

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesina presentada para obtener el grado académico de LICENCIADO EN
QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE PLANTAS
PROVENIENTES DE
LA REGIÓN SEMIÁRIDA PAMPEANA”

BORREGO MARÍA FERNANDA



PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta universidad ni en otra institución académica. . Se llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Química.de La Facultad de Ciencias Exactas y Naturales durante el período comprendido entre el 3 de junio de 2011 y 17 de mayo de 2012, bajo la dirección de la Dra. Bellozas Reinhard Mónica, y bajo la codirección del Dr.Camiña José Manuel.

Agradecimientos

Este trabajo de tesis representa la culminación de una etapa importante en mi vida, con muchos logros profesionales y cambios a nivel personal. Durante estos años numerosas personas me apoyaron, algunas están conmigo de toda la vida y otras se han ido incorporando en este camino. A todas ellas les debo un sincero agradecimiento.

En primer lugar a mi directora de tesis, consejera y amiga, Mónica; por los valiosos aportes, sugerencias, comentarios y consejos imprescindibles para la realización de este trabajo y por la confianza depositada en mi para llevarlo a cabo. Así como también a mi co- director por los aportes y disponibilidad para alcanzar la realización de esta tesina. Al Dr. Miguel Cantarelli, por contribuciones en el trabajo estadístico. Y obviamente a la Universidad Nacional de la Pampa. Muchas gracias!!

A nivel más personal, y no solo desde el punto de vista académico a mi compañera de trabajo Flor, con la cual comparto muchas horas de mi semana y que hacen del laboratorio no solo un lugar de trabajo, sino que también un sitio de encuentro de amigas. Mil Gracias por toda la ayuda desinteresada que siempre me brindas.

A mí querida familia, por la contención, el apoyo de siempre por el amor incondicional. A mi hermano, por la increíble personita que es, y que a pesar de los kilómetros que nos han separado, estuvo siempre presente cada vez que lo necesité. A Gabi, por acompañar y cuidar a Cris.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos de la Pampa Micka, Gise, Vico, Mati, Emi, Magui y Yani. A mis viejas amistades de Daireux que aún persisten con el tiempo y las distancias May, Ro, Mary, Marita, Vir, Mary, Damian y Belu que han estado en cada momento importante de mi vida. Gracias por el sostén cuando fue necesario, por las largas charlas y los consejos sinceros. Son indispensables en mi vida. Amigos míos, los quiero con toda el alma.

17/5/2012

Departamento de Química

María Fernanda Borrego

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

RESUMEN

El descubrimiento de nuevos productos naturales para el control de plagas a través de la búsqueda de extractos vegetales con efectos biológicos sobre especies perjudiciales, han tenido en los últimos años un notable incremento debido a la resistencia que las mismas presentan hacia algunos insecticidas químicos convencionales. Por otra parte, la tendencia actual, es encontrar principios activos más selectivos, menos nocivos al ambiente y que produzcan bajos niveles de residuos en los productos agrícolas.

En este trabajo se evaluó el efecto repelente de cinco especies botánicas *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulata*, *Urtica ureas*, *Clematis montevidensis* y *Euphorbia dentata* obtenidos en la región semiárida pampeana, a partir de extractos crudos provenientes de hexano y etanol-cloroformo. A los fines, de evaluar el efecto repelente de los diferentes extractos, se prepararon soluciones de concentración de 10 mg mL⁻¹, realizándose ensayos biológicos sobre adultos de la especie *Tribolium castaneum* Herbst.

Siguiendo el método propuesto por Talukder & Howse modificado, se determinó al cabo de las 5 horas de ensayo el porcentaje de repelencia (PR), el cual fue corroborado mediante las pruebas estadísticas Chi², *t* y ANOVA.

La evaluación de los extractos vegetales provenientes de hexano mostró un marcado efecto repelente respecto a los obtenidos de etanol-cloroformo. Entre los extractos analizados, el que evidenció mayor PR fue el hexánico de las especies *Clematis montevidensis* (60,95%), seguido de *Ambrosia tenuifolia* (49,14%); quedando en un tercer lugar *Baccharis articulata* (43,26%) proveniente del extracto etanol-cloroformo.

SUMMARY

The discovery of new natural products for pest control, through the search for plant extracts with biological effects on harmful species, have had in recent years a notable increase due to the resistance that these species present to several conventional chemical insecticides. Moreover, the current trend is to find active compounds more selective, less damaging to the environment and with low levels of residues in agricultural products.

In this work, was evaluated the repellent effect of crude extracts from ethanol-chloroform and hexane, from five botanical species: *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulata*, *Urtica ureas*, *Euphorbia dentate* and *Clematis montevidensis*, which were sampled from semi-arid Pampean region. For the assessing of the repellent effect in the different extracts, were prepared solutions of concentration 10 mg mL⁻¹, by bioassays on adults *Tribolium castaneum* Herbst.

Following the method modified proposed by Talukder & Howse, was obtained the repellency percentage (RP) after 5 hours of testing, which were evaluated by statistical tests: Chi², *t* and ANOVA.

Plant extracts from hexane showed a marked repellent effect over those that were obtained from ethanol-chloroform. Among the extracts in hexane tested, the higher values of RP were obtained for *Clematis montevidensis* (60.95%) and *Ambrosia tenuifolia* (49.14%), while the best RP for ethanol-chloroform extract was obtained for *Baccharis articulata* (43.26%).

1. Introducción	1
1.1 Plaguicidas Botánicos	1
1.2 Historia	2
1.3 Ensayo biológico	4
1.4 Insectos	5
1.4.1 Insectos en estudio <i>Tribolium castaneum</i>	7
1.4.2 Clasificación de <i>Tribolium castaneum</i>	7
1.4.3 Distribución geográfica e importancia económica	8
1.4.4 Descripción morfológica	8
1.5 Especies vegetales en estudio	10
1.5.1 <i>Baccharis articulata</i>	10
1.5.1.1 Clasificación Taxonómica	10
1.5.1.2 Descripción botánica	10
1.5.1.3 Consideraciones generales	11
1.5.1.4 Distribución	11
1.5.2 <i>Euphorbia dentata</i>	11
1.5.2.1 Clasificación Taxonómica	11
1.5.2.2 Descripción botánica	12
1.5.2.3 Consideraciones generales	13
1.5.2.4 Distribución	13
1.5.3 <i>Ambrosia tenuifolia</i>	13
1.5.3.1 Clasificación Taxonómica	13
1.5.3.2 Descripción botánica	14
1.5.3.3 Consideraciones generales	15
1.5.3.4 Distribución	15
1.5.4 <i>Urtica ureas</i>	15
1.5.4.1 Clasificación Taxonómica	15
1.5.4.2 Descripción botánica	16
1.5.4.3 Consideraciones generales	16
1.5.4.4 Distribución	17
1.5.5 <i>Clematis montevidensis</i>	17
1.5.5.1 Clasificación Taxonómica	17

1.5.5.2 Descripción botánica	18
1.5.5.3 Consideraciones generales	18
1.5.5.4 Distribución	19
1.6 Insecticidas comportamentales: Repelencia	19
2. Objetivos e hipótesis	22
2.1 Objetivos	22
2.2 Hipótesis	22
3. Materiales y métodos	23
3.1 Muestreo	23
3.2 Material vegetal	23
3.2.1 Recolección de las especies vegetales	23
3.2.2 Reactivos	24
3.2.3 Preparación de extractos crudos de las especies vegetales	25
3.2.4 Reconocimiento de terpenoides. Ensayo de Liebermann-Buchard	25
3.2.5 Soluciones para los bioensayos	25
3.3 Insectos	26
3.3.1 Material biológico	26
3.3.2 Bioensayos de actividad repelente sobre <i>Tribolium castaneum</i> Herbst	26
3.4 Tratamiento de datos	26
4. Resultados y discusión	29
4.1 Resultados	29
4.1.1 Muestreo	29
4.1.2 Rendimiento: extracción	29
4.1.3 Estudio de comparación de especies vegetales con solvente de extracción hexano por calculo de IR , y calculo de χ^2	30

4.1.4 Estudio de comparación de especies vegetales con solvente de extracción etanol-cloroformo por calculo de IR , y calculo de χ^2	31
4.1.5 Prueba “T-Student”, para comparación de solventes de extracción de las distintas especies vegetales a la hora 5 del bioensayo	33
4.1.6 Efecto del tiempo de aplicación en los solventes de extracción para cada especie vegetal	33
4.1.6.1 Efecto del tiempo de aplicación sobre <i>Baccharis articulata</i>	33
4.1.6.2 Efecto del tiempo de aplicación sobre <i>Ambrosia tenuifolia</i>	34
4.1.6.3 Efecto del tiempo de aplicación sobre <i>Euphorbia dentata</i>	35
4.1.6.4 Efecto del tiempo de aplicación sobre <i>Urtica urens</i>	36
4.1.6.5 Efecto del tiempo de aplicación sobre <i>Clematis montevidensis</i>	36
4.1.7 Ensayos estadísticos ANOVA para hexano	37
4.1.8 Ensayo de ANOVA para Etanol-cloroformo	38
4.1.9 Ensayo de ANOVA total	39
4.1.10 Ensayo para determinación de terpenoides en extractos	40
4.2 Discusión	40

5. Conclusiones	43
5.1 Del efecto del solvente en el extracto	43
5.2 De las propiedades repelentes de los extractos de las especies vegetales estudiadas	43
5.3 Del tiempo de exposición de los repelentes	44
5.4 De los porcentajes de repelencia y ensayos estadísticos	44
6. Bibliografía	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plaguicidas Botánicos

Durante las últimas cinco décadas, los insecticidas sintéticos han sido las sustancias más utilizadas para el control de organismos perjudiciales. El uso extensivo e indiscriminado de estos compuestos ha ocasionado contaminación del suelo y agua, motivando efectos tóxicos sobre organismos benéficos, personas y otros vertebrados, y generando el desarrollo de resistencia en los insectos que se pretendía controlar. Debido a esto, se inició la búsqueda de nuevos insecticidas que sean compatibles con el ambiente, así como de producción más económica (Rossetti, 2008).

La necesidad de encontrar nuevas moléculas y nuevos sitios de acción, ha motivado el desarrollo de la investigación en el control de plagas hacia sustancias activas, provenientes de productos naturales o de metabolitos secundarios de extractos vegetales. La evaluación y el uso botánico de plaguicidas, ya sea como extractos crudos o formulados, constituyen una estrategia alternativa, amistosa para el ambiente, en el control de organismos no benéficos.

Los extractos crudos son mezclas complejas de constituyentes que individualmente o en conjunto, pueden mostrar distintas propiedades en el control de plagas, las cuales pueden incluir toxicidad, repelencia, ovicida, efecto antioviposición, antialimentario, etc (Ho, 1996; Sarac, 1995).

Los plaguicidas de origen vegetal tienden a tener una actividad de amplio espectro, fáciles de procesar y de utilizar. Además, dado que en la mayoría de los casos son seguros para los animales superiores y el medio ambiente, su estudio e investigación se ha visto incrementada debido a la búsqueda de nuevas sustancias activas y nuevos sitios de acción en el control de plagas, provenientes de productos naturales o de metabolitos secundarios de extractos vegetales (Viglianco, 2008).

1.2 Historia

Los compuestos botánicos constituyen una antigua alternativa para el control de insectos, ya que las plantas han sido desde la antigüedad, un recurso al alcance del ser humano para tales fines. Estas fueron veneradas por las virtudes que se les había reconocido y transmitidas de generación en generación, sin saber porqué o como actuaban, atribuidas a hechos incontestables y de origen mágico o misterioso.

El surgimiento de la utilización de las plantas como fuente de insecticidas naturales tuvo su origen en simples observaciones empíricas, dado que se comprobó que ciertos vegetales se protegían mejor que otros frente al ataque de insectos.

Esta capacidad que poseen las plantas para defenderse frente a insectos perjudiciales, es el resultado de años de evolución, a través de los cuales desarrollaron la capacidad de producir una diversidad de compuestos con funciones diferentes, que han desempeñado un papel muy importante en la interacción entre los diversos organismos dentro de los ecosistemas.

Existen diversas sustancias producidas por las plantas que generan distintos efectos sobre otros organismos, las cuales son conocidas bajo el nombre de aleloquímicas, que según su modo de acción pueden clasificarse como sustancias defensivas, tóxicas, repelentes, disuasorias o atrayentes (Cox, 2002). Se puede afirmar entonces, que las plantas actúan como laboratorios naturales donde se sintetizan una infinidad de productos, constituyendo una fuente inagotable de sustancias químicas que podrían ser la base del surgimiento de nuevas moléculas insecticidas altamente selectivas, de baja persistencia en el ambiente y con menor posibilidad de generar fenómenos de resistencia. Esto último, se debe a que las moléculas de origen vegetal presentan una enorme diversidad estructural, lo cual le confiere nuevos sitios de acción en comparación a los insecticidas sintéticos (García, 2004; Isman & Akhtar, 2007).

Los productos de origen botánico que han ido surgiendo hasta nuestros días, ofrecen un abanico de opciones interesantes, dentro de los cuales es importante mencionar: el extracto de tabaco, la rotenona y el polvo de piretro. Estos extractos naturales que han surgido durante los siglos XVII y XIX, dieron lugar a una extensa historia y prácticas culturales si se los compara frente a los insecticidas de origen sintético.

Haciendo una breve descripción de los mismos, podemos comenzar cronológicamente por la *nicotina*, que es un alcaloide obtenido por maceración del tabaco (*Nicotiana tabacum* Fam. Solanaceae). Sus propiedades insecticidas fueron reconocidas en la primera mitad del siglo XVI. Este compuesto no se encuentra en la planta en forma libre, sino que formando maleatos y citratos. La nicotina es básicamente un insecticida de contacto no persistente. Hoy en día se encuentran en el mercado un grupo de insecticidas conocidos como neonicotinoides, que son copias sintéticas o derivadas de la estructura de la nicotina como por ejemplo imidacloprid, thiacloprid, nitempiram, acetamiprid y thiamethoxam entre otros.

El piretro es una oleoresina extraída de las flores secas de *Tanacetum sp* y *Chrysanthemum sp.* (Asterelaceae), donde se encuentran los principios activos de la planta que dieron origen a los piretroides sintéticos, quienes dominan actualmente el mercado, acaparando el 80% de las ventas, debido a que poseen amplio espectro de actividad, rápido efecto, excelente degradabilidad y baja toxicidad para mamíferos (Casida & Quistad, 1995).

La rotenona es un isoflavonoide presente en las raíces de *Lonchocarpus sp.* y *Derris sp.* (Favaceae) que ha sido utilizada como insecticida desde hace más de 150 años.

El neem, obtenido de las semillas de *Azadirachta indica* (Meliaceae) es un compuesto utilizado en la India desde hace más de 4.000 años para combatir insectos plaga de grano almacenado. El extracto obtenido de dichas semillas contiene triterpenoides, de los cuales el más importante es la azadiractina, un tetranortriterpenoide (Jones et al., 1989).

Sin embargo, recientemente se han documentado fenómenos de resistencia a los piretroides sintéticos, sumado a ello la utilización del neem se ha visto limitada debido a su elevado costo (Tabla 1) y su baja eficiencia frente a insectos (Caballero García, 2004; Regnault-Roger et al, 2004; Correa et al., 2006; Isman, 2006; Soares Correa et al., 2008; dos Santos Veloso et al., 2008). Es por ello que la búsqueda de nuevos compuestos vegetales para controlar insectos plaga es incesante.

Tabla 1. Propiedades de los insecticidas de origen vegetal utilizados en los EE.UU

Propiedad	Piretro	Rotenona	Neem	Aceites esenciales
País de origen	Kenia, Australia	Sudeste asiático, Venezuela	India	Todo el mundo
Materias activas	Piretrinas (ésteres)	Rotenoides (isoflavonoides)	Azadiractina (limonoides)	Monoterpenos
Precio aprox. (dólares/Kilo)	45-60	3-5	125-200	10-25
Formulaciones	Numerosas	Polvo, polvo mojable	Concentrados emulsionables	Numerosas
Situación reglamentaria	Homologado	Homologado	Homologado	Exento Tóxico,
Acción frente a las plagas	Contacto Knock- down	Tóxico por ingestión	Tóxico (ingest.) antialimentario	antialimentario, repelente
Persistencia	Muy limitada	Limitada Moderada,	Muy limitada	Muy limitada
Toxicidad para mamíferos	Mínima	Muy tóxica para el hombre	No tóxico	No tóxico

Modificada de Regnault-Roger *et al.* (2004).

1.3 Ensayo biológico

Los bioensayos son herramientas ampliamente utilizadas, para el estudio del efecto y destino de los agentes tóxicos. Estas pruebas de toxicidad permiten realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos o físicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones concentración-respuesta bajo condiciones controladas en terreno o en laboratorio.

Al implementar bioensayos y pruebas de toxicidad es necesario efectuar su estandarización, que consiste en establecer la sensibilidad de las especies y la reproducibilidad del experimento frente a un tóxico de referencia. Lo dicho anteriormente es útil para asegurarse que la respuesta de la población expuesta a cierto agente tóxico, se deba al efecto de éste y no a variaciones de la sensibilidad de los organismos (Jeannette et al., 2003).

Los bioensayos han resultado ser una buena herramienta para la evaluación de extractos naturales, por lo que se han diseñado diferentes ensayos biológicos, con el objetivo de poder probar la actividad de compuestos secundarios generados por las plantas.

El uso de insectos en diversas etapas de desarrollo y la evaluación de susceptibilidad de los mismos, ha permitido mediante estos ensayos la identificación de distintos productos naturales, proporcionando información sobre la repelencia, toxicidad por contacto, la perturbación de la oviposición, y los efectos de largo alcance.

Los avances en técnicas de bioensayos, han llevado a la evaluación del efecto repelente en extractos de más de 2000 especies vegetales. Si bien pocos de estos extractos naturales han alcanzado la categoría de insecticidas comerciales, es muy amplia la necesidad de reducir el uso de insecticidas sintéticos debido al impacto que los mismos generan. De allí radica la importancia de la aplicación de los bioensayos en pos de nuevas alternativas para el futuro, que estén relacionadas con un menor impacto, no solo a nivel ecológico, sino también del usuario (Alonso- Amelot, 1994).

Entre otras, se destaca la utilización en bioensayos de la especie *Tribolium castaneum* debido a que es una plaga agrícola de importancia primaria, con una creciente resistencia a los insecticidas sintéticos. Este escarabajo ha mostrado susceptibilidad a una serie de productos químicos derivados de plantas. Por lo tanto, resulta factible utilizar *Tribolium castaneum* para comprobar futuros plaguicidas de importancia ecológica y económica (Alonso- Amelot et al., 1994).

1.4 Insectos

Las primeras interacciones del hombre con los insectos fueron tan ambiguas como las mantenidas en la actualidad. Así, muchos de estos organismos resultan beneficiosos, en tanto que otros son destructivos y pueden causar severos daños a la salud del hombre, a sus animales domésticos, a los cultivos y a los productos que produce y almacena. Con relación a esto último, existe una situación ineludible en la que el hombre y los insectos están condenados a compartir hábitats y recursos. Por este motivo, la aparición de fenómenos de competencia interespecifica es algo inevitable, a pesar de los notables avances tecnológicos. El enfrentamiento entre el hombre y las plagas continúa vigente, a juzgar por las graves pérdidas que los insectos ocasionan a los alimentos almacenados. (De los Mozos Pascual, 1997).

Los insectos-plaga de granos almacenados comenzaron a ser importantes cuando el hombre, hace más de 10.000 años, comenzó a almacenar sus cosechas para utilizarlas posteriormente como alimento o como semillas para sus cultivos.

De la antigua civilización egipcia, ha llegado hasta nuestros días un legado de pruebas escritas sobre el almacenamiento de granos y otros alimentos, así como de las primeras medidas de control. El almacenamiento para períodos de escasez, fue una práctica común que se hizo extensiva hace aproximadamente 4.500 años, y desde entonces, se tiene conocimiento de la utilización de construcciones de gran capacidad para este propósito (Levinson & Levinson, 1994). En la actualidad, deben cumplirse tres requisitos básicos para evitar la proliferación de los insectos en el almacenaje. El grano se debe guardar, seco, sano y limpio. Para esto, la consigna básica y válida para todo tipo de almacenamiento es la de mantener los granos vivos con el menor daño posible. Cuando los granos se guardan sin alteraciones físicas y fisiológicas, mantienen todos los sistemas propios de autodefensa y se conservan mejor durante el almacenamiento (Casini & Santa Juliana, 2005). Si estas condiciones no se cumplen, se produce la infestación de los granos por los insectos. Esto genera un impacto negativo que se traduce en importantes daños y pérdidas económicas. Existen unas 1.000 especies de insectos que infestan los productos almacenados (De los Mozos Pascual, 1997). Tradicionalmente, a estas especies se las suele clasificar en plagas primarias o secundarias en base al daño producido sobre el grano (Dell'Orto Trivelli & Arias Velázquez, 1985). Si bien esta clasificación se mantiene, esto conlleva a un análisis más profundo, que permite agrupar a las especies en base a las diferentes estrategias de alimentación y en términos generales, se habla de un único grupo denominado “commodity feeders”. Es importante tener en cuenta que cada especie plaga requiere su propio “nivel de daño”, encontrándose en un extremo las que claramente cumplen el rol de plagas primarias y se alimentan de granos enteros y en el otro, las secundarias que poseen un espectro de alimentación más amplio. Por lo tanto, algunas plagas secundarias se alimentan de granos parcialmente dañados, debido al ataque previo de las plagas primarias o debido a daños mecánicos ocasionados durante la cosecha, transporte, limpieza y secado de los granos. Otras, tienen preferencia por las harinas, que podría considerarse el caso más extremo de daño en el grano y finalmente existen algunas especies que atacan preferentemente cereales, fideos, chocolates o alimentos para mascotas (Rees, 2004).

Las plagas primarias, están representadas por insectos altamente especializados con capacidad de perforar la testa de las semillas. Dentro de este grupo encontramos a coleópteros de las familias Curculionidae (*Sitophilus granarius*; *S. oryzae*; *S. zeamais*, y

Prostephanus truncatus) Bostrichidae (*Rhyzopertha dominica*) y lepidópteros de la familia Gelechiidae (*Sitotroga cerealella*).

Las plagas secundarias en cambio, son insectos poco especializados que atacan un amplio rango de productos almacenados, procesados y manufacturados. Dentro de éstas se encuentran coleópteros de las familias Cucujidae (*Cryptolestes ferrugineus*, *C. pusillus* y *Oryzaephilus surinamensis*) y Tenebrionidae (*Tribolium castaneum*).

La presencia de insectos en los granos constituye un serio problema al momento de su comercialización, los insectos pueden entrar en los sitios de almacenaje temporario e incluso infestar productos que se encuentran al final de la cadena de comercialización, como fideos, arroz, harinas, cereales y chocolates. Durante el empaque de los granos, se utilizan repelentes químicos para prevenir el ataque de insectos; el metil salicilato y el DEET son los más utilizadas en los sitios de empaque (Hou et al., 2004). Por lo que los gobiernos sancionan leyes que regulan su control a los fines de importación. En Argentina, la legislación establece el rechazo de toda mercadería con un solo insecto y/o ácaro vivo en cualquier etapa de la comercialización, cuya normativa se encuentra en la Resolución N°1975/94 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos.

1.4.1 Insectos en estudio Tribolium castaneum

El género *Tribolium* comprende 30 especies, cinco de ellas se encuentran en asociación con los productos almacenados, siendo *T. castaneum* la plaga más importante a nivel mundial (Rees, 2004).

1.4.2 Clasificación de Tribolium castaneum

Phylum Arthropoda

Clase Insecta

Orden Coleoptera

Suborden Polyphaga

Serie Cucujiformia

Superfamilia Cucujoidea

Familia Tenebrionidae

Género Tribolium

Especie *Tribolium castaneum* Herbst

1.4.3 Distribución geográfica e importancia económica.

Tribolium castaneum es una especie cosmopolita, se desarrolla en climas templados y mediterráneos aunque es dominante en climas cálidos, siendo los fríos los menos favorables. Se trata de una de las especies que se encuentran con mayor frecuencia en los productos almacenados. Ataca virtualmente cualquier tipo de producto seco de origen animal o vegetal, siendo especialmente importante como plaga de cereales y granos. Es considerada una plaga secundaria ya que, tanto las larvas como los adultos, se alimentan de grano partido. La infestación puede dejar un olor persistente y desagradable en el grano debido a la secreción de benzoquinonas liberadas desde glándulas abdominales (Rees, 2004).

1.4.4 Descripción morfológica.

- Adultos: presentan una coloración marrón rojiza y miden entre 2.6 y 4.4 mm (Fig. 1) Posee los últimos tres segmentos antenales de mayor tamaño que los anteriores. En una vista lateral de la región cefálica, se puede observar claramente una carena que divide el ojo en dos facetas. Ventralmente la distancia entre ambos ojos es relativamente estrecha y puede observarse un proceso en forma de hacha entre el primer par de patas. Dorsalmente, el tórax presenta pequeños hoyos en la región central del pronoto (Rees, 2004).



Figura 1: Adulto de *T. castaneum*.

- Huevos: pequeños y alargados, de color blanquecino, recién ovipuestos están cubiertos de una capa viscosa que les sirve para adherirse a las superficies facilitando la infestación (Dell'Orto Trivelli & Arias Velázquez, 1985)
- Larva: pequeña, delgada, cilíndrica mide entre 5 y 10 mm de longitud, de color blanco amarillo pálido y cabeza rojiza (Fig. 2).



Figura 2: Larva de *T. castaneum*.

- Pupa: de color blanco al comienzo de la fase, gradualmente se torna color amarillo (Fig. 3) y antes de emerger el adulto se torna de coloración castaño rojiza (Metcalf & Flint, 1974).



Figura 3: Pupa de *T. castaneum*

- Ciclo de vida: La hembra puede depositar más de 1.000 huevos durante su vida adulta. Las larvas se alimentan del producto almacenado e incluso de otros insectos pequeños. El canibalismo es muy común tanto en larvas como en adultos. La larva se desarrolla completamente en unos 25 días aproximadamente. Los estados de huevo y pupa son cortos, pasando más del 60% del ciclo en estado larval. El adulto puede vivir por dos o tres años si se dan las condiciones adecuadas. Se multiplica

en un rango de temperaturas que va de 22 a 40 °C y una humedad relativa (HR) no inferior al 1 %. En condiciones óptimas de temperatura y humedad (35 a 37 °C y 70% HR) el ciclo se completa en 20 días. Esta es la tasa de reproducción más rápida alcanzada por una plaga de grano almacenado.

1.5 Especies vegetales en estudio

1.5.1 *Baccharis articulata*

1.5.1.1 Clasificación Taxonómica

Reino Plantae

División Fanerógama Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Asterales

Familia Asteraceae

Subfamilia Asteroideae

Tribu Astereae

Género: *Baccharis*

Especie: *B. articulata*

1.5.1.2 Descripción botánica

Arbusto perenne dioico ramoso de 0,5-1,5 m de altura (Fig. 4). Tallos provistos de dos alas longitudinales angostas de 0,5-3 mm de latitud. Hojas reducidas a brácteas inconspicuas. Capítulos sésiles, solitarios o dispuestos en glomérulos de 2-6 a su vez ordenados en un racimo simple o un racimo de espigas terminal. Capítulos pistilados con involucre acampanado de 4-5 x 4-5 mm; filarios en 3-4 series, obtusos, los exteriores ovados y los interiores oblongos. Flores numerosas de ápice desigualmente dentado. Capítulos estaminados con involucre acampanado de 3-4 x 4 mm; filarios semejantes a los pistilados. Flores numerosas; estilo con ramas separadas. (Mangiaterra, 2005).

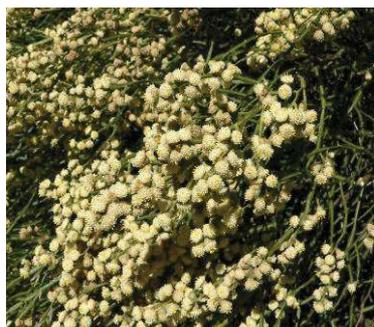


Figura 4 *Baccharis articulata*

1.5.1.3 Consideraciones generales:

El género *Baccharis* L. (Asteraceae: Astereae: Baccharinae) está representado en Argentina por 96 especies, algunas de las cuales son llamadas popularmente “carquejas” y están caracterizadas por sus tallos áfilos o subáfilos, provistos de expansiones caulinares aliformes, las cuales son empleadas con frecuencia en medicina popular en nuestro país. Tienen hoy, importante aplicación en fitomedicina (especialmente en la forma de fitoterápicos) e integran tanto medicamentos magistrales como especialidades farmacéuticas, especialmente en asociación. Son empleadas en uso interno como hepáticas, colagogo-coleréticas y diuréticas, en uso externo especialmente como antisépticas y como vulnerarias en el tratamiento de heridas y úlceras. (Pettenatti, 2007).

1.5.1.4 Distribución

Se halla distribuida en Sudamérica, en el sur de Brasil, Paraguay, Perú y en el nordeste y en el centro de Argentina. En La Pampa es frecuente encontrar esta especie en sectores relictuales de la estepa pampeana y del centro de la Provincia.

1.5.2 Euphorbia dentata

1.5.2.1 Clasificación Taxonómica

Reino Plantae

Subreino Tracheobionta

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Rosidae

Orden Malpighiales

Familia Euphorbiaceae

Subfamilia Euphorbioideae

Tribu Euphorbieae

Subtribu Euphorbiinae

Género *Euphorbia*

Especie *E. dentata*

1.5.2.2 Descripción botánica

Es una especie anual, de ciclo primavera estival (Fig. 5). Posee hipocótilo largo y delgado. Cotiledones simétricos, peciolados. Lámina oval espatulada de consistencia carnosa, con nervio medio poco notable y glabros. Epicótilo breve, casi nulo. Sus primeras hojas son opuestas, atenuadas en el pecíolo. Láminas de color verde medio, de contorno romboidal, con el tercio inferior liso y el superior aserrado, con pequeñas espinitas en cada diente, nervios perceptibles en el haz y en el envés. En cuanto a su segundo par de hojas y siguiente son de características similares a la anterior, pero además presentan pecíolos cortos y estípulas triangulares y glabras. En cuanto al hábito de crecimiento que posee es erecto. (Rodríguez et al., 1992)



Figura 5: *Euphorbia dentata*

1.5.2.3 Consideraciones generales

Es una planta con látex, con tallos de color marrón rojizo. Comúnmente llamada hierba de la araña, lechosilla, lechillo, pascuarilla, hierba del chicle y macetilla (Argentina). Causa problemas en los cultivos de verano y especialmente en los de soja. Se diferencia del “lecherón” porque las hojas tienen márgenes enteros o irregularmente dentados.

Fue citada por primera vez en la República Argentina por Parodi en 1930, detectada a partir del año 1983, en el Partido de Azul, provincia de Bs. As., localizada en focos aislados en cultivos de soja y actualmente se la encuentra en el 85% del área agrícola, 250.000 has, en densidades que van desde 20 a 200 plantas por m².

En esta zona, la especie *E. dentata* es considerada una especie altamente competitiva y de difícil control debido a la baja eficacia de la mayoría de los tratamientos químicos y la alta dependencia del estado fenológico al momento del control (Juan & Saint-André, 1997; Juan et al., 2000).

1.5.2.4 Distribución

Se presenta en áreas disyuntas en el suroeste de Estados Unidos de Norteamérica y centro y norte de Argentina. En La Pampa, es frecuente en el este y en el norte donde constituye una maleza de los cultivos de verano y se encuentra también en sitios húmedos incultos.

1.5.3 Ambrosia tenuifolia

1.5.3.1 Clasificación Taxonómica

Reino: PlantaeCOPIAS

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Asteridae (unranked) Euasterids II

Orden Asterales

Familia Asteraceae

Subfamilia Asteroideae

Tribu Heliantheae

Subtribu Ambrosiinae

Género: *Ambrosia*

Especie *A. tenuifolia*

1.5.3.2 Descripción botánica

Posee un ciclo perenne de emergencia primaveral (Fig. 6). Especie de hipocótilo cilíndrico, glabro; generalmente color violáceo. Cotiledones con peciolo cortos con láminas oval, glabra, algo engrosada y nervio central perceptible.

Epicótilo cilíndrico; blanquecino; pubescente. Las primeras hojas, tienen pecíolo ancho, lámina pinnatilobada; lóbulos anchos de bordes paralelos, color verde grisáceo; con pelos abundantes dirigidos hacia el ápice. Las segundas hojas y siguientes son alternas de iguales características que las primeras. Posee un hábito de crecimiento en mata. (Rodríguez et al.,1992.)



Figura 6 *Ambrosia tenuifolia*

1.5.3.3 Consideraciones generales

Se halla presente en rastrojos, alfalfares viejos, campos de pastoreo, y puede también aparecer en cultivos. Su ingestión por vacunos ocasiona olor y sabor desagradables en la leche y es sospechosa de ser tóxica. Se multiplica por rizomas, por lo que es frecuente encontrar rebrotes y no plántulas.

Es una especie conocida vulgarmente con los nombres de “ajenjo de campo”, “Altamisa” y “Artemisa”. En la medicina popular es utilizada por sus propiedades farmacológicas como tónico estomacal, antipirético, vermífugo, emenagogo y antitusivo para niños. Se ha comprobado que toda la planta es toxica produciendo dermatitis e irritación gástrica.

1.5.3.4 Distribución

Es nativa de Sudamérica, vive en el sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina, desde el norte a la Patagonia. En La Pampa es frecuente en sitios húmedos, junto a canales de riego y drenaje y en áreas medanosas cerca de lagunas, en toda la Provincia.

1.5.4 Urtica ureas

1.5.4.1 Clasificación Taxonómica

Reino Plantae

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Rosales

Familia Urticaceae

Género *Urtica*

Especie *U. urens*

1.5.4.2 Descripción botánica

Posee un ciclo anual, de emergencia otoño- invernal (Fig. 7). Posee un epicótilo de longitud media, grueso y glabro. Sus cotiledones con pecíolos pilosos, láminas orbiculares con escotadura pequeña en el ápice y nervio central visible. El epicótilo es mediano rollizo, con pelos largos. El tallo es alto y cuadrado crece entre 30 y 40 cm. Sus hojas son opuestas, alargadas, aserradas, con nervaduras salientes, color verde oscuro. Tiene flores blancas y pequeñas, de cáliz tubuloso, que son auxiliares, sésiles, dispuestas en grupos de 14 a 16 y con una coloración oscura en su base. La ortiga menor tiene flores masculinas y femeninas en la misma planta, mientras que la ortiga mayor las tiene en plantas distintas. En cuanto a su hábito de crecimiento es erguida. (Rodríguez, 1992)



Figura 7: *Urtica urens*

1.5.4.3 Consideraciones generales

U. urens L. se la conoce con los nombres comunes de: “ortiga”, “ortiga crespá”, “ortiga chica”, “ortiga negra”, “caá poropé” y “rupá chico” (Marrassini et al., 2010).

Toda la planta se halla recubierta de pelos urticantes, huecos y frágiles que, al contacto con la piel, descargan un líquido que produce un fuerte escozor y sensación de quemadura. Crece de manera silvestre junto a cercas, muros y en matorrales espesos. Requiere suelos fértiles con buena capacidad para retener la humedad, pero bien drenado y en sitios soleados con abundante materia orgánica y nitrógeno, por lo que es una maleza

común en cultivos hortícolas y pasturas. Se reproduce por semillas, las cuales deben ser colocadas a un metro de distancia, de manera que su manejo se facilite, debido a su carácter urticante posee excelentes cualidades como repelente de insectos y de enfermedades. Además de sus propiedades fitoterapéuticas, la ortiga se cocina de igual modo que las espinacas, para su consumo en ensaladas (Beltran et al., 2011).

En América del Sur, tradicionalmente se ha utilizado la infusión de las hojas como diurético, tónico, hipoglucemiante y para el alivio del dolor muscular o de las articulaciones. Se agrega a diferentes preparaciones culinarias y es considerada un alimento nutritivo.

En Europa las raíces de *U. urens* también son utilizadas para el tratamiento de hiperplasia benigna prostática (HBP) Recientemente, se describió que esta especie tendría propiedades quimioprotectoras contra diversos carcinógenos (Marrassini et al., 2010).

1.5.4.4 Distribución:

Se ha encontrado inicialmente en Europa, pero se ha naturalizado en muchos países del mundo, incluyendo en Argentina donde se a distribuído por todo el territorio (Marzocca, 1976).

1.5.5 Clematis montevidensis

1.5.5.1 Clasificación Taxonómica

Reino Plantae

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Orden Ranunculales

Familia Ranunculaceae

Subfamilia Ranunculoideae

Tribu Anemoneae

Género *Clematis*

Especie *Clematis montevidensis*

1.5.5.2 Descripción botánica

Enredadera leñosa (liana) que puede alcanzar 3-4 m de altura, rizomatosa (Fig. 8). Tallos estriados y a la madurez glabrescentes, castaño-rojizos. Hojas opuestas, imparipinnaticompuestas, (uni-) biyugas, con 3-5 foliíolos ovados a elípticos, generalmente asimétricos de ápice agudo, enteros o desigualmente partidos hasta sectos, glabrescentes o con tricomas esparcidos; pecíolos peciólulos haptotrópicos. Inflorescencias multifloras, con flores actinomorfas, perfectas y unisexuales en la misma inflorescencia. Gineceo con numerosos carpelos libres, estilo muy acrescente. Aquenio lateralmente comprimido, asimétrico, pubescente, acompañado del estilo persistente, largo (hasta 10 cm.) y plumoso. (Petenatti et al, 2005).



Figura 8: *Clematis montevidens*

1.5.5.3 Consideraciones generales

Es una enredadera leñosa (liana) cuyas partes aéreas son usadas en medicina popular en Sudamérica oriental y austral. La planta se halla distribuída ampliamente en Argentina, Bolivia, Uruguay, Paraguay y Brasil.

En Argentina y Uruguay es conocida por los nombres vulgares “barba de viejo”, “bejuco”, “loconte”, “cabello de ángel” y “barba de chivo”.

Es considerada tóxica, actuando como cáustico y vesicante, en el norte del país se le ha atribuido la muerte de vacunos. Desde antiguo se conoce las propiedades irritantes, rubefacientes y vesicantes del follaje de esta planta, cuyo sabor es descripto como “quemante y acre”. La infusión de las hojas ha sido citada para combatir enfermedades de la piel como lepra, sarna, etc. Ha sido mencionado su uso como antirreumática y antivenérea en Paraguay. Los apéndices plumosos de los frutos son citados como hemostáticos; se los aplica en manojos sobre heridas profundas, logrando así detener hemorragias por acción mecánica. También, se emplean las hojas para curar miasis animales. En Paraguay y el norte de la Argentina la especie se emplea también en el tratamiento de afecciones de vías respiratorias, a modo de rapé para resfriados y dolores de cabeza.

Sólo 5 especies del género habitan en la Argentina: *C. bonariensis* Juss. ex DC., *C. campestris* A. St.-Hil., *C. dioica* L. [con dos variedades: var. *australis* Eichler y var. *brasiliensis* (DC.) Eichler], *C. haenkeana* C. Presl. y *C. montevidensis*. Esta última es la de mayor distribución en nuestro país (Pettenatti et al., 2005).

1.5.5.4 Distribución

Se encuentra en todas las provincias argentinas hasta el norte de la Patagonia. También crece espontáneamente en países limítrofes (Bolivia, sur del Perú, Brasil, Paraguay y Uruguay) (Pettenatti et al., 2005)

1.6 Insecticidas comportamentales: Repelencia

Conociendo la biología de los insectos y su comportamiento frente a los distintos estímulos físicos o químicos es que surgen este nuevo grupo de insecticidas, donde un insecto puede cambiar su comportamiento de tal manera que si siente la parencia de un insecticida deje de comer o se va del lugar.

La quimiorrecepción a distancia (olfato) y la de contacto (gusto) constituyen procesos extremadamente importantes en los insectos, debido que generan algunos de los patrones de comportamiento más relevantes, como la búsqueda de alimento, selección de sitios adecuados para la ovoposición, localización de parejas u hospedadores, formación de

castas en los insectos sociales y respuestas a sustancias atrayentes y/o repelentes (Gillott, 2005).

Es así que el comportamiento de los insectos, a diferencia del de los vertebrados, es mucho más dependiente de señales químicas que de cualquier otro tipo de estímulo (visual, táctil o auditivo). Los receptores moleculares del olfato y del gusto se localizan principalmente en antenas, palpos bucales, tarsos y ovopositor y la decisión de alimentarse o no está determinada por estímulos positivos o negativos sobre dichos receptores (Dahanukar et al., 2005).

En la relación planta-insecto, el olfato es el encargado de la recepción a distancia de los estímulos químicos que provocarán la primera respuesta del insecto, atrayéndolo hacia la fuente emisora o repeliéndolo de la misma (Koul & Dhaliwal, 2001). Estas sustancias químicas, emitidas por las plantas y capaces de modificar el comportamiento se denominan aleloquímicos y se agrupan en dos grandes categorías:

- a) las kairomonas son sustancias químicas que al ser liberadas benefician solamente al agente receptor, permitiendo por ejemplo, que el insecto reconozca una planta huésped;
- b) las alomonas, son sustancias que favorecen únicamente al emisor, actuando como repelentes y disuasivos de alimentación u oviposición (Gillott, 2005).

Los repelentes han sido definidos como sustancias químicas que actúan localmente o a distancia, provocando el alejamiento de un insecto de la fuente emisora, previniendo así su alimentación (Dethier et al., 1960; Choochote et al., 2007).

En la agricultura tradicional de África, India y Europa, una práctica común consistía en mezclar material de plantas locales con granos almacenados destinados a la alimentación para reducir la presencia de plagas. Así, hojas de neem o de menta, eran utilizadas en los sitios de almacenamiento para repeler insectos (Van Puyvelde, 1976; Ignatowicz et al., 1994).

Los pequeños productores del sudoeste de Francia tenían la costumbre de colocar plantas aromáticas como menta, ajo o laurel en el interior de los sacos de granos para protegerlos de la infestación (Regnault-Roger & Vincent, 2004).

Durante la Segunda Guerra Mundial, se invirtieron esfuerzos y dinero en la investigación y síntesis de nuevas sustancias químicas repelentes. Así, entre 1952 y 1962

se testearon más de 11.000 compuestos de los cuales sólo unos pocos fueron efectivos contra un amplio rango de insectos (Ryan, 2002). Entre ellos podemos mencionar al DEET (N,N-dietilmeta-toluamida), que aún actualmente sigue siendo el más efectivo y a pesar de sus efectos adversos sobre la salud del hombre, no se ha encontrado aún un sustituto que otorgue el mismo grado de protección y efectividad repelente frente a artrópodos hematófagos (Nerio et al., 2009).

El consumo de repelentes utilizados en los sitios donde se almacenan los granos ha aumentado notablemente en los últimos años. Estos productos se emplean como protectores, evitando que el insecto se acerque al grano, además de prevenir la alimentación y la oviposición (Fields et al., 2001). Generalmente son colocados alrededor de los silos, en los empaques o como preventivos aplicados en las estructuras de almacenaje antes de guardar el grano fresco (Cox, 2004).

El uso intensivo y extensivo de repelentes ha generado serios inconvenientes relacionados con la salud del hombre y del planeta (Nerio et al., 2009). Así, la necesidad de encontrar productos efectivos, persistentes y prácticos de utilizar, ha incrementado el interés por las sustancias repelentes de origen vegetal. En esa búsqueda incesante, se han encontrado aceites esenciales que presentan efecto repelente en plagas del almacenaje. El aceite esencial de *Ocimum kilimandscha ricum* (Lamiaceae) posee actividad repelente en adultos de *Sitophilus granarius*, *S. zeamais* y *T. castaneum* (Obeng-Ofori et al., 1998). En este último insecto también se registró actividad repelente con los aceites de *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae), *Evodia rutaecarpa* (Rutaceae) y *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) (Perez & Pascual-Villalobos, 1999; Liu & Ho, 1999; Ogendo et al., 2008). También se han observado efectos repelentes, de extractos vegetales obtenidos a partir de especies de las familias Solanaceae y Compositae (género *Calendula*), evaluados sobre *T. castaneum* obteniéndose un mayor índice para *C. arvensis* (Pascual-Villalobos, 1998), extractos de semilla de pitra mostraron fuerte efecto repelente sobre el escarabajo rojo de harina (*T. castaneum*) (Talukder & Howse, 1995).

También se han evaluado extractos crudos de *Polystachia Aloysia* (Griseb) *Moldenke* (Verbenaceae) (Hojas), *Solanum Argentinum Bitter et Lillo* (Solanaceae) (hojas) y *Tillandsia recurvate*(L.) L. (Bromeliaceae) observándose entre todas las combinaciones de especies de plantas y solventes probados, un elevado efecto repelente para el extracto de hexano de *Solanum Argentinum*, en comparación a *S. oryzae*. (Viglianco et al., 2008).

2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivos

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad repelente proveniente de extractos crudos extraídos de cinco especies vegetales presentes en la región semiárida pampeana: *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulata*, *Urtica ureas*, *Clematis montevidensis* y *Euphorbia dentata*. Para ello se evaluó el poder repelente de los extractos hexánicos y etanol-clorofórmicos de tales vegetales frente a *Tribolium castaneum* Herbst, especie considerada plaga de granos almacenados.

2.2 Hipótesis

La hipótesis del presente proyecto, es encontrar nuevos principios activos de origen natural para el control de plagas, provenientes de extractos vegetales, que posean buena eficacia, selectividad y bajo impacto ambiental. Con ello, se evitaría el uso de plaguicidas convencionales sintéticos, mucho de los cuales son resistentes por las plagas, y/o son contaminantes ambientales, produciendo efectos secundarios en otras especies consideradas beneficiosas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo

El muestreo se realizó en la región centro de la provincia de La Pampa, recolectándose una importante cantidad de material vegetal. Dado que el material es de origen natural, no se desarrolló un diseño de muestreo específico. Para grandes plantíos, se empleó un muestreo aleatorio simple para seleccionar el material vegetal a analizar.

3.2 Material vegetal

Se utilizaron extractos crudos de las siguientes especies vegetales *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulata*, *Urtica ureas*, *Clematis montevidensis* y *Euphorbia dentata*. La identificación del material vegetal fue realizada por el Ing. Agr. Oscar Martínez, docente de la asignatura Botánica de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa, empleando el herbario que dicha Facultad posee en su sede.

3.2.1 Recolección de las especies vegetales

Ambrosia tenuifolia: la recolección de material fresco se realizó en la ciudad de Santa Rosa (casco urbano) y en el jardín Botánico de la Facultad de Agronomía, UNLPam. en diciembre de 2009. Material herbario correspondiente Dpto. Lihuel Calel, Lihuel Calel, Troiani *et al.* 546, 7-I-70.

Baccharis articulata: la recolección de el material “in situ” de esta especie se realizó en la zona de médanos (ex Selsa) campo de la Facultad de Agronomía, UNLPam., entre marzo y en abril del 2008. Material herbario correspondiente Dpto. Conhelo, Eduardo Castex, Troiani y Steibel 6198, 21-XI-79.

Urtica urens Todo el materiales de esta especie vegetal “ortiga”, fu recolectados en el campo de la Facultad de Agronomía. UNLPam., durante el periodo invernal 2009. Material herbario correspondiente Loc. Mata Redonda. Parque Luro. Dep. Toay. Col. P. Steibel et al N°10780. Fecha 9/X/94.

Clematis montevidensis El material de esta especie botánica, fue recolectado en el campo de la Facultad de Agronomía. UNLPam, durante el periodo invernal 2009.

Euphorbia dentata El material de esta especie, fueron recolectado en el campo de la Facultad de Agronomía. UNLPam., durante el periodo invernal 2009. Material herbario correspondiente Dpto. Capital, Santa Rosa, Facultad de Agronomía, A. Prina 295, 15-III-88.

3.2.2 Reactivos

Tabla 2. Reactivos.

Reactivo	Marca	Grado
Etanol	Dorwil	p.a
Cloroformo	Dorwil y Tejon	p.a
Hexano	Dorwil	p.a
Anhídrido acético	Cicarelli	p.a
Ácido sulfúrico	Cicarelli	p.a

- Material de vidrio: tubos, pipetas, frasco (para la maceración de las distintas plantas), cristalizadores.
- Placas de Petri descartables.
- Papel de filtro.
- Molinillo.

3.2.3 Preparación de extractos crudos de las especies vegetales

El material vegetal fue secado al aire (a la sombra) y luego se molido en un molinillo. Para llevar a cabo la extracción de las muestras vegetales, se realizo una

extracción sólido-líquido, de forma manual, para lo cual se colocaron 20 g de muestra vegetal con el solvente de extracción, por un periodo de tiempo de 72 hs.. Los solventes que se utilizaron fueron primero hexano y a continuación etanol-cloroformo 1:1. Posteriormente se realizó a cada extracto una pre-concentración por evaporación. (Viglianco et al, 2006; 2008).

3.2.4 Reconocimiento de terpenoides. Ensayo de Liebermann – Buchard

Permite reconocer la presencia de triterpenos y/o esteroides, ambos tipos de compuestos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo 8 y la posición C₅-C₆.

Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por las paredes del tubo de ensayo se agregan 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. El ensayo se confirma a través de un cambio rápido de coloración:

1. Rosado-azul muy rápido
2. Verde intenso-visible rápido
3. Verde oscuro- negro-final de la reacción

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. (Aragadvay, 2009)

3.2.5 Soluciones para los bioensayos

Los extractos hexánicos fueron disueltos en hexano, y los extractos provenientes de etanol-cloroformo 1:1 con etanol, a excepción de la *Baccharis articulata* para la cual se usó directamente la mezcla etanol- cloroformo 1:1. Se obtuvieron soluciones de 10 mg mL⁻¹, con las cuales se llevaron a cabo los ensayos biológicos (Viglianco et al., 2008).

3.3 Insectos

3.3.1 Material biológico

Los ejemplares de *Tribolium castaneum* Herbst provinieron de una colonia susceptible del CIPEIN-CITEFA, que se criaron en frascos (tamaño 14 x 10,5 x 30 cm) cerrados con tela de malla fina y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa ($75 \pm 5\%$) y fotoperíodo alternados de 12 horas para permitir su rápida reproducción.

Los insectos fueron alimentados con una mezcla de harina y levadura en una proporción 7:1 (Viglianco et al., 2006).

3.3.2 Bioensayos de actividad repelente sobre *Tribolium castaneum* Herbst

Las pruebas se llevaron a cabo siguiendo el método modificado propuesto por Talukder & Howse (1993). Círculos de papel de filtro de 9 cm de diámetro se marcaron a la mitad, luego se aplicó 1 mL de los extractos de concentración de 10 mg mL^{-1} en una de las mitades, mientras que en la mitad restante se coloca el solvente utilizado en la solución aplicada como testigo. Los círculos se secan al aire hasta evaporación completa del solvente y dispuestos en placas de Petri a las que se les coloca diez insectos, contados en intervalos regulares de una hora durante cinco horas (Fig 10).

3.4 Tratamiento de datos

Los datos son convertidos a porcentaje de repelencia (PR), mediante la fórmula de Talukder & Howse (1995).

$$\text{PR}(\%) = (\text{Nc} - 5) \times 20$$

Nc: corresponde al porcentaje de insectos en la mitad control.

Los valores medios fueron clasificados mediante la siguiente escala (Tabla 3).

Tabla 3. Clases correspondientes en función del (PR)

Clase	Porcentaje de repelencia (%)
0	Mayor a 0,01 a menor a 0,1
1	0,1 a 20
2	20,1 a 40
3	40,1 a 60
4	60,1 a 80
5	80,1 a 100

Por otra parte, se realizó la evaluación estadística de los datos de las pruebas biológicas, que permitieron visualizar con mayor claridad las respuestas obtenidas. Los ensayos estadísticos utilizados fueron ANOVA , prueba “*t*” y Chi ² (Wang et al., 2006; Cosimi et al., 2009).

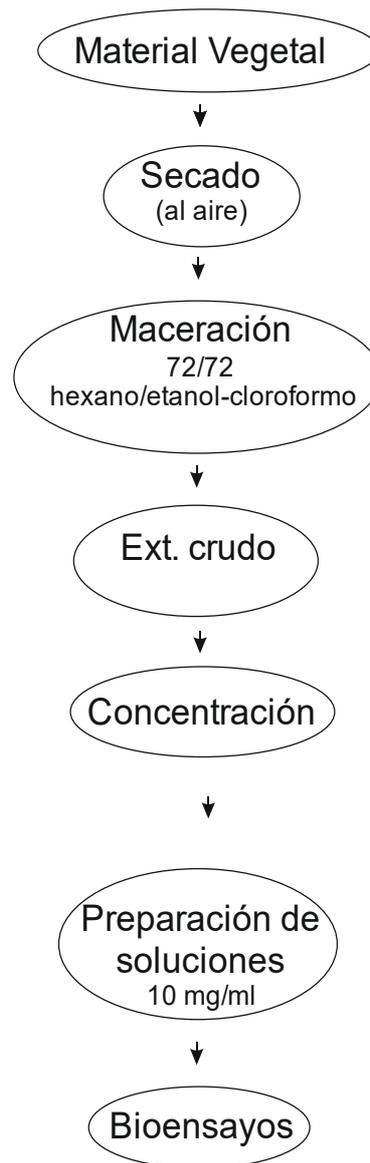


Figura 9: Diagrama del proceso de extracción de los extractos orgánicos de las especies vegetales utilizadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados

4.1.1 Muestreo

El muestreo se realizó en la región centro de la provincia de La Pampa, recolectándose una importante cantidad de material vegetal, llevada a cabo por personal idóneo en el campo de la botánica. En la tabla 4 se puede apreciar las fechas de muestreo realizada para las distintas especies vegetales estudiadas.

Tabla 4 Fechas de recolección para las distintas especies vegetales.

Especies vegetales	Fecha de Recolección
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	2009
<i>Baccharis articulata</i>	2008
<i>Urtica urens</i>	2008
<i>Clematis Montevidensis</i>	2009
<i>Euphorbia dentata</i>	2009

4.1.2 Rendimiento de la extracción

Mediante la aplicación del método de extracción sólido-líquido, explicado en el capítulo 3: Materiales y Métodos, se obtuvo el rendimiento de extracción de especie vegetal finamente molida utilizando como solvente hexano y una mezcla de etanol-cloroformo 1:1. La tabla 5 muestra los rendimientos de extracción obtenidos con hexano y etanol-cloroformo para cada una de las especies vegetales estudiadas.

Tabla 5. Porcentajes de extracción correspondiente a cada especie vegetal.

Especies vegetales	Rendimiento con Hexano (%)	Rendimiento con Etanol Cloroformo (%)
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	0,05	2,45
<i>Baccharis articulata</i>	0,13	7,05
<i>Urtica urens</i>	0,23	0,5
<i>Clematis montevidensis</i>	0,06	0,5
<i>Euphorbia dentata</i>	0,07	2,5

Como se aprecia en la tabla, las mejores extracciones fueron con la mezcla etanol-cloroformo, con rendimientos muy superiores a los obtenidos mediante la utilización de hexano.

4.1.3 Estudio de comparación de especies vegetales con solvente de extracción hexano por cálculo de PR y Chi^2

Los extractos hexánicos de las especies *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulata*, *Urtica urens*, *Clematis montevidensis* y *Euphorbia dentata* también arrojaron valores positivos de repelencia como puede observarse en la tabla 6. A partir de estos índices, se puede observar que el extracto crudo de *Clematis montevidensis* dio el mayor porcentaje de repelencia, ubicándose dentro de una clase 4, evidenciando así el mayor efecto repelente. Las especies *Ambrosia tenuifolia*, *Urtica urens* y *Baccharis articulata* mostraron porcentajes de repelencia (PR) similares (49,14%, 41,90% y 47,80%) respectivamente por lo que se ubican dentro de la clase 3, encontrándose que la especie *Urtica urens* presenta mayor porcentaje de repelencia frente a las otras dos especies. Por último, la especie *Euphorbia dentata* mostró el menor PR arrojando el valor de 1,714; por lo que se la ubica dentro de la clase 1.

Por otra parte, en la tabla 6 se aprecian los valores de Chi^2 calculados para estos ensayos y sus correspondientes valores de Chi^2 críticos. La prueba Chi^2 es utilizada para comprobar si una serie de datos presenta o no una tendencia normal. En todos los casos, se puede observar que los valores calculados superan a los valores críticos, indicando que lo

ensayos no siguen una distribución normal, por lo que el comportamiento de los insectos frente a los extractos no fue aleatorio, sino que hubo una marcada tendencia estadística a alejarse de ellos.

Tabla 6 Valores arrojados de PR y χ^2 para las cinco especies vegetales, correspondiente a solvente de extracción Hexano

Solvente de extracción	Especies vegetales	PR (Porcentaje de repelencia)	Clase	χ^2 (calculado)	χ^2 (Crítico)
Hexano	<i>Ambrosia tenuifolia</i>	49,14	3	53	31,410
	<i>Baccharis articulata</i>	41,90	3	71,6	31,410
	<i>Urtica urens</i>	47,80	3	67,8	31,410
	<i>Clematis montevicensis</i>	60,95	4	73,6	31,410
	<i>Euphorbia dentata</i>	1,714	1	66,6	31,410

La prueba χ^2 demostró que los insectos no se distribuyeron de forma homogénea a ambos lados de la placa, si no que hay una tendencia hacia alguno de los lados de la misma, evidenciado mediante el PR generado por las distintas especies vegetales.

4.1.4 Estudio de comparación de especies vegetales con solvente de extracción etanol-cloroformo por calculo de PR, y calculo de χ^2

Los extractos cloroformo-etanol de las especies *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulata*, *Urtica urens*, *Clematis montevicensis* y *Euphorbia dentata* dieron valores positivos de repelencia, como puede observarse en la tabla 7

Tabla 7. Valores arrojados de PR y χ^2 para las cinco especies vegetales, correspondiente a solvente de extracción etanol- cloroformo.

Solvente de extracción	Especies vegetales	PR (Porcentaje de repelencia)	Clase	χ^2 (calculado)	χ^2 (Crítico)
Etanol cloroformo	<i>Ambrosia tenuifolia</i>	9,51	1	108	43,773
	<i>Baccharis articulata</i>	43,26	3	116,8	43,773
	<i>Urtica urens</i>	40,39	3	103,8	43,773
	<i>Clematis montevidensis</i>	38,68	2	109,2	43,773
	<i>Euphorbia dentata</i>	11,91	1	58,6	31,410

Las clases 1, 2 y 3 hacen referencia a los porcentajes de repelencia (PR) calculados donde si bien no se alcanza una clase 5 que corresponde a porcentaje de repelencia entre 80,1 y 100% , se observa una clase 3 que corresponde a un rango de PR entre 40,1 y 60%.

Se observa del análisis del PR que el extracto crudo de *Baccharis articulata* dio el mayor valor y en un segundo lugar la especie *Urtica urens* con una diferencia de 2,87, quedando ambas especies vegetales dentro de la misma clase 3. Para el caso de la *Clematis montevidensis* con 38,68%, se ubica en una clase 2, mientras las especies restantes *Ambrosia tenuifolia* y *Euphorbia dentata* con PR 9,51% y 11,91% se ubican en una clase 1, demostrando su bajo efecto repelente.

Al igual que los resultados obtenidos previamente con los extractos hexánicos, mediante el análisis del χ^2 para cada especie se pudo observar que en todos los casos, los valores de χ^2 superan el valor del χ^2 crítico ampliamente, lo que indica que los insectos no se distribuyen de forma homogénea en la placa de Petri, sino que hay una clara

tendencia a alejarse de la mitad aplicada con el extracto, generando el efecto repelente evidenciado mediante el PR por las distintas especies vegetales.

4.1.5 Prueba “t de Student” para comparación de solventes de extracción de las distintas especies vegetales a la hora 5 del bioensayo

Se realizó una prueba *t* a fin de evaluar estadísticamente, si alguno de los dos solventes presentó diferencias significativas con respecto al otro en relación a su capacidad repelente. Mediante esta prueba *t*, se comprobó que únicamente para *Ambrosia tenuifolia*, había una diferencia estadística significativa debida al efecto del solvente. El valor de “*t*” obtenido fue superior al crítico: $t_{(\text{calculado})}$ 4,58968294 y de $t_{(\text{critico})}$ 1,85954803, indicando que el efecto repelente de esta especie vegetal es superior cuando se utiliza hexano como solvente de extracción. En relación con las restantes especies, no se hallaron diferencias significativas debido a efecto de solvente.

4.1.6 Efecto del tiempo de aplicación en los solventes de extracción para cada especie vegetal

Se evaluó el comportamiento de los insectos adultos a lo largo del tiempo de aplicación del repelente a fin de observar cual podría ser el óptimo para cada extracto crudo.

4.1.6.1 Efecto del tiempo de aplicación sobre Baccharis articulata

La figura 10 muestra el comportamiento de ambos extractos etanol-clorofomo y hexano para la especie *Baccharis articulata*, en función del tiempo de duración del bioensayo.

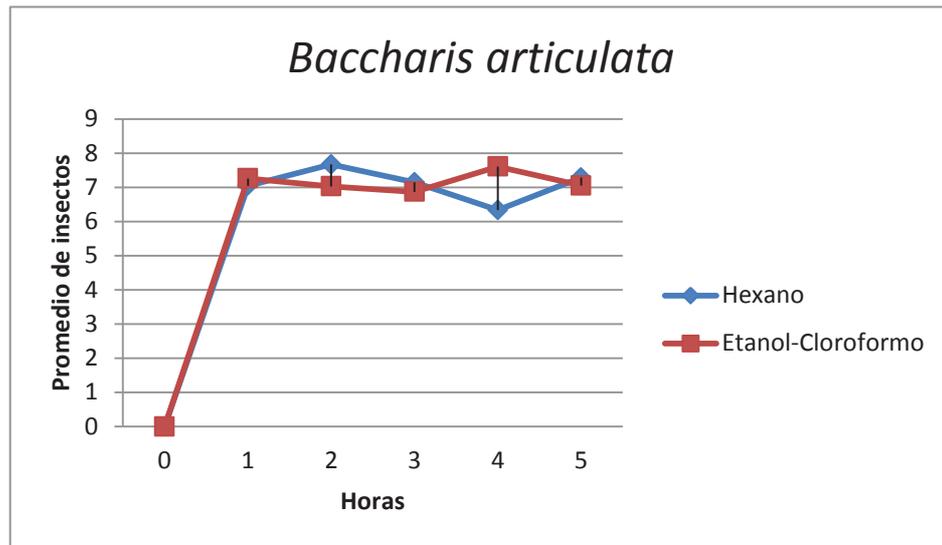


Figura 10. Efecto repelente de extractos de *Baccharis articulata*.

Tal como se aprecia en la figura 10, para ambos solventes se alcanza el valor máximo en la primera hora de tratamiento, por lo que se observa que a partir de cumplida la hora de ensayo, poseen buena actividad repelente. Luego de pasada la hora de tratamiento, el promedio permanece prácticamente constante.

4.1.6.2 Efecto del tiempo de aplicación sobre *Ambrosia tenuifolia*

En la figura 11 se observa el comportamiento de ambos extractos etanol-cloroformo y hexano para la especie *Ambrosia tenuifolia* durante el transcurso del ensayo biológico.

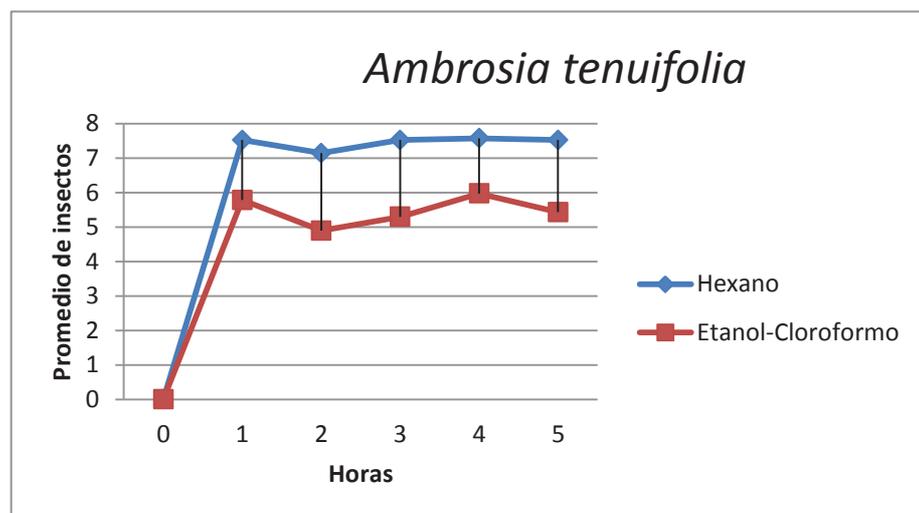


Figura 11. Efecto repelente de extractos de *Ambrosia tenuifolia*

Al igual que en el caso anterior, puede apreciarse valores máximos para los dos solventes a partir de la hora de ensayo. Sin embargo, el efecto repelente de los extractos provenientes de etanol-cloroformo es marcadamente inferior con respecto a los provenientes de hexano, lo cual nos evidencia un mejor efecto repelente para el caso del extracto crudo proveniente de este solvente. Este resultado está en concordancia con la prueba *t* realizada en 4.1.5, siendo la especie *Ambrosia tenuifolia* la que mostró diferencia significativa en el efecto repelente al evaluar los dos solventes de extracción.

4.1.6.3 Efecto del tiempo de aplicación sobre *Euphorbia dentata*

Como podemos observar en la figura 12, se demuestra el comportamiento de ambos extractos etanol-cloroformo y el hexánico para la especie *Euphorbia dentata* sostenido en el tiempo de duración del bioensayo.

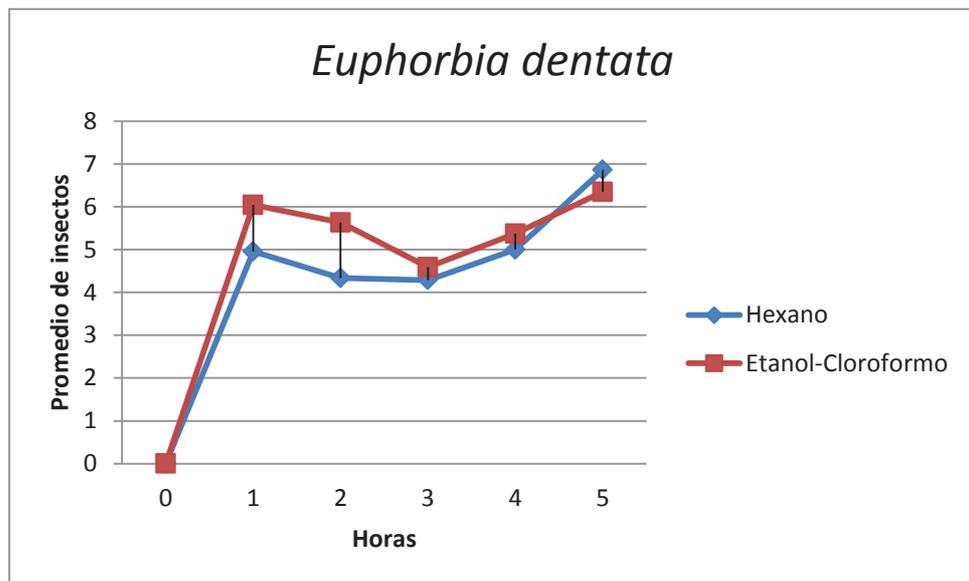


Figura 12. Efecto repelente de extractos de *Euphorbia dentata*

En el caso de la especie *Euphorbia dentata*, el comportamiento reflejado en la figura 12 muestra un valor umbral máximo de cinco horas para ambos solventes, muy diferente al observado para *Ambrosia tenuifolia* y *Bacharis articulata*. En lo que respecta al comportamiento repelente, podemos ver que, comienza siendo superior para el caso de

los extractos provenientes de etanol-cloroformo durante las primeras dos horas, pero a partir de la hora tres y hasta la hora cinco el efecto repelente prácticamente se iguala.

4.1.6.4 Efecto del tiempo de aplicación sobre *Urtica urens*

En la figura 13 se aprecia el comportamiento de los extractos etanol-cloroformo y hexano para la especie *Urtica urens* sostenido en el tiempo de duración del bioensayo.

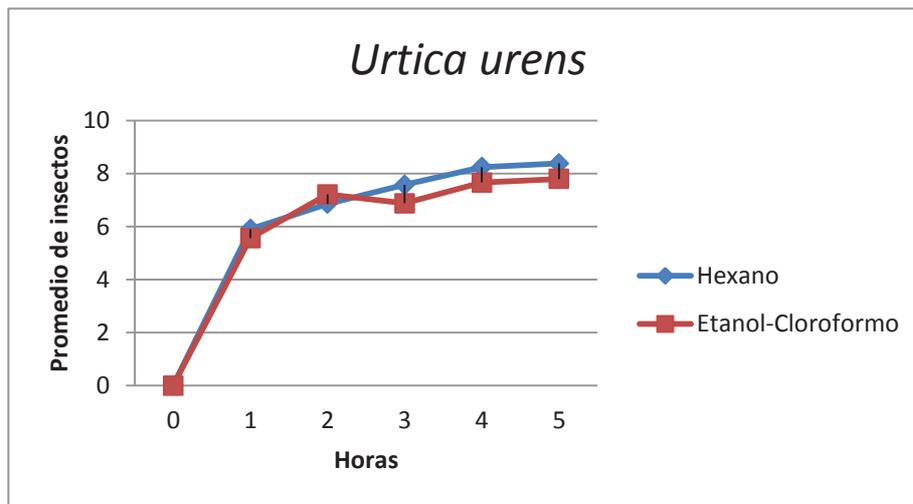


Figura 13. Efecto repelente de *Urtica urens*

La figura 13 muestra el comportamiento de los insectos con los dos solventes de extracción para la especie *Urtica urens*. Los máximos efectos fueron obtenidos a las cinco horas de tratamiento. Podemos ver también un comportamiento similar para ambos extractos a lo largo de las cinco horas, observándose una mínima superioridad del extracto hexánico en las últimas tres horas.

4.1.6.5 Efecto del tiempo de aplicación sobre *Clematis montevidensis*

Mediante la figura 14 podemos ver el comportamiento de ambos extractos etanol-cloroformo y el hexánico para la especie *Clematis montevidensis* durante el tiempo del bioensayo.

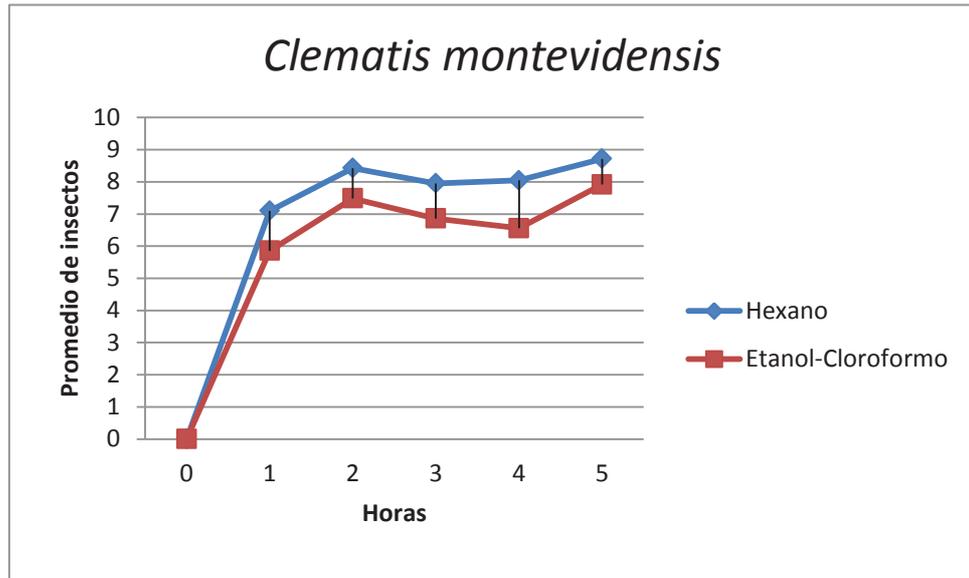


Figura 14. Efecto repelente de *Clematis montevidensis*

En la figura 14 se puede apreciar los efectos repelentes estudiados en *Clematis montevidensis*. Al igual que en *Euphorbia dentata* y *Urtica urens*, anteriormente observadas, el valor umbral máximo se refleja a la hora cinco del bioensayo. Además, podemos evidenciar un comportamiento similar en función del tiempo que es mínimamente mayor para el caso del extracto hexánico; el cual nos indica un mejor efecto repelente, respecto al proveniente de extractos etanol-cloroformo.

4.1.7 Ensayos estadísticos de ANOVA para hexano

Se utilizó el cálculo de ANOVA para comparar las distintas medias obtenidas de los ensayos biológicos realizados a las cinco especies vegetales al utilizar hexano como solvente de extracción y a las cinco horas de ensayo, cuyos resultados se pueden apreciar en la tabla 8.

Tabla 8. Promedios y varianzas obtenidas para el análisis de ANOVA.

Grupos	N	Promedio	Varianza
Ambrosia tenuifolia Hexano	21	7,52	6,56
Baccharis articulata Hexano	21	7,28	12,41
Urtica urens Hexano	21	8,38	4,95
Clematis montevidensis Hexano	21	8,71	3,91
Euphorbia dentata Hexano	21	6,86	13,03

Mediante el análisis de ANOVA se pudo ver que no había diferencia significativa entre sus medias, y que estas eran iguales, debido a que el valor de F calculado (1,536) es inferior al F crítico (2,462). Sin embargo, tal como se puede apreciar en tabla 7, los valores de varianza presentan heterogeneidad, por lo que la aplicación del ensayo podría ser inválido.

4.1.8 Ensayo de ANOVA para etanol-cloroformo.

En la Tabla 9 se pueden observar los resultados obtenidos por ANOVA para comparar las distintas medias obtenidas de los ensayos biológicos realizados a las cinco especies vegetales al utilizar como solvente de extracción etanol cloroformo

Tabla 9. Promedios y varianzas obtenidas para el análisis de ANOVA.

<i>Grupos</i>	<i>n</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Ambrosia tenuifolia Etanol-cloroformo	28	5,18	15,19
Baccharis articulata Etanol-cloroformo	39	7,05	10,89
Urtica urens Etanol-cloroformo	39	7,35	5,82
Clematis montevidensis Etanol-cloroformo	35	7,79	7,32
Euphorbia dentata Etanol-cloroformo	23	6,35	11,42

Mediante, el test de ANOVA se pudo apreciar que para el tratamiento con etanol-cloroformo existía una diferencia de las distintas medias entre las especies vegetales analizadas, debido a que el valor del F calculado 4,03 excedía al F crítico 2,43.

Para evaluar entre que valores de medias había variabilidad, se calculo la diferencia significativa menor (DMS); pudiéndose observar mediante este cálculo que la media que variaba con respecto al resto, es la que corresponde a *Ambrosia tenuifolia*. Mientras, las medias restantes de *Baccharis articulata*, *Urtica urens*, *Clematis montevidensis* y *Euphorbia dentata* no presentaron diferencias significativas entre ellas, indicando que son estadísticamente iguales.

4.1.9 Ensayo de ANOVA total

Finalmente, se realizó la aplicación de ANOVA de todas las medias muestrales, obtenidas mediante la realización de bioensayo con los extractos crudos provenientes tanto de hexano como de etanol cloroformo. Logrando una evolución integral del efecto repelente manifestado en los distintos ensayos biológicos realizados.

Tabla 10. Promedios y varianzas obtenidas para el análisis de ANOVA.

<i>Solvente</i>	<i>Grupos</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Hexano	<i>Ambrosia tenuifolia</i>	21	7,52	6,56
	<i>Baccharis articulata</i>	21	7,29	12,41
	<i>Urtica urens</i>	21	8,38	4,95
	<i>Clematis montevidensis</i>	21	8,71	3,91
	<i>Euphorbia dentata</i>	21	6,86	13,03
Etanol- Cloroformo	<i>Ambrosia tenuifolia</i>	28	5,18	15,19
	<i>Baccharis articulata</i>	39	7,05	11,05
	<i>Urtica urens</i>	39	7,79	5,64
	<i>Clematis montevidensis</i>	35	7,91	7,32
	<i>Euphorbia dentata</i>	23	6,35	11,42

Observando los valores de las medias calculadas se puede apreciar el comportamiento conjunto de todas las especies vegetales, frente a los dos solventes de extracción. Esto, permite establecer un ranking de efectividad, donde el extracto crudo hexánico obtenido de la especie *Clematis montevidensis* tuvo mayor capacidad repelente seguido de *Urtica urens*.

RANKING

Clematis montevidensis Hexano

Urtica urens Hexano

Clematis montevidensis Etano-Cloroformol

Urtica urens Etanol-Cloroformo

Ambrosia tenuifolia Hexano

Baccharis articulata Hexano

Baccharis articulata Etanol-Cloroformo

Euphorbia dentata hexano

Euphorbia dentata Etanol-Cloroformo

Ambrosia tenuifolia Etanol-Cloroformo

Mediante la aplicación de la prueba de ANOVA a las cinco especies vegetales extraídas con ambos solventes, se obtuvo que existía una diferencia significativa entre sus distintas medias, arrojando un valor de $F_{\text{calculado}}$ de 3,11 valor que excedía el $F_{\text{crítico}}$ de 1,92.

Por medio de la aplicación de DMS, se pudo determinar que las medias que tenían una diferencia significativa correspondían a *Euphorbia dentata*, *Ambrosia tenuifolia* en etanol cloroformo, y *Euphorbia dentata* en hexano.

4.1.10 Ensayo para determinación de terpenoides en extractos

Se observa que en los extractos con mayor PR, se corresponden a la presencia de compuestos terpenoides.

Tabla 11. Contenido de terpenoides, en extractos con mayor PR.

Especies vegetales	Solvente de extracción	Presencia de terpenos ⁽¹⁾
<i>Clematis montevidensis</i>	hexano	(+++)
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	hexano	(++)
<i>Baccharis articulata</i>	etanol-cloroformo	(+++)

(1) (+++) Alta, (++) media, (+) baja y (-) no presencia de terpenoides.

4.2 Discusión

Pérez et al, 2006 señalan, que ciertos extractos crudos de algunas plantas tienen efectos biocidas sobre distintas especies granarias y que pueden ser utilizadas como alternativa al control de plagas. Es sabido que esta técnica es muy utilizada en la agricultura familiar por lo que podría ser beneficioso el uso de extractos naturales para el control de insectos.

Es por ello, que mediante la maceración del material vegetal, con soluciones extractivas podemos obtener distintas familias de metabolitos secundarios, dependiendo de la polaridad del solvente de extracción utilizado, los cuales podrían estar relacionados con el efecto repelente encontrado en las distintas especies vegetales ensayadas.

Existen varios compuestos, presentes en las plantas que tienen poder insecticida o de repelencia como son los terpenoides, entre otros, los cuales afectan a los artrópodos plaga. Entre las plantas que se han utilizado para el control de plagas podemos mencionar al neem (*Azadirachta indica* A. Juss.); donde el componente mayoritario es un tetraterpenoide conocido como *azadirachtina* característico de la familia de las Meliaceas; la citronela (*Cymbopogon nardus* L.), cuyos dos componentes principales son monoterpenoides (geraniol y citronelal) de conocido efecto repelente (Montoya, 2006).

Analizando cualitativamente, se observó la presencia de terpenoides en los extractos crudos de las especies vegetales estudiadas que mostraron un buen efecto repelente. Mangiaterra (2005) demostró la presencia de terpenoides y flavonoides en *Baccharis articulata*. También se encontraron informes (Oberti et al., 1986; Silva et al., 1992) sobre la composición química de extractos crudos para la especie *A. tenuifolia* donde se evidencia la presencia de varios sesquiterpenos. Sin embargo, en ambas bibliografías no se menciona el desarrollo de ensayos biológicos que evidencien el efecto repelente en insectos.

Analizando el PR para todas las especies estudiadas en función de los solventes, los resultados obtenidos fueron superiores con extractos vegetales provenientes de hexano, en comparación a etanol-cloroformo.

Desde el punto de vista de las especies vegetales extraídas con hexano, la más relevante fue *Clematis montevidensis*, alcanzando la clase cuatro y quedando por encima de los demás extractos crudos de las especies ensayadas. Otras especies, en extracto etanol cloroformo, que mostraron menor efecto repelente fueron *Baccharis articulata* y *Urtica urens* que se ubican dentro de la clase tres propuesta por Talukder & Howse (1995).

Para el caso de las especies que mostraron un menor potencial repelente, este hecho podría estar relacionado con la concentración utilizada (10 mg mL^{-1}) en los bioensayos, por la cual una misma sustancia puede comportarse como repelente o atractante, dependiendo de las condiciones dadas en el ensayo biológico (Giordano et al., 2000). Algunos autores, sugieren que mayores concentraciones de los principios activos serían necesarias para lograr efecto tóxico en las larvas (Ho et al., 1996; Huang et al., 1997; Liu & Ho, 1999; Mondal & Khalequzzaman, 2006). Otra posible causa podría ser la pérdida de componentes debida a la volatilización, lo que explicaría la disminución de la repelencia observada en nuestro estudio.

También es importante considerar que los principios activos que actúan adecuadamente sobre un insecto, puedan no serlo para otros; incluso para la misma

especie, ya que la actividad suele variar en los diferentes estadios del desarrollo (Hamraoui & Regnault-Roger, 1997). Este fenómeno se observa con frecuencia en plagas de grano almacenado (Stadler et al., 1990; Rejendran & Sriranjini, 2008; Nyamadoret al., 2010).

El análisis del efecto repelente en función del tiempo para los dos solventes, se observó que en las especies: *Euphorbia dentata*, *Urtica urens* y *Clematis montevidensis*, el umbral de repelencia se evidencia sobre las últimas horas del bioensayo, mientras que para *Ambrosia tenuifolia* y *Bacharis articulata* el efecto repelente se demostró a partir de la primer hora de aplicación. El conocimiento de este comportamiento nos permite evaluar que los efectos repelentes no son evidentes en forma inmediata, si no que requieren de un tiempo para que el mismo pueda ser positivo. El tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo hasta que el efecto se torna evidente, podría estar sujeto entre otros factores, a que durante las primeras horas los insectos se aclimatan al ambiente al que son sometidos; debiéndose activarse sus receptores a algunas sustancias químicas provenientes de los extractos crudos (García et al., 2003).

Por otro lado, se observa que los extractos crudos de la especie *Ambrosia tenuifolia*, muestra una diferencia importante al variar el solvente de extracción, lo cual también se verifica con la prueba estadística *t*, manifestando diferencias significativas entre ambas e indicando la superioridad repelente del extracto hexánico en comparación al de etanol-cloroformo en esta especie vegetal.

Por otra parte, el ensayo de ANOVA que involucra a los extractos crudos de las especies en ambos solventes a las cinco horas de aplicación, demostró que el extracto hexánico de la especie *Clematis motevidensis* es la que manifestó mayor capacidad repelente de todos los ensayos realizados.

5. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis ha mostrado las distintas capacidades repelentes estudiadas en cinco especies vegetales autóctonas de la provincia de La Pampa: *Clematis montevidensis*, *Urtica urens*, *Ambrosia tenuifolia*, *Baccharis articulata* y *Euphorbia dentata*, empleando hexano y etanol-cloroformo como solventes de extracción.

Dado que actualmente existe un gran interés hacia la búsqueda de plaguicidas obtenidos a partir de productos naturales (mejor conocidos como “orgánicos”), este trabajo ha desarrollado un estudio cuyas implicancias futuras puedan dar lugar al desarrollo de nuevos principios activos repelentes, amigables con el ambiente, de fácil obtención y con efectos mínimos a otras poblaciones benéficas .

A partir de los resultados obtenidos, se pueden alcanzar las siguientes conclusiones:

5.1. Del efecto del solvente en el extracto

El solvente hexano ha logrado extraer de las distintas especies vegetales evaluadas, una familia de compuestos que demostraron tener una mayor actividad repelente en comparación a el solvente etanol-cloroformo. Sin embargo, su uso como repelente comercial debería ser materia de estudios posteriores.

5.2. De las propiedades repelentes de los extractos de las especies vegetales estudiadas.

El extracto hexánico de la especie *Clematis montevidensis* ha demostrado ser el que posee mayor capacidad repelente, mientras que *Baccharis articulata* dio los mejores resultados con el solvente de extracción etanol-cloroformo. Al menos en estas especies, sería recomendable profundizar los estudios respecto de sus extractos, a los fines de hallar las sustancias responsables de la repelencia, así como aspectos vinculados a concentraciones mínimas propelentes, efectos residuales, etc.

5.3. Del tiempo de exposición de los repelentes.

En general, se ha observado que los mejores efectos repelentes se obtienen a partir de cinco horas de aplicación para los extractos de las especies: *Euphorbia dentata*, *Urtica urens* y *Clematis montevidensis*. En cambio, para *Ambrosia tenuifolia* y *Baccharis articulata* ese efecto se observó a una hora de aplicación. Si bien estos tiempos pueden ser prolongados para uso tópico humano, dichos tiempos serían cortos considerando períodos de almacenamiento de días, meses o incluso años. En tal sentido, estudios posteriores deberían enfocarse a evaluar la capacidad repelente de los principios activos en función de los meses a partir de su aplicación.

5.4. De los porcentajes de repelencia y ensayos estadísticos

Según se pudo observar, los mejores porcentajes de repelencia obtenidos fueron para *Clematis montevidensis* hexano y *Ambrosia tenuifolia* hexano, situación que fue comprobada estadísticamente con los valores de Chi^2 .

Por otra parte, el análisis de los solventes a través del ensayo *t*, mostró diferencias significativas para hexano en comparación a etanol-cloroformo para la especie *Ambrosia tenuifolia*.

Por último, ANOVA permitió obtener un ranking de extractos según especies y solventes, hallándose los mejores resultados para *Clematis montevidensis* en hexano.

Por todo lo expuesto, a partir de los estudios realizados en el presente trabajo de tesis, se puede concluir que las especies vegetales *Clematis montevidensis* en hexano, *Urtica urens* en hexano, *Clematis montevidensis* en etanol-cloroformo, *Urtica urens* en etanol-cloroformo, *Ambrosia tenuifolia* en hexano, *Baccharis articulata* en hexano y *Baccharis articulata* en etanol-cloroformo, poseen elevadas capacidades repelentes.

Por ello, estudios posteriores podrían enfocarse hacia el desarrollo de nuevas patentes en repelentes orgánicos, con materias primas asequibles en la provincia de La Pampa y con posibles riesgos ambientales y humanos mínimos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Amelot, M. E.; Ávila, J. L.; Otero, L. D.; Mora, F. And Wolff, B .1994. A new bioassay for testing plant extracts and pure compounds using red flour beetle *Tribolium Castaneum* Herbst Journal of Chemical Ecology. Vol. 20 No. 5.

Aragadvay Yungán, S.P. (Tesina de grado) Riobamba-Ecuador; Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Escuela de Bioquímica y Farmacia.

Beltran, G.; Ron, L.; Salazar Buitrón, C. P. y Fernando, L. 2011. Propuesta de Plan de Manejo de los Recursos Naturales de La Microcuenca del Río Nangulví. <http://hdl.handle.net/123456789/200>

Caballero García, C. 2004. Efectos de terpenoides naturales hemisintéticos sobre *Leptinotarse decemlineata* (SAY) y *Spodoptera exigua* (HUBNER) (Lepidoptera:Nocturnae). Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid: Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis doctoral, 107 pp.

Casida, J. & Quistad, G. 1995. Pyrethrum owers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses. Oxford, UK: Oxford Univ. Press. 356 pp.

Casini, C. & Santa Juliana, M. 2005. Postcocecha de trigo. Secado y Almacenaje, pp:55-70. En: Jornadas técnicas de Capacitación en Siembra, Cocecha, Poscocecha, Pulverización y Fertilización. 88 pp.

Choochote, W.; Chaithong, U.; Kamusuk, K.; Jitpakdi, A.; Tippawangkosol, P.; Tuetun, B.; Champakaew, D. & Pitasawat, B. 2007. Repellent activity of selected essential oils aganist *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*, 78:359 - 364.

Correa, A.; Santos, J.; Cordeiro, E. & Guedes, R. 2006. Fluctuating asymmetry inpyrethroir-resistant and -susceptible populations of the maize weevil (*Sitophilus*

zeamais). 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 4. Pest resistance to Pesticides and Control Measures. Conference Papers., pp. 285-291.

Cosimi, S.; Rossi, E; Cioni, P.L. and Canale, A. 2009. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.) Journal of Stored Products Research. 45:125-132.

Cox, P. 2002. Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. Journal of Stored Products Research, 38:95-115.

Cox, P. 2004. Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation. Journal of Stored Products Research, 40(1):1-25.

Dahanukar, A.; Hallem, E. A. & Carlson, J. 2005. Insect chemoreception. Current Opinion in Neurobiology, 15:423 -430.

De los Mozos, P. M. 1997. Plagas de productos almacenados. Bol. S.E.A., 20:93 -109.

Dethier, V.; Barton Browne, L. & Smith, C. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. Journal of Economic Entomology, 53:134-136.

Dell'Orto Trivelli, H. & Arias Velázquez, C. 1985. Insectos que dañan granos y productos almacenados. Ed. Oficina Reg. de la FAO para América Latina y El Caribe. Santiago, Chile, 142 pp.

dos Santos Veloso, M.; Almeida Oliveira R.; Barboza Silva, L.; Carvalho Guedes, R.; Evangelista Visôto, L.; Fernandes Moreira, L.; Pilon, A.; de Oliveira, J. & da Paixão, G. 2008. Taxa respiratória e comportamento de populações resistentes e susceptível do caruncho do milho expostas à cipermetrina. XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Área: Pragas de Graos Armazenados. Resumo ID:1915-2. Uberlândia, MG

Fields, P.; Xie, Y. & Hou, X. 2001. Repellent effect of pea (*Pisum sativum*) fractions against stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 37:359-370.

Garcia, M.; Sosa, M.; Donadel, O.; Giordano, O. & Tonn, C. 2003. Effects of some sesquiterpenes on the stored-product insect *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62(3-4):17-26.

Gillott, C. 2005. *Entomology*. Springer. Third edition. 831 pp.

Giordano, O.; Sosa, M. & Tonn, C. 2000. Actividad Biológica de Metabolitos Secundarios de Plantas frente a *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Anales Acad. Nac. de Cs. Exactas Físicas y Naturales*, 52:13-17.

Hamraoui, A. & Regnault-Roger, C. 1997. Comparaison des activités insecticides monoterpenes sur deux especes d'insectes ravageurs des cultures *Cerattitis capitata* et *Rhopalosiphum padi*. *Acta Bot. Gallica*, 144:413 -417.

Ho, S.H.; Koh, L.; Ma, Y.; Huang, Y. and Sim, K.Y. 1996. The oil of garlic, *Allium sativum* L (Amaryllidaceae), as a potential grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Mostch. *Postharvest Biol Technol* 9:41-48.

Hou, X.; Fields, P. & Taylor, W. 2004. The effect of repellents on penetration into packaging by stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 40:47-54.

Huang, Y.; Tan, J.; Kini, R. & Ho, S. 1997. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of Stored Products Research*, 33:289 -298.

Ignatowicz, S.; Wesolowska, B. & Banasik, K. 1994. Potential of common plants as grain protectants: repellents effect of powdered leaves and seeds of the neem tree on stored product pests. *Proceedings of the 1st international conference on Insects chemical, physiological and environmental aspects. Conference on 105th birthday Anniversary of Stefan Kopec'*, páginas 317 -322. Ladek Zdrój, Poland.

- Isman, M. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51:4566.
- Isman, B. M. & Akhtar, Y. 2007. Plant Natural Products as a Source for Developing Environmentally Acceptable Insecticides pp: 235-288. en: Ishaaya, I.; Nauen, R. y Horowitz, A.R. *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. 314 pp.
- Jones, P.; Ley, S.; Morgen, E. & Santos, D. 1989. The chemistry of the neem tree, pp: 19-45. En: *Focus of Phytochemicals-Pesticides*. Jacobson, M. (Eds). CRC, Boca Raton, FL.
- Juan, V.F.; Saint-Andre, H. y Fernandez, R.R. 2003. Competencia de Lecheron (*Euphorbia dentata*) en soja. *Planta Daninha, Viçosa - MG*, 21 (2): 175-180.
- Koul, O. & Dhaliwal, G. 2001. *Phytochemical Biopesticides*. Harwood Academic Publishers.
- Levinson, H. & Levinson, A. 1994. Origin of grain storage and insect species consuming desiccated food. *Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz*, 67:47-59.
- Liu, Z. & Ho, S. 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 35:317-328.
- Mangiaterra, P. A. (Tesina de grado). 2005. Buenos Aires. Universidad de Belgrano.
- Marrasini, C.; Gorzalczany, S. y Ferraro, G. 2010. Actividad analgésica de dos especies de *Urtica* con usos etnomédicos en la República Argentina. *Dominguezia - Vol. 26(1)* .
- Marzocca, A. 1976. *Manual de malezas* (3ª. Ed.). Argentina: Editorial Hemisferio sur.
- Metcalf, C. & Flint, W. 1974. *Insectos destructivos e insectos útiles: sus costumbres y su control*. Ed. Cía. Continental S.A. Trad. de la 4 Edic. en Inglés. México, 1208 pp.

Mondal, M. & Khalequzzaman, M. 2006. Toxicity of essential oils against red our beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Biosciences, 14:43-48.

Montoya, J. O.; Soto, G. A.; de Sousa, A. H. 2006. Efecto de repelencia de *Crotalaria juncea*, *Galactia striata* y *Cymbopogon nardus* para el manejo de *Cyrtomenus bergi* (Hemiptera: Cydnidae). Revista de Biología e Ciencias da Terra Volume 6- Número 2.

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.

Nyamador, W.; Ketoh, G.; Amévoïn, K.; Nuto, Y.; Koumaglo, H. & Glitho, I. 2010. Variation in the susceptibility of two *Callosobruchus* species to essential oils. Journal of Stored Products Research, 46(1):48-51.

Obeng-Ofori, D.; Reichmuth, C.H.; Bekele J.& Hassanali, A. 1998. Toxicity and protectant potential of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum* against four stored product beetles. International Journal of Pest Management, 44(4):203 - 209.

Oberti, J.C; Silva, G.L; Sosa V.E; Kulanthaveivel, P y Herz, W. 1986. Ambrosanolides and secoambrosanolides from *Ambrosia tenuifolia*. Phytochemistry 25(6): 1355-1358

Ogendo, O.; Kostyukovsky, M.; Ravid, U.; Matasyoh, J.; Deng, A.; Omolo, E.; Kariuki, S. & Shaaya, E. 2008. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. Journal of Stored Products Research, 44:328-334.

Pascual Villalobos, M.J. 1998. Repelencia, inhibición del crecimiento y toxicidad de extractos vegetales de *Tribolium castaneum* Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae) .Boletin de Sanidad Vegetal. Plagas, 24:143-154 .

Pérez, D. D. y Iannacone, O. J. 2006. Efectividad de Extractos Botánicos de Diez Plantas Sobre la Mortalidad y Repelencia de Larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., Insecto Plaga del Pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. Agric. Téc. 66:121-30.

Petenatti, M.E; Álvarez, M .E.; Petenatti, E .M.; Del Vitto, L. A.; Saad, J. R.; Téves, M.R. & Giordano, O.S. 2005. Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino, V. *Clematis montevidensis* var. *montevidensis*, Caracterización de la Droga Acta Farmacéutica Bonaerense, 24 (2): 190-196.

Petenatti, E.M.; Petenatti, M .E; Cifunte, D.A; Gianello, J .C.; Giodano, O.S.; Tonn, C. E. & Del Vitto, L.A. 2007. Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. VI. Caracterización y Control de Calidad de dos Especies de “Carquejas”: *Baccharis sagittalis* y *B. triangularis* (Asteraceae) Latin American Journal of Pharmacy, 26 (2): 201-208.

Pérez, M. & Pascual-Villalobos, M. 1999. Efectos del aceite esencial de Inorescencias de *Chrysanthemum coronarium* L. en mosca blanca y plagas de almacén. Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg., 14(1-2):249- 258.

Rees, D. 2004. Insectes of Stored products. CSIRO. Australia. 181pp.

Regnault Roger, C.; Philogene, B.; Vincent, C. 2004. Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Barcelona. Mexico.337 pp.

Rejendran, S. & Sriranjini, V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. Journal of Stored Products Researchs., 44:126 -135.

Rodríguez, E.N. y Faya de Falcon L.M. 1992. Malezas reconocimiento de semillas y plántulas. INTA.

Rossetti, M. R.; Defagó, M. T.; Carpinella, M. C.; Palacios, S. M. y Valladares, G. 2008 .Actividad biológica de extractos de *Melia azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidea) ISSN 0373-5680 Rev. Soc. Entomol. Argent. 67 (1-2): 115-125.

Ryan, F. 2002. Insect Chemoreception. Fundamental and Applied. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.323 pp.

Silva, G.L; Oberti, J.C, Herz, W. 1992. Sesquiterpene lactones and other constituents of Argentine *Ambrosia* species. *Phytochemistry* 31(3):859-861

Silva, J.; Torrejón, G.; Bay-Schmith, E. & Larrain, A. 2003 Calibración del bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia pulex* (crustacea: cladóceras) usando un toxico de referencia. *Gayana* 67(1): 87-96.

Soares Corrêa, A.; Albinati Oliveira, P.; Góes Cordeiro, E.; Guedes Pereira, E. & Carvalho Guedes, R. 2008. Resistência a permetrina em populações brasileiras de caruncho domilho *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Área: Pragas de Grãos Armazenados. Resumo ID:118-1. Uberlândia, MG.

Stadler, T.; Picollo, M. & Zerba, E. 1990. Factores ecofisiológicos relacionados con la susceptibilidad a insecticidas y la resistencia a malatión en *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera:Curculionidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 16:743 -754.

Sülßen, V.; Güida, C.; Coussio, J., Paveto, C.; Muschietti, L.; Martino, V. 2005. In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentina traditional medicine. *Parasitol Res.* 98:370-374

Talukder, F.A.; Howse, P.E. 1993. Deterrent and insecticidal effects of extracts of *Pithecellobium dulce* (meliaceae) against *Tribolium castaneum*. *Journal of Chemical Ecology* 19: 2463-2471.

Talukder, F.A.; Howse, P.E. 1995. Evaluation of *Aphanamixis polystachya* as a source of repellents, antifeedants, toxicants and protectants in storage against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*, 31 (1), 55-61.

Van Puyvelde, L. 1976. L' umuravumba-iboza riparia (Hochst.) N.E.Br. (Lamiaceae), la plante medicinale d' usage curant au Rwanda. *Rapp. Deuxieme Coll. Cames*, 60:121 -136.

Viglianco, A.I.; Novo, R.J.; Cagnolini, C.I.; Nassetta, M. 2006. Actividad biológica de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav. y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L.). *Agriscientia*, XXIII (2): 83-89.

Viglianco, A.I.; Novo R.J.; Cagnolini, C.I.; Nassetta, M. e Cavallo, A. 2008. Antifeedant and Repellent Effects of three plants from Córdoba (Argentina) Against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *BioAssay* 3:4.

Wang, J.; Zhu, F.; Zhou, X.M.; Niu, C.Y.; Lei, C.L.2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisa Vulgaris* to *Tribolium castaneum* *Journal of Stored Products Research* 42: 339-347.