

## Evaluación de extractos totales como repelente para el control de *Tribolium castaneum* Herbst, 1979 (Coleoptera: Tenebrionidae)

### Evaluation of total extracts as repellent for the control of *Tribolium castaneum* Herbst, 1979 (Coleoptera: Tenebrionidae)

Nayive Pino-Benitez<sup>1,2</sup>, Carlos Mario-Valencia<sup>1</sup>

#### Resumen

**Objetivo:** Evaluar la actividad repelente de seis extractos totales obtenidos mediante maceración con etanol de 96° en frío, contra insectos adultos de *Tribolium castaneum* Herbst, 1979. **Metodología:** Los ensayos *in vivo* de la actividad repelente fue medida utilizando la técnica de área de preferencia, cuantificando el porcentaje de repelencia obtenido a diferentes concentraciones de exposición. Los resultados fueron analizados mediante la prueba T-pareada para determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ); la comparación entre el porcentaje de repelencia (PR) de los diferentes extractos se realizó usando ANOVA, empleando el posttest de Dunn's para hacer comparaciones con el control positivo. **Resultados:** Los extractos a las dos horas de exposición muestran un aumento en su actividad repelente proporcional al incremento de la concentración con un efecto independiente, el cual permanece casi constante hasta las cuatro horas post-test, siendo los extractos más efectivos los obtenidos de *Ocimum campechianum* variedad blanca, *Palicuria guianensis* y *Piper divaricatum* con PR=92%, 75%, 74% respectivamente. **Conclusiones:** Estos resultados sugieren la utilización potencial de los seis extractos para el control de *T. castaneum*, siendo el extracto de *O. campechianum* var blanca el más recomendado por poseer la más alta actividad repelente. Además, este estudio se constituye en un aporte a la bioprospección de la flora chocoana con potencial para el desarrollo sustentable de la región.

**Palabras clave:** Bioactividad, Mosquito artrópodo, Protectores de granos.

#### Abstract

**Objective:** To evaluate the repellent activity of six total extracts derived from plants of the departamento de Chocó. The repellent activity of the total extracts was tested against adult insects of *Tribolium castaneum* Herbst, 1979, pests of stored grains. **Methodology:** During *in vivo* tests, the repellent activity was measured using the area preference technique by quantifying the obtained percentage of repellency at different exposure concentrations. The results were analyzed by paired t-test to determine significant differences ( $p < 0.05$ ). Moreover, the comparison between the repellency percentages (RP) the different extracts was performed using analysis of variance (ANOVA) by means of Dunn's post test to assess comparisons with the positive control. **Results:** The evaluated extracts showed a proportional increase of its repellent activity to the concentration increase showing an independent effect. As a result, the more effective extracts were the derived from *Ocimum campechianum* variedad blanca, *Piper divaricatum* and *Palicuria guianensis* with repellency percentages of 92%, 75% and 74% respectively. **Conclusions:** These results presents suggest a potential use of the six plants extract tested to control *T. castaneum* from which, *O. campechianum* var white extract is the most recommended as it showed high repellent activity. Additionally, this study constitutes a big contribution to bio-prospecting of Chocó Flora and to the sustainable development of the region.

**Keywords:** Bioactivity, Grain protectants, Mosquito arthropods.

<sup>1</sup> Universidad Tecnológica del Chocó, Laboratorio de Productos Naturales, Quibdó, Chocó, Colombia.

<sup>2</sup> Bio-Red-CO-Cenivam. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. e-mail: nayivepino@gmail.com  
Fecha recepción: Octubre 23, 2013 Fecha aprobación: Noviembre 21, 2015 Editor Asociado: Quinto H.

## Introducción

Según Olivero-Verbel *et al.* (2009), el aumento de la producción agrícola ha generado el estudio de nuevas técnicas que permitan desarrollar un buen manejo de los granos almacenados, y así mantener el recurso para las generaciones futuras, sin afectar la salud de los consumidores. De los factores que deterioran los granos almacenados, los insectos ocupan un lugar muy importante, porque se estima que entre 5% y 35% de estos granos, se ven afectados por ellos (Boxall 1991). Varios autores como Saini y Rodríguez (2004), Stefanazzi *et al.* (2006), Dal Bello y Padín (2006), comentan sobre la importancia en el control de insectos en la cosecha y poscosecha de cereales debido a que pueden afectar notablemente la calidad del grano y con ello los volúmenes de exportación.

Estos problemas han llevado a la búsqueda de alternativas de control incluidas en el desarrollo de agrosistemas sostenibles, basados en un manejo integrado del cultivo sin alterar el equilibrio del sistema tal como lo expresan Ducrot (2005) y Céspedes y Alarcón (2011). Entre estos métodos alternativos se encuentran sustancias derivadas de plantas que actúan como biocontroladores, sustancias que son producidas solo por algunas plantas y reciben el nombre de metabolitos secundarios, tales como terpenos, sesquiterpenos, lignanos, alcaloides, esteroides, taninos y flavonoides. No obstante, para el control de los insectos que atacan a los granos almacenados se ha utilizado tradicionalmente el uso de productos químicos sintéticos y es de conocimiento que el uso indiscriminado de estos, no solo ha generado un problema de contaminación por los desechos que se producen de la actividad devastando el medio ambiente (por su baja biodegradabilidad), sino, los que causan los grandes efectos toxicológicos que afectan animales, plantas y seres humanos, tal como lo reportan varios autores (Bourguet *et al.* 2000, FAO 2002, Riebeiro *et al.* 2003, Céspedes y Alarcón 2011).

De acuerdo con lo anterior los insecticidas naturales a partir de extractos vegetales constituyen una interesante alternativa para el control de insectos; en ese sentido la flora chocoana está inexplorada, y aunque existen algunos reportes de acción repelente en extractos vegetales, son más las informaciones en aceites esenciales, por lo que las perspectivas en este estudio, son aún mayores. En esta investigación

se evalúa por vez primera la actividad repelente de los extractos vegetales obtenidos a partir de *Piper divaricatum*, *Piper sanctifelisis*, *Siparuna guianensis*, *Palicourea guianensis*, *Ocimum campechianum* variedad blanca, y *Solanum nudum*.

## Metodología

**Insectos usados.** *Tribolium castaneum*, Herbst. Los bioensayos se realizaron utilizando la especie de insecto plaga de granos almacenados *T. castaneum*, pertenecientes a la familia Coleoptera: Tenebrionidae. Este insecto se conoce como gorgojo de la harina, los cuales fueron recolectados en el mercado principal de la ciudad de Cartagena, obtenidos del afrecho de maíz. Los insectos se ubicaron en recipientes de vidrio cubiertos con tela de malla, utilizando avena molida como sustrato; fueron adaptados a las condiciones del laboratorio de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena, a una temperatura de  $26\pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa de 70-85% y fotoperíodos de 12:12 luz:oscuridad, siguiendo los parámetros reportados por Olivero-Verbel *et al.* (2009).

**Actividad repelente.** Los ensayos de la actividad repelente se realizaron por el método de área de preferencia siguiendo lo descrito por Taponjou *et al.* (2005) y Chaubey (2007). Para realizar el ensayo se colocaron un total de 20 insectos adultos de *T. castaneum* en el interior de una caja Petri con papel filtro cortado a la mitad, resultando dos áreas de trabajo, una con volúmenes iguales de diferentes concentraciones de extracto disuelto en acetona y la otra área solo con acetona; las concentraciones resultantes fueron 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{g/ml}$ . Como control positivo se utilizó una formulación repelente comercial de nombre *Stay off*, que contiene como ingrediente activo etil-butil-acetil-aminopropionato al 15% (IR3535), evaluado de igual forma que los extractos, generando cinco concentraciones de ingrediente activo por unidad de área, el testigo solo se trató con el disolvente. Según la EPA (US Environmental Protection Agency), IR3535 es un repelente sintético seguro, no es peligroso cuando es inhalado o usado sobre la piel, pero en contacto con los ojos podría causar algún tipo de irritación. IR3535 es químicamente similar al aminoácido  $\beta$ -alanina. Por su naturaleza química y baja toxicidad, la EPA lo clasifica como un bioplaguicida de acuerdo con

O'Farrill-Nieves (2008).

Se secaron a temperatura ambiente tanto las áreas tratadas con el aceite esencial como el control (0.5 ml c/u) durante 10 minutos con el objetivo de permitir la evaporación del solvente, para luego ser de nuevo pegadas con cinta adhesiva y dejadas en la caja de Petri. De forma inmediata se colocaron 20 insectos adultos de *T. castaneum*, de diferente sexo en la mitad del papel, con ayuda de un vial. Seguidamente, la caja fue tapada y almacenada en condiciones de oscuridad continua tal como lo propone Chaubey (2007). Para cada concentración de extracto vegetal fueron realizadas tres réplicas y cada ensayo fue repetido dos veces.

Las áreas tratadas y no tratadas se dejaron por 10 minutos al aire libre con el objeto de que el solvente se evaporara del papel filtro. Luego se unieron con cinta transparente y se liberaron 20 gorgojos adultos en el centro de la caja de Petri con ayuda de un vial. Los recuentos de gorgojos presentes en cada mitad del papel filtro se realizaron después de dos y cuatro horas de exposición.

Para la determinación del porcentaje de repelencia (PR) se utilizó la siguiente ecuación siguiendo los parámetros descritos por Tapondjou *et al.* (2005):

$$PR = [(N_c - N_t)/(N_c + N_t)] \times 100$$

Donde:

$N_c$ : número de insectos en el área control (acetona).

$N_t$ : número de insectos en el área tratada (E+acetona).

En caso de que sea encontrado mayor número de organismos en el área tratada ( $N_t > N_c$ ), el porcentaje de repelencia se considera negativo, e interpretado como actividad atrayente.

**Análisis estadístico de los datos.** Para cada extracto los resultados se presentan como la media del porcentaje de repelencia (PR) ± error estándar (X ± EE). El número promedio de insectos en cada mitad del papel filtro se comparó mediante la prueba T-pareada para determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). El signo obtenido en el cálculo de PR se empleó para cualificar la acción repelente (positivo) o atrayente (negativo) de los extractos vegetales. En todos los casos, se evaluó previamente la distribución normal y la homogeneidad de varianzas por los pruebas de Kolmogorov-Smirnov y *Bartlett*, respectivamente. La

comparación entre el PR de los diferentes extractos se realizó usando una ANOVA porque los datos cumplieron con lo supuesto, empleando el post test de Dunn para valorar comparaciones con el control positivo. Todos estos procedimientos fueron realizados con el software Graphpad InStat.

## Resultados

De acuerdo con las evaluaciones realizadas para los seis extractos etanólicos de las especies estudiadas, durante dos y cuatro horas de exposición frente al gorgojo de la harina *T. castaneum*, el análisis estadístico de los datos transformados indica que todos los extractos mostraron actividad repelente, pero el extracto con mayor efecto repelente fue el de *O. campechianum* variedad blanca (92%) a las dos horas de exposición y 300 µg/ml, que fue significativamente mejor repelente que el IR3535 frente a los mismos parámetros; siguió en su orden *P. guianensis* (76%), pero esta especie también presentó atracción significativa (propiedad atrayente) en concentración de 100 µg/ml, a dos horas (-66±4) y cuatro de exposición (-56±8), igualmente ocurrió con *S. guianensis* a las dos horas (-13±11) y cuatro de exposición (-28±9) y a la misma concentración. Luego siguieron *S. guianensis* (75%), *P. divaricatum* (74%), y *S. nudum* (71%) pero solo en 100 µg/ml y a dos horas de exposición, no encontrándose diferencias significativas de estas últimas frente al control (Tabla 1).

## Discusión

En este trabajo, la concentración del extracto es proporcional al aumento en la actividad repelente, así como lo reportan varios autores (Novo *et al.* 1998, Pascual-Villalobos 1998, Gutiérrez *et al.* 2008). Los estudios de repelencia de aceites esenciales frente a *T. castaneum*, presentan comportamientos parecidos en el PR y la concentración de los aceites esenciales como lo muestra en su revisión Nerio *et al.* (2010), Espitia (2011) y Caballero-Gallardo *et al.* (2011).

Los extractos evaluados también son reportados con bioactividad antimicrobiana y antioxidante (Sánchez *et al.* 2000, Ciccio y Gómez 2002, Fernández *et al.* 2007, Pino 2009, Pino y Stashenko 2009, Pino *et al.* 2009, Runyoro *et al.* 2010).

**Tabla 1.** Porcentaje de repelencia e intervalos de confianza para los extractos vegetales y el repelente comercial IR3535 frente a *Tribolium castaneum*, a diferentes tiempos de exposición

Especie	Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ )	% de repelencia <sup>a</sup> según el tiempo de exposición (horas)	
		2	4
<i>Piper divanicatum</i>	100	10 $\pm$ 8	3 $\pm$ 11
	150	45 $\pm$ 4	36 $\pm$ 4
	200	50 $\pm$ 7	30 $\pm$ 7
	250	65 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	55 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
	300	75 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	70 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
<i>Piper santifelisis</i>	100	15 $\pm$ 6	5 $\pm$ 9
	150	45 $\pm$ 3	35 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
	200	50 $\pm$ 3	41 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
	250	55 $\pm$ 5	56 $\pm$ 2
	300	65 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	68 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
<i>Siparuna guianensis</i>	100	-13 $\pm$ 11 <sup>b c</sup>	-28 $\pm$ 9 <sup>b c</sup>
	150	8 $\pm$ 8	-4 $\pm$ 5
	200	21 $\pm$ 8	23 $\pm$ 5
	250	41 $\pm$ 4	43 $\pm$ 3
	300	74 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	73 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
<i>Palicourea guianensis</i>	100	-66 $\pm$ 4 <sup>b c</sup>	-56 $\pm$ 8 <sup>b c</sup>
	150	15 $\pm$ 2	28 $\pm$ 4
	200	50 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	45 $\pm$ 5
	250	63 $\pm$ 5 <sup>b</sup>	53 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
	300	76 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
<i>Ocimum campechianum</i> variedad blanca	100	45 $\pm$ 8	51 $\pm$ 9
	150	65 $\pm$ 9 <sup>b</sup>	63 $\pm$ 7 <sup>b</sup>
	200	75 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	70 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
	250	80 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	76 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
	300	92 $\pm$ 2 <sup>b c</sup>	83 $\pm$ 5 <sup>b</sup>
<i>Solanum nudum</i>	100	71 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	56 $\pm$ 5
	150	48 $\pm$ 6	23 $\pm$ 14
	200	36 $\pm$ 2	38 $\pm$ 11
	250	26 $\pm$ 21	20 $\pm$ 14
	300	43 $\pm$ 2	20 $\pm$ 8
IR 3535	100	48 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	48 $\pm$ 6 <sup>b</sup>
	150	53 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	13 $\pm$ 6
	200	65 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	61 $\pm$ 7 <sup>b</sup>
	250	73 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	75 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
	300	83 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	80 $\pm$ 3 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Promedio de los porcentajes de repelencia a diferentes tiempos durante 2 y 4 horas de exposición; los valores son  $\pm$  SEM de 6 réplicas.

<sup>b</sup> Diferencia significativa entre el número de organismos en ambas áreas tratadas y no tratadas, usando una prueba T pareada ( $p < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Diferencia significativa entre los extractos y el control IR3535, usando ANOVA con post-test de Dunn.

## Conclusiones

Los resultados anteriores sugieren la utilización potencial de estos seis extractos (*P. divanicatum*, *P. santifelisis*, *S. guianensis*, *P. guianensis*, *O. campechianum* variedad blanca, y *S. nudum*), para el control de *T. castaneum*, siendo el extracto de *O. campechianum* var blanca el más recomendado por

poseer la más alta actividad repelente. Adicionalmente, este estudio se constituye en un aporte a la bioprospección de la flora chocoana con potencial para el desarrollo sustentable de la región, lo que es un aporte alentador para la agroindustria colombiana como potenciales controladores biológicos de esta plaga de granos almacenados.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo brindado por los grupos de investigación de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena a través de los profesores Jesús Olivero y Karina Caballero. A Universidad Tecnológica del Chocó y al patrimonio autónomo para la Ciencia la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contrato RC-0572-2012.

## Literatura citada

- Bourguet D, Genissel A, Raymond M. 2000. Insecticide resistance and dominance levels. *J Econ Entomol.* 93: 1588-95.
- Boxall RA. 1991. Post-harvest losses to insect: A world overview. *In: Rossmoore HW (ed). Biodeterioration and biodegradation 8.* London: Elsevier. 95 pp.
- Caballero-Gallardo K, Olivero-Verbel J, Stashenko E. 2011. Repellent activity of essential oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* Herbst. *J Agricult Food Chem.* 59 (5): 1690-6.
- Céspedes C, Alarcón J. 2011. Biopesticidas de origen botánico, fitoquímicos y extractos de Celastraceae, Rhamnaceae y Scrophulariaceae. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 10 (3): 175 -81.
- Chaubey MK, 2007. Insecticidal activity of *Trachyspermum ammi* (Umbelliferae), *Anethum graveolens* (Umbelliferae) and *Nigella sativa* (Ranunculaceae) essential oils against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *African J Agricult Res.* 2 (11): 596-600.
- Ciccio J, Gómez L. 2002. Volatils constituents of hte leaves of *Siparuna thecaphora* (Siparunaceae) from Turrialba, Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 50 (3/4): 963-7.
- Dal Bello G, Padín S. 2006. Olfatómetro simple para evaluar la actividad biológica de aleloquímicos vegetales en *Tribolium castaneum*, Herbst. *Agrociencia.* 2: 23-6.
- Ducrot PH. 2005. Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants. pp. 47-58. *In: Regnault RC, Philogene BJJ, Vincent C (eds.). Biopesticides of plant origin.* Paris, Andover: Lavoiser and Intercept, Ltd. 313 pp.
- Espitia CR. 2011. *Evaluación de la actividad repelente e insecticida de aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas utilizados contra Tribolium castaneum Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae).* Tesis para optar el título de MSc Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología. Grupo de Química Ambiental y Computacional, Universidad de Cartagena, Colombia. 61 pp.
- FAO. 2002. *Países Bajos sobre el carácter multifuncional de la agricultura y la tierra.* [Fecha de consulta: 3 de abril de 2012]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/X2777S/X2777S00.htm>
- Fernández K, Patiño A, Murillo E, Méndez J. 2007. Actividad antioxidante y antimicrobial de los volátiles de cuatro variedades de albahacas cultivadas en el departamento del Tolima. *Scient Tech.* XIII (33): 401-3.
- Gutiérrez FS, Stefanazzi N, Purray AP, Ferrero AA. 2008. Bioactividad de extractos de hojas de *Aloysia polystachya* (verbenaceae), en larvas y adultos de *Tribolium castaneum*, Herbst. *Bol San Veg Plagas.* 34: 501-8.
- Nerio L, Olivero J, Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technol.* 101 (1): 372-8.
- Novo RJ, Viglianco A, Nassetta M. 1998. Actividad repelente de diferentes extractos vegetales sobre *Tribolium castaneum* (Herbst). *Agriscientia.* 14: 31-6.
- O'Farrill-Nieves H. 2008. Las plagas del hogar y el jardín. N° 8. San Juan: Departamento de Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico. pp. 1-2.
- Olivero-Verbel J, Caballero K, Jaramillo B, Stashenko E. 2009. Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia origanoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst. *Salud UIS.* 41 (3): 244-50.
- Pascual-Villalobos MJ. 1998. Repelencia, inhibición del crecimiento y toxicidad de extractos vegetales en larvas de *Tribolium castaneum*, (Herbst) (Coleptera: Tenebrionidae). *Bol San Veg Plagas.* 24: 143-54.
- Pino N. 2009. *Plantas útiles del departamento del Chocó. Parte I: Extractos.* Chocó: Universidad Tecnológica del Chocó. 312 pp.
- Pino N, Meléndez EM, Stashenko EE. 2009. Eugenol and methyl eugenol chemotype of essential oil of species *Ocimum gratissimum* L. and *Ocimum campechianum* Mill., from the northwest region of Colombia. *J Chromatograph Sci.* 47 (9): 800-3.
- Pino N, Estashenko E. 2009. Antibiotic validation of medicinal plants of the Northwest of Colombia against *Staphylococcus aureus*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 8 (2): 145-50.
- Riebeiro BM, Guedes RNC, Oliveira EE, Santos JP. 2003. Insecticide resistance and synergism in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *J Stored Prod Res.* 39: 21-31.
- Runyoro D, Ngassapa O, Vagionas K, Aligiannis N, Graikou K, Chinou I. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. *Food Chem.* 199 (1): 311-6.
- Saini E, Rodríguez SM. 2004. *Insectos perjudiciales a los productos almacenados.* Santiago de Chile: Instituto de Microbiología y Zoología, Universidad de Chile. 56 pp.
- Sánchez E, Leal I, Fuentes L, Rodríguez C. 2000. Estudio farmacognóstico de *Ocimum basilicum* L. (albahaca blanca). *Rev Cubana Farm.* 4 (3): 187-95.
- Stefanazzi MM, Gutiérrez T, Standler NA, Bonni A, Ferrero A. 2006. Actividad biológica del aceite esencial de *Tagetes termiflora* Kunth (Asteraceae) en *Tribolium castaneum*, Herbst (Insecta, Coleoptera, Tenebrionidae). *Bol San Veg Plagas.* 32: 439-47.
- Tapondjou AL, Ader C, Fontem DA, Bouda H, Reichmut C. 2005. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* duVal. *J Stored Prod Res.* 41 (1): 91-102.