



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

**EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL PERICÓN (*Tagetes lucida Cav.*)
COMO BIOPLAGUICIDA CONTRA INSECTOS DE MAÍZ ALMACENADO.**

TESIS.

PARA OBTENER TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO.

P R E S E N T A:

CELSO MENDEZ RODRIGUEZ

DIRECTOR: DOCTOR EN CIENCIAS.

FRANCISCO J. ESPINOSA GARCÍA.

MORELIA, MICHOACAN. MARZO 2015.

DEDICATORIAS

Este logro va dedicado a mis padres por no haber perdido la confianza y haberme apoyado incondicionalmente en todo momento, y haberme inculcado los valores necesarios para mi formación. Y por haberme tenido mucha paciencia, ya que no fue fácil, pero se logró tarde pero seguro, gracias Papa, gracias Mama que sin ustedes no hubiera sido posible este sueño.

A mis hermanos que también aportaron su granito de arena para que este sueño fuera realidad.

A mis amigos que me brindaron su apoyo y amistad e hicieron que estuviera como en familia, por haber compartido con ellos momentos inolvidables.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento más sincero al Dr. Francisco Javier Espinosa García, en primer lugar por haberme aceptado en su equipo de trabajo, por su paciencia en la realización de este trabajo, por sus enseñanzas, por los congresos a los que tuve la oportunidad de asistir con su ayuda y sobre todo por haberme brindado de su tiempo siempre que lo requerí y por su confianza, “Muchas gracias”

Mis más sinceros agradecimientos a Dios, quien ha sido mi soporte en todas las dimensiones de mi vida.

Este trabajo fue realizado con apoyo del Proyecto PAPIIT IT215511-3 del Dr. Francisco J. Espinosa García *“La función de diversidad de los MS defensivos y la prospección de inhibidores de contradefensas de organismos resistentes a xenobioticos”*; también fue apoyado por el Centro de Investigaciones en Ecosistemas de la UNAM a través de POFJEG.

“Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán”.

A la Biól. Yolanda M. García Rodríguez por la revisión de mi trabajo y por sus valiosas aportaciones, que siempre estuvo ahí apoyándome a resolver las dudas que surgieron en el proceso de mi trabajo.

A la Dra. Alicia Bautista Lozada por la revisión de mi trabajo y por sus valiosas aportaciones y a resolver mis dudas sobre técnicas que surgieron en el proceso de mi trabajo.

Al Dr. Angel Bravo Monzón por la revisión de mi trabajo y por sus valiosas aportaciones en resolver dudas sobre los análisis estadísticos que surgieron en el proceso de mi trabajo.

Al Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco por la revisión de mi trabajo y por sus valiosas aportaciones.

A mis compañeros Homero, Maricruz, Fátima, Judith, Yesenia, Claudio y Lupita, quienes me apoyaron sin dudarlos e hicieron que el trabajo fuera más fácil. Muchas gracias por su amistad y por su apoyo.

RESUMEN

El uso de plantas con actividad insecticida se propone como método alternativo de control de insectos, para reducir daños causados por plaguicidas convencionales. *Tagetes lucida*, es una maleza, conocida comúnmente como Pericón o Santa María, que es usada tradicionalmente en aplicaciones terapéuticas por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes. El objetivo de este trabajo es la obtención y evaluación del aceite esencial de *T. lucida* y probar su efecto insecticida o de repelencia contra el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*), una de las principales plagas del maíz almacenado. En este trabajo se reporta la evaluación del aceite como repelente. Se colectaron 4 kg de *T. lucida* en Capula, Michoacán, y se obtuvieron 20 ml de su aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor. Este aceite fue analizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Sus componentes mayoritarios fueron: metileugenol (62.1%) y estragol (31.2%). La actividad de repelencia se probó en insectos no apareados machos y hembras, por olfatometría de dos vías exponiéndolos a 5 concentraciones (1, 2, 4 Y 8µl) de aceite esencial. Al aumentar la concentración del aceite esencial se observó que las hembras fueron atraídas por el aceite esencial, mientras que los machos fueron repelidos completamente. Este hallazgo podría ser importante en el diseño de trampas atrayentes cebadas con aceite esencial de *Tagetes lucida* para las hembras de *Sitophilus zeamais*. Para evaluar la actividad bioplaguicida del aceite esencial de *T. lucida*, se fumigaron 450 insectos con las siguientes concentraciones, (0.18, 0.37, 0.75, 1.5, 3.12, 6.25 y 12.5 µl/ml aire); el control y un testigo. La fumigación de insectos se hizo con papel filtro impregnado de aceite esencial de *T. lucida* en frascos ámbar de 8 mL. Se impregnó un disco de papel filtro con 2 cm² de diámetro con diferentes concentraciones de aceite esencial de *T. lucida*. Los resultados obtenidos en fumigación con *T. lucida* se evaluaron hasta las 96 horas de exposición hacia *S. zeamais* obteniendo una CL₅₀ de = 1.83 µL/mL y una CL₉₅= de 7.32µL/mL de aire. Los resultados obtenidos de *T. lucida* muestran una relación positiva entre la concentración del aceite y la mortalidad de *S. zeamais*.

Palabras clave: **aceite esencial, *Tagetes lucida*, *Sitophilus zeamais***

ABSTRACT

The use of plants with insecticidal activity is proposed as an alternative method of insect control to reduce damage caused by conventional pesticides. *Tagetes lucida* is a weed, commonly known as Pericón or Santa María, which is traditionally used in therapeutic applications for its antibacterial, antifungal and antioxidant properties. The aim of this work is the collection and evaluation of essential oil of *T. lucida* and prove its insecticide or repellent effect against maize weevil (*Sitophilus zeamais*), a major pest of stored maize. In this paper the evaluation of oil repellent reported. 4 kg of *T. lucida* Capula Michoacan were collected, and 20 ml of the essential oil obtained by distillation by steam. This oil was analyzed by Gas chromatography-mass spectrometry. Its main components were: methyleugenol (62.1%) and estragole (31.2%). The activity of insect repellency was tested on male and female unpaired, two-way olfactometry exposing to 5 concentrations (1, 2, 4 and 8 μ l) essential oil. Increasing the concentration of essential oil is observed that females were attracted to the essential oil, while males were completely repelled. This finding could be important in designing attractive traps baited with essential oil of *Tagetes lucida* for females of *Sitophilus zeamais*. To evaluate the biopesticide activity of essential oil of *T. lucida*, 450 insects were sprayed at the following concentrations (0.18, 0.37, 0.75, 1.5, 3.12, 6.25 and 12.5 μ l / ml air); control and a witness. Fumigate insects became filter paper impregnated with essential oil of *T. lucida* in 8 mL amber bottles. Filter paper disc of diameter 2 cm² was impregnated with different concentrations of essential oil of *T. lucida*. The results obtained in spraying *T. lucida* were evaluated up to 96 hours of exposure to *S. zeamais* obtaining a LC50 = 1.83 μ L / mL and LC95 = de 7.32 μ L / mL of air. The results of *T. lucida* show a positive relationship between the concentration of oil and mortality of *S. zeamais*.

Keywords: essential oil, *Tagetes lucida*, *Sitophilus zeamais*

INDICE

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN.....	5
INDICE.....	7
INDICE DE TABLAS.....	9
INDICE DE FIGURAS.....	10
1. INTRODUCCION.....	11
2. ANTECEDENTES.....	15
2.1 Aceites esenciales.....	16
2.2 Manejo de granos.....	17
2.3 Sistema de estudio.....	19
a) <i>Tagetes lucida</i>	19
b) <i>Sitophilus zeamais</i>	21
3. HIPOTESIS.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivo especifico.....	24
5. MATERIALES Y METODOS.....	25
5.1 Colecta de <i>Tagetes lucida</i>	25
5.2 Extracción de aceite esencial por arrastre de vapor.....	25

5.3 Análisis del aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i> por cromatografía de gases.....	26
5.4 Cría de insectos.....	27
5.5 Bioensayo de fumigación.....	28
5.6 Ensayos de olfatometria.....	29
6. RESULTADOS.....	32
7. DISCUSION.....	41
7.1 Repelencia.....	42
7.2 Fumigación.....	43
8. CONCLUSIONES.....	47
9. BIBLIOGRAFIA.....	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i> obtenida por cromatografía de gases-masas.	32
Tabla 2. Análisis probit de la mortalidad de <i>Sitophilus zeamais</i> fumigado con vapores de aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i>	36

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Bioensayo de olfatometría de dos vías.....	30
Fig. 2. Cromatograma de los compuestos mayoritarios de <i>Tagetes lucida</i>	35
Fig. 3. Porcentaje de supervivencia de <i>Sitophilus zeamais</i> a la fumigación con aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i>	37
Fig.4. Efecto de repelencia de <i>Tagetes lucida</i> contra hexano en hembras y machos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	38
Fig. 5. Efecto de repelencia de <i>Tagetes lucida</i> contra aire limpio en hembras y machos adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	39

1. INTRODUCCIÓN

La importancia de la conservación de los granos almacenados constituye una necesidad principalmente alimenticia y económica (Lagunes y Rodríguez 2003; Silva *et al*, 2005; Pérez *et al*, 2007). Las pérdidas de post-cosecha en los cereales almacenados tienen una importancia económica que muchas veces no se valora en su verdadera dimensión, existiendo pérdidas en cantidad y calidad de los granos (Sandoval, 1984). Una de las etapas más críticas para el maíz es la de llenado de almacén, donde se propicia el ataque de diferentes organismos, por lo que la pérdida de los granos durante su almacenaje es el principal problema en post-cosecha que enfrenta el agricultor (Larraín, 1994)

Unas de las plagas de granos almacenados más destructivas corresponden a especies del género *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae), conocidos comúnmente como gorgojos. Ya que aproximadamente el 10% de los granos de cereales pueden ser infestados en el momento de la cosecha, y si la infestación continua con el almacenaje, alrededor del 30 a 50% de los granos pueden estar dañados al cabo de seis meses (FAO. 1999). El gorgojo de maíz (*Sitophilus zeamais* Motschulsky) es el insecto considerado como la plaga de maíz almacenado más importante a escala mundial. Se estima que genera pérdidas del 20 al 90% en áreas subtropicales y tropicales, afectando principalmente a los agricultores de escasos recursos. En México la incidencia de esta plaga supera el 80% en regiones húmedas y es la primera causa de daño de post-cosecha. El hábitat de los gorgojos corresponde a regiones de climas cálidos a templados, alimentándose principalmente de maíz, aunque pueden consumir otros cereales

como arroz, trigo y avena, donde se presentan distintas especies como *Sitophilus oryzae* L. y *Sitophilus granarius* L. (González, 1989; Artigas, 1994).

Cuando se habla de productos almacenados se puede pensar intuitivamente en alimentos. Sin embargo, se pueden considerar como producto almacenado materiales muy diversos que los humanos conservan durante periodos variables para una utilización posterior. La madera, los tejidos, el tabaco, las flores secas, etc., son productos almacenables y susceptibles de ser usados como sustratos alimenticios por diversas especies de insectos que pueden convertirse en plagas, potenciales o reales, de dichos productos. (Aguilar-Amat, 1930; Flores, 1960). En cualquier caso, son las plagas de productos de tipo alimentario, especialmente los granos de cereales, leguminosas y sus derivados, las que tienen una mayor relevancia y sobre las que se han desarrollado más extensamente las técnicas de control. La principal causa de contaminación de los productos almacenados es la denominada infestación cruzada, por introducir productos infestados en un almacén limpio (De los Mozos, 1997).

Entre las plagas que atacan los granos almacenados se distinguen habitualmente dos tipos, el primer grupo engloba las denominadas “plagas primarias”, que son aquellas capaces de perforar la testa de las semillas y por tanto atacar los granos intactos (De los Mozos, 1997). En general son especies altamente especializadas en la infestación de los granos. En este grupo se encuentran los curculiónidos del género *Sitophilus* y, *Rhizopertha dominica*: el Bostríquido *Prostephanus truncatus* y algunas polillas como *Sitotroga cerealella* y *Plodia interpunctella* H. (De los Mozos, 1997; García-Lara et al., 2007)

Las denominadas plagas secundarias solo pueden desarrollarse sobre granos dañados, bien mecánicamente durante su procesado o por la acción de otras plagas. En general las plagas secundarias suelen ser especies de amplio espectro trófico, poco especializadas en el ataque a granos. (De los Mozos, 1997). Debido a las condiciones ambientales existentes en los almacenes, la mayoría de las plagas importantes de almacén tienen un desarrollo rápido y alcanzan con prontitud la madurez sexual. Como resultado, su tasa intrínseca de crecimiento es muy alta y las poblaciones aumentan con rapidez (García Mari, 1991).

Para minimizar las pérdidas causadas por plagas insectiles, normalmente se utilizan insecticidas químicos, que en las dosis recomendadas pueden causar toxicidad tanto a la semilla como a las plántulas y con frecuencia provocan resistencia al insecticida (Rodríguez, 2003). Por esto es necesario estudiar nuevos productos que presenten igual o mejores resultados en el control de las plagas y que además no dañen la calidad de las semillas durante su almacenamiento (Monsanto, 2002). En la búsqueda de alternativas, económicas, biodegradables y disponibles en armonía con el desarrollo sostenible (Ewete, 2007) está el empleo de extractos y aceites esenciales de plantas que contienen compuestos químicos secundarios y activos contra las plagas agrícolas. Muchas de los cuales no han sido evaluadas como fuente de sustancias con propiedades insecticidas (Asawalam, 2006). Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles responsables del aroma de las plantas compuestas por una mezcla de metabolitos secundarios; comúnmente extraídos de hojas, raíces, tallos y frutos de la planta (Martínez 2003; Leyva et al, 2007).

Los componentes de los aceites esenciales incluyen terpenos, compuestos derivados de isopreno (Guenther, 1948). Algunos de estos compuestos tienen propiedades insecticidas y pueden tener efectos inhibidores del crecimiento de insectos. Algunos monoterpenos (Harwood et al, 1990; Regnault-Roger y Hamraoui, 1995), como D-limoneno (Karr et al, 1990), poseen actividades insecticidas y pueden inhibir la reproducción en varias especies de insectos.

2. ANTECEDENTES

Las plantas producen y emiten numerosos compuestos volátiles conocidos como metabolitos secundarios, que no parecen tener una función directa en procesos: fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, pero que intervienen en la defensa vegetal (García y Pérez 2009). Estos compuestos se dividen en tres grupos principales: terpenos, fenoles y alcaloides. Los terpenos y terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, con más de 40,000 moléculas diferentes. Los glucósidos que son metabolitos secundarios de gran importancia cuyo nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres tipos de glucósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Finalmente los alcaloides que son una familia de más de 15,000 compuestos solubles en agua, con al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y con actividad biológica (Anaya y García 2006; García y Pérez 2009).

Los volátiles de las plantas, compuestos principalmente por terpenos, intervienen en numerosas interacciones bióticas, en relación con funciones fisiológicas y ecológicas como la interacción planta-animal (Marín y Céspedes, 2007), y tienen diferentes aplicaciones, desde fármacos, plaguicidas, herbicidas, insecticidas y fungicidas, hasta colorantes, saborizantes y fragancias (Trejo y Rodríguez, 2007). Sin embargo las funciones más importantes de los volátiles son su contribución a la defensa vegetal, como repelentes de herbívoros, atrayentes de enemigos naturales o polinizadores y de dispersores de semillas (Marín y Céspedes, 2007;

Trejo y Rodríguez, 2007; García y Pérez, 2009). Se considera a los metabolitos secundarios como una alternativa para reducir el uso de insecticidas sintéticos en el control de plagas de granos almacenados (Koul *et al.*, 2008), empleándolos como polvos, extractos y aceites esenciales vegetales (Salvadores 2005; Betancur *et al.*, 2010).

2.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son fracciones volátiles líquidas compuestas por mezclas de compuestos, generalmente obtenidas por destilación usando arrastre con vapor de agua (Moreno *et al.*, 2006). La actividad de los aceites esenciales en insectos plaga de productos almacenados se ha evaluado principalmente midiendo su toxicidad por dos métodos: contacto y fumigación (Koul *et al.*, 2008; Kumar 2008). Se sabe por ejemplo que los aceites esenciales con alto contenido de monoterpenos pueden actuar como insecticidas contra plaga de maíz almacenado (Sampson *et al.*, 2005). También los AE han sido reportados como fungicida contra hongos patógenos, para los que se han reportado compuestos como eucaliptol, α -pineno, limoneno, carvacrol y *p*-cimeno, los cuales pueden inhibir el crecimiento de micelio de hongos fitopatógenos (Devakumaet *al.*, 2004; Marangon *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2009; Scora y Scora, 2009)

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Martínez, 2003). Son

frecuentemente volátiles y son usados recientemente para producir bioplaguicidas (Isman, 2000). Es conocida la actividad antibacteriana, antifúngica y antiséptica de los aceites esenciales, por lo tanto sus aplicaciones son variadas (Moreno *et al*, 2006). Los efectos tóxicos de los aceites esenciales se evalúan por bioensayo de contacto, fumigación o consumo de dieta (Hummelbrunner e Isman, 2001; Steffanazzi et al, 2004).

2.2. Control de plagas de granos almacenados

Con la finalidad de conservar los granos almacenados de las principales plagas que los atacan, se han planteado múltiples métodos, entre los cuales están los de control físico, químico y biológico (Silva, 2006). Los métodos químicos son aquellos donde se emplean plaguicidas sintéticos, y en los métodos biológicos involucran el uso de plantas en distintas formas; polvos, extractos, aceites etc. Existen otros métodos como el manejo de la temperatura y humedad, que son factores abióticos determinantes en el desarrollo de los insectos. Por otra parte, los granos son organismos vivos en estado de latencia que deben ser conservados con una baja tasa metabólica para conservar su calidad y poder germinativo. Las temperaturas elevadas mantenidas durante un cierto tiempo reducen la supervivencia y la ovoposición de numerosas plagas de almacén, especialmente en condiciones de baja humedad (Pradzynska, 1995). Se ha comprobado en laboratorio que temperaturas de 45-60 °C eliminan todas las fases de *Sitophilus granarius* sin afectar al aspecto y la capacidad germinativa de los granos de trigo (Pixtón, 1982). La relación entre humedad relativa en la atmósfera intergranular y el contenido en humedad de los granos es un fenómeno complejo.

Habitualmente se considera que la humedad relativa debe estar por debajo del 65% y el contenido en humedad del grano no debe superar el 14% para conseguir una conservación adecuada (Pixtón, 1982). Tras ser cosechados, los granos tienen un porcentaje alto de humedad y es conveniente secarlos antes de su almacenamiento. Se ha reportado que con una humedad inferior al 14% muchas especies de insectos son incapaces de desarrollarse sobre los granos. Plagas como *Sitophilus*, son incapaces de ovipositar en granos con un contenido de humedad inferior al 10% (Birch, 1958).

Existe también el uso de feromonas, que en el caso de plagas de coleópteros típicos de almacén (*Cryptolestes* spp, *Oryzaephilus* spp, *Rhizopertha* spp., *Sitophilus* spp. o *Tribolium* spp.) los adultos son muy longevos, y se alimentan activamente del sustrato atacado. Estas estrategias vitales se corresponden con dos sistemas de comunicación química (Burkholder, 1982). Esta especie los machos producen una feromona de agregación que atrae tanto a hembras como a otros machos a una zona determinada.

2.3 SISTEMA DE ESTUDIO

Clasificación taxonómica y descripción de *Tagetes lucida*

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Género: *Tagetes*

Especie: *Tagetes lucida* Cav.



Fotografía obtenida en:

http://www.bio.utexas.edu/courses/bio406d/images/pics/ast/Tagetes_lucida.htm

a) *Tagetes lucida*

Tagetes lucida es una hierba perenne que crece en bosques nativos, conocida comúnmente como Pericón o Santa María (Rzedowski, 2001). Esta especie aromática ha sido usada tradicionalmente en diferentes aplicaciones terapéuticas, por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes (Céspedes *et al.*, 2006), incluso nematocida (Siddiqui y Alam, 1988). *T. lucida* es una planta ruderal en áreas de montaña y en terreno agrícolas, crece en vegetación secundaria en

bosques de pino, pino-encino y tropicales caducifolios (Neher, 1996; Turner, 1996; Villarreal, 2003); es erecta, herbácea, perenne, con una altura de 30 hasta 100 cm, hojas simples sésiles, cabezuelas en corimbos, flores liguladas amarillo claro o amarillo anaranjado, olor dulce de aroma anisado al estrujarse (Turner, 1996; Villarreal, 2003; SEMARNAT, 2006). Prospera en altitudes de 800 a 2700 msnm, (Turner, 1996; Villarreal), aunque Neher (1966) señala el intervalo de 1500 hasta 4100 msnm, que incluye desde México hasta Centro América. Se le conoce como Pericón, aunque tiene otros nombres: flor de Santa María, yerbanís, anisillo, coronilla, hierba de las nubes, falso hipericon, hierba añil, periquilla, yitapericóo, curucumis, curucumin, tzitziqui, nana uarhi (purépecha), guía laga-zaa (zapoteco), baschigoko (tarahumara), cuauhiyautli-zacayahucti-yiauhitli (náhuatl) (Villarreal, 2003; SEMARNAT, 2006). Se usa como pigmento amarillo para teñir telas; saborizante anisado en bebidas y licores; condimento de elotes y chayotes hervidos; té; sahumar en casos de sustos y espanto; ramillete ceremonial y alimento forrajero para ganado y aves de traspatio. Su uso medicinal se extiende a 25 padecimientos, utilizado como humo, cataplasma y té (SEMARNAT, 2006). Se ha sugerido que esta actividad biológica está en función de su composición química: compuestos fenólicos y terpenos que varían según el genotipo, medio ambiente y condiciones agronómicas en las que crece (Bakkali *et al.*, 2008). La composición química de *T. lucida* ha sido estudiada en diferentes trabajos, que incluyen: extractos de maceración y aceite esencial extraído por hidrodestilación (Bicchi *et al.*, 1997). Se ha reportado como sus componentes principales anetol, metileugenol y estragol (Bicchi *et al.*, 1997). Se ha sugerido que los extractos hexánicos de capullos de clavo de olor, cuyo contenido es principalmente eugenol

(Guenther, 1950), tienen efecto tóxico en *Sitophilus zeamais* y *Tribolium castaneum*, y que pueden reducir su fecundidad (Ho *et al.*, 1994). Obeng-Ofori y Reichmuth (1997) también reportan que el eugenol puede ser tóxico para las cuatro especies de coleópteros de productos almacenados: *S. zeamais*, *S. granarius*, *T. castaneum* y *Prostephanus truncatus*. Isoeugenol, otro de los componentes del aceite esencial de *T. lucida*, y aceite esencial de nuez moscada (Guenther, 1950), ha mostrado tener actividad tóxica y antialimentaria contra *S. zeamais* y *T. castaneum* (Huang *et al.*, 1997). El metil-eugenol, ha mostrado tener actividad antialimentaria contra las larvas de *Pieris rapae crucivora* L. (Yano y Kamimura, 1993). Sin embargo, aún se desconoce el efecto de estos compuestos en mezclas.

b) *Sitophilus zeamais*

Nombre común: Gorgojo del maíz

Phylum: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: *Curculionidae*

Subfamilia: Dryophthoridae

Género: *Sitophilus*

Especie: *Sitophilus zeamais*



Fotografía obtenida en:

en:http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/eafrinet/maize_pests/key/maize_pests/Media/Html/Sitophilus_zeamais_Motschulsky_1855_-_Maize_Weevil.htm

Es un gorgojo de aproximadamente 5 mm de longitud, de color pardo negruzco, cuya cabeza se proyecta en forma de pico (Bergvinson. 2007). Su cabeza está proyectada en forma de trompa con antenas acodadas en forma de maza. El protórax esta densamente cubierto de presiones circulares tiene alas y vuela con gran facilidad, sus élitros presentan cuatro manchas de color amarillento. La distribución de *S. zeamais* es mundial, aunque afecta principalmente a las zonas tropicales y subtropicales húmedas, también se le encuentra en zonas templadas, especialmente en los lugares donde se cultiva el maíz. Se considera una plaga primaria porque los adultos son capaces de perforar los granos y sus larvas se desarrollan en el interior del grano, principalmente cereales, tanto en el campo como en almacén. Los daños se inician cuando la hembra perfora el grano para ovipositar, posteriormente las larvas forman surcos en el endospermo para alimentarse pasando por un estadio de pupa y cuando se convierten en adultos perforan el grano y salen al medio ambiente, para iniciar su nueva infestación (Bergvinson, 2007). Una sola hembra puede poner de 300 a 400 huevos durante su vida. Los adultos pueden vivir de 5 a 8 meses. Se producen entre 6 y 7 generaciones por año dependiendo de las condiciones climáticas. El adulto y la larva dañan los granos, éstos quedan totalmente perforados y ya no son aptos para el consumo, perdiendo peso y poder germinativo. Los adultos poseen hábitos voladores, por esta razón comienzan su ataque en el campo, continuándolo durante el almacenaje. *S. zeamais* es el principal responsable de las infestaciones que preceden a la cosecha, debido a que su tendencia a volar es mayor en esta especie (Fleitas 2007).

.3. HIPÓTESIS

El aceite esencial de *Tagetes lucida* tiene efecto antagonista contra *Sitophilus zeamais*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERAL.

Determinar si el aceite esencial de *Tagetes lucida* tiene efectos antagonistas contra *Sitophilus zeamais*.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener aceite esencial de *Tagetes lucida* por arrastre de vapor.
- Caracterizar químicamente el aceite esencial de *Tagetes lucida* por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Evaluar el aceite esencial de *Tagetes lucida* como bioplaguicida y como repelente contra *Sitophilus zeamais*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta de *Tagetes lucida*

Tagetes lucida se colectó en los meses de septiembre y octubre de 2012 en la localidad de Capula, Michoacán (101°23'36" de longitud oeste y 19°40'25" de latitud norte a 2100 msnm). El ejemplar de referencia será depositado en el herbario de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

5.2 Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial de las hojas frescas de *T. lucida*, se realizó por medio de una destilación por arrastre de vapor de agua en una autoclave marca Paragón modificada, donde se depositaron 4 kg de hoja fresca en su interior a una temperatura de 100°C (Ríos, 2010). A la autoclave modificada en una de las válvulas de escape se le adaptó el sistema de intercambiador de calor como condensador y un embudo de separación con 20 ml de hexano para recoger el agua condensada de la destilación. Posteriormente se filtró la muestra para eliminar impurezas a través de sulfato de sodio aproximadamente una pisco. La cantidad de aceite esencial total que se obtuvo después de haber realizado la destilación fue de 20 ml y se dejó en el refrigerador a -4°C para que no se volatilizara la muestra. Los compuestos hidrofóbicos de la planta quedaron disueltos en el hexano (Ríos, 2010).

5.3 Análisis químico del aceite esencial de *Tagetes lucida*

El aceite esencial de *T. lucida* se analizó en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890) acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent MS 5973N). Se inyectaron 0.5 µL, con división (split 60:1) a una temperatura de inyector 220°C, usando helio como gas acarreador (8.84 psi) con flujo constante de 64.4 mL/min. La temperatura programada del horno: inicio 60°C por 5 minutos, después aumentó 5°C/min hasta llegar a 200°C, para finalmente aumentar 25°C/min hasta llegar a 300°C. Las condiciones usadas en el detector selectivo de masas fueron: velocidad de flujo de 1 mL/min, voltaje de ionización a 70 eV, temperatura de la interfase de 280°C, modo SCAN, e intervalo de masas de 35-500 m/z.

Los compuestos se identificaron por comparación de espectros de masas, con inyección de estándares e Índices Kovats. La comparación de espectros de masas se hizo manualmente con los espectros de masas de la Biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST02), aceptando la identificación de compuestos puros con más del 90% de concordancia. Los estándares comerciales (Sigma Aldrich) que se inyectaron fueron: estragol y metil eugenol. Los Índices Kovats se calcularon inyectando dos series de alcanos (C₈-C₂₀ y C₂₁-C₄₀) obtenidas comercialmente (Sigma Aldrich), en las mismas condiciones en las que se analizó el aceite, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice Kovats} = \frac{[\text{TR compuesto} - \text{TR}_n]}{\text{TR}_n - \text{TR}_{n-1}} * (100 * z) + (100 * n)$$

Donde TR_n es el tiempo de retención del hidrocarburo eluído antes del compuesto desconocido; TR_N es el tiempo de retención del hidrocarburo eluído después del compuesto desconocido; n es el número de carbonos del compuesto eluído antes que el compuesto desconocido y z la diferencia de átomos de carbono entre ambos hidrocarburos. Los índices calculados (Tabla 1) fueron comparados con los reportados en el literatura (Adams, 2007). La concentración de cada compuesto en la muestra se calculó con el método de área y se reportó en porcentaje (Tabla 1).

5.4 Cría de *Sitophilus zeamais*

Se utilizaron adultos de *S. zeamais*, de una cría mantenida en condiciones controladas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura. El cultivo de *S. zeamais* se realizó con 4 kg maíz comercial adquirido en Morelia, Michoacán. Este maíz se limpió con un tamiz de No. 10 con una apertura de 17.3 mm y se esterilizó refrigerándolo a -4°C por 48 horas. Posteriormente se colocaron 200 insectos adultos no sexados en un frasco esterilizado de un litro con 750 g de maíz estéril. Esta cría se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 días para favorecer la reproducción de los gorgojos. Después de este periodo de oviposición los adultos fueron extraídos y los frascos con maíz fueron mantenidos a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura y tres semanas después se obtuvo la primera generación de insectos adultos conocida como F1. Posteriormente se realizó la limpieza de maíz cada 24 horas, para la cual se utilizó un tamiz de No. 10 (malla de 17.3 mm) en la que se agregaba una cierta cantidad de maíz, y se agitaba vigorosamente aproximadamente durante dos minutos para obtener los insectos que se utilizaron en los experimentos. Posteriormente se realizó el sexado de los insectos para realizar el bioensayo de olfatometría. La

diferenciación de sexos se realizó mediante el criterio de Halstead (1963): el rostrum del macho es de menor longitud, más ancho y rugoso que el de la hembra que tiene el rostrum mas liso y delgado. Para obtener a los insectos no apareados se revisaba cada 24 horas si ya habían emergido, posteriormente fue separado insecto por insecto y fue colocado en frascos diferentes hasta determinar el sexo de cada insecto.

5.5 Bioensayo de Fumigación

La fumigación de insectos se hizo con papel filtro impregnado de aceite esencial de *T. lucida* en frascos ámbar de 8 mL. Se impregnó un disco de papel filtro con 2 cm² de diámetro con diferentes concentraciones de aceite esencial de *T. lucida* a concentraciones (0.18, 0.37, 0.75, 1.5, 3.12, 6.25 y 12.5 µL/mL aire), el control (hexano) y un testigo. Este papel filtro se colocó en la tapa de un vial ámbar de 8 mL en el cual se depositaron 5 insectos adultos de la misma edad. Cada tratamiento se repitió 10 veces, por lo que se trabajó con un total de 450 insectos adultos. La mortalidad se evaluó cada 24 horas durante 7 días donde se extrajeron todos los insectos y se cuantificaron los vivos y muertos para determinar el porcentaje de mortalidad. Se consideró muerto a todo insecto que no se movió ante la aplicación de un estímulo físico, que fue con el toque de una pinza. (FAO, 1980). Los resultados obtenidos se realizó mediante análisis probit para corroborar si el aceite de *T. lucida* causaba efecto toxico sobre *Sitophilus zeamais* y se evaluó hasta las 96 horas de exposición.

5.6 Ensayos de olfatometría

Para evaluar la respuesta de adultos de *S. zeamais* al aceite esencial de *T. lucida* utilizamos un olfatómetro de dos vías o en forma de "Y". Los brazos son cámaras de vidrio sellados con conectores y mangueras de silicón que transportan aire limpio. Cada olfatómetro estaba conectado en un extremo a un medidor de flujo por medio de mangueras de silicona con un diámetro interior de 9mm. En el otro extremo cada vía está conectada a una pipeta Pasteur con un papel filtro de 1cm² impregnado de la sustancia a evaluar, y en el otro, a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 100 mL de agua destilada para humedecer el aire. Los olfatómetros se lavaron con acetona y se secaron en el horno de secado 24 horas antes de realizar la prueba. Se usaron dos olfatómetros. El cuerpo del olfatómetro mide 10 cm y la longitud de cada brazo es de 10 cm con un diámetro interno de 1 cm. El ensayo se realizó en un cuarto oscuro y con un par de lámparas de luz fluorescente de 55 W, cada brazo se conecto a un flujo regulado de aire de 60 mL/min a una distancia de 30 cm del olfatómetro, sostenidas por dos soportes universales (Fig. 1).



Figura. 1. Bioensayo de olfatometría de dos vías.

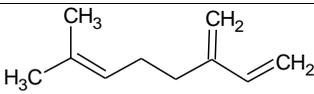
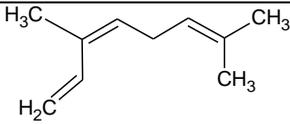
La respuesta de *S. zeamais* al aceite esencial de *T. lucida* se midió en adultos sexados que se mantuvieron en ayunas por 24 horas. Inicialmente se realizó un ensayo con 5 insectos, probando su preferencia/rechazo únicamente con vacío para asegurarse que el insecto no tuviera preferencia por alguno de los brazos. Posteriormente, se procedió a realizar la prueba de olfatometría con el aceite esencial de *T. lucida*, con un olfatómetro de dos vías o “Y”, conectando cada brazo a un flujo regulado de aire de 60 ml/min a una distancia de 30 cm del olfatómetro. Se utilizaron dos fuentes de olor (aceite esencial y hexano) en el papel filtro colocado en el extremo de cada brazo. Se evaluaron cinco dosis (0.5, 1, 2, 4 y 8 μ L) que se aplicaron al papel filtro con jeringas Hamilton de 1 y 10 μ L. Para cada medición se observó el comportamiento del insecto durante 5 minutos en la que se observó que las hembras elegían más rápido, a diferencia de los machos que eran indecisos pues se quedaron caminando en el cuerpo del olfatómetro. Se realizaron 30 repeticiones por concentración, con un total de 150 hembras y 150 machos.

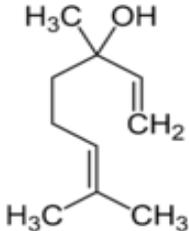
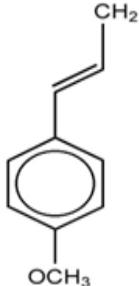
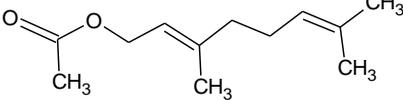
Los olfatosmetros se cambiaron aleatoriamente después de 5 repeticiones, cambiando de posición tanto la muestra (aceite esencial) como el control (hexano) para asegurarse la respuesta del insecto. Después de cada 5 repeticiones los olfatosmetros se lavaron con acetona y posteriormente se secaron en la estufa antes de volver a usarlos. Se realizó una prueba binomial para saber si hubo diferencia significativa. Se realizaron pruebas comparando la respuesta de *Tagetes lucida* contra hexano y aire limpio, hexano contra aire limpio solo en hembras y a concentraciones altas de hexano.

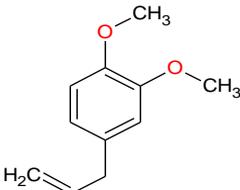
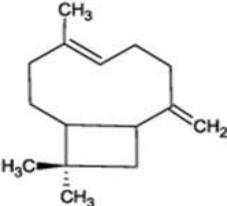
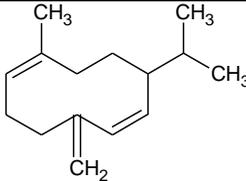
6. RESULTADOS

La cantidad de aceite esencial obtenido fue de 20 mL partir de 4 kg de planta. El análisis de su composición química de *T. lucida* indica que sus componentes mayoritarios son metileugenol y estragol, pues los dos constituyen el 93% del aceite (Tabla 1).

Tabla. 1. Composición química del aceite esencial de *Tagetes lucida* obtenida por cromatografía de gases-masas. Solo se incluyeron los componentes con concentración mayor al 0.19%. TR= Tiempo de Retención IK= Índice Kovat,.

TR	COMPUESTO	%	IK
6.06	 β -mirceno	2.3	992
7.36	 β -cis-Ocimeno	1.3	1048

8.65	 <p style="text-align: center;">β-Linalol</p>	2.1	1101
11.38	 <p style="text-align: center;">Estragol</p>	31.2	1206
15.99	 <p style="text-align: center;">Acetato de geranilo</p>	0.7	1383

16.78	 <p data-bbox="486 541 630 569">Metileugenol</p>	62.1	1416
17.07	 <p data-bbox="486 971 630 999">β-Cariofileno</p>	0.2	1426
18.57	 <p data-bbox="474 1285 643 1313">Germacreno D</p>	0.2	1487

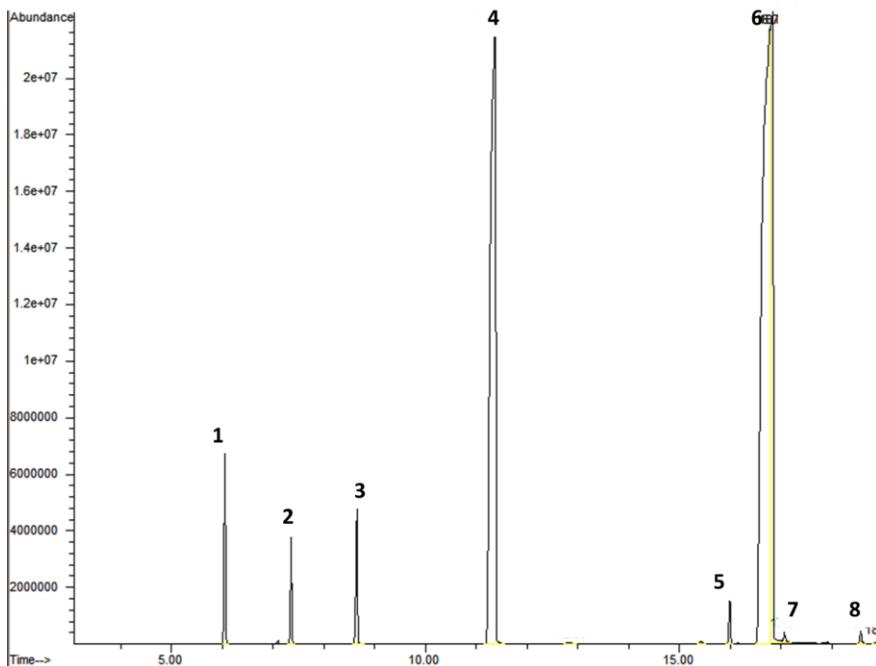


Fig. 2. Compuestos mayoritarios de *Tagetes lucida*: 1. β -mirceno, 2. β -ocimeno, 3. β -linalol, 4. estragol, 5. acetato de geranilo, 6. metileugenol, 7. β -cariofileno, 8.

Efectos insecticidas del aceite esencial por fumigación

Los resultados obtenidos en fumigación muestran que al aumentar el tiempo de exposición de *S. zeamais* al aceite esencial, disminuye la cantidad de aceite necesaria para matar el 95 % de la población. Para el aceite de *T. lucida*, a las 72 horas después de su aplicación, las CL_{50} y CL_{95} fueron de 6.35 y 40.32 μ L/ml de

aire, respectivamente. A las 96 h de aplicación, las CL₅₀ Y CL₉₅ fueron de 1.83 y 7.32 µL/ml, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis probit de la mortalidad de *Sitophilus zeamais* fumigado con vapores de aceite esencial de *Tagetes lucida*.

Tiempo (horas)	Pendiente ± SE	Intercepto ± SE	LC50	LC90	Intervalo de 95% C.L	X ^{2b}
24	1.60 ± 0.24	-3.04 ± 0.36	78.83 µL/ml	495.75 µL/ml	57.35 ± 128.99	1.56
48	2.38 ± 0.50	-3.13 ± 0.73	20.81 µL/ml	72 µL/ml	- - -	6.84
72	1.59 ± 0.21	-1.28 ± 0.23	6.35 µL/ml	40.32 µL/ml	4.44 ± 8.52	3.76
96	2.13 ± 4.02	-0.56 ± 0.26	1.83 µL/ml	7.32 µL/ml	1.09 ± 2.48	0.54

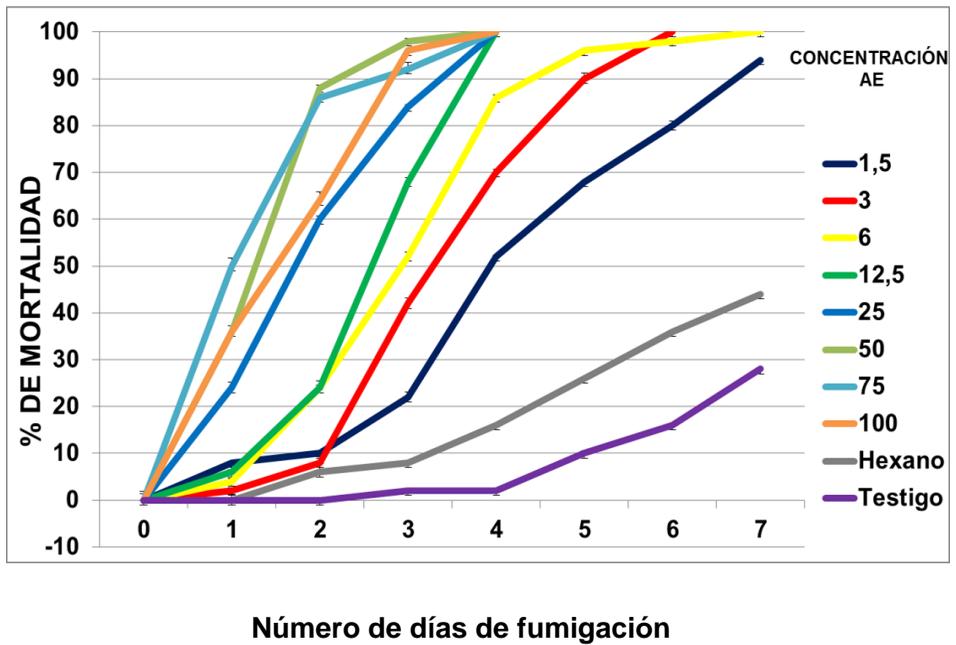


Fig. 3. Porcentaje de supervivencia de *Sitophilus zeamais* a la fumigación con aceite esencial de *Tagetes lucida*

Ensayos de olfatometría

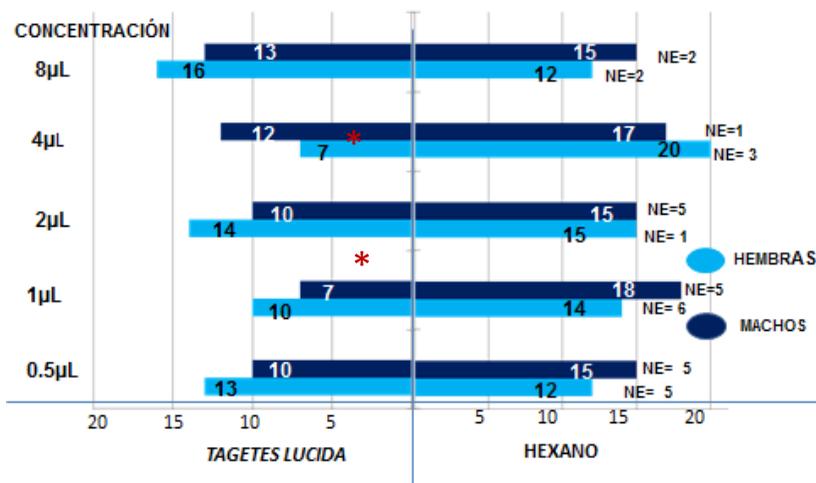


Fig.4. Efecto de repelencia de *Tagetes lucida* en hembras y machos adultos de *Sitophilus zeamais*. NE indica no elección y * indica la concentración donde la diferencia entre tratamientos fue significativa.

El resultado obtenido del ensayo de olfatometría, de *T. lucida* contra hexano, se encontró que al aumentar la concentración del aceite esencial se observó una respuesta diferencial entre hembras y machos: Se realizó la prueba binomial para comprobar concentración por concentración si hubo diferencia significativa en hembras y machos. Se encontró que las concentración de 1 µL en machos y 4 µL en hembras, eran repelentes (Fig. 3). Sin embargo, cuando se realizó la prueba de chi cuadrada para comparar las respuestas a todas las concentraciones tanto en hembras como en machos no hubo repelencia o atracción consistente (hembras, $\chi^2 = 4.394$, g.l. = 4, $p = 0.355$; machos, $\chi^2 = 2.198$, g.l. = 4, $p = 0.699$).

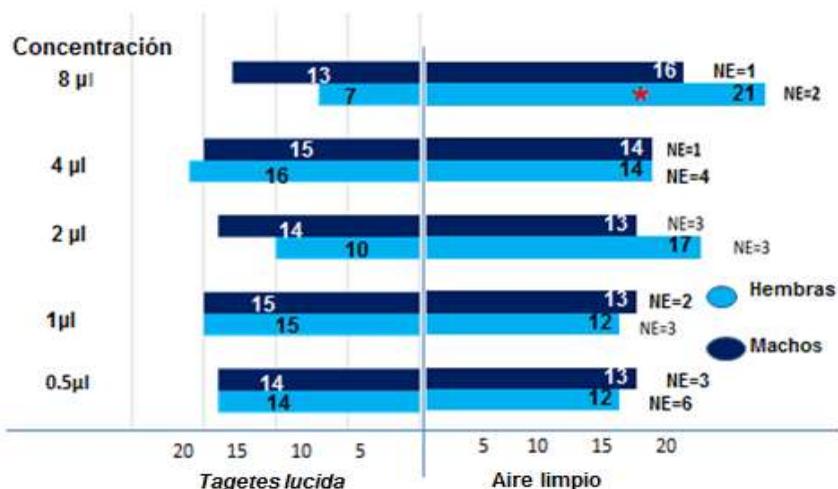


Fig. 5. Efecto de repelencia de *Tagetes lucida* en hembras y machos adultos de *Sitophilus zeamais*. El tratamiento testigo fue aire limpio. NE indica no elección y * indica la concentración donde la diferencia entre tratamientos fue significativa

El ensayo de olfatometría de *Tagetes lucida* con aire limpio se realizó para corroborar si *Tagetes lucida* es repelente o no al gorgojo de maíz, se aplicó la prueba binomial en hembras y machos. Sólo en hembras se encontró una diferencia significativa en la concentración de 8µL. Cabe mencionar que se realizó una prueba de aire limpio contra hexano, con sólo en hembras, en una concentración de 0.43 y 0.86 µL/cm². Se observó que el hexano en estas concentraciones ensayadas causaba repelencia al insecto con un 35 % por lo que se concluye que el aceite de *T. lucida* es repelente para las hembras a la

concentración ensayada de $8 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ ($0.86\mu\text{L}$ hexano presente en el aceite). Pero parte de la repelencia se debe al hexano que contenía.

7. DISCUSIÓN

Los compuestos mayoritarios de *Tagetes lucida* fueron metil-eugenol (62.1%) y estragol (31.2%), compuestos que previamente se habían detectado en *Tagetes* (Marotti *et al.*, 2004; Ogunwande y Olawore, 2006; Moghaddam *et al.*, 2007).

En *Tagetes lucida* colectado en Capula, Michoacán, se encontraron ocho compuestos, siendo mayoritarios estragol, y metileugenol, ambos contituyendo un 93% del aceite. Esta composición es similar a la reportada para *T. lucida* colectada en Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México donde los compuestos mayoritarios fueron metil eugenol (64%) y estragol (29.4%) (Fulgencio-Negrete, 2013). En contraste, el análisis de esta especie colectada en Costa Rica, determinó treinta compuestos, resultando mayoritario (95-97%) el metil-chavicol (estragol) (Ciccio 2004). Muñoz *et al.* Encontraron en Colombia alto contenido de estragol en flores (93%) y hojas (93%) de *T. lucida* fue cercano al reportado por Ciccio 2004 (95 y 97%, respectivamente).

La composición química de los aceites esenciales varía dependiendo de la ubicación geográfica, época de colecta y la forma de extracción de la planta, un ejemplo de ello son los resultados de las muestras de Costa Rica difieren de los obtenidos previamente de plantas que crecen en México (Guzmán y Manjarrez, 1962) donde metileugenol asciende a 80% y estragol sólo el 12%. Todos estos resultados de composición química contrastante sugieren que *T. lucida* probablemente tiene al menos dos quimiotipos. Habría que realizar un análisis sistemático de la composición de *T. lucida* a lo largo de su amplia distribución geográfica. La consideración de estas diferencias es importante cuando se hacen

los ensayos para utilizar la planta de la misma especie proveniente de diferentes regiones, pues en general se ha reportado que el efecto insecticida de los aceites esenciales depende de su composición química (Sampson et al., 2005; Nerio et al., 2009; Samir et al., 2009; Long et al., 2010).

7.1 **Olfatometria**REPELENCIA.

Los adultos de *S. zeamais*, son capaces de detectar aceites esenciales a través del olfato, evitándolos cuando tienen oportunidad de escoger (Jayasekara *et al.*, 2005). El efecto repelente es una propiedad relevante a ser considerada al momento de escoger un aceite esencial para el control de plagas de granos almacenados. De modo general, cuanto mayor es la repelencia, menor será la infestación, resultando en la reducción o supresión de la oviposición y consecuentemente, del número de insectos emergidos. Por ejemplo, Serrato *et al.* (2003) evaluaron mediante bioensayos en invernadero y campo el aceite esencial extraído de *Tagetes filifolia* para controlar la mosquita blanca, logrando total repelencia. Sin embargo, en el presente trabajo en el ensayo *T. lucida* contra hexano no se pudo distinguir claramente el efecto repelente para *Sitophilus zeamais*, porque el hexano tiene efecto repelente por sí mismo y esto implicó que se puso a competir dos cosas repelentes entre sí. Esto fue contrastante con el ensayo de *T. lucida* con aire limpio, donde se encontró repelencia contra las hembras en la concentración 8 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. Por lo que se concluye que el aceite de *T. lucida* es repelente para las hembras en la concentración de 8 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ (0.86 μl hexano), aunque parte de la repelencia se debe al hexano que contenía el aceite.

7.2 Bioensayo de fumigación

El efecto fumigante del aceite de *Tagetes lucida* puede explicarse por los compuestos mayoritarios que contiene y posiblemente de los efectos de la combinación de los mismos. Los compuestos mayoritarios de *T. lucida*, metileugenol y estragol han sido reportados como tóxicos para *Sitophilus zeamais*. Un extracto de capullos de clavo de olor en hexano con alto contenido de eugenol mostró un efecto de toxicidad por contacto, en *S. zeamais* y *Tribolium castaneum*, con cinco a seis diluciones en serie de eugenol (12-35%) (Guenther, 1950). Obeng-Ofori y Reichmuth (1997) también informaron que el eugenol a concentraciones 1, 3, 5 y 10 µl/ml de contacto era tóxico para las cuatro especies de coleópteros de productos almacenados, a saber, *S. zeamais*, *S. granarius*, *T. castaneum* y *Prostephanus truncatus*. El metileugenol, un análogo de eugenol extraído de *Artemisia capillaris* Thunb., tiene actividad antialimentaria a concentraciones de peso corporal para insectos para las larvas de *Pieris rapae crucivora* L. (Yano y Kamimura, 1993).

Se ha reportado que los compuestos mayoritarios de *T. lucida* tienen efecto tóxico en insectos adultos de *S. zeamais* y *T. castaneum* por contacto, principalmente el eugenol (Obeng-Ofori y Reichmuth 1997). En bioensayos de aplicación tópica, el eugenol a LD₅₀ 31mg/mg puede causar una mortalidad similar en insectos adultos de *S. zeamais* y *T. castaneum* (Ho, et al. 1994). Los ensayos reportados fueron por contacto y por aplicación tópica, y lo que se realizó en este ensayo fue por

fumigación en la que se encontró los mismos resultados teniendo un efecto tóxico contra *Sitophilus zeamais*.

No hay estudios reportados sobre los efectos combinados de los compuestos puros presentes en *T. lucida*, sin embargo los compuestos de metileugenol, eugenol e isoeugenol combinados con Deltametrina insecticida de la familia de piretroides la toxicidad de contacto ensayado en *T. castenum* y *S. zeamais* se incrementó de dosis subletales a letales. Por otro lado la combinación de timol y carvacrol y eugenol eran sinérgicamente activa contra *Escherichia coli*. Ya que los metabolitos secundarios no actúan solos sino en mezclas (García-Rodríguez et al., 2012), probablemente la mezcla de compuestos presentes en el aceite esencial de *T. lucida* contribuyeron al efecto tóxico que se observó en este trabajo, pues los componentes del aceite ya han sido reportados como tóxicos para *S. zeamais* (Morales et al., 2007; Martínez 2003; Marín et al., 2007).

Los estudios que reportan efecto insecticida con volátiles por exposición en *S. zeamais*, muestran que las concentraciones letales de algunos aceites esenciales son muy bajas. Huang et al, 2000 reportaron una CL_{50} de 0.063 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de los compuestos volátiles de *Lippia origanoides*, mientras que Long et al., (2010) reportaron para adultos de *S. zeamais* una CL_{50} = de 0.29 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del aceite de *Artemisia mongolica* por ensayos de fumigación. Pimienta Ramírez (2011) reportó que el aceite esencial de *E. glabratum*, por ensayo de fumigación, tiene efecto insecticida para los adultos de *S. zeamais* con una CL_{50} de = 18.0 y una CL_{95} de 72.0. $\mu\text{L} / \text{mL}$.

Los resultados obtenidos en fumigación con *Tagetes lucida* se evaluaron hasta las 96 horas de exposición hacia *S. zeamais* obteniendo una CL_{50} de = 1.83 y una CL_{95} de 7.32 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y en la que se demostró que a mayor tiempo de exposición el aceite esencial de *T. lucida* muestra una actividad insecticida hacia *S. zeamais* y por ende a mayor concentración se muestra mayor mortalidad en menor tiempo.

Este estudio mostró que el aceite esencial de *T. lucida* como insecticida se considera viable ya que observamos una $CL_{50} = 1.83 \mu\text{L}/\text{mL}$ no muy elevada comparada con la que reporto Pimienta Ramírez (2011) una $CL_{50} = 18.0 \mu\text{L}/\text{mL}$ con *E. glabratum*. Lo obtenido en *T. lucida* por fumigación se aproxima a lo reportado por Long et al., (2010), una $CL_{50} = 0.29 \mu\text{L}/\text{mL}$ del aceite de *Artemisia mongolica*

Las concentraciones del aceite esencial de *T. lucida* usadas en este trabajo pueden tener un uso potencial para fumigar a *S. zeamais*, debido a que hubo mortalidad en concentraciones bajas y en un corto periodo de tiempo. Además, no se ha reportado que esta planta sea tóxica para humanos a pesar de su amplio uso. Es de interés mencionar que el estragol o metil-chavicol es un componente común de varias plantas aromáticas utilizadas como aditivos alimentarios como el anís, albahaca, hinojo, tarragón y aguacate criollo. Un estudio en ratones reveló que el metil-chavicol es un carcinógeno genotóxico después de la exposición crónica o en dosis superiores a 0,05 mg/kg. (De Vincenzi *et al.* 2000). Sin embargo la toxicidad del estragol se puede eliminar con relativa rapidez del organismo humano, por lo que el uso de *T. lucida* cantidades bajas o como especia aromática no debe suponer un riesgo para la salud.

No se sabe si el aceite de *T. lucida* afecta a la germinación de las semillas de maíz, por lo que habría que hacer los experimentos correspondientes. Por lo pronto podría ser usado como fumigante para semillas de maíz destinadas al consumo. Sin embargo el uso del aceite esencial de *T. lucida* tendría que evaluarse en campo.

De acuerdo al rendimiento de aceite esencial obtenido en este trabajo (XX mL/kg), para extraer una cantidad suficiente de aceite para ser utilizada como método de control de *S. zeamais*, sería necesaria una cantidad considerable de la planta. Por ejemplo, para eliminar por fumigación al 50% y 95 % de la población presente en un recipiente de 200 kg serían necesarios destilar 26 kg y 104 kg de la parte aérea de *T. lucida* en un periodo de 4 y 13 días para obtener 130 ml y 520 ml de aceite, respectivamente.

Estos resultados indican que, ya que esta maleza es muy abundante, el trabajo para la recolección de las hojas, extracción del aceite y la cantidad de aceite requerido para erradicar esta plaga sería viable para el método de control para productores con acceso a poblaciones grandes de *T. lucida*. Sin embargo el acceso a una autoclave y otros insumos como el hexano es limitaría el aprovechamiento de la especie como bioinsecticida para pequeños productores. Pero se pueden diseñar destiladores poco costosos y ensayar otras sustancias hidrófobas (como aceite comestible) para mejorar la recolección del aceite esencial.

8. CONCLUSIÓN

La hipótesis planteada con los resultados obtenidos se demuestra que la composición química de *Tagetes lucida* metileugenol y estragol tiene actividad insecticida sobre *Sitophilus zeamais*.

Las propiedades insecticidas de *Tagetes lucida* a concentraciones elevadas de 6.25 y 12.5 $\mu\text{l}/\text{mL}$ aire causan mayor mortalidad a *Sitophilus zeamais*.

El aumento del tiempo de exposición, aumenta el efecto tóxico del aceite esencial de *Tagetes lucida*, es decir que se requiere de menor concentración para matar el mismo número de insectos.

9. BIBLIOGRAFIA

Abbott, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267.

Aguilar-Amat, J. B., 1930. Un enemigo de los cables telefónicos. Bulletin de la Institución Catalana de Historia Natural, 30: 59-59.

Akob, C. A.; F. K. Ewete .2007. The efficacy of ashes of four locally used plant materials against *Sitophilus zeamais* (coleóptera: Curculionidae) in Cameroon. International Journal of Tropical Insect Science. 27: 21-26.

Alebeek, F.A.N, VAN, 1996.- Natural Suppression of bruchid pests in stored cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in West Africa. Journal of Sustainable Agriculture, 42 (1): 55-60.

Anaya, L. A y F. J. Espinosa. 2006. La química que entretiene a los seres vivos. Ciencias (83): 4-13.

Arango, F.P y Vázquez. V.M 2008. Efecto tóxico de *Verbena officinalis* (familia Verbenaceae) en *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). Revista Lasallista de Investigación 5 (2): 74-82.

Archer, S. A., 1996.- Preliminary studies on the use of *Beuveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleóptera: Curculionidae) in the laboratory. Journal of Stored Products Research, 32 (2): 105-113.

Annis, P.C.Banks, H. J., 1993.- Is hermetic storage of grains feasible in modern agricultural systems? In COREY, S., DALL, D. MILNE, W. (Eds.).*Pest control sustainable agricultura*, C.S.I.R.O. (Australia).pp.: 479-482.

Arnason, J. T, Baum B, Gale J, Lambert J D H, Bergvinson D, Philogene B J R, Serratos A, Mihm J y Jewell D C (1994) Variation in resistance of Mexican landraces of maize to maize weevil *Sitophilus zeamais*, in relation to taxonomic and biochemical parameters. *Euphytica* 74:227-236.

Artigas, J. (1994) Entomologia economica. Volumen 1. Universidad de CONCEPCIÓN, CONCEPCIÓN. 140pp.

Asawalam, E.F. 2006. Insecticidal and repellent properties of *Piper guineense* seed oils extract for the control of maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Electronic Journal of Enviromental Agricultural and Food Chemistry. 5: 1389-1394.

Bakkali. F. S. Averbeck, D. Averbeck, Y M. Idaoma. 2008. Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology. 46: 446-475.

Banks, H. J. Y Annis, P. C., 1977. *Suggested procedures for controlled atmosphere storage of dry grain*. C.S.I.R.O. Australian Division of Entomology, Technical Paper nº 13.23 pp.

Betancur, R.J., A.G. Silva, J.C., Rodríguez, G.C., Fischer, y S.N Zapata, 2010. Insecticidal Activity of *Peumus boldus* Molina Essential Oil against

Sitophilus zeamais Motschulsky. Chilean Journal of Agricultural Research 70(3): 399-407.

Bicchi, C. Fresia, M. Rubiolo, P., Monti, D. Franz, C. y Goehler, I. 1997. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* Essential Oil. Flavour and Fragrance. Journal. 12 : 47-52.

Birch, L. C. 1958.- Experimental background to the study of the distribution and abundance of insects. I. The influence of temperature, moisture and food on the innate capacity of increase of three grain beetle. *Ecology*. 34: 698-711.

Burkholder, W. E, 1982.- Reproductive biology and communication among grain storage and warehouse beetles. *Journal of Georgia Entomological Society*, 17 (4), 1-10.

Burkholder, W. E y Ma, M. 1985.-Pheromones for monitoring and control of stored-product insects. *Annual Review of Entomology*, 30: 257-272.

Céspedes, C. I. J.G. Ávila, A. Martínez, B. Cerrato, J. C. Calderón-Múgica, R. Salgado-Garciglia, 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 3521-3527.

Ciccio, J. F. 2004. A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. *Journal Tropical Biology*. 52:853-857.

De los Mozos, P. M. 1997. Plagas de los productos almacenados. Bol. S.E.A centro de investigación Agraria de Albaladejito. (20) pp: 93-109.

Devakuma, U. C. J. Mohany P. Agarwal. 2004. Antifungal. Activity of Aroma Chemicals against Seed borne Fungi. Journal Essential Oil (16): 496-499.

De Vincenzi, M., Silano, M., Maialetti, F., *et al.* 2000. Safety data review. Constituents of aromatic plants: II. Estragole. Fitoterapia, 71, pp. 725-729

Evans, D, E, 1987,- Stored products. In: BURN, A.J., COAKER, T,H, JEPSON, P. C. (Eds.).-*Integrated Pest Management*. Academic press, New York (U.S.A). pp.: 425-461.

Ewete, Francis kola, 2007. The efficacy of ashes of four locally used plant materials against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in Cameroon. *International Journal of Tropical Insect Science* 27 (1) PP. 21 - 26

FAO. 1999. The use of spices and medicinals as bioactive protectants for grains. FAO agricultural Services Bulletin N°. 137. Roma, Italia. 234p.

Fleitas, D.G. 2007. Prueba de viabilidad y poder germinativo de la semilla de maíz (*zeamays*, Lin). Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos45/conservacion-semillas-maiz/conservacion-semillas-maiz3.shtml>. Consultado 18/01/2014.

Fleurat-Lessard, F, 1988.- L'utilisation des pièges a phéromones pour la surveillance des pyrales nuisibles. *Phytoma* Defense des cultures, 401: 51-53.

Flores, H., 1960. *Sinoxylon sexdentatus*, insecto perforador del plomo (*Coleoptera, Bostrycidae*). *Graellsia*, 18: 165-178.

García A. A. y U. Pérez. 2009. Metabolismo secundario de las plantas. Serie *Fisiología Vegetal* 2 (3): 119-145.

García-Lara, S.; C. Espinosa-Carrillo; D. J. Bergvinson. 2007. Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control. México D.F. CIMMYT. 65 p.

García Mari, F., Llorens Climent, J. M., Costa Comelles, J. y Ferragut Pérez, F., 1991.- *Acaros de las plantas cultivadas y su control biológico*. Pisa Ediciones, Alicante (España). 175 pp.

García-Rodríguez, Y., A. Bravo-Monzón, Y. Martínez-Díaz, G. Torres-Gurrola y F. J. Espinosa-García. 2012. Variación fitoquímica defensiva en ecosistemas terrestres, 217-252. En: J. C. Rojas y E. A. Malo (eds.). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. El Colegio de la Frontera Sur. México. 446 p.

González, H. R. 1989. Insectos y ácaros de importancia agrícola y cuarentenaria en Chile. Universidad de Chile/BASF. Santiago, Chile.

González, P., 2003. Control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky con polvos inertes.

Memoria de Título, Ing. Agron. Universidad de Concepción, Fac. Agron.

Chillán, Chile.

Guenther, E. 1948. The essential oils, Vol. 1. D. Van Nostrand Co., Inc., New York.

Guenther, E. 1950. The essential oils, Vol. 4. D. Van Nostrand Co., Inc., New York.

Guzmán, A. Y A. Manjarrez. 1962. Estudio del Aceite Esencial de *Tagetes florida*. Bol.Inst.Quím.Univ.Nal. Autón.Méx.14:. 48-54

Hadíz. , 2003, Yang y Ma, 2005, Jaenson et al. , 2006 y Tolosa et al. , et al. ensayos 2006). Campo sobre la actividad repelente de cuatro productos vegetales contra principalmente *Mansonia* población en Etiopía Occidental. FitoterapiaInvestigación, 17 (2003), pp. 202-205.

Halstead, D.G.H. External sex differences in stored-products: Coleoptera. Bulletin of Entomological Research, v.54, p.119-134, 1963.

Hardin, B. 1991.- Replacing fumigants with beneficial insects. Three cheers for the tiny heroes who satnd guard at the granary. Pest Control Technology, 19 (4): 48-49, 52.

Harwood, H.S., Moldenke, F.A., Berry, E.R., 1990. Toxicity of monoterpenes to the variegated cutworm (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology 83, 1761–1767.

Hernández, T.; Canales, M.; Flores, C. García, A.M., Durán, A.; Ávila, J.G. 2006
Antimicrobial Activity of *Tagetes lucida*. Pharmaceutical Biology (Formerly
International Journal of Pharmacognosy), Volume 44, Number 1, pp. 19-
22(4)

Hernández, T., M. Canales, A. M. García, A. Duran, S. Meraz, P. Davila y G. Ávila.
2008. Antifungal Activity of the Essential Oils of Two Verbenaceae: *Lantana
achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlan de las Salinas, Puebla
(México). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y
Aromáticas 7 (4): 202-206.

Huang, Y., S. L. Lam y S. H. Ho. 2000. Bioactivities of essential oil from *Elletaria
cardamomum* (L.) maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium
castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research (36): 107-117.

Hummelbrunner, L.A (SIM) Isman, M.B. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and
synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the
Tobacco Cutworm, *Spodopteralitura* (Lep., Noctuidae) J. Agric. Food Chem.,
49 (2) pp: 715-720.

Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop
Prot, 19 pp: 603-608.

Jacobs, S. and D. Calvin. 1988. Weevils on stored grains. Entomological Notes.
Department of Entomology. College of Agricultural Sciences. Cooperative
Extension. (En línea). Pennsylvania State University.

<http://www.ento.psu.edu/extension/factsheets/pdfs/weevilsgrain.pdf>

[Consulta: 28/08/2013].

Javaid, I. Ramatlakapela, K., 1995.- The management of cowpea Weevils [*Callosobruchos maculatus* Fabricius] In cowpea seeds by using ash and sand. *Journal of Sustainable Agriculture*, 7 (2/3): 147-154.

Jayasekara, T.K. Stevenson, P. C. Hall, D.R. & BELMAIN, S.R., 2005.- Effect of volatile constituents from *Securidaca longepedunculata* on insect pests of stored grain. *Journal Chemical Ecology* 31: 303-313.

Karr, L. L., Drewes, C. D., Coats, J. R., 1990. Toxic effects of d-limonene in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36, 175-186.

Koul, O., Walia S. G. S Dhaliwal. 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Insect Biopesticide Research Centre* 4 (1): 63-84.

Kumar, C. M. 2008. Fumigant Toxicity of Essential Oil from Some common Spices against Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Oleo Science* 57 (3): 171-179.

Lagunes, A. 1994. Extractos de polvos vegetales y polvos minerales para el combate de plagas de maíz y del frijol en la agricultura de subsistencia. México: colegio de Posgraduados /USAID/CONACYT /BORUCONSA. 35p.

Lagunes, S. G. y J. Rodríguez. 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de

calcio en maíz almacenado. Ciencia de Investigación Agrícola 30 (3): 153-160.

Larraín, p. 1994. Manejo integrado de plagas en granos almacenados. Investigación y progreso Agropecuario, v.81. p. 10-16.

Leyva, Maureen., J. E. Tacoronte y M. C. Marquetti. 2007. Composición química y efecto letal del aceite esencial de *Pimenta racemosa* (Myrtales: Myrtaceae) sobre *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). Revista Cubana de Medicina Tropical 59 (2):154-158.

Lindgren, D.L y Vincent, L.E., 1970.- Effect of atmospheric gases alone or in combination on the mortality of the granary and vice weevils. Journal of Economic Entomology, 63: 1926-1929.

Long, L. Z., S. S. Chu y R. Q. Liu. 2010. Chemical composition and insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* of the essential oils of *Artemisia capillaries* and *Artemisia mongolica*. Journal molecules (15): 2600-2608.

Marangon, J. C., G. J. Newandram, D. O. Dev. y M. F. Moreira. 2008. Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. Journal Chemical Ecology (34): 1213–1218.

Marín, L. J. y C. L. Céspedes.2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al Agro. *Revista Fitotecnica Mexicana* 30 (4): 327-351.

- Marotti, M. R Piccaglia, B Biavati, I Marotti (2004) Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *Journal Essential Oil Research*. 16:440–444.
- Martínez, M. A. 2003. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia. Medellín. 34 (4): 327-351.
- Moghaddam M, R Omidbiagi, F Sefidkon (2007) Chemical composition of the essential oil of *Tagetes minuta* L. *Journal Essential Oil Research*. 19:3-4.
- Monsanto, 2002. Los beneficios de la biotecnología (por qué es importante la biotecnología). Folleto técnico. Monsanto Division Agricultura España. 35p.
- Moreno, M.S., E.O. Crescente, M.S Ortiz y M. Quintero 2006. Composición química y actividad tóxica del aceite esencial de *Simsia pubescens* Triana. *Asociación Interciencia* 31 (10): 745-747.
- Nerio, S. L., V. J. Olivero y E. E. Stashenko. 2009. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research* (45): 212–214.
- Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C.H., 1997. Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (WILD.) against four species of stored-product Coleoptera. *International Journal of Pest Management* 43, 89–94.

Ogunwande IA, NO Olowore (2006) El aceite esencial de las hojas y las flores de "AfricanMarigold", *Tagetes erecta* L. *Journal of Essential Oil Research* 18:366-368.

Pascual, V., M. A Ballestas y A. Soles. 2004. Toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas del almacén de arroz. *Biología sanitaria vegetal plaga*.(30): 279.

Pérez, F., G. Silva, M. Tapia y R. Hepp. 2007. Variación anual de las propiedades insecticidas de *Peumus boldus* sobre *Sitophilus zeamais*. *Pesquería Agropecuaria Brasilia* 42 (5): 633-639.

Pixton, S. W., 1982. The importance of moisture and equilibrium relative humidity in stored products. *Tropical Stored Products inf.*, 43: 16-29.

Pradznska, A., 1995.- The role of higher temperaturas to control of granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) *PraceNaukoweInstytutuOchronyRoslin*,36(1/2): 119-127.

Quentin, M.E., Spencer, J.L. y Miller, J.R. 1991.- Bean tumbling as a control measure for the common vean Weevil, *Acanthoscelides obtectus*. *Entomología Experimentalis et Applicata.*, 60: 105-109.

Regnault-Roger, C., Hamraoui, A., 1995. Fumigant toxic activityand reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera), a bruchid of Kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Stored Products Research* 31, 291-299.

Ríos, R. E. M. 2010. Composición Química y potencial alelopático de *Eupatorium glabratum* Kunt (cedazo) de Llano de Pario, Michoacán. Tesis de licenciatura. Facultad Químico-Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 85 pp.

Ritacco, M. 1998. Control por Radiación Gamma del insecto plaga *Sitophilus orizae* en grano de trigo almacenado. Comisión Nacional Atómica. Argentina. Pp: 1-10.

Rodríguez, C., G. Silva, J. D. Vendramim. 2003. Insecticidas de origen vegetal. P. 87-112. In Silva, G., R., Hepp (eds). Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción-Fundación para la Innovación Agraria. Chillan. Chile.

Rzedowski, C. G y J. E. Rzedowski. 2005. Flora Fanerógama del Valle de México. 2ª. Instituto de Ecología A.C. Conocimiento y el uso de la biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, 1406 pp.

Rocha, V. G., S. G. Almeida, R. M. Bismara, M. M. Duarte, J. Brito, M. Silva, C. S. Silva., S. M. Piedade y M. A. Domínguez. 2009. Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill. Against the storage fungi *Aspergillus flavus* link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research* (45): 108-111.

Salvadores, U. Y 2005. Polvos aromáticos para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en trigo almacenado. Tesis de licenciatura. Facultad de Agronomía Universidad de Concepción. Chillan, Chile. 22pp

- Salvadores, U., Silva G.A., Tapia V.M. Y Hepp G. R. 2007. Polvos de especies aromáticas para el control del gorgojo de maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, en trigo almacenado. Agricultura Técnica 67(2): 147-154.
- Samir, A., M. Abdelgalei, I. Magdy, E. Mohamed, E. Mohamed, I. Badawy y A. Sailan. 2009. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. Journal chemical ecology (35): 518-525.
- Sampson, J., N. Tabanca, N. Kirimer, B. H. Demirci, A. Base, M. K. Spiers y E. Wedge. 2005. Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult *Lipaphis pseudobrassicae* (Davis) (Aphididae: Homoptera). Pest management science (61): 1122-1128.
- Sandoval, M. 1984. Evite pérdidas en sus granos almacenados. Chile Agrícola, 90:103-104.
- Scora, M. K. y R W. Scora. 2009. Effect of volátiles on mycelium growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, and *P. ulaiense*. Journal basic microbiology 38 (5): 405-413.
- Serrato, C. M. A., Reyes T. B., Ortega A. L., Domingo G. A., .2003. Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag.): Recurso Genético Mexicano para controlar la Mosquita Blanca (*Bemisia* sp. y *Trialurodes*). Revista del Jardín Botánico Nacional 24 (1-2). 66-70.

Semarnat, 2006. *Tagetes lucida*. [www.semarnat.gob.mx/pfnm/Tagetes lucida.html](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/Tagetes_lucida.html) (enero 2014).

Siddiqui, M.A., y Alam, M.M 1988. Toxicity of different plant parts of *Tagetes lucidato* plant parasitic nematodes. Indian Journal of Nematology 18 (2): 181-185.

Silva, A. G., González, P., Hepp, R. Casals, P. 2004. Control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky con polvos inertes. Agrociencia 38 (5) pp: 529-536.

Silva, A. G., Orrego.,Hepp, R. (sim)Tapia, M. 2005. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado. Pesquería. Agropecuaria 40 (1) pp: 11-17

Silva, G.; A. Lagunes; J. C. Rodríguez. 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (coleóptera: Curcolionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. Ciencia e investigación agraria, v.30, p. 153-160.

Steffanazzi, N., Gutiérrez, M.M., Cariac, M., Ferrero, A.A. (SIM) Stadler, T. 2004. Repelencia en larvas de *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) a *Tagetes terniflora* (Asteraceae).

Turner, B.L. 1996. The comps of Mexico: A systematic account of the family Asteraceae, vol6 Tageteae and Athemideae. PhytologiaMemoirs 10.

Trejo, T. G y Z. M. Rodríguez 2007. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro *interciencia* 32 (10): 669-674.

Villarreal, Q., J. A 2003. Familia compositae. Tribu Tageteae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología A.C Pátzcuaro, Michoacán. Mexico. 85 p.

Yano, K.; Kamimura, H. 1993 Antifeedant activity toward larvae of *Pieris rapae crucivora* of phenolethers related to methyleugenol isolated from *Artemisia capillaris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57, 129-130.