

**DESARROLLO DE MICROECONOMÍAS REGIONALES
EN LA PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES**

COSECHADOS EN SUELOS MINEROS - ATN/RF 16110

Producto 21: Informe sobre formulación de muestras

Saran Anabel
Minig Marisol
Bellozas Reinhard Monica

2021





Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directores Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por la Dra. Anabel Saran, la Dra. Marisol Minig y la Dra. Monica Bellozas Reinhard.

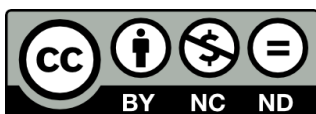
Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Resumen

Los aceites esenciales (AEs) de 5 plantas aromáticas nativas de La Pampa, Argentina, se obtuvieron mediante hidrodestilación y se analizaron para determinar su repelencia sobre *Tribolium castaneum* Herbst. Todos los AEs probados mostraron una alta actividad de repelencia a la concentración más alta testeada (0.3 mg/cm²). Sin embargo los AEs de *Baccharis spartioides* y *Helianthus petiolaris* fueron los más eficientes, mostrando una mayor repelencia que el control positivo estándar (DEET). A 3×10^{-1} mg/cm², *B. spartioides* y *H. petiolaris* mostraron un 95% y un 92,2% de repelencia, respectivamente. La composición química de los AEs se analizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Este trabajo presenta la primera determinación de la composición química del AE de *H. petiolaris*. Para evaluar la actividad de repelencia en “condiciones de campo” simuladas, se evaluó el comportamiento de esta plaga en harina tratada con los AEs. En presencia del AE de *H. petiolaris*, el 90% de los insectos abandonaron el grano, mientras que *B. spartioides* indujo un 81% la emigración. Para maximizar los rendimientos en la producción de repelentes, se propuso realizar la mezcla de los AEs con AE de limón comercial. Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa principalmente luego de 24 h de aplicadas las mezclas, donde la repelencia de la mezcla persistió en contraste con los AE puros cuya repelencia cae significativamente a las 12 h. Estos hallazgos establecen que las mezclas de los AEs de *B. spartioides* y *H. petiolaris* son alternativas prometedoras para controlar a la especie invasora *T. castaneum* en granos almacenados y sustituir a los derivados sintéticos que se aplican en la actualidad. Este producto se enmarca en las actividades propuestas para el año 2020.

Palabras Clave:

Aceites esenciales, *Tribolium castaneum*, Control de plagas, Almacenamiento postcosecha.

Información de Relevancia con una discusión técnica

Una gran parte de las tierras tropicales de África, Asia y América Latina se encuentran bajo un patrón de lluvias unimodal y, a menudo, muy variable. Sin sistemas de riego, su producción local se limita a una cosecha anual y los granos deben almacenarse frecuentemente durante largos períodos en depósitos de baja tecnología en pequeñas fincas (Alonso Amelot & Avila Núñez, 2011). En este contexto, existe una necesidad continua de proteger los granos almacenados contra el deterioro, especialmente por la pérdida de calidad y peso durante el periodo de poscosecha que comprende desde la cosecha a campo hasta la llegada al consumidor (Padin *et al.*, 2002).

En Argentina, históricamente las pérdidas poscosecha registradas para los principales cultivos han oscilado alrededor del 8%, lo que genera aproximadamente una pérdida económica de 1.000 millones de dólares por cultivo (INTA, 2008).

Tribolium castaneum *Herbst.*, es una de las plagas primarias destructivas más extendidas de los granos almacenados y se ha reportado como una de las más prevalentes en las áreas portuarias de Buenos Aires, Argentina (Descamps *et al.*, 2008). Los escarabajos y las larvas se alimentan de una amplia variedad de sustancias vegetales secas, como los productos de cereales molidos, lo que provoca una gran pérdida tanto en la calidad como en la cantidad del producto almacenado (Rees, 2004).

Desde hace décadas, se han utilizado varios tipos de fumigantes e insecticidas sintéticos para el control de insectos en el grano almacenado, pero su uso frecuente ha inducido resistencia en la mayoría de las plagas (Subramanyam & Hagstrum, 1995). Además, los niveles de residuos aceptables de plaguicidas en granos y oleaginosas (FAO, 2013; SENASA, 2013) limitan las dosis y el uso de estos fumigantes, poniendo el control de estas plagas en una encrucijada.

Recientemente, se han explorado intensamente los metabolitos secundarios de las plantas como un intento de desarrollar nuevas alternativas biorracionales. Se espera que dichas alternativas sean específicas para las plagas, con baja toxicidad para los mamíferos, fáciles de usar, biodegradables y con un impacto reducido en la salud y el medio ambiente, a fin de minimizar la dependencia excesiva de los pesticidas químicos (Jindal *et al.*, 2013).

Los compuestos volátiles producidos por las plantas superiores son responsables de la interacción planta-planta, el mecanismo de defensa y la atracción de polinizadores (Batish *et al.*, 2008). Estos compuestos volátiles presnetes en los aceites esenciales, también han mostrado actividad insecticida y repelente contra las plagas de insectos de granos almacenados (Bakkali *et al.*, 2008). Por otro lado, dado que los plaguicidas botánicos tienen múltiples mecanismos y sitios de acción, el desarrollo de resistencia es limitado y necesita períodos prolongados y una gran población para que se produzca la resistencia a los mismos (Regnault Roger *et al.*, 2012). Si bien, su alta volatilidad hace necesaria la formulación para aumentar su efectividad, y la utilización de altas concentraciones, los insecticidas botánicos han ganado popularidad tanto en el manejo integrado de plagas como en la producción agroecológica. Como ejemplo, los Aes obtenidos como subproductos del procesamiento de los cítricos han ganado aceptación en la industria alimentaria ya que han sido reconocidos como seguros y

muchos cultivos toleran su presencia como repelentes (Fisher & Phillips, 2008). Las principales familias botánicas de las que se extraen AEs son *Asteraceae*, *Myrtaceae*, *Lauraceae* y *Lamiaceae* (Giuliano, 2001). La familia *Asteraceae*, también llamada “compuesta”, reúne más de 23.500 especies, repartidas en unos 1.600 géneros, por lo que son la familia de las Angiospermas con mayor riqueza y diversidad biológica (Jeffrey, 2007). *Asteraceae* es también la familia más numerosa en Argentina, con 227 géneros (cinco endémicos) y 1400 especies (92 adventicias y 382 endémicas). Naturalmente esta familia crece en la mayoría de los ecosistemas, se adaptan a diferentes suelos, climas y relieves. En la región fitogeográfica de la Puna, las *Asteraceae* se han adaptado al déficit hídrico, baja humedad atmosférica, alta radiación solar y temperaturas nocturnas bajo cero durante todo el año. La tribu más representada en número de géneros es *Heliantheae* y en número de especies la tribu *Senecioneae*. En la provincia de La Pampa esta familia es la segunda en importancia después de *Poaceae* (Rúgolo de Agrazar *et al.*, 2005).

OBJETIVOS

En este contexto el objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades repelentes de los AEs de *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulate*, *Baccharis spartioides*, *Helianthus petiolaris* y *Senecio serratifolius* sobre la plaga *T. castaneum* y encontrar una mezcla que permitan su formulación y su futura aplicación en granos almacenados. Dicho objetivo se enmarca dentro de las actividades propuestas para el año 2020.

METODOLOGÍA

Colecta de material vegetal

Las partes aéreas de *A. tenuifolia*, *B. articulate*, *B. spartioides*, *H. petiolaris* y *S. serratifolius* fueron recolectadas en diferentes localidades en la provincia de La Pampa, Argentina. El material vegetal (biomasa) se secó en el laboratorio durante 7 días a temperatura ambiente (25-28 °C). Las plantas fueron identificadas en el Departamento de Botánica de la Universidad de La Pampa.

Extracción de los AEs

Los AEs se extrajeron por hidrodestilación de la biomasa vegetal seca utilizando un extractor de escala semi-industrial (Figmay, SRL, Argentina). Las condiciones de extracción fueron: 1 Kg de biomasa vegetal seca molida, 5 L de agua, 4 h de destilación. Luego de la extracción se utilizó sulfato de sodio anhidro para eliminar las trazas de agua de los AEs. Se calculó el rendimiento y los aceites extraídos se almacenaron a 4 °C en matraces ámbar.

Insectos

Se obtuvieron especímenes de *T. castaneum* del Centro de Investigaciones sobre Plagas e Insecticidas (CIPEIN-CITEFA), Universidad Nacional General San Martín, Argentina. Las cepas se mantuvieron en recipientes de plástico (volumen 3 L) cubiertos con una malla de nailon. Los insectos se criaron en harina de trigo mezclada con levadura de cerveza (7: 1 p/p) en una incubadora de crecimiento a 25-27 °C, humedad relativa de 70-75% y fotoperíodo 12:12 h luz: oscuridad.

Actividad repelente

Se siguió el Método de Preferencia de Área (Zhe Zhang *et al.*, 2017) para la evaluación de las actividades repelentes de los aceites esenciales sobre adultos de *T. castaneum*. Los papeles de filtro (Whatman N °1, diámetro 9 cm) se dividieron a la mitad. Una mitad se impregnó con 0,5 ml de AE diluido en acetona y la otra mitad se impregnó con 0,5 ml de acetona pura (control). Las concentraciones evaluadas fueron 3×10^{-3} , 3×10^{-2} , 3×10^{-1} , 0.31 mg/cm² para *B. articulate*, *B. spartioides*, *H. petiolaris*, *S. serratifolius* y 1.5×10^{-3} , 1.5×10^{-2} , 1.5×10^{-1} , 0.15 mg/cm² para *A. tenuifolia*. Se utilizaron diferentes concentraciones debido a que las cantidades de AE obtenido de cada especie vegetal fueron diferentes y específicas de cada especie. Los discos de papel se secaron al aire durante 24 h hasta la evaporación de la acetona y luego se colocaron en una placa de Petri de plástico. Se liberaron diez adultos de *T. castaneum* en el medio de cada placa y cerraron y cubrieron con cinta plástica. La prueba de repelencia se realizó en las mismas condiciones ambientales de temperatura, humedad y fotoperiodo descriptas para la crianza y se rotaron las placas todos los días para evitar el comportamiento basal de los insectos. El número de insectos en cada mitad de los discos de papel se registró cada hora durante 5 h y a las 24 h desde el inicio de la prueba. Se utilizó DEET (N, N-dietil-3-metilbenzamida de Sigma-Aldrich) como control positivo. Se utilizaron cinco réplicas para cada tratamiento.

El porcentaje de repelencia (PR) se calculó de la siguiente manera:

$$PR = \frac{CT}{C + T} \times 100$$

Donde C representa el número de insectos en el área no tratada y T el número de insectos en el área tratada (Nerio *et al.*, 2009). De acuerdo con los promedios PR obtenidos, las diluciones de los AEs se asignaron luego a diferentes clases de 0 a V: clase 0 (0-0,1%), clase I (0,1-20%), clase II (20,1-40%), clase III (40,1-60%), clase IV (60,1-80%) y clase V (80,1-100%) (Liu & Ho, 1999).

CG-MS análisis de la composición de los AEs

Una vez seleccionados los AEa más prometedores fueron analizados por GC-MS con el fin de determinar su composición química, y eventualmente el principal compuesto responsable de la repelencia. Así, se analizaron los AEa de *B. spartioides* y *H. petiolaris* en un cromatógrafo de gases HP 6890N Series Plus (Agilent Technologies, California, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas modelo 5973N (Agilent Technologies, California, EE.UU) y un autoinyector HP 6890 Series. La separación de los analitos se logró utilizando una columna capilar HP-5 MS (30 m x 0,25 mm de D.I., espesores de película de 0,25 m y fenilmetilsiloxano al 5%), suministrada por J & W Scientific (Folsom, CA, EE. UU.). El gas portador (helio) se fijó a un caudal constante. El volumen de inyección fue de 2 µl en modo splitless, las temperaturas del puerto de inyección y de la línea de transferencia se establecieron en 250 °C y 280 °C, respectivamente. El espectrómetro de masas se hizo funcionar con una corriente de filamento de 300 mA y una energía de electrones de 70 eV en el modo de ionización de electrones positivos. Con base en el rango de escaneo de masa de 50 a 550 unidades de masa atómica (uma) con el modo SCAN, los tiempos de retención de los compuestos se determinaron comparando el patrón de fragmentación de MS de los

estándares y la base de datos de National Institute of Standards and Technology (NIST) 2.0 GC– Biblioteca de MS. Chemstation versión D.01.00 se utilizó para la adquisición de datos, el procesamiento de datos y el control de instrumentos.

Actividad repelente sobre harina tratada

Según Mohan y Fields (2002), el movimiento de insectos en los granos tratados puede revelar la interacción entre las capacidades repelentes y atrayentes. Para la prueba de repelencia sobre harina, se utilizaron las concentraciones que más repelencia produjeron en los ensayos previos realizados, la cual fue 3×10^{-1} mg/cm². Brevemente, se colocaron 0,5 g de harina enriquecida con la dilución de aceite esencial en acetona y 0,5 g de harina enriquecida con acetona (vehículo) en cada mitad de una placa de Petri. Después de secar al aire la acetona, se liberaron 15 larvas de *T. castaneum* en el medio de cada recipiente. La prueba se llevó a cabo en las mismas condiciones ambientales descritas para el crecimiento. Se contó el número de larvas que escaparon de la harina tratada a las 2 h y 24 h luego de la liberación. Se utilizaron tres réplicas por tratamiento. El porcentaje de repelencia se calculó con la misma ecuación utilizada en el ensayo de actividad repelente.

Actividad repelente de las mezclas propuestas

Con el fin de potenciar el efecto repelente de los AEs de *B. spartioides* y *H. petiolaris* y maximizar la producción, los diferentes AEs se mezclaron 50/50 sobre una base de AE de limón (contenido mínimo de limoneno 85%) comprado en la Droguería Pico SA, (General Pico, La Pampa, Argentina). La concentración final obtenida fue de 10 mg/ml de cada AE en una base de AE de limón. Una vez mezclado, se siguió el Método de Preferencia de Área aplicad anteriormente para la evaluación de las actividades repelentes.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software InfoStat. El análisis de varianza unidireccional (ANOVA) y la prueba de Tukey se realizaron en los datos para determinar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las distintas concentraciones para la prueba de actividad repelente. Se realizó el mismo análisis para encontrar las diferencias en la actividad repelente entre extractos puros y mezclas.

RESULTADOS

Se destiló por arrastre de vapor entre 100 y 250 kg. Los rendimientos de los AEs se presentan en la **Tabla 1** junto con las coordenadas y ubicaciones de cada sitio de recolección. Los rendimientos de los 5 aceites esenciales extraídos oscilaron entre el 0,001% (*B. articulate* y *S. serratifolius*) y 0,1% (*B. spartioides* y *H. petiolaris*).

Tabla 1. Especies vegetales, información de colecta y rendimiento de aceites esenciales.

Especies	Origen	Latitud	Longitud	AE Rendimiento (%w/w)
<i>A. tenuifolia</i>	Santa Rosa, LP	36°37'39.917''S	64°18'23.949''W	0.05
<i>B. articulate</i>	Toay, LP	36°42'55.011''S	64°20'27.788''W	0.001
<i>B. spartioides</i>	Puelches, LP	37°52'26.444''S	65°26'57.593''W	0.1
<i>H. petiolaris</i>	Santa Rosa, LP	36°37'8.348''S	64°19'11.76''W	0.1
<i>S. serratifolius</i>	Int. RN N°5-RN N°7, LP	36°32'12.383''S	63°56'40.017''W	0.001

LP: La Pampa provincia, Argentina. RN: Ruta Nacional.

%w/w: gr de AE/ gr material vegetal destilado.

Los resultados de los ensayos de repelencia para los AEs testeados se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Repelencia de los AEs.

Especie	C ¹	Porcentaje de repelencia (PR)						RC ²
		Horas después de la liberación						
		1	2	3	4	5	24	
<i>A. tenuifolia</i>	0.15	91.	84.4 ^b	86.	82.2 ^b	75.6 ^b	68.9 ^b	V
	1.5x10 ⁻¹	71.	64 ^b	60 ^b	75.6 ^b	48.9 ^c	-	V
	1.5x10 ⁻²	71.	64 ^b	60 ^b	75.6 ^b	48.9 ^b	-	III
	1.5x10 ⁻³	24.	6.7 ^a	-	17.8 ^a	-	-	I
<i>B. articulate</i>	0.3	91.	86.7 ^b	86.	86.7 ^b	66.7 ^b	9.9 ^{ab}	IV
	3x10 ⁻¹	93.	91.1 ^b	91.	80.2 ^b	73.7 ^b	73.3 ^b	V
	3x10 ⁻²	75.	60 ^b	-	62.2 ^b	39 ^b	31.1 ^a	III
	3x10 ⁻³	-	-	-	-	-	-20 ^a	-
<i>B. spartioides</i>	0.3	31.	58.6 ^b	47.	11.1 ^a	28.9 ^a	11.1 ^a	II
	3x10 ⁻¹	100	95.6 ^c	97.	97.8 ^b	100 ^b	80 ^b	V
	3x10 ⁻²	73.	33.3 ^b	36.	13.3 ^a	40 ^b	-4.4 ^a	II
	3x10 ⁻³	4.4 ^a	-	6.3 ^a	11.1 ^a	4.4 ^a	-	-
<i>H. petiolaris</i>	0.3	100	100 ^b	100	97.8 ^c	95.6 ^a	0 ^b	V
	3x10 ⁻¹	97.	93.3 ^b	97.	97.8 ^c	95.6 ^a	71.1 ^c	V
	3x10 ⁻²	66.	84.4 ^b	73.	66.7 ^a	71.1 ^a	33.3 ^b	IV
	3x10 ⁻³	8.9 ^a	35.6 ^a	66.	75.6 ^a	73.3 ^a	-	II
<i>S. serratifolius</i>	0.3	91.	77.8 ^a	86.	91.1 ^a	91.1 ^a	20 ^{ab}	IV
	3x10 ⁻¹	97.	91.1 ^a	91.	88.9 ^a	75.6 ^a	33.3 ^a	IV
	3x10 ⁻²	51.	60 ^a	51.	55.6 ^a	-	-	II
	3x10 ⁻³	17.	6.7 ^b	22.	-8.9 ^b	-20 ^b	-	-
<i>DEET</i>	0.3	80 ^b	93.3 ^b	97.	97.8 ^b	97.8 ^b	68.9 ^b	V
	3x10 ⁻¹	44.	55.6 ^a	8.9 ^a	51.6 ^a	20 ^a	-2.2 ^a	II
	3x10 ⁻²	4.4 ^a	6.7 ^a	11.	6.7 ^a	20 ^a	11.1 ^a	I
	3x10 ⁻³	66.	66.7 ^b	55.	15.6 ^a	55.6 ^a	-	II
<i>Lemon</i>	0.3	97.	95.6 ^b	91.	100 ^b	97.8 ^b	42.2 ^b	V
	0.15	97.	100 ^b	100	93.3 ^b	100 ^b	51.1 ^b	V
	9x10 ⁻¹	97.	97.8 ^b	80 ^b	95.6 ^b	97.8 ^b	52.6 ^a	V
	3x10 ⁻²	60 ^a	13.3 ^a	-	-8.9 ^a	-	-	-

¹C: concentración (mg/cm²); ²RC: clase de repelencia. Valores en la misma columna seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes por ANOVA, Tukey (P > 0.05).

Todos los aceites testeados mostraron actividad repelente contra *T. castaneum* de una manera dependiente de la dosis aplicada. A excepción de *A. tenuifolia*, todas las especies vegetales mostraron una mayor repelencia a la concentración de 3x10⁻¹ mg/cm². Se observaron diferencias significativas en la repelencia a la tercera dilución

realizada (3×10^{-2} mg/cm²) en el 50% de las muestras. Además, se observó que la actividad de repelencia de todas las especies tuvo un comportamiento fluctuante en las primeras 5 h, disminuyendo significativamente a las 24 h de exposición. El AE de *B. spartioides* presentó la actividad repelente más alta contra *T. castaneum* a la concentración de 3×10^{-1} mg/cm², entrando en la clasificación V de repelente. Mientras que el AE de *H. petiolaris* fue el segundo más efectivo, mostrando su máxima actividad repelente a la misma concentración que *B. spartioides*, también entrando en la clasificación mas alta (V) de repelencia. Ambos aceites incluso exhibieron una mayor actividad repelente que el control positivo DEET, el cual entro en la clasificación II de repelencia, a la concentración de 3×10^{-1} mg/cm². A la dosis más alta ensayada (3×10^{-3} mg/cm²), solo *H. petiolaris* mostró una repelencia moderada (clase II).

Los resultados del análisis GC-MS de los AEs de *B. spartioides* y *H. petiolaris* se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Identificación de los constituyentes presentes en los AEs de *B. spartioides* y *H. petiolaris*.

Rt (min)	Compuestos	<i>B. Spartiodes</i>	<i>H. petiolaris</i>
7.134	(S) cisVerbenol	-	12.54
8.143	Verbrnone	-	6.08
7.301	Verbenol	-	10.79
8.950	Bornyl acetate	-	18.97
13.187	α -Bisabolol	1.32	-
14.135	Ledene oxide (I)	-	5.53
14.068	Spathulenol	35.15	-
14.135	Ledene oxide (I)	-	5.53
14.719	Caryophyllene oxide	31.1	27
16.438	Isoaromadendrene	-	3.53
16.863	1,6(1-(Hydroxymethyl)vinyl)-4,8a-dimethyl-3,5,6,7,8,8a-hexahydro-2(1H)-naphthalenone	6.42	-
19.132	α -Pipene oxide	20.74	3.56
24.538	Manoyl oxide	-	1
Total		94.73	89
NI†		5.27	11

†No identificado.

En el AE de *B. spartioides*, se identificaron 5 compuestos principales, que representaron aproximadamente el 95% de la composición total. Los principales compuestos identificados (concentraciones superiores al 30%) fueron espatulenol (35,15%) y óxido de cariofileno (31,10%).

En el AE de *H. petiolaris*, se identificaron 9 compuestos principales, que representan aproximadamente el 90% de la composición total. Se enumeran todos los componentes que representaron más del 1% en composición, siendo los compuestos mayoritarios (concentraciones superiores al 12%) el (S) cis-Verbenol (12,54%) y el óxido de cariofileno (27,00%).

Los resultados del ensayo de la actividad repelente sobre harina tratada se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Actividad repelente sobre harina tratada con los AEs de *B. spartioides* y *H. petiolaris*.

Aceite Esencial	C ¹	PR ² 2 h	PR ² 24 h
<i>B. spartioides</i>	3x10 ⁻¹	95.5	67.6
<i>H. petiolaris</i>	3x10 ⁻¹	100	80

¹C: concentración (mg/cm²)

En el caso de *H. petiolaris*, el 90% de los insectos rechazaron la harina tratada mientras que *B. spartioides* indujo el 67,6% de la emigración. En ambos casos, la repelencia disminuyó después de 24 horas de tratamiento en aproximadamente un 20 y un 25%, respectivamente.

Los resultados de la actividad repelente para las mezclas propuestas se presentan en la **Figura 1** y **Figura 2**. La actividad repelente de la mezcla de *H. petiolaris*-Limoneno (**Figura 2**) persistió después de 24 h de tratamiento mientras que el AE puro de *H. petiolaris* disminuyó en un 24% a las 24 h de aplicación. En el caso de la mezcla *B. spartioides*-Limoneno (**Figura 1**), tanto la mezcla como el AE puro de *B. spartioides* disminuyeron en un 20%. Cuando se testeó el AE de limón puro a la concentración de 3x10⁻¹mg/cm², no mostró actividad repelente, sin embargo cuando se utilizó en combinación con el AE de *H. petiolaris*, la mezcla aumentó en un 20% su repelencia individual.

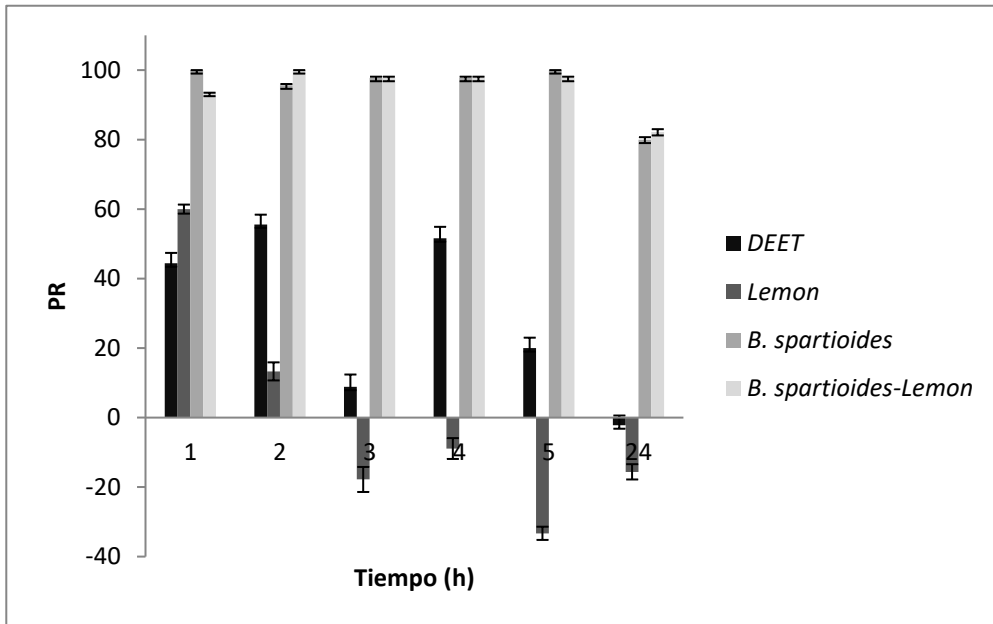


Figura 1. Actividad repelente de la mezcla propuesta *B. spartioides-Limon*, comparada con los AEs puros y el control positivo DEET a la concentración de 3×10^{-1} mg/cm².

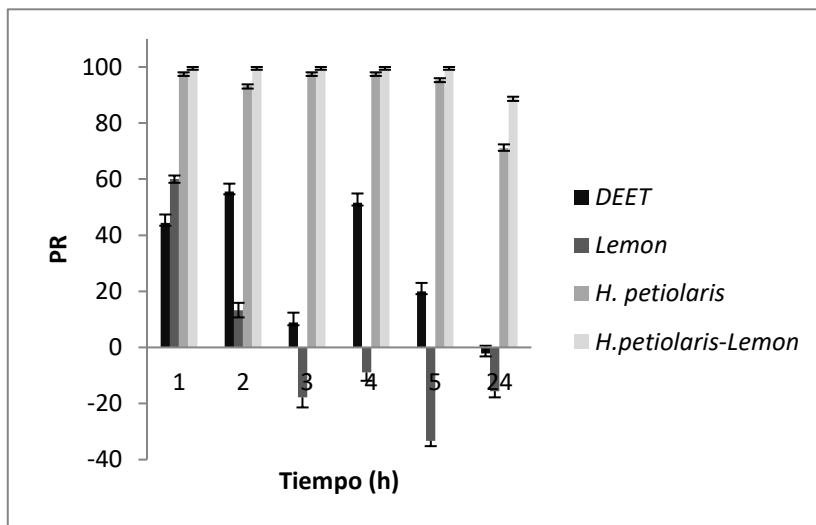


Figura 2. Actividad repelente de la mezcla propuesta *H. petiolaris-Limon*, comparada con los AEs puros y el control positivo DEET a la concentración de 3×10^{-1} mg/cm².



DISCUSIÓN

En general, el rendimiento de los aceites esenciales obtenido luego de la extracción es bajo, variando entre 0,01% y 2,00% dependiendo de la especie vegetal (Zekaria, 2006). Algunos autores han informado rendimientos para aceites esenciales de diferentes plantas, tales como Muña 0,19% p/p (Cano, 2007), Ruyaq muña 2,4% v/p (Carhuapoma *et al.*, 2009); Orégano 1,30% v/p (Albado *et al.*, 2001); Eucalipto 3% v/p (Libertad *et al.*, 2001); Salvia 0,80% v/p (Ricciardi y Ricciardi, 2000). Si bien los rendimientos de AEs obtenidos para las especies vegetales estudiadas en nuestro trabajo fueron significativamente más bajos (**Tabla 1**) que los reportados para otras especies vegetales, el hecho de que estas especies sean endémicas y ruderales, hace que la recolección de la biomasa vegetal necesaria se pueda realizar sin generar daño o presión selectiva sobre el ecosistema (Elechosa, 2009).

Según nuestro conocimiento, este es el primer informe de actividad repelente frente a *T. castaneum* para las AEs de *A. tenuifolia*, *B. articulata*, *H. petiolaris* y *Senecio serratifolius*. Mientras que para *B. spartioides*, Jofré Barud *et al.* (2014) reportaron la actividad repelente del aceite esencial puro contra la plaga de la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* y también se encuentra reportada su actividad antimicrobiana (Oliva *et al.*, 2007) y nematicida (Sosa *et al.*, 2012). También existen algunos reportes sobre AEs de otras especies de *Baccharis*, como *B. salicifolia* y *B. darwinii*, que describen su gran actividad repelente contra insectos y nematodos parásitos de las plantas (Sosa *et al.*, 2012; Kurdelas *et al.*, 2012).

Todas las especies vegetales mostraron una mayor repelencia a la concentración intermedia testeada de 3×10^{-1} mg/cm² y no a la concentración más alta testeada. Este fenómeno fue reportado por Zhe Zhang *et al.* (2017) para especie vegetal *Artemisia ordosica*, los mismos informaron que la actividad repelente frente a *T. castaneum* no aumentó con el aumento de la concentración de los aceites.

Este informe constituye la primera descripción de la composición del aceite esencial de *H. petiolaris* mediante análisis GC-MS. Sin embargo la composición de *B. spartioides* fue reportada anteriormente por Jofré Barud *et al.*, (2014). El mismo reporto la composición del AE de *B. spartioides* proveniente de la provincia de San Juan. Su composición estuvo dominada por los hidrocarburos monoterpénicos, α -fellandreno (44,5%), sabineno (20,7%) y α -pineno (15,9%). En contraste, Oliva *et al.*, (2007) reporto la composición del AE de *B. spartioides* proveniente de tres regiones distintas de Argentina (las áreas Noroeste, Centro y Patagonia). Fueron los principales constituyentes de los aceites alcanfor (26,5–50%), limoneno (4,3– 35,8%), citronelal (12%), carvona (10%) y espatulenol (2,1-11,8%), encontrando una variación relativamente alta en su composición y actividad antimicrobiana según el origen. Tal divergencia en los resultados revela la variabilidad intrínseca de la composición de los AEs, la cual depende de la compleja interacción entre el fenotipo de la planta y el ambiente. Además, otras fuentes de variabilidad composicional también pueden incluir el órgano de la planta de la cual se extraen los aceites, el estado fenológico de la planta y la época del año en la que se cosecha (Isman & Machial, 2006). En este contexto, la predictibilidad de la composición de los AEs es uno de los principales desafíos biotecnológicos en la producción de bio-formulados y es fundamental identificar los componentes responsables de la repelencia (Canter *et al.*, 2005). Los aceites esenciales son



mezclas complejas de numerosas moléculas y su bioactividad podría verse afectada por interacciones entre sus componentes estructurales debido a la acción aditiva y / o sinergismo entre clases químicas (Hummelbrunner & Isman, 2001).

Tanto *H. petiolaris* como *B. spartioides* indujeron la emigración de los gorgojos de harina tratada con los AEs. Sin embargo en ambos caso la repelencia disminuyó después de 24 horas de tratamiento en aproximadamente un 20 y un 25%, respectivamente.

Sadeghi y col. (2013) reportaron la repelencia de Palizin® (jabón de coco 65%) frente a *T. castaneum* y otras plagas de productos almacenados utilizando el bioensayo de impregnación de harina como un método que simula la complejidad de la condición real en actividad repelente, el cultivo y el comportamiento de la plaga. Silva y col. (2002) informaron que el efecto obtenido en lugar de ser insecticidas inhibió el desarrollo normal de los insectos y demostraron que la aplicación de dosis sub-letales de productos naturales puede controlar la plagas, indirectamente. Esto es particularmente relevante en un contexto donde el uso de plaguicidas químicos ampliamente tóxicos se encuentra bajo serias restricciones en un mundo cada vez más regulado.

Lee *et al.*, (2002) reporto la toxicidad fumigante del aceite de limón contra *T. castaneum* obteniendo la segunda actividad más potente (LD50 = 16.2 µl/l aire). También, Karamaouna *et al.*, 2013 informaron que en un rango de 2,7 a 8,1 mg/mL de concentración, los AE obtenidos de las cáscara de *Citrus limon* L. (principalmente limoneno) fueron los más repelentes de todos los AE evaluados, contra la cochinilla de la vid. También se registró limoneno como ingrediente activo pesticida en 15 productos: para uso contra garrapatas y pulgas, como insecticida en aerosol, como repelente para perros y gatos al aire libre, como repelente para manteles, como repelente de insectos para uso en humanos, y como larvicida de mosquitos (EPA, 1994). Al menos una patente estadounidense (N ° 5.653.991 publicada en 1997 por Robert L. Rod; USPTO 1997) se refiere al uso de diversas formulaciones oleosas de d-limoneno, con o sin un portador de agua, contra plagas de plantas tales como whiteflies.

En nuestro trabajo encontraron que en un rango de 30 a 100 mg/ml de concentración, el AE de limón se clasifica como repelencia de clase V contra adultos de *T. castaneum* (**Tabla 2**) y por ello se propuso para realizar mezclas con los AEs obtenidos previamente.

Ya que la concentración de AE necesaria para generar el efecto repelente era alta en comparación con el rendimiento de los aceites (**Tabla 1**), la mezcla propuesta reduce significativamente la concentración de aceite necesaria. Pudimos corroborar que a su vez la mezcla incremento el efecto repelente con el tiempo (**Figura 1 y 2**).

Estos hallazgos presentan la mezcla de AE de *B. spartioides* y *H. petiolaris* como alternativas prometedoras para controlar *T. castaneum* en granos almacenados, como sustitutos más seguros y adecuados de los insecticidas sintéticos que se utilizan actualmente.



CONCLUSIONES

La bioprospección de espíes vegetales y la investigación sobre la posibilidad de obtener a partir de las mismas bioproductos menos tóxicos y respetuosos con el medio ambiente como sustitutos en la protección de granos almacenados a aumentando significativamente en los últimos años. En este contexto, las especies nativas son un reservorio prometedor de bioinsumos. Este estudio revela que el uso de los AE extraídos de *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulate*, *Baccharis spartioides*, *Helianthus petiolaris* y *Senecio serratifolius* podría utilizarse como un insecticida botánico frente a *T. castaneum*, ya que son capaces de controlar a esta plaga en dosis 10 veces inferiores a los productos sintéticos estándar que se utilizan en la actualidad (DEET). En base a la persistencia de la repelencia y su bajo rendimiento, la mezcla de los AEs de *B. spartioides* y *H. petiolaris*, con una base de AE de limón fue propuesta. Estas mezclas permiten reducir el costo de producción de los repelentes y aumentan a su vez la duración del efecto repelente hasta luego de 24 h de aplicación. Aunque aún se necesitan ensayos adicionales para evaluar de manera integral la toxicidad, evaluar el efecto de esta mezcla y validar su eficacia en condiciones de almacenamiento de granos a gran escala, los resultados obtenidos en el presente trabajo permitirían desarrollar tecnologías de procesamiento para la obtención de productos comerciales que mejoran la calidad y seguridad de productos agrícolas a partir de aceites esenciales. Esta estrategia de control de plagas se ha es crucial para los insectos en el grano almacenado, ya que la acumulación de residuos tóxicos en los productos alimenticios está estrictamente examinada y es un asunto de interés público.



Referencias Bibliográficas

- Albado, E., Saenz, G., Grabiell, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana*, 12(1), 16 – 19.
- Alonso Amelot, M. E., Avila Núñez, J. L. (2011). Comparison of seven methods for stored cereal losses to insects for their application in rural conditions. *Journal of Stored Products Research*. 47, 82-87.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils review. *Food Chem Toxicol*. 46, 446-475.
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, K. R., Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *For Ecol Manage*. 256, 2166-2174.
- Benzi, V., Stefanazzi, N., Murray, A. P., Werdin González, J. O., Ferrero, A. (2014). Composition, Repellent, and Insecticidal Activities of Two South American Plants against the Stored Grain Pests *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Hindawi Publishing Corporation Entomology*, 14.
- Cano, C. A. (2007). Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”. Tesis para optar el Grado Académico de Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM. Lima - Perú.
- Canter, P. H., Thomas, H., Ernst. E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*, 23, 180-185.
- Carhuapoma, M. Y., López, S. G., Roque, M. A., Billie, V., Bell, C. C., Whu, D. W. (2009). Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “RUYAQ MUÑA”. *Ciencia e Investigación*, 12(2), 83-89.
- Descamps, L. R., Stefanazzi, N., Sanchez Chopa C., Ferrero, A. A. (2008). Actividad biológica de extractos vegetales de *Schinus molle* var. *areira* (Anacardiaceae) en *Tribolium castaneum* Herbst. (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae), plaga de grano almacenado. *Boletín de la Sanidad Vegetal-Plagas*, 34, 595-605.
- Elechosa M. A. (2009). Manual de recolección sustentable de plantas aromáticas nativas de la región central y noroeste de la Argentina. *INTA*, 633, 8.
- Emekci, M. S., Navarro, E., Donahaye, M., Rindner Azrieli, A. (2002). Respiration of *Tribolium castaneum* (Herbst) at reduced oxygen concentrations. *Journal of Stored Products Research*, 38, 413-425.
- EPA U.S. Environmental Protection Agency. (1994). Reregistration eligibility decision (RED): limonene. EPA 738-R-94-034. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC.
- FAO. (2013). United Nations Organization for Food and Agriculture. Maximum Codex limits for pesticide residues. Published on the Internet, available at <http://www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm>.
- Fisher, K., Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156-164.
- Franzios, G., Mirotsoy, M., Hatzia Apostolou, E., Kral, J., Scouras, Z., Mavragani-Tsipidou, P. (1997).



- Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J Agric Food Chem*, 45, 2690–2694.
- Giuliano, D. A. (2001). Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, 39, 131–154.
- Hummelbrunner, L., Isman, M. (2001). Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep.: Noctuidae). *J Agric Food Chem*, 49, 715–720.
- INTA. (2008). Postharvest efficiency: generation, development and diffusion of technologies to increase the efficiency of conditioning, drying and storage of cereals, oilseeds and industrial crops in the country. Available at: http://agrolluvia.com/wp-content/uploads/2010/01/inta-balcarce-proyecto-especifico-eficiencia-de-poscosecha__.pdf
- Isman, M. B., Machial, C. M. (2006). Pesticides based on plant essential oils from traditional practice to commercialization. In: Rai, Carpinella (Eds.), *Naturally Occurring Bioactive Compounds*. Elsevier Publishing Co, 1, 29–44.
- Jeffrey, C. (2007). *Compositae*: Introduction with key to tribes. *Families and Genera of Vascular Plants*, 8, 61-87.
- Jindal, V., Dhaliwal, G. S., Koul, O. (2013). Pest management in 21st century: roadmap for future. *Biopest Int*, 9, 1-22.
- Jofré Barud, F., López, S., Tapia, A., Feresina, G. E., López, M. L. (2014). Attractant, sexual competitiveness enhancing and toxic activities of the essential oils from *Baccharis spartioides* and *Schinus polygama* on *Ceratitis capitata* Wiedemann. *Industrial Crops and Products*, 62, 299-304.
- Karamaouna, F., Kimbaris, A., Michaelakis, A., Papachristos, D., Polissiou, M., Papatsakona, P., Tsora, E. (2013). Insecticidal activity of plant essential oils against the vine mealybug, *Planococcus ficus*. *Journal of Insect Science*, 13, 142.
- Kurdelas, R. R., López, S., Lima, B., Egly Feresin, G., Zygodoc, J., Zacchino, S., López, M. L., Tapia, A., Freilea, M. L. (2012). Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. *Industrial Crops and Products*. 40, 261-267.
- Lee, B., Lee, S., Annis, P. C., Pratt, S. J., Park, B., Tumaalii, F. (2002). Fumigation toxicity of essential oils, monoterpenes against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst. *Journal Asia-Pacific Entomology*, 5, 237-240.
- Libertad, A., Morales, L., Armas, L. (2001). Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina UNMSM*, 62, 156-161.
- Liu, Z. L., Ho, S. H. (1999). Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodiarutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). *J Stored Prod*, 35, 317-328.
- Mohan, S., Fields P.G. (2002). A simple technique to assess compounds that are repellent or attractive to stored product insects. *J Stored Prod Res*, 38, 23-31.
- Nerio, L., Olivero Verbel, J., Stashenko, E. (2009). Repellency activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *J Stored Prod Res*, 45, 212-214.
- Oliva, M. M., Zunino, M. P., López, M. L., Soria, Y. A., Ybarra, F. N., Sabini, L., Demo, M. S., Biurrun, F.,



- Zygodlo, J. A. (2007). Variation in the essential oil composition and antimicrobial activity of *Baccharis spartioides* (H. et A.) J. Remy from three regions of Argentina. *J Essent Oil Res*, 19, 509-513.
- Padin, S., Dal Bello, G., Fabrizio, M. (2002). Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelide sobtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Products Research*, 38, 69-74.
- Rees, D. (2004). Insects of Stored products. *CSIRO Australia*, 1, 181.
- Regnault Roger, C., Vincent, C., Arnason, J. T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annu Rev Entomol*, 57, 405-424.
- Ricciardi, G., Ricciardi, A. (2000). Efecto de las variaciones estacionales sobre la composición química del aceite esencial de plantas de "salvia morada" de Sáenz Peña (Chaco). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, UNNE; Exactas, n.11. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/cyt.htm>
- Rúgolo de Agrazar, Z. E., Steibel, P. E., Troiani, H. O. (2005). Manual ilustrado de las gramíneas de la provincia de La Pampa. Primera Edición. La Pampa, Santa Rosa: Editorial 25 de la Universidad Nacional de La Pampa; Córdoba, Río Cuarto. *Editorial de la Universidad de Río Cuarto*, 1, 374.
- Ruiz Leal, A., (1975). Flora popular mendocina. *Eudeba Editorial, Buenos Aires*, 62-73.
- SENASA. (2013). National Secretariat of Agricultural Health. Plant Protection, Agrochemicals. Published on the Internet, available at <http://www.senasa.gov.ar>.
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J., Rodríguez, D. (2002). Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 66, 4-12.
- Sosa, M. E., Lancelle, H. G., Tonn, C. E., Andres, M. F., Gonzalez, A., Coloma, A. (2012). Insecticidal and nematocidal essential oils from *Argentinean eupatorium* and *Baccharis spp.* *Biochemical Systematics and Ecology*, 43, 132-138.
- Subramanyam, B., Hagstrum, D. W. (1995). Resistance measurement and management. *Integrated managements of insects in stored products*, 1, 331-339.
- Troiani, H. O., Steibel, P. H. (1999). Sinopsis de las Compuestas (*Compositae Giseke*) de la provincia de La Pampa. *Rep Argentina Rev Fac Agronomía*, 10(1), 1-90.
- Zekaria, D. (2006). Los aceites esenciales: una alternativa a los antimicrobianos. Disponible en: http://www.calier.es/pdf/Microsoft_Word_-_Aceites_esen_como_promotores.pdf.
- Zhe, Z., Shan-shan, G., Wen-juan, Z., Zhu-feng, G., Jun-yu, L., Shu-shan, D., Cheng-fang, W., Zhi-wei, D. (2017). Essential oil and polyacetylenes from *Artemisia ordosica* and their bioactivities against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera:Tenebrionidae). *Industrial Crops and Products Res*, 100, 132-137.



Instituciones participantes



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

FONTAGRO
Banco interamericano de Desarrollo
1300 New York Avenue, NW, Stop
W0502, Washington DC 20577
Correo electrónico: fontagro@iadb.org