación de Mikhaiel, fueron diferentes a los del AE utilizado en nuestra investigación.

Los AEs de *H. juniperinum* (**a9**) e *H. mexicanum* (**a19**) se caracterizaron por presentar como compuestos mayoritarios hidrocarburos alifáticos como el nonano, decano y el 2-metiloctano. Esta composición química rica en hidrocarburos coincide con la composición reportada en especies de la familia Hypericaceae cuyos AEs se suelen usar como combustibles (Stashenko & Pino, 2011). Con respecto a la actividad fumigante sobre *T. castaneum* los mencionados AEs tuvieron CL_{50} de 66.53 y 200.43 $\mu\text{L/L}$ aire, respectivamente. Es importante destacar que para ambas especies no se tiene reporte de actividad fumigante contra *T. castaneum*. No obstante, hay investigaciones de dichos AEs contra otra plaga de almacén importante como el *S. zeamais* (Patiño, 2017). Por otro lado, se ha evaluado la actividad fumigante sobre *T. castaneum* con otra especie de la familia

Hypericaceae; *H. perforatum*, evidenciándose que tiene efectos insecticidas potenciales (Ashrafi & Ebadollahi, 2016).

Para el caso de los AEs de *P. aduncum* (a6), *P. eriocladum* (a8), *P. aequale* (a12), *L. alba* (a13), *Eucalyptus sp.*, (a20), *X. discreta* (a22) y *C. album* (a23) no se tiene reportes bibliográficos para el control del *T. castaneum*, por lo tanto, la presente investigación es una oportunidad para hacerlo ya que sus valores de CL_{50} estuvieron entre 41.9 y 264.58 $\mu\text{L/L}$ aire. Sin embargo, la composición química de estos AEs si coincide con estudios previos realizados. (Guerrini et al., 2009; Maia et al., 1998; Patiño, 2017).

2.3.4. Agrupamiento clúster

Como se mencionó anteriormente, el análisis clúster que se desarrolló en este capítulo tuvo como fin identificar las características de los AEs que están relacionadas a la mortalidad de *T. castaneum*. Para realizar dicho análisis se incluyeron las características (parámetros) químicas y de respuesta a la actividad de mortalidad de todos los AEs utilizados, es decir, aquella información que se obtuvo en la experimentación ya sea de manera directa o indirecta. En la **Tabla 2.6** se muestran los parámetros utilizados para dicho agrupamiento, los cuales fueron **1)** El porcentaje de abundancia relativa de los tipos de metabolitos secundarios encontrados en los AEs y **2)** las concentraciones letales (CLs) estimadas. Cabe destacar que, al ser el agrupamiento clúster un análisis exploratorio, se decidió ejecutar dos tipos agrupamientos jerárquicos: **1)** Agrupamiento con base al vecino más cercano y **2)** agrupamiento con base al vecino más lejano. Para la visualización de la distribución de los AEs en los diferentes grupos, se utilizaron árboles de clasificación conocidos como dendogramas, que permiten distinguir la configuración de los grupos

Tabla 2.6. Parámetros utilizados para el agrupamiento clúster de los AEs promisorios

Cod.	Aceite esencial	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Fenilpropanos	Otros compuestos	CL ₃₀	CL ₅₀	CL ₉₀
a1	<i>F. vulgare</i>	21.8	0.0	60.9	0.0	12.013	16.234	26.549
a2	<i>Z. monophyllum</i>	89.6	8.4	0.0	0.0	12.279	18.537	33.829
a3	<i>A. dracunculus</i>	6.2	1.9	88.5	0.0	14.726	22.775	42.447
a4	<i>E. cardamomum</i>	96.7	0.1	0.0	0.5	24.05	29.371	42.373
a5	<i>L. angustifolia</i>	96	0.0	0.0	0.0	12.99	34.144	85.842
a6	<i>P. aduncum</i>	38.6	58.1	0.0	0.0	21.08	41.91	92.818
a7	<i>P. nigrum</i>	57.2	28.5	0.0	0.0	24.657	43.906	90.948
a8	<i>P. eriocladum</i>	95.9	0.0	0.0	0.0	19.994	58.288	151.87
a9	<i>H. juniperinum</i>	22.3	19.8	0.3	23.1	40.706	67.269	132.184
a10	<i>P. anisum</i>	10.1	0.3	77.4	8.7	47.934	79.162	155.477
a11	<i>L. origanoides</i>	78.7	5.6	2.5	0.0	51.946	87.71	175.11
a12	<i>P. aequale</i>	15.6	0.0	79.1	0.0	66.9	92.3	154.2
a13	<i>L. alba</i>	73.8	17.3	0.0	0.2	78.528	107.691	178.961
a14	<i>M. fragrans</i>	87.6	0.6	8.4	0	87.401	115.253	183.318
a15	<i>C. sinensis</i>	77.7	4.1	0.0	4.7	116.237	138.325	192.303
a16	<i>cupressus sp.</i>	96.5	0.0	0.0	0.0	128.647	152.298	210.098
a17	<i>S. molle</i>	38.9	15	0.1	0.0	125.666	160.045	244.064
a18	<i>R. officinalis</i>	84.9	7.4	0.0	0.0	148.782	191.491	295.865
a19	<i>H. mexicanum</i>	26.1	5.0	0.0	56.8	179.509	229.065	350.17
a20	<i>Eucalyptus sp.</i>	73.5	17.4	0.0	1.6	200.521	232.759	311.543
A21	<i>O. basilicum</i>	16.4	43.9	24.1	3.8	187.184	234.012	348.451
A22	<i>X. discreta</i>	79.1	10.9	0.0	0.0	200.426	237.229	327.17
A23	<i>C. album</i>	82.1	5.6	0.2	0.0	227.934	264.586	354.157

2.3.4.1. Agrupamiento Tipo I: Clúster con metodología del vecino más cercano

El análisis de vecino más cercano fue el método para clasificar los AEs basándose en el parecido que existe entre sus características, lo que significa que la distancia entre dos AEs es una medida de su similaridad. El dendrograma o agrupamiento obtenido en este caso se muestra en la **Figura 2.5**.

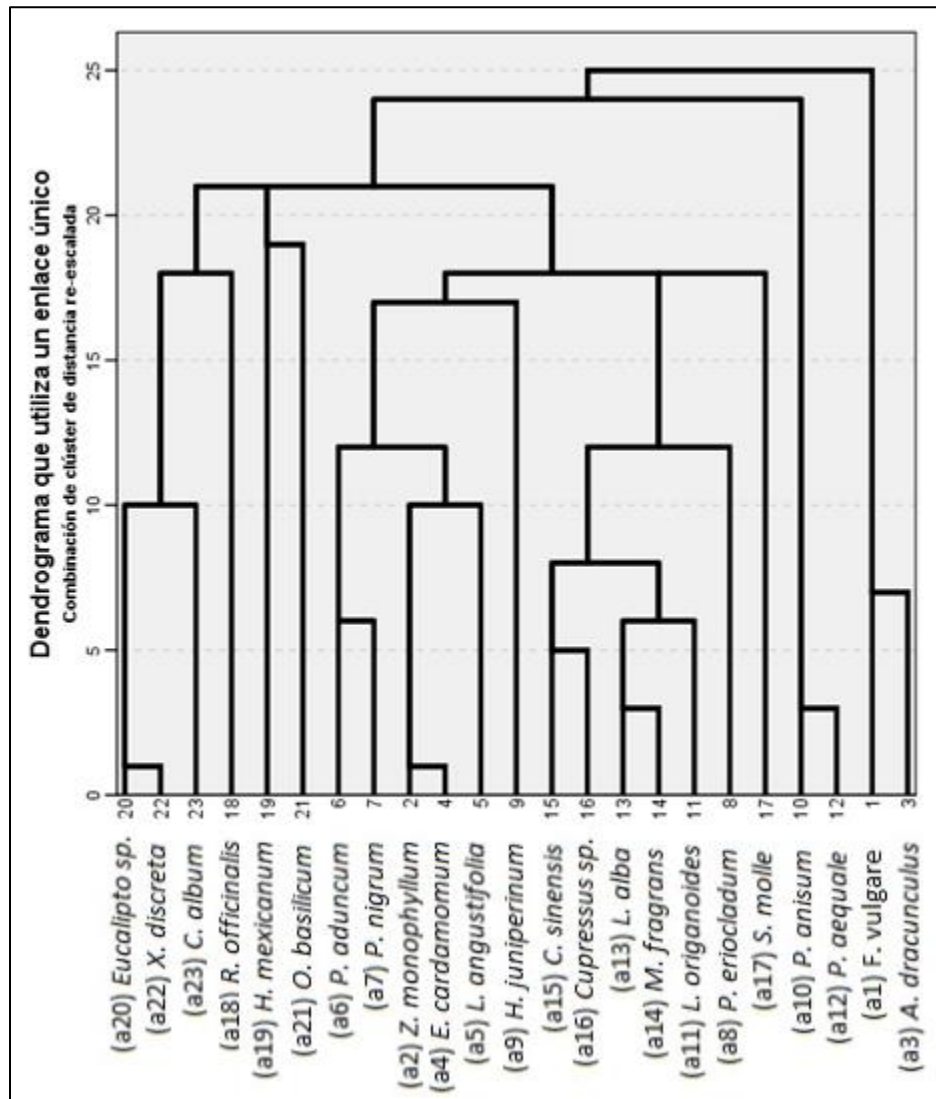


Figura 2.5. Dendrograma de los AEs promisorios con base a la distancia euclidiana entre vecinos más cercanos.

Con base a la anterior figura, se puede apreciar que no hay un patrón de agrupamiento que permita identificar un perfil de AE con determinadas características. Es decir, que utilizando este método de agrupamiento no existe certeza al grupo (o grupos) al que pertenecen los AEs, ya que las distancias de disimilitud entre éstos son muy cortas; por lo tanto, hay características compartidas entre cada uno de ellos. Por ejemplo, en dicho dendograma se muestran agrupamientos confusos como es el caso de **a1** y **a12** (con CLs y composiciones muy diferentes) que, aunque se encuentran muy cerca el uno del otro, no se reconoce un patrón de agrupamiento. Bajo esta misma tendencia se encuentran otros pares de aceites como el caso de **a17** y **a8**; **a9** y **a15**; **a11** y **a8**; entre otros.

La anterior dificultad en el agrupamiento se puede deber a varios factores, pero el principal está relacionado con que todos los parámetros o características que tienen los AEs son significativos para su agrupamiento, por lo tanto, no hay uno que establezca una diferencia clara entre ellos. Esto se corrobora con la ANOVA mostrada en la **Tabla 2.7**, notándose que, exceptuando el parámetro “sesquiterpenos”, todas las características de los AEs tienen una significancia menor a 0.05, por ende, son medidas significativas, y por lo tanto son relevantes a la hora de formar grupos de AEs, lo que indicó que la similaridad entre ellos no es un parámetro que permita clasificarlos.

Tabla 2.7. Resultados de la ANOVA para las variables descriptoras en el agrupamiento de los AEs entre vecinos más cercanos.

Variable	F	Significancia*
CL ₅₀	21.483	< 0.0001
CL ₃₀	19.997	< 0.0001
CL ₉₀	19.621	< 0.0001
Monoterpenos	7.612	< 0.002
Sesquiterpenos	0.998	0.415
Fenilpropanos	123.797	< 0.0001
Otros compuestos	32.827	< 0.0001

* Se considera significativo todos los valores por debajo de 0.05

2.3.4.2. Agrupamiento Tipo II: Clúster con metodología del vecino más lejano

El análisis de vecino más lejano fue el método utilizado para clasificar los AEs con base en sus diferencias. Lo que significa que entre mayor sea la distancia entre dos AEs mayor será la medida de su disimilaridad (diferencia). El dendograma o agrupamiento obtenido en este caso se muestra en la **Figura 2.6**.

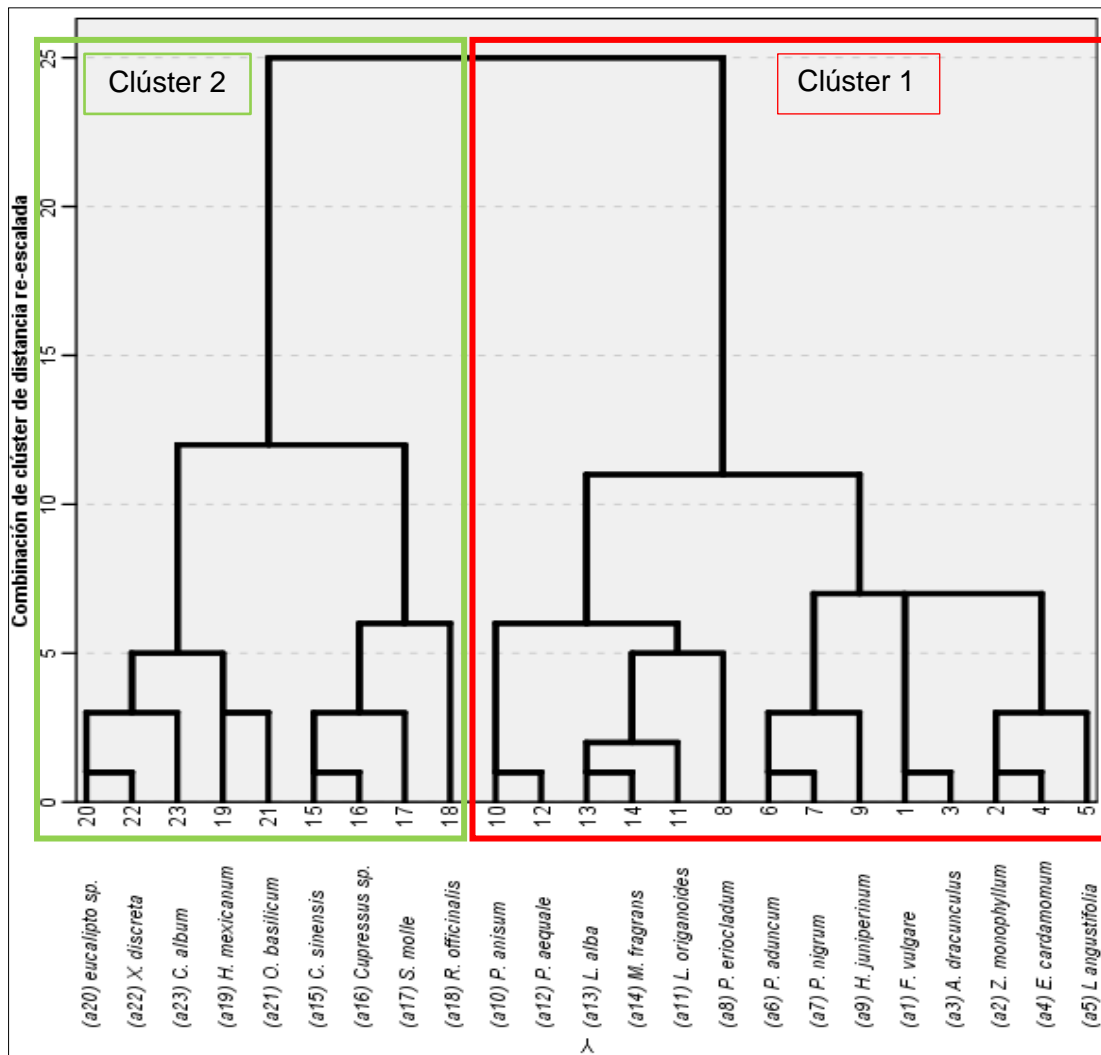


Figura 2.6. Dendograma de los AEs promisorios con base a la distancia euclidiana entre vecinos más lejanos. Rojo: clúster 1. Verde: clúster 2.

Con base en la figura anterior se puede observar que existe un agrupamiento más claro de los AEs, que el observado con el agrupamiento tipo I, ya que en el dendograma (**Figura 2.6**) se observan dos grandes categorías. El **clúster 1** (encerrado en color rojo) en el cual

se encuentran 14 AEs y el **clúster 2** (encerrado en color verde) en el cual se encuentran 9 AEs.

Particularizando en el **clúster 1**, se observa que en éste se encuentran aquellos AEs más activos y que presentan mayor diversidad química. En este grupo se encuentran AEs ricos en monoterpenos (**a2, a4, a5, a8, a11, a13 y a14**), en fenilpropanos (**a1, a3, a10 y a12**), en sesquiterpenos (**a6 y a7**) y en otros compuestos (**a9**). Es importante destacar que a medida que los AEs van desplazándose hacia la izquierda del dendograma, sus similitudes van disminuyendo considerablemente; tal es el caso de los AEs **a5** y **a10**, donde el primero está constituido de monoterpenos (96%) y, el segundo, de fenilpropanos (77.4%) y sus CL_{50} fueron 16.2 y 79.2 $\mu\text{L/L}$ aire, respectivamente.

Por lo tanto, el agrupamiento de los AEs del **clúster 1** se fundamentó, primero, en su buena actividad fumigante sobre *T. castaneum* y, segundo, en la diversidad química de su composición. Dicho comportamiento se puede apreciar gráficamente en la **Figura 2.7** donde se muestra como varía el rango de la composición química y las concentraciones letales.

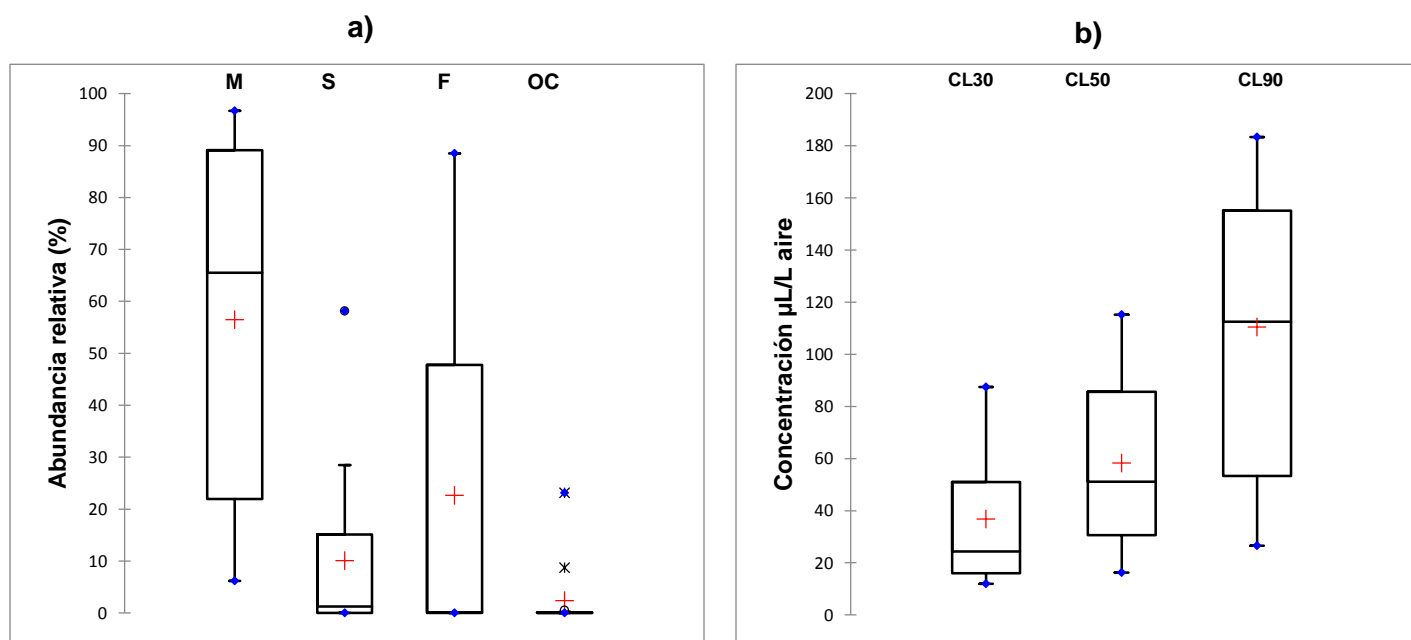


Figura 2.7. Boxplot que compara a) la diversidad química de los AEs (M: monoterpenos, S: sesquiterpenos, F: fenilpropanos y OC: otros compuestos) y b) las CLs de los AEs que hacen parte del clúster 1 (CL₃₀: concentración letal del 30%, CL₅₀: concentración letal del 50% y CL₉₀: concentración letal del 90%)

De igual manera, de la figura anterior se pueden realizar otras apreciaciones: **1)** todos los AEs que conforman el **clúster 1** contienen monoterpenos. **2)** Hay AEs en este clúster que pueden no tener fenilpropanos, sesquiterpenos u otros compuestos. **3)** hay AEs que contienen monoterpenos o fenilpropanos en proporciones mayores al 80 % **4)** la distribución de la CL_{90} es más amplia que la que se observa para CL_{30} y CL_{50} **5)** las CL_{50} de los AEs que hacen parte de este clúster están entre 10 y 120 $\mu\text{L/L}$ aire.

Por otro lado, en el **clúster 2** (encerrado en color verde) se ubicaron los AEs que se caracterizaron por presentar una composición química menos diversa en su mayoría constituidos por monoterpenos. Además, la actividad fumigante de los 9 AEs incluidos en este clúster fue la más baja, con CL_{50} mayores a los 100 $\mu\text{L/L}$ aire. Dicho comportamiento se puede apreciar gráficamente en la **Figura 2.8**.

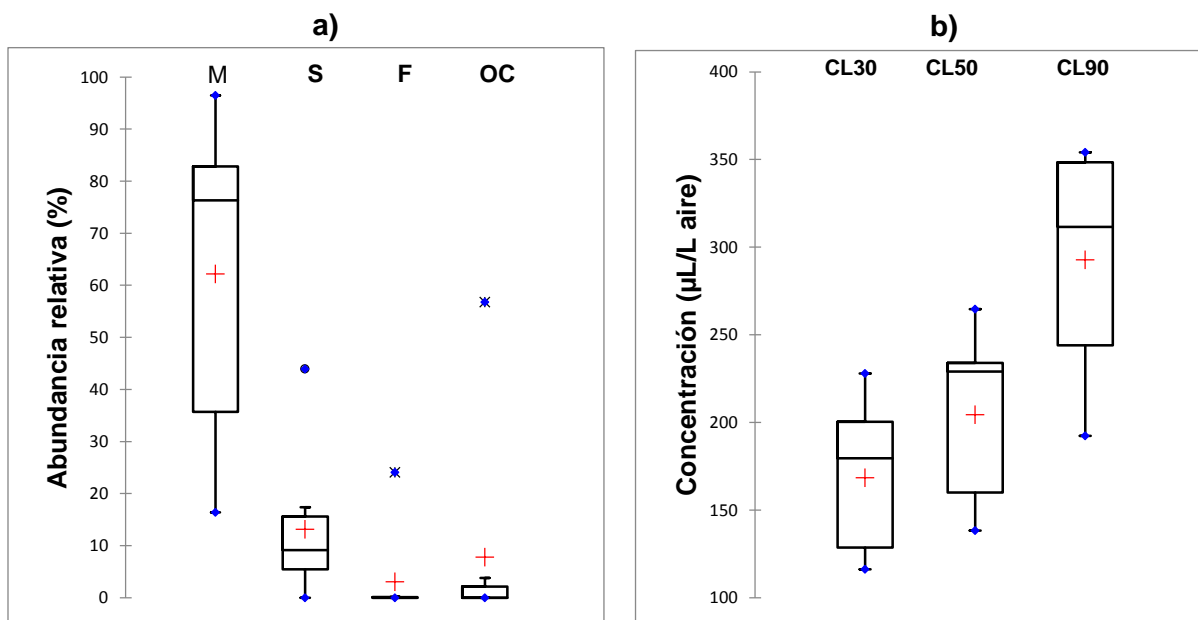


Figura 2.8. Boxplot que compara a) la diversidad química de los AEs (**M**: monoterpenos, **S**: sesquiterpenos, **F**: fenilpropanos y **OC**: otros compuestos) y b) las CLs de los AEs que hacen parte del clúster 2 (**CL₃₀**: concentración letal del 30%, **CL₅₀**: concentración letal del 50% y **CL₉₀**: concentración letal del 90%)

De la figura anterior, también es posible observar que: **1)** todos los AEs que conforman este clúster tienen un porcentaje de monoterpenos mayor al 15% **2)** hay AEs con abundancias de sesquiterpenos entre el 5 y 20 % **3)** los AEs de este grupo no evidencian una cantidad importante de fenilpropanos **4)** la media de las CL_{50} está por arriba de los 200 $\mu\text{L/L}$ aire

Con base en los resultados del análisis clúster tipo II, se pudo inferir que la diversidad química de los AEs está estrechamente relacionada con la respuesta de mortalidad sobre

T. castaneum. Ahora bien, para poder estimar cuales tipos de metabolitos secundarios podrían relacionarse con la mortalidad causada en el insecto, se realizó una ANOVA para discriminar las variables significativas en el agrupamiento realizado. La **Tabla 2.8** muestra la salida con los resultados de dicho análisis. Nótese que los parámetros que muestran valores de significancia por debajo de 0.05 fueron las concentraciones letales y los fenilpropanos. Esto puede llevar a pensar que este tipo de compuestos tienen un efecto destacado en la respuesta de mortalidad del insecto. Las demás variables en el agrupamiento tuvieron valores superiores a 0.05.

Tabla 2.8. Resultados de la ANOVA para las variables descriptoras en agrupamiento de los AEs entre vecino más lejano.

Variable	F	Sig
CL ₃₀	38.363	0.000
CL ₅₀	58.799	0.000
CL ₉₀	97.004	0.000
Monoterpenos	2.007	0.147
Sesquiterpenos	1.239	0.323
Fenilpropanos	5.626	0.006
Otros compuestos	0.922	0.449

* Se considera significativo todos los valores por debajo de 0.05

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados hasta ahora obtenidos se puede hacer una aproximación a las características que debe poseer un AE ideal cuya mezcla de metabolitos potencien la mortalidad sobre *T. castaneum*. Dichas características son la presencia, en mayor medida, de fenilpropanos y de monoterpenos.

2.1. CONCLUSIONES

El presente estudio realizó un aporte al conocimiento mediante la caracterización química de los AE de diferentes especies y la evaluación de la actividad fumigante sobre *T. castaneum*. Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron concluir.

- El tamizaje de actividad fumigante, permitió seleccionar 23 AEs, que mostraron actividad insecticida en un porcentaje $\geq 60\%$, los cuales fueron caracterizados químicamente empleando la técnica GC-MS.
- De los AEs promisorios, el 65% fueron de naturaleza monoterpénica, el 18% de naturaleza fenilpropánica, el 9% de naturaleza sesquiterpénica y el restante 8% de los AEs están constituidos por otros compuestos donde se destacan hidrocarburos alifáticos. No obstante, la composición química de los AEs coincide en gran medida con los reportes hechos previamente en la literatura.
- Se encontró que, de los 23 AEs evaluados en la presente investigación, siete no tienen reportes de actividad fumigante sobre *T. castaneum* y corresponden a los AEs de las especies: *P. aduncum*, *P. eriocladum*, *H. juniperinum*, *P. aequale*, *H. mexicanum*, *Eucalyptus sp*, *X. discreta* y *C. album*, por lo tanto, en este trabajo se reportan por primera vez.
- Se logró observar que los AEs más promisorios para el control de *T. castaneum* fueron los aceites de las especies *F. vulgare*; *Z. monophyllum*; *A. dracunculus*; *E. cardamomum*; *L. angustifolia*; *P. aduncum* y *P. nigrum* ya que estos tuvieron las CL_{50} más bajas con valores inferiores a los 50.0 $\mu\text{L/L}$ aire.
- Con el análisis clúster realizado los AEs se agruparon con claridad de acuerdo con sus disimilaridades. En dicho análisis se notó que entre mayor sea la cantidad de fenilpropanos en la composición de los AEs, mayor será la probabilidad de generar una respuesta de mortalidad sobre *T. castaneum*.

CAPITULO III: EFECTOS DE ACEITES ESENCIALES SOBRE ENZIMAS DE IMPORTANCIA EN EL *T. castaneum*.

3.1. INTRODUCCIÓN

T. castaneum ha generado resistencia a un gran número de insecticidas, por lo que muchos se han vuelto ineficientes por su uso indebido y prolongado (Talukder, 2009). Esto debido a que dichas sustancias tienden a tener un mismo mecanismo de acción, lo que ha generado que el insecto, por sobrevivir, modifique los puntos diana que se ven afectados. (IRAC, 2019). Un ejemplo de esto es que los insecticidas que inhiben enzimas de importancia vital para *T. castaneum* como lo son la acetilcolinesterasa y la citocromo-c-oxidasa (fundamental en la cadena transportadora de electrones) ya no tengan efecto alguno, generándose enzimas como la acetilcolinesterasa insensible cuya estructura modificada es difícil de inhibir (Badii & Garza, 2007). Lo mismo ocurre con las proteínas que son fundamentales en la respiración como el citocromo c oxidada (citocromo IV) cuyas estructuras primarias se ven modificadas para evitar su inhibición (Trdan, 2016) (Pérez, 2012).

Por otro lado, hay estudios que demuestran que el *T. castaneum* ha podido desarrollar resistencia, no solo en la modificación del punto de acción, sino también mediante un aumento en su actividad metabólica, generando con esto la elevación de enzimas que lo desintoxican de los insecticidas. Tal es el caso del aumento en baterías enzimáticas muy representativas como la glutatión-S-transferasa que cataliza la conjugación, de los insecticidas, con glutatión endógeno y facilita su excreción (Molina & Figueroa, 2009). De igual manera, al aumentar el metabolismo de dichos xenobióticos es muy probable que se generen especies reactivas de oxígeno (radicales libres) que deben ser eliminadas del insecto para así evitar daños severos. Esto conlleva a un aumento progresivo de enzimas como la catalasa cuya principal función es descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno evitando daños en los tejidos del insecto.

Los anteriores factores demuestran que los insecticidas sistémicos tienen grandes probabilidades de perder su eficacia. De ahí, que una de las grandes ventajas que tiene el uso de AEs como insecticidas botánicos es que estos pueden alterar la fisiología del insecto

con diferentes modos de acción debido a que son mezclas complejas de terpenos y fenilpropanos (Patiño, 2017; Prieto, 2012). Lo anterior obliga al insecto a recurrir, de manera simultánea, a todos los mecanismos de supervivencia que pueda utilizar, haciendo que la probabilidad de generar resistencia se reduzca sustancialmente, pues activar estos mecanismos (resistencia bioquímica, resistencia por modificación del punto diana, resistencia por penetración reducida o resistencia comportamental) en un mismo momento es verdaderamente difícil para cualquier organismo (Trdan, 2016).

Pese a esto, son aún muy limitados los estudios que se han realizado para conocer los modos de acción de los AEs, especialmente cuando se sabe que pueden afectar cientos de puntos diana. No obstante, la gran mayoría de estudios concuerdan que su acción sobre *T. castaneum* tienden a ser procesos bioquímicos que perturban la biología normal del animal lo que resulta finalmente en su muerte (FAO, 2016a). Tal es el caso de aquellos que tienden a inhibir la actividad catalítica de enzimas que son fundamentales para la supervivencia del insecto como es el caso de la acetilcolinesterasa o de aquellos que inhiben a las enzimas desintoxicantes como lo son la glutatión-S-transferasa y la catalasa. Lo anterior hace evidente la necesidad de entender cómo afecta a los insectos objetivo los insecticidas disponibles y así, optimizar su aplicación y reducir el desarrollo de resistencia (Campolo et al., 2018).

Con base en todo lo anterior, en el presente capítulo, primero, se exponen los resultados de la extracción del homogenizado proteico de *T. castaneum*; segundo, se caracterizó dicho extracto y se determinó la actividad enzimática específica de las enzimas acetilcolinesterasa, glutatión-s-transferasa y catalasa. Tercero, se evaluó la inhibición de la actividad catalítica de dichas enzimas por efecto de los 23 AEs potencialmente activos extraídos de plantas colombianas y, por último, se realizó una caracterización del grupo de los 23 AEs con base en la inhibición que generan en dichas enzimas.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Diseño experimental

El diseño experimental que se desarrolló en el presente capítulo se dividió en dos fases, las cuales se citan a continuación.

Fase I

- i) Obtención del homogeneizado proteico de *T. castaneum*.
- ii) Caracterización de las enzimas acetilcolinesterasa, glutatión-S-transferasa y catalasa en el homogeneizado proteico de *T. castaneum*.
- iii) Estudio de la inhibición catalítica de las enzimas de interés por efecto de los AEs descritos en el capítulo II.
- iv) Estimación de la CI_{50} de aquellos AEs que generaron una inhibición de la actividad catalítica de las enzimas mayor o igual de 0.5.
- v) Agrupamiento clúster para determinar los perfiles de los AEs con respecto a su inhibición catalítica sobre las enzimas de interés utilizando el método de KNN

Fase II

- vi) Agrupamiento de los AEs en función de su actividad inhibitoria y actividad fumigante con base en los resultados de las CL_{50} y los porcentajes de inhibición enzimática, junto con los descriptores utilizados en el capítulo II.
- vii) Determinación de los perfiles de los AEs utilizando el agrupamiento y componentes principales.

3.2.2. Caracterización del homogenizado proteico de *T. castaneum*

3.2.2.1. Enzimas utilizadas

Las enzimas utilizadas como estándares para la elaboración de las curvas de calibración fueron compradas a la empresa Sigma-Aldrich y la **Tabla 3.1** muestra algunas de sus características:

Tabla 3.1. Características de las enzimas utilizadas como patrones en la presente investigación.

Nombre	Procedencia	% proteína	U/mg proteína
Acetilcolinesterasa	Anguila eléctrica	65	376
Glutatió n s transferasa	Hígado equino	71	140
Catalasa	Hígado bovino	71	4918

3.2.2.2. Extracción del homogenizado proteico de *T. castaneum*

Del pie de cría se tomaron 1200 insectos adultos sin sexar (≈ 4 g) y se sumergieron en nitrógeno líquido, posteriormente, se realizó un pretratamiento de limpieza macerando los insectos con acetona fría en una proporción de 1:10 durante 10 min. Luego, el producto macerado se centrifugó a $10000 \times g$ durante 15 min a 4°C en una centrifuga marca *Thermo scientific*®. El pellet resultante se homogenizó con un buffer fosfato 0,1 M a $\text{pH} \approx 7,2$. El homogenizado obtenido se centrifugó a $15000 \times g$ durante 60 min a 4°C . Finalmente se filtró el sobrenadante con lana de vidrio y antes de almacenarse a -20°C se agregó el benzamidina al 3% (Prieto, 2012)

3.2.2.3. Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas totales del extracto enzimático fue determinado por el método de Bradford (Bradford, 1976).

1) Preparación de la curva de calibración. Se partió de una solución de albúmina de suero bovino (ASB) de concentración 1 mg/mL con la cual se construyó la curva de calibración con concentraciones entre 5 y 60 $\mu\text{g/mL}$ de ASB. Se realizaron lecturas de absorbancia a 595 nm.

2) Cuantificación de proteínas totales. Se tomaron 50 μL del homogenizado y se mezclaron con 1500 μL del reactivo de Bradford recién filtrado. Posteriormente, la mezcla se incubó en completa oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se tomaron tres alícuotas de 300 μL cada una y se leyó la absorbancia a 595 nm. La lectura se interpola en la curva estándar diseñada y se estima la concentración original de proteínas en el extracto.

3.2.2.4. Actividad enzimática de acetilcolinesterasa (AChE) en el extracto proteico de *T. castaneum*

La curva de calibración y actividad enzimática de AChE se determinaron siguiendo el método colorimétrico de Ellman ([Ellman, et al., 1961](#)).

1) Preparación de la curva de calibración. Se utilizó la enzima patrón de AChE de anguila eléctrica para construir la curva de calibración. Se utilizaron concentraciones de la enzima entre 1,0 y 0,02 U/mL. Antes de iniciar la reacción enzimática, la enzima se incubó durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 25 μL de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) 10 mM, 25 μL de yoduro de acetiltiocolina (AChI) 10 mM y 225 μL de búfer fosfato (0.1 M; pH \approx 7.2) para un total de 300 μL por pozo. Se realizó la lectura de absorbancia a 420 nm cada 5 min durante 45 minutos después de poner la placa en el espectrofotómetro. La lectura se realizó por triplicado.

2) Determinación de la actividad enzimática de AChE en el homogenizado proteico de *T. castaneum*. Para realizar este ensayo se utilizaron los mismos reactivos y procedimiento que para la elaboración de cada punto de la curva de calibración. Se añadieron 50 μL del homogenizado proteico de *T. castaneum* (como fuente de la enzima) y luego los demás reactivos en el siguiente orden y volumen: 25 μL DTNB, 200 μL de búfer fosfato y 25 μL de AChI. Se realizó la lectura de absorbancia a 420 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado. La absorbancia obtenida para el homogenizado se interpoló en la curva de calibración y se expresó la actividad enzimática de la AChE en U/mL.

3.2.2.5. Actividad enzimática de glutatión-S-transferasa (GST) en el extracto proteico de *T. castaneum*

El método colorimétrico que se empleó para determinar la actividad de la enzima fue monitorear espectrofotométricamente la conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) con glutatión reducido (GSH), que forman el conjugado 2,4-dinitrofenil-SG a los 340 nm durante 3 min (Dowd et al., 2009).

1) Preparación de la curva de calibración. Se utilizó la enzima patrón GST de hígado equino para construir la curva de calibración. Se utilizaron concentraciones de la enzima entre 0,01 y 9,33 U/mL. Posteriormente, se adicionó 225 µL búfer fosfato (0.1 M; pH ≈7.2), luego 25 µL de GSH 12,8 mM y por último 25 µL de CDBN 0,5 mM. Como controles se utilizaron un pozo donde no se añadió el sustrato de la reacción (CDNB) y un pozo del color de los reactivos (donde no se añadió la enzima a evaluar). Al terminar de agregar los reactivos se realizó la lectura de Absorbancia a 340 nm cada 30 s durante 3 min. El aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad catalítica de GST.

2) Determinación de la actividad enzimática GST en el homogenizado proteico de *T. castaneum*. Para realizar este ensayo, se utilizaron los mismos reactivos y procedimiento que para la elaboración de cada punto de la curva de calibración, sin embargo, se tomaron 50 µL del homogenizado proteico en vez de la enzima de hígado equino. Los demás reactivos se adicionaron en el siguiente orden: 200 µL de búfer fosfato, 25 µL GSH y 25 µL de CDBN. Cada ensayo se realizó por triplicado y la absorbancia obtenida se interpoló en la curva de calibración y se expresó la actividad de la GST en U/mL.

3.2.2.6. Actividad enzimática de catalasa en el extracto proteico de *T. castaneum*

En el método que se empleó, se relacionó la actividad de la catalasa con la longitud (en mm) de la columna de espuma producto de la reacción de la enzima con H₂O₂ al 30% (Iwase et al., 2013). La longitud de la columna de espuma se determinó utilizando un pie de rey Mitutoyo® con un rango entre 0 -160 mm y 0,03 de exactitud.

1) Preparación de la curva de calibración. Se utilizó como referencia la actividad catalítica de catalasa de hígado bovino entre 20 a 2000 U/mL. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando tubos de ensayo de 180 mm alto por 12 mm de diámetro. Para cada punto de la curva se adicionaron: 100 µL de la solución de la enzima, 100 µL de búfer fosfato enriquecido con Tritón-X al 1% y 100 µL de H₂O₂ 30% v/v. Las lecturas se realizaron 7 min después de haber iniciado la reacción y cada ensayo se hizo por triplicado. La altura de la columna de espuma es directamente proporcional a la actividad de catalasa.

2) Determinación de la actividad enzimática de catalasa en el homogenizado proteico de *T. castaneum*. Para realizar este ensayo, se utilizaron los mismos reactivos y procedimiento que para la elaboración de cada punto de la curva de calibración, sin embargo, se tomaron 100 µL del homogenizado proteico en vez de la enzima de hígado bovino. Posteriormente, se agregaron 100 µL de Tritón-X al 1% y 100 µL H₂O₂ 30% v/v y se midió la columna de espuma generada. La altura de la columna de espuma obtenida se interpoló en la curva de calibración y se expresó la actividad de la catalasa en U/mL

3.2.3. Estudio de la inhibición *in vitro* de la AChE, GST y catalasa

Para determinar la inhibición de la actividad catalítica de las enzimas, se utilizó la misma metodología empleada para la determinación de su actividad específica, pero agregando una solución del AE que, en volumen final de la reacción, tuviera una concentración de 500 ppm. Para preparar la solución stock de cada AE se utilizó como solvente una solución de tritón 100-X al 2 % en búfer fosfato. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

Para el caso de las enzimas **AChE** y **GST** se sustituyeron 50 µL del búfer fosfato con la misma cantidad de la solución del AE y así tener un volumen final de 300 µL por pozo. El porcentaje de inhibición se define como la variación relativa de la absorbancia de los pozos tratados con el AE, en relación con el control (sin AE) como se explica en la **Ecuación 3.1**:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 * \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde A_0 - es la absorbancia del control (enzima + sustrato), A_1 fue la absorbancia de la muestra (enzima + solución de AE + sustrato). Para el caso de la AChE se utilizó como control positivo el Nuván®

En el estudio de inhibición de la **catalasa** se agregaron 100 μL de la solución de AE, para tener un volumen final de 400 μL por tubo de ensayo. Para determinar la actividad inhibitoria se midió la longitud total en [mm] de la columna de espuma cuando la enzima reacciona con el H_2O_2 . La **ecuación 3.2** muestra la relación antes expresada:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{100 * (L_c - L_j)}{L_c} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Donde, L_c representa la longitud de la columna de espuma del control, L_j representa la longitud de la columna de espuma con el AE.

3.2.4. Estimación de las CI_{50}

Las Concentraciones Inhibitorias (CI_{50}) solo se estimaron para aquellos AEs que causaron una inhibición superior o igual al 50 %. Para hacerlo se utilizó el método de inhibición descrito en el apartado anterior, pero utilizando rangos de concentración del AE entre 1000 y 19 ppm. Por cada concentración se hicieron tres replicas. Posteriormente, los datos obtenidos fueron analizados en el software SPSS versión 24 utilizando el modelo Probit

3.2.5. Análisis estadístico de k-means (KNN)

Utilizando el software SPSS® versión 24 se hizo un análisis clúster de los AEs utilizados en la presente investigación, con el fin de identificar un perfil general que englobe las características que debe tener un AE para generar la inhibición de las enzimas evaluadas. En dicho análisis se utilizaron los siguientes descriptores de cada AE: **1)** su composición química, **2)** su concentración letal 50 y **3)** la inhibición para cada una de las enzimas.

La técnica de *clustering* que se empleó en este capítulo fue del **tipo no jerárquico**, la cual fue de K medias (KNN). La cual tiene como objetivo la asignación de los AEs en diferentes grupos de acuerdo con la cercanía de sus características a la media de cada grupo asignado.

La métrica utilizada para efectuar el método KNN fue la distancia euclidiana al cuadrado expresada en la **ecuación 3.3**

$$W_n = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \underbrace{\min}_{1 \leq j \leq k} \|X_i - \mu_j\|^2 \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

3.2.6. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) aplicado a los 23 AEs tuvo como finalidad obtener la variabilidad de las actividades estudiadas, inhibición y mortalidad con relación a su composición química. De esta manera, poder dilucidar relaciones intrincadas y patrones tanto de inhibición como de letalidad de los AEs utilizados para este estudio

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Caracterización del homogenizado proteico de *T. castaneum*.

Se obtuvieron 40 mL del homogenizado enzimático el cual se caracterizó determinando la actividad enzimática específica de las enzimas de interés en la presente investigación (AChE, GST y catalasa). Además, se cuantificó el total de proteínas del extracto, para expresar todos los resultados en función a la proteína total presente. Por tal motivo, se elaboraron curvas de calibración que, por métodos estadísticos (mínimos cuadrados y curvas de Ringbom), se ajustaron para obtener el segmento cuya relación actividad-respuesta fuera lo más lineal posible. En la **Figura 3.1** se muestra las curvas de calibración obtenidas en cada caso con sus respectivas ecuaciones de recta y sus coeficientes de determinación (R^2).

En primer lugar, al evaluar el extracto proteico de *T. castaneum* con el método de Bradford, se obtuvo una absorbancia promedio de 1.191 la cual se interpoló en la curva diseñada que se muestra en la **Figura 3.1a**. Por tanto, la concentración original de proteínas fue de 32.69 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. De igual manera, al implementar el método de Ellman para determinar la actividad enzimática de la AChE, se obtuvo una absorbancia promedio de 0.490 que se Interpoló en la curva de la **Figura 3.1b**. Como resultado se tuvo una actividad enzimática específica de 0.527 U/mL. Con respecto a la actividad enzimática de la GST, en el ensayo se tuvo una absorbancia corregida de 1.715; este valor se interpoló en la curva de la **Figura 3.1c**, obteniéndose una actividad específica para dicha enzima de 5.49 U/mL. Finalmente, para la catalasa, se midió la columna de espuma que presentó el extracto proteico al adicionarle H_2O_2 , la cual tuvo una longitud de 77 mm. Esta longitud se interpoló en la curva de la **Figura 3.1d** y se determinó que la actividad específica fue de 1257.82 U/mL.

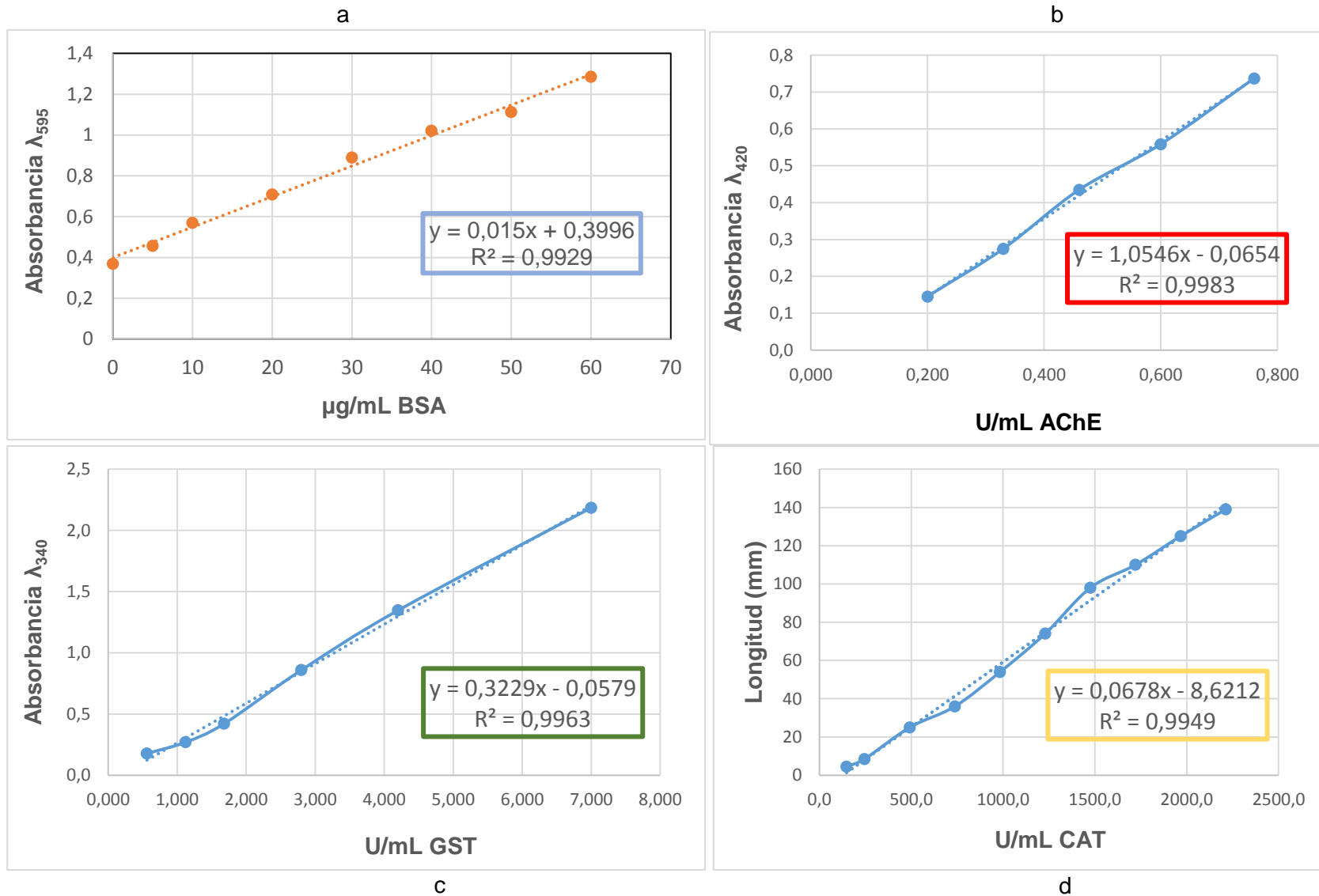


Figura 3.1. Curvas de calibración realizadas en la presente investigación. a). Curva de calibración para la cuantificación de proteínas. Curvas de calibración para determinar la actividad enzima de b) AChE c) GST y d) catalasa

La **Tabla 3.2** resume la caracterización que se obtuvo del homogenizado proteico de *T. castaneum*.

Tabla 3.2. Resumen de las características del homogenizado proteico obtenido del *T. castaneum*.

Muestra No	Volumen inicial (mL)	Contenido de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Actividad AChE (U/mL)	Actividad GST (U/mL)	Actividad CAT (U/mL)
1	40	$32.7 \pm 1,2$	0.53 ± 0.06	$5.49 \pm 0,33$	$1257.82 \pm 45,05$

3.3.2. Resultados de la inhibición catalítica de las enzimas

Con el ánimo de realizar una aproximación a los mecanismos de acción implicados en el efecto fumigante sobre *T. castaneum*; causados por los 23 AEs promisorios, se evaluó la capacidad de dichos aceites para inhibir la actividad catalítica de las enzimas AChE, GST y catalasa. En La **Tabla 3.3** se muestran los resultados de inhibición causados por los 23 AEs, evaluados a 500 ppm, sobre cada una de las enzimas mencionadas. Los aceites están organizados en la tabla de acuerdo con su actividad fumigante, donde **a1** es el más activo y **a23** el menos activo.

Tabla 3.3. Porcentajes de inhibición causados por los AEs sobre las enzimas AChE, GST y catalasa.

código	AE	Inhibición GST (%)	Inhibición AChE (%)	Inhibición catalasa (%)
a1	<i>F. vulgare</i>	1.496 ± 0.06	31.70 ± 0.02	16.52 ± 4.58
a2	<i>Z. monophyllum</i>	54.66 ± 0.15	22.72 ± 0.02	61.30 ± 4.16
a3	<i>A. dracuncululus</i>	41.18 ± 0.28	32.52 ± 0.02	21.74 ± 4.00
a4	<i>E. cardamomum</i>	6.16 ± 0.09	15.78 ± 0.02	9.57 ± 3.00
a5	<i>L. alba</i>	28.61 ± 0.30	0.54 ± 0.05	12.17 ± 9.7
a6	<i>P. aduncum</i>	56.74 ± 0.15	24.08 ± 0.07	8.26 ± 1.52
a7	<i>P. nigrum</i>	1.30 ± 0.02	89.73 ± 0.01	3.91 ± 1.68
a8	<i>P. eriocladum</i>	31.17 ± 0.26	18.50 ± 0.03	31.30 ± 3.21
a9	<i>H. juniperinum</i>	2.60 ± 0.08	25.44 ± 0.09	76.96 ± 1.52
a10	<i>P. anisum</i>	17.70 ± 0.22	31.84 ± 0.03	11.74 ± 3.21
a11	<i>L. origanoides</i>	17.178 ± 0.31	31.56 ± 0.01	7.39 ± 3.60
a12	<i>P. aequale</i>	11.95 ± 0.11	38.30 ± 0.03	3.48 ± 1.73

a13	<i>L. angustifolia</i>	5.87 ± 0.18	8.78 ± 0.04	81.74 ± 2.00
a14	<i>M. fragrans</i>	4.31 ± 0.27	10.61 ± 0.03	25.65 ± 7.21
a15	<i>C. sinensis</i>	58.41 ± 0.09	19.86 ± 0.05	23.48 ± 4.16
a16	<i>cupressus sp</i>	34.45 ± 0.11	17.41 ± 0.03	51.30 ± 8.02
a17	<i>S. molle</i>	11.21 ± 0.09	31.97 ± 0.04	76.09 ± 0.57
a18	<i>R. officinalis</i>	24.89 ± 0.22	64.35 ± 0.02	26.96 ± 2.64
a19	<i>H. mexicanum</i>	38.16 ± 0.05	11.36 ± 0.06	18.70 ± 4.72
a20	<i>Eucalyptus sp</i>	23.86 ± 0.11	20.34 ± 0.06	66.52 ± 1.15
a21	<i>O. basilicum</i>	25.08 ± 0.28	32.11 ± 0.03	43.48 ± 2.08
a22	<i>X. discreta</i>	2.27 ± 0.10	30.68 ± 0.07	64.35 ± 3.05
a23	<i>C. album</i>	39.25 ± 0.13	36.26 ± 0.04	3.04 ± 0.04

3.3.2.1. Actividad inhibitoria sobre la AChE

Aunque los 23 AEs utilizados en la presente investigación demostraron tener actividad insecticida sobre *T. castaneum*, aún son reducidos los estudios con respecto a sus mecanismos de acción. No obstante, las sintomatologías que generan en el insecto como la hiperactividad, convulsiones y parálisis apuntan a una acción neurotóxica similares a los producidos por insecticidas organofosforados y carbamatos; lo que ha derivado en la evaluación de su capacidad inhibitoria sobre la AChE (Aazza, et al., 2011a; Prieto, 2012). En la mayoría de estudios las pruebas de inhibición se realizan con la enzima aislada de otros organismos como la anguila eléctrica, la cucaracha o la mosca doméstica y no con la enzima de los insectos tratados (Kostyukovsky, et al., 2002). Lo anterior puede generar sesgos en los mecanismos de inhibición ya que la AChE presente en dichas especies, aunque cumpla con la misma función que en *T. castaneum*, pueden tener diferentes polimorfismos y modos de interacción con las sustancias objeto de estudio. Por lo tanto, en esta investigación se evaluó el efecto inhibitorio de los AEs sobre la actividad enzimática de la AChE presente en el homogenizado proteico obtenido de *T. castaneum*. La **Figura 3.2** muestra los resultados de inhibición causada por los AEs evaluados a una concentración de 500 ppm, así como el efecto inhibitorio causado por el insecticida Nuvan® a una concentración de 50 ppm.

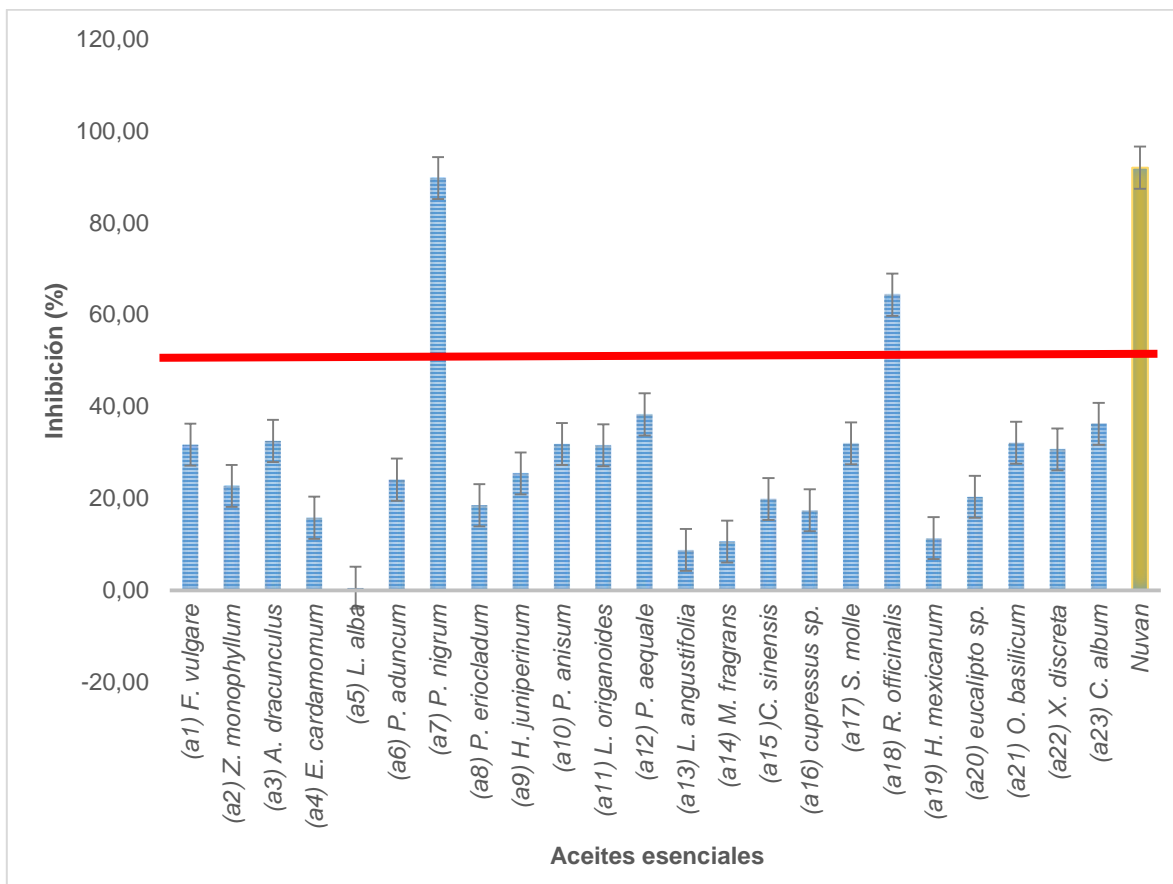


Figura 3.2. Porcentaje de inhibición de los AEs promisorios sobre la AChE.

Con base en la anterior gráfica se puede observar que 21 AEs, del total evaluados, tuvieron efectos inhibitorios por debajo del 40 %. Dichos resultados de inhibición contrastan con sus valores de CL_{50} , ya que estos últimos fueron inferiores a la concentración utilizada en el ensayo de inhibición de la enzima en cuestión (500 ppm). Por lo tanto, no es posible asociar la mortalidad del insecto causada por el AE a la inhibición de la AChE por efectos del AE. Cabe la posibilidad que sea otro el mecanismo de acción que altere las funciones metabólicas, bioquímicas y fisiológicas en el insecto para provocar su muerte (Tripathi et al., 2009).

Lo anteriormente expuesto se puede ejemplificar con los AEs de *F. vulgare* (a1), *A. dracuncululus* (a3) y *P. anisum* (a10), los cuales se caracterizan por ser ricos en fenilpropanos (estragol y anetol) y por tener CL_{50} entre 16 y 70 $\mu\text{L}/\text{L}$ aire. Pese a considerarse como activos contra *T. castaneum*, dichos AEs no causaron una fuerte inhibición sobre la enzima estudiada (entre el 35 y 40 %) por lo tanto, puede que éstos generen la muerte del insecto

a través de otros mecanismos como el estrés oxidativo que está reportado para sus componentes mayoritarios (Olmedo et al., 2015).

Bajo la misma tendencia se encuentra el AE de *L. origanoides* (a11) que no tiene reportes de actividad inhibitoria sobre la AChE, pero que en la presente investigación la pudo inhibir en un 35 %. Dicho resultado concuerda con otros previos, en los que los componentes mayoritarios de dicho aceite (timol y carvacrol), fueron evaluados sobre la AChE de otros artrópodos, con resultados de inhibición muy reducidos (Anderson & Coats, 2012; Arif et al., 2018). Lo anterior sugiere que, si bien pudo haber algún efecto inhibitorio de a11 sobre la enzima de *T. castaneum*, no es probable que se haya debido al efecto de sus componentes mayoritarios y que el mecanismo de acción principal de dicho AE en la mortalidad del insecto sea otro (Mila Jukic, Politeo, Maksimovic, Milos, & Milos, 2006).

Un caso particular se presenta con los AEs de *E. cardamomum* (a4), *Eucalyptus sp* (a20) y *X. discreta* (a22) que tienen contenidos de eucaliptol entre 12.5 y 43.9 %, el cual tiene reportada una potencial actividad inhibitoria sobre la AChE (Aazza, et al., 2011). Pese a esto, los AEs mencionados tuvieron porcentajes de inhibición bajos frente a los reportados para el compuesto puro. Lo anterior conlleva a concluir que los demás metabolitos presentes en los AEs pueden tener un efecto antagónico e impedir que la enzima se inhiba (Khorrami et al., 2018). Bajo esta misma tendencia, se puede apreciar los AEs de *Z. monophyllum* (a2), *C. sinensis* (a15), *C. album* (a23) y *L. alba* (a5) que tuvieron una inhibición sobre la enzima entre el 0 y el 30% pese, a que tienen contenidos importantes de β -pineno y limoneno, monoterpenos con actividad reportada sobre AChE (Abdelgaleil, et al., 2009; Houghton, et al., 2007)

En la **Figura 3.2.** se puede observar que los únicos AEs que, a la concentración evaluada, tuvieron porcentajes de inhibición de la actividad catalítica de la enzima superiores al 60 % fueron los de *P. nigrum* (a7) y *R. officinalis* (a18), con un 89.73 y 64.35 %, respectivamente. Por lo tanto, a estos dos AEs se les estimó la CI_{50} y los resultados se presentan en la **Tabla 3.4.** Con base en la tabla se puede observar que los aceites a7 y a18 requirieron concentraciones muchos más altas, en comparación con el Nuvan ®, para provocar la inhibición.

Tabla 3.4. Concentración inhibitoria 50 de los AEs de *P. nigrum* y *R. officinalis* sobre la AChE de *T. castaneum*

Sustancia	CI ₅₀ (ppm) (Límite de confianza 95%)
<i>P. nigrum</i>	303.11 (268.06-347.41)
<i>R. officinalis</i>	418.26 (322.23-539.77)
Nuvan®	<12

Así pues, al comparar la CI₅₀ de los aceites **a7** y **a18** (303.11 y 418,26 ppm, respectivamente) con sus valores de CL₅₀ (43.91 y 191.49 µL/ L aire, respectivamente) se observa que las concentraciones inhibitorias son mucho mayores que las concentraciones letales, lo que sugiere que la mortalidad del insecto puede estar relacionada con un efecto inhibitorio sobre la AChE, pero la inhibición de dicha enzima no es el principal mecanismo de acción de los AEs mencionados.

No obstante, los aceites **a7** y **a18** se caracterizaron por contener eucaliptol, limoneno y α -pineno como compuestos mayoritarios, los cuales tienen reporte de ser fuertes inhibidores de la enzima evaluada (Houghton, et al., 2007). Sin embargo, al ser los AEs mezclas de metabolitos que interactúan de diferentes maneras, pueden generar sinergismos o antagonismos que desencadenen diversas respuestas fisiológicas dentro de los insectos. Tal es el caso de la dupla entre α -pineno y β -cariofileno (también mayoritarios en los a7 y a18) que combinados tienen una actividad fumigante sobre *T. castaneum* mucho más potente que la que tienen los compuestos individuales (Chaubey, 2012).

3.3.3. Agrupamiento clúster KNN

Con la información obtenida hasta el momento, se construyó un agrupamiento de los AEs teniendo en cuenta su actividad insecticida, su composición química relativa y el porcentaje de inhibición de la enzima AChE; con el fin de encontrar un perfil de AEs que cuente con las mejores características. La **Tabla 3.5** de parámetros es la que se utiliza para la construcción de dicho agrupamiento.

Tabla 3.5. Tabla de parámetros de agrupación enzima AChE

AE	% Inh	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Fenilpropanos	Otros compuestos	CL ₅₀ (µL/L aire)
<i>F. vulgare</i>	31.70	21.8	0	60.9	0	16.234
<i>Z. monophyllum</i>	22.72	89.6	8.4	0	0	18.537
<i>A. dracunculus</i>	32.52	6.2	1.9	88.5	0	22.775
<i>E. cardamomum</i>	15.78	96.7	0.1	0	0.5	29.371
<i>L. alba</i>	4.22	96	0	0	0	34.144
<i>P. aduncum</i>	24.08	38.6	58.1	0	0	41.91
<i>P. nigrum</i>	89.73	57.2	28.5	0	0	43.906
<i>P. eriocladium</i>	18.50	95.9	0	0	0	58.288
<i>H. juniperinum</i>	25.44	22.3	19.8	0.3	23.1	67.269
<i>P. anisum</i>	31.84	10.1	0.3	77.4	8.7	79.162
<i>L. origanoides</i>	31.56	78.7	5.6	2.5	0	87.71
<i>P. aequale</i>	38.30	15.6	0	79.1	0	92.3
<i>L. angustifolia</i>	9.12	73.8	17.3	0	0.2	107.691
<i>M. fragrans</i>	10.61	87.6	0.6	8.4	0	115.253
<i>C. sinensis</i>	19.86	77.7	4.1	0	4.7	138.325
<i>Cupressus sp.</i>	17.41	96.5	0	0	0	152.298
<i>S. molle</i>	31.97	38.9	15	0.1	0	160.045
<i>R. officinalis</i>	64.35	84.9	7.4	0	0	191.491
<i>H. mexicanum</i>	12.11	26.1	5	0	56.8	229.065
<i>Eucalyptus sp.</i>	20.34	73.5	17.4	0	1.6	232.759
<i>O. basilicum</i>	32.11	16.4	43.9	24.1	3.8	234.012
<i>X. discreta</i>	30.68	79.1	10.9	0	0	237.229
<i>C. album</i>	36.26	82.1	5.6	0.2	0	264.586

El algoritmo k-means mostró que los 23 AEs se clasificaron en tres grupos tal y como se muestra en la **Tabla 3.6**.

Tabla 3.6. Agrupamiento k-means de los 23 AEs en función a sus características e inhibición de la AChE.

Grupo1	Grupo 2	Grupo 3
<i>F. vulgare</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>H. mexicanum</i>
<i>A. dracunculus</i>	<i>M. fragrans</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>
<i>P. aduncum</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>O. basilicum</i>
<i>P. nigrum</i>	<i>cupressus sp</i>	<i>X. discreta</i>
<i>H. juniperinum</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>C. album</i>
<i>P. anisum</i>	<i>Z. monophyllum</i>	<i>S. molle</i>
<i>P. aequale</i>	<i>E. cardamomum</i>	
	<i>P. eriocladum</i>	
	<i>L. alba</i>	
	<i>L. origanoides</i>	

La variación entre cada uno de los grupos formados se debe mayoritariamente al factor CL₅₀, al porcentaje de inhibición y a la abundancia de monoterpenos y fenilpropanos. Mientras que la abundancia en sesquiterpenos y otros compuestos no es significativa para el modelo de agrupación como se puede ver en la ANOVA de la **Tabla 3.7**

Tabla 3. 7. Variables que generan diferencias significativas entre los grupos formados de los 23 AE.

Fuente de Variación	F	Pr > F
% Inhibición	4.125	0.032
Monoterpenos	20.759	< 0.006
Sesquiterpenos	1.626	0.222
Fenilpropanos	7.688	0.003
Otros	0.853	0.441
CL50	36.898	< 0,0001

En la **Figura 3.3** se muestra el perfil de cada grupo, cabe destacar que el rasgo que distingue al grupo tres (color verde) son valores altos de CL₅₀ (baja actividad fumigante) y abundancia pobre de fenilpropanos. El rasgo característico del grupo dos (color azul) es

que presenta una abundancia pobre de otros compuestos y una abundancia alta de monoterpenos y una capacidad baja para inhibir la AChE. El grupo uno (rojo) se caracteriza por tener una un porcentaje de inhibición alto sobre la enzima, alto contenido de fenilpropanos y la mejor actividad fumigante (CL_{50} más bajas). Por lo tanto, es en el grupo uno donde se encuentran los AEs que tienen tanto la mejor actividad inhibitoria como la mejor actividad fumigante de todo el grupo de AEs. Además, en dicho grupo están aquellos AEs que, en su mayoría, tienen un alto contenido de fenilpropanos. Lo anterior abre la posibilidad que se utilicen AEs o mezclas de sus compuestos que tengan dichas características y así potenciar el efecto inhibitor sobre la AChE de *T. castaneum*.

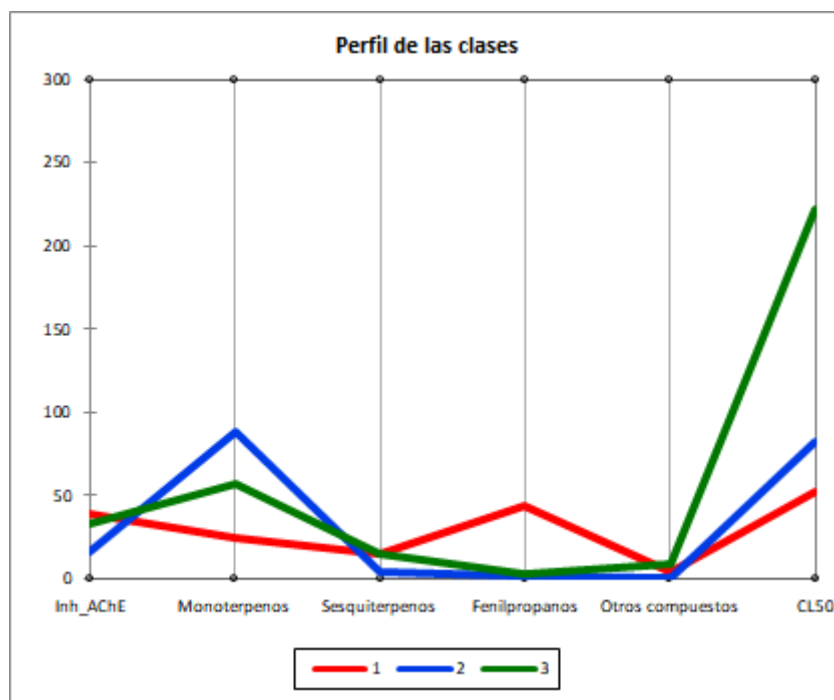


Figura 3.3. Perfil de los 3 grupos de AEs formados en el agrupamiento k-means en la inhibición de la AChE.

3.3.2.2. Actividad inhibitoria de la GST

Ahora bien, se evaluó la actividad inhibitoria de los 23 AEs sobre la enzima GST para aproximar con esto, a otro mecanismo de acción sobre la mortalidad de *T. castaneum*. La sobreproducción de enzimas desintoxicadoras como la GST puede reducir la actividad insecticida de los AEs, debido a que puede conjugar los metabolitos electrófilos que los componen con GSH endógeno del insecto y facilitar su excreción (Hua, et al., 2014).

Por lo tanto, en la búsqueda de nuevos agentes fitosanitarios se hace primordial el estudio de la inhibición de enzimas como la GST, pues esta es una de las principales responsables de la generación de resistencia, ya que es una enzima inducible por algunos compuestos químicos. Como se pudo observar en la **Tabla 3.2** el homogenizado proteico de *T. castaneum* tuvo una actividad enzimática aproximada de 5.49 U/mL. Esta alta actividad puede deberse a varios factores, uno de ellos está asociado con la tolerancia hacia insecticidas (principalmente organofosforados). Aun así, es muy difícil establecer un parámetro que pueda unificar un criterio de la actividad de GST en un organismo ya que se han estudiado gran cantidad de especies animales (entre ellas los insectos) y se ha encontrado una amplia variación de actividad dentro de grupos de organismos relacionados (Sívori, 1993). Aunado a lo anterior, no se pudo utilizar un control positivo para la inhibición de la GST, debido a la disponibilidad de este tipo de inhibidores en el mercado.

Ahora bien, los resultados de inhibición de la enzima por efecto de los AEs se muestran en la **Figura 3.4**.

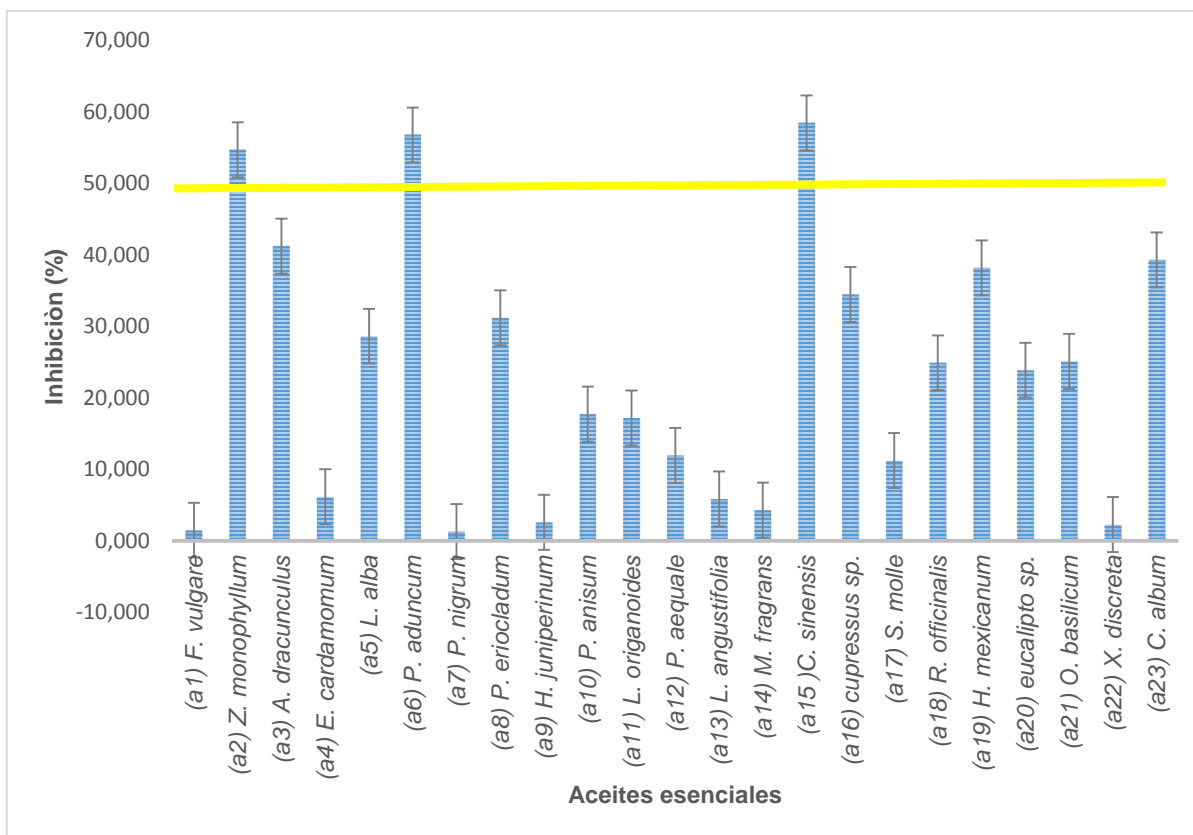


Figura 3.4. Porcentaje de inhibición de los AEs promisorios sobre la GST.

Con base en la anterior figura se puede apreciar que la gran mayoría de los AEs utilizados en esta investigación tuvieron una inhibición inferior al 40 % y que solo fueron tres los aceites que causaron una actividad inhibitoria entre el 50 y 60% a la concentración evaluada (500 ppm). Estos fueron los aceites de *C. sinensis* (**a15**), *P. aduncum* (**a6**) y *Z. monophyllum* (**a2**), los cuales se caracterizan por estar compuestos principalmente por monoterpenos. A estos AEs se les estimó la CI_{50} . Los resultados se pueden observar en la **Tabla 3.8**.

Tabla 3.8. Concentración inhibitoria 50 de los AEs de *C. sinensis*, *P. aduncum* y *Z. monophyllum* sobre la GST de *T. castaneum*

Aceite esencial	CI_{50} (ppm) (Límite de confianza 95%)
<i>C. sinensis</i>	681,61 (550.88-894.28)
<i>P. aduncum</i>	579,89 (473.74-734.60)
<i>Z. monophyllum</i>	671,03 (519.64-943.311)

Al comparar la CI_{50} de los aceites **a15**, **a6** y **a2** (681.61, 579,89 y 671,03 ppm, respectivamente) con sus valores de CL_{50} (138.325, 41.91 y 18.537 μ L/L aire, respectivamente) se observa que las concentraciones inhibitorias son mucho mayores que las concentraciones letales, lo que sugiere que la mortalidad del insecto puede estar relacionada con un efecto inhibitorio sobre la GST, pero la inhibición de dicha enzima no es el principal mecanismo de acción de los AEs mencionados. Para ninguno de los 23 AEs se encontraron reportes en la literatura sobre la inhibición del glutatión-S-transferasa de *T. castaneum* o de otro organismo. Lo que indica que este es el primer reporte de esta actividad para los AEs promisorios. Es importante destacar que la exposición de los insectos a los AEs puede modificar la actividad o cantidad de las proteínas desintoxicadoras, ya sea aumentándolas o disminuyéndolas. Un aumento en la presencia de proteínas desintoxicantes pueda contribuir a la supervivencia del insecto, mientras que

una disminución de éstas puede generar un desbalance hormonal que se traduce en el deterioro del crecimiento y finalmente la inducción de la muerte del insecto (Leyva, et al., 2015). No obstante, en el presente estudio no se hace una caracterización *in vivo* por lo tanto no se puede reconocer si hubo o no un aumento de esta enzima en los insectos tratados.

Agrupamiento clúster KNN

Con la información obtenida hasta el momento, se construyó un agrupamiento de los AEs teniendo en cuenta su actividad insecticida, su composición química relativa y el porcentaje de inhibición de la enzima GST. La **Tabla 3.9** de parámetros es la que se utiliza para la construcción de dicho agrupamiento.

Tabla 3.9. Tabla de parámetros de agrupación enzima GST.

AE	% Inh	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Fenilpropanos	Otros compuestos	CL ₅₀ (μL/L aire)
<i>F. vulgare</i>	2.12	21.8	0	60.9	0	16.234
<i>Z. monophyllum</i>	54.66	89.6	8.4	0	0	18.537
<i>A. dracunculus</i>	41.17	6.2	1.9	88.5	0	22.775
<i>E. cardamomum</i>	6.14	96.7	0.1	0	0.5	29.371
<i>L. alba</i>	28.59	96	0	0	0	34.144
<i>P. aduncum</i>	56.73	38.6	58.1	0	0	41.91
<i>P. nigrum</i>	1.28	57.2	28.5	0	0	43.906
<i>P. eriocladum</i>	31.16	95.9	0	0	0	58.288
<i>H. juniperinum</i>	3.38	22.3	19.8	0.3	23.1	67.269
<i>P. anisum</i>	17.69	10.1	0.3	77.4	8.7	79.162
<i>L. origanoides</i>	17.16	78.7	5.6	2.5	0	87.71
<i>P. aequale</i>	11.93	15.6	0	79.1	0	92.3
<i>L. angustifolia</i>	6.90	73.8	17.3	0	0.2	107.691
<i>M. fragrans</i>	8.01	87.6	0.6	8.4	0	115.253
<i>C. sinensis</i>	58.41	77.7	4.1	0	4.7	138.325
<i>Cupressus sp.</i>	34.44	96.5	0	0	0	152.298
<i>S. molle</i>	11.20	38.9	15	0.1	0	160.045
<i>R. officinalis</i>	24.88	84.9	7.4	0	0	191.491
<i>H. mexicanum</i>	38.15	26.1	5	0	56.8	229.065
<i>Eucalyptus sp.</i>	23.85	73.5	17.4	0	1.6	232.759
<i>O. asilicum</i>	25.07	16.4	43.9	24.1	3.8	234.012
<i>X. discreta</i>	3.81	79.1	10.9	0	0	237.229

C. album	39.24	82.1	5.6	0.2	0	264.586
-----------------	-------	------	-----	-----	---	---------

El algoritmo k-means mostró que los 23 AEs se clasificaron en tres grupos tal y como se muestra en la **Tabla 3.10**.

Tabla 3.10. Agrupamiento *k-means* de los 23 AEs en función a sus características e inhibición de la GST.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>F. vulgare</i>	<i>Z. monophyllum</i>	<i>Cupressus sp.</i>
<i>A. dracunculus</i>	<i>E. cardamomum</i>	<i>S. molle</i>
<i>P. anisum</i>	<i>L. alba</i>	<i>R. officinalis</i>
<i>P. aequale</i>	<i>P. aduncum</i>	<i>H. mexicanum</i>
	<i>P. nigrum</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>
	<i>P. eriocladium</i>	<i>O. basilicum</i>
	<i>H. juniperinum</i>	<i>X. discreta</i>
	<i>L. angustifolia</i>	<i>C. album</i>
	<i>M. fragrans</i>	<i>C. sinensis</i>
	<i>L. origanoides</i>	

La variación explicada, es decir, la variación entre los grupos se debe mayoritariamente al factor CL₅₀ y a la abundancia de fenilpropanos y en un menor grado, al factor abundancia de monoterpenos como se puede apreciar en la **Tabla 3.11**.

Tabla 3.11. Variables que generan diferencias significativas entre los grupos formados de los 23 AE.

Observación	F	Pr > F
%Inhibición	0.597	0.560
Monoterpenos	8.24	0.002

Sesquiterpenos	1.190	0.325
Fenilpropanos	188.932	< 0,0001
Otros	0.344	0.654
CL50	38.146	< 0,0001

En la **Figura 3.9** se muestra el perfil de los tres grupos formados. El rasgo que distingue al grupo tres (verde) son valores altos de CL₅₀ y poco contenido de fenilpropanos. El grupo dos (azul) se distingue por valores un poco más altos de monoterpenos en comparación con el grupo tres, así como valores muy bajos de fenilpropanos. El grupo uno presenta valores muy bajos de monoterpenos, de inhibición y valores altos de CL₅₀. Por lo tanto, los monoterpenos son el factor que mayor influencia tienen en la inhibición de la enzima GST. Lo anterior corrobora la actividad inhibitoria de los aceites **a15**, **a6** y **a2**, ubicados en los grupos 2 y 3 y que están constituidos por monoterpenos principalmente.

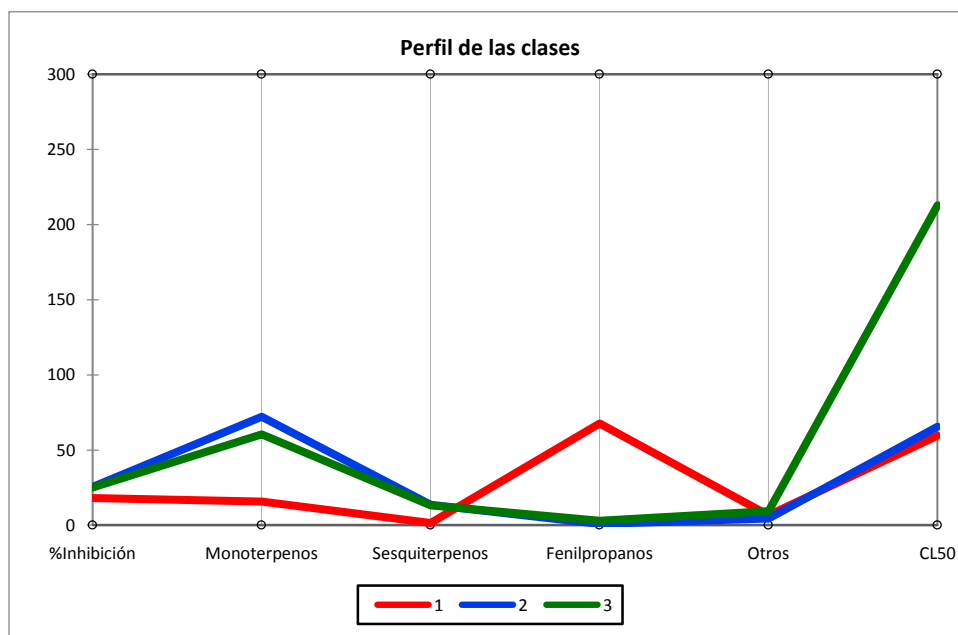


Figura 3.5. Perfil de los AEs formados en el agrupamiento k-means en la inhibición de la GST.

3.3.2.3. Actividad inhibitoria de la catalasa

La catalasa es la enzima desintoxicadora encargada de proporcionar la primera defensa en el sistema antioxidante de los organismos, reduciendo especies reactivas de oxígeno (EROs) como el H_2O_2 . Usualmente los animales, ya sean vertebrados o invertebrados, poseen grandes cantidades de esta enzima, por lo que es fundamental para su supervivencia. Lo anterior concuerda con la actividad enzimática de la catalasa estimada en el homogenizado proteico de *T. castaneum* que fue de 1257.8 U/mL ya que son muchas las reacciones de oxidación que se pueden llevar a cabo en su metabolismo y de las cuales requiere protegerse. Por lo tanto, los AEs promisorios se evaluaron con el propósito de determinar si su actividad fumigante está relacionada con la inhibición de esta importante enzima.

La **Figura 3.6** se muestran los resultados de inhibición sobre la enzima extraída del *T. castaneum*.

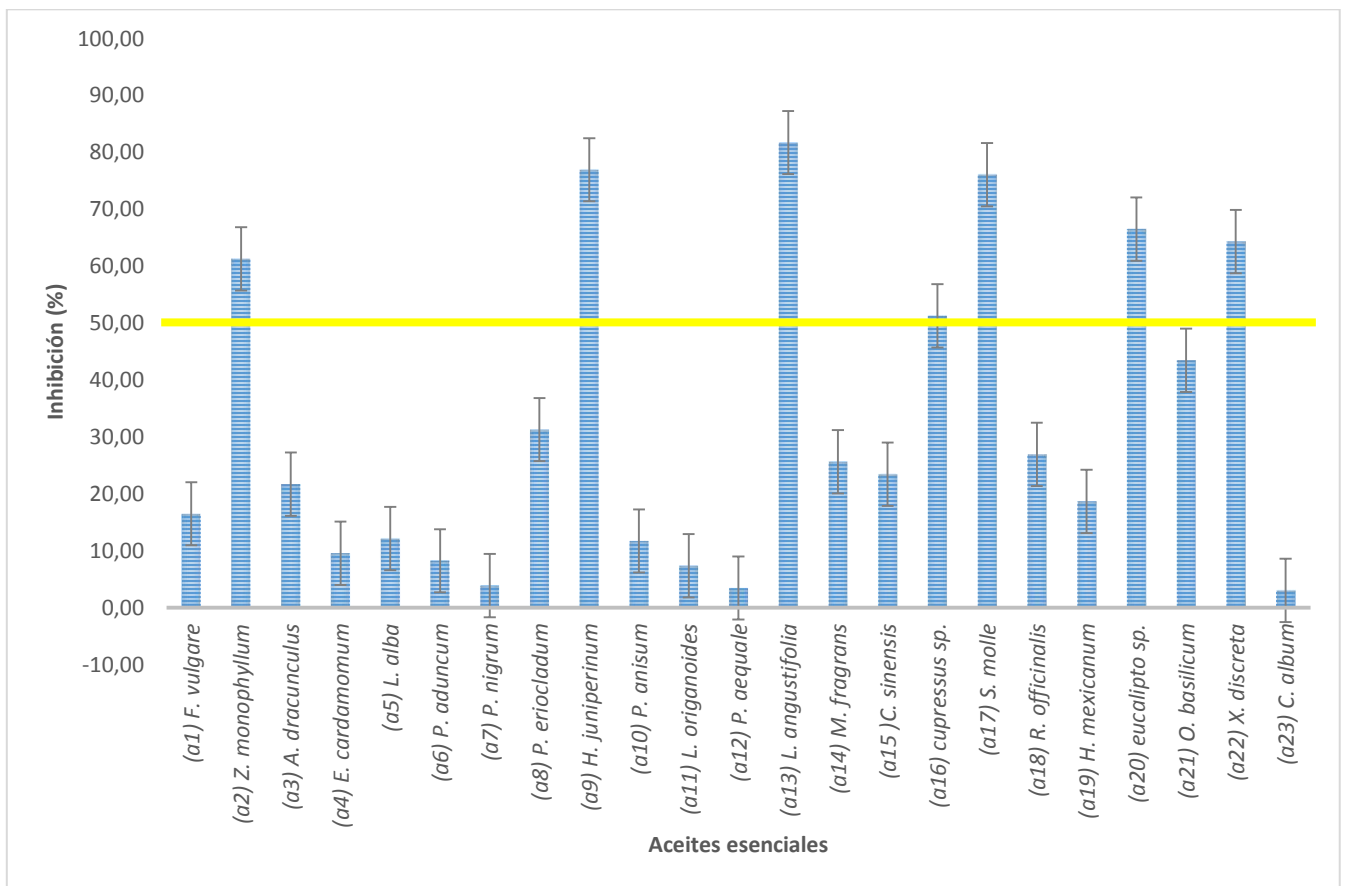


Figura 3.6.. Porcentaje de inhibición de los AEs promisorios sobre la catalasa.

Como se puede apreciar en la figura anterior fueron siete los AEs que lograron una inhibición mayor al 50 % de esta enzima, los cuales fueron *Z. monophyllum* (a2), *H. juniperinum* (a9), *L. angustifolia* (a11), *S. molle* (a17), *Cupressus sp.*(a16), *Eucalyptus sp.* (a20) y *X. discreta* (a22), los cuales se caracterizan por tener cantidades importantes en su composición de monoterpenos, exceptuando el a9 cuyo contenido no supera el 21 %. Para los demás AEs la cantidad de monoterpenos está entre el 40 y 95 %. La **Tabla 3.12** muestra las Cl_{50} de los AEs mencionados.

Tabla 3.12. Concentración inhibitoria 50 de los AEs con una inhibición ≥ 50 % de la catalasa.

Aceite Esencial	Cl_{50} (ppm) (Límite de confianza 95%)
<i>Z. monophyllum</i>	578,11 (449.15-783.30)
<i>H. juniperinum</i>	535,93 (405.91-735.21)
<i>L. angustifolia</i>	231,71 (75.02-798-01)
<i>S. molle</i>	705,05 (593.49-865.75)
<i>Cupressus sp.</i>	380,15 (247.00-656.66)
<i>Eucalyptus sp.</i>	425,92 (344.03-534.77)
<i>X. discreta</i>	616,83 (531.47-725.37)

La tabla anterior muestra que, el AE con la Cl_{50} más baja fue el de *L. angustifolia* con un valor de 231.71 ppm. El resto de los aceites que hacen parte de este grupo fueron menos activos con Cl_{50} entre 380.15 y 705.05 ppm. Si se compara dichos valores con las CL_{50} de cada AE, se puede establecer que se requieren concentraciones más bajas para controlar al insecto vía fumigante, que la que se requiere para inhibir dicha enzima. Lo anterior sugiere, que a la concentración evaluada (500 ppm), el AE puede tener otros mecanismos que propician la muerte del insecto. Cabe destacar que ninguno de estos AEs tiene reporte en la literatura como inhibidores de la catalasa, lo que constituye un primer reporte en dicha actividad inhibitoria. Sin embargo, es importante precisar que la metodología utilizada en la

presente investigación está sujeta a factores ambientales como la temperatura que pueden estar ligados a los cambios del comportamiento en la enzima.

Los demás 16 AEs evaluados tuvieron una inhibición por debajo del 30 %, lo que se puede deber a que dichos AEs, no tengan ninguna influencia sobre la actividad catalítica de la enzima y, por lo tanto, afecten otros puntos dianas en el insecto. Igualmente, no se tienen reportes de la inhibición de la enzima para estas sustancias. No obstante, no se pudo utilizar un control positivo para la inhibición de la catalasa, debido a la disponibilidad de este tipo de inhibidores en el mercado.

Agrupamiento clùster KNN

Con la información obtenida hasta el momento, se construyó un agrupamiento de los AEs teniendo en cuenta su actividad insecticida, su composición química relativa y el porcentaje de inhibición de la enzima catalasa. La **Tabla 3.13** de parámetros es la que se utiliza para la construcción de dicho agrupamiento.

Tabla 3.13. Tabla de parámetros de agrupación enzima catalasa

AE	% Inh	Monoterpenos	Sesquiterpenos	Fenilpropanos	Otros compuestos	CL ₅₀ (μL/L aire)
<i>F. vulgare</i>	16.53	21.8	0	60.9	0	16.234
<i>Z. monophyllum</i>	61.31	89.6	8.4	0	0	18.537
<i>A. dracuncululus</i>	21.74	6.2	1.9	88.5	0	22.775
<i>E. cardamomum</i>	9.57	96.7	0.1	0	0.5	29.371
<i>L. alba</i>	12.76	96	0	0	0	34.144
<i>P. aduncum</i>	8.26	38.6	58.1	0	0	41.91
<i>P. nigrum</i>	5.36	57.2	28.5	0	0	43.906
<i>P. eriocladium</i>	31.31	95.9	0	0	0	58.288
<i>H. juniperinum</i>	76.96	22.3	19.8	0.3	23.1	67.269
<i>P. anisum</i>	11.74	10.1	0.3	77.4	8.7	79.162

<i>L. origanoides</i>	7.40	78.7	5.6	2.5	0	87.71
<i>P. aequale</i>	3.48	15.6	0	79.1	0	92.3
<i>L. angustifolia</i>	81.74	73.8	17.3	0	0.2	107.691
<i>M. fragrans</i>	25.66	87.6	0.6	8.4	0	115.253
<i>C. sinensis</i>	23.48	77.7	4.1	0	4.7	138.325
<i>cupressus sp.</i>	51.31	96.5	0	0	0	152.298
<i>S. molle</i>	76.09	38.9	15	0.1	0	160.045
<i>R. officinalis</i>	26.96	84.9	7.4	0	0	191.491
<i>H. mexicanum</i>	18.70	26.1	5	0	56.8	229.065
<i>Eucalyptus sp.</i>	66.52	73.5	17.4	0	1.6	232.759
<i>O. basilicum</i>	43.48	16.4	43.9	24.1	3.8	234.012
<i>X. discreta</i>	64.35	79.1	10.9	0	0	237.229
<i>C. album</i>	3.63	82.1	5.6	0.2	0	264.586

El algoritmo k-means mostró que los 23 AEs se clasificaron en tres grupos tal y como se muestra en la **Tabla 3.14**.

Tabla 3.14. Agrupamiento k-means de los 23 AEs en función a sus características e inhibición de la catalasa

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>F. vulgare</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>H. mexicanum</i>
<i>Z. monophyllum</i>	<i>M. fragrans</i>	<i>Eucalyptus sp.</i>
<i>A. dracunculus</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>O. basilicum</i>
<i>E. cardamomum</i>	<i>Cupressus sp.</i>	<i>X. discreta</i>
<i>L. alba</i>	<i>S. molle</i>	<i>C. album</i>
<i>P. aduncum</i>	<i>R. officinalis</i>	
<i>P. nigrum</i>		
<i>P. eriocladium</i>		
<i>H. juniperinum</i>		
<i>P. anisum</i>		
<i>L. origanoides</i>		
<i>P. aequale</i>		

La variación explicada, es decir, la variación entre los grupos se debe en este caso al factor CL₅₀, las demás fuentes de variación no son significativas, como se puede apreciar en la **Tabla 3.15**.

Tabla 3.15.. Variables que generan diferencias significativas entre los grupos formados de los 23 AE.

Observación	F	Pr > F
Promedio		
Inhibición	2.270	0.129
Monoterpenos	1.151	0.336
Sesquiterpenos	0.505	0.611
Fenilpropanos	1.833	0.186
Otros	1.446	0.259
CL50	98.486	< 0,0001

En la **Figura 3.11** se muestra el perfil de los tres grupos formados. Cabe anotar que el rasgo que distingue al grupo tres (verde) son los valores altos de CL₅₀ y abundancia baja de fenilpropanos. El grupo dos (color azul) se distinguen por tener los porcentajes más altos de inhibición de la enzima y una CL₅₀ intermedia. Los AEs de este grupo se caracterizan por ser monoterpénicos ya que tienen cantidades muy bajas de sesquiterpenos, fenilpropanos y otros compuestos. En el grupo uno (color rojo) se encuentran los AE que se caracterizan por tener una amplia diversidad química y presenta CL₅₀ bajas y bajos porcentajes de inhibición sobre la catalasa. De este agrupamiento se puede decir que a pesar de que los monoterpenos no tuvieron un valor de significancia relevante, si se podría decir que una alta abundancia de estos compuestos puede estar relacionada con la inhibición de la enzima ya que la mayoría de los AEs que la inhibieron tienen este tipo de compuestos como mayoritarios.

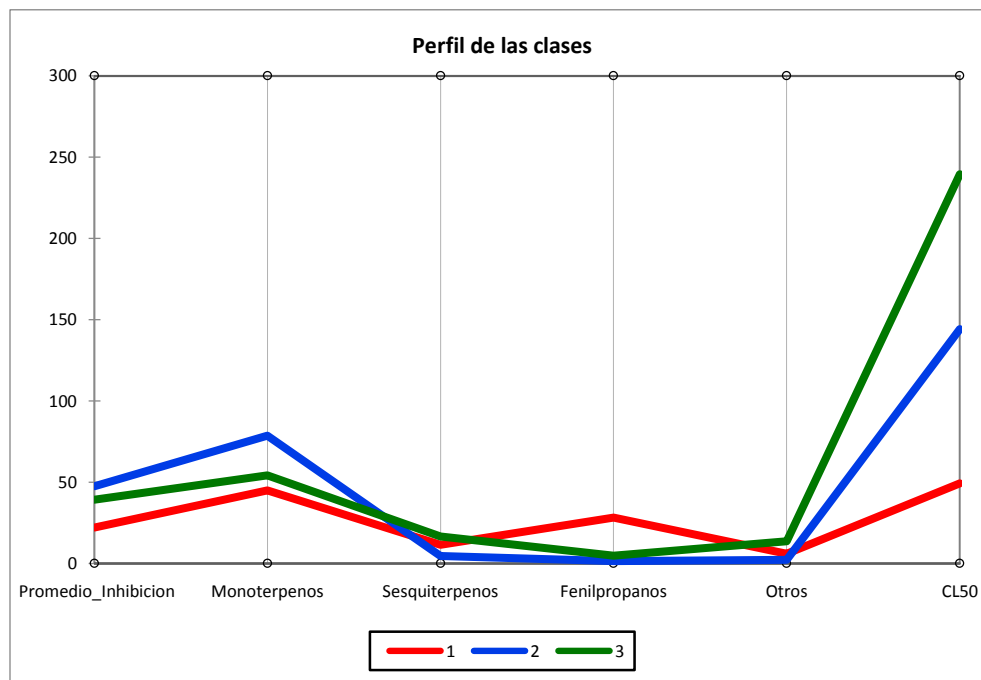


Figura 3.7. Perfil de los AEs formados en el agrupamiento k-means en la inhibición de la catalasa

3.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP)

La aplicación del ACP en este trabajo, facilita el análisis y agrupación de los AEs evaluados de acuerdo con su composición química, a su capacidad de inhibición de las enzimas de interés y a la letalidad causada en el insecto. Esto con el objetivo de explicar de manera integral el efecto de los aceites sobre *Tribolium castaneum*. El método de componentes principales busca determinar que variables son las significativas sobre el efecto que pueda tener sobre el gorgojo a través de la definición de componentes en función de las variables o descriptores utilizados (CL, %Inhibición enzimática; abundancia de cuatro clases de metabolitos secundarios). Para determinar cuántas componentes definen la variación del

efecto de los AEs sobre el gorgojo rojo se utiliza los mayores valores propios, los cuales se presentan en la **Tabla 3.16**.

Tabla 3.16. Valores propios y de varianza que definen las componentes que describen los efectos de los AEs sobre *T. castaneum*.

	F1	F2	F3	F4
Valor propio	2.262	1.856	1.116	1.036
Variabilidad (%)	28.278	23.202	13.947	12.956
% acumulado	28.278	51.480	65.427	78.382

Como se puede ver en la tabla, el espectro de actividad de 23 AEs puede explicarse en función de 4 componentes con una varianza máxima 78 % del efecto de los AEs sobre el gorgojo rojo. A partir de estos valores propios se puede construir el gráfico BIPILOT que se presenta en la **Figura 3.8**.

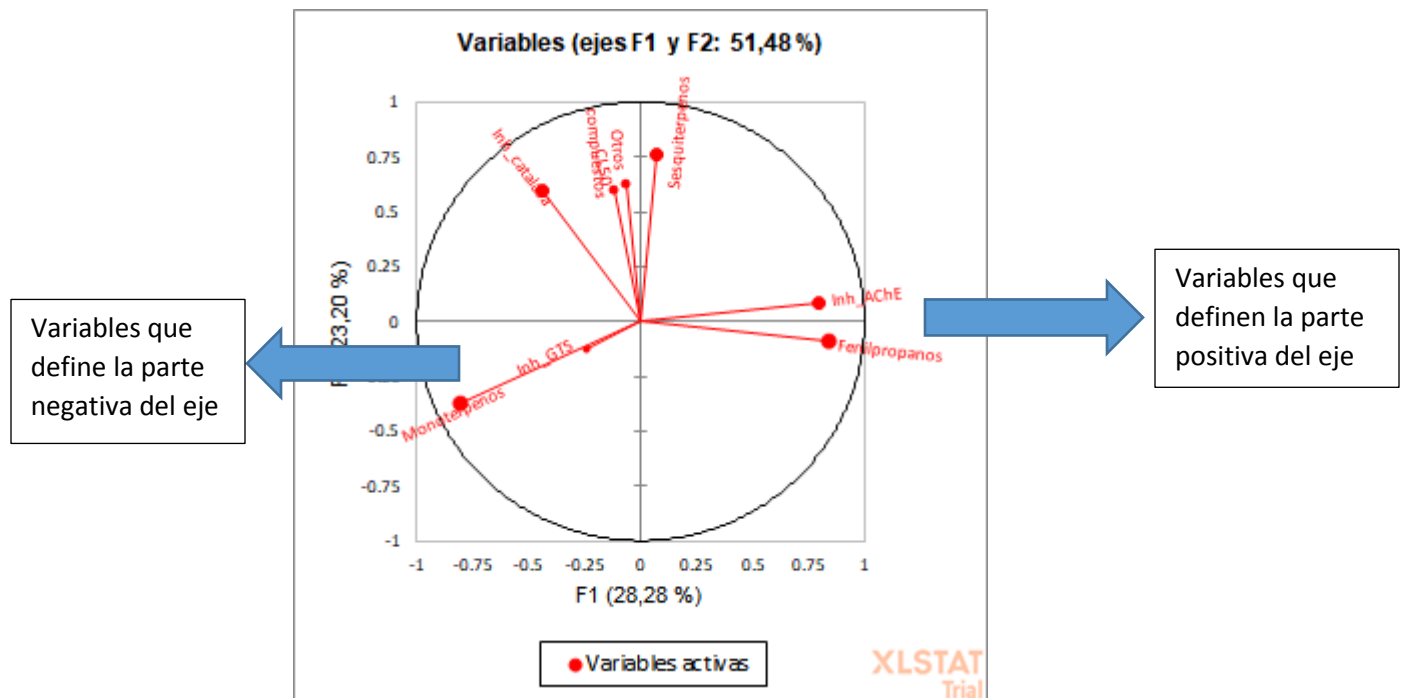


Figura 3.8. Gráfico BIPILOT para el análisis de los efectos de los AEs sobre *T. castaneum*

Las contribuciones más significativas por parte de los descriptores de los AEs a los ejes factoriales están dadas por el criterio de los mayores valores de coseno al cuadrado, lo que significa que las variables que tengan los valores más cercanos a uno (1) definen el eje (ver **Tabla 3.17** - valores en negrilla). Por lo tanto, se puede decir que la componente 1 positiva esta descrita por la abundancia de fenilpropanos y la inhibición de la AChE, y la componente 1 negativa esta descrita por la abundancia de monoterpenos y la inhibición de GST.

Tabla 3.17. Valores de coseno cuadrado de los descriptores de los AEs

	F1	F2	F3
Inh_catalasa	0.230	0.181	0.206
Inh_AChE	0.566	0.013	0.050
Inh_GTS	0.039	0.004	0.574
CL50	0.007	0.547	0.002
Monoterpenos	0.797	0.020	0.001
Sesquiterpenos	0.018	0.431	0.160
Fenilpropanos	0.677	0.059	0.048
Otros	0.101	0.316	0.082

El gráfico BIPLLOT mostrado en la **Figura 3.9** se construye incluyendo la posición de los 23 AEs (Obs 1 a 23) con el objetivo de hacer evidentes las aceites que están más correlacionados con cada uno de los ejes.

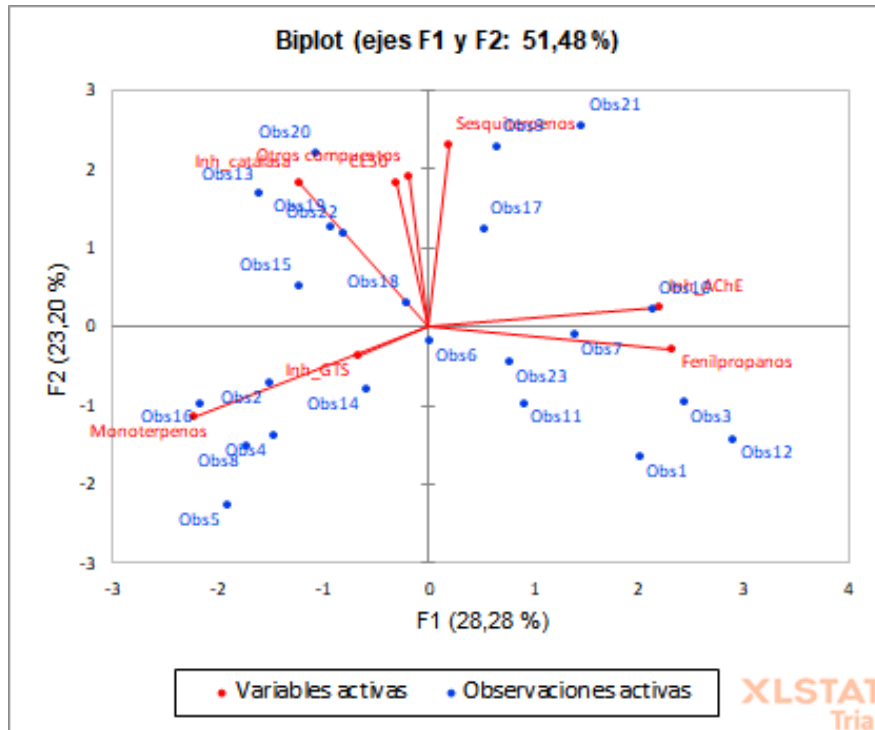


Figura 3.9. Gráfico BIPLLOT de las variables y las observaciones activas relacionadas con los efectos de los AEs sobre *T. castaneum*.

En la **Figura 3.9** se puede observar, en la componente 1 positiva, que al disminuir la abundancia de fenilpropanos y aumentar la de monoterpenos en los AEs, se reduce la letalidad en el insecto, pero se aumenta la inhibición de la AChE. La anterior observación se hace evidente al comparar la ubicación el BIPLLOT del aceite de *F. vulgare* (**Observación 1**) y del aceite de *P. nigrum* (**Observación 7**). Por otro lado, en la componente 1 negativa, se puede observar que a medida que se reduce la proporción de monoterpenos y se incrementa la cantidad de sesquiterpenos se logra una mayor inhibición de la GST. La anterior descripción se hace evidente al comparar la posición en el BIPLLOT del aceite de *L. angustifolia* (**Observación 5**) con la ubicación del aceite de *Z. monophyllum* (**Observación 2**). Con respecto a la inhibición de la enzima catalasa no se encontró un patrón claro que se pueda seguir para determinar el comportamiento de la inhibición frente a la composición.

3.5. CONCLUSIONES

El presente estudio realizó un aporte al conocimiento mediante la caracterización del enzimática del homogenizado proteico de *T. castaneum* y el estudio de inhibición de la actividad catalítica de AEs sobre enzimas de importancia vital para *T. castaneum*. Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron concluir.

- El homogenizado proteico de *T. castaneum*, usado en la presente investigación, contó con la presencia de las enzimas acetilcolinesterasa, glutatión s transferasa y catalasa, las cuales tuvieron una actividad específica de 0.53, 5.49 y 1257.82 U/mL, respectivamente.
- De los 23 AEs evaluados a 500 ppm solo dos causaron una inhibición sobre la enzima AChE, que correspondieron a los AEs de *P. nigrum* ($CL_{50} = 303.11$ ppm) y *R. officinalis* ($CL_{50} = 418.26$ ppm), los cuales contienen únicamente monoterpenos y fenilpropanos en su composición.
- Los AEs de *C. sinensis*, *P. aduncum* y *Z. monophyllum* fueron los únicos capaces de inhibir en más del 50 % la actividad de la GST a una concentración de 500 ppm. Los demás AEs generaron una inhibición inferior al 40 %. Para ninguno de los 23 AEs se encontraron reportes en la literatura sobre la inhibición de la GST de *T. castaneum*, por consiguiente, este es el primer reporte para dicha actividad. Los AEs que contienen una concentración alta de monoterpenos y, algún contenido de sesquiterpenos, son los que inhiben mejor la GST, a pesar de tener una CL_{50} alta.
- Los AEs de *Z. monophyllum*, *H. juniperinum*, *L. angustifolia*, *S. molle*, *Cupressus sp.*, *Eucalyptus sp.* y *X. discreta* tuvieron el mayor efecto inhibitorio sobre la catalasa con porcentajes de inhibición entre el 50 y 80 %, a una concentración de 500 ppm. Los demás AEs evaluados tuvieron una inhibición por debajo del 30 %. Para ninguno de los AEs evaluados se encontraron reportes en la literatura sobre la inhibición de la catalasa de *T. castaneum*, por consiguiente, este es el primer reporte. Los monoterpenos pueden ser los metabolitos responsables involucrados en la inhibición de dicha enzima.
- La concentración de los AEs, en cada uno de los ensayos de inhibición, fueron muy superiores a sus CL_{50} . Por lo tanto, la mortalidad del insecto puede estar relacionada con un efecto inhibitorio sobre las enzimas evaluadas, pero no son el principal mecanismo de acción de la muerte del insecto. Sin embargo, se encontraron

algunos AEs capaces de inhibir más de una enzima, a la misma concentración. Tal es el caso de *Z. monophyllum* que fue un muy buen inhibidor de la GTS y catalasa y, además inhibió, aunque en menor proporción, la AChE. Este tipo de AEs se pueden convertir en sustancias multiana para el control de *T. castaneum*.

4. RECOMENDACIONES

- Determinar si los AEs promisorios causan otros efectos sobre el *T. castaneum*, por ejemplo, repelencia, toxicidad por contacto, deterrencia alimentaria e inhibición de la reproducción.
- Realizar las pruebas de inhibición enzimática *in vivo* para corroborar si hay o no, sobre expresión de las enzimas de interés.
- Evaluar otros puntos diana que puedan ser afectados por los AEs, como por ejemplo los canales GABA, receptores octopaminérgicos, el complejo citocromo p450, entre otros.
- Realizar estudios de adaptación a cultivo de las especies vegetales más promisorias para el control de *T. castaneum*.
- Evaluar la actividad insecticida sobre *T. castaneum* de los compuestos mayoritarios presentes en los AEs promisorios, y así corroborar su relación con el efecto causado.
- Diseñar mezclas con los AEs y/o compuestos puros para potenciar la acción insecticida.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2011a). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, *16*(9), 7672–7690. <https://doi.org/10.3390/molecules16097672>
- Aazza, S., Lyoussi, B., & Miguel, M. G. (2011b). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*, *16*(9), 7672–7690. <https://doi.org/10.3390/molecules16097672>
- Abbasipour, H., Mahmoudvand, M., Rastegar, F., & Hossein, M. (2011). Fumigant Toxicity and Oviposition Deterrency of the Essential Oil from Cardamom , *Elettaria cardamomum* , Against Three Stored — product Insects Fumigant toxicity and oviposition deterrency of the essential oil from cardamom , *Elettaria cardamomum* , agains. *Journal of Insect Science*, *11*(165), 1–10.
- Abbott, W. S. (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology*, *18*, 265–267.
- Abdel-Sattar, E., Zaitoun, A. A., Farag, M. A., El Gayed, S. H., & Harraz, F. M. H. (2010). Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. *Natural Product Research*, *24*(3), 226–235. <https://doi.org/10.1080/14786410802346223>
- Abdelgaleil, S. A. M. (2017). Insecticidal properties of essential oils against *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase and adenosine triphosphatases, (May). <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1038999>
- Abdelgaleil, S. A. M., Badawy, M. E. I., Mohamed, M. I. E., & Mohamed, S. (2012). Chemical Composition and Fumigant Toxicity of Essential Oils Isolated from Egyptian Plants Against Stored Product Insects *Sitophilus Oryzae* (L .) and *Tribolium Castaneum* (Herbst). In *Int. Conf. on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products* (pp. 50–57). Antalya, Turkey.
- Abdelgaleil, S. A. M., Badawy, M. E. I., Mohamed, M. I. E., & Shawir, M. S. (2012). Chemical Composition and Fumigant Toxicity of Essential Oils Isolated From

Egyptian Plants Against Stored Product Insects *Sitophilus Oryzae* (L .) and *Tribolium Castaneum* (Herbst), (October), 50–57.

Abdelgaleil, S. A. M., Mohamed, M. I. E., Badawy, M. E. I., & El-arami, S. A. A. (2009). Fumigant and Contact Toxicities of Monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase Activity. *Journal of Chemical Ecology*, 35(5), 518–525.
<https://doi.org/10.1007/s10886-009-9635-3>

Abdelgaleil, S., Badawy, M., Mohamed, M. I., & Shawir, M. (2015). Chemical Composition and Fumigant Toxicity of Essential Oils Isolated From Egyptian Plants Against Stored Product Insects *Sitophilus Oryzae* (L .) and *Tribolium Castaneum* (Herbst). *Egyptian Journal of Pest Control*, 25(3), 639–647.

Abdelghaffar, M., Garamoon, A., & Gad, H. (2017). Effect of Ozone Gas on the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 10(4), 43–48. <https://doi.org/10.21608/eajbsa.2017.12484>

Abou-taleb, H. K., Mohamed, M. I. E., Mohamed, S., & Abdelgaleil, S. A. M. (2015). Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters Insecticidal properties of essential oils against *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase and adenosine triphosphatases, (June), 37–41.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1038999>

Abou-Taleb, H. K., Mohamed, M. I. E., Shawir, M. S., & Abdelgaleil, S. A. M. (2016). Insecticidal properties of essential oils against *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase and adenosine triphosphatases. *Natural Product Research*, 30(6), 710–714. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1038999>

Adams, R. (2012). Identification of Essential Oils Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry. (4th Ed., pp. 804–805).

Alcala-Orozco, M., Caballero-Gallardo, K., Stashenko, E. E., & Olivero-Verbel, J. (2019). Repellent and Fumigant Actions of the Essential Oils from *Elettaria cardamomum* (L.) Maton, *Salvia officinalis* (L.) Linnaeus, and *Lippia origanoides* (V.) Kunth Against *Tribolium castaneum* and *Ulomoides dermestoides*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(1), 18–30. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1585966>

- Amini, S., Tajabadi, F., Khani, M., Labbafi, M., & Tavakoli, M. (2018). Identification of the Seed Essential Oil Composition of Four Apiaceae Species and Comparison of their Biological Effects on *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* (Herbst.). *Journal of Medicinal Plants*, 17(67), 68–76.
- Anderson, J. A., & Coats, J. R. (2012). Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102(2), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.12.002>
- Annis, P. C., Lee, B.-H., Park, B.-S., Tumaalii, F., Pratt, S. J., & Lee, S.-E. (2008). Fumigant Toxicity of Essential Oils and Monoterpenes Against the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 5(2), 237–240. [https://doi.org/10.1016/s1226-8615\(08\)60158-2](https://doi.org/10.1016/s1226-8615(08)60158-2)
- APRD. (2007). Arthropod Pesticide Resistance Database. Retrieved from <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=95>
- Arif, S., Rizvi, H., Ling, S., Tian, F., Xie, F., & Zeng, X. (2018). Industrial Crops & Products Toxicity and enzyme inhibition activities of the essential oil and dominant constituents derived from *Artemisia absinthium* L. against adult Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera : Psyllidae). *Industrial Crops & Products*, 121(February), 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.031>
- Ashrafi, R., & Ebadollahi, A. (2016). Biological Activities of *Hypericum perforatum* L. Essential Oil Against Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera : Tenebrionidae). *Journal of Entomology*, 13(3), 91–97. <https://doi.org/10.3923/je.2016.91.97>
- Augusto, C., Llanos, H., Arango, D. L., & Giraldo, M. C. (2008). Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 76–82.
- Badii, M., & Garza, V. (2007, May). Resistencia en Insectos, Plantas y Microorganismos. *CULCyT*, 4(18), 9–25.
- Benzi, V., Stefanazzi, N., & Ferrero, A. A. (2009). Biological Activity of Essential Oils from Leaves and Fruits of Pepper Tree (*Schinus molle* L.) to Control Rice Weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69(2), 154–159. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392009000200004>

- Bingham, A. C., Subramanyam, B., Mahroof, R., & Alavi, S. (2017). Development and validation of a model for predicting survival of young larvae of *Tribolium castaneum* exposed to elevated temperatures during heat treatment of grain-processing facilities. *Journal of Stored Products Research*, *72*, 143–152.
<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2017.04.008>
- Bisset, J. (2002). *Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. REV CUBANA MED TROP* (Vol. 54).
- Bolívar, M. (2007). Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro Y prevención. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*, *15*(1), 180–184.
- Boyer, S., Zhang, H., & Lempérière, G. (2012). A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects, (January 2008), 213–229.
<https://doi.org/10.1017/S0007485311000654>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistry*, *72*, 248–254.
- Caballero, Karina. Olivero, Jesús. Pino, Nayive. Stashenko, E. (2014). Chemical composition and bioactivity of *Piper auritum* and *P. multiplinervium* essential oils against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *13*(1), 10–19.
<https://doi.org/10.3329/jbs.v14i0.441>
- Caballero, K., Olivero, J., & Stashenko, E. (2011). Repellent activity of essential oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* herbst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(5), 1690–1696. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L361353171%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1021/jf103937p>
- Caballero, K., Olivero, J., & Stashenko, E. (2012). Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research*, *50*, 62–65. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.05.002>
- Campolo, O., Giunti, G., Russo, A., Palmeri, V., & Zappalà, L. (2018). Essential Oils in

- Stored Product Insect Pest Control. *Journal of Food Quality*, 2018(October).
<https://doi.org/10.1155/2018/6906105>
- Can Baser, K. H., & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Retrieved from
<https://ttnngmai.files.wordpress.com/2012/09/handbookofessentialoil.pdf>
- Cantrell, C. L., Dayan, F. E., & Duke, S. O. (2012). Natural Products As Sources for New Pesticides. *Journal of Natural Products*, 75, 1231–1242.
- Chaubey, M. K. (2012). Acute, Lethal and Synergistic Effects of Some Terpenes Against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ecologia Balkanica*, 4(1), 53–62.
- Clark, J., Scott, J., Campos, F., & Bloomquist, J. (1994). RESISTANCE TO AVERMECTINS: Extent, Mechanisms, and Management Implications. *Annual Review Entomology*, 40, 1–30.
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022–4034.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>
- Departamento General de Planeación (DNP). (2016). Pérdida y desperdicio de alimentos en Colombia, 22–31. Retrieved from https://mrv.dnp.gov.co/Documentos de Interes/Perdida_y_Desperdicio_de_Alimentos_en_colombia.pdf
- Devi, M. B., & Devi, N. V. (2015). Biology of Rust-Red Flour Beetle , *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera : Tenebrionidae), 7(1), 12–15.
- Dowd, A. J., Steven, A., Morou, E., Hemingway, J., Vontas, J., & Paine, M. J. I. (2009). A simple glutathione transferase-based colorimetric endpoint assay for insecticide detection. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(2), 164–168.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.008>
- Durán, D. C., Caballero, D., Martínez, J. R., Córdoba, Y., & Stashenko, E. E. (2015). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) cultivadas en Colombia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(0), 89. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.156>

- Durán, R., Luz, A., Montes, C., & Peláez, C. (2012). Aceite Esencial Obtenido De Cáscaras De Naranja En Diferentes Estados De Madurez De Dos Cultivos En El Municipio De Chimichagua, Colombia. *Alimentos Hoy*, 21(26), 60–71. Retrieved from <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/122>
- El-bakry, A. M., Abdelaziz, N. F., Sammour, E., & Abdelgaleil, S. A. M. (2016). Insecticidal Activity of Natural Plant Essential Oils against Some Stored Product Insects and Their Side Effects on Wheat Seed Germination Insecticidal Activity of Natural Plant Essential Oils against Some Stored Product Insects and Their Side Effects on , (January), 82–88.
- Ellman, G., Courtney, D., Andres, V., & Featherstone, R. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13726518>
- FAO. (2012). Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas (pp. 10–45). Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-bt561s.pdf>
- FAO. (2016a). Insectos que dañan granos productos almacenados.
- FAO. Pérdidas post cosecha: un concepto mal definido o mal utilizado. Estudio sintético y didáctico sobre el fenómeno de las pérdidas que se producen a lo largo del sistema post-cosecha (2016).
- FAO. (2017). *Pérdidas y desperdicios de alimentos en América latina y el Caribe*.
- FENALCE. (2017). *Informe de gestión 2017, Fondo Nacional Cerealista*.
- FENALCE. (2018). Indicadores Cerealistas 2018 A.
- Gahukar, R. T. (2018). Management of pests and diseases of important tropical/subtropical medicinal and aromatic plants: A review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9(February), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.03.002>
- García, S., & Bergvinson, D. J. (2007). Programa integral para reducir pérdidas poscosecha en maíz Agricultura Técnica en México Instituto Nacional de Investigaciones Forestales , Agrícolas y Pecuarias. *Agricultura Técnica En México*,

33(2), 181–189.

- García, S., Bergvinson, D. J., & Espinosa, C. (2007). *Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control*. (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), Ed.). México, D.F.
- González, F. G., Delgado, M. R., Zapata, R. T., Manuel, V., & Alarcón, S. R. (2009). Agentes de control biológico de plagas de granos almacenados. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas.*, 8, 49–56.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., ... Bruni, R. (2009). Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(1), 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.08.002>
- Hallman, G. J. (2013). Control of stored product pests by ionizing radiation. *Journal of Stored Products Research*, 52, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2012.10.001>
- Hernández, A., & Carballo, A. (2018). *Almacenamiento y conservación de granos y semillas*. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. Retrieved from <http://somossemilla.org/wp-content/uploads/2017/06/Almacenamiento-de-semillas.pdf>
- Hernández, J. E. (1998). *Tecnologías apropiadas para el almacenamiento y conservación de granos en pequeñas fincas: Cartilla divulgativa*. Bogotá D. C: Universidad Nacional de Colombia.
- Houghton, P., Ren, Y., & Howes, M. (2007). Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*, 14(4), 289–300. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.02.002>
- Hu, J., Wang, W., Dai, J., & Zhu, L. (2019). Chemical composition and biological activity against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Artemisia brachyloba* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 128(November 2018), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.076>
- Hua, W., Xue-ru, L., Dong-dong, Y., Xing, Z., & Jun-tao, F. (2014). Effect of allyl isothiocyanate on ultra-structure and the activities of four enzymes in adult *Sitophilus zeamais*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 109, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.01.001>

- ICA. (2009). *Mis Buenas Prácticas Agrícolas*. (Ministerio de agricultura y desarrollo rural, Ed.). Bogotá D. C.
- IRAC. (2019). *Clasificación del modo de acción de insecticidas y acaricidas*.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603–608.
- Isman, M. B. (2009). Plant Essential Oils as Green Pesticides for Pest and Disease Management. In *Crop Protection* (Vol. 19, pp. 41–51). <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0887.ch004>
- Iwase, T., Tajima, A., Sugimoto, S., Okuda, K. I., Hironaka, I., Kamata, Y., ... Mizunoe, Y. (2013). A simple assay for measuring catalase activity: A visual approach. *Scientific Reports*, 3(March 2014). <https://doi.org/10.1038/srep03081>
- Jaramillo-colorado, B., & Nayive, P. (2015). Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Chocó , Colombia. *Revista de Toxicología*, 32(2), 112–116. Retrieved from <file:///D:/Informacion/Downloads/P. aduncum.pdf>
- Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M., & Milos, M. (2006). In Vitro Acetylcholinesterase Inhibitory Properties of Thymol, Carvacrol and their Derivatives Thymoquinone and Thymohydroquinone. *Phytotherapy Research*, 21, 748–754. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Jukic, M., Politeo, O., & Milos, M. (2006). Chemical Composition and Antioxidant Effect of Free Volatile Aglycones from Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt .) Compared to Its Essential Oil. *Croatica Chemica Acta*, 79(2), 209–214.
- Khani, A., & Heydarian, M. (2014). Fumigant and repellent properties of sesquiterpene-rich essential oil from *Teucrium polium* subsp . *capitatum* (L .). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(12), 956–961. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60169-3](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60169-3)
- Khoobdel, M., Ahsaei, S. M., & Farzaneh, M. (2017). Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with *Rosmarinus officinalis* essential oil in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Entomological Research*. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12212>

- Khorrami, F., Valizadegan, O., Forouzan, M., & Soleymanzade, A. (2018). The antagonistic/synergistic effects of some medicinal plant essential oils, extracts and powders combined with Diatomaceous earth on red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(13–14), 685–695. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1458412>
- Kim, S. II, & Lee, D. W. (2014). Toxicity of basil and orange essential oils and their components against two coleopteran stored products insect pests. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 17(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2013.09.002>
- Kiran, S., & Prakash, B. (2015). Toxicity and biochemical efficacy of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis*. *Industrial Crops and Products*, 74, 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.073>
- 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(11), 1101–1106. <https://doi.org/10.1002/ps.548>
- Lee, B. L. S., Annis, P. C., Pratt, S. J., Park, B., & Tumaalii, F. (2002). Fumigant Toxicity of Essential Oils and Monoterpenes Against the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 5(2), 237–240. [https://doi.org/10.1016/S1226-8615\(08\)60158-2](https://doi.org/10.1016/S1226-8615(08)60158-2)
- Leyva, M., French, L., & Marquetti, M. D. C. (2015). Aceite de trementina modificado: un inhibidor de enzimas de - toxicadoras en dos cepas de *Aedes aegypti*. *Revista Biomédica*, 26(1), 13–22. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v26i1.4>
- Maia, J. G. S., Zohhbi, M. D. G. B., Andrade, E. H. A., Santos, A. S., Da Silva, M. H. L., Luz, A. I. R., & Bastos, C. N. (1998). Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal*, 13(4), 269–272. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(1998070\)13:4<269::AID-FFJ744>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(1998070)13:4<269::AID-FFJ744>3.0.CO;2-A)
- Mikhael, A. (2011). Potential of some volatile oils in protecting packages of irradiated wheat flour against *Ephestia kuehniella* and *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research*, 47(4), 357–364. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.06.002>

- Mohamed, M. I. E., & Abdelgaleil, S. A. M. (2008). Chemical composition and insecticidal potential of essential oils from Egyptian plants against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Applied Entomology and Zoology*, 43(4), 599–607. <https://doi.org/10.1303/aez.2008.599>
- Molina, D., & Figueroa, L. E. (2009). Metabolic resistance to organophosphate insecticides in *Anopheles aquasalis* Curry 1932, Libertador municipality, Sucre State, Venezuela. *Biomédica*, 29(4), 604–615. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572009000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Muchtaridi, Subarnas, A., Apriyantono, A., & Mustarichie, R. (2010). Identification of compounds in the essential oil of nutmeg seeds (*Myristica fragrans* Houtt.) that inhibit locomotor activity in mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4771–4781. <https://doi.org/10.3390/ijms11114771>
- Naseem, M. T., & Khan, R. R. (2011). Comparison of repellency of essential oils against red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, Vol. 2(7), 131 – 134. Retrieved from [http://www.academicjournals.org/JSPPR/PDF/pdf2011/Jul/Naseem and Khan.pdf](http://www.academicjournals.org/JSPPR/PDF/pdf2011/Jul/Naseem%20and%20Khan.pdf)
- Nassetta, M., Viglianco, A., & Novo, R. (1997). Actividad repelente de diferentes extractos vegetales sobre *Tribolium castaneum* (Herbst). *AGRISCIENTIA*, 14, 31–36.
- Navarro, D. A. (2014). *Manejo Integrado de Plagas*.
- Olmedo, R., Herrera, J. M., Lucini, E. I., Zunino, M. P., Pizzolitto, R. P., Dambolena, J. S., & Zygadlo, J. A. (2015). Essential oil of *Tagetes filifolia* against the flour beetle *Tribolium castaneum* and its relation to acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. *Agriscentia*, 32(2), 113–121. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/agrisc/v32n2/v32n2a04.pdf>
- Orav, A., Stulova, I., Kailas, T., & Müürisepp, M. (2004). Effect of Storage on the Essential Oil Composition of *Piper nigrum* L. Fruits of Different Ripening States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2582–2586. <https://doi.org/10.1021/jf030635s>
- Orhan, I., Kartal, M., Kan, Y., & Sener, B. (2008). Activity of essential oils and individual

- components against acetyl- and butyrylcholinesterase. *ZeitsJournal of Chriff Fur Naturforschung. C, Biosciences*, 63(7–8), 547–553. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18810999>
- Özcan, M. M., & Chalchat, J. C. (2006). Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. *Annals of Microbiology*, 56(4), 353–358. <https://doi.org/10.1007/BF03175031>
- Pascual, M. J., Ballesta, M. C., & Soler, A. (2004). Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 30, 279–286.
- Patiño, W. (2017). *Aceites esenciales como potenciales agentes fitosanitarios para el control de Sitophilus zeamais*. *Aceites esenciales como potenciales agentes fitosanitarios para el control de Sitophilus zeamais*. Universidad Nacional de Colombia.
- Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>
- Pedrini, N., Dal Bello, G. M., Padín, S. B., & Juárez, M. P. (2010). Capacidad insecticida de *Beauveria bassiana* cultivada en hidrocarburos para control de coleópteros en granos almacenados. *Agrociencia Uruguay*, 15(1), 64–69. Retrieved from http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482011000100008
- Peixoto, M. G., Bacci, L., Fitzgerald Blank, A., Araújo, A. P. A., Alves, P. B., Silva, J. H. S., ... Arrigoni-Blank, M. de F. (2015). Toxicity and repellency of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against stored grain insects. *Industrial Crops and Products*, 71, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.084>
- Pérez, E. (2012). Plaguicidas botánicos: una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, 16(1), 51–59.
- Pérez, S. (2012). *Determinación de Enzimas de Resistencia en Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

- Prieto, J. (2012). *Estudio fitoquímico de Compsonera capitellata (Myristicaceae), Zanthoxylum rigidum (Rutaceae) y Ocotea longifolia (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de Sitophilus sp.* Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/11391/>
- Prieto, J., Patiño, O., Delgado, W., Moreno, J., & Cuca, L. (2011). Chemical composition, insecticidal, and antifungal activities of fruit essential oils of three colombian *Zanthoxylum* species. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(1), 73–82. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392011000100009>
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Arch Prev Riesgos Labo*, 4(2), 67–75.
- Ramiro, W., & Bayona, P. (2017). Aceites esenciales como potenciales agentes fitosanitarios para el control de *Sitophilus zeamais* Aceites esenciales como potenciales agentes fitosanitarios para el control de *Sitophilus zeamais*.
- Regnault, C. (1997). The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*, 2, 25–34.
- Regnault, C., Vincent, C., & Arnason, J. T. (2012). Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Annual Review of Entomology*, 57(1), 405–424. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554>
- Ringuelet, J., Ocampo, R., Henning, C., & Urrutia, I. (2014). Actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown sobre *Tribolium castaneum* Herbst . en granos de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, 9(2), 214–222.
- Rodriguez, A., Zunino, M., & Dambolena, J. (2018). Optimización de ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en *Sitophilus zeamais* (Mots.). *Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 5(1). Retrieved from <http://ezproxy.unal.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsbas&AN=edsbas.27206382&lang=es&site=eds-live>
- Rodriguez, M. (2008). *Estudio de la Resistencia a Insecticidas en Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri.” Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri.

- Rozman, V., Kalinovic, I., & Korunic, Z. (2007). Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43, 43(1), 349–355. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2006.09.001>
- Saleem, M., Hussain, D., & Rashid, R. H. (2013). Insecticidal activities of two citrus oils against *Tribolium castaneum*. *American Journal of Research Communication*, 1(6), 67–74.
- Shaaya, E., Kostjukovski, M., Eilberg, J., & Sukprakarn, C. (1997). Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 33(1), 7–15. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(96\)00032-X](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(96)00032-X)
- Shi, H., Pei, L., Gu, S., Zhu, S., Wang, Y., Zhang, Y., & Li, B. (2012). Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2012.07.010>
- Shojaei, A., Talebi, K., Sharifian, I., & Ahsaei, S. M. (2017). *Ac ha r ce ea pt n ed Bi o pa lo pe gis r - t un til pr oo f*, (May 2016).
- Shukla, J., Tripathi, S., & Chaubey, M. (2009). Toxicity of *Myristica fragrans* and *Illicium verum* essential oils against flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 8(6), 403–407.
- Singh, S. (2017). Natural plant products-As protectant during grain storage : A review Subash. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(3), 1873–1885.
- Sívori, J. (1993). *Regulación de la Glutathión-S- Transferasa (GST) de Triatoma infestans y su importancia en el proceso de intoxicación por insecticidas organofosforados*. Universidad de Buenos Aires.
- Stashenko, E. (2009). Aceites esenciales (pp. 11–124). Bucaramanga, Santander: UIS. Retrieved from <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf>
- Stashenko, E., & Pino, N. (2011). Especie de *Clusia* productora de biocombustible. *Vitae, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica de La Universidad de Antioquia*, 57(52), 278–283.
- Talukder, F. (2009). Pesticide Resistance in Stored- - Product Insects and Alternative

Biorational Management : A Brief Review, 15, 9–15.

Tarigan, S. I., Dadang, & Sakti Harahap, I. (2016). Toxicological and physiological effects of essential oils against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Biopesticides*, 9(2), 135–147.

Trdan, S. (2016). *Insecticides Resistance*. (S. Trdan, Ed.), *Insecticides Resistance* (1st ed.). <https://doi.org/10.5772/60478>

Tripathi, A. K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., & Bhattacharya, P. R. (2009). A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(5), 052–063. <https://doi.org/10.1080/09540091.2010.523455>

Triplehorn, C., & Johnson, N. (2005). *Borror and Belong's introduction to the study of insects* (7th editio). Belmont USA: Peter Marshal.

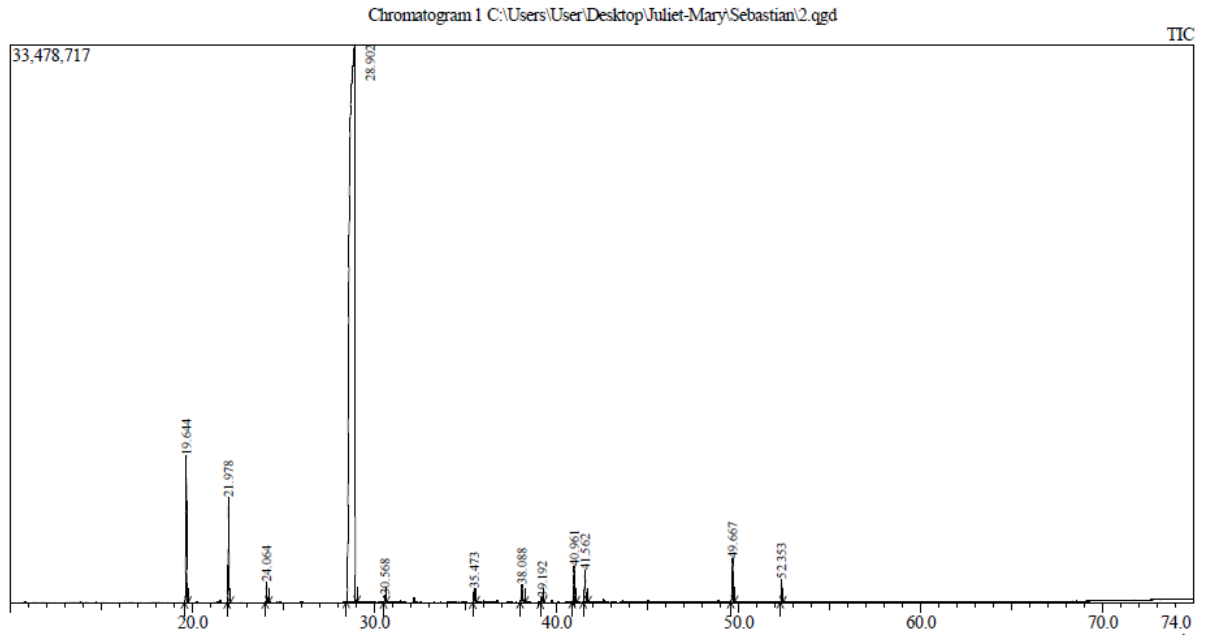
Upadhyay, N., Dwivedy, A. K., Kumar, M., Prakash, B., & Dubey, N. K. (2018). Essential Oils as Eco-friendly Alternatives to Synthetic Pesticides for the Control of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 21(2), 282–297. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1459875>

Vontas, J. G., Enayati, A. A., Small, G. J., & Hemingway, J. (2000). A simple biochemical assay for glutathione S-transferase activity and its possible field application for screening glutathione S-transferase-based insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 68(3), 184–192. <https://doi.org/10.1006/pest.2000.2512>

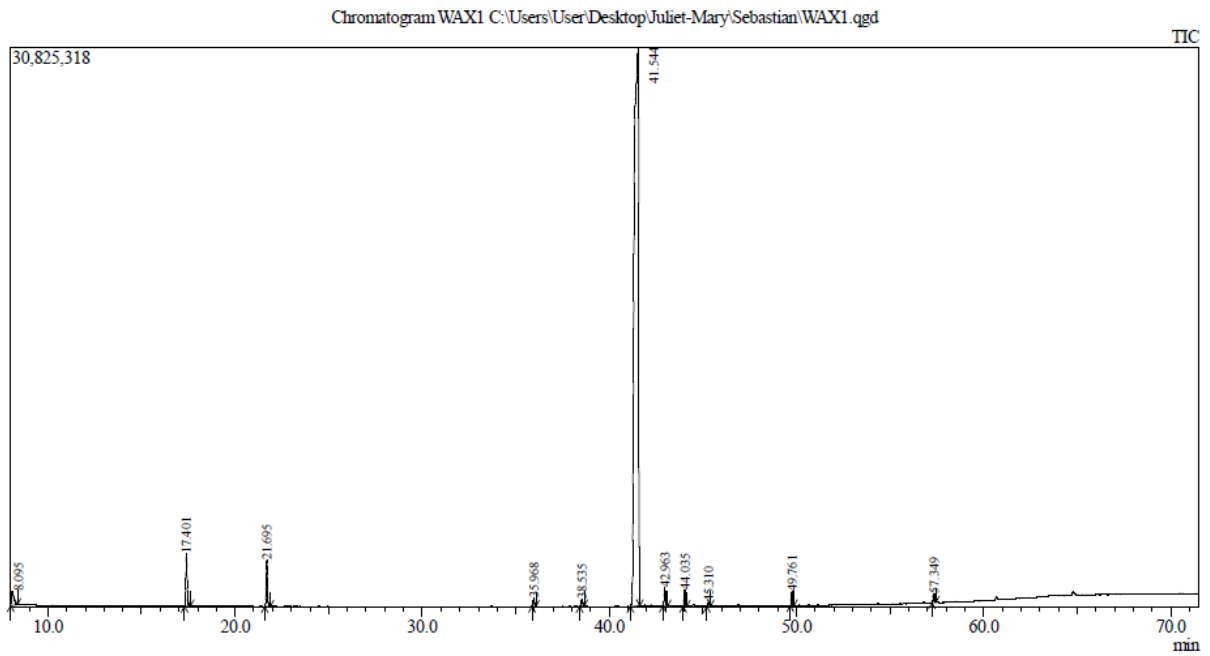
Wagan, T. A., Hu, D., He, Y., Mabubu, J. I., & Nawaz, M. (2016). Repellency of three plant essential oils against red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera : Tenebrionidae) a kar ş i üç bitki Özet. *Turkish Journal of Entomology*, 40(4), 347–354.

Cromatogramas de los AEs analizados en la presente investigación.

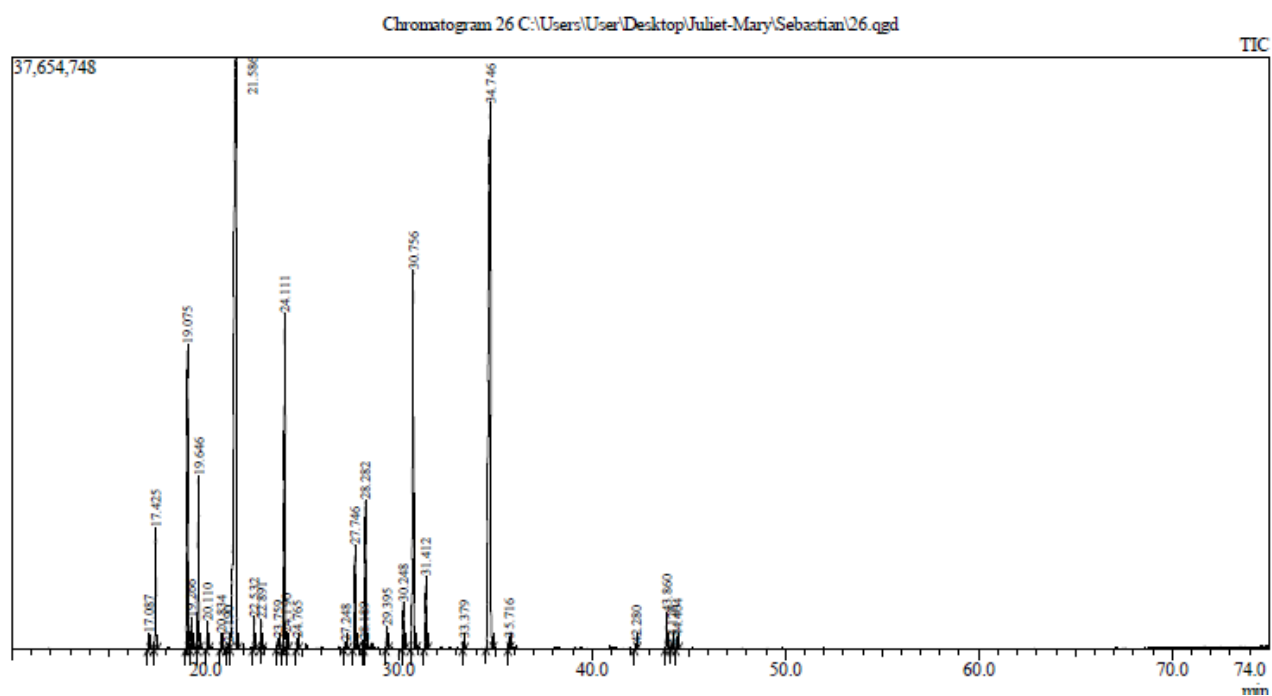
- ***Artemisa dracunculus* (DB-5)**



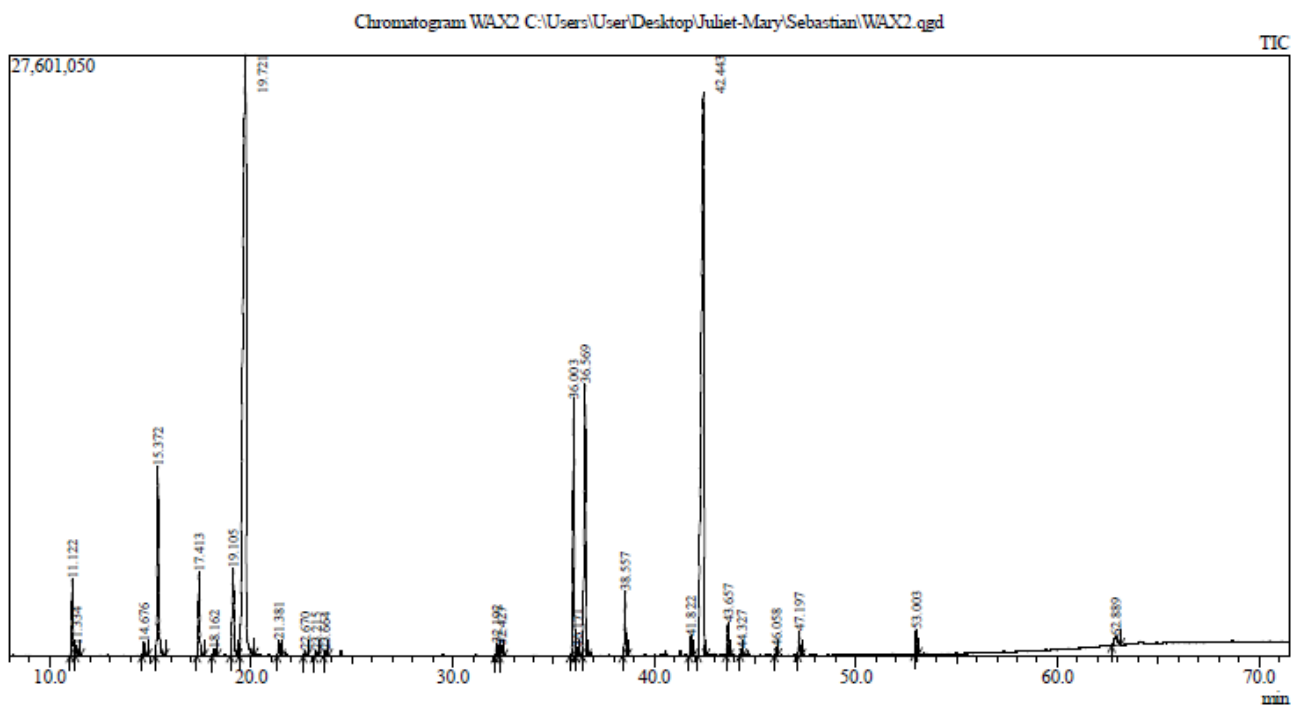
- ***Artemisa dracunculus* (INNOWAX)**



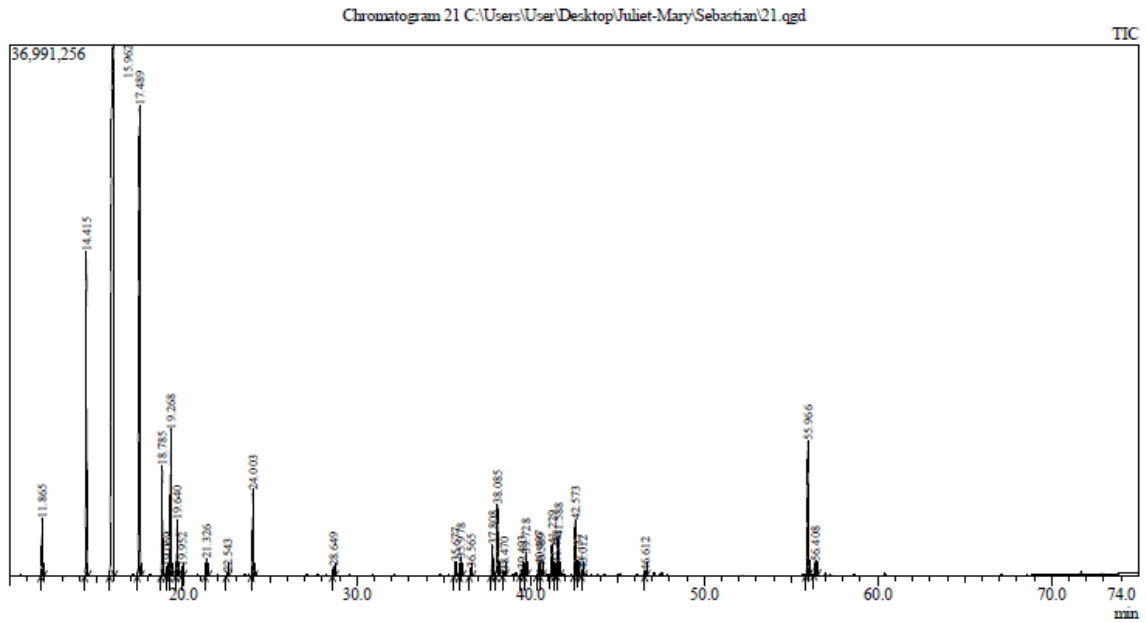
- *Elettaria cardamomum* (DB-5)



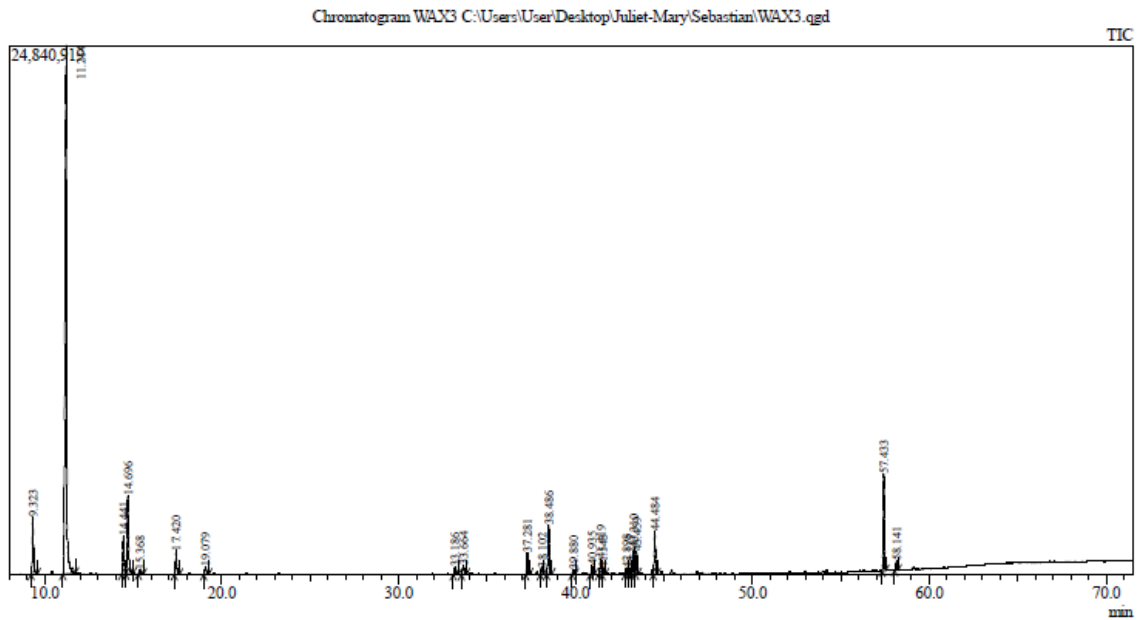
- *Elettaria cardamomum* (INNOWAX)



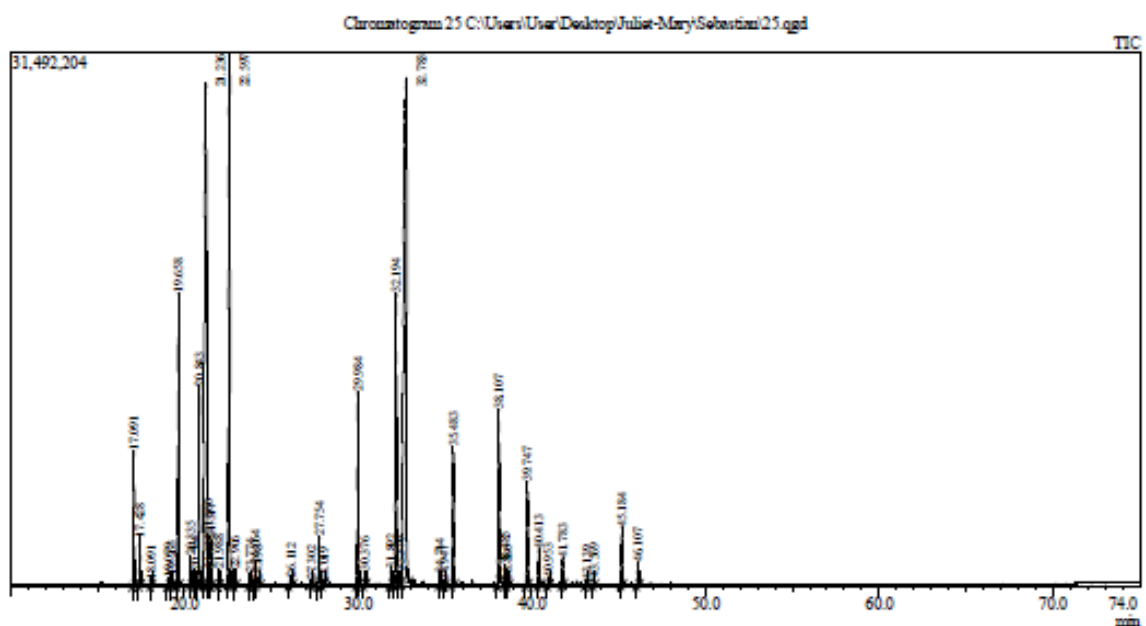
- **Hypericum mexicanum (DB-5)**



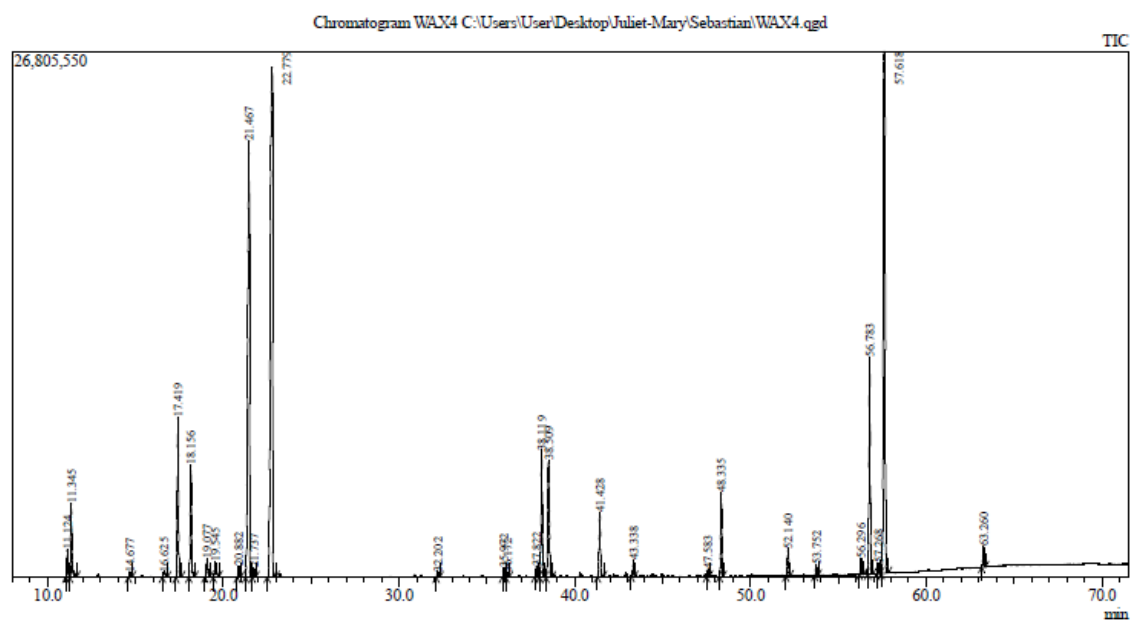
- **Hypericum mexicanum (INNOWAX)**



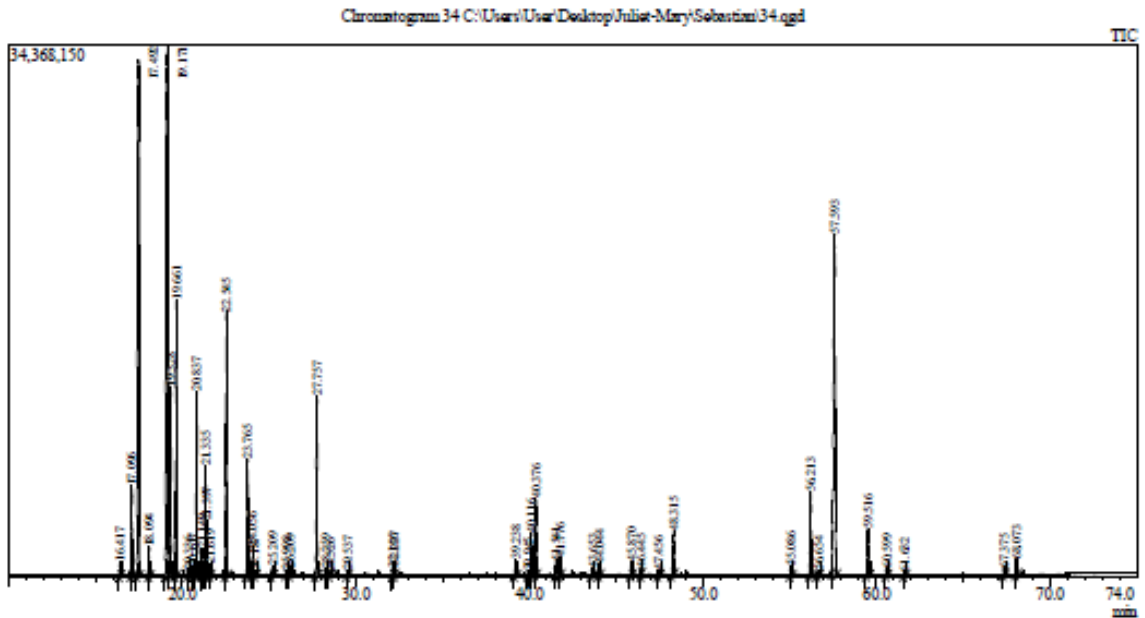
- *Lipia organoides* (DB-5)



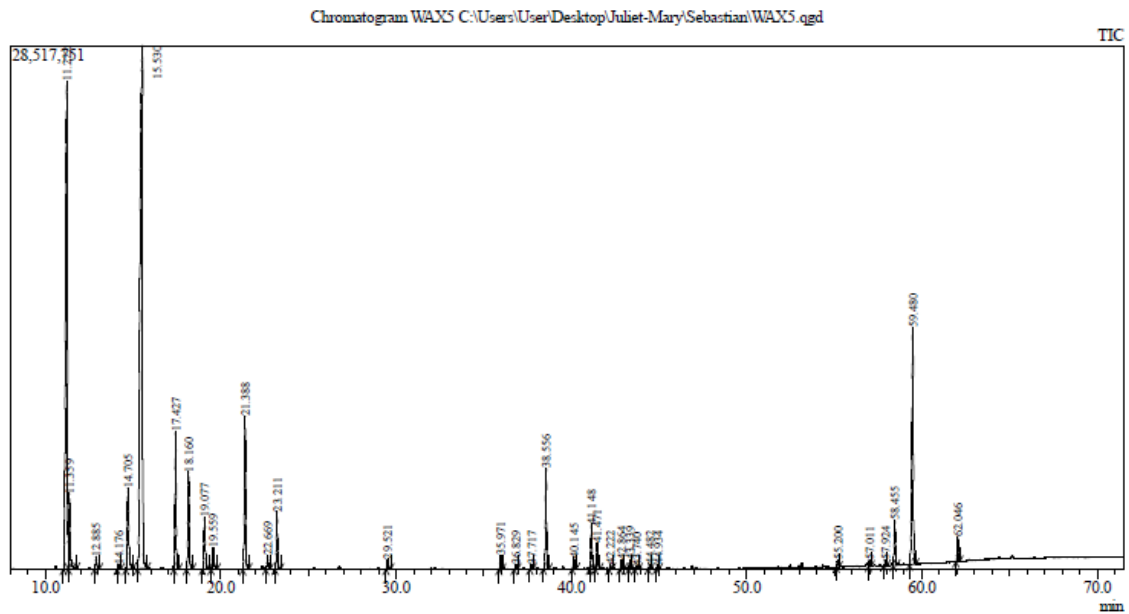
- *Lipia organoides* (INNOWAX)



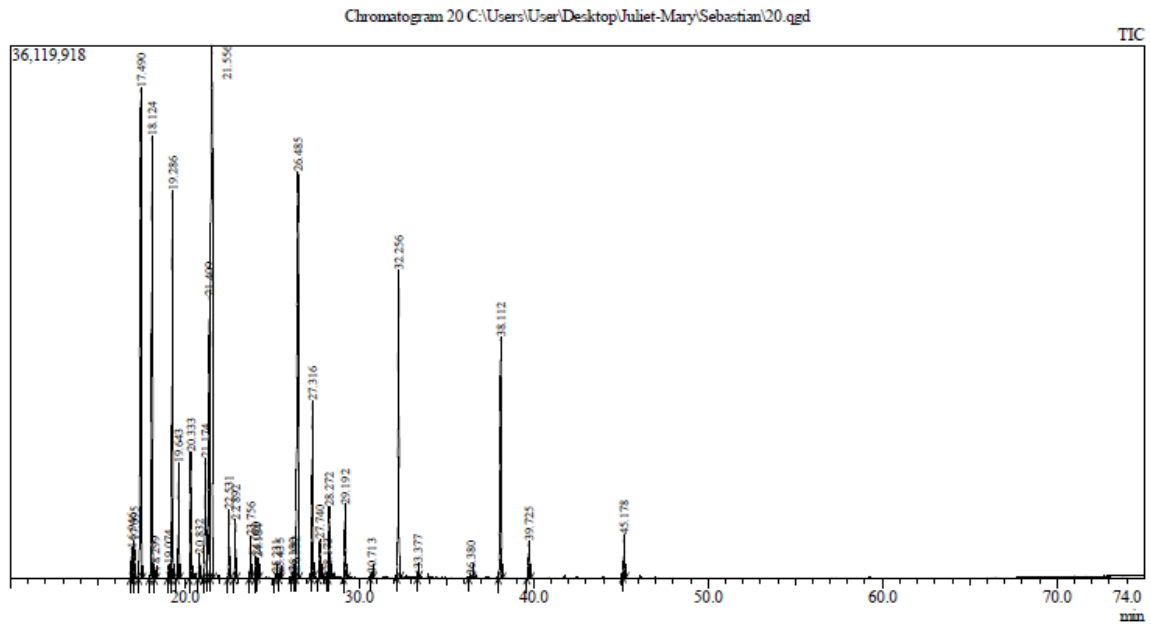
- *Cupressus sp.* (DB-5)



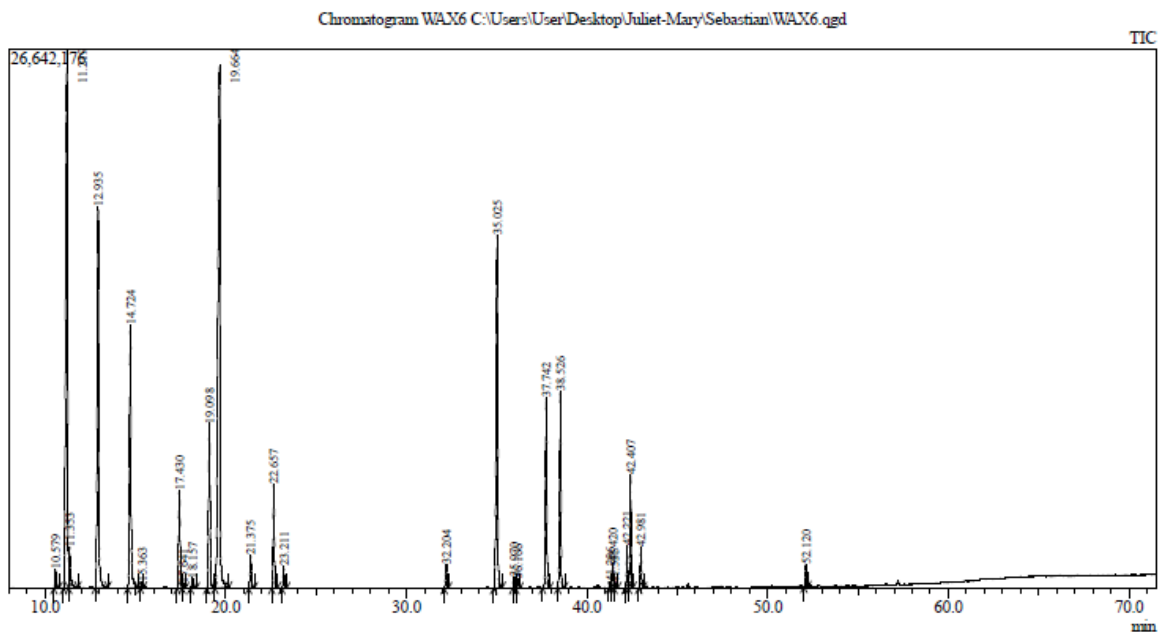
- *Cupressus sp.* (INNOWAX)



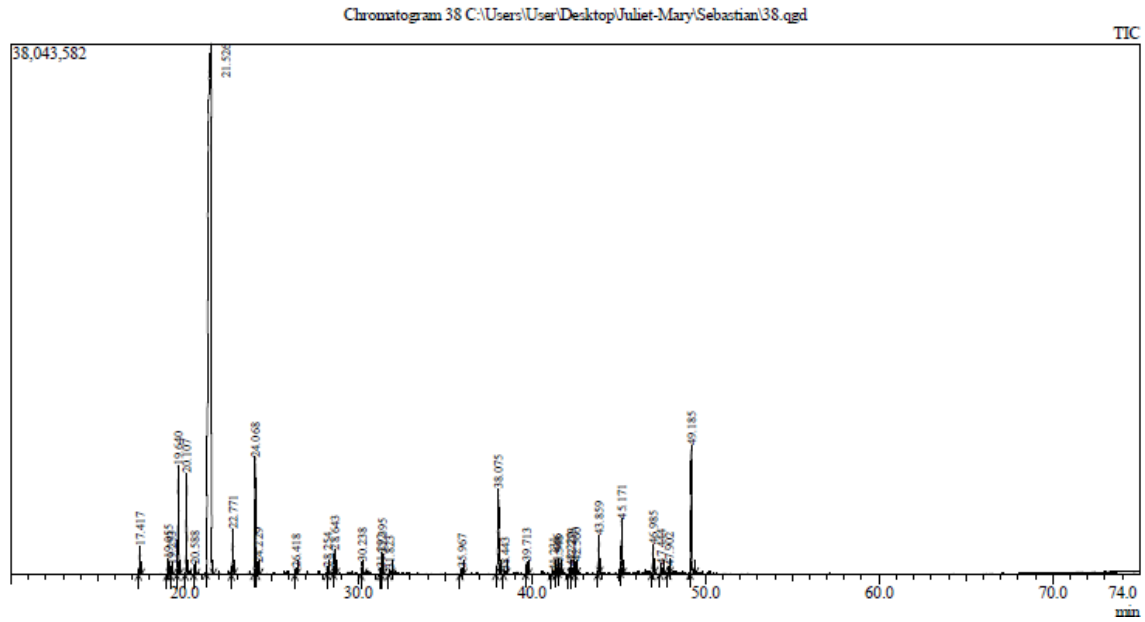
- *Rosmarinus officinalis* (DB-5)



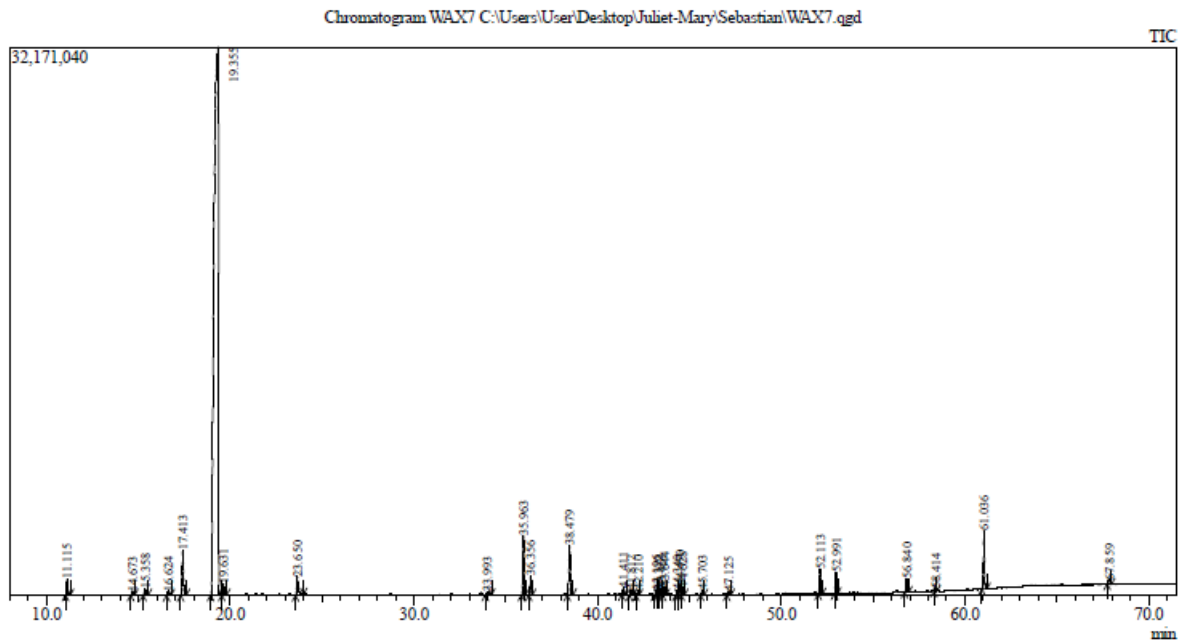
- *Rosmarinus officinalis* (INNOWAX)



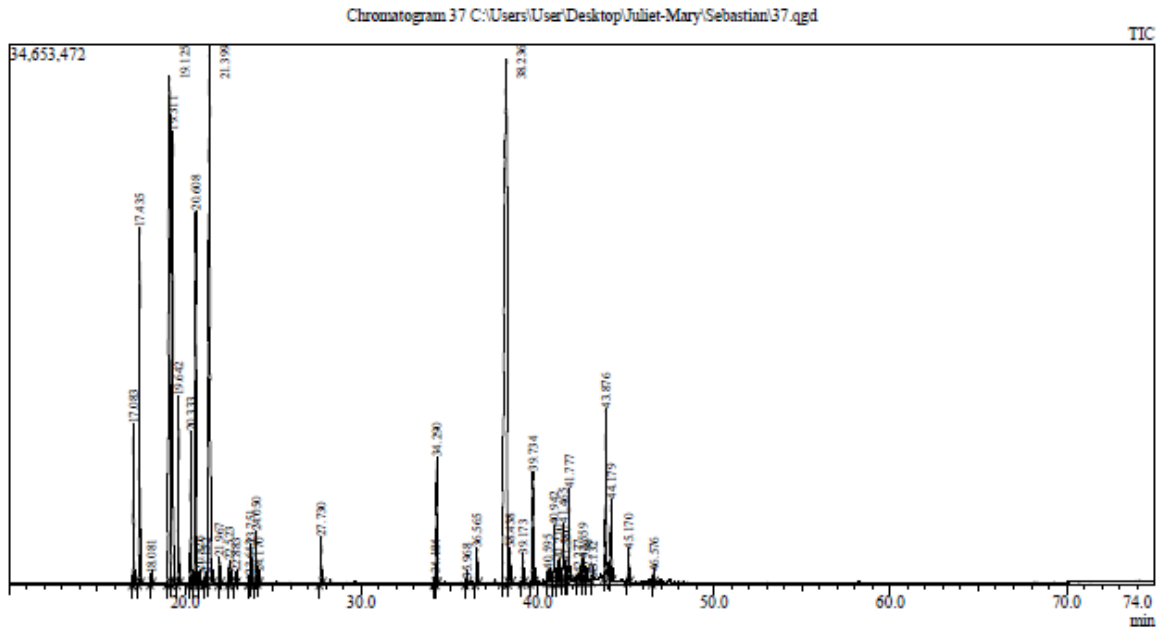
- ***Citrus sinensis* (DB-5)**



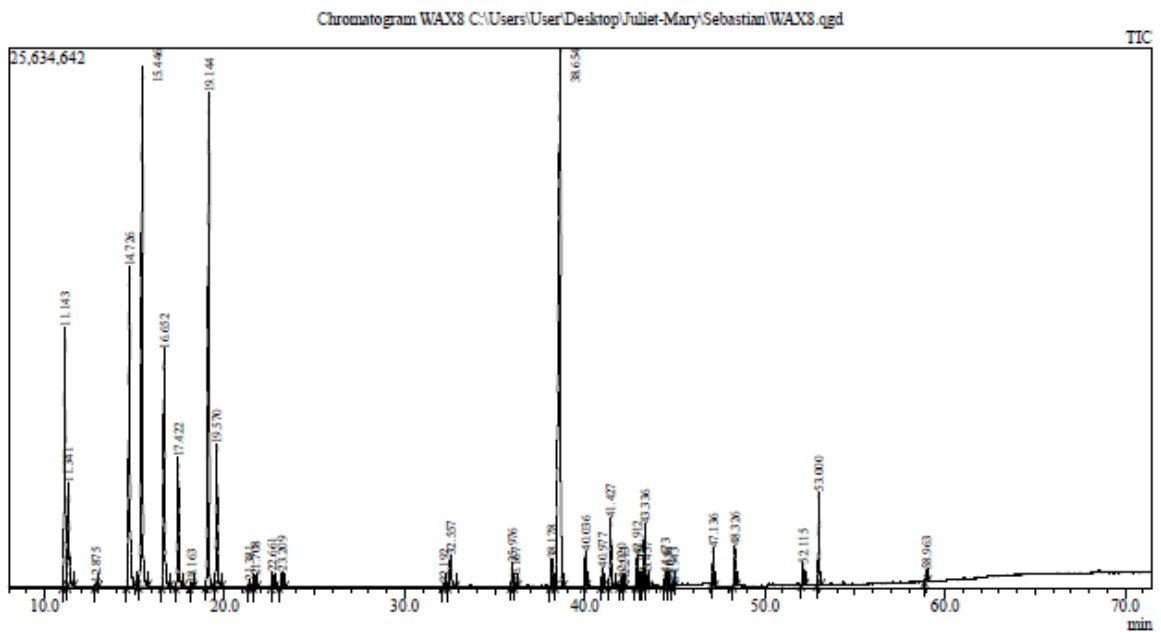
- ***Citrus sinensis* (INNOWAX)**



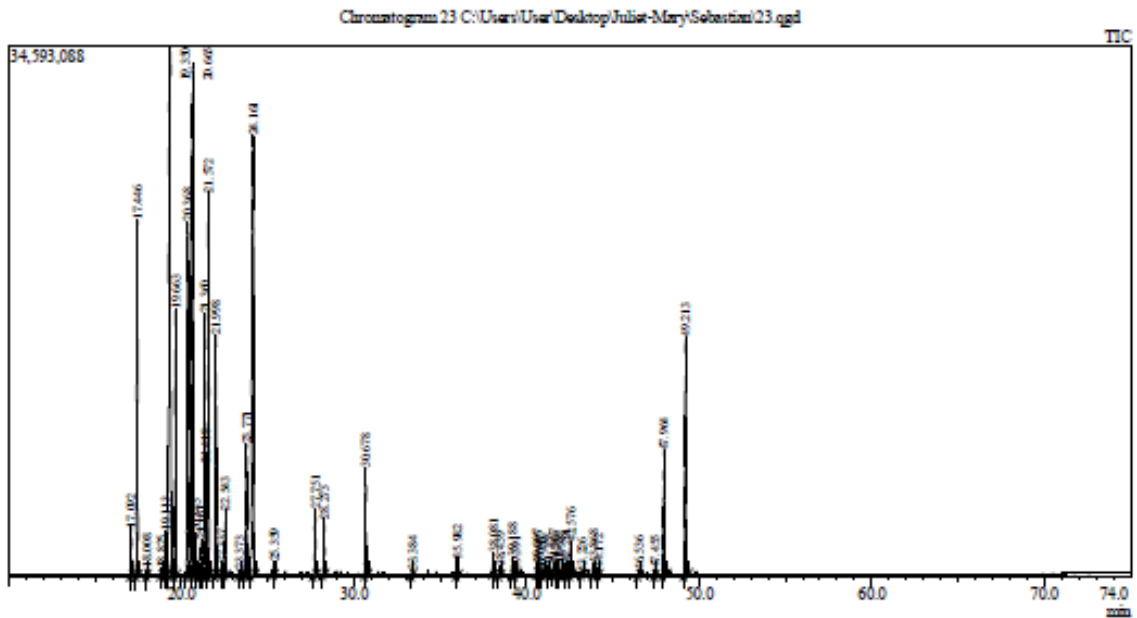
- ***Piper nigrum* (DB-5)**



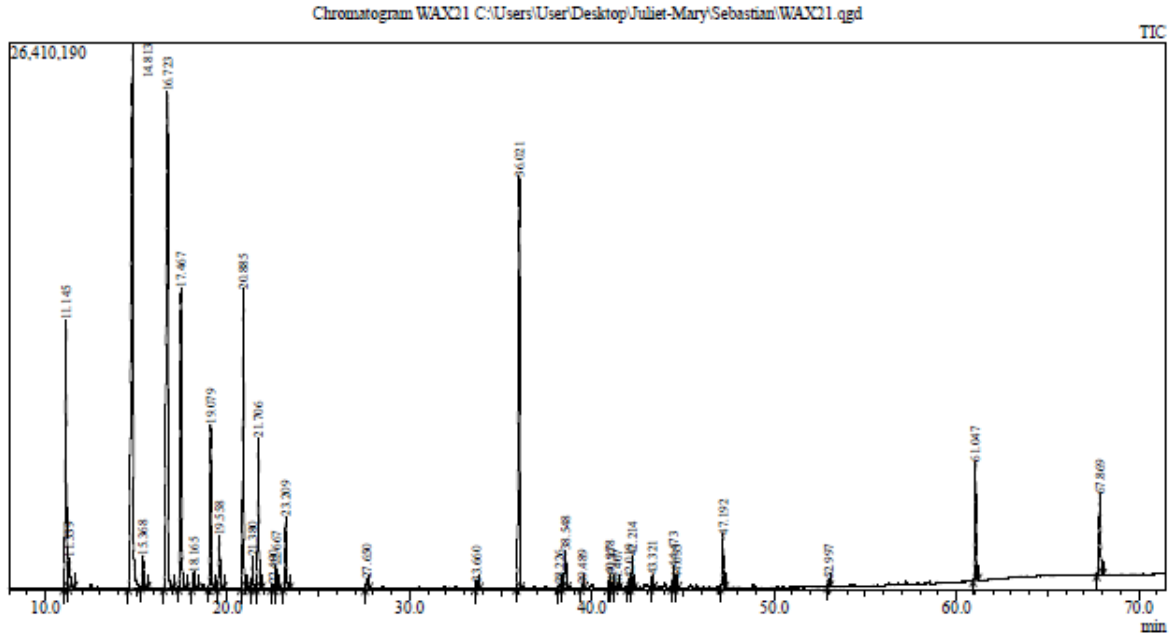
- *Piper nigrum* (INNOWAX)



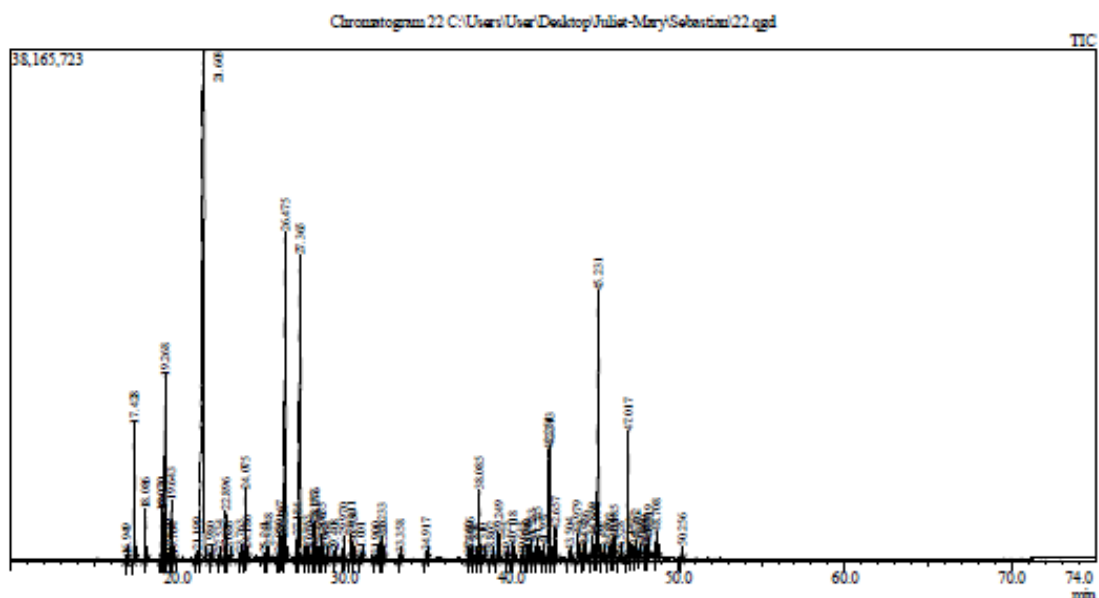
- *Zanthoxylum monophyllum* (DB-5)



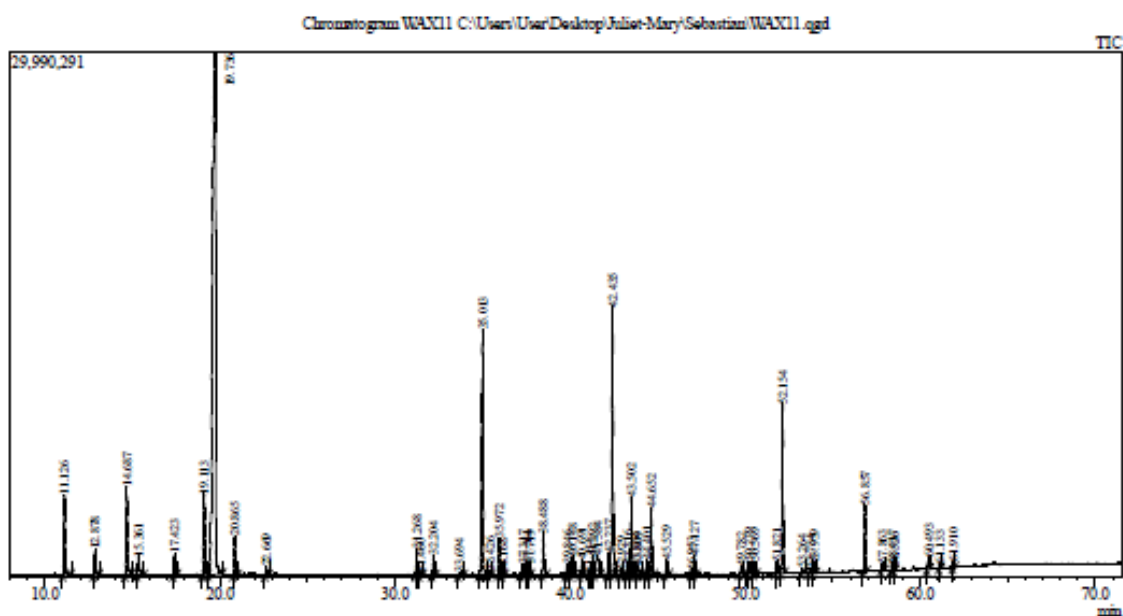
- *Zanthoxylum monophyllum* (INNOWAX)



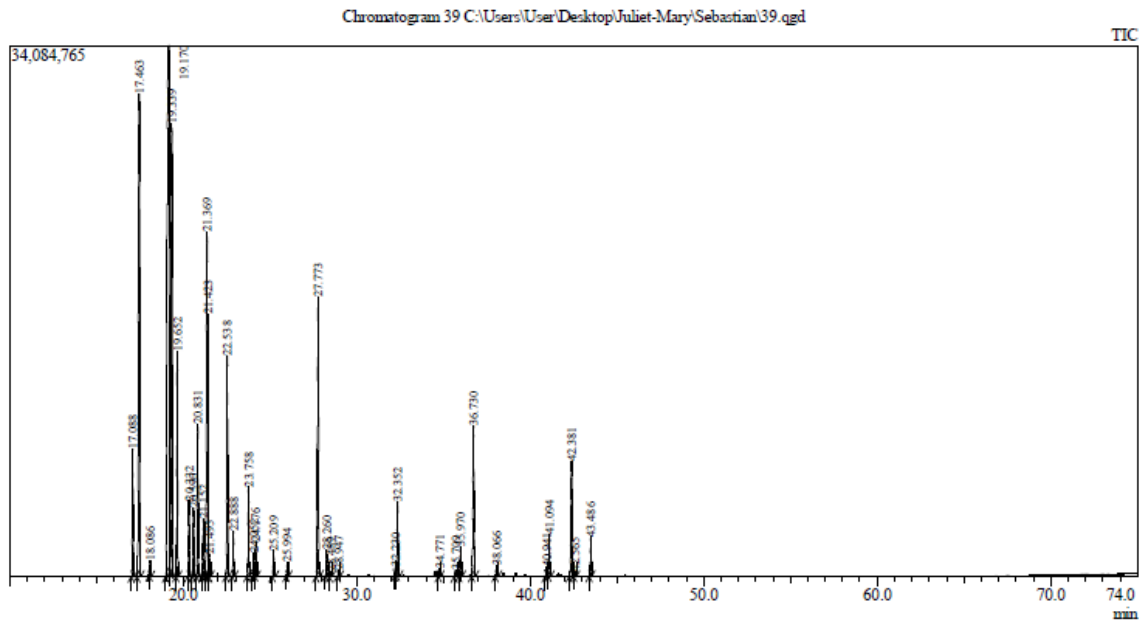
- *Lavandula angustifolia* (DB-5)



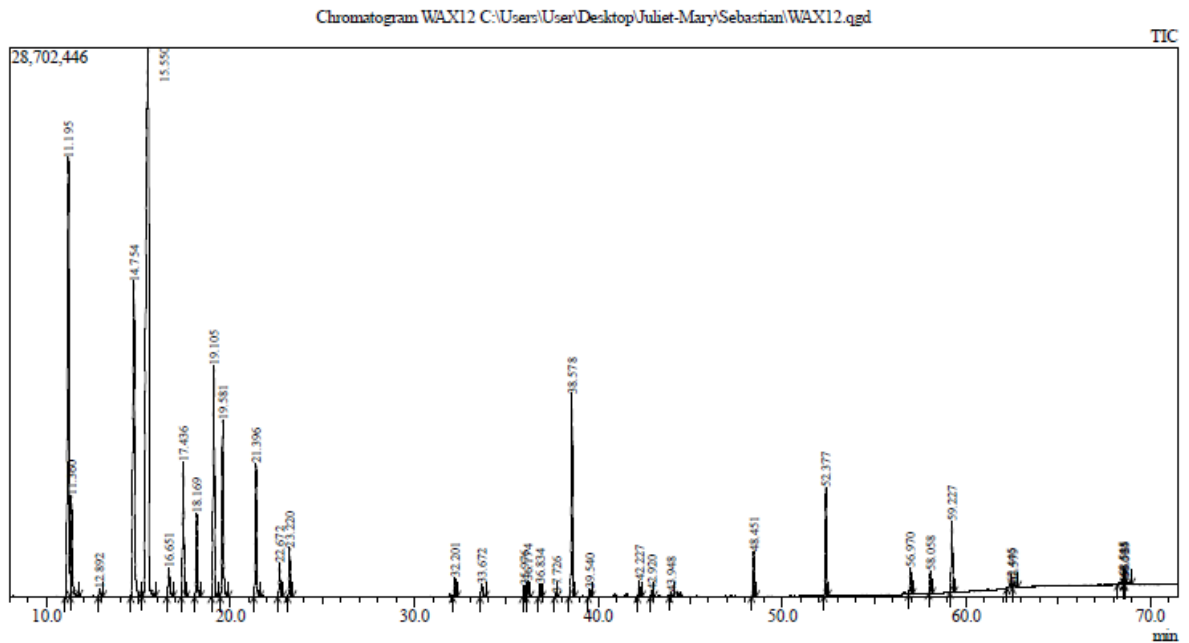
- *Lavandula angustifolia* (INNOWAX)



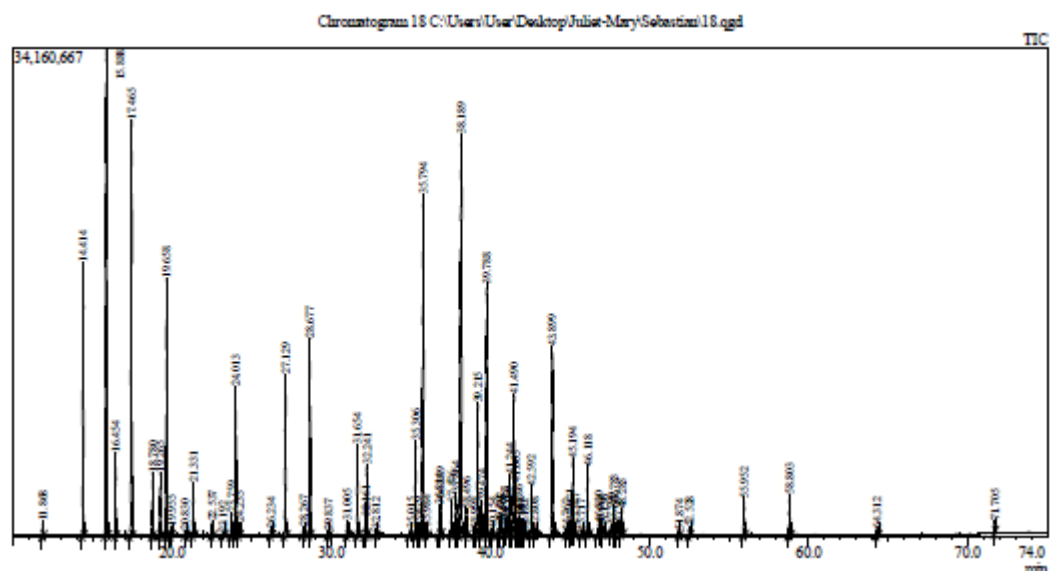
- *Myristica fragrans* (DB-5)



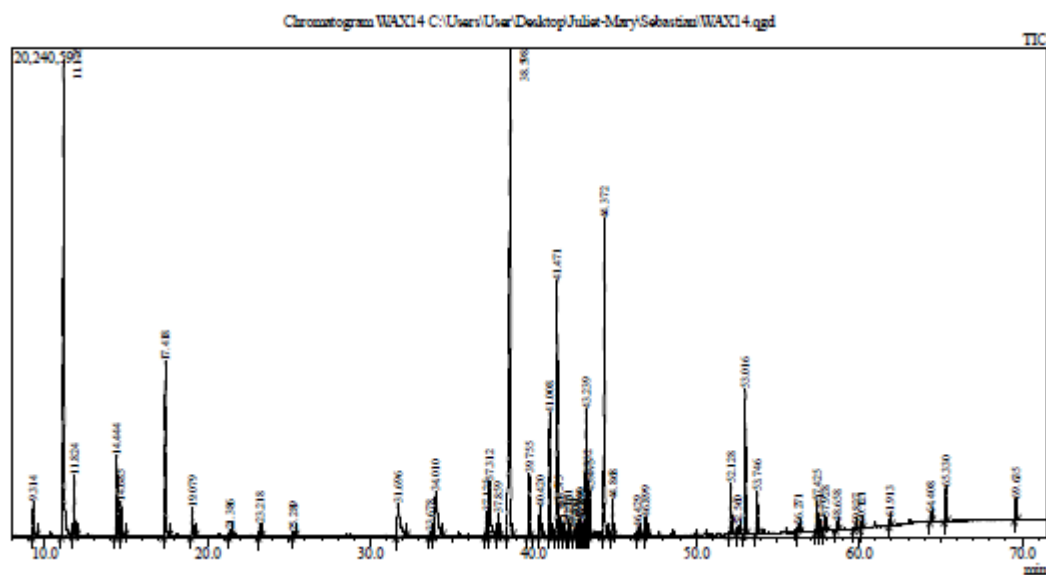
- *Myristica fragrans* (INNOWAX)



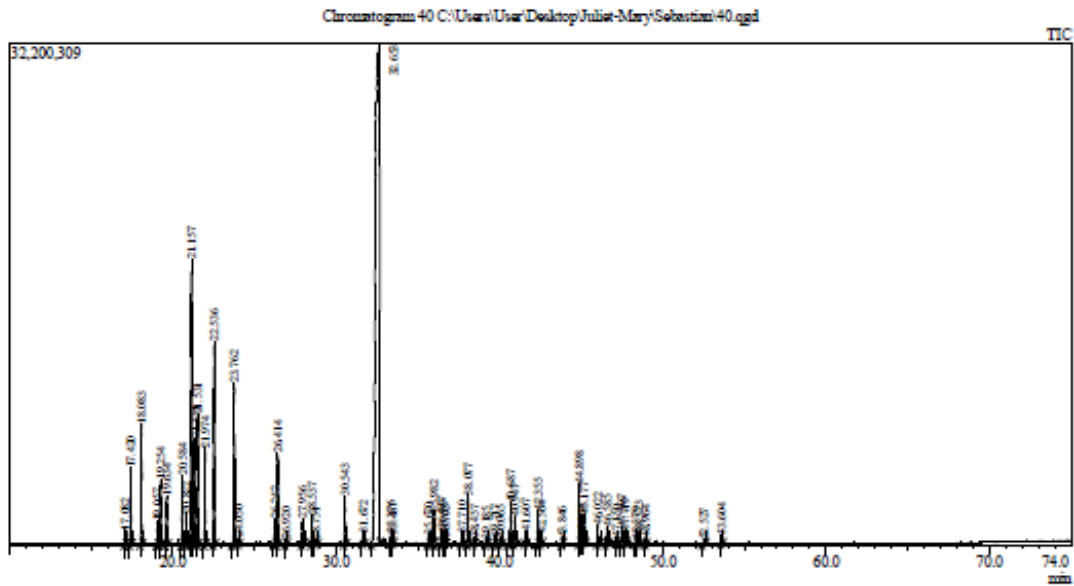
- *Hypericum juniperinum* (DB-5)



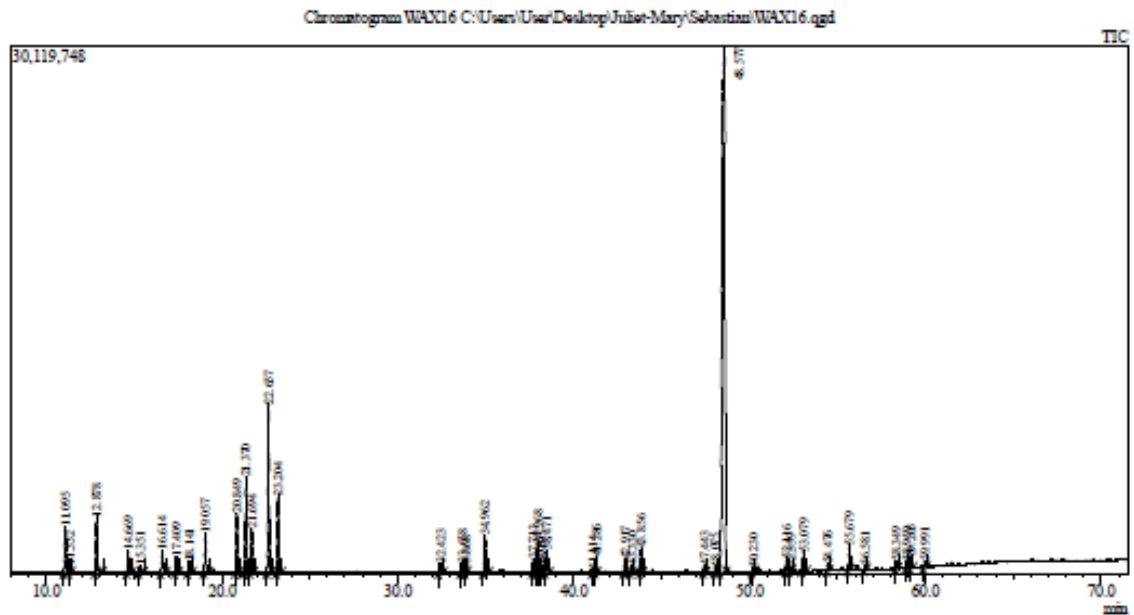
- *Hypericum juniperinum* (INNOWAX)



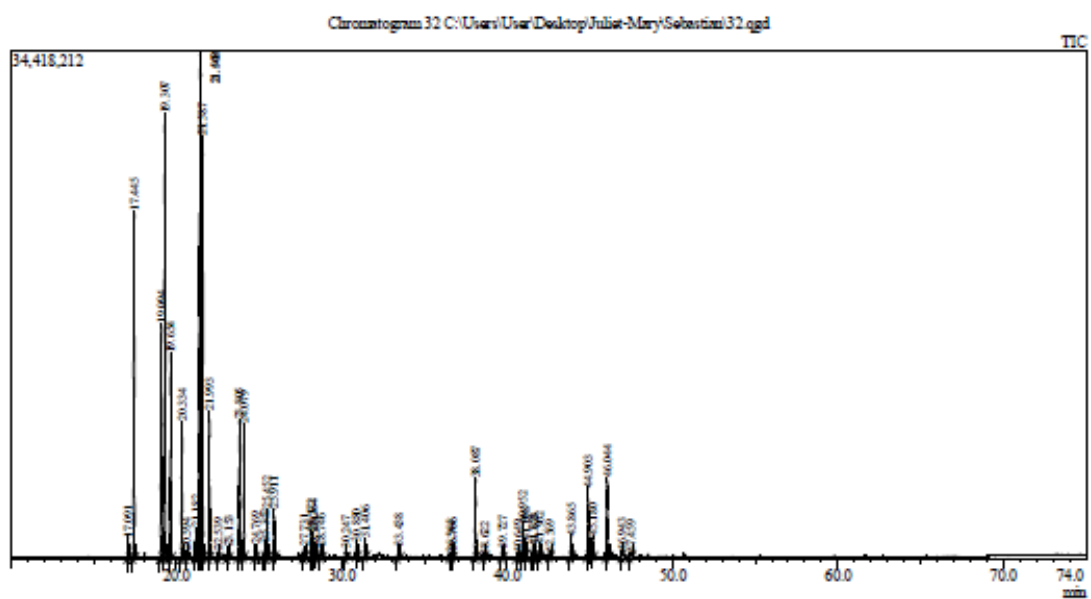
- Piper aequale (DB-5)**



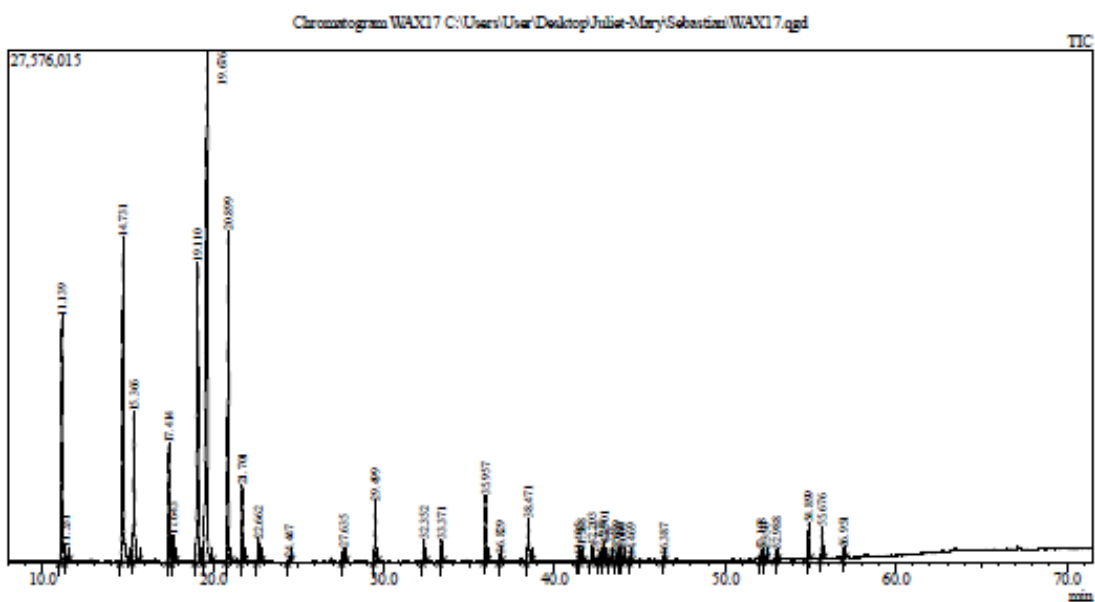
- Piper aequale (INNOWAX)**



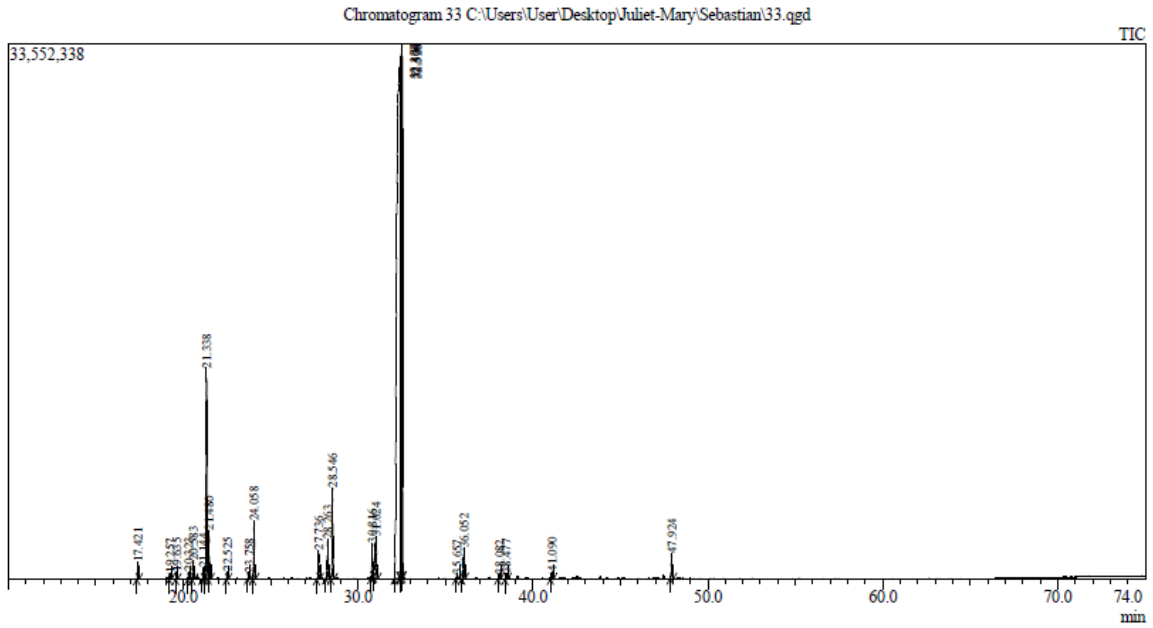
- *Coleonema album* (DB-5)



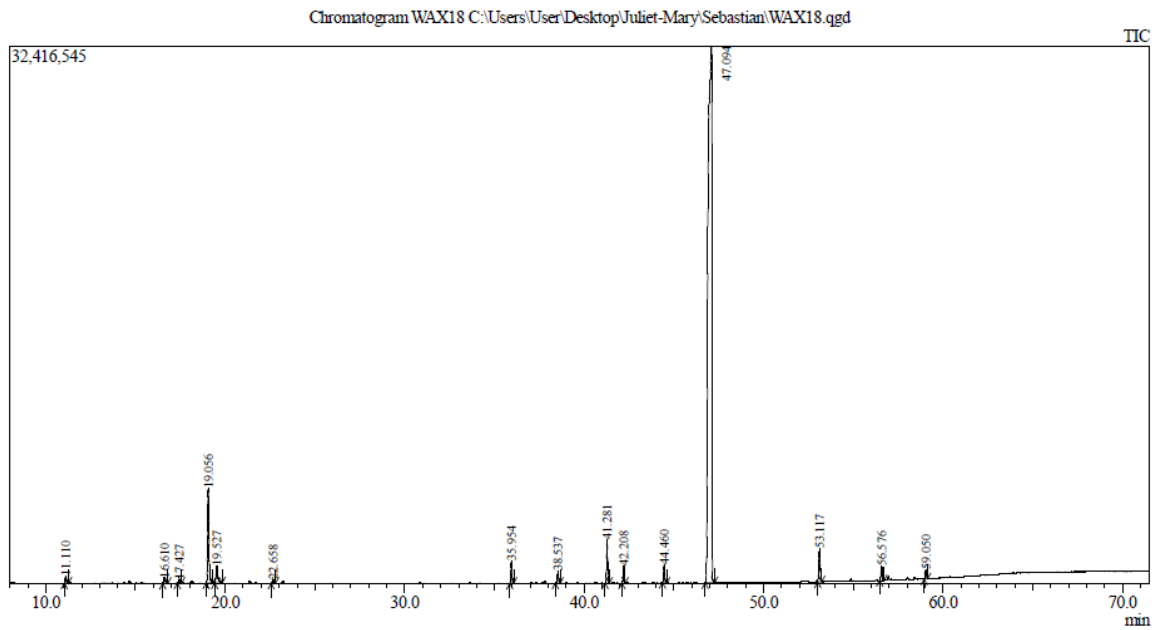
- *Coleonema album* (INNOWAX)



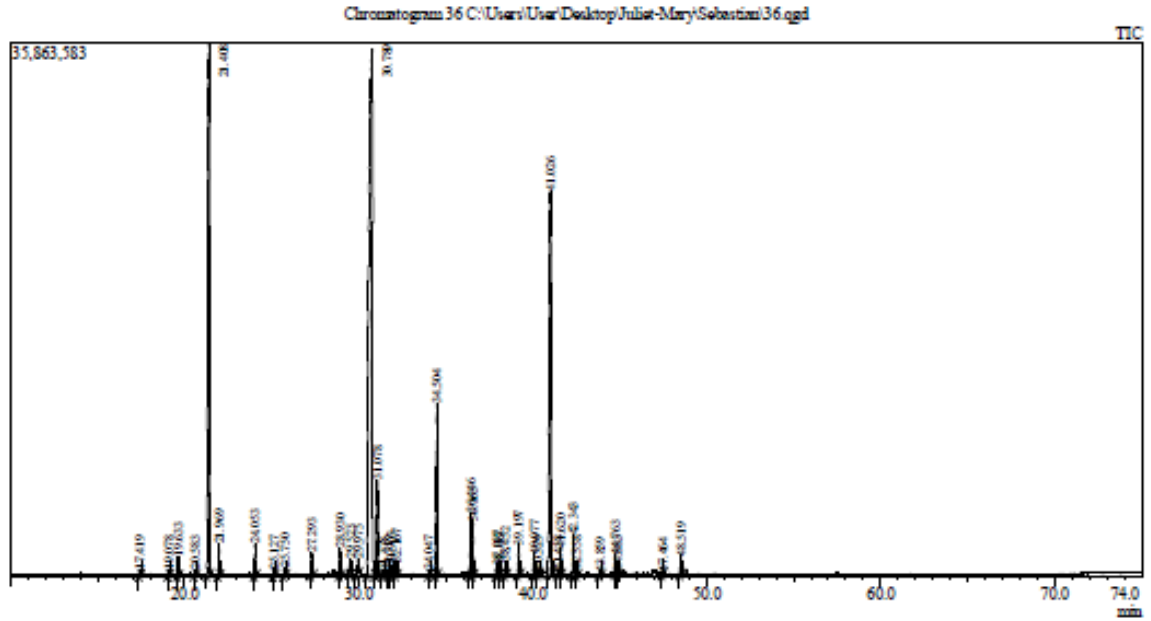
- Pimpinella anisum* (DB-5)**



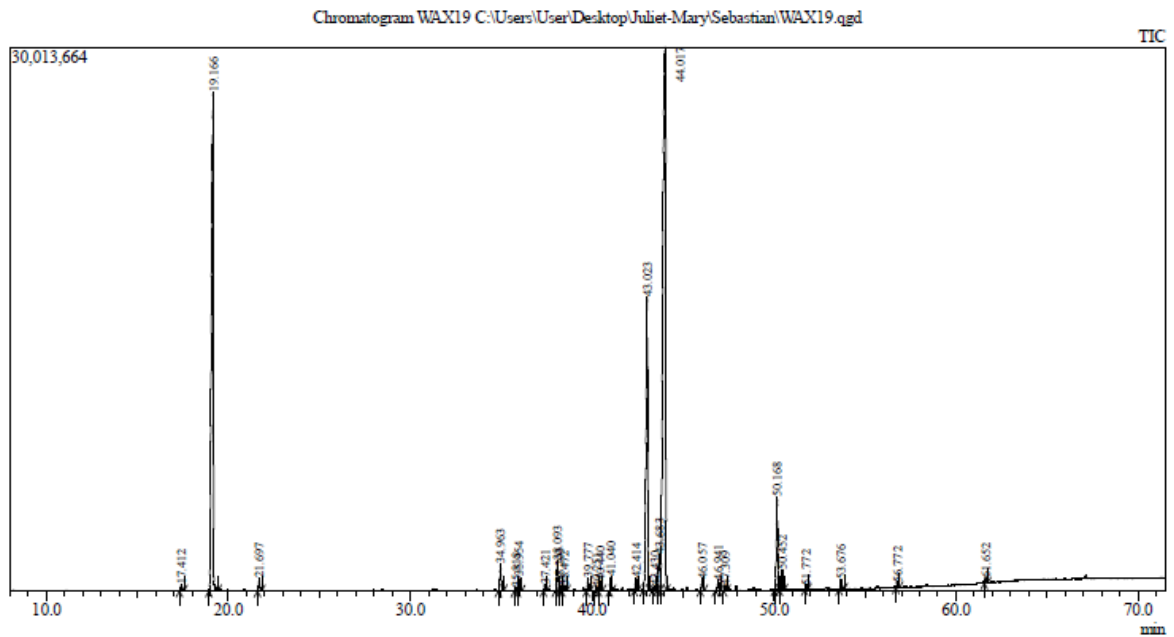
- Pimpinella anisum* (INNOWAX)**



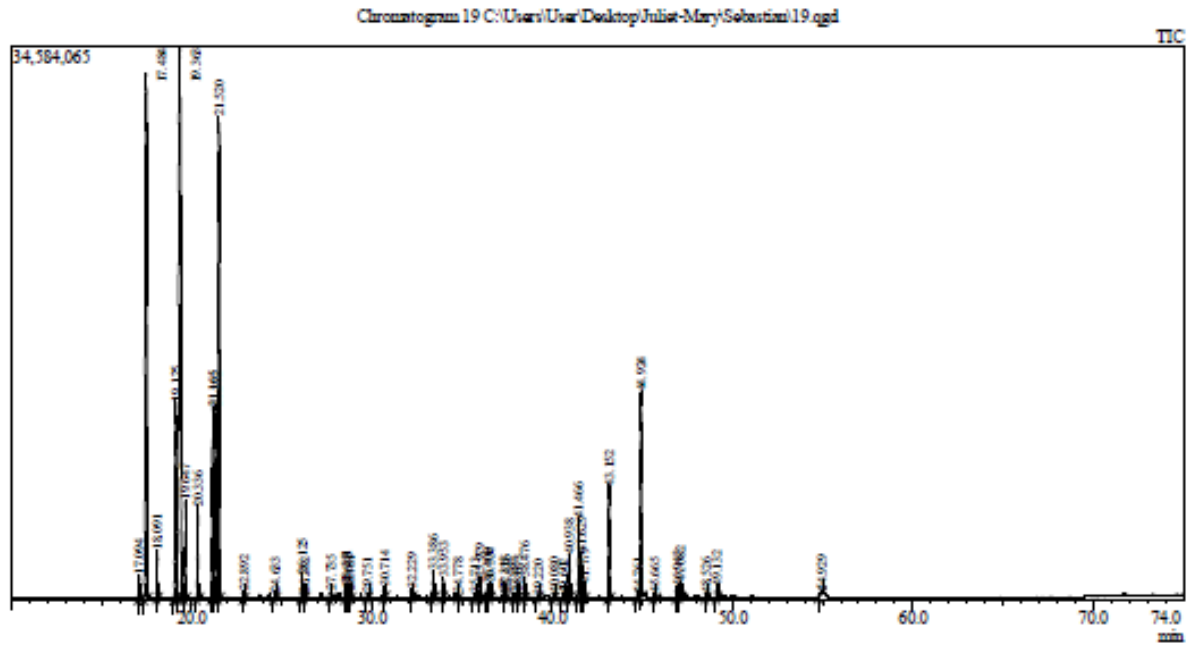
- *Lippia alba* (DB-5)



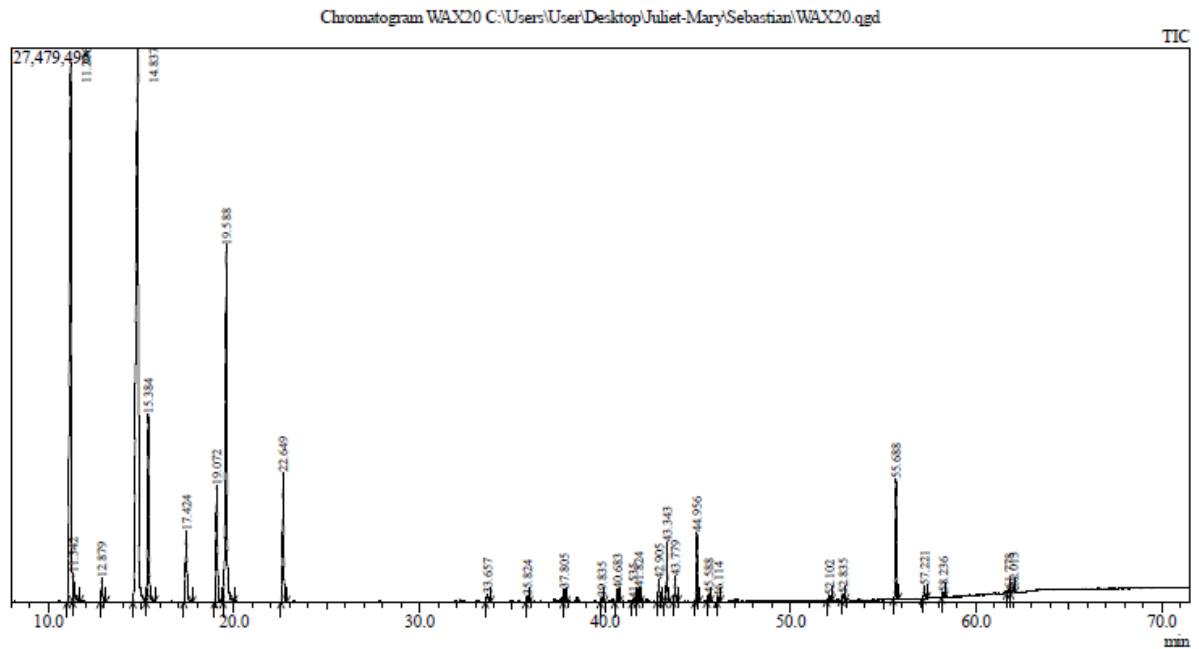
- *Lippia alba* (INNOWAX)



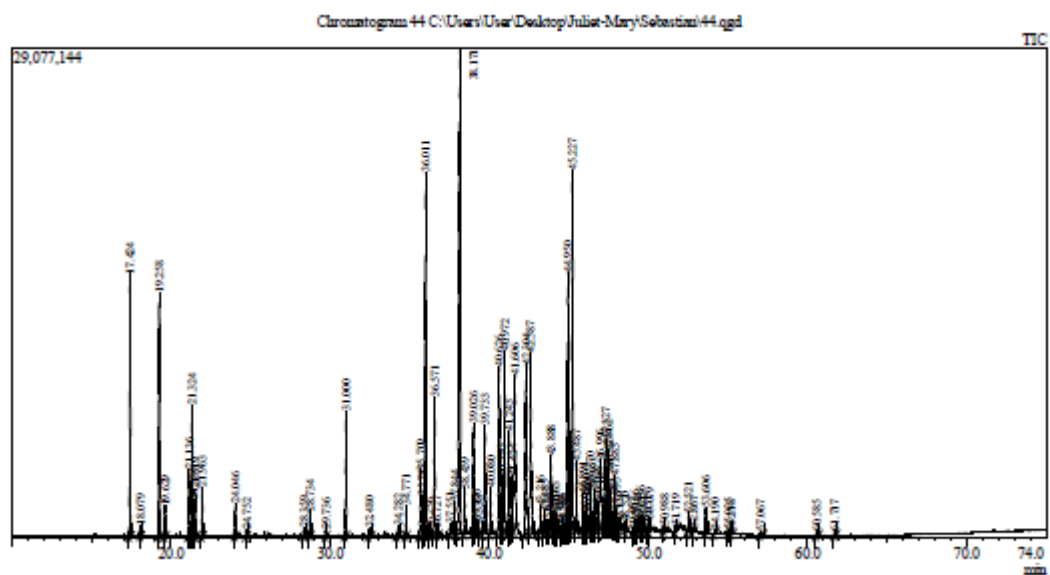
- *Xylopia discreta* (DB-5)



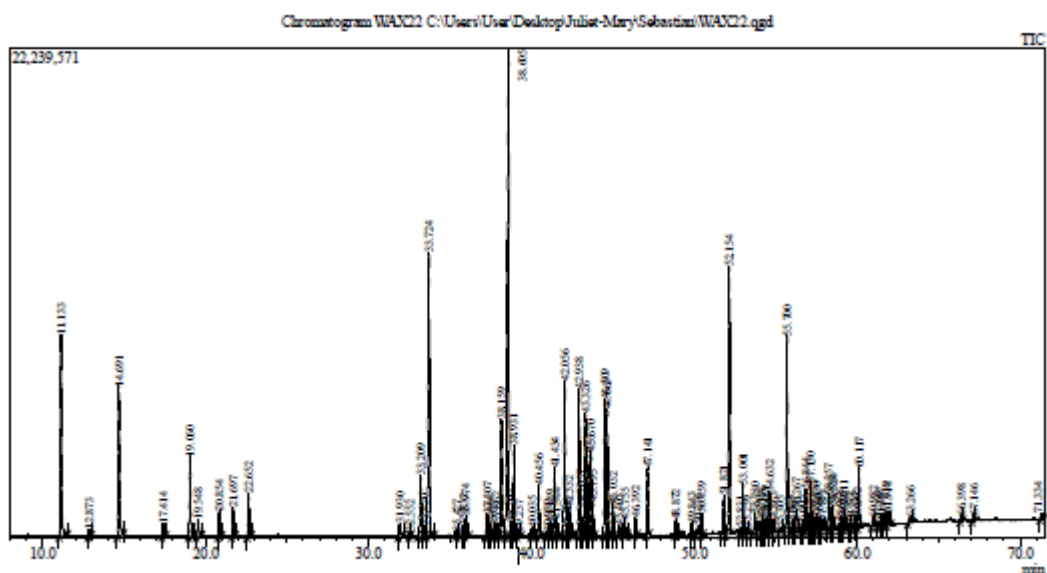
- *Xylopia discreta* (INNOWAX)



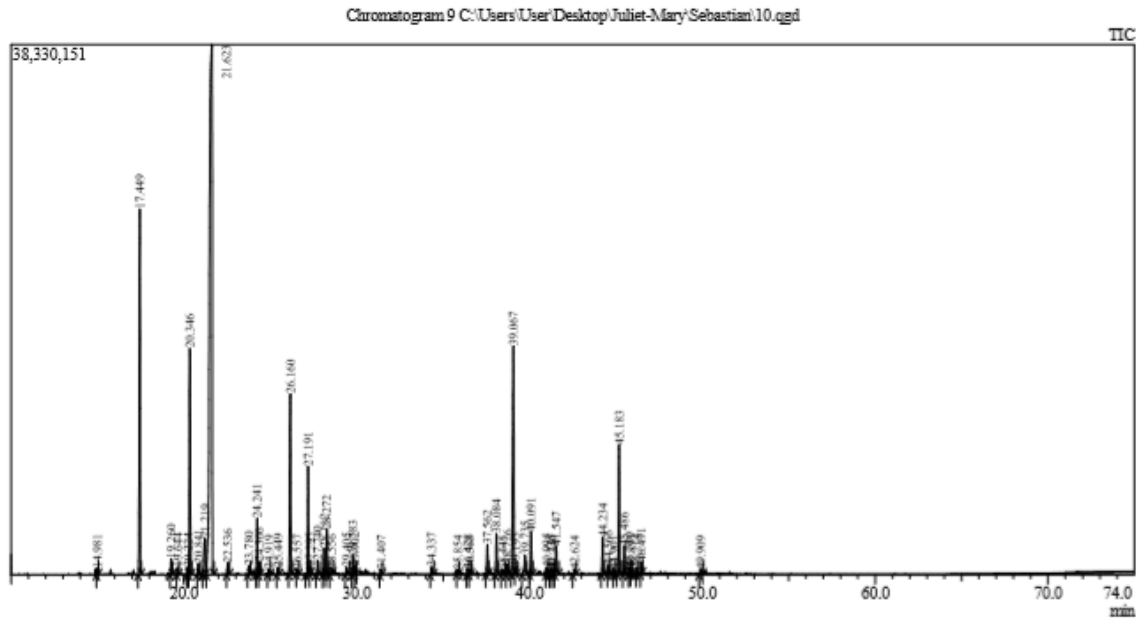
- *Piper aduncum* (DB-5)



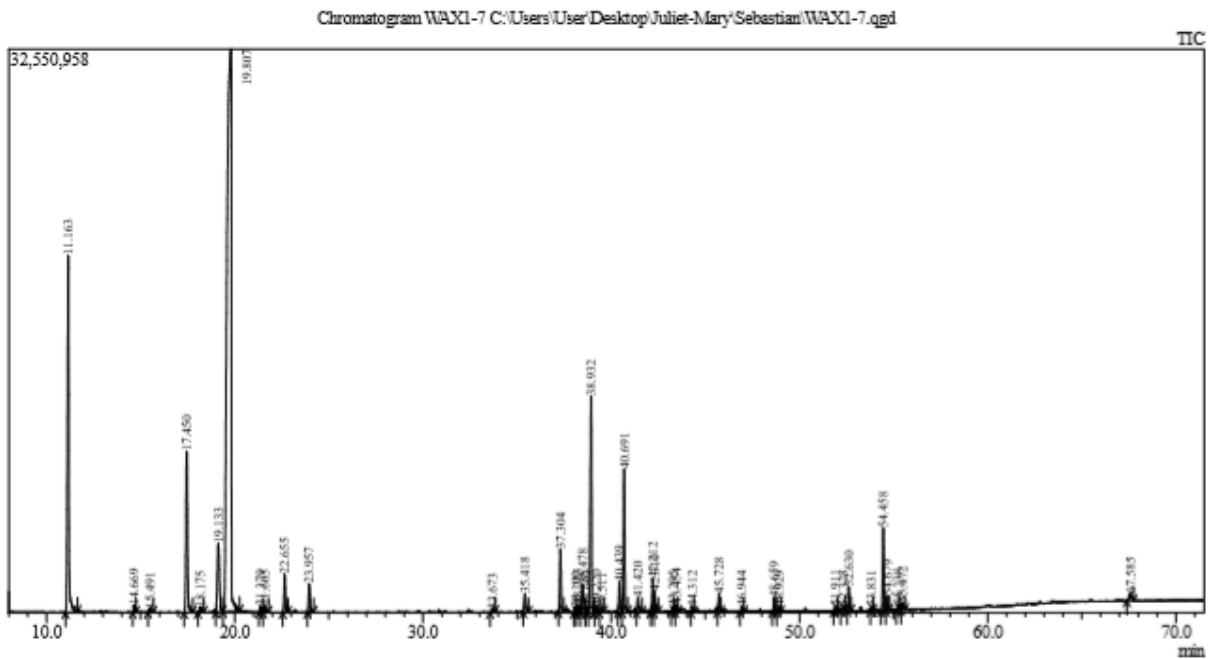
- *Piper aduncum* (INNOWAX)



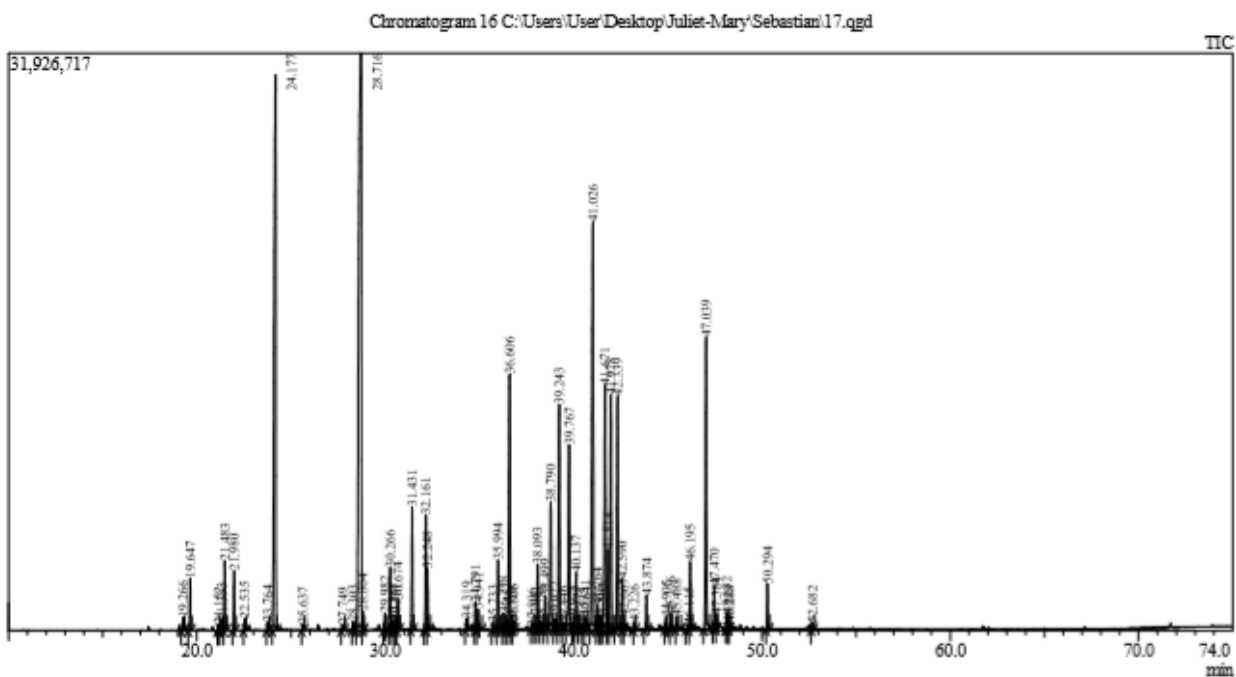
- *Eucalyptus sp.* (DB-5)



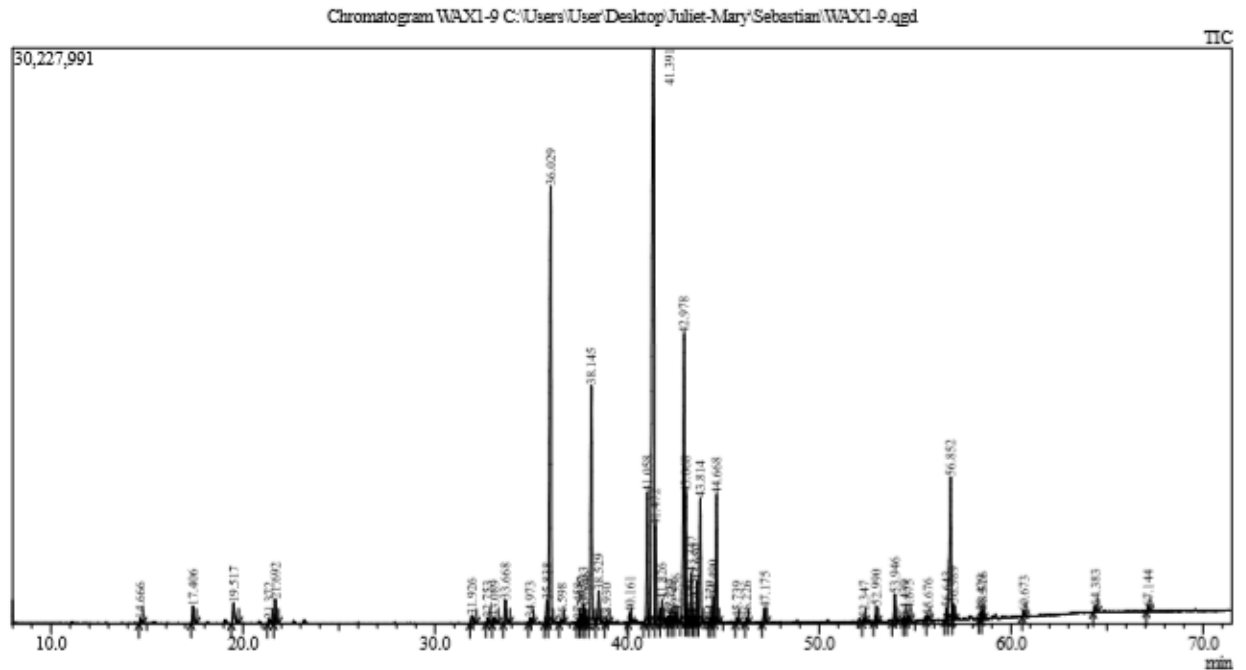
- *Eucalyptus sp.* (INNOWAX)



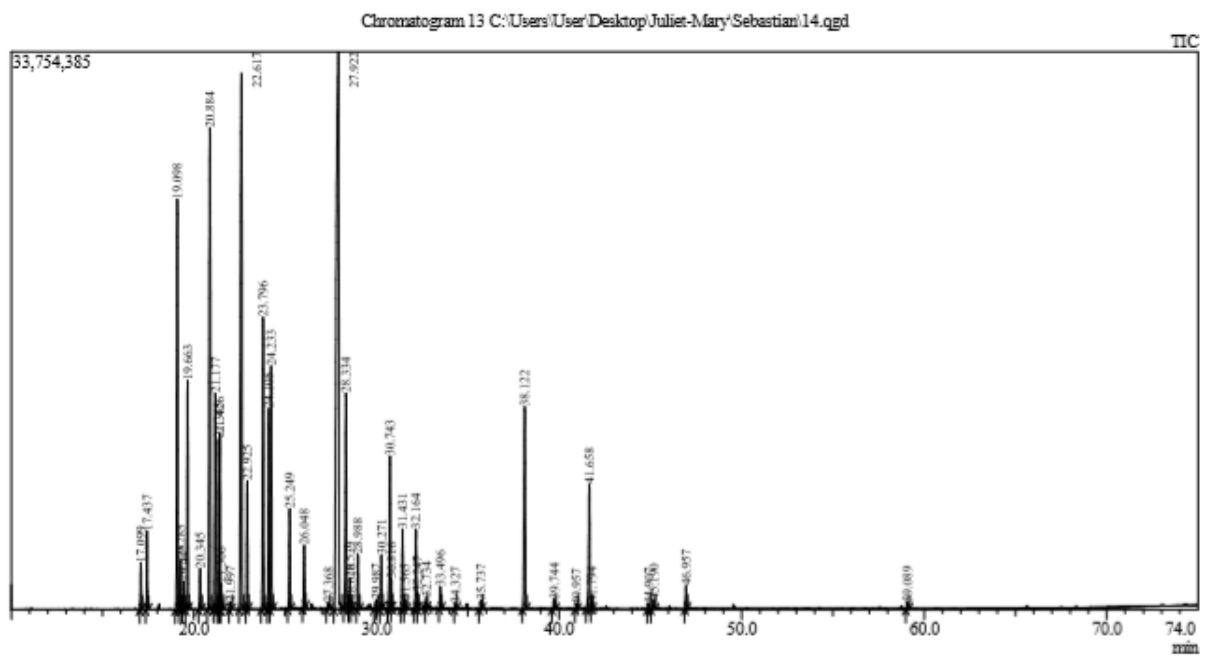
- *Ocimum basilicum* (DB-5)



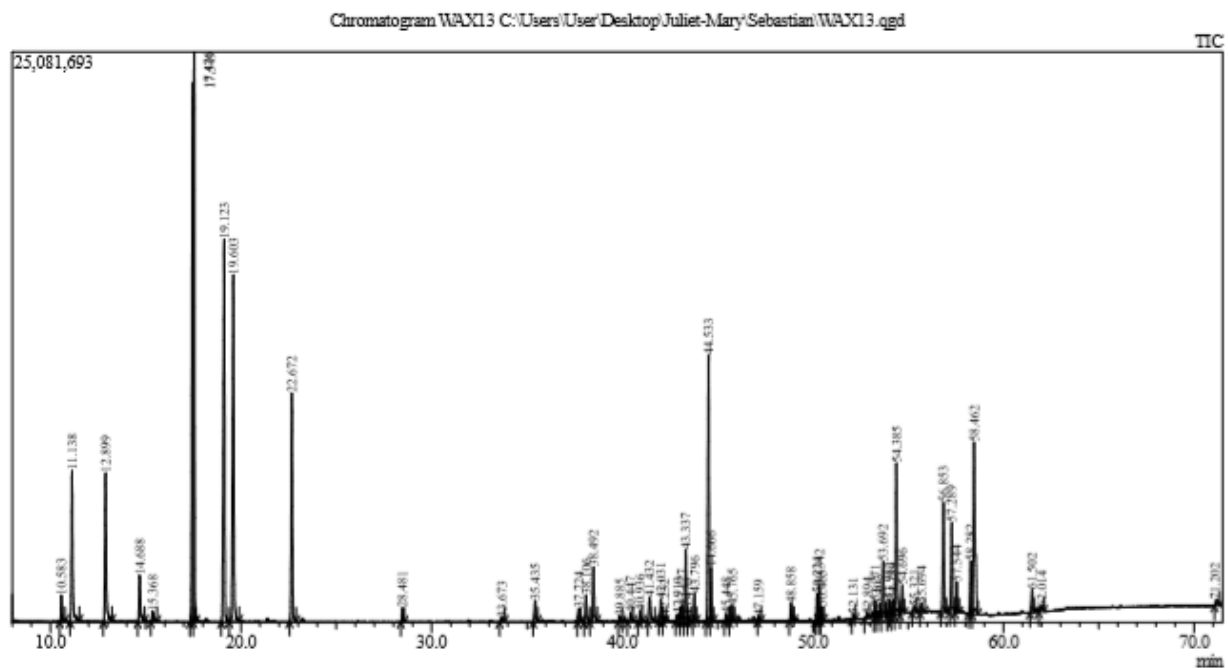
- *Ocimum basilicum* (INNOWAX)



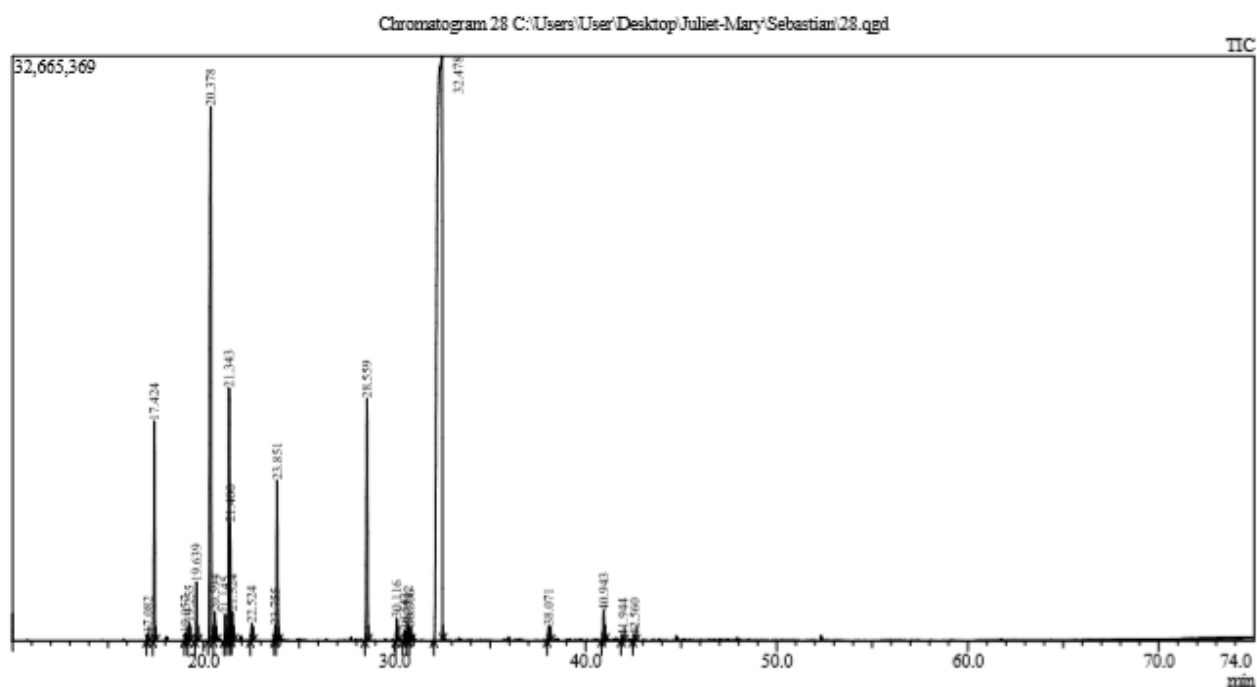
- *Schinus molle* (DB-5)



- *Schinus molle* (INNOWAX)



- *Foeniculum vulgare* (DB-5)



- *Foeniculum vulgare* (INNOWAX)

