

Evaluación del efecto insecticida de *Picrasma crenata* Engl. in Engl. & Prantl —Simaroubaceae— sobre coleópteros plaga de granos almacenados

Silvia M. Rodríguez

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Cátedra de Zoología Agrícola. Avenida San Martín 4453 (1417). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina.

* Autor a quien dirigir la correspondencia: silro@agro.uba.ar

Compendio de tesis

Lugar y fecha de aprobación de la tesis: Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad de La Plata. 3 de octubre de 2015.

Resumen

Se evaluó la acción de *Picrasma crenata* Engl. in Engl. & Prantl (Simaroubaceae) sobre coleópteros plaga de granos almacenados: *Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum*, *Oryzaephilus surinamensis* y *Ulomoides dermestoides*. Se desarrollaron experiencias con distintos extractos obtenidos con solventes de diferente polaridad (no polares a polares) y extractos acuosos (infusión y cocimiento). Se observó el efecto por contacto tarsal y se concluye que la efectividad de los extractos obtenidos de *P. crenata* varía de acuerdo con la polaridad de los solventes utilizados y a mayor concentración del bioinsecticida mayor porcentaje de mortalidad. Además, se observó la acción por ingesta de extractos de acetato de etilo y acetona de *P. crenata* sobre adultos de *T. castaneum*. Los adultos respondieron a las mayores dosis de los extractos de acetona y etanol, la duración del período larval varió con los extractos de acetato de etilo y etanol. La duración del período pupal varió con el extracto de acetato de etilo. En otra experiencia se evaluó la acción de *P. crenata* como regulador de crecimiento al comparar su acción con los reguladores de crecimiento: Novalurón® y Lufenurón®. En relación al desarrollo larval, todos los extractos tuvieron un comportamiento similar al Novalurón®; los extractos de acetato de etilo y etanol tuvieron un comportamiento similar al Lufenurón®. En relación al desarrollo pupal el extracto de acetato de etilo tuvo un comportamiento similar a los reguladores de crecimiento. Se llevaron a cabo ensayos por topicación sobre las plagas de granos almacenados con la conclusión que los extractos de *P. crenata* no responden como bioinsecticidas al aplicarse por topicación. Se evaluaron las cuasinas y neocuasinas por contacto tarsal e ingesta. Los resultados indican que la fracción con la mayor relación cuasina/neocuasina mostró un efecto por contacto tarsal sobre *S. oryzae*, con una eficacia del 100 % al cabo de 48 horas y que la acción sinérgica de cuasina y neocuasina presentó un efecto positivo sobre la mortalidad de *T. castaneum* cuando actuó por ingesta y por contacto tarsal sobre *S. oryzae*.

Evaluation of the insecticidal effect of *Picrasma crenata* Engl. in Engl. & Prantl —Simaroubaceae— on Coleoptera pests of stored grains

Summary

The action of *Picrasma crenata* on Coleoptera, pests of stored grains was evaluated: *Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum*, *Oryzaephilus surinamensis* and *Ulomoides dermestoides*. Experiences were developed with different extracts obtained with solvents of different polarity (not polar to polar) and aqueous extracts (infusion and decoction). The tarsal contact effect was observed and it is concluded that the effectiveness of the extracts obtained from *P. crenata* varies according to the polarity of the solvents used and an increased in mortality is observed at a higher bioinsecticide concentration. In addition, the effect by ingestion of ethyl acetate and acetone extracts of *P. crenata* on adults of *T. castaneum* was observed. The adults responded to the highest doses of the acetone and ethanol extracts, the length of the larval period varied with the ethyl acetate and ethanol extracts. The duration of the pupal period varied with the ethyl acetate extract. In another experience, the action of *P. crenata* as a growth regulator was evaluated by comparing its action with growth regulators: Novaluron™ and Lufenuron™. In relation to the larval development, all the extracts had a similar behaviour to Novaluron. The ethyl acetate and ethanol extracts had a similar behaviour to Lufenuron. In relation to the pupal development the ethyl acetate extract had a similar behavior to the growth regulators. Experiments were carried out by topication on stored grain pests and it was concluded that extracts of *P. crenata* did not respond as bioinsecticides when applied by top-

Palabras clave: *Picrasma crenata* - bioinsecticida - cuasinas - neocuasinas - reguladores de crecimiento.

Key words: *Picrasma crenata* - bioinsecticide - quassin - neoquassin - growth regulator.

ication. Quassins and nequassins were evaluated by tarsal contact and ingestion. The results indicate that the fraction with the highest quassin/neoquassin ration showed an effect by tarsal contact on *S. oryzae*, with a 100 % efficiency after 48 hours and that the synergy of cuasine and neocuasine had a positive effect on the mortality of *T. castaneum* when acting by ingestion and by tarsal contact on *S. oryzae*.

Introducción

Los granos cosechados y llevados a depósito pasan a formar un nuevo ecosistema en el cual interactúan factores bióticos (hongos, bacterias, insectos, ácaros, roedores, entre otros) y abióticos (temperatura, humedad). Estos factores, así como causas de índole técnica (estado del grano, condiciones de almacenamiento, duración, entre otros), producen un deterioro del producto que se observa en una disminución de su valor comercial (Alonso y col., 1996). Para evitar el efecto de estos factores deben cumplirse tres requisitos básicos: el grano se debe guardar seco, sano y limpio (Casini y Santa Juliana, 2005).

De los 15 millones de organismos vivientes (animales y vegetales), los insectos representan el 50 % (Speight y col., 2008). Actualmente se han registrado aproximadamente 250 especies de insectos plagas de granos almacenados, de las cuales 25 son de importancia por los daños que ocasionan (FAO, 2001). Las pérdidas debidas a estos daños oscilan entre 5 y 10 % en países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo esta cifra es aproximadamente del 50 % (Adam y col., 2006).

De los numerosos órdenes de insectos, solamente tres, Coleoptera (gorgojos), Lepidoptera (mariposas y polillas) y Psocoptera (piojos de los libros), contienen especies consideradas plagas de granos almacenados. Los órdenes Hemiptera (chinchas) e Hymenoptera (avispidas) actúan como predadores y parasitoides de las plagas pertenecientes a los grupos mencionados. Miembros de otros órdenes como Thysanura (pececitos de plata), Blattaria (cucarachas), Diptera (moscas) e Isoptera (termitas) pueden encontrarse accidentalmente contaminando los granos (Riudavets y col., 2002; Rees, 2004; Dal Bello y Padín, 2006; Nerio y col., 2009).

Entre las diversas estrategias disponibles para el control de plagas, aquellas que incluyen el uso de insecticidas sintéticos son las más utilizadas. Sin embargo, su empleo en dosis inadecuadas suele causar fenómenos de resistencia y resurgencia de plagas y, además, provocar fitotoxicidad y contaminación del ambiente ya que al acumularse en los alimentos, los insecticidas pueden resultar tóxicos para el hombre y otros mamíferos e incluso eliminar insectos benéficos (Alonso y col., 1996).

Como consecuencia de la utilización de los insecticidas sintéticos y en relación a una agricultura económica y ecológicamente sustentable, en el mediano y en el largo plazo, resulta imprescindible buscar nuevas pautas de manejo de plagas durante el almacenamiento de la producción de granos (Silva y col., 2002).

Algunos compuestos químicos de origen vegetal, como los metabolitos secundarios, resultan efectivos para controlar las poblaciones de aquellos insectos considerados plaga. Una ventaja del uso de estos metabolitos secundarios es que no dejan residuos tóxicos que puedan afectar sensiblemente tanto a la fauna como al hombre (Davidson, 1992).

La familia Simaroubaceae fue estudiada según distintas perspectivas. Entre los aspectos observados se han comprobado sus propiedades medicinales y antifúngicas. Sus especies se caracterizan por la presencia de principios activos de sabor amargo en su leño descortezado conocidos como cuasinoides. Estos compuestos son de naturaleza terpenoide y, entre ellos, el principal responsable del sabor amargo es la cuasina ($C_{22}H_{28}O_6$), que es la sustancia más amarga encontrada en la naturaleza (50 veces más que la quinina) (Theis, 2003).

Varias especies de la familia Simaroubaceae han demostrado tener actividad insecticida como los aceites esenciales de *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle sobre *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae) que actúa como repelente y, además, tiene una alta actividad fumigante sobre esta plaga (Lu y Shi, 2012). La especie más estudiada por sus propiedades insecticidas es *Quassia amara* L., nativa de las Guayanas Francesas y, según la literatura, fue citada por primera vez en el año 1835 (Beserra Almeida, 2007). Los compuestos aislados del leño de *Q. amara* fueron: cuasina, cuasinol, cuasimarina, cuasinasi-na, 18-hidroxicuasina, neocuasina, dihidronorneocuasina, y simalikalactonas A, B, C y D (Alonso, 2004).

Por otro lado, se observó el efecto de la cuasina sobre el pulgón del lúpulo [*Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae)] (Rosella y col., 1991), el efecto fagodisuasivo sobre el gusano masticador [*Spodoptera eridania* Stoll. (Lepidoptera: Noctuidae)] (Guo y col., 2005) y sobre el escarabajo mexicano del frijol [(*Epilachna varivestis* Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae)] (Leskinen y col., 1984). Por otra parte, Guo y col. (2005) comprobaron que a una concentración de 0,05 % la cuasina no es fitotóxica.

El género *Picrasma* Blume está representado por árboles o arbustos que alcanzan una altura máxima de 20 m y se caracterizan por poseer tanto la corteza como la madera muy amarga. En la Argentina, algunas Simaroubaceae nativas son utilizadas para el control biológico, por ejemplo, *Picrasma crenata* Engl. in Engl. & Prantl (sin.: *Aeschrion crenata* Vell. o *Picrasma palo-amargo* Spreng.), cuyo nombre vulgar es "palo amargo", es una especie citada para el no-

reste del país, en la provincia de Misiones (Vitagliano y Comin, 1971; Zuloaga y Morrone, 1999). Esta especie se encuentra estrechamente emparentada con otras especies de esta familia como *P. excelsa* (Sw) Planch., *Picrasma quasiosoides* Benn, *Picramnia pentandra* Sw, *Simarouba glauca* DC y *Simarouba tulae* Urban (Woodbury y col., 1974). La cuasina, neocuasina y picrasmina se utilizan como insecticidas naturales. Estos compuestos tienen acción insecticida sobre varias especies de Hemiptera, Lepidoptera y Coleoptera (Stoll, 1989, Mambelli y col., 1994). Daido y col. (1995) realizaron estudios de la estructura de los cuasinósidos para determinar su actividad insecticida y antialimentaria; demostraron que se requiere un grupo carbonilo en el anillo A; un carbonilo β insaturado o un metileno dióxido en el anillo C y una lactona en el anillo D.

Debido a la importancia de contar con insecticidas naturales se analizó la actividad de los extractos polares y no polares de *Picrasma crenata* sobre las siguientes plagas de granos almacenados: *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae), *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae), *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) y *Ulomoides dermestoides* (Fairm) (Coleoptera: Tenebrionidae).

A través de distintas metodologías se observó su efecto por contacto tarsal, ingesta y topicación. Se lo comparó con la acción de insecticidas convencionales y reguladores de crecimiento, como así también, se estudió la acción directa de los cuasinoides (cuasina y neocuasina).

Materiales y métodos

Material Vegetal

El leño de *P. crenata* fue provisto por la empresa "Platarío S. A.", proveniente de plantaciones comerciales en Apóstol (provincia de Misiones). El material fue determinado por Beatriz G. Varela, y una muestra se encuentra depositada en el Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (Colección BAF de drogas vegetales).

Elaboración de los preparados para el análisis

Extractos orgánicos

Se colocaron 200 g de leño de "palo amargo" trozado en un recipiente adecuado, se le agregó 2 L de éter de petróleo y se dejó macerar durante 48 h. Al cabo de este lapso, se filtró y se llevó a sequedad con un evaporador rotatorio a presión reducida. A los últimos 20 ml de la solución sometida a evaporación se le agregó 2 g de manitol como adsorbente. El material de "palo amargo" utilizado para esta primera extracción se lo puso en contacto con el solvente diclorometano. Se repitió el procedimiento para éste y los

siguientes solventes en escala de polaridad creciente: acetato de etilo, acetona, etanol y metanol.

Extractos acuosos

Cocimiento o decocción: se colocaron 100 g de leño de "palo amargo" finamente molido en un recipiente adecuado, se le agregó 1 L de agua destilada, se calentó la mezcla hasta que el agua hirvió, se mantuvo en esta condición durante 20 min a ebullición lenta. Se dejó enfriar hasta los 40 °C, se filtró y liofilizó (Farmacoepa Argentina, VIII Ed.).

Infusión: se agregaron 100 g de leño de "palo amargo" finamente molido en un recipiente adecuado, se colocó 1 L de agua destilada hirviendo y se dejó reposar por 20 min (Farmacoepa Argentina, VIII Ed.). Se filtró y liofilizó.

Obtención de los cuasinoides (cuasina y neocuasina)

Maceración: se pesaron 200 g de leño trozado de *P. crenata*, se molieron con un molino de cuchillas rotativas y luego se colocaron a macerar en un recipiente adecuado. Por cada 100 g del polvo se agregó 100 ml de diclorometano (CH_2Cl_2), se lo dejó en contacto durante 72 horas agitando periódicamente. Se realizaron dos extracciones sucesivas que fueron unidas posteriormente.

Concentración: para este proceso se utilizó un evaporador rotatorio reduciéndose el volumen a 50 ml.

Con el objetivo de confirmar si los extractos de *P. crenata* obtenidos con diclorometano contenían cuasina y neocuasina, se realizó una cromatografía en capa delgada (CCD) del extracto. Se utilizó como fase estacionaria una placa de sílica gel 60 F254, con zona de concentración, de 2 mm de espesor y tamaño de 20 x 4 cm. Como su nombre lo menciona, esta placa posee un indicador de fluorescencia bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm, que facilita la observación de las bandas de cuasina y neocuasina a esa longitud de onda.

La siembra se realizó con un capilar de vidrio, para garantizar la distribución uniforme y se colocó la placa en una cuba de cromatografía. La solución testigo estaba compuesta por una mezcla de cuasina y neocuasina purificados, que se utilizaron para la comparación de las bandas. La fase móvil utilizada fue cloroformo metanol (95:5).

Luego de realizada la corrida cromatográfica, la placa se observó bajo luz UV a una longitud de onda de 254 nm, luego a 365 nm. Se obtuvieron 6 bandas. Sobre una parte del cromatograma se reveló utilizando una solución de vainillina al 1 % en etanol seguida de ácido sulfúrico al 10 % en etanol (Wagner y Bladt, 1996).

Cuantificación de los cuasinoides

Con el fin de determinar el contenido de los cuasinoides en las seis bandas (o fracciones) obtenidas de la CCD se realizó una cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC) con detector UV/visible, bajo los siguientes parámetros (Robins y col. 1984):

Columna. LiChroCart 250-4 RP-18 (5 µm).

Fase móvil. ácido ortofosfórico 0,02 M : metanol : acetonitrilo (50:35:15).

Flujo. 0,5 ml por minuto.

Longitud de onda del detector. 255 nm.

Volumen de inyección. 10 µl.

Solución estándar mixta. 25 mg en 50 ml en fase móvil

Solución muestra. 140 mg de cada banda eluida en 25 ml en fase móvil.

Tiempos de retención. Cuasina, 10,6 min; Neocuasina, 20 min.

Concentración de Cuasinas. Banda 2: 0,0044 mg/ml. Banda 3: 0,0318 mg/ml

Concentración de Neocuasinas. Banda 2: 0,01068 mg/ml. Banda 3: 0,01854 mg/ml. Banda 4: 0,01788 mg/ml

Las bandas 1, 5 y 6 no poseen cuasina ni neocuasina. En base a estas fracciones se elaboraron los tratamientos.

Cría de las plagas de granos almacenados en condiciones de laboratorio

Los individuos utilizados para desarrollar las experiencias fueron obtenidos a partir de la cría realizada en la Cátedra de Zoología Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires. Las condiciones de laboratorio fueron 28 ± 1 °C y 76 % de HR. La temperatura se mantuvo mediante una estufa con termostato y la humedad con un humidificador y una solución saturada de NaCl (Winston y Bates, 1960). En todos los casos, los insectos provenían de una misma cohorte. Las experiencias se llevaron a cabo sobre cuatro plagas de granos almacenados: *S. oryzae*, *O. surinamensis*, *T. castaneum* y *U. dermestoides*. Para esto se aislaron 200 insectos entre machos y hembras de cada especie. Se colocaron en contacto con el alimento correspondiente, contenidos en frascos de vidrio de 12 cm de diámetro de boca y 25 cm de alto y tapa de tela metálica de 0,5 mm para facilitar el intercambio gaseoso durante 15 días, tiempo suficiente para que se produzca la fecundación de estas especies anfígónicas y su posterior oviposición. Transcurrido este lapso se retiraron los adultos. Se cumplió su ciclo vital en el cual a partir de los huevos se desarrollaron los estados de larva, pupa y posteriormente adulto o imago. Las experiencias se desarrollaron con esta primera generación (F1).

Insecticida organofosforado, metil-clorpirifós, considerado en los bioensayos

Un número reducido de insecticidas se utilizaron con éxito en el control de las plagas de granos almacenados. Los organofosforados no constituyen una solución para el control de estas plagas, pero su aplicación sobre pisos, paredes y techos, así como en el exterior de las estibas, coadyuva a mantener un nivel bajo de plagas, sobre todo en almacenes con un movimiento importante de merca-

dería (Dierksmeier Corcuera, 2007). Un insecticida convencional con estas características es el metil-clorpirifós (5,6 mPa). Este compuesto es un organofosforado sólido, blanco, de apariencia cristalina y de aroma fuerte. Actúa por contacto e ingestión y, además, en fase vapor (inhalación), penetra profundamente en el canopeo del cultivo. Es estable y persistente en el suelo.

Los extractos obtenidos de *P. crenata* fueron contrastados con el insecticida metil-clorpirifós (N° CAS 2921-88-2). Para este experimento se consideraron aquellos extractos que produjeron una mayor mortalidad y estabilidad en las experiencias previas del método del film sobre las plagas de granos almacenados. Estos fueron acetato de etilo, acetona y etanol, los cuales se compararon con el insecticida convencional sobre el insecto *T. castaneum*.

Análisis de Variancia

Se realizó un análisis de variancia a cada uno de los extractos seleccionados, en sus respectivas concentraciones y metil-clorpirifós, testeado a una dosis comercial, durante 72 horas, con un intervalo de 6 h entre cada observación (Infostat, 2009). Se calculó la concentración letal 50 (CL50) y el tiempo letal 50 (TE50).

Bioequivalencia

En la prueba de hipótesis de equivalencia la estrategia es emplear una hipótesis nula de medias distintas, a diferencia de la estrategia clásica. De este modo el rechazo de la hipótesis nula resulta en tener suficientes evidencias de equivalencia de medias. Como dos medias poblacionales nunca van a ser exactamente idénticas, la hipótesis nula usada en la práctica es aquella en que la diferencia entre las medias es mayor que algún valor de tolerancia definido a priori por el investigador. El nivel de tolerancia empleado puede basarse en un nivel arbitrario de similaridad (Garret, 1997).

Las hipótesis para comparar el tratamiento experimental y el estándar fueron planteadas según la técnica de bioequivalencia, más específicamente de no inferioridad, siguiendo a Diletti y col. (1992).

Ensayos biológicos

Exposición por método del film (contacto tarsal)

En el interior de las cajas de Petri se colocó un papel de filtro humedecido con 1 ml de cada una de las soluciones. En los tratamientos testigos se procedió del mismo modo pero con agua destilada. Se introdujeron 10 ejemplares adultos de la plaga de granos almacenados en estudio (*S. oryzae*, *T. castaneum*, *O. surinamensis* y *U. dermestoides*), se realizaron cinco repeticiones. Se efectuó el recuento de los individuos muertos a los 30 min, 6, 12, 24, 48 y 72 ho-

ras luego de comenzado el ensayo. Los datos se analizaron mediante ANOVA y pruebas a posteriori (Tukey, $\alpha = 0,05$) para la mortalidad, calculada como:

$$\text{Mortalidad \%} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de individuos muertos}}{\text{N}^\circ \text{ de individuos totales}} \times 100$$

Concentración Letal 50 y el Tiempo Efectivo 50

Se calculó la Concentración Letal 50 (CL50) y el Tiempo Efectivo 50 (TE50) con sus intervalos de confianza por el método de Probit (Miller y Tainter, 1944; Weil, 1952; Silva y Hepp, 2003).

Exposición por ingestión del alimento tratado

El ensayo se realizó con *T. castaneum* debido a su importancia económica en la conservación de granos y por ser, además, una plaga de infestación secundaria por lo cual, ataca los granos quebrados y productos de la molienda, quedando expuestos los adultos y las larvas a la acción de los insecticidas.

La dieta base consistió en harina de trigo 0000, levadura de cerveza en polvo y fécula de maíz.

Experiencia 1. *Mortalidad de individuos adultos de Tribolium castaneum por la ingesta de extractos de Picroasma crenata.*

Se observó el efecto de los extractos cuando fueron adicionados a la dieta base de los adultos. La unidad experimental fue el frasco de vidrio de 3 cm de diámetro por 5 cm de altura en un diseño completamente al azar (DCA). En cada uno se colocaron 2 g de la dieta base (harina de trigo, fécula de maíz y levadura), más las correspondientes dosis, en polvo, para cada uno de los tratamientos.

Los tratamientos fueron: To: testigo (dieta base); T1 y T2: acetato de etilo, T3 y T4: acetona y T5 y T6: etanol. Las dosis fueron 0,15 g/ml y 0,20 g/ml para cada uno de los extractos. Se realizaron 5 repeticiones (n = 5 con 10 individuos c/u) para cada tratamiento, y los frascos fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C) y humedad (60 ± 5 %). Se contabilizó la mortalidad de los insectos adultos, realizando en total 10 observaciones, la primera a las 24 horas y las siguientes a intervalos fijos de tres días. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA de dos vías (solvente de extracción y dosis) con dos niveles cada uno, para cada momento de observación en forma independiente.

Experiencia 2. *Duración de los estados juveniles de Tribolium castaneum por efecto de los extractos de Picroasma crenata sobre la ingesta y su relación con los reguladores de crecimiento.*

La unidad experimental, el tipo de alimento y el tratamiento estadístico fueron similares a la Experiencia 1.

Se consideraron dos reguladores de crecimiento, a dosis comerciales, como parámetros comparativos: Novalurón® y Lufenurón®. Se incorporó una larva neonata perteneciente a una misma cohorte de *T. castaneum* por frasco.

Los tratamientos fueron: To testigo (dieta base), T1 y T2 acetato de etilo, T3 y T4 acetona, y T5 y T6 etanol. Las dosis fueron 0,15 g/ml y 0,20 g/ml para cada uno de los extractos, respectivamente. T7 Novalurón® (10 % EC, 1 cm³/l) y T8 Lufenurón® (5 % EC, 1 cm³/l). Se realizaron 10 repeticiones (n = 10) para cada tratamiento en condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C) y humedad (60 ± 5 %). Se contabilizó la duración del estado larval y pupal. Las observaciones se realizaron a intervalos de cuatro días, hasta que las larvas testigo alcanzaron el estado adulto. Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Mortalidad por topicación de los adultos de Tribolium castaneum, Sitophilus oryzae y Oryzaephilus surinamensis con los extractos de Picroasma crenata

Se observó el efecto de los extractos cuando fueron topicados sobre los adultos de tres especies de plagas de granos almacenados: *T. castaneum*, *S. oryzae* y *O. surinamensis*. Para ello, se tomaron individuos pertenecientes a una misma cohorte (Lagunes y Vazquez, 1994).

La unidad experimental fue la caja de Petri de 90 mm de diámetro con un papel de filtro en la base, en un diseño completamente al azar (DCA). Se efectuó una aplicación tópica sobre la región ventral de los últimos urosternitos, con 0,4 µl de cada una de las diluciones, mediante una microjeringa Hamilton de 10,0 µl.

Los tratamientos fueron: To: testigo (sin tratar), T1: acetato de etilo, 0,30 g/ml; T2: acetona, 0,25 g/ml y T3: etanol: 0,30 g/ml.

Las concentraciones fueron determinadas en relación con las experiencias anteriores.

Se realizaron 5 repeticiones (n = 5 con 10 individuos c/u) para cada tratamiento y las cajas de Petri fueron mantenidas en condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C) y humedad (60 ± 5 %).

Se contabilizó la mortalidad de los individuos, realizando la primera observación a los 30 min, la segunda a las 6 h y las siguientes a intervalos de 6 horas hasta completar las 48 horas. El análisis estadístico utilizado fue la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Bioequivalencia entre los extractos de Picroasma crenata y un insecticida convencional sobre Tribolium castaneum

Por experiencias previas con el método del film (contacto tarsal) se determinó que los extractos que producían una mayor mortalidad eran el acetato de etilo, la acetona y el

Tabla 1.- Tratamientos realizados a distintas concentraciones por contacto tarsal con distintos extractos en comparación con un insecticida convencional

Extractos	Tratamiento	Dosis
	To	Testigo
	T1	0,15 g/ml
Acetato de etilo	T2	0,20 g/ml
Acetona	T3	0,25 g/ml
Etanol	T4	0,30 g/ml
	T5	0,35 g/ml
Metil-clorpirifós	T6	2,88 x 10 ⁻⁵ cm ³ /ml

etanol. Se realizó un análisis de varianzaa para cada uno de ellos.

Los tratamientos realizados con los diferentes extractos y las concentraciones empleadas se detallan en la tabla 1. Las observaciones se hicieron a las 0,5; 6; 12; 18; 24; 48 y 72 h. Se calculó la CL₅₀ a las 6 h, por ser el momento más representativo en cuanto al porcentaje de mortalidad y por ser progresiva a través del tiempo de exposición y, por consiguiente, ajustarse a un análisis de Probit.

Para el análisis de la bioequivalencia se consideraron los extractos de etanol y acetato de etilo, por producir una mayor mortalidad a una menor dosis (CL₅₀ a las 6 h). Para la variable respuesta binomial se define a θ como la diferencia positiva de la probabilidad de éxito del grupo estándar (Pe) y la probabilidad de éxito para el grupo experimental (Ps), esto es: $\theta = Ps - Pe$. El estadístico de la prueba es el estadístico Z habitual derivado de la aproximación de la distribución binomial a la normal (Atherton Akaff y Sloan, 1998).

$$Z_0 = \frac{\Theta - \delta}{SE}$$

$$SE = \left[\frac{Ps(1 - Ps)}{Ns} + \frac{Pe(1 - Pe)}{Ne} \right]^{1/2}$$

Donde Ns es el tamaño estándar de la muestra estándar y Ne es el tamaño de la muestra experimental. SE es una función de Ps y Pe. La hipótesis nula se rechaza y se concluye que existe equivalencia entre las proporciones de éxito de los tratamientos estándar y experimental si $Z_0 < Z_{\alpha}$, alternativamente (valor $p < \alpha$).

Efecto de los cuasinoides (cuasina y neocuasina) sobre *Sitophilus oryzae*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* y *Ulomoides dermestoides*

Ulomoides dermestoides se incorpora a este experimento

porque es una plaga potencial para la Argentina e interesante de considerar en futuras experiencias.

Para la realización del ensayo se utilizaron las bandas extraídas con diclorometano de *P. crenata* y, en función de ello, se establecieron los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1. Compuestos presentes en las bandas cromatográficas que no poseen cuasinoides (cuasinas y neocuasinas) en concentración significativa (Bandas 1, 5 y 6), con el fin de verificar si existen otros compuestos con propiedades insecticidas.

Tratamiento 2. Compuestos presentes en las bandas cromatográficas que poseen mayor relación cuasina/neocuasina (Banda 2).

Tratamiento 3. Compuestos presentes en las bandas cromatográficas que poseen mayor relación cuasina/neocuasina (Banda 3).

Tratamiento 4. Compuestos presentes en las bandas cromatográficas que poseen únicamente neocuasina (Banda 4).

Todos los ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura (27 ± 1 °C) y humedad relativa (60 %). Asimismo, todos fueron realizados siguiendo un diseño completamente aleatorizado (DCA) con 5 repeticiones (10 individuos cada una). Se realizaron dos ensayos:

1. Primera Experiencia

- 1_a. Efecto de los cuasinoides a través del método de contacto
 - a₁. Ensayo preliminar utilizando las cuatro plagas mencionadas
 - a₂. Ensayo sobre *S. oryzae*

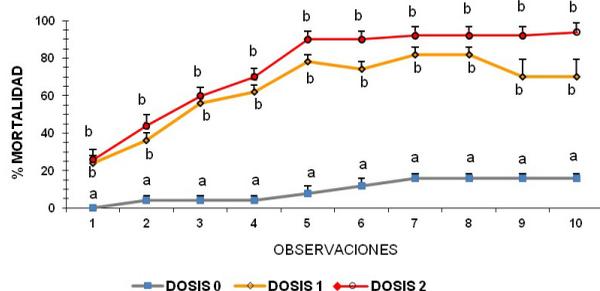
2. Segunda Experiencia

- 2_a. Efecto de los cuasinoides a través de la ingesta

1_a. Método de contacto

a₁. *Ensayo preliminar.* El objetivo de este ensayo fue observar si los cuasinoides de *P. crenata* producen algún efecto por contacto sobre los adultos de *O. surinamensis*, *T. castaneum*, *S. oryzae* y *U. dermestoides*. En las cajas de Petri se colocó un papel de filtro en la base y, en ausencia de alimento, se procedió a ubicar 1 ml de cada tratamiento en las diferentes cajas. Se aireó y se colocaron 10 individuos adultos de cada una de las plagas para los distintos tratamientos. Para el control se utilizó metanol ya que este fue el solvente en el cual se diluyeron los principios activos. Se midió el efecto de los extractos mediante la mortalidad de los adultos a las 3, 6, 12, 18, 48 y 72 horas después de su introducción.

Figura 1.- Mortalidad de los adultos de *T. castaneum* por el efecto de ingesta de los extractos de etanol de *P. crenata*



a. Ensayo por contacto sobre *Sitophilus oryzae*. A partir de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar, se repitió el ensayo con *S. oryzae*, duplicando la dosis a 2 ml. Para el análisis de los resultados, se utilizó el análisis de la variancia (ANOVA) para el porcentaje de la mortalidad de los tratamientos y las pruebas a posteriori para las comparación de sus medias (Tukey = 0,05)

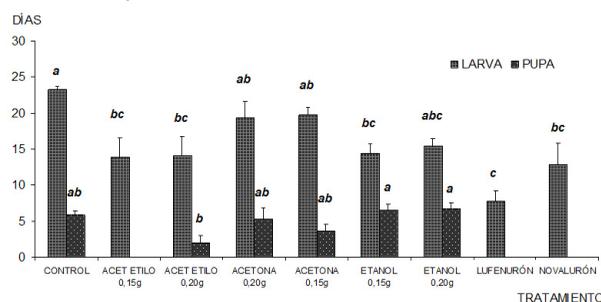
2. Método de ingesta

El ensayo se realizó con *T. castaneum* debido a su importancia económica en la conservación de los granos y por ser, además, una plaga de infestación secundaria por lo cual, ataca los granos quebrados y productos de la molienda, quedando expuestos los adultos y las larvas a la acción de los insecticidas. Para la realización del estudio se procedió de la siguiente manera:

En adultos. La unidad experimental fue un frasco de vidrio de 3 cm de diámetro por 5 cm de altura. Se colocó 1 g de la dieta base (harina de trigo, fécula de maíz, levadura en proporción 10:10:1,5), y luego se introdujo 1 ml de cada banda de *P. crenata*. Se incorporaron 10 insectos adultos por frasco. Se evaluó la mortalidad de estos insectos en cada unidad experimental a las 24 h y luego cada 3 días hasta completar las 10 observaciones. Los ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura ($27 \pm 1^\circ \text{C}$) y humedad relativa (60 %).

En larvas. La unidad experimental, el tipo de alimento y el tratamiento estadístico fueron similares al tratamiento con los adultos. Se incorporaron 10 larvas en cada unidad experimental. Se evaluó la mortalidad de estos insectos en cada una de éstas a las 24 h y luego cada 3 días hasta completar las 10 observaciones. Los ensayos se realizaron en condiciones controladas de temperatura ($27 \pm 1^\circ \text{C}$) y humedad relativa (60 %). Para el análisis de los resultados, se utilizó análisis de variancia (ANOVA) para el porcentaje de mortalidad de los tratamientos y pruebas a posteriori para las comparación de sus medias (Tukey = 0,05)

Figura 2.- Duración del período larval y pupal de *T. castaneum* en relación al efecto de los reguladores de crecimiento, Lufenurón® y Novalurón®



Larvas (H = 26,01; p = 0,0002); pupas (H = 6,29; p = 0,0653)

Resultados y Discusión

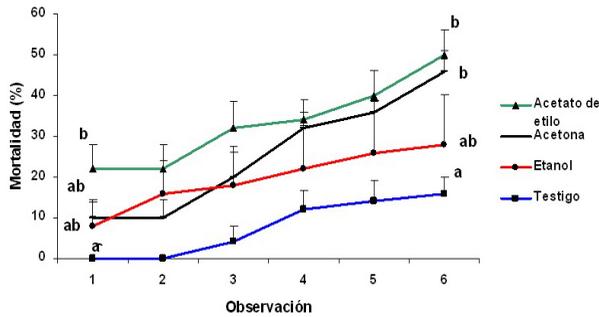
En general, se observó un aumento de la efectividad al aumentar la polaridad de los solventes de extracción y al aumentar la concentración de cada uno de los extractos. De las cuatro especies bajo estudio, se pudo observar un mayor porcentaje de mortalidad sobre *O. surinamensis* y *T. castaneum* (tabla 2 y 3). Los extractos de acetato de etilo, acetona, etanol y metanol mostraron una alta mortalidad en todas las concentraciones. Los extractos obtenidos por cocimiento e infusión lograron una mortalidad, en promedio, de 72 % para *T. castaneum* y *S. oryzae*, mientras que sobre *U. dermestoides* y *O. surinamensis* fue baja.

Se calculó la concentración letal del 50 % de la población (CL50) y el tiempo efectivo de mortalidad del 50 % de la población (TL50), los extractos más efectivos fueron en orden decreciente: acetona, acetato de etilo, etanol, metanol, diclorometano y éter de petróleo. Los valores de la CL50 disminuyeron con el aumento de la polaridad de los solventes.

En base a los resultados obtenidos en el método del film, por contacto, se llevó a cabo la experiencia de la observación de la mortalidad de los adultos de *T. castaneum* por efecto de los extractos de acetona, acetato de etilo y etanol de *P. crenata* incorporados a la dieta. El extracto de etanol fue el más efectivo (Figura 1).

En una segunda experiencia, se incorporaron los mismos extractos a la dieta de las larvas de *T. castaneum*, su acción se comparó con los reguladores de crecimiento Novalurón® y Lufenurón®. Se observó que el período larval se acortó en relación al control y los extractos de acetato de etilo y etanol tuvieron un comportamiento similar al de los reguladores de crecimiento. En el estado pupal la mortalidad fue alta, manifestándose a través del número de individuos que llegaron a adulto, la duración de este período fue similar al control para los extractos de etanol y acetona, mientras que para el acetato de etilo la concentración menor se comportó como los reguladores de crecimiento en los cuales las larvas no llegaron a empupar (Figura 2).

Figura 3.- Mortalidad de *Sitophilus oryzae* por efecto de la topicación con extractos de *Picrasma crenata*



K. Wallis, en forma independiente por momento de lectura y prueba a posteriori) ($\alpha = 0,05$) ($H = 8,33$; $p = 0,0363$)

Con la finalidad de observar el efecto de los extractos en las primeras horas de observación, es decir, un efecto *knock out*, se realizó un análisis de la CL₅₀ a las seis horas de comenzado el ensayo. Los extractos de acetato de etilo y etanol lograron la mortalidad del 50 % de la población con dosis menores. Por este motivo fueron considerados para un análisis de bioequivalencia con el insecticida convencional metil-clorpirifós. Los resultados demostraron que solamente el extracto de etanol presentó evidencias para poder considerarlo bioequivalente al Clorpirifós (Tabla 2).

Por otro lado, al someter las especies *S. oryzae*, *T. castaneum* y *O. surinamensis* a la acción por contacto de los extractos de *P. crenata*, a través de la metodología por topicación, se observó un bajo efecto, excepto la especie *S. oryzae* que difirió significativamente del testigo al alcanzar una mortalidad del 50 % (Figura 3).

Cuando se aislaron los cuasinoides, cuasina y neocuasina, pudo observarse que las cuasinas con el método del film presentaron efectividad sobre los adultos de *O. surinamensis* y *S. oryzae*. La respuesta de éste fue superior a la de *O. surinamensis* con la dosis de 1 ml, por lo que se llevó a cabo un segundo ensayo con una doble dosis de todos los tratamientos sobre *S. oryzae*. Se confirmó la alta mortalidad producida por el tratamiento con mayor porcentaje de cuasinas (Figura 4).

En la segunda experiencia, donde se puso a prueba la eficacia de los cuasinoides a través de la ingesta sobre adultos y larvas de *T. castaneum*, se pudo observar que las larvas presentaron una mejor respuesta que los adultos. Con esta metodología, se evidenció la efectividad de los cuasinoides sobre adultos y larvas de estas plagas de granos almacenados.

En el tratamiento por ingesta se observaron diferencias significativas en la mortalidad respecto del tratamiento testigo, pero no entre las dosis de los extractos de etanol probadas (Figura 4). Las dosis 1 y 2 de este compuesto produjeron una mortalidad acumulada de 70 % y 90 % respectivamente de los adultos de *T. castaneum* (Figuras 5 y 6).

Tabla 2.- Concentración letal media de los extractos a las 6 horas de observación

Fracción/CL ₅₀	CL ₅₀ (6 h)	IF (95 %)
Acetato de etilo	0,16	(0,15-0,17)
Etanol	1,38	(0,90-1,66)
Acetona	1,74	(1,58-1,88)

Conclusiones

Los experimentos realizados permiten demostrar la acción de los cuasinoides cuando actúan por ingesta sobre las plagas de granos almacenados y la baja respuesta cuando se aplica directamente sobre el tegumento, es decir, por topicación. En todos los casos la efectividad fue más alta al aumentar la concentración de cada uno de los extractos.

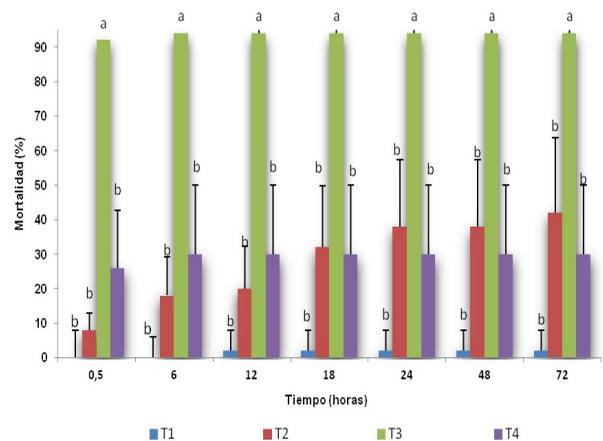
Por consiguiente, los ensayos realizados permiten plantear la hipótesis de que, además de los cuasinoides, otros metabolitos secundarios podrían actuar con acción insecticida o con efecto de sinergismo sobre los sesquiterpenos (cuasina y neocuasina).

Los resultados obtenidos constituyen un aporte interesante a estas nuevas líneas de investigación. *Picrasma crenata* es una buena alternativa en el control de las plagas de granos almacenados.

Referencias bibliográficas

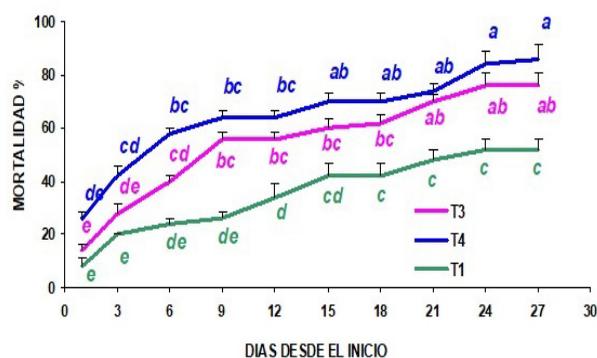
Adam, B.; Phillips, P.; Flinn, P. (2006). "The economics of IMP in stored grain: Why don't more grain handlers use IMP". *Actas y Trab. del 9th International Working Conference on Stored Product*

Figura 4.- Mortalidad promedio producida por los cuasinoides de *Picrasma crenata* sobre adultos de *Sitophilus oryzae* por contacto, por momento de observación



Las barras representan el error estándar de las medias. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas ANOVA y Test de Tukey F(6;28; p > 0,05)

Figura 5.- Mortalidad promedio producida por los cuasinoídes de *Picrasma crenata* sobre las larvas de *Tribolium castaneum* por ingesta a través del tiempo



Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA 2 vías (tratamiento x tiempo) ($F = 189,29$; $p < 0,0001$)

Protection. Plenary session 1. Stored Grain Losses, ABRAPOS, Campinas, Sao Paulo, Brazil pp. 3-12.

Alonso, J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Corpus. Rosario, Argentina.

Alonso, A.; Calderini, D.F.; Cantamutto, M.A.; Carmona, M.; Chiara, G.; Di Nápoli, M.; Duarte, G.; Estenssoro, M.; Fraschina, J.; Gallez, E.L.; Gallo Candolo, E.G.; Montaner, J.G.; Grosse, R.; Maluf, J.E.L.; Lamédica, C.; Leaden, M.; Maddoni, G.A.; Peck, R.M.; Miralles, D. J.; Miravalles, M.T.; Mockel, F.; Nisi, J.; Vila J.M.O.; Permingeat, O.; Pozzi, R.; Santamarina, A.; Savin, R.; Slafer G.A.; Tombetta, E.; Zorraquín, T. (1996). *Cuadernillo de Actualización Técnica N° 56*. Area de comunicaciones AACREA 10: 87-89.

Atherton Akaff, P.J.; Sloan, J.A. (1998). "Design and Analysis of Equivalence Clinical Trials Via the SAS System. Statistics, Data Analysis, and Modeling". *SUGI 23 Conference Leaders Contents*. Proceedings of the Twenty-Third Annual, Opryland Hotel Nashville, Tennessee.

Beserra Almeida, M.M.; Campos Arriaga, A.M.; Lima dos Santos, A.K.; Lemos, T.L.G.; Braz-Filho, R.; Curcino Vieira, I.J. (2007). "Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década". *Química Nova* 30 (4). São Paulo: 935-951. ISSN 0100-4042. doi: 10.1590/S0100-40422007000400033. [Consulta: 24 de enero de 2011]

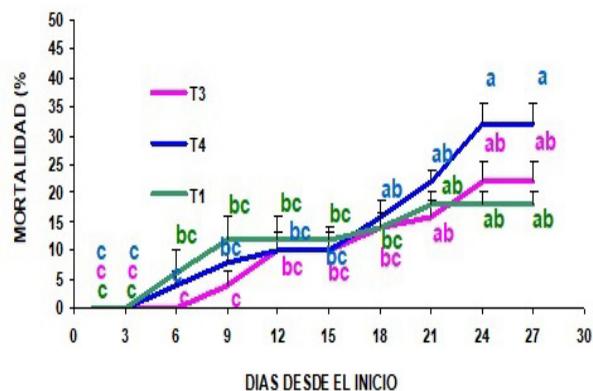
Casini, C.; Santa Juliana, M. (2005). "Postcosecha de trigo. Secado y almacenaje". *Jornadas técnicas de capacitación, en siembra, cosecha, postcosecha, pulverización y fertilización*. INTA, Manfredi, Pcia. de Córdoba, pp. 55-70.

Daido, M.; Ohmo, N.; Imamura, K.; Fukamiya, N.; Hatakashi, M.; Yamazaki, H.; Tagaharo, K.; Lie, K.; Okano, M. (1995). "Antifeedant and insecticidal activity of quassinoids against the diamond backmoth (*Plutella xylostella*) and structure activity relationships". *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59: 974-979.

Dal Bello, G.; Padín, S. (2006). "Olfatómetro simple para evaluar la actividad biológica de aleloquímicos vegetales en *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae)". *Agrociencia* 10(2): 23-26.

Davidson, R.H.; Lyon, W.F. (1992). *Plagas de insectos agrícolas y del jardín*. Limusa-Noriega, México, D. F. 743 pp.

Figura 6.- Mortalidad promedio producida por los cuasinoídes de *Picrasma crenata* sobre adultos de *Tribolium castaneum* por ingesta a través del tiempo



Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. ANOVA 2 vías (tratamiento x tiempo) ($F = 4,8$; $p = 0,0099$)

Dierksmeier Corcuera, G. (2007). "Características y mecanismos de acción de algunos compuestos usados en el combate de plagas de almacén". *Fitosanidad* 11 (2): 81-84.

Diletti, E.; Hauschke, D.; Steinijans, V.W. (1991). "Sample size determination for bioequivalence assessment by means of confidence intervals". *International Journal of clinical pharmacology, therapy and toxicology* 29: 1-8.

FAO (2001). *Breves normas de control de calidad en granos almacenados*. Farmacopea Nacional Argentina, VII Edición (2003). Ministerio de Salud de la Nación.

Garrett, K.A. (1997). "Use of Statistical Tests of Equivalence (Bioequivalence Tests)". *Plant Pathology* 87 (4): 372-374.

Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R., Walker, L., Sindelar, R. (2005). "Biologically Active Quassinoids and Their Chemistry: Potential Leads for Drug Design". *Current Medicinal Chemistry* 12 (2): 173-190.

Koike, K.; Yokoh, M.; Furukawa, M.; Ishii, S.; Ohmoto, T. (1995). "Quassinoids from *Picrasma javanica*". *Phytochemistry* 40 (1): 233-238.

Lagunes, A.; Vazquez Navarro, M. (1994). *El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas*. Centro de Entomología y Acarología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Edo. 159 pp.

Leskinen, V.; Polonsky, J.; Bhatnagar, S. (1984). "Antifeedant activity of quassinoids". *Journal Chemical Ecology* 10 (10): 1497-1507.

Lu, J.; Shi, L. (2012). The bioactivity of essential oil from *Ailanthus altissima* Swing (Sapindales: Simaroubaceae) Bark on *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae). *Advanced material Research* 365: 428-432.

Mambelli, P.; Marchini, B.; Bazzocchi, C.; Pari, P.; Tellarini, S. (1994). "El Valutazioni preliminari sull'ottimizzazione delle modalità d'uso del legno quassio (*Quassia amara* L.; *Picrasma excelsa* (Swz.) Lindl. Quale insecticida biológico". El Atti Convegno Internazionale: *Coltivazione e miglioramento di piante officinali*, Pari Ministero Agricoltura e Foresta. Trento, Italia, 2-3.

Marinoni, R.C.; Ribeiro-Costa, C.S. (2001). "Influence of temperature and diet on the development of *Ulomoides dermestoides*

- (Fairmaire, 1893) (Coleoptera, Tenebrionidae, Diaperinae)". *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44 (2): 129-134.
- Miller, L.C.; Tainter, M.L. (1944). "Estimation of DL 50 and its error by means of logarithmic-Probit graph paper". *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 57 (2) 261-264 <https://doi.org/10.3181/00379727-57-14776>.
- Nerio, L.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. (2009). "Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grow in Colombia against *Sitophilus zeamais* Mostschulsky (Coleoptera)". *Journal of Stored Products Research* 45: 212-214.
- Rees, D. (2004). *Insects of Stored products*. CSIRO. Australia.
- Riudavets, J.; Lucas, E.; Pons, M. (2002). *Insects and mites of stored products in the northeast of Spain*. International Organization for Biological and Integrated Control West Palearctic Regional Section, 25: 41-44.
- Robin, R.J.; Rhodes, M.J.C. (1984). "High performance liquid chromatography methods for the analysis and purification of quassinoids from *Quassia amara* L.". *Journal of Chromatography* 283: 436-440.
- Rosella, M.A.; Mandrile, E.L.; Bongiorno De Pfrter, G. (1991). "Nueva Farmacognosia de las 'Cuasias' (Simaroubaceae)". *Revista Farmacéutica* 133 (1): 19-28.
- Silva, G.; Hepp, R. (2003). *Bases para el manejo racional de insecticidas*. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Fundación para la Innovación Agraria, Chillán, Chile.
- 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.
- Speight, M.; Hunter, M.; Watt, D. (2008). *Ecology of Insects. Concepts and Applications*. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, Second Edition: 628.
- Stoll G. (1989). *Protección natural de cultivos en las zonas tropicales*. Editorial Científica Josef Margraf, Alemania Federal: 180.
- Theis, N.; Lerda, M. (2003). "The evolution of function in plant secondary metabolites". *International Journal of Plant Science* 164 (3): 93-102.
- Vitagliano, J. C.; Comin, J. (1971). "Quassinoids from *Aeschron creanata*". *Phytochemistry* 11: 807-810.
- Wagner, H.; Blatt, S. (1996). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2^{da} Edición Springer: 384.
- Weil, C. (1952). "Tables for convenient calculation of median effective dose (DL 50 or ED 50) and instructions in their use". *Biometrics* 8: 249-263.
- Winston, P.W.; Bates, D. H. (1960). "Saturated solutions for the control of humidity in biological research". *Ecology* 41: 232-237.
- Woodbury, R.O.; Little Jr, E.L.; Wadsworth, F.H. (1974). "Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands". *Guide of standard floras of the world*. David Frodin. Second Volume. Cambridge: 1107.
- Zuloaga, F.O.; Morrone, O. (1999). *Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina*. Missouri Botanical Garden Press: 1269.