

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“DESARROLLO DE UN
NOVEDOSO
BIOINSECTICIDA PARA
UN CONTROL
ORGÁNICO DE LA
COCHINILLA
HARINOSA EN
VIÑEDOS”**

Germán Deza Borau

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“DESARROLLO DE UN NOVEDOSO
BIOINSECTICIDA PARA UN
CONTROL ORGÁNICO DE LA
COCHINILLA HARINOSA EN
VIÑEDOS”

Tesinista: Deza Borau, Germán

Firma:.....

Director: Peschiutta, Maria Laura

Firma:.....

Co-Director: Zygadlo, Julio Alberto

Firma:.....

Cátedra de Química Orgánica, FCFyN-UNC- IMBIV-CONICET y Área de Aromas y
Pigmentos (ICTA-FCFyN-UNC)

**“DESARROLLO DE UN NOVEDOSO
BIOINSECTICIDA PARA UN
CONTROL ORGÁNICO DE LA
COCHINILLA HARINOSA EN
VIÑEDOS”**

Nombre/s y Apellido:..... Firma:.....

Nombre/s y Apellido:..... Firma:.....

Nombre/s y Apellido:..... Firma:.....

Calificación:.....

Fecha:.....

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	i
ÍNDICE.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Insectos utilizados para las experiencias en laboratorio.....	9
Fitotoxicidad en vid de los compuestos naturales.....	9
Actividad insecticida de los compuestos naturales de baja fitotoxicidad en vid.....	10
Elaboración y evaluación de formulaciones anti-cochinillas.....	11
Fitotoxicidad en invernadero.....	12
Caracterización de la aspersión en las experiencias de fitotoxicidad y actividad insecticida.....	13
Análisis de datos.....	13
RESULTADOS.....	14
Fitotoxicidad de compuestos naturales volátiles con conocida actividad insecticida.....	14
Actividad insecticida de compuestos naturales no fitotóxicos contra la <i>Planococcus ficus</i>	15
Fitotoxicidad de las formulaciones en hojas de vid.....	17
Determinación del efecto insecticida de las formulaciones.....	18
Fitotoxicidad en invernadero.....	20
Caracterización de la aspersión en las experiencias de fitotoxicidad y actividad insecticida.....	21
DISCUSIÓN.....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXO.....	32

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Laura, por aceptarme en el proyecto y brindarme su tiempo y conocimientos con generosidad, cariño y dedicación.

A Julio, mi codirector, por darme la posibilidad de trabajar en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio.

A mis padres, Teófilo y Elisa, por su apoyo incondicional, por su amor y la educación que me dieron. Todo en mi vida se lo debo a ellos.

A mi hermana Patricia y mi sobrino Mateo, simplemente los amo.

A Virginia, mi amor, porque mi vida es mejor junto a ella.

A Aquiles, mi mejor amigo y compañero durante tantas horas de estudio.

A mi abuelo Arturo y mi abuela Nilda.

A mis amigos Daniel, Joel y Santi, por tantos buenos momentos compartidos.

A mis compañeros de la facultad

A la Cátedra de Química Biológica (FCEFyN-UNC) por facilitarme parte del equipamiento

A la Cátedra de Química Orgánica (FCEFyN-UNC), al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET) y al Instituto de Ciencia y Tecnología de los alimentos (ICTA) por el uso de sus instalaciones

A la bodega “Terra Camiare” por facilitarme el material de estudio

A CONICET, FONCyT-UNC por el apoyo económico

A la Universidad Nacional de Córdoba y especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

RESUMEN

La cochinilla harinosa, *Planococcus ficus* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae) es una plaga que afecta principalmente a las plantaciones de vid (*Vitis vinifera* L.), causando enormes pérdidas económicas en Argentina y el mundo. Debido a los numerosos problemas ocasionados por los plaguicidas sintéticos, las investigaciones recientes se centran en el desarrollo e implementación de plaguicidas naturales aptos para la salud humana y amigable con el medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue lograr una formulación bioinsecticida por contacto para el control de *P. ficus* en viñedos. Se realizaron ensayos de fitotoxicidad en hojas de vid con diferentes compuestos orgánicos volátiles (cuminaldehído, (+)-mentofurano, (2E,6Z)-2,6-nonadienal, salicilaldehído y (R)-(+)-pulegona), para luego evaluar la actividad insecticida de aquellos que resultasen no fitotóxicos. La (R)-(+)-pulegona fue el compuesto no fitotóxico con mayor porcentaje de mortalidad de la cochinilla harinosa, a las 24 y 48 h de aplicación. A partir de este compuesto activo se elaboraron las formulaciones anti-cochinillas utilizando TWEEN® 20 y lecitina de soja como surfactantes, y limoneno y tierra de diatomeas (TD) como degradadoras de la capa cerosa del insecto. Las formulaciones Pulegona+TD+Lecitina y Pulegona+Limoneno+TD+Lecitina fueron no fitotóxicas y superaron el 70 % de mortalidad a las 24 h. Esta alta mortalidad probablemente se debió a una interacción entre la pulegona, la TD y la lecitina que permite más movilidad molecular y aumenta la eficiencia del principio activo logrando que el mismo ingrese y actúe en el insecto. En conclusión, la formulación Pulegona+TD+Lecitina puede ser una buena herramienta para el control orgánico de *P. ficus* en viñedos.

Palabras claves:

Planococcus ficus, vides, actividad insecticida, compuestos naturales

INTRODUCCIÓN

La industria vítica y la viticultura constituyen un motor económico muy importante en el desarrollo rural en muchas regiones y es el cultivo frutícola de mayor relevancia económica a nivel mundial (Torregrosa *et al.*, 2015). Particularmente, Argentina se encuentra entre los países con mayor área cultivada con viñedos y una producción anual de vinos de 14,5 millones de hL en 2018. La producción vitivinícola de 2018 es una de las más altas desde el año 2000 (INV, 2019).

Las plantaciones de vid (*Vitis vinifera* L.) en nuestro país presentan numerosas enfermedades y plagas (Raigon, 2013). Hasta el siglo XXI ninguna requería la utilización de importantes cantidades de agroquímicos para su control. Aquella situación casi libre de plagas cambió cuando, a principios de este siglo, estas plantaciones comenzaron a ser afectadas por la cochinilla harinosa de la vid, *Planococcus ficus* Signoret (Hemiptera: Pseudococcidae) (Becerra *et al.*, 2006) (Fig. 1). Los daños que ocasiona esta plaga van desde disminución en la calidad de las uvas de mesa hasta pérdidas totales en la producción. Estos insectos producen daños directos como la necrosis de los tejidos, la disminución de nutrientes y destrucción de las bayas. Además *P. ficus* favorece daños indirectos por hongos patógenos que provocan la podredumbre del racimo, la presencia de Acrotoxina A en vinos (Becerra *et al.*, 2006) y la transmisión de varias enfermedades virales, lo que la convierte en una plaga de relevancia económica aún a bajos niveles de infestación (Walton *et al.*, 2006).

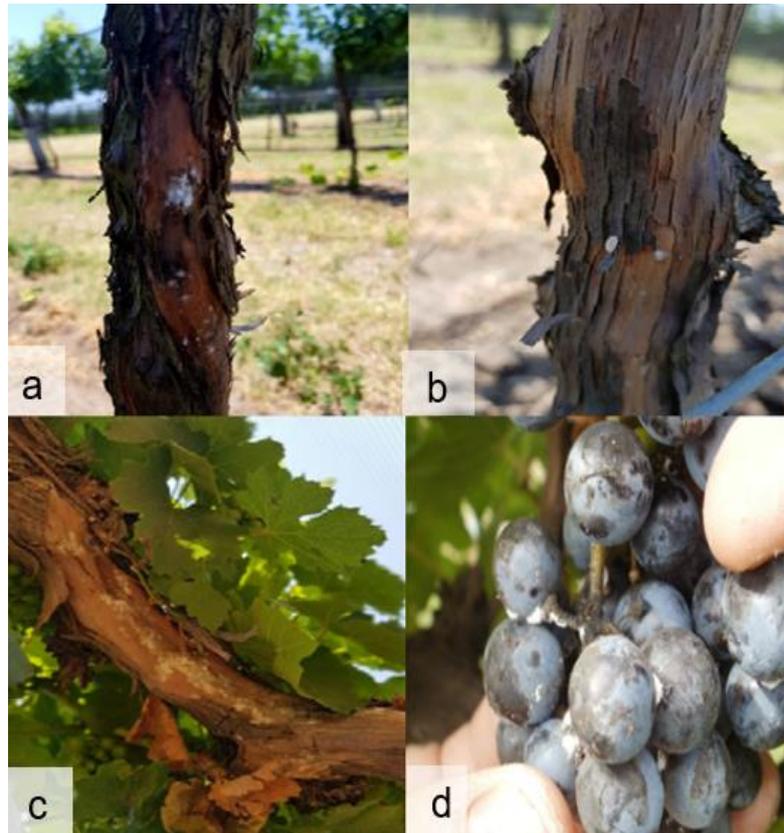


Figura 1. Presencia de *Planococcus ficus* en viñedos. **a)** masa algodonosa producto de infestación de cochinilla harinosa en el tronco principal, **b)** cochinilla harinosa en ritidoma, **c)** restos de ovisacos en ramas, **d)** *Planococcus ficus* en el racimo de uvas.

Las cochinillas viven en la corteza de las ramas, en el tronco y en las raíces gruesas que se hallan a nivel del suelo. Una característica de estos insectos es que se esconden debajo del ritidoma, donde también pueden depositar huevos (Sforza *et al.*, 2005) (Fig. 1b). El pasaje invernal tiene lugar principalmente en estado de huevo y, en menor medida, como hembras adultas. Éstas miden de 4 a 4,5 mm y están cubiertas de una sustancia cerosa y pulverulenta (Becerra *et al.*, 2005) (Fig. 2). En primavera comienza la postura, mayormente en los órganos verdes y cada hembra llega a depositar de 400 a 500 huevos. La evolución es muy rápida y en el mes de noviembre ya aparecen los nuevos adultos (Sforza *et al.*, 2005) (Fig. 3).



Figura 2. Hembra adulta de *Planococcus ficus*.

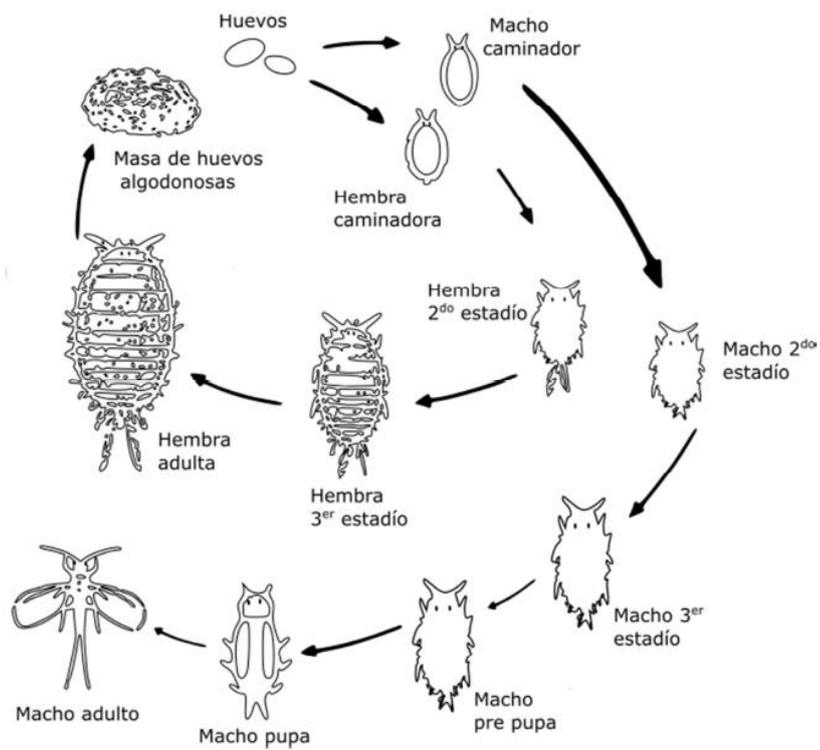


Figura 3. Ciclo biológico de *Planococcus ficus*. (Infografía obtenida de Peschiutta (2017))

En la actualidad, *P. ficus* se distribuye en la mayoría de las provincias con producción de uva de Argentina (Daane *et al.*, 2012) y afectan tanto a pequeños como grandes productores, reduciendo sus oportunidades económicas en el mercado, poniendo en riesgo la competitividad del sector y generando crisis económicas a nivel local y regional (SENASA, 2017).

Pocos insecticidas están inscriptos en SENASA para el control de la cochinilla harinosa. El control de plagas de la vid implica un intenso uso de insecticidas sintéticos como carbamatos, piretroides y organofosforados, y el abuso y mal uso de estos productos químicos ha ocasionado riesgos en la salud humana y ambiental (del Puerto Rodríguez *et al.*, 2014). La actual ineficacia práctica y económica en el control de plagas y el uso continuo de insecticidas sintéticos promueve el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes e incremento de la incidencia de plagas secundarias (Pekas, 2011). El crecimiento de las ciudades que avanza y se expande hacia los campos aledaños, trae aparejado la convivencia de los viñedos con casas familiares, escuelas y demás instituciones locales. Aparecen de esta forma nuevas reglamentaciones sobre la aplicación de productos químicos para el control de plagas, prohibiendo la fumigación de los campos con productos que anteriormente estaban permitidos. Es por ello que las investigaciones recientes se centran en el desarrollo e implementación de nuevas estrategias y plaguicidas altamente selectivos, biodegradables, aptos para la salud humana y más amigable con el ambiente (Robu *et al.*, 2015).

Algunos componentes de los aceites esenciales de las plantas son prometedores como agentes de control ecológico de insectos plagas (Gonzales Correa *et al.*, 2015; Peschiutta *et al.*, 2016) en reemplazo a los insecticidas sintéticos. Estos compuestos orgánicos funcionan como tóxicos para los insectos vía penetración de la cutícula (efecto de contacto), vía sistema respiratorio (efecto fumigante) y vía aparato digestivo (efecto de ingestión) (Ibrahim *et al.*, 2001). La pulegona y el mentofurano son unos de los terpenos más bioactivos contra la cochinilla harinosa (Peschiutta *et al.*, 2017), debido a

que inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa del insecto (Herrera et al., 2015), similar al modo de acción del cuminaldehído (Yeom et al., 2012). Otros compuestos orgánicos naturales efectivos contra insectos son el salicilaldehído (Park et al., 2000), y el (2E,6Z)-2,6-nonadienal (Zunino et al., 2015). El limoneno es un compuesto lipofílico que tiene el potencial de interactuar con la cera de la cutícula de las cochinillas, disolviéndola y produciendo mortalidad debido a su alta toxicidad (Karamaouna et al., 2013). Los lípidos cuticulares no sólo regulan el balance de agua evitando la desecación, también tienen una participación relevante en la absorción de sustancias químicas e insecticidas, en la penetración de microorganismos y en procesos de comunicación química como feromonas de contacto (Fusé et al., 2013; Quarles, 1992). Esta característica es especialmente importante para el control de *P. ficus* debido a que son insectos con altas secreciones de cera hidrofóbica que recubre su cuerpo y repele a los insecticidas basados en agua (Walton y Pringle, 2004). Otro producto de origen natural que actúa directamente sobre la cutícula del insecto plaga es la tierra de diatomeas (TD). Este material está registrado como insecticida en diferentes países, principalmente para la protección de granos almacenados, para uso doméstico y en cultivos protegidos (Fusé et al., 2013). A diferencia de los insecticidas químicos, la TD posee baja toxicidad, tiene alto poder residual y se puede utilizar en la producción orgánica (Quarles, 1992). El mecanismo de acción insecticida de la TD es por abrasión y adsorción de los lípidos cuticulares del insecto, lo que produce la muerte por desecación (Fusé et al., 2013; Subramanyam y Hagstrum, 2012). De este modo, aún la utilización de dosis subletales de TD puede afectar el ciclo de vida y/o la supervivencia de los insectos, en especial en presencia de otros agentes de control.

La mezcla de productos naturales, a modo de formulaciones, ofrece muchas posibilidades en la búsqueda de mejores y más potentes usos de sustancias tóxicas. La mezcla no es una simple suma de los efectos producido por los componentes, sino que mayormente producen uno o varios efectos farmacológicos no previstos. Por ejemplo, la acción de uno de los componentes puede aumentar por la presencia del otro (sinergismo) (Sun y Johnson, 1960). Esta propiedad resulta de sumo interés para elaborar nuevos productos para el control de plagas. Una combinación óptima entre dos o más productos sería altamente efectiva, ya que si el pesticida tiene un solo sitio de acción la

resistencia de la plaga se desarrolla más rápidamente, que si tiene varios (FAO, 2012). Por lo tanto, a diferencia de los productos sintéticos, el uso de compuestos orgánicos combinados en una misma formulación disminuirá la resistencia de los insectos al actuar cada compuesto en diferentes blancos (“targets”). Al mismo tiempo, las diferentes combinaciones permitirán reducir la fitotoxicidad que los productos naturales producen si son aplicados solos en altas dosis y de manera directa al cultivo (Ibrahim *et al.*, 2001).

Uno de los factores que mejora la eficiencia de la pulverización se relaciona con el tamaño de la gota ya que un tamaño óptimo de ésta en la aplicación de insecticidas permitirá incrementar su efecto toxico a bajas dosis (Himel 1969). Además la presencia de adyuvantes en la formulación, como TWEEN® 20 o lecitina de soja, modifican ciertas propiedades de la solución de pulverización y/o aumentan su eficiencia biológica (Melo *et al.*, 2019).

La necesidad actual de la viticultura se centra en la búsqueda de nuevas formulaciones que permitan combatir las plagas, por lo que herramientas novedosas de control de plagas para un manejo integrado construirán el marco propicio de sostenibilidad económica, cultural, de salud humana y ambiental.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Obtener una formulación bioinsecticida efectiva para un control orgánico de *P. ficus* en los viñedos.

Objetivos específicos:

1. Evaluar fitotoxicidad en hojas de vid de compuestos naturales volátiles con conocida actividad insecticida.
2. Evaluar el efecto insecticida de contacto sobre *P. ficus* de dos compuestos naturales volátiles con baja fitotoxicidad.
3. Elaborar formulas con el compuesto natural volátil más activo contra *P. ficus* y otros productos naturales.
4. Evaluar el efecto fitotóxico e insecticida de las formulaciones anti-cochinillas desarrolladas.
5. Conocer el efecto fitotóxico de las formulaciones más activas sobre plantas jóvenes de *Phaseolus vulgaris* L. en invernadero a fin de inferir el efecto fitotóxico *in vivo* en plantines de vid.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos utilizados para las experiencias en laboratorio

Los individuos de *P. ficus* fueron obtenidos a partir de colonias criadas en laboratorio provenientes de las fincas productoras de vides de la localidad de Colonia Caroya (31°02'0"S, 64°5'36"O), Córdoba. Las colonias de cochinillas se mantuvieron en brotes de papa (*Solanum tuberosum*) en cámaras de cría a 27 °C con un fotoperiodo de 12:12 (L: D) y 65 % de HR (Mani *et al.*, 2014). Para los ensayos se usaron hembras adultas pre-ovipositoras (>1,5 mm). Los insectos (y sus estadios) fueron identificados por medio de claves genéricas y específicas para *P. ficus* (Granara de Willink, 2014).

Fitotoxicidad en vid de los compuestos naturales

La fitotoxicidad se midió de acuerdo a Peschiutta *et al.* (2019) en hojas frescas y sanas de vides cortadas en el campo y tratadas con los diferentes compuestos naturales con conocida actividad insecticida, cuminaldehído (Yeom *et al.*, 2012), (+)-mentofurano (Peschiutta *et al.*, 2017), (2E,6Z)-2,6-nonadienal (Zunino *et al.*, 2015), salicilaldehído (Park *et al.*, 2000), (R)-(+)-pulegona (Herrera *et al.*, 2015; Peschiutta *et al.*, 2017) y Clorpirifós (conteniendo 48% de material activo), utilizado como producto de referencia. Se colocó un disco de papel de filtro Whatman (2 cm de diámetro) humedecido con 100 µL de agua destilada en el fondo de cada vial para mantener la hoja hidratada. Los discos de hojas de 2,5 cm de diámetro (0,3 g) fueron cortados en el laboratorio y se introdujeron en viales de vidrio de 30 mL. Se prepararon soluciones de 600 µL/L, 1000 µL/L y 1200 µL/L (concentraciones molares en Tabla 3, Anexo) de cada compuesto natural con 0,2% de TWEEN®, utilizando agua como solvente. Se aplicó 0,5 ml del producto directamente sobre el disco de hoja utilizando un aspersor de 10 ml de uso farmacéutico con un pulverizador comprado en el mercado (Fig. 4). Después de 24 horas de exposición, se retiraron los discos de hojas, se colocaron en un tubo Falcon con 40 mL de agua destilada y se dejaron equilibrar durante 24 h con agitación (300 rpm). Finalmente, se midió la

conductividad eléctrica de la solución usando un conductímetro de agua pura (Hanna, modelo HI98308) para determinar la existencia de fuga de electrolitos de las membranas celulares debido al daño producido por los productos. Cada tratamiento se repitió 5 veces y se realizó un control negativo utilizando agua destilada. La experiencia se realizó en diferentes épocas del año, por lo tanto, para los controles se tuvo en cuenta la diferencia fenológica de la hoja al momento de la experiencia.



Figura 4. Pulverizador utilizado en los ensayos de actividad insecticida y fitotoxicidad.

Actividad insecticida de los compuestos naturales de baja fitotoxicidad en vid

Los compuestos naturales que no resultaron fitotóxicos en sus concentraciones más altas con respecto al control fueron evaluados respecto a su efecto insecticida por contacto en *P. ficus*.

El efecto insecticida se midió a las 24 y 48 h mediante un ensayo de aplicación de contacto directo (Peschiutta *et al.*, 2019). En la experiencia se emplearon placas de Petri (90 mm) que contenían un disco de papel de filtro (Whatman N° 1) con 10 hembras adultas pre-ovipositoras de *P. ficus*. Se pulverizaron los insectos con 0,5 ml de cada compuesto natural seleccionado, a las concentraciones de 600 y 1200 $\mu\text{L/L}$. Se utilizó un control negativo (agua) y un control positivo (1000 $\mu\text{L/L}$ -Clorpirifós). De acuerdo con la resolución 504 de SENASA se puede utilizar el Clorpirifós en el campo en los casos de presencia de cochinilla harinosa (SENASA 2019). Todos los tratamientos fueron replicados cinco veces.

Elaboración y evaluación de formulaciones anti-cochinillas

Para las formulaciones anti-cochinillas se utilizó el compuesto natural de mejor efecto insecticida, como principio activo y, como surfactantes, TWEEN® 20 (0.2%) (Karamaouna *et al.* (2013) y lecitina de soja alimenticia en polvo (5 g/L). El limoneno (1500 µL/L) y la TD (60 g/L) fueron utilizadas como degradadoras de la capa cerosa externa del insecto (Hollingsworth, 2005; Peschiutta, 2017). Las concentraciones de lecitina y TD se prepararon de acuerdo con lo especificado en sus respectivos envases. La TD fue molida en un mortero antes de ser incorporada a la formulación, a fin de disminuir el tamaño de sus partículas. Las concentraciones de limoneno y el compuesto de interés fueron seleccionadas de acuerdo con experiencias previas no publicadas del grupo de investigación. En todas las formulaciones se utilizó agua como solvente.

Las formulaciones anti-cochinillas preparadas fueron:

compuesto seleccionado+Limoneno+TD+Lecitina,

compuesto seleccionado+TD+Lecitina,

compuesto seleccionado+Limoneno+Lecitina,

compuesto seleccionado+TD+Tween,

compuesto seleccionado+Tween,

compuesto seleccionado+Lecitina,

compuesto seleccionado+Limoneno+Tween.

La actividad insecticida de contacto de cada formulación y la fitotoxicidad en hojas de vid fueron evaluadas de la misma forma que los compuestos naturales. Se siguió el mismo procedimiento para el grupo de control, que consistió en a) agua (control negativo), b) agua con TWEEN® 20 al 0,2%, c) agua con lecitina de soja 5 g/L. La mortalidad de insectos se registró después de 24 h y 48 h y se calcularon los porcentajes de mortalidad.

Los datos de concentración-mortalidad de la formulación que resultó más efectiva y económica se utilizaron para obtener los valores de concentración letal (CL₅₀ y CL₉₅). Estos valores se calcularon utilizando la formulación

elaborada con una serie de concentraciones (0, 400, 600, 800, 1000 y 1200 $\mu\text{L/L}$) del compuesto seleccionado.

Fitotoxicidad en invernadero

A fin de conocer el efecto de las formulaciones más activas en plantas dicotiledóneas, se emplearon plantines de porotos (*P. vulgaris*) germinados en vermiculita y colocados en un invernadero (Fig. 5). Luego de una semana de adaptación, se aplicó 0,5 mL de las dos formulaciones más efectivas contra *P. ficus* sobre el tallo principal y hojas utilizando el aspersor. Se observaron los daños tisulares a las 24 h en las plantas pulverizadas y se comparó con el control negativo (agua). Cada tratamiento se replicó en 10 plantines de poroto. La razón por la cual se emplearon plantines de porotos en lugar de vides se debe a su mayor facilidad para producirlas, mayor disponibilidad en el mercado, crecimiento más rápido y su precio más económico. De la misma forma que los herbicidas de amplio espectro actúan sobre gramíneas y/o dicotiledóneas, los efectos de los tratamientos de la aplicación de las formulaciones pueden resultar comparables a los manifestados en plantines de vid (Vincenzetti 1978).



Figura 5. Plantines de poroto (*Phaseolus vulgaris*) en invernadero a los siete días de crecimiento.

Caracterización de la aspersión en las experiencias de fitotoxicidad y actividad insecticida

Se determinaron las características de aspersión del pulverizador empleado en los ensayos insecticidas y de fitotoxicidad (Fig. 4) a fin de estandarizar la aplicación de los productos. Se evaluó la distancia alcanzada por las gotas y el tamaño de las gotas generadas. La distancia alcanzada por las gotas se determinó a partir de la medición con regla del diámetro de dispersión de éstas al aplicar la formulación más efectiva y económica sobre hojas blancas de papel a una distancia de 12 cm y luego calculando su área ($n = 16$). El tamaño de las gotas generadas por el aspersor se determinó a partir de la utilización de imágenes obtenidas con una cámara DFC 420 montada en una lupa Leica M420 ($n = 147$) de la superficie superior de las cochinillas. Las imágenes fueron luego analizadas con el software ImageJ 1.49v. (Schneider et al. 2012).

Análisis de datos

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2017) y SPSS v 21.0 (IBM 2012). Los porcentajes de mortalidad se analizaron con Modelos mixtos lineales generales, con factores de efectos fijos (tratamientos) se utilizó una prueba LSD Fisher y DGC a posteriori ($P < 0,05$) (Di Rienzo *et al.*, 2017). Se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov y se probó homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Se utilizó la prueba t de Student, para las comparaciones de medias entre el tratamiento de fitotoxicidad respecto el control, previa la verificación del cumplimiento de los supuestos. Los valores de CL_{50} y CL_{95} y sus intervalos de confianza al 95% fueron calculados a través del método Probit (Finney, 1971).

RESULTADOS

Fitotoxicidad de compuestos naturales volátiles con conocida actividad insecticida

Los valores de conductividad eléctrica de los compuestos naturales (2E,6Z)-2,6-nonadienal y (R)-(+)-pulegona no presentaron diferencias significativas respecto al control en ninguna de las tres concentraciones probadas (Tabla 1). El cuminaldehido no presentó fitotoxicidad a bajas concentraciones (600 µL/L y 1000 µL/L) mientras que si lo hizo a 1200 µL/L. El salicilaldehido fue fitotóxico a 1000 µL/L y 1200 µL/L y (+)-mentofurano fue fitotóxico en todas las concentraciones evaluadas (Tabla 1).

Tabla 1. Conductividad eléctrica en hojas frescas de vid luego del tratamiento por 24 h con los diferentes compuestos naturales volátiles probados.

COMPUESTO	MEDIA ± EE	T	P
Cuminaldehido 600 µL/L	47,30 ± 15,20	-2,32	0,15
Cuminaldehido 1000 µL/L	53,2 ± 10	-4,11	0,05
Cuminaldehido 1200 µL/L	50,37 ± 1,79	-21,19	<0,01*
(+)-mentofurano 600 µL/L	30,33 ± 3,18	-8,55	<0,01*
(+)-mentofurano 1000 µL/L	37,63 ± 4,72	-5,36	0,03*
¹ (+)-mentofurano 1200 µL/L	106,56 ± 4,42	-3,83	<0,01*
(2E,6Z)-2,6-nonadienal 600 µL/L	16,27 ± 3,56	-1,9	0,08
(2E,6Z)-2,6-nonadienal 1000 µL/L	19,40 ± 7,95	-0,93	0,45
(2E,6Z)-2,6-nonadienal 1200 µL/L	23,03 ± 4,90	-2,23	0,15
Salicilaldehido 600 µL/L	56,87 ± 10,48	-4,27	0,05
Salicilaldehido 1000 µL/L	103,17 ± 19,98	-5,36	0,03*
Salicilaldehido 1200 µL/L	120,53 ± 15,24	-7,11	0,02*
(R)-(+)-pulegona 600 µL/L	20,5 ± 7,63	-1,11	0,38
¹ (R)-(+)-pulegona 1000 µL/L	76,47 ± 8	1,27	0,25
¹ (R)-(+)-pulegona 1200 µL/L	93,83 ± 12,08	2,13	0,06
Clorpirifós 1000 µL/L	12,38 ± 0,88	0,27	0,79

Las medias son comparadas con el control (11,30 ± 0,94) con un test-*t* (*P* < 0.05).

¹ Medias comparadas con el control 75,66 ± 8.82 con un test-*t* (*P* < 0.05).

* Indica fitotoxicidad

Actividad insecticida de compuestos naturales no fitotóxicos contra *Planococcus ficus*

El porcentaje de mortalidad de *P. ficus* en los tratamientos con los compuestos (2E,6Z)-2,6-nonadienal y (R)-(+)-pulegona no mostró diferencias significativas respecto control negativo, a concentraciones de 600 $\mu\text{L/L}$ a 24 y 48 h de exposición ($P > 0.05$; Fig. 6 a, b). El (2E,6Z)-2,6-nonadienal no mostró actividad insecticida en ninguna de las concentraciones probadas a 24 h (Fig. 6 a), pero si produjo mortalidad a concentración de 1200 $\mu\text{L/L}$ a 48 h (Fig. 6 b). La (R)-(+)-pulegona a 1200 $\mu\text{L/L}$ fue el compuesto que ocasionó mayor porcentaje de mortalidad a las 24 h (31,60 %) alcanzando un 37,60 % a las 48 h. Los porcentajes de mortalidad del Clorpirifós (control positivo) no mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo a las 24 h, pero aumentó su efecto toxico a un 18% a las 48 h. (Fig. 6 a, b).

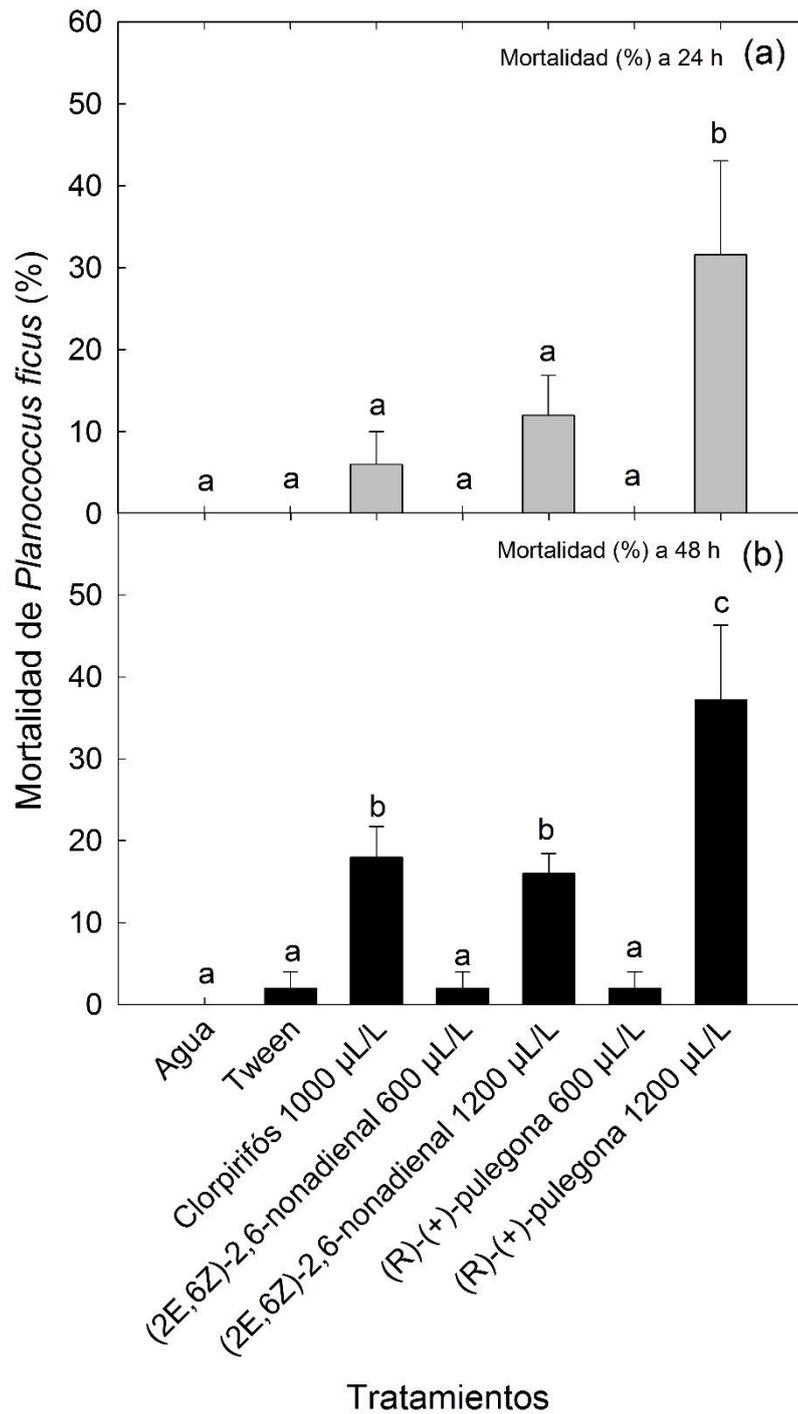


Figura 6. Porcentaje de mortalidad de *Planococcus ficus* con (2E,6Z)-2,6-nonadienal y (R)-(+)-pulegona a 600 y 1200 µL/L después de (a) 24 h y (b) 48 h de exposición. Las barras representan el valor medio+EE (n=5) de cada compuesto natural, Clorpirifós (control positivo), Tween y agua (control negativo). Diferentes letras entre barras indican diferencias significativas (test LSD Fisher, $P < 0,05$).

Fitotoxicidad de las formulaciones en hojas de vid

Ningún valor de fitotoxicidad de las formulaciones presentó diferencias significativas con el control negativo ($P > 0,05$; Tabla 2).

Tabla 2. Conductividad eléctrica en hojas frescas de vid luego del tratamiento por 24 h con las diferentes formulaciones.

COMPUESTO	MEDIA \pm EE	T	P
Tierra de diatomeas	42,20 \pm 10,42	-1,4	0,23
Lecitina	24,23 \pm 4,16	0,68	0,53
¹ Tween	11,40 \pm 0,52	-0,44	0,68
² Pulegona+TD+Lecitina	69,42 \pm 3,89	-1,39	0,19
Pulegona+TD+Tween	30,3 \pm 4,45	-0,61	0,57
Pulegona+Limoneno+TD+Lecitina	50,10 \pm 10,26	-2,18	0,09
Pulegona+Limoneno+Lecitina	31,87 \pm 5,83	-0,68	0,53
Pulegona+Tween	34,27 \pm 7,08	-0,94	0,39
Pulegona+Lecitina	30,91 \pm 1,37	-1,50	0,21
Pulegona+Limoneno+Tween	32,57 \pm 1,98	-1,89	0,13

Las medias son comparadas con el control (27,37 \pm 1,92) con un test- t ($P < 0.05$).

¹Medias comparadas con el control negativo 10,73 \pm 1,25 con un test- t ($P < 0.05$).

²Medias comparadas con el control negativo 63,43 \pm 8,51 con un test- t ($P < 0.05$).

* Indica fitotoxicidad

Determinación del efecto insecticida de las formulaciones

Se seleccionó la (R)-(+)-pulegona a 1200 $\mu\text{L/L}$ como principio activo para la elaboración de las formulaciones anti-cochinillas debido a que fue el compuesto natural que presentó mayor porcentaje de mortalidad de *P. ficus* por contacto. Las formulaciones Pulegona+TD+Lecitina y Pulegona+Limoneno+TD+Lecitina fueron las que ocasionaron mayores porcentajes de mortalidad de *P. ficus* (superando el 70 % de mortalidad) a 24 h (Fig. 7) y 48 h ($F = 12,62$; $P < 0,01$ y $F = 12,28$ $P < 0,01$ respectivamente; Fig. 8 a, b). La CL_{50} de la formulación Pulegona+TD+Lecitina fue de 1108,33 (IC = 1017,24; 1267,46) $\mu\text{L/L}$ y la CL_{95} de 1899,205 (IC = 1552,786; 2940,782) $\mu\text{L/L}$. Los porcentajes de mortalidad de Pulegona+Tween, Pulegona+Lecitina, Pulegona+TD+Tween, Pulegona+Limoneno+Tween y Pulegona+Limoneno+Lecitina mostraron diferencias significativas con el control negativo a 24 y 48 h ($P < 0,01$), sin embargo, la mortalidad de *P. ficus* no superó el 51 % (Fig. 8 a, b).

Los porcentajes de mortalidad de la Lecitina, TD y TWEEN® 20 no mostraron diferencias significativas con control negativo, indicando que estas sustancias no producen mortalidad por sí solas.

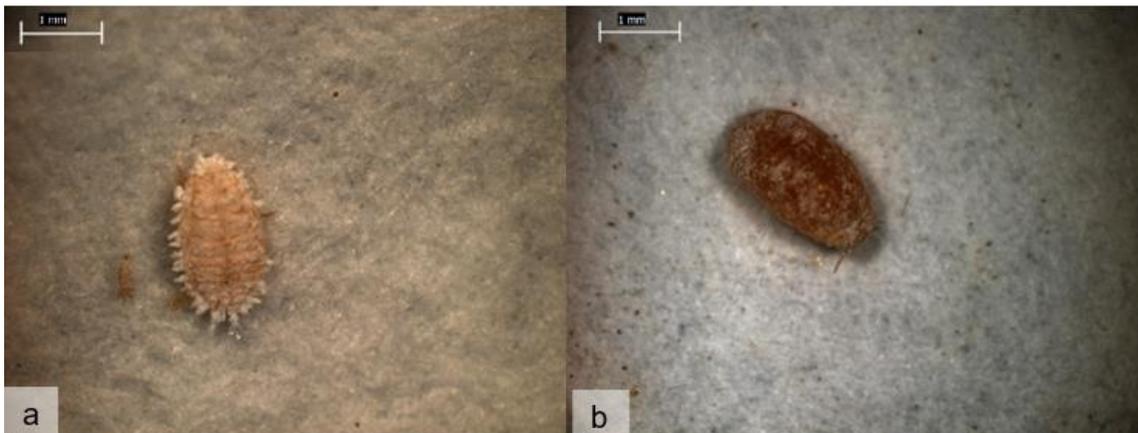


Figura 7 a) Hembra adulta de *Planococcus ficus* 24 h después de ser tratada con control (Agua) **b)** Hembra adulta de *Planococcus ficus* 24 h después de ser tratada con la formulación Pulegona+TD+Lecitina. La barra de escala representa 1 mm.

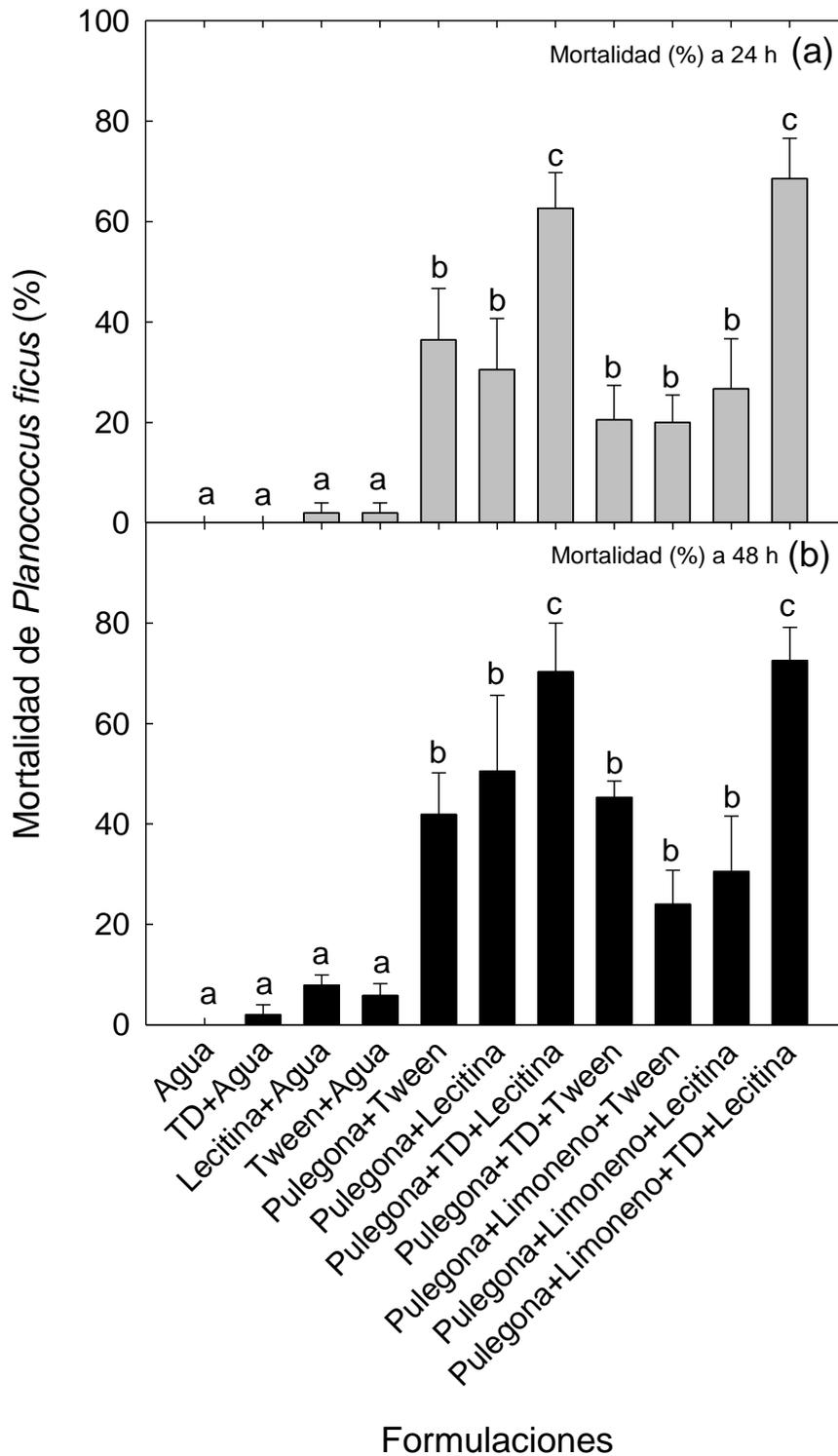


Figura 8. Porcentaje de mortalidad de *Planococcus ficus* con las formulaciones después de (a) 24 h y (b) 48 h de exposición. Las barras representan el valor medio+ EE (n = 5) para cada formulación y grupo control. Diferentes letras entre barras indican diferencias significativas (prueba DGC, $P < 0,05$).

Fitotoxicidad en invernadero

Las plantas jóvenes de poroto no mostraron signos visibles de daño en tejidos foliares a las 24 h de la aplicación de las formulaciones Pulegona+TD+Lecitina y Pulegona+Limoneno+TD+Lecitina (Fig. 9 b, c).

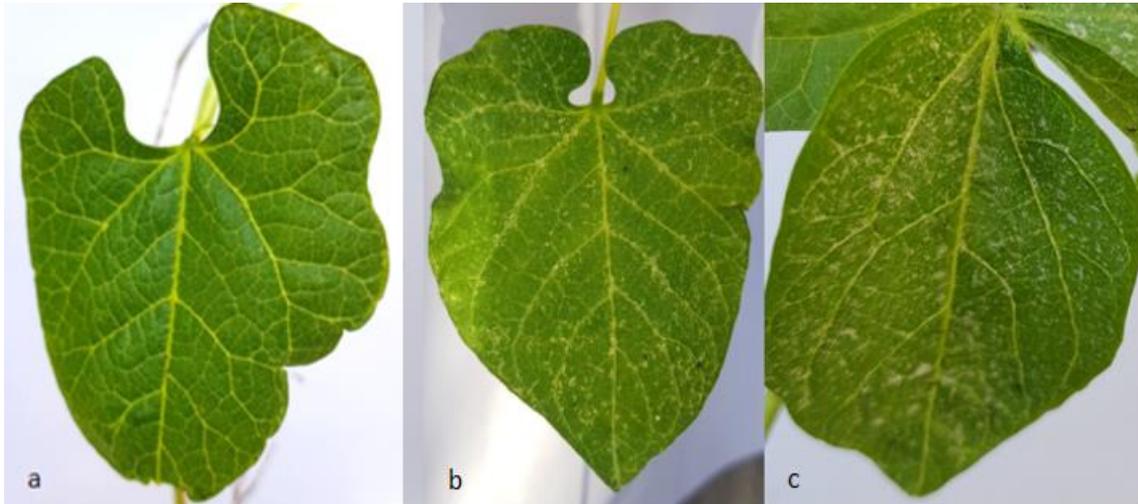


Figura 9. Fotografías de hojas de plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) a las 24 h de aplicar las formulaciones. **a)** Control: planta pulverizada con agua, **b)** planta pulverizada con la formulación Pulegona+TD+Lecitina **c)** planta pulverizada con la formulación Pulegona+Limoneno+TD+Lecitina. Nota: en b y c los puntos blancos en la lámina de la hoja corresponden a residuos de tierra de diatomeas.

Caracterización de la aspersión en las experiencias de fitotoxicidad y actividad insecticida

El aspersor utilizado produjo gotas de rociado de $0,36 \pm 0,01$ mm de diámetro (Fig. 10). El área de dispersión de las gotas del aspersor fue de $33,70 \pm 0,76$ cm².



Figura 10. Gotas de la formulación Pulegona+TD+Lecitina sobre el cuerpo de la cochinilla. Imagen obtenida con cámara DFC 420 montada en lupa Leica M420. La barra de escala representa 1 mm.

DISCUSIÓN

Algunos compuestos naturales que tienen la propiedad de ser buenos insecticidas también pueden llegar a ocasionar toxicidad en plantas (Jaramillo-Colorado et al., 2019). En este estudio, el cuminaldehído y el salicilaldehído, reconocidos por su actividad insecticida (Yeom 2012, Park 2000) fueron tóxicos al aplicarlos en hojas de vid, pero solo en las concentraciones más altas probadas (cuminaldehído 1200 $\mu\text{L/L}$ y salicilaldehído 1000 y 1200 $\mu\text{L/L}$). Smid et al. (1995) encontraron que ambos compuestos a las concentraciones de 600 $\mu\text{L/L}$ y 400 $\mu\text{L/L}$ respectivamente, no son fitotóxicos para bulbos de tulipanes. Sin embargo, en otros estudios el cuminaldehído presentó efecto herbicida al inhibir la germinación de *Echinochloa crus-galli* (Gouda et al., 2016) y el salicilaldehído inhibió el crecimiento de *Salvinia minima* (Gallardo et al., 1998). En el presente estudio, el mentofurano fue fitotóxico en todas las concentraciones probadas. Weidenhamer et al. (1994) encontraron que el efecto alelopático sobre algunas plantas como *Rudbeckia hirta* y *Leptochloa dubia* producido por los arbustos de *Calamintha ashei* se debe a la presencia de mentofurano. Por su parte, la pulegona y el (2E,6Z)-2,6-nonadienal no tuvieron efecto fitotóxico en hojas de vid. La pulegona tampoco inhibe la germinación de los granos de maíz (Peschiutta et al., 2019b). Sin embargo, en un estudio de Mucciarelli et al (2001) se encontró que la (+)-pulegona fue el terpeno más tóxico para *Cucumis sativus* debido a que es un fuerte inhibidor de la respiración radical.

La (R)-(+)-pulegona produjo el mayor porcentaje de mortalidad por contacto de la cochinilla harinosa en concentración de 1200 $\mu\text{L/L}$ en concordancia con el 100% de mortalidad encontrado por Peschiutta et al. (2017) en ensayos de toxicidad fumigante a 600 $\mu\text{L/L}$ aire. Este terpeno es además bioactivo contra otros insectos como el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Herrera et al., 2014; Peschiutta et al., 2019b) y dípteros como *Musca domestica* (Palacios et al., 2009) debido principalmente a que se metaboliza a mentofurano por la vía oxidativa citocromo P450 incrementando su toxicidad (Gunderson et al., 1986; Peschiutta et al., 2017). Otro compuesto que produjo

alta mortalidad fue el (2E, 6Z)-2,6-nonadienal. Hubert et al. (2008) encontraron que *Sitophilus granarius* fue el más sensible a este aldehído, seguido de *Tribolium castaneum*, *S. oryzae*, *Cryptolestes ferrugineus* y *Rhyzopertha dominica*. Además, se encontró que este compuesto es altamente efectivo repeliendo a *S. zeamais* (Zunino et al., 2015).

El Clorpirifós utilizado en este estudio como control positivo, no produjo mortalidad de *P. ficus*, similar a resultados obtenidos con otra especie de cochinilla *Phenacoccus solenopsis* donde los niveles de resistencia a este insecticida sintético fueron muy altos (Afzal et al. 2015; Ahmad y Akhtar 2016).

Todas las formulaciones elaboradas a partir de los productos (R)-(+)-pulegona, TD, limoneno, lecitina de soja y TWEEN® 20, no fueron fitotóxicas en hojas de vid y produjeron mortalidad de la cochinilla harinosa. Las formulaciones Pulegona+TD+Lecitina y Pulegona+Limoneno+TD+Lecitina fueron las más efectivas. Estudios de actividad insecticida por fumigación con limoneno, componente utilizado en una de las formulaciones, mostró que este compuesto por sí solo no produce mortalidad significativa de *P. ficus* en relación al control negativo (Peschiutta et al., 2017). Sin embargo, Karamaouna et al (2013) encontraron que el limoneno produce alta mortalidad de la cochinilla harinosa, al ser aplicado por contacto, ya que puede humedecer y matar los insectos que presentan una cobertura cerosa. En pruebas de fumigación, el compuesto volátil penetra a través del sistema respiratorio, mientras que, en los experimentos de contacto, la molécula tóxica penetra a través de la cutícula (Hubert et al., 2008). Esta diferencia indicaría una sensibilidad diferente de los insectos a los compuestos naturales en relación con su aplicación por contacto o como fumigante. A pesar de esto, la mortalidad producida por el tratamiento Pulegona+Limoneno+TD+Lecitina no fue diferente a la producida por la formulación sin limoneno, indicando que este compuesto no aumenta el efecto tóxico de la fórmula.

La TD es un producto inorgánico (81% es sílice amorfa, y el resto diferentes metales y no metales) que tiene la capacidad de afectar por abrasión la capa cerosa que recubre la cutícula de *P. ficus*, facilitando la penetración del componente activo de la formulación al insecto (Fusé et al., 2013; Quarles, 1992; Subramanyam y Hagstrum, 2012). La TD no presentó mortalidad por si

misma a pesar de tener un alto poder residual (Quarles, 1992). Otros estudios también encontraron que independientemente de la especie y la dosis, se necesita una exposición prolongada a las partículas de TD para obtener altos niveles de mortalidad de los individuos expuestos. Bajo ciertas circunstancias, los insectos pueden moderar la pérdida de agua, lo que aumenta la supervivencia, como en condiciones de mayor humedad o movilidad reducida (Vayias y Athanassiou, 2004).

Los surfactantes como TWEEN® 20 y lecitina de soja utilizados en las formulaciones podrían alterar las propiedades fisicoquímicas de la solución de pulverización, afectando así factores como la humectabilidad, la adhesión y la dispersión de las gotas de pulverización, contribuyendo a una mejor retención y penetración del compuesto activo al cuerpo del insecto (Melo et al., 2019; Yu et al., 2009). Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que las formulaciones con mayor acción insecticida fueron aquellas que utilizaron lecitina de soja. Esto podría deberse a que esta mezcla se homogeneiza mejor, presenta mayor estabilidad y/o mayor humectabilidad con lecitina que con TWEEN® 20, mejorando de esta manera las propiedades fisicoquímicas de la pulverización (Melo et al., 2019). La lecitina es un muy buen tensioactivo y es utilizado en alimentos por su nula toxicidad (Čilek et al., 2006). Las propiedades de emulsión de la lecitina de soja pueden asociarse con sus componentes fosfolipídicos, que son agentes emulsionantes, humectantes y dispersantes bien conocidos (Nyankson et al., 2015).

Se conoce que el sinergismo de varios compuestos químicos en una formulación produce un efecto total más grande que el efecto de cada compuesto por separado (Scalerandi et al., 2018). En el presente estudio, se encontró que las formulaciones anti-cochinillas que presentaban la mezcla TD-lecitina en su constitución duplicaban la mortalidad producida por la pulegona aplicada de manera aislada, con o sin la presencia de un tensioactivo. Esto probablemente se debe a una interacción entre la pulegona, la TD y la lecitina que permite más movilidad molecular y aumenta la eficiencia del principio activo logrando que el mismo exprese su total potencial insecticida.

La eficiencia de pulverización depende en gran medida de la interacción entre el producto aplicado y el insecto (Preininger et al., 2018).

Las características de la aspersión resultan de importancia para mejorar la eficiencia insecticida (Holdgate, 1955). Por lo tanto, para lograr una buena cobertura de pulverización del objetivo con bajos volúmenes, es necesario que las gotas aplicadas tengan un tamaño prácticamente uniforme, dependiendo el tamaño real del tipo particular de aplicación (Boize et al., 1976). En el presente estudio las gotas producidas por el aspersor tuvieron un tamaño uniforme y la lecitina posiblemente fue el tensioactivo que permitió mejorar algunas de estas propiedades de la solución, como disminuir la evaporación y aumentar el área de cobertura máxima de gotas, aumentando de esta manera la eficiencia del producto aplicado (Yu et al., 2009). El conocimiento sobre la distribución del tamaño de las gotas depositadas en objetivos biológicos es la clave para planificar las tácticas de pulverización en términos de formulaciones, utilización de equipos de pulverización, tiempo y técnica de aplicación, para lograr la máxima eficacia biológica (Uk, 1977).

En conclusión, las formulaciones Pulegona+TD+Lecitina y Pulegona+Limoneno+TD+Lecitina podrían ser productos amigables con el ambiente para el control orgánico de *P. ficus* en *V. vinifera* debido a su alta eficiencia, rápida acción y al posible menor desarrollo de resistencia que los insecticidas sintéticos. Ambas formulaciones no son fitotóxicas para la vid y presentan similar actividad insecticida, siendo la formulación Pulegona+TD+Lecitina de más fácil preparación y más económica, por lo que sería la más adecuada para la aplicación. Sin embargo, se necesitan a futuro más estudios en condiciones de campo para evaluar el posible uso de esta formulación anti-cochinillas en los viñedos.

La utilización de estos novedosos bioinsecticidas constituye un gran paso hacia la generación de alimentos orgánicos libre de pesticidas y de otros productos contaminantes, evitando además la fitotoxicidad que ocasiona la aplicación de insecticidas en las plantaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Afzal, M. B. S., Ijaz, M., Farooq, Z., Shad, S. A., & Abbas, N. (2015). Genetics and preliminary mechanism of chlorpyrifos resistance in *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Homoptera: Pseudococcidae). *Pesticide biochemistry and physiology*, 119, 42-47.

Ahmad, M., & Akhtar, S. (2016). Development of resistance to insecticides in the invasive mealybug *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Pakistan. *Crop Protection*, 88, 96-102.

Becerra, V., González, M., Herrera, M., y Miano, J. (2006) Dinámica poblacional de *Planococcus ficus* Sign. (Hemiptera - Pseudococcidae) en viñedos. Mendoza. *Rev. FCA UNCuyo*, 38, 1-6.

Becerra, V., Herrera, M., Gonzales, M., y Lanati, S. (2005) Se investiga el manejo de la cochinilla harinosa de la vid. *Ruralis*, 1, 8-11.

Boize, L., Gudin, C., y Purdue, G. (1976) The influence of leaf surface roughness on the spreading of oil spray drops. *Annals of Applied Biology*, 84, 205-211.

Čilek, A., Čelebi, N., y Tirnaksiz, F. (2006) Lecithin-based microemulsion of a peptide for oral administration: preparation, characterization, and physical stability of the formulation. *Drug Delivery*, 13, 19-24.

Chaimovitsh, D., Shachter, A., Abu-Abied, M., Rubin, B., Sadot, E., y Dudai, N. (2017) Herbicidal activity of monoterpenes is associated with disruption of microtubule functionality and membrane integrity. *Weed Science*, 65, 19-30.

Daane, K., Almeida, R., Bell, V., Botton, M., Fallahzadeh, M., y Mani, M. (2012). Biology and management of mealybugs in vineyards. En *Arthropod Management in Vineyards: Pests, Approaches and Future Directions* (ed. by N. Bostanian, C. Vincent y R. Isaacs), pp. 271–307. New York: Springer.

Del Puerto Rodríguez, A.M., Suárez Tamayo, S., y Palacio Estrada, D.E. (2014) Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52, 372-387.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C.W. (2017) *InfoStat versión 2017*, Universidad Nacional de Córdoba.

FAO (2012) Guidelines on prevention and management of pesticide resistance. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides, 55.

Finney, D. (1971) Probit Analysis. Cambridge, Cambridge University Press.

Fusé, C.B., Villaverde, M.L., Padín, S.B., De Giusto, M., y Juárez, M.P. (2013) Evaluación de la capacidad insecticida de tierras de diatomeas de yacimientos argentinos. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 39, 2.

Gallardo, M.T., Martin, B.B., y Martin, D.F. (1998) Inhibition of water fern *Salvinia minima* by cattail (*Typha domingensis*) extracts and by 2-chlorophenol and salicylaldehyde. Journal of Chemical Ecology, 24, 1483-1490.

Gonzales Correa, Y.D.C., Faroni, L.R.A., Haddi, K., Oliveira, E.E., y Pereira, E.J.G. (2015) Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 125, 31-37.

Gouda, N.A., Saad, M.M., y Abdelgaleil, S.A. (2016) Pre and post herbicidal activity of monoterpenes against barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). Weed Science, 64, 191-200.

Granara de Willink, M. (2014). Hemiptera: Pseudococcidae. En Biodiversidad de Artrópodos Argentinos (ed. by S. Roig-Juñent, L. Claps y J. Morrone), Vol. 3, pp. 249-259, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Gunderson, C., Brattsten, L., y Fleming, J. (1986) Microsomal oxidase and glutathione transferase as factors influencing the effects of pulegone in southern and fall armyworm larvae. Pesticide Biochemistry and Physiology, 26, 238-249.

Herrera, J., Zunino, M., Massuh, Y., Pizzollito, R., Dambolena, J., Gañan, N., y Zygadlo, J. (2014) Fumigant toxicity of five essential oils rich in ketones against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). Agriscientia, 31, 35-41.

Herrera, J.M., Zunino, M.P., Dambolena, J.S., Pizzolitto, R.P., Gañan, N.A., Lucini, E.I., y Zygadlo, J.A. (2015) Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais*. Industrial Crops and Products, 70, 435-442.

Himel, C.M. (1969) The optimum size for insecticide spray droplets. Journal of economic entomology, 62(4), 919-925.

Holdgate, M. (1955) The wetting of insect cuticles by water. *Journal of Experimental Biology*, 32, 591-617.

Hollingsworth, R.G. (2005) Limonene, a citrus extract, for control of mealybugs and scale insects. *Journal of economic entomology*, 98, 772-779.

Hubert, J., Münzbergová, Z., y Santino, A. (2008) Plant volatile aldehydes as natural insecticides against stored-product beetles. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64, 57-64.

IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Ibrahim, M.I., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tiilikkala, K., y Holopainen, J.K. (2001) Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: With special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agricultural and food science in Finland*, 10, 243-259.

INV, I.N.d.V. (2019) Instituto Nacional de Vitivinicultura, INV, Vol. 2017. <https://www.argentina.gob.ar/instituto-nacional-vitivinicultura>

Jaramillo-Colorado, B.E., Pino-Benitez, N., y González-Coloma, A. (2019) Volatile composition and biocidal (antifeedant and phytotoxic) activity of the essential oils of four Piperaceae species from Choco-Colombia. *Industrial Crops and Products*, 138, 111-463.

Karamaouna, F., Kimbaris, A., Michaelakis, A., Papachristos, D., Polissiou, M., Papatsakona, P., y Tsora, E. (2013) Insecticidal activity of plant essential oils against the vine mealybug, *Planococcus ficus*. *Journal of Insect Science*, 13, 142, 1-13.

Mani, M., Shivaraju, C., y Narendra Kulkarni, S. (2014) New Delhi, Heidelberg, New York, Dordrecht, London. *The grape entomology*, Springer New Delhi

Melo, A.A., Hunsche, M., Guedes, J.V., Hahn, L., y Feltrin, N.M. (2019) Study of the effects of adjuvants associated with insecticides on the physicochemical properties of the spray solution and characterization of deposits on wheat and maize leaves under simulated rain. *Engenharia Agrícola*, 39, 315-322.

Mucciarelli, M., Camusso, W., Berteza, C.M., Bossi, S., y Maffei, M. (2001) Effect of (+)-pulegone and other oil components of *Mentha x piperita* on cucumber respiration. *Phytochemistry*, 57, 91-98.

Nyankson, E., DeCuir, M.J., y Gupta, R.B. (2015) Soybean lecithin as a dispersant for crude oil spills. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3, 920-931.

Palacios, S.M., Bertoni, A., Rossi, Y., Santander, R., y Urzúa, A. (2009) Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica* (L.). *Parasitology Research*, 106, 207-212.

Park, I.-K., Lee, H.-S., Lee, S.-G., Park, J.-D., y Ahn, Y.-J. (2000) Insecticidal and fumigant activities of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: Attelabidae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 2528-2531.

Pekas, A. (2011) Biological pest control in citrus: an alternative to chemical pesticides with benefits for essential oil quality. In *International Federation of Essential Oils and Aroma Trades*., pp. 115-124. Barcelona.

Peschiutta, M. (2017). La cochinilla harinosa de la vid: ¿Cómo controlar una plaga de gran impacto económico mundial? In *Bioplaguicidas* (ed. by J. Zygadlo), pp. 13-38. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Peschiutta, M., Arena, J., Ramirez Sanchez, A., Gomez Torres, E., Pizzolitto, R., Merlo, C., Zunino, M., Omarini, A., Dambolena, J., y Zygadlo, J. (2016) Effectiveness of Mexican oregano essential oil from the Dominican Republic (*Lippia graveolens*) against maize pests (*Sitophilus zeamais* and *Fusarium verticillioides*). *Agriscientia*, 33, 89-97.

Peschiutta, M., Pizzolitto, R., Ordano, M., Zaio, Y., y Zygadlo, J. (2017) Laboratory evaluation of insecticidal activity of plant essential oils against the vine mealybug, *Planococcus ficus*. *VITIS Journal of Grapevine Research*, 56, 79–83.

Peschiutta, M.L., Brito, V., Ordano, M., y Zygadlo, J.A. (2019a) Efficacy of selected volatile compounds for organic vine mealybug control. *VITIS: Journal of Grapevine Research*, 58, 1-6.

Peschiutta, M.L., Brito, V.D., Achimón, F., Zunino, M.P., Usseglio, V.L., y Zygadlo, J. (2019b) New insecticide delivery method for the control of *Sitophilus zeamais* in stored maize. *Journal of Stored Products Research*, 83, 185-190.

Preininger, C., Sauer, U., Bejarano, A., y Berninger, T. (2018) Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 7265-7282.

Quarles, W. (1992) Diatomaceous earth for pest control. *IPM practitioner*, 14, 1-11.

Raigon, J.M. (2013) Plagas y enfermedades de la vid, AER San Martín.
https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-_plagas_y_enfermedades_en_vid1.pdf

Robu, V., Covaci, G., y Popescu, I.M. (2015) The use of essential oils in organic farming. *Research Journal of Agricultural Science*, 47, 134-137.

Scalerandi, E., Flores, G.A., Palacio, M., Defagó, M.T., Carpinella, M.C., Valladares, G., Bertoni, A., y Palacios, S.M. (2018) Understanding synergistic toxicity of terpenes as insecticides: Contribution of metabolic detoxification in *Musca domestica*. *Frontiers In Plant Science*, 9, 1579.

Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012), "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods* 9(7): 671-675, PMID 22930834 (on Google Scholar).

SENASA (2017) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
<http://www.senasa.gov.ar/>

SENASA (2019) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
<http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-504-2010-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

Sforza, R., Kirk, A., y Jones, W. (2005) Results of foreign exploration for natural enemies of *Planococcus ficus* (Homoptera: Pseudococcidae), a new invasive mealybug in California vineyards. 7th International Conference on Pests in Agriculture, pp. 26-27.

Smid, E.J., de Witte, Y., y Gorris, L.G. (1995) Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. *Postharvest Biology and Technology*, 6, 303-312.

Subramanyam, B. y Hagstrum, D.W. (2012) Alternatives to pesticides in stored-product IPM Springer Science & Business Media. Kansas.

Sun, Y.P. y Johnson, E. (1960) Analysis of joint action of insecticides against house flies. *Journal of Economic Entomology*, 53, 887-892.

Torregrosa, L., Vialet, S., Adivèze, A., Iocco-Corena, P., y Thomas, M.R. (2015). Grapevine (*Vitis vinifera* L.). En *Agrobacterium* protocols, pp. 177-194. Springer.

Uk, S. (1977) Tracing insecticide spray droplets by sizes on natural surfaces. The state of the art and its value. *Pesticide Science*, 8, 501-509.

Vayias, B. y Athanassiou, C. (2004) Factors affecting the insecticidal efficacy of the diatomaceous earth formulation SilicoSec against adults and larvae of the confused flour beetle, *Tribolium confusum* DuVal (Coleoptera: Tenebrionidae). *Crop Protection*, 23, 565-573.

Vincenzetti, P. G. (1978). [Alloxydimedon Sodium (Carbodimedon), new herbicide against Gramineae, selective in Dicotyledoneae cultures (sugar-beet, potato, peas, garlic, etc.)]. In *Mediterranean Symposium of Herbicides*. Madrid. 6-10 Mar 1978.

Walton, V. y Pringle, K. (2004) Vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret)(Hemiptera: Pseudococcidae), a key pest in South African vineyards. A review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 25, 54-62.

Walton, V.M., Daane, K.M., Bentley, W.J., Millar, J.G., Larsen, T.E., y Malakar-Kuenen, R. (2006) Pheromone-based mating disruption of *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in California vineyards. *Journal of economic entomology*, 99, 1280-1290.

Weidenhamer, J.D., Menelaou, M., Macias, F.A., Fischer, N.H., Richardson, D.R., y Williamson, G.B. (1994) Allelopathic potential of menthofuran monoterpenes from *Calamintha ashei*. *Journal of chemical ecology*, 20, 3345-3359.

Yeom, H., Kang, J., Kim, G., y Park, I. (2012) Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of Apiaceae plant essential oils and their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7194–7203.

Yu, Y., Zhu, H., Ozkan, H., Derksen, R., y Krause, C. (2009) Evaporation and deposition coverage area of droplets containing insecticides and spray additives on hydrophilic, hydrophobic, and crabapple leaf surfaces. *Transactions of the ASABE*, 52, 39-49.

Zunino, M.P., Herrera, J.M., Pizzolitto, R.P., Rubinstein, H.C.R., Zygadlo, J.A., y Dambolena, J.S. (2015) Effect of Selected Volatiles on Two Stored Pests: The Fungus *Fusarium verticillioides* and the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63, 7743-7749.

ANEXO

Tabla 3. Concentración molar de los compuestos naturales evaluados

COMPUESTO	MOLARIDAD
Cuminaldehido 600 $\mu\text{L/L}$	3,96 mM
Cuminaldehido 1000 $\mu\text{L/L}$	6,60 mM
Cuminaldehido 1200 $\mu\text{L/L}$	7,92 mM
(+)-mentofurano 600 $\mu\text{L/L}$	3,87 mM
(+)-mentofurano 1000 $\mu\text{L/L}$	6,45 mM
(+)-mentofurano 1200 $\mu\text{L/L}$	7,74 mM
(2E,6Z)-2,6-nonadienal 600 $\mu\text{L/L}$	3,71 mM
(2E,6Z)-2,6-nonadienal 1000 $\mu\text{L/L}$	6,19 mM
(2E,6Z)-2,6-nonadienal 1200 $\mu\text{L/L}$	7,42 mM
Salicilaldehido 600 $\mu\text{L/L}$	5,75 mM
Salicilaldehido 1000 $\mu\text{L/L}$	9,58 mM
Salicilaldehido 1200 $\mu\text{L/L}$	11,50 mM
(R)-(+)-pulegona 600 $\mu\text{L/L}$	3,68 mM
(R)-(+)-pulegona 1000 $\mu\text{L/L}$	6,14 mM
(R)-(+)-pulegona 1200 $\mu\text{L/L}$	7,37 mM
Limoneno 1500 $\mu\text{L/L}$	9,26 mM

Tabla 4. Propiedades físicas de los compuestos naturales evaluados

COMPUESTO	DENSIDAD	PESO MOLECULAR
Cuminaldehido	978 kg/m ³	148,20 g/mol
(+)-mentofurano	969 kg/m ³	150,22 g/mol
(2E,6Z)-2,6-nonadienal	855 kg/m ³	138,21 g/mol
Salicilaldehido	1170 kg/m ³	122,12 g/mol
(R)-(+)-pulegona	935 kg/m ³	152,23 g/mol
Limoneno	841 kg/m ³	136,24 g/mol