



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



Carrera de Ciencias Biológicas  
Tesina de Grado para optar por el título de Biólogo

# Compuestos fenólicos como bioplaguicidas de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky)

Tesinista:

Rodriguez, Alfredo Manuel    Firma: .....

Directora:

Dra. Zunino, María Paula    Firma: .....

Codirector:

Dr. Dambolena, J. Sebastián    Firma: .....

Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales, Ciencias Biológicas.  
Área de Aromas y Pigmentos, ICTA.  
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC.

# Compuestos fenólicos como bioplaguicidas de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky)

Tribunal Examinador

Presidente:

Dra. Mg. Diana O. Labuckas Firma: .....

Vocal:

Dra. Zunino, María Paula Firma: .....

Vocal:

Dr. Meriles, José Firma: .....

Calificación: .....

Fecha: .....

# AGRADECIMIENTOS

A la Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales y al Instituto de Ciencia y Técnica de los Alimentos (ICTA) por proporcionarme los espacios y el instrumental necesario para llevar a cabo todo el trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), a través del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FonCyT), y a la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC) por el apoyo económico al proyecto.

A la Universidad Nacional de Córdoba, y especialmente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, y a todos mis profesores por darme la oportunidad de cumplir el sueño de convertirme en biólogo, y hacer de estos últimos años una de las mejores experiencias de mi vida. Espero ahora poder retribuir un poco de todo lo que me han legado.

A mis directores, Paula y Sebastián, por creer en mí, tomar en cuenta todos mis comentarios, por toda la paciencia y las horas que dieron para escucharme y ayudarme con todo, por la confianza que pusieron en mi trabajo, que fue invaluable.

Al jefe de cátedra, Julio y todos mis compañeros de laboratorio por las horas de su tiempo y trabajo a enseñarme y ayudarme y especialmente por la compañía, las charlas, los mates, las horas de laboratorio y escritorio, por hacerme un lugar siempre, por la contención que significa poder trabajar en un ambiente tan especial.

A todos mis compañeros y amigos que hice en esta facultad por acompañarme todos estos años. Me sería imposible describir con palabras todas las cosas importantes que compartí con estas personas, sin las cuales no hubiera sido posible llegar a esta instancia. Sepan que siempre van a poder contar conmigo y que trabajaré pertinazmente para que nuestros caminos siempre se crucen.

A mis raíces, mi provincia, Catamarca, mi colegio, mis profesores y amigos que vienen desde antes porque también fueron parte de todo esto, me formaron y me acompañaron, e hicieron posible que llegase a ser lo que hoy soy.

A toda mi familia, principalmente a mis padres, Isabel y Raúl, y mi hermana Lucia, que son la imagen que me acompaña desde que tengo memoria, cuya entereza siempre me sostuvo, que me empujaron siempre a cumplir mis sueños y buscar la felicidad, y que me enseñaron a trabajar con entereza y tenacidad, que las cosas se deben hacer bien siempre cueste lo que cueste y que el valor de las cosas se mide por el esfuerzo y dedicación que ponemos en ellas. Con ellos compartí todos los momentos importantes de mi vida y es con ellos con quien más quiero compartir esto también. Que mi alegría sea la suya y estén siempre conmigo.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis abuelas, Angelita e Isabel, por demostrarme siempre su cariño, y ser dos grandes referentes en mi vida, que me formaron con su sabiduría y su visión particular del mundo. Espero que estén orgullosas también y prometo convertirme en el ejemplo de lo que uno puede ser en la vida si se mantiene fiel a sus valores.

## RESUMEN

El gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* (Motsch., Coleoptera: Curculionidae) es una importante plaga primaria de granos almacenados y sus productos derivados. Las infestaciones generadas por estos insectos son un problema grave que genera pérdidas en la producción y pone en riesgo la inocuidad del alimento (Sallam, 1999; Ferreira-Castro y col., 2012). Los métodos tradicionales de control de plagas durante las operaciones de poscosecha se basan en la aplicación de plaguicidas sintéticos (Mejía, 2003; Abadía y col., 2013). Sin embargo, el surgimiento de variedades de plagas resistentes a estos insecticidas (Matteson, 1995; Guerra-Pimentel y col., 2008), los riesgos de seguridad asociados a la aplicación y manipulación de compuestos tóxicos (Abadía y col., 2013) junto con la preocupación por la posible contaminación de los granos con agroquímicos (Riley & Curtis, 1992) ha suscitado el recrudescimiento de las normativas nacionales e internacionales con respecto a la utilización de estos productos (Mejía, 2003; Abadía y col., 2013) y al surgimiento de nuevas preferencias en el consumidor (Riley & Curtis, 1992).

Los bioplaguicidas formulados a partir de productos naturales, en cambio, tienen la ventaja de ser seguros para el consumo y biodegradables (Isman, 2006; Rajendran & Skiranjini, 2008; Seiber y col., 2014). Se han reportado numerosos compuestos fenólicos naturales con propiedades interesantes para ser empleados en el control de insectos plaga (por ej. Obeng-Ofori y col., 1994; Arnason y col., 1997; Huang y col., 2002; Houghton y col., 2006; Wang y col., 2009). Para determinar su potencial, seleccionamos 12 compuestos fenólicos naturales junto con 3 compuestos estructuralmente relacionados y medimos su actividad como atrayentes o repelentes, su toxicidad aguda por contacto y su capacidad para inhibir la enzima acetilcolinesterasa (AChE) *in vitro* de *S.zeamais*. Con estos datos intentamos determinar qué características estructurales de estos compuestos afectan las respuestas medidas mediante un análisis de estructura-actividad cuantitativo (QSAR).

De los compuestos ensayados por su actividad como semioquímicos destacaron como atrayentes Guaiacol ( $IR_{40\mu M} = 77$ ) y Eugenol ( $IR_{0.4\mu M} = 51$ ). La mayoría de los compuestos atrayentes están relacionados estructuralmente con los fenilpropanoides. Además, las interferencias estéricas sobre el grupo  $Ph - OH$  y la presencia de grupos aldehído dentro de la molécula afectarían positivamente la capacidad atractiva. La actividad atrayente del compuesto Vainillina ( $IR_{40\mu M} = 25$ ;  $IR_{4\mu M} = 28$ ) estaría relacionado con la ecología del insecto, el grano almacenado y organismos fúngicos (Kavitha y col., 2005). Los compuestos Timol, Carvacrol, Estragol y Anetol presentaron alta actividad repelente ( $-63 < IR < -45$ ), siendo Carvacrol el que mejor se desempeña a bajas concentraciones ( $IR_{0.4\mu M} = -47$ ). Nuestras observaciones concuerdan con la hipótesis de que la capacidad repelente está afectada positivamente por la presencia de funciones oxigenadas (Nerio y col., 2010) aunque la relación estructura-actividad no ha sido aun completamente esclarecida.

Los compuestos que presentaron mayor actividad AntiAChE fueron, en orden descendente: Carvacrol ( $IC_{50} = 19.4\mu M$ ), Isoeugenol ( $IC_{50} = 235\mu M$ ), Timol ( $IC_{50} = 964\mu M$ ) y Eugenol ( $IC_{50} = 8016\mu M$ ). La capacidad de inhibir la enzima AChE parece estar relacionada con la capacidad del compuesto de interaccionar con estructuras de membrana en las que se encuentra embebida dicha enzima y el tamaño de la molécula. El mecanismo de acción para los fenoles involucraría a distintas regiones de la molécula interaccionando con sitios reguladores sobre la superficie de la enzima causando la obstrucción de la entrada al sitio activo.

Los compuestos no fenólicos Anetol, Estragol presentaron la mejor actividad insecticida por contacto ( $LC_{50} = 41\mu mol/cm^2$  y  $LC_{50} = 77\mu mol/cm^2$ , respectivamente). Los compuestos fenólicos más tóxicos fueron Eugenol ( $LC_{50} = 158\mu mol/cm^2$ ) y Timol ( $LC_{50} = 196\mu mol/cm^2$ ), sin embargo ninguno presenta una toxicidad comparable a los insecticidas de uso comercial. La capacidad insecticida de estos compuestos parece estar gobernada por la capacidad del compuesto de alcanzar los sitios de acción, determinada por el valor de su pKa, y su capacidad de inhibir la enzima AChE, de manera de ejercer un efecto neurotóxico.

## ABSTRACT

The maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motsch., Coleoptera: Curculionidae), is a major pest of stored products and its derivatives. The infestation caused by these insects poses great concern as it can thrill post-harvest grain losses and fungal infections involving mycotoxigenic strains (Sallam, 1999; Ferreira-Castro y col., 2012). In such cases synthetic pesticides are widely used as pest management methods (Mejía, 2003; Abadía y col., 2013). But, the emergence of insecticide-resistant strains (Matteson, 1995; Guerra-Pimentel y col., 2008), the risks associated with handling and application of toxic compounds (Abadía y col., 2013) and the public concern about the presence of agrochemicals in both grains and food (Riley & Curtis, 1992), all together, had given rise to new legislation that limits the use of these products on food production (Mejía, 2003; Abadía y col., 2013) as well as new trends in food consumption (Riley & Curtis, 1992).

Natural-derived pesticides, in the other hand, had the advantage of being recognized as safe for both consumers and the environment (Isman, 2006; Rajendran & Skiranjini, 2008; Seiber y col., 2014). Natural-occurring phenolic compounds, particularly, had been recently acknowledge as active molecules with interesting properties for the management of entomological plagues (e.g. Obeng-Ofori y col., 1994; Arnason y col., 1997; Huang y col., 2002; Houghton y col., 2006; Wang y col., 2009). In order to determine their potential, we selected a group of 12 natural-occurring phenolic compounds with 3 other structurally-related compounds and quantify their semiochemical activity in attraction-repellence essays, acute contact toxicity and neurotoxicity by *in vitro* acetylcholinesterase (AChE) inhibition essay against *S.zeamais*. In addition we looked into the relation between structure parameters (descriptors) and bioactivity, by QSAR analysis.

The best attractants were Guaiacol ( $IR_{40\mu M} = 77$ ) and Eugenol ( $IR_{0.4\mu M} = 51$ ). Almost the entire groups of compounds that exert attractive responses on *S.zeamais* were structurally-related with phenylpropanoids. Besides, steric interference surrounding the *Ph – OH* group as well as the presence of aldehyde moieties within the molecule had been positively associated with the attractiveness against this beetle. We also postulated a possible relation between the attractive potential of Vanillin ( $IR_{40\mu M} = 25$ ;  $IR_{4\mu M} = 28$ ) and the ecology of stored-grain, the maize weevil and fungal organisms (Kavitha y col., 2005).

Thymol, Estragole and *trans*-Anethole exert the higher repellence activity ( $-63 < IR_{40\mu M} < -45$ ) while Carvacrol show the lowest *IR*'s value at the lowest concentrations measured ( $IR_{0.4\mu M} = -47$ ). Our data agreed with the hypothesis of oxygenated compounds being more active than hydrocarbons (Nerio y col., 2010) although the structure-activity relationship hasn't been completely elucidated yet.

Carvacrol, Ioeugenol, Thymol and Eugenol had the highest antiAChE activity ( $IC_{50} = 19.4\mu M$ ;  $IC_{50} = 235\mu M$ ;  $IC_{50} = 964\mu M$ ,  $IC_{50} = 8016\mu M$ , respectively). The inhibition seems to be related with the ability of these molecules to form interactions with regulatory sites placed on the enzyme's surface, causing the obstruction of the active site.

The non-phenolic compounds *trans*-Anethole and Estragole were the most toxic molecules against the maize weevil ( $LC_{50} = 41\mu mol/cm^2$  and  $LC_{50} = 77\mu mol/cm^2$  respectively) while Eugenol ( $LC_{50} = 158\mu mol/cm^2$ ) and Timol ( $LC_{50} = 196\mu mol/cm^2$ ) were the most toxic only among the phenolic compounds. Nevertheless none of the molecules that were included in this research were even close to the toxicity of the synthetic organophosphates' insecticides. The acute contact toxicity seemed to be governed by the capability of these molecules to reach critical sites within the beetle's body, determined by the pKa's value, and their ability to exert neurotoxic effects by inhibit the AChE activity.

# CONTENIDO

## Agradecimientos

## Resumen

### Capítulo I – Introducción General

El gorgojo del maíz, <i>Sitophilus zeamais</i> (Motschulsky).....	1
Control Químico .....	2
Productos Naturales, Bioactividad y Manejo Integrado de Plagas .....	5
Compuestos fenólicos .....	5
Objetivos .....	6
Objetivos Generales .....	6
Objetivos específicos .....	6
Materiales.....	6

### Capítulo II - Actividad como Semioquímico

Metodología .....	8
Análisis .....	9
Análisis Cualitativo.....	9
Resultados .....	10
Repelentes .....	10
Atrayentes .....	10
Mixtos .....	10
Análisis Cualitativo.....	11

### Capítulo III - Actividad Insecticida

Metodología .....	13
Análisis .....	13
Resultados .....	13

### Capítulo IV - Actividad AntiAChE

La enzima AChE.....	15
Metodología .....	16
Análisis .....	16
Resultados .....	17

### Capítulo V - Análisis QSAR

Predictores .....	18
Metodología .....	19
Resultados .....	20
Actividad AntiAChE.....	20
Actividad Insecticida .....	21

### Capítulo VI - Discusión final y conclusiones

Actividad como semioquímicos.....	23
Actividad AntiAChE.....	25
Actividad Insecticida .....	26
Miscelánea .....	27
Conclusiones .....	28

### Bibliografía y Anexos

Bibliografía .....	29
Anexo.....	37

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En el mundo existen más de mil especies de insectos que se alimentan, viven y se reproducen en productos almacenados de la agroindustria (Rajendran, 2002) causando la pérdida del aproximadamente el 20% de la producción mundial de alimentos (Sallam, 1999).

Aproximadamente unas 250 de estas especies se encuentran presentes en el cono sur (Cubillos, 1983). A pesar de que muchas veces puedan pasar desapercibidas debido a su pequeño tamaño, estos insectos son capaces de tolerar condiciones mucho más severas que sus análogos “silvestres” si consideramos que son capaces de desarrollarse sobre un sustrato con un porcentaje de humedad mínimo. Poseen además de la capacidad de alimentarse de una enorme variedad de sustratos secos de origen tanto animal como vegetal y un estado adulto con un periodo de vida notablemente prolongado, lo que sumado a su capacidad de reproducirse continuamente aún incluso bajo condiciones desfavorables, e incluso sobrevivir largos periodos sin alimentarse, les confiere una capacidad de infestación inigualable. No es de extrañarse entonces que muchas de estas especies tengan distribuciones cosmopolitas afectando la producción de granos y sus productos derivados en prácticamente todos los ambientes imaginables (Lindsey, 1944).

Las especies de insectos que infestan productos almacenados existen desde que el hombre comenzó a emplear sitios de almacenamiento para sus cosechas, lo que puede remontarse hasta el Neolítico (Cubillos, 1983). A lo largo de su historia han evolucionado para poder vivir y desarrollarse en las condiciones provistas por los granos de cereales de importancia alimentaria tanto enteros como procesados, y en sus productos derivados durante la fase de almacenamiento. La relación entre el hombre y el desarrollo de las plagas ha sido tan íntima que hoy en día es casi imposible encontrar poblaciones que existan y se desarrollen independientemente de los agroecosistemas (Lindsey, 1944).

La dinámica que sigue una plaga de esta naturaleza puede resumirse como sigue: en primer lugar el insecto debe llegar al sitio de almacenamiento, ya sea por sus propios medios o en los mismos granos previamente a que se lleve a cabo su almacenamiento en graneros, bodegas, silos, etc. Una vez dentro, si los individuos pueden tolerar las condiciones de humedad y temperatura, tienen a su disposición una gran cantidad de alimento que asegura su multiplicación y supervivencia. La actividad metabólica resultante incrementa la humedad y temperatura del medio en que se desarrollan creando las condiciones para que otras especies de insectos de granos almacenados se multipliquen en un proceso denominado facilitación. El fenómeno se va autocatalizando hasta que la humedad es propicia para la violenta proliferación de hongos que elevan aún más la temperatura, haciéndola intolerable para los insectos que emigran hacia otras fuentes de alimento. El grano queda destruido, disminuyendo la disponibilidad de alimentos y ocasionando graves pérdidas (Cubillos, 1983).

A esta altura no debería extrañarnos que nuestra capacidad de desarrollar estrategias y técnicas para el control efectivo de las plagas de insectos haya ido de la mano con el avance de nuestro entendimiento de la ecología del insecto y su relación con las condiciones ambientales, la biología del grano almacenado, la presencia de plagas secundarias, etc.

## El gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky)

El género *Sitophilus*, perteneciente al orden Coleoptera, familia Curculionidae, incluye especies de gorgojos reconocidas como importantes plagas de granos almacenados y sus productos, como son el gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky); el gorgojo del arroz, *S.oryzae* (L.) y el gorgojo del trigo, *S.granarius* (L.) (Fig. 1).

Evolutivamente estuvieron relacionados con especies que se alimentaban de granos silvestres cuya distribución habría abarcado una buena porción de Eurasia y África, a pesar de que sus orígenes geográficos pueden no haber sido los mismos. Esto se deduce principalmente del hecho de que *S.zeamais* y *S.oryzae* pueden coexistir en zonas tropicales y subtropicales, a pesar de que esta última también se encuentra presente en zonas templadas, mientras que *S.granarius* está adaptada preferentemente a climas templados (Lindsey, 1944).

*Sitophilus zeamais* es uno de los principales insectos que ataca al maíz almacenado. Las pérdidas en la producción de granos debidas a este insecto a nivel mundial puede ser de hasta un 10% (Mejía, 2003). Se considera una plaga primaria porque los adultos son capaces de horadar la cubierta del grano sano. De esta forma éstos quedan totalmente perforados y prácticamente huecos por lo que ya no son aptos para el consumo. Además genera pérdida de poder germinativo y perdidas de peso que rondan el 4-5% aunque en grandes infestaciones puede alcanzar hasta un 30-40% (Food and Agriculture Organization, FAO, 2015).

Este gorgojo que alcanza los 3-5 mm de largo aproximadamente, presenta una coloración café-castaño o negra. Posee una cabeza prolongada en un pico o *rostrum*; alas oblongas y antenas acodadas en forma de maza; tórax alargado y cónico hacia la cabeza y con puntuaciones ovales en su dorso. Morfológicamente es prácticamente indistinguible de *S.oryzae*, y para su identificación se requiere de un análisis de genitalia.





Figura 1 - De izquierda a derecha: *S. granarius* (gorgojo del trigo), *S. zeamais* (gorgojo del maíz) y *S. oryzae* (gorgojo del arroz).  
Fuente: Abadía y col., 2013, cortesía de la Canadian Grain Commission

Las hembras de *S. zeamais* practican un agujero en el grano entero, y dejan un solo huevo y lo sellan con un fluido gelatinoso que luego endurece. Posteriormente nacen las larvas apodas que se alimentan en el interior del grano hasta que se transforma en pupas. Cada hembra coloca entre 50 y 250 huevos durante el transcurso de su vida adulta, los que eclosionan entre los 4 a 14 días posteriores a la postura, dependiendo de la temperatura y humedad relativa del ambiente (Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de plagas, SiNaViMo, 2016). La temperatura a la que se desarrollan los huevos puede variar entre 15-35°C con un óptimo a 25°C y 10% de humedad (Brich, 1944; FAO, 2015).

Los estados de huevo, larva y pupa habitan dentro de túneles o cámaras escavados dentro del mismo grano, y por lo tanto estos estados no se observan normalmente. La larva vive entre 3 y 4 semanas, pasando al estado pupa donde permanecerá entre 8 y 10 días más hasta eclosionar como un adulto. Este ciclo puede concluir en aproximadamente un mes en condiciones óptimas de temperatura y humedad, prolongándose a medida que la temperatura disminuye. La vida del gorgojo adulto se prolonga por 7 a 8 meses, y a veces hasta un año. Estimativamente pueden llegar a producirse entre 6 y 7 generaciones por año dependiendo de las condiciones climáticas (Sallam, 1999; SiNaViMo, 2016). A diferencia de otras especies los adultos poseen hábitos voladores, por lo que comienzan su ataque en el campo, continuándolo luego en el almacenaje (Cubillos, 1983; Sallam, 1999; SiNaViMo, 2016). Los ataques ocurren preferentemente sobre granos sanos y enteros, pudiendo localizarse en cualquier parte de la masa de granos.

Contrariamente a lo que sugiere su denominación, el gorgojo del maíz adulto también ataca granos de otros cereales (trigo, arroz, avena, etc), subproductos de la molienda y productos elaborados (fideos, galletitas, pan blanco, bizcochos); mientras que las larvas se alimentan exclusivamente de semillas de cereales (Cubillos, 1983; Sallam 1999; SiNaViMo, 2016).

Se distribuyen en todo tipo de climas tropicales y subtropicales. El gorgojo *S. zeamais*, a diferencia de su congénere *S. oryzae* es capaz de tolerar bajas temperaturas. En Argentina puede encontrarse más que nada en el norte (FAO, 2015). En Latinoamérica, debido al cambio climático se teme que su distribución pueda extenderse hacia el sur a medida que algunas regiones se tornen más cálidas y húmedas (SiNaViMo, 2016). Para una lectura más detallada sobre la biología y la ecología del gorgojo del maíz consultar el trabajo de B. C. Longstaff (1981), “*Biology of the grain pest species of the genus Sitophilus (Coleoptera: Curculionidae) : a critical review*”.

## Control Químico

El daño producido por las infestaciones de *S. zeamais* suele ser de dos tipos:

- *Daño directo*, el cual es provocado por el consumo del grano, lo que causa pérdida de peso, reducción de poder germinativo, disminución de la cantidad de nutrientes y de la calidad de comercialización (Santos y col., 1990);
- *Daño indirecto* producto del calentamiento y la migración de la humedad hacia los sitios de almacenamiento (Appert, 1987; Mills, 1989; Okiwelu y col., 1987), lo que además facilita el asentamiento de plagas secundarias, como insectos plagas capaces de alimentarse de grano dañado (*Tribolium castaneum* (Herbst.) y *T. confusum* (Jacquelin du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae)) y microorganismos como bacterias y hongos (Cravedi & Quaroni, 1982; Sauer y col., 1984; Magan y col., 2003).

La contaminación con insectos es un problema importante para el control de calidad de los granos almacenados. El gorgojo al alimentarse no solo causa reducción de peso y aumento del porcentaje de granos dañados, además los restos de insectos muertos, telas y deyecciones aumentan el porcentaje de materias extrañas en el granel (Sallam, 1999; Mejía, 2003).

Las infestaciones por insectos generan condiciones propicias para el ataque de hongos plaga, produciendo pérdidas tanto de características cualitativas como cuantitativas (Cox & Collins, 2002; Cox, 2004; Lopez y col., 2006; Rajendran & Skiranjini, 2008; Abadía y col., 2013). Se ha demostrado que los gorgojos del género *Sitophilus* actúan como vectores de hongos, propiciando la infestación (Ferreira-Castro y col., 2012): *S.zeamais* particularmente es capaz de portar esporas de hongos como *Fusarium verticillioides* y *Aspergillus flavus* (Ferreira-Castro y col., 2012), causantes de la podredumbre de la espiga de maíz en Argentina (Chulze y col., 2000) y principales productores de micotoxinas en maíz (Miller, 2008). Por estas razones, los países productores de cereales tienen normativas específicas que regulan la presencia de insectos en el grano almacenado. En el caso de los productos destinados a exportación también se deben observar las normativas de calidad del país destinatario. Particularmente FAO recomienda que el porcentaje de granos de maíz atacados por gorgojos no debe superar el 1% antes de su comercialización (Mejía, 2003). En Argentina, por su parte, se encuentra prohibida la comercialización y exportación de granos con insectos vivos (Abadía y col., 2013).

El almacenamiento es la operación poscosecha más importante y crítica para evitar pérdida de la producción. Los productos cosechados experimentan periodos variables de almacenaje dependiendo de la demanda del mercado, el tamaño de la cosecha y las necesidades del productor. Mientras mayor es el tiempo que dura el almacenamiento, mayores son las probabilidades de que surja una plaga, si no se toman los recaudos apropiados. Esto obliga a los productores a tomar numerosas medidas tanto para prevenir como para eliminar las distintas plagas que puedan desarrollarse en el sitio (Sallam, 1999).

El control químico de *S.zeamais* es una de las estrategias más prevalentes empleadas actualmente a pesar de no ser siempre eficaces (Mejía, 2003). Esta técnica se lleva a cabo mediante la aplicación de insecticidas sólidos como organofosforados o carbamatos, y fumigaciones directamente sobre los granos almacenados utilizando bromometano o fosfina (Fig. 2). El gorgojo es especialmente sensible a estos principios activos debido a sus efectos neurotóxicos resultantes de su capacidad de inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Houghton y col., 2006). Las prácticas incluyen la aplicación de insecticidas de forma preventiva antes del almacenaje ya sea sobre de las instalaciones de almacenamiento o sobre el grano directamente, la aplicación preventiva de insecticida sobre la parte superior de silos luego del llenado y aplicaciones durante el almacenamiento para el control de plagas ya instaladas (Abadía y col., 2013). En la mayoría de los casos el grano almacenado una vez tratado puede considerarse libre de la plaga pero no siempre se previene la reinfestación debido a que el estado de pupa tiene una baja sensibilidad natural a algunos de estos insecticidas por lo que nuevos adultos pueden emerger para reiniciar el proceso (FAO, 2015).

Muchos países en el mundo se han tornado paulatinamente menos tolerantes con la utilización de pesticidas en la producción de alimentos por razones muy diversas. Algunos compuestos, por ejemplo, se han prohibido por ser particularmente peligrosos durante las tareas de manipulación y aplicación (Matteson, 1995). Podemos mencionar el caso del gas fosfina, extremadamente tóxico tanto para insectos como para humanos y otros animales, es también corrosivo y capaz de auto encenderse a concentraciones altas. Debido a su peligrosidad su aplicación conlleva numerosas medidas de precaución para con los operadores y para evitar intoxicaciones accidentales lo que implica complicaciones para el productor (Abadía y col., 2013).

La utilización de ciertos químicos se ha discontinuado debido al riesgo que significa su liberación accidental en el ambiente:

- El gas fosfina, particularmente, debe aplicarse en recintos donde se asegure la hermeticidad ya que tiende a fugarse hacia los alrededores afectando a los organismos de las inmediaciones (Abadía y col., 2013). Esto ameritó, por ejemplo, que en el año 2016 se aprobara en nuestro país la ley 27.262 que determina la prohibición en todo el territorio argentino del uso de plaguicidas fumigantes durante el transporte en camiones y vagones de granos, productos y subproductos agrícolas.
- El gas de bromuro de metilo o bromometano, un insecticida halogenado, actualmente ha sido prohibido a nivel internacional por el Protocolo de Montreal por su relación con la depleción del ozono estratosférico (Price, 1996).
- Los compuestos organofosforados son especialmente peligrosos debido a su gran poder residual ya que una vez en el ambiente son persistentes o recalcitrantes en el suelo o en aguas superficiales (Matteson, 1995; Abadía y col., 2013).

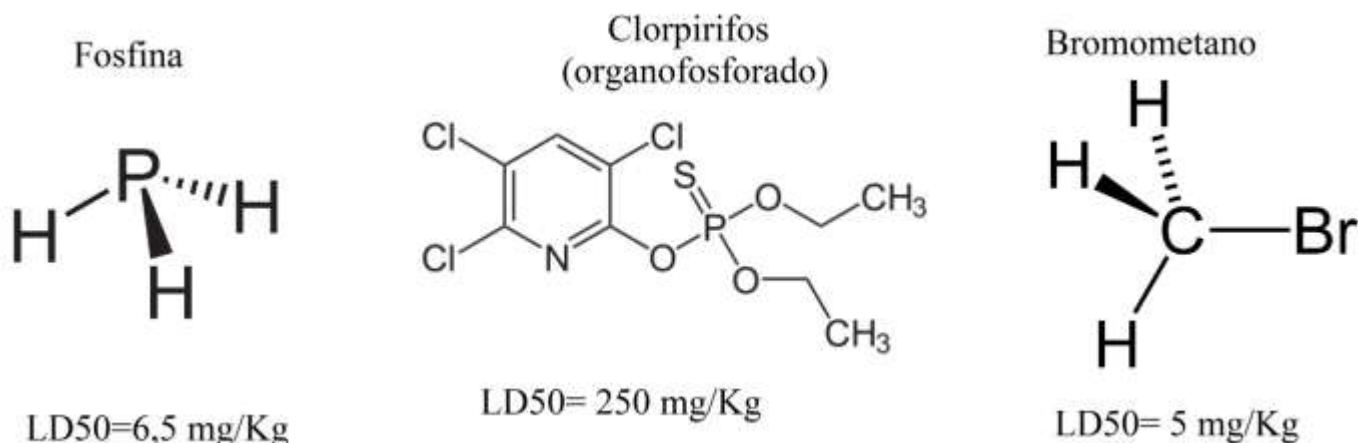


Figura 2 – Compuestos químicos comúnmente empleados como insecticidas en el control químico de *S.zeamais* (Mots.). Se muestran además los valores de Dosis Letal 50% ( $LD_{50}$ ) utilizados como referencia toxicológica para humanos. Fuente: Hojas de Seguridad (SDS) del producto.

Otro problema a tener en cuenta es el fenómeno de la resistencia a insecticidas. El número de especies plaga de los sitios de almacenamiento que han desarrollado poblaciones con resistencia a uno o más principios activos (entre las que se incluyen las especies del género *Sitophilus*) viene en aumento desde la década de 1960 (Dyte, 1974). En Argentina las primeras variedades de *S.zeamais* resistentes a insecticidas convencionales fueron reportadas en 1976 (Champ & Dyte, 1976). Más recientemente se ha reportado la presencia de cepas de *S.zeamais* resistentes a fosfina en algunas regiones de Brasil (Guerra-Pimentel y col., 2008).

El aumento de la dosis empleada no suele ser efectivo para solucionar este problema en el largo plazo. Algunas economías, como la de Holanda y Dinamarca han restringido el uso de pesticidas como una forma de mantener a su producción agropecuaria competitiva, debido a que en algunos casos el abuso o uso irresponsable de estos agroquímicos lleva al aumento de la resistencia de las plagas y esto aumenta los requerimientos de nuevas aplicaciones en un bucle de retroalimentación positiva que eleva innecesariamente los costos de producción (Matteson, 1995). La resistencia de una población a un principio activo particular se han intentado afrontar utilizando principios activos alternativos, lo que en última instancia ha favorecido el desarrollo de cepas con resistencia cruzada o multiresistentes (Dyte, 1974). La resistencia ha impulsado tanto el desarrollo de nuevos compuestos insecticidas como la investigación en la ecología de las plagas y el desarrollo de estrategias de manejo innovadoras donde el control químico tradicional es visto como el último recurso a emplear (Dyte, 1974)

La contaminación de los granos por productos químicos es otro aspecto que genera preocupación. Se debe tomar conciencia que los granos son alimentos que directa o indirectamente serán destinados a seres humanos y/o animales. La utilización de productos químicos para el control de los insectos que también presentan efectos sobre el ser humano pone en riesgo la inocuidad del grano si se exceden los límites máximos de residuos o si su aplicación se realiza incorrectamente o de forma irresponsable (Abadía y col., 2013).

Los granos deben estar ausentes de residuos de productos químicos y biológicos ya que estos se manifiestan hasta en el aceite o el alimento ya elaborado. La mayoría de los países tienen normativas más o menos estrictas sobre el tipo de agroquímicos que se pueden utilizar y el contenido máximo que puede presentar el producto final. Podemos mencionar, por citar algunos casos de relevancia, que la FAO recomienda que los residuos de pesticidas en el grano almacenado no superen los 0,1 mg/Kg (Mejía, 2003) y en Argentina, el límite máximo de residuos de fosfina en granos almacenados aprobado por *Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria* (SENASA, Resolución 934/2010) es de 0,1 mg/kg (Abadía y col., 2013). En el caso de los compuestos organofosforados como el Diclorvós (DDVP) y el Clorpirifós, debido a su alta toxicidad, en Argentina la *Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica* (ANMAT) prohíbe su importación, producción, comercialización y uso en formulaciones de productos domisanitarios (Resolución MSN 456/2009) y productos de liberación controlada (Disposición N° 7292/98). En Argentina está permitido que los granos tengan hasta 5 mg/Kg residuales de DDVP (Abadía y col., 2013). En la Unión Europea, Estados Unidos y Canadá el DDVP y otros compuestos organofosforados se encuentran prohibidos, por lo que puede darse que una carga de granos de exportación sea rechazada si se encuentran trazas residuales de este compuesto (Matteson, 1995).

A todo esto debemos agregar el papel que juega el consumidor final de los alimentos dentro de la cadena productiva. Sea real o injustificada, la percepción de los consumidores sobre el riesgo que constituyen los pesticidas en la seguridad de los alimentos puede traducirse en efectos importantes en el mercado. La preocupación de los consumidores con respecto a las prácticas en donde se emplean agroquímicos ha escalado enormemente en los últimos años y todo indica va a seguir aumentando en los próximos años más allá de que existan o no datos para apoyar o desestimar la hipótesis de que estos compuestos representen un verdadero peligro para la salud humana (Riley &

Curtis, 1992). Una buena parte de la demanda considera que los alimentos orgánicos o libres de agroquímicos son más seguros y saludables que los convencionales. Está marcada tendencia en el mercado puede ser aprovechada por aquellos productores que puedan adaptar su producción a las nuevas exigencias.

## Productos Naturales, Bioactividad y Manejo Integrado de Plagas

Es en este contexto mundial que surge el enfoque de Control o *Manejo Integrado de Plagas* (MIT) cuyos fundamentos proponen incorporar diferentes estrategias y prácticas de control para limitar el daño de los insectos de la forma más económica posible, al mismo tiempo que preserva la inocuidad del grano y minimiza el impacto ambiental y los productos naturales podrían jugar un rol importante en la persecución de este objetivo (Casida & Quistad, 1998; Abadía y col., 2013).

El metabolismo vegetal es capaz de producir una enorme variedad de compuestos químicos. Los aceites esenciales (AE's) son mezclas diversas, que incluyen muchos tipos de moléculas generalmente poco polares. Como resultado de este enorme repertorio de principios activos estas mezclas químicas complejas son capaces de desarrollar las más variadas respuestas en amplio rango de sistemas biológicos, lo que comúnmente se denomina *bioactividad*. La necesidad de reducir al mínimo el impacto producido por la utilización de insecticidas (Abadía y col., 2013) ha suscitado un gran interés en la utilización de productos naturales y derivados de extractos vegetales de origen natural debido a su alta biodegradabilidad, disponibilidad a nivel local y baja toxicidad en mamíferos (Isman, 2006; Rajendran & Skiranjini, 2008; Seiber y col., 2014).

Muchos extractos vegetales pueden afectar distintos aspectos de la ecología de los insectos. Efectos ovicidas, capacidad de inhibir la alimentación, capacidad de repeler, esterilizar o incluso matar a estos organismos son ejemplos de las bioactividades reportadas para algunos AE's (Nawrot & Harmatha, 1994; Isman, 2000; Cox, 2004; Isman, 2006; Rajendran & Skiranjini, 2008).

Los gorgojos del género *Sitophilus* son de las especies de insectos más estudiadas en cuanto a su respuesta frente a distintos productos naturales (Rajendran & Sriranjini, 2008) de la que existe una extensa bibliografía (por ejemplo Isman, 2000; Nerio y col., 2009; Wang y col., 2009; Conti y col., 2010; Conti y col., 2011; Athanassiou y col., 2013; Bougherra y col., 2015 y Herrera y col., 2015a,b entre otros). Actualmente existen numerosos AE's y extractos vegetales con propiedades que podrían emplearse en el control de *S.zeamais* (FAO, 2015). Las estrategias varían. Se han invertido grandes esfuerzos en encontrar principios activos capaces de elicitar el mismo efecto producido por los insecticidas empleados actualmente en el control químico de *S.zeamais* a través de inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE).

Actualmente somos capaces incluso de explotar lo que sabemos sobre la ecología del insecto para el diseño de señuelos y trampas (Cox & Collins, 2002). La asociación e interrelación entre plagas de insectos y/o microorganismos y granos almacenados es considerada como un ecosistema de características particulares (Sinha, 1973). Cada especie de insecto puede vincularse a un nicho específico dentro de este ecosistema, ya sean plagas primarias que atacan granos enteros, plagas secundarias que atacan grano partido e incluso plagas terciarias que se desarrollan sobre granos infestados de hongos y microorganismos (Cubillos, 1983). Se ha demostrado en numerosos estudios que los insectos fitófagos son guiados por señales químicas procedentes del sustrato-huésped en el proceso de selección de su fuente de alimento (Phillips y col., 1993; Germinara y col., 2002; Zhang y col., 2003; Piesik y col. 2008). La identificación de estos semioquímicos (compuestos producidos por una especie capaces de modificar el comportamiento de otra) ha generado gran interés, principalmente por sus aplicaciones en el monitoreo y control de plagas (Phillips, 1997; Cox, 2004).

## Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son una serie de químicos estructuralmente derivados de la molécula de Fenol (hidroxibenceno) caracterizados por presentar un grupo hidroxilo ( $-OH$ ) unido a un anillo aromático tipo benceno (Fig. 3). Entre las propiedades químicas comunes a esta familia podemos mencionar que son miscibles en la mayoría de los solventes orgánicos y parcialmente solubles en agua a temperaturas bajas, actúan como antioxidantes y tienen una acidez relativamente más alta que los alcoholes alifáticos de mismo peso molecular (Rappoport y col, 2003).

Pese a que son mejor conocidos por ser derivados de combustibles fósiles, son productos naturales ampliamente distribuidos en la biosfera. Sin ir más lejos, el compuesto Fenol, materia prima importante para la síntesis de muchos productos químicos industriales, puede hallarse en la naturaleza formando parte de polímeros de lignina, del AE de tabaco (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae) y de agujas de pino (*Pinus sylvestris*, Pinaceae), y como producto de excreción en orina de mamíferos (Rappoport y col., 2003; Tyman y col., 1996).

Los fenoles naturales tienen una gran potencialidad para aplicaciones en el control de plagas de insectos. Pueden actuar como feromonas de insectos como es el caso de Fenol y Guaiacol, para las especies de ortópteros *Locusta migratoria* y *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) (Fuzeau-Braesch y col., 1988; Obeng-Ofori y

col., 1994). Algunos compuestos fenólicos producidos naturalmente por los granos sanos de maíz han sido asociados a la resistencia al ataque de *S.zeamais* (FAO, 2015). El contenido de ácidos fenólicos, como ácido *p*-Cumárico, ácido Caféico, ácido *trans*-Ferúlico y Vainillina, presentes en el grano de maíz está relacionado con el aumento de la dureza del pericarpo y las paredes del endosperma; y se ha demostrado que afecta negativamente al desempeño de *S.zeamais* en parámetros como el número de huevos en cada puesta, el número de individuos que alcanzan el estado juvenil y pérdida de peso en el grano atacado (Arnason y col., 1997).

Muchos fenoles presentes en los AE's pertenecen a la familia de los monoterpenoides (metabolitos secundarios de plantas derivados de la polimerización de dos unidades de isopreno). Debido a su carácter apolar son potencialmente capaces de interferir con la fisiología de aquellos insectos de hábitos fitófagos (Brattsten, 1983). Existe un gran número de trabajos que indican que este grupo de compuestos tienen propiedades insecticidas debido a su capacidad de inhibir la actividad de la enzima AChE (Houghton y col., 2006) así como propiedades repelentes (por ej. Wang y col., 2009).

Monoterpenoides fenólicos como el timol, carvacrol (Fig. 4), *p*-cymeno, eugenol e isoeugenol, presentes en los AEs de plantas aromáticas como tomillo (*Thymus* sp. L., Lamiaceae), orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*(L.) Merr. & L.M.Perry, Myrtaceae) e ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook.f. & Thomson, Lamiaceae) respectivamente, presentan actividad insecticida, según describen diversos autores (Rice & Coats, 1994<sup>ab</sup>; Grodnitzky & Coats, 2002; Huang y col., 2002; Kordali y col., 2008; Yeom y col., 2012; Ortega-Nieblas y col., 2014; Ziaee y col., 2014, respectivamente).

En este trabajo nos propusimos estudiar el potencial de 15 compuestos fenólicos presentes naturalmente en AE's y extractos vegetales, y compuesto relacionados, para aplicaciones relacionadas al control de *S.zeamais* e intentar dilucidar qué características estructurales de esta familia química están relacionadas con su bioactividad.

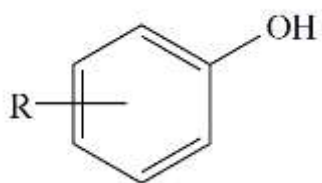


Figura 3 - Compuesto fenólico genérico.  
Extraído de Rappoport y col., 2003.

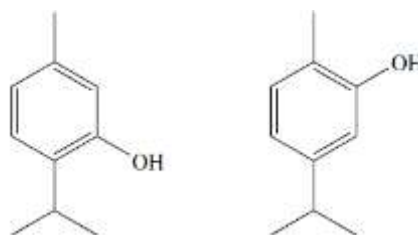


Figura 4 – Dos compuestos fenólicos, Timol y su isómero Carvacrol.  
Extraído de Rappoport y col., 2003.

## OBJETIVOS

### Objetivos Generales

Estudiar el potencial de los compuestos fenólicos naturales como bioplaguicida y semioquímicos del gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* (Motsch.), e identificar características estructurales dentro del grupo de compuestos fenólicos correlacionadas con las respuestas elicitadas por estos.

### Objetivos específicos

- Evaluar el efecto atracción/repelencia de los compuestos fenólicos sobre la conducta de *S. zeamais*.
- Determinar la actividad insecticida por contacto de grupo de compuestos fenólicos contra *S.zeamais*.
- Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa del insecto.
- Realizar un estudio QSAR, para obtener un modelo matemático de correlación con las actividades medidas.

## MATERIALES

El modelo de estudio fue el gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* (Motschulsky, Coleóptera: Curculionidae), una plaga primaria que se alimenta de granos sanos de maíz generando pérdidas durante la fase de almacenaje y ensilado. Se utilizaron individuos adultos, de 2 semanas de edad aproximadamente, de ambos sexos, criados a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $70 \pm 5\%$  de humedad relativa, en continua oscuridad, en contenedores plásticos con una dieta a base de granos de maíz enteros libres de insecticida.

Los compuestos destinados a ser ensayados incluyeron 15 moléculas estructuralmente relacionadas entre las cuales encontramos al Fenol; 11 compuestos fenólicos, como son *o*-Cresol, *m*-Cresol, *p*-Cresol, Timol, Carvacrol, Guaiacol, Creosol, Eugenol, *trans*-Isoeugenol, Vainillina y Ácido *trans*-Ferúlico; 2 alcoxibencenos, *trans*-Anetol y

Estragol; y un hidrocarburo aromático, el compuesto *p*-Cimeno (Fig. 5) (ver Anexo I). Todos los estándares para análisis fueron adquiridos de Fluka-Kahlbaum-Germany. Los compuestos empleados para ensayos de inhibición enzimática, Reactivo de Ellman (DTNB) y yoduro de acetilcolina (AChI), fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (ver Anexo I).

Como controles positivos de inhibición enzimática y actividad enzimática se utilizaron, respectivamente, Clorpirifos y Diclorvos, insecticidas de amplio espectro disponibles comercialmente (ver Anexo I). Otros solventes y soluciones buffer se encuentran caracterizados apropiadamente en los capítulos siguientes.

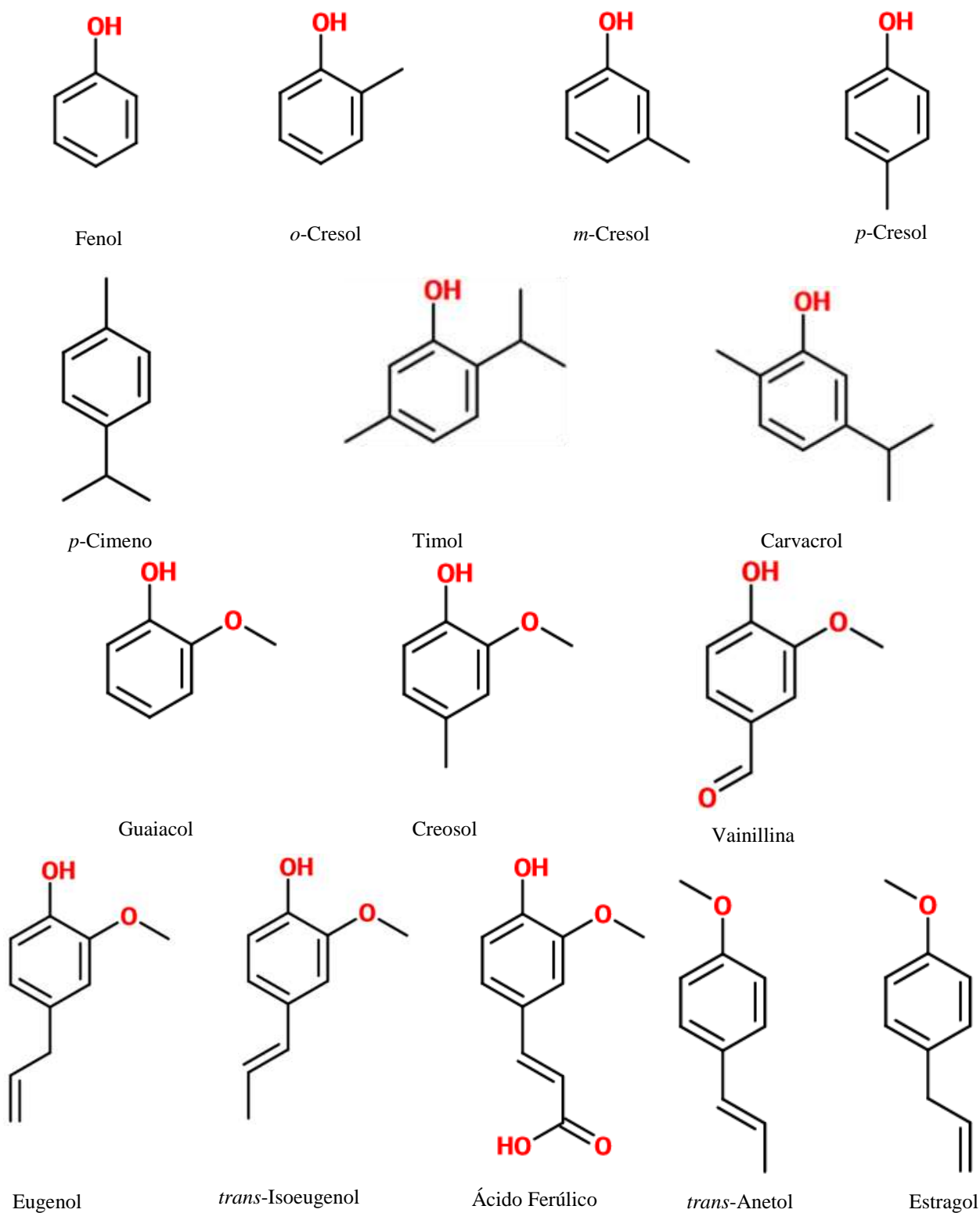


Figura 5 – Compuestos fenólicos y derivados de origen natural, en rojo se destacan las funciones oxigenadas.

# CAPÍTULO II

## ACTIVIDAD COMO SEMIOQUÍMICO

La percepción de señales olfativas es de gran importancia para la ecología de *S.zeamais* porque está involucrada en los patrones de comportamiento más importantes como son la alimentación, la oviposición y la búsqueda de pareja, entre otros. Los insectos fitófagos generalmente utilizan estos semioquímicos volátiles procedentes de la especie vegetal de la que se alimentan o alguna de sus estructuras, como semillas o flores, en una o más fases de proceso de invasión (Phillips y col., 1993). Estos compuestos pueden actuar indicándole al insecto la presencia de una fuente de alimento próxima (actividad atrayente) o bien como una señal de que el sustrato no es apto para su consumo (actividad repelente) (Collins y col., 2007). Estudios en *S.zeamais* demuestran que la presencia de volátiles producidos por el sustrato de alimentación actúa como una señal que favorece la agregación (Walgenbach y col., 1987).

En la investigación sobre el manejo de plagas las técnicas olfatómetricas son comúnmente empleadas en el estudio del comportamiento de insectos. Estas técnicas se emplean específicamente para medir respuestas frente a estímulos producidos por compuestos volátiles. Los datos obtenidos en estos ensayos pueden luego utilizarse en el desarrollo de repelentes de insectos e incluso señuelos químicos, entre otros. Por esta razón, como parte del estudio se midió la respuesta conductual tipo atracción/repelencia del gorgojo *S.zeamais* frente a distintos compuestos fenólicos.

## METODOLOGÍA

Los experimentos fueron llevados a cabo mediante una técnica de olfatometría a dos vías de acuerdo a metodología descrita por Herrera y col. (2015a,b):

- El olfatómetro a dos vías consta básicamente de dos cámaras selladas unidas por un pasillo. Se emplearon dos erlenmeyer de 250 ml cada uno para las cámaras, conectados mediante un tubo de vidrio de 30cm de largo y 1cm de diámetro a modo de pasillo (Fig. 6). En el tubo se practicó una pequeña abertura de 1x1 cm en un punto medio equidistante a los dos erlenmeyers para introducir los escarabajos dentro del sistema.
- Se colocaron en cada cámara un papel de filtro de 1x1cm impregnado por la cantidad necesaria de compuesto a ensayar. La concentración del tratamiento se refirió en unidades de  $\mu\text{mol}$  de compuesto por litro de aire dentro de la cámara ( $\mu\text{M}$ ). Los controles fueron inoculados con una cantidad equivalente de solvente (Acetona o *n*-Hexano).
- Los extremos del tubo se introdujeron ajustadamente a través de sendos orificios realizados en tapones de goma que fueron colocados en las bocas de los erlenmeyers de manera que ambas cámaras quedasen así conectadas. La zona de unión erlenmeyer-tapón se selló luego de la inoculación aplicando film, para evitar la fuga de gases y asegurar las condiciones de hermeticidad.
- Un grupo de aproximadamente VEINTE (20) insectos mantenidos en condiciones de inanición por al menos 12h se colocaron en el centro del pasillo a través de la abertura central, que posteriormente fue sellada para evitar que los insectos escapen.
- El sistema se incubó en oscuridad por 2h a 28°C y 60±5% humedad relativa. Los insectos pudieron deambular libremente por el pasillo pero una vez ingresados a una cámara no es posible su retorno. Al final del periodo de incubación se registraron el número de insectos en cada cámara: los que optaron por la vía que presentaba la señal olfativa y los que optaron por la vía sin tratamiento.
- De manera de obtener un panorama abarcativo de la actividad de estos compuestos se midieron tres concentraciones 40  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 0.4  $\mu\text{M}$  (5500 ppb, 550 ppb y 55 ppb respectivamente). Cada concentración se realizó al menos por quintuplicado.
- Se utilizó ácido propiónico como control positivo de repelencia; Vainillina como control positivo de atracción (Germinara y col., 2008; Phillips y col., 1993); Hexano o Acetona como solventes para diluciones y como controles de independencia (Herrera y col., 2015a,b).
- El compuesto Ác. Ferúlico no pudo ser ensayado debido a su baja solubilidad en el solvente empleado.

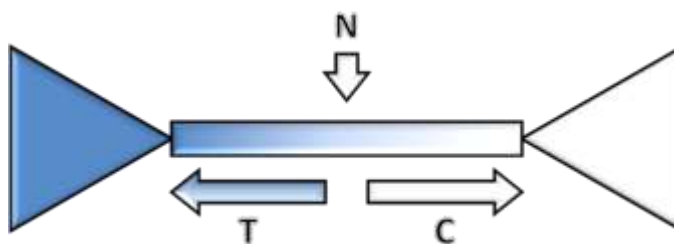


Figura 6 – Diagrama esquemático de un olfatómetro a dos vías. Un cierto número de insectos (*N*) son depositados en el centro de un tubo de vidrio sellado que tiene a izquierda y derecha dos cámaras, una de las cuales contiene el compuesto de interés volatilizado en una concentración conocida. Un cierto número de insectos se dirige hacia la cámara con el tratamiento (*T*) mientras que otro grupo se dirige hacia la cámara sin tratamiento (*C*).



# ANÁLISIS

El objetivo es poder discriminar y cuantificar estas dos conductas. Para ello se calculó un índice de respuesta ( $IR$ ) según los descrito por Philips y col. (1993). Se compara la diferencia entre la cantidad de insectos que responden al tratamiento entrando a la cámara donde se inocula la señal olfativa ( $T$ ) y la cantidad de insectos que se dirigen en sentido contrario al estímulo olfativo ( $C$ ) en función de la cantidad total de insectos liberados dentro del olfatómetro (ec. 1). Este índice toma valores entre 100% y -100%, valores positivos indican atracción y valores negativos, repelencia.

$$IR = \frac{T - C}{N} \times 100\% \quad (ec. 1)$$

La significancia de cada ensayo fue evaluada utilizando una prueba T bajo la hipótesis nula  $H_0: IR \neq 0$ , con un nivel de significancia de  $p < 0,05$  (Philips y col., 1993). Cada ensayo está respaldado por un sistema de doble control. El erlenmeyer enfrentado al tratamiento al que únicamente se inocula solvente funciona como un blanco para poder contrastar la tendencia de comportamiento de los insectos. Además, cada tanda de olfatómetros se encuentra asociada a un olfatómetro al que no se le inocula ningún principio activo, denominado *control de independencia*, que se ve afectado por las mismas condiciones ambientales y experimentales que los olfatómetros donde se testean compuestos volátiles. Este control, en principio, no debería presentar una diferencia significativa en la preferencia de los insectos por uno u otro compartimento (independencia de la dirección). Esta independencia de la dirección se cumple efectivamente si consideramos los valores medios de numerosos ensayos, observándose variaciones puntuales de mayor o menor cuantía.

Suponiendo que estas variaciones reflejan en parte los efectos estocásticos e influencias externas que podrían haber afectado el experimento se diseñó e implementó un método de normalización de datos como parte de otro proyecto de investigación (Rodríguez y col., 2016). Empleando análisis estadístico de procesos (Gráficos de Control), se identificaron patrones de variación no aleatorios debido a causas específicas dentro de los valores de  $IR$  medidos en los controles de independencia.

Sobre aquellos ensayos donde fue posible asignar causas especiales de variación se descontó la variación del Control de independencia de los valores medidos de  $IR$  para los ensayos de compuestos volátiles asociados a dicho control mediante la siguiente expresión (ec. 2).

$$IR_C = \left[ \left( \frac{T}{N} - \frac{I}{nN_n} \right) - \left( \frac{C}{N} - \frac{D}{nN_n} \right) \right] \times 100\% \quad (ec. 2)$$

El valor del índice de respuesta corregido ( $IR_C$ ) depende del comportamiento observado en los insectos del control del independencia ponderado por el número total de olfatómetros presente en la tanda ( $n$ ), y el número total de insectos dentro del olfatómetro ( $N_n$ ), donde  $I$  representa el número de insectos que se encontraron en la cámara izquierda;  $D$  el número de insectos<sup>1</sup>.

## Análisis Cualitativo

En nuestro trabajo no fue posible llevar a cabo un estudio de la relación Estructura-Actividad cuantitativo (QSAR) para los datos de Atracción/Repelencia medidos debido principalmente a:

- Falta de una clara dosis-dependencia en los datos medidos o tendencia observable que nos permitiera obtener medidas de resumen cuantitativas.
- Pérdida de sensibilidad debido al alto porcentaje de insectos que no presentaron respuesta<sup>2</sup>.
- Variabilidad excesiva de los datos, a pesar de los esfuerzos por reducir esta mediante normalización de datos<sup>3</sup>.
- Número relativamente bajo de ensayos que presentasen una respuesta estadísticamente significativa, e incluso los que sí tuvieron una respuesta significativa tuvieron p-valores relativamente altos.

Sin embargo, para enriquecer nuestro análisis llevamos a cabo un estudio cualitativo utilizando un Análisis de Conglomerados en donde, utilizando el juego de datos para las tres concentraciones medidas junto con el valor de los

---

<sup>1</sup> La ec. 2 se encuentra desarrollada en el caso de que el  $IR_C$  se encontrase con el erlenmeyer tratamiento orientado hacia la izquierda.

<sup>2</sup> Este problema también se ha reportado en otros estudios similares con el gorgojo del maíz (Bedini y col., 2016) y no parece ser exclusiva de la especie sino más bien es un inconveniente asociado a las técnicas olfatómetricas.

<sup>3</sup> La sobre dispersión de los datos parecer ser un problema común a todas las técnicas olfatómetricas en insectos (Davison & Ricard, 2010).

predictores obtenidos para cada compuestos (Capítulo V), mostramos las relaciones que existen entre los diferentes tipos de actividad elicitados por los compuestos (Fig. 7). Para el análisis se consideró que aquellos compuestos que tenían un valor de  $IR_C$  no significativo tienen índice de respuesta igual a CERO (0) y se excluyó al *o*-Cresol por no elicitarse una respuesta significativa a ninguna concentración.

## RESULTADOS

Para los ensayos de independencia no se observó una tendencia significativa para ninguna dirección en los valores medios medidos a lo largo de todos los experimentos ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo se observaron desvíos puntuales significativos en 12 de las 46 tandas de experimentos realizadas. Se aplicó la corrección para el valor de  $IR$  en datos correspondientes a los compuestos Timol, Carvacrol, Isoeugenol, *o*-Cresol, *p*-Cresol, Creosol, Vainillina y Fenol. Con esto se logró una reducción de la variabilidad de los datos de  $6,03 \pm 0,05$  puntos porcentuales de  $IR$  promedio sobre el desvío estándar de los datos.

No se observó un comportamiento de dosis-dependencia claro en las observaciones. Según el tipo de comportamiento/respuesta observado podemos agrupar los compuestos en 3 categorías (Tabla 1).

### Repelentes

Esta categoría incluye los compuestos Fenol ( $IR_{4\mu M} = -33$ ), *p*-Cresol ( $IR_{4\mu M} = -41$ ), *p*-Cimeno ( $IR_{40\mu M} = -40$ ), Timol ( $IR_{40\mu M} = -63$ ), Estragol ( $IR_{40\mu M} = -46$ ) y Anetol ( $IR_{40\mu M} = -54$ ). Estos presentan actividad repelente o no significativa a todas las concentraciones medidas ( $IR \leq 0$ ). La mayoría de estos compuestos evidenciaron un comportamiento dosis-dependiente: a medida que aumentamos su concentración el valor de  $IR$  disminuye a excepción del fenol que presenta dosis dependencia inverso, mostrando una mayor capacidad repelente a bajas concentraciones. Los compuestos *o*-Cresol, Estragol, Anetol no presentan actividad apreciable a bajas concentraciones.

De todos los compuestos, los dos éteres fenólicos, Anetol y Estragol, fueron los compuestos que elicitaban la respuesta más consistente ( $p < 0.001$ ). La respuesta de *S.zeamais* frente a estos compuestos fue recientemente estudiada también por Bedini y col. (2016) donde se observó una clara actividad repelente<sup>4</sup> por parte de ambos, aunque Estragol fue reportado como levemente más repelente que su isómero. El compuesto Timol presentó la capacidad repelente más alta ( $IR_{40\mu M} = -63$ ). Este es un conocido repelente de otras especies de insectos (por ej. Park y col., 2005; Toloza y col., 2006). El hidrocarburo aromático *p*-Cimeno también tuvo un buen desempeño como repelente a altas concentraciones ( $IR_{40\mu M} = -40$ ) comparable a lo publicado por Caballero-Gallardo y col. (2011) en ensayos de repelencia realizados frente a *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Carvacrol presentó la mejor capacidad repelente a la concentración más baja ensayada ( $IR_{0.4\mu M} = -47\%$ ). Este compuesto también fue caracterizado como repelente para la especie *T.castaneum*, aunque a concentraciones relativamente altas (Caballero-Gallardo y col., 2011).

### Atrayentes

En esta categoría entran los compuestos fenólicos Eugenol, Isoeugenol, *m*-Cresol, Guaiacol, Vainillina y Creosol. Estos actúan como atrayentes a ciertas concentraciones ( $IR \geq 0$ ) e inactivos a otras concentraciones. Tanto Isoeugenol como Guaiacol parecen presentar dosis-dependencia. El Guaiacol fue el compuesto que mejor capacidad atrayente presentó ( $IR_{40\mu M} = +77\%$ ). Sin embargo el compuesto Eugenol presentó una fuerte atracción ( $IR_{0.4\mu M} = +51\%$ ) a la concentración más baja ensayada lo que le confiere un enorme potencial para aplicaciones como la construcción de señuelos. El compuesto Eugenol también ha sido caracterizado como atrayente de otras especies de insectos como *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) y *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Ladd y col., 1983).

### Mixtos

Presentan actividad atrayente o repelente dependiendo de la concentración. En este grupo encontramos al Carvacrol. Este comportamiento al parecer no es tan inusual: anteriormente en estudios similares en el gorgojo *S.granarius* se observó que esta especie es capaz de detectar y responder de forma diferencial frente a distintas concentraciones de un mismo compuesto siendo el caso más común aquellos compuestos que actúan como atrayentes a bajas concentraciones y como repelentes a altas concentraciones (Germinara y col., 2008).

---

<sup>4</sup>Los autores también reportan cierta actividad atrayente para Anetol a bajas concentraciones que no fue observada en nuestro estudio (Bedini y col., 2016).

Tabla 1 – Índice de Respuesta (IR)

Compuesto	Concentración					
	40 $\mu$ M		4 $\mu$ M		0,4 $\mu$ M	
Fenol	(-11)	$\pm 6$ %* (c)	(-33)	$\pm 6$ %* (c)	(-26)	$\pm 9$ %* (c)
Timol	(-63)	$\pm 10$ %* (c)	(-62)	$\pm 8$ %* (c)	(-29)	$\pm 7$ %* (c)
Carvacrol	(-6)	$\pm 9$ % (c)	26	$\pm 6$ %*	(-47)	$\pm 17$ %* (c)
Eugenol	(-3)	$\pm 4$ %	(-6)	$\pm 7$ %	51	$\pm 11$ %**
Isoeugenol	30	$\pm 6$ %*	(-9)	$\pm 12$ %	9	$\pm 11$ % (c)
p-Cresol	(-11)	$\pm 12$ % (c)	(-41)	$\pm 11$ %* (c)	22	$\pm 17$ % (c)
m-Cresol	27	$\pm 5$ %*	11	$\pm 3$ %*	21	$\pm 5$ %**
o-Cresol	(-26)	$\pm 25$ % (c)	(0)	$\pm 19$ %	(0)	$\pm 5$ %
Estragol	(-46)	$\pm 10$ %***	(-34)	$\pm 14$ %**	3	$\pm 11$ %
Anetol	(-54)	$\pm 12$ %***	(-43)	$\pm 8$ %***	5	$\pm 16$ %
Guaiacol	77	$\pm 10$ %**	34	$\pm 17$ %	3	$\pm 11$ %
Vainillina	25	$\pm 8$ %* (c)	28	$\pm 9$ %* (c)	(-20)	$\pm 22$ % (c)
Creosol	12	$\pm 21$ %	52	$\pm 12$ %* (c)	29	$\pm 8$ %** (c)
Ác. Ferúlico	-		-		-	
p-Cimeno	(-40)	$\pm 9$ %**	(-26)	$\pm 8$ %**	23	$\pm 11$ %

Referencia: Datos corregidos (c); valores significativamente diferentes de cero,\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Repelentes (amarillo); Atrayentes (azul); y Mixtos (verde).

## Análisis Cualitativo

En el gráfico podemos observar que tanto los compuestos atrayentes como los compuestos repelentes se agrupan separadamente en el dendrograma formando dos bloques (Fig.7).

Los compuestos Anetol; Estragol y *p*-Cimeno, que se consideran *outgroups* ya que carecen del grupo -OH sustituido sobre el anillo aromático, se agrupan tempranamente en la base del árbol. Estructuralmente además son compuestos relativamente más volátiles que los fenoles debido a la imposibilidad de formar interacciones tipo puente hidrógeno. La característica de este grupo es una fuerte repelencia a altas concentraciones e inactividad a bajas.

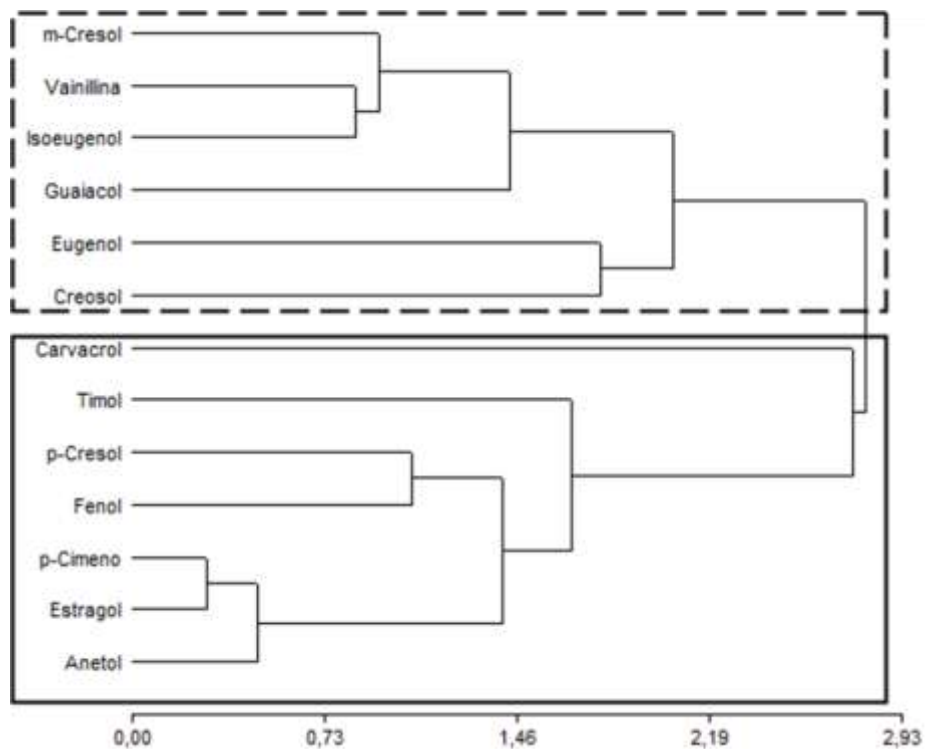


Figura 7 – Dendrograma del análisis de conglomerados (Distancia Euclídea) para actividad atracción/repelencia. Los cálculos se realizaron utilizando el software estadístico Infostat (Di Rienzo y col., 2016).

Cercanamente se asocian con *p*-Cresol y Fenol, compuestos fenólicos estructuralmente simples. La principal diferencia de esta dupla con respecto a los demás compuestos es que presentan un grupo  $-OH$  totalmente libre de interferencias estéricas, ya que no poseen sustituyentes en posiciones *meta* u *orto*. Se caracterizan por ser repelentes suaves a bajas concentraciones. Finalmente se asocian los dos isómeros Timol y Carvacrol formando un gran bloque de compuestos repelentes. El primero es un buen repelente a diversas concentraciones mientras que el segundo lo es solo a bajas concentraciones.

El resto de los compuestos son considerados atrayentes y se engloban en el gran bloque superior, que incluye *m*-Cresol; Vainillina; Isoeugenol; Güaiacol; Eugenol y Creosol. De estos *m*-Cresol es un atrayente suave en todo el rango de concentraciones; mientras que Vainillina, Guaiacol e Isoeugenol son atrayentes a altas concentraciones y Eugenol lo es solo a bajas concentraciones.

# CAPÍTULO III

## ACTIVIDAD INSECTICIDA

Los estudios de la actividad insecticida de productos naturales se realizan en periodos cortos que generalmente no superan las 96 hs de exposición (Korunić y col., 2008) con el objeto de determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Al efecto producido por un compuesto químico sobre un organismo en un periodo corto de tiempo luego de la exposición a dicha sustancia se le denomina *toxicidad aguda*, contraria a la toxicidad crónica donde se mide el efecto en periodos suficientemente largos.

En los experimentos de toxicidad aguda generalmente se mide la mortalidad como único efecto de importancia. La razón por la cual se llevan a cabo en periodos cortos tiene que ver con parámetros de diseño donde se prefieren sustancias que produzcan efectos en el corto plazo, y preferentemente a bajas concentraciones.

Los compuestos fenólicos carecen de una presión de vapor lo suficientemente alta a temperatura ambiente como para funcionar como insecticidas fumigantes efectivos (Rajendran & Sriranjini, 2008) por lo que lo más apropiado es medir su capacidad insecticidas por vía del contacto directo. La cutícula del insecto permite la adsorción el compuesto (Wigglesworth, 1942; Dresden & Krijgsman, 1948) debido al carácter apolar de los fenoles (Rappoport y col, 2003). El compuesto alcanza luego el sistema nervioso central y otros órganos diana a través del sistema de tráqueas (vía más rápida), nervios periféricos, la hemolinfa, etc (Gerolt, 1969; Gerolt, 1983).

## METODOLOGÍA

Los ensayos de toxicidad por contacto se llevaron a cabo mediante la técnica descrita por Zunino y col. (2012):

- Un grupo de insectos se mantuvo dentro de una cámara cerrada sobre una superficie absorbente impregnada con el compuesto de interés.
- Se utilizaron cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro, de vidrio y discos de papel de filtro de  $58 \pm 2 \text{ cm}^2$  como superficie absorbente. La concentración del ensayo se expresó en  $\mu\text{mol}$  de compuesto por  $\text{cm}^2$  de superficie absorbente.
- Los solventes, n-hexano y acetona, se utilizaron para vehicular los compuestos. Se aplicaron alícuotas de 0.6 ml de la dilución con distintas cantidades según la concentración, excepto los controles a los que se aplicó el solvente puro.
- Después de evaporado el solvente durante 2 minutos, se introdujeron al sistema grupos de 10 insectos. Las cápsulas de Petri fueron colocadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $60 \pm 5\%$  de humedad relativa.
- La mortalidad se midió después de 24 h consideradas a partir del comienzo de la exposición (Mondal & Khalequzzaman, 2010). Cada concentración se ensayó al menos por quintuplicado.

## ANÁLISIS

Los datos de toxicidad aguda suelen presentar una clara dosis-dependencia cuando se grafican datos de concentraciones o dosis empleadas frente al porcentaje de mortalidad observado. Como medida de resumen se suele utilizar como parámetro la concentración a la cual el 50% de la población dentro del experimento peca, denominado concentración letal cincuenta ( $LC_{50}$ ).

Este parámetro se estimó mediante un análisis de regresión tipo Probit, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$  (Mondal & Khalequzzaman, 2010; Yang y col., 2011) utilizando el software estadístico Infostat (Di Rienzo y col., 2016). La cantidad y magnitud de las concentraciones medidas varió para cada compuesto dependiendo del nivel de toxicidad de cada uno y el nivel de ajuste requerido por el análisis Probit. Las concentraciones ensayadas abarcaron un rango desde  $30 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$  hasta  $900 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ .

## RESULTADOS

La toxicidad del insecticida comercial Clorpirifos contra *S.zeamais* medida por este mismo método evaluada por Herrera y col. (2015a) arrojó un valor de  $LC_{50}$  de  $(3.4 \pm 0.6)E-03 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ . En general los compuestos fenólicos no tienen una toxicidad comparable a los insecticidas de uso regular, ya que presentan valores de  $LC_{50}$  cinco órdenes de magnitud mayores que el compuesto comercial (Tabla 2).

Dentro de las toxicidades medidas el compuesto Isoeugenol presentó la toxicidad más baja; Fenol, *m*-Cresol y Vainillina tuvieron una toxicidad baja; Timol, Carvacrol, Eugenol, *p*-Cresol, *o*-Cresol y Guaiacol, tuvieron una toxicidad media al igual que el hidrocarburo aromático, *p*-Cimeno.

Los derivados éter, Estragol y Anetol, presentaron actividad insecticida un orden de magnitud mayor que todos los fenoles medidos. Este aspecto se discutirá en detalle más adelante por su relevancia para el estudio de relación estructura-actividad.

Timol y Carvacrol presentaron una toxicidad relativamente alta ( $196 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$  y  $221 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ , respectivamente). Resultados similares se recogen en diversas publicaciones: en ensayos de actividad insecticida por

aplicación tópica realizados en *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Timol y Carvacrol presentan una capacidad insecticida significativamente mayor a otros monoterpenoides, siendo más efectivo el isómero Timol (Rice & Coats, 1994a,b; Lee y col., 1997a,b).

El compuesto Eugenol presentó una toxicidad similar a la observada para Timol y Carvacrol contra *S.zeamais*. En estudios similares también se menciona al Eugenol como un monoterpenoide con una capacidad insecticida por contacto comparable a la de Timol y Carvacrol contra *M.domestica* y *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae) (Lee y col., 1997a,b; Waliwitiya y col., 2005).

En un estudio de toxicidad realizado por Lee y col. (2008) en *S.oryzae* utilizando una técnica por contacto similar a la empleada por nosotros se encontraron valores de  $LC_{50}$  para Eugenol y *p*-Cimeno mucho mayores a los medidos en nuestro trabajo (6,4 mmol/cm<sup>2</sup> y 18,25 mmol/cm<sup>2</sup>, respectivamente) aunque los valores relativos se mantuvieron: Eugenol fue de dos a tres veces más tóxico que *p*-Cimeno.

Los dos isómeros, Eugenol e Isoeugenol tuvieron actividades opuestas dentro de la serie siendo, respectivamente, los compuestos fenólicos con mayor y menor toxicidad. Este resultado es acorde con los valores informados por Ngho y col. (1998) en ensayos de toxicidad por contacto en placa contra *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae), donde el compuesto Eugenol fue el que mejor se desempeñó mientras que el isómero Isoeugenol, y el hidrocarburo *p*-Cimeno no presentaron una toxicidad aguda apreciable. En contraposición, en un estudio llevado a cabo por Huang y col. (2002) se midieron valores de  $LD_{50}$  prácticamente idénticos para ambos fenoles cuando se aplicaron de forma tópica sobre el abdomen de individuos de *S.zeamais*. Cabría determinar si las diferencias observadas entre estas dos mediciones es producto de las técnicas empleadas y lo que estos nos puede decir sobre el mecanismo de acción de estos compuestos.

En el trabajo publicado por Yeom y col. (2012) donde se compararon la toxicidad por aplicación tópica de los compuestos Anetol, Timol, Carvacrol y *p*-Cimeno en *Blattella germánica* (Blattodea: Blattellidae) los resultados apuntaron a que este grupo de compuestos presentaban una toxicidad relativamente alta y similar, siendo incluso Timol el más persistente a bajas concentraciones. Nuestros hallazgos en ensayos de toxicidad por contacto en *S.zeamais*, sin embargo, indican que el éter fenólico Anetol presentó, con diferencia, la mayor actividad insecticida de todos los compuestos ensayados.

Tabla 2 – Toxicidad aguda medida para compuestos fenólicos y derivados

Compuesto	$LC_{50} \pm DE$ ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ )	Intervalo de Confianza (95%)	
		Límite Inferior	Límite Superior
Fenol	447 $\pm$ 21	408	486
Timol	196 $\pm$ 61	176	216
Carvacrol	221 $\pm$ 70	133	309
Eugenol	158 $\pm$ 13	152	164
Isoeugenol	897 $\pm$ 46	799	995
<i>p</i> -Cresol	297 $\pm$ 15	284	310
<i>m</i> -Cresol	585 $\pm$ 27	546	614
<i>o</i> -Cresol	186 $\pm$ 21	166	206
Estragol	77 $\pm$ 22	65	89
Anetol	41 $\pm$ 5	33	49
Guaiacol	329 $\pm$ 30	324	354
Vainillina	453 $\pm$ 40	394	512
Creosol			
Ferulato			
<i>p</i> -Cimeno	326 $\pm$ 21	284	368
Clorpirifos	0.0034 $\pm$ 0.0006		

# CAPÍTULO IV

## ACTIVIDAD ANTIACHÉ



Los síntomas visibles típicos del envenenamiento en insectos usualmente comienzan con un periodo de hiperactividad y excitación, luego ataxia (descoordinación en el movimiento de las partes del cuerpo), convulsiones y tétano, seguido de lo cual el individuo o bien logra recuperarse completamente o sobreviene parálisis total y muere. Este fenómeno se repite en diversas especies bajo el efecto de diferentes compuestos insecticidas lo que hace pensar en un principio que en estados iniciales del envenenamiento el modo de acción de los distintos insecticidas sigue un mecanismo similar (Gerolt, 1983).

La mayoría de los insecticidas modernos, como organofosfatos, carbamatos y piretroides, presentan actividad neurotóxica. La evidencia apunta a que la mayoría de estos compuestos actúan como inhibidores de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) presente en las redes neuronales colinérgicas, debido principalmente a la correlación existente entre la resistencia de ciertas especies de insectos a estos insecticidas con cambios genéticos en la sensibilidad de esta enzima a estos compuestos (Gerolt, 1983).

Por otro lado se encuentran actualmente en estudio otros mecanismos plausibles de acción para nuevos compuestos para los cuales no existe una correlación clara entre la inhibición de la enzima AChE y la actividad insecticida (Lee y col., 2001), como inhibición de las enzimas succinil-deshidrogenasa y/o citocromo oxidasa (Gerolt, 1983; Rajendran & Sriranjini, 2008)<sup>5</sup>.

Sin embargo, la mayor parte de los esfuerzos de investigación se encuentran enfocados en la investigación de compuestos inhibidores de AChE, debido también en parte a sus diversas aplicaciones en otras disciplinas como la medicina de las enfermedades neurodegenerativas y el monitoreo ambiental (Pohanka, 2011).

## La enzima AChE

La enzima AChE es una esterasa específica capaz de atacar el grupo éster presente en la molécula de acetilcolina (ACh), un neurotransmisor, para generar como producto de hidrólisis colina y acetato (Fig. 8). Su principal función fisiológica tiene lugar en el tejido nervioso de animales, donde juega un importante papel en la destrucción de este neurotransmisor a nivel de las sinapsis lo que restablece la funcionalidad de la terminal postsináptica (Pohanka, 2011). La enzima en insecto se encuentra embebida en membranas biológicas (Gerolt, 1983). La actividad enzimática *in vitro* depende de varios factores como el pH y la temperatura a la que ocurre la reacción, el valor de pKa del grupo sulfhidrilo, efectos estéricos y electrostáticos, la capacidad de removerla de la membrana y particularmente la presencia de inhibidores específicos.

Los compuestos inhibidores pueden presentar las más variadas estructuras y propiedades físico químicas clasificándose en función del sitio de la enzima que afectan (Pohanka, 2011). Los tipos de inhibidores conocidos incluyen drogas, medicamentos, toxinas naturales, agentes químicos utilizados con fines bélicos, insecticidas organofosforados, carbamatos e incluso ciertos metales pesados y detergentes (Guilhermino y col., 1998; Pohanka, 2011).

La pérdida de la funcionalidad de esta enzima por inhibición tiene efectos neurotóxicos. Como resultado de la pérdida de actividad se genera un exceso de neurotransmisor que no es degradado de modo que el órgano efector del insecto sufre sobrestimulación. Una vez que una proporción crítica de la masa de la enzima tisular se inactiva se manifiestan síntomas y signos de envenenamiento colinérgico y sobreviene la muerte (Roberts & Reigart, 2013). La sensibilidad de la enzima a inhibidores está afectada por procesos de agregación enzimática y la presencia de isoenzimas (Gerolt, 1983).

El estudio de esta enzima es de vital importancia por su relevancia para la fisiología animal. Sin ir más lejos, los estudios sobre la actividad de esta enzima en muestras biológicas se ha empleado y se emplea actualmente en el diseño de drogas y medicamentos para enfermedades como el Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Pohanka, 2011); como bioindicador de contaminación con agroquímicos en personas y animales (Bocquené y col., 1990; Tecles & Cerón, 2003; Roberts & Reigart, 2013); y para el diseño de nuevos productos para el control de plagas (Picollo y col., 2008; Yeom y col., 2012; Herrera y col., 2015).

Se han descrito numerosos componentes presentes en AEs con propiedades insecticidas debido a su capacidad de inhibir la enzima AChE (Rajendran & Skiranjini, 2008). Medir la bioactividad de los compuestos fenólicos naturales como inhibidores de la actividad AChE de *S. zeamais* es un paso fundamental para conocer su potencial como principio activo en el diseño de bioplaguicidas, y entender que propiedades estructurales están implicadas en el mecanismo de acción insecticida de estos compuestos.

---

<sup>5</sup> Incluso se sabe que los organofosfatos y carbamatos también actúan como inhibidores de otras enzimas, sin embargo se ha dado poca relevancia a este hecho (Gerolt, 1983).

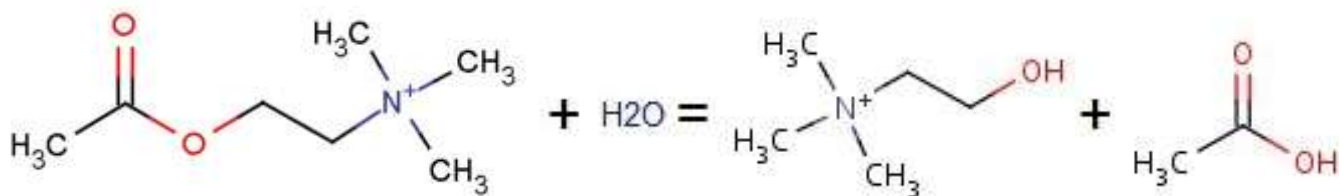


Figura 8 - Acetilcolina (izq.) y sus productos de hidrólisis, colina y ácido acético (der.).

## METODOLOGÍA

Los procedimientos analíticos desarrollados para la determinación de la actividad AChE *in vitro* más empleados actualmente son del tipo colorimétrico basados en la reacción de Ellman. Este método, que se ha utilizado con éxito para medir actividad AChE en gran cantidad de especies y en diferentes tipos de tejidos, emplea el ácido 5,5'-dithio-*bis*-(2-nitrobenzoico) (DTNB, también llamado Reactivo de Ellman) como sonda para hacer un seguimiento de la reacción catalizada por la enzima AChE, utilizando como sustrato alternativo a la molécula de acetiltiocolina como sal de yodo (AThChI) (Ellman, y col., 1961).

La medición de la actividad AChE se llevó a cabo por el método de Ellman adaptado para ensayos de actividad AChE en microplaca de 96 pocillos, según el método propuesto en Herrera y col. (2015a,b), actualizado y optimizado para mediciones seriadas realizadas en un lector de microplaca Multi-Modal marca Sinergy 2 de Biotek Instruments:

- La enzima para el estudio se obtuvo en forma de extracto enzimático según Herrera y col. (2015a,b). Insectos adultos, previamente lavados y secados, fueron homogeneizados en Buffer Fosfato 0.1M (pH 7.4) en una concentración de 0.1g/ml de buffer. El material homogeneizado fue centrifugado a 5000 rpm durante 20 min a  $0\pm 4^{\circ}\text{C}$  y se recolectó el sobrenadante. Este extracto enzimático se mantiene en condiciones de congelamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y en una bolsa sellada hasta su utilización según las recomendaciones para conservación de muestras biológicas para ensayos de actividad AChE establecidos por Tecles y col. (2002) y Eyer & Worek (2009).
- En cada pocillo o microwell se sembraron 20 $\mu\text{l}$  del extracto enzimático junto a 20 $\mu\text{l}$  de una solución del compuesto a ensayar en etanol 96%v/v, 20 $\mu\text{l}$  del reactivo de Ellman, una solución de DTNB 4mM en Buffer Fosfato 0.1M (pH 7.4), y 20 $\mu\text{l}$  de solución de AThChI 2,5mM en Buffer Fosfato 0.1M (pH 7.4). El volumen se lleva a 200 $\mu\text{l}$  finales agregando 120 $\mu\text{l}$  de buffer de reacción.
- Para la realización de ensayos en presencia de inhibidores la mayoría de los protocolos recogidos en la bibliografía llevan a cabo una incubación de la enzima junto a la sustancia potencialmente inhibidora (Picollo y col., 2008; Loizzo y col., 2009; Öztürk y col., 2011; Herrera y col., 2015b). En nuestro ensayo la enzima fue incubada por al menos 30 minutos en presencia del inhibidor a  $28^{\circ}\text{C}$  antes de iniciar la reacción mediante el agregado del sustrato AThChI.
- La actividad del ensayo se midió a 415nm de cada microwell, registrándose la absorbancia en simultáneo durante 45 minutos a una velocidad de una lectura por minuto, a una temperatura fija de  $28^{\circ}\text{C}$ .
- Los controles negativos se llevaron a cabo reemplazando la solución de compuesto inhibidor por un volumen equivalente de etanol 96%v/v. Para los controles positivos se utilizó Diclorvos o DDVP (2,2-diclorovinil-dimetil fosfato), un insecticida organofosforado comercial.

## ANÁLISIS

De cada ensayo se obtuvo una secuencia de puntos que se ajusta adecuadamente a una dinámica lineal. La actividad AChE de cada tratamiento y control se calcula como la pendiente de la recta obtenida por regresión lineal de las absorbancias corregidas (Ellman y col., 1961), por el método de mínimos cuadrados, con un valor de significancia  $p < 0,05$  mediante el software Infostat versión 2016 (Di Rienzo y col., 2016).

Este valor es proporcional a la rapidez con que ocurre la reacción, y por ende de la actividad de la enzima. La actividad del tratamiento se comparó con la actividad del control sin solución inhibidora. Para cada concentración se calcula el índice de inhibición (*Inh*) (ec. 3).

$$Inh = \left(1 - \frac{r_T}{r_C}\right) \quad (ec. 3)$$

Donde  $r_T$  es la actividad del tratamiento y  $r_C$  la actividad del control.

Las actividades medidas se corrigieron para la actividad no específica del cromóforo, la absorbancia del inhibidor y las reacciones de hidrólisis no enzimáticas del sustrato AThChI, mediante una serie de blancos construidos a tal fin. El valor de  $IC_{50}$  (concentración a la cual se reduce un 50% la actividad de la muestra) se calculó para las concentraciones ensayadas utilizando un análisis de regresión Probit mediante el software Infostat (Di Rienzo y col., 2016).

## RESULTADOS

Los resultados de los ensayos de inhibición están recogidos en la Tabla 3. El insecticida sintético DDVP presentó una  $IC_{50}$  de 0,337 mM en ensayos realizados con AChE de *S.zeamais* (Herrera y col., 2015b). Los compuestos Isoeugenol y Carvacrol presentaron una capacidad inhibitoria superior a la del compuesto comercial. La actividad antiAChE de Eugenol ( $IC_{50} = 8,016mM$ ) fue similar a la informada por otros autores para la enzima AChE de *E.electricus* ( $IC_{50} = 2,92 mM$ ) (Dohi y col., 2009). La actividad de Carvacrol ( $IC_{50} = 19.4\mu M$ ) es menor a lo reportado para otros organismos modelos, a saber: 410  $\mu M$  y 766  $\mu M$  en AChE de *E.electricus* (Jukic y col., 2007, Mata y col., 2007, respectivamente); 1198  $\mu M$  en *B.germanica* (Yeom y col., 2012); 1638  $\mu M$  en *M.domestica*, 224  $\mu M$  en *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) y 51  $\mu M$  *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) (Anderson & Coats, 2012). Este resultado indicaría que la enzima AChE del insecto *S. zeamais* es especialmente sensible al efecto inhibidor del compuesto Carvacrol. En el trabajo realizado por Jukic y col. (2007) además se reportó una  $IC_{50}$  de 4926  $\mu M$  para el isómero Timol contra la enzima de *E.electricus*. Si bien en nuestro ensayo el compuesto Timol presentó una actividad inhibitoria mucho mayor a la reportada por estos autores para la enzima patrón ( $IC_{50} = 964 \mu M$ ) si fue posible reproducir la relación de toxicidad elicitada frente al compuesto Carvacrol: tanto en nuestras mediciones como en el estudio antes mencionado Carvacrol presentó un valor de  $IC_{50}$  un orden de magnitud menor que su isómero, lo que hace pensar que la posición del grupo  $-OH$  sobre el anillo aromático puede tener efectos importantes sobre la capacidad inhibitoria en este tipo de compuestos (Jukic y col., 2007).

En un trabajo donde se estudió la capacidad neurotóxica de un gran número de terpenoides se comparó la actividad de los compuestos Estragol, Anetol, Carvacrol, Timol, Vainillina y Eugenol utilizando como modelo enzima AChE de *E.electricus*. Si bien en dicha ocasión no se calcularon los valores de  $IC_{50}$ , los compuestos Estragol, Anetol, Eugenol y Vainillina no tuvieron capacidad inhibitoria significativa o que indicaría valores de  $IC_{50}$  inusualmente altos. Al igual que en nuestro trabajo, se observó que tanto Timol como Carvacrol tuvieron un buen desempeño siendo la actividad de Carvacrol más del doble de la observada para Timol (Orhan y col., 2008). También se ha reportado en otro trabajo que el compuesto *cis*-Anetol parece tener muy baja capacidad inhibitoria (Mata y col., 2007) similar a los resultados obtenidos para su isómero *trans*-Anetol en este trabajo ( $IC_{50} = 26,14 mM$ ).

Es interesante observar que el compuesto más simple, Fenol, presentó el peor desempeño de toda la serie ( $IC_{50} = 69,63 mM$ ), considerando que la actividad del compuesto Carvacrol, estructuralmente relacionado, fue hasta más de tres mil veces mayor. Esto podría ser un buen punto de partida para el diseño de nuevos compuestos con mejor actividad por modificaciones químicas de esqueletos aromáticos. El compuesto p-Cimeno no pudo ser ensayado debido a problemas técnicos derivados de su miscibilidad en el medio de reacción. En artículos de Miyazawa & Yamafuji (2005) se cita que este compuesto tuvo un desempeño similar a otro hidrocarburo aromático,  $\alpha$ -Pino (  $IC_{50} = 419-630 \mu M$ ) como inhibidor de AChE eritrocítica bovina (Perry y col., 2000; Orhan y col., 2008), por lo que podríamos esperar que tuviese un valor de  $IC_{50}$  comparable al de Timol.

Tabla 3 – Actividad AntiAChE

Compuesto	$IC_{50}$ (mM)	Intervalo de Confianza (95%)	
		Límite Inferior	Límite Superior
Fenol	69,63	68,83	70,43
Timol	0,964	1,004	0,924
Carvacrol	0,0194	0,0154	0,0234
Eugenol	8,016	7,936	8,096
Isoeugenol	0,235	0,195	0,275
p-Cresol	35,00	34,40	35,60
m-Cresol	65,35	65,25	65,45
o-Cresol	19,23	19,03	19,43
Estragol	16,78	16,68	16,88
Anetol	26,14	25,74	26,54
Guaiacol	39,30	38,80	39,80
Vainillina	30,09	29,89	30,29
Creosol	18,00	17,80	18,20
Ferulato	36,74	36,34	37,14
p-Cimeno	-		
Diclorvós	0,337		

# CAPÍTULO V

## ANÁLISIS *QSAR*

Los modelos QSAR establecen correlaciones a través de algoritmos matemáticos entre distintas características de una serie de sustancias químicas estructuralmente similares y su respuesta, actividad o comportamiento experimental. Todas aquellas variables cuantitativas que representan atributos, propiedades o características de los compuestos en estudio empleados en el análisis que nos ayudan a explicar este comportamiento se denominan descriptores. Estos pueden ser variables estructurales (por ej. grado de insaturación), topológicas (por ej. superficie polar total), fisicoquímicas (por ej. punto de ebullición), etc. La calidad del análisis dependerá de la cantidad y calidad de los descriptores empleados. La meta es encontrar una expresión matemática o modelo que pueda explicar la respuesta o bioactividad de las distintas sustancias codificadas en sus propias estructuras (ec. 4).

$$\text{Bioactividad} = f(\text{Descriptores}) \quad (\text{ec. 4})$$

Los métodos estadísticos empleados están basados en análisis de correlación y regresión que pueden variar en complejidad y en la técnica empleada, pudiéndose clasificar en lineales y no lineales. Los modelos lineales son los más simples y ampliamente utilizados. Se establecen sobre la base de que la respuesta ( $Y$ ) es una función lineal de los distintos descriptores incluidos en el modelo ( $X_1, X_2, \dots, X_i, \dots, X_n$ ) tal que (ec. 5):

$$Y_{(X_1, X_2, \dots, X_i, \dots, X_n)} = a_0 + a_1 X_1 + \dots + a_i X_i + \dots + a_n X_n \quad (\text{ec. 5})$$

Donde  $a_1, a_2, \dots, a_i, \dots, a_n$  son los coeficientes lineales que ponderan la contribución de cada descriptor a la respuesta base, representada por la constante  $a_0$ . Tanto las variables  $X_i$  como  $Y$  pueden transformarse matemáticamente para asegurar un cambio de escala, de signo u otra propiedad deseable para el análisis. Estos modelos pueden construirse mediante análisis de Regresión Lineal Múltiple, y se validan observando parámetros de ajuste como el p-valor de cada descriptor, el coeficiente de determinación ajustado ( $R_{adj}^2$ ) del modelo, el Error Medio Cuadrático ( $ECMP$ ) y el Error Relativo Medio ( $RMSE$ ) de los descriptores empleados, y la distribución de los Errores Observados vs Errores Predichos.

Para aplicar un modelo QSAR se debe suponer en principio que todos los compuestos de la serie química elegida tienen el mismo mecanismo de acción frente a la respuesta elegida, a todas las concentraciones ensayadas (Roy y col., 2015), de manera que lo que se intenta es modelar la eficacia relativa de cada estructura para elicitarse un mismo tipo de respuesta específica. Por esta razón, a la hora de definir una serie química se utilizaron compuestos estructuralmente similares de manera de minimizar la probabilidad de que actúen por mecanismos distintos. Si esto no fuera así, es decir, si los compuestos desarrollasen mecanismos de acción diferentes se observarían como grupos bien diferenciados en un análisis QSAR, y requeriría la aplicación de un análisis de relación Estructura-Actividad Cualitativo o de Clasificación, como paso previo (Roy y col., 2015).

Este tipo de análisis se utilizan fundamentalmente en el diseño de productos químicos con propósitos específicos ya que constituyen una herramienta *in silico*, relativamente sencilla que permite el desarrollo de modelos que una vez validados pueden emplearse para la predicción de la respuesta esperada para sustancias nuevas sin testear e incluso obtener una interpretación sobre el mecanismo de acción (relación estructura-actividad, propiamente dicha) (Roy y col., 2015).

La interpretación del modelo final es la parte más crucial y requiere un conocimiento extensivo de los aspectos moleculares de la serie química elegida, de la información aportada por cada descriptor y como estos pueden afectar a la respuesta observada. Muchos estudios de QSAR se han empleado con éxito para predecir la actividad biológica, establecer el mecanismo involucrado en diversos procesos biológicos y entender las interacciones químicas-biológicas en el diseño de drogas (por ej. Voda y col., 2004; Bohman y col., 2008; Wang y col., 2008; Dambolena y col., 2011; Dambolena y col., 2012; Pizzolito y col., 2015). En este trabajo empleamos el análisis QSAR como una herramienta para determinar qué características topológicas, geométricas, fisicoquímicas y/o electrónicas de los compuestos fenólicos naturales que seleccionamos influyen en su capacidad o potencial para el control químico de *Sitophilus zeamais*.

## Predictores

Un predictor es una variable o indicador que resume cierta información específica de las moléculas en estudio. Pueden clasificarse según la naturaleza de la información que brindan (estructural, topológica, geométrica, eléctrica, fisicoquímica, etc) o su dimensionalidad (cantidad de variables que se integran para cuantificar el predictor).

Los predictores pueden cuantificarse por métodos computacionales y/o experimentales e idealmente deben poseer las siguientes propiedades: (a) debe ser posible de cuantificar para un amplio rango de compuestos químicos; (b) su cuantificación debe ser rápida y asequible; (c) su cuantificación debe arrojar valores diferentes para compuestos estructuralmente disimiles; (d) el valor de la variable debe ser proporcional a las diferencias estructurales, es decir que a mayor disimilitud entre sustancias mayor distancia entre valores; (e) debe poseer una interpretación física (Roy y col., 2015).

## METODOLOGÍA

El análisis *QSAR* se realizó a través de tres etapas sucesivas (Roy y col., 2015): (a) la obtención y preparación de los datos experimentales, recopilación y cálculo de predictores<sup>6</sup> sobre la serie de compuestos elegida, (b) el procesamiento de los datos mediante algoritmos y métodos estadísticos y (c) la interpretación del modelo resultante.

La primera etapa conllevó la mayor parte del esfuerzo y estuvo compuesta por dos grandes partes: la obtención de los datos de respuesta para la serie de compuestos elegida, también denominada punto final del modelo o variable dependiente (*Y*)<sup>7</sup> que corresponde a los datos consignados en los capítulos anteriores; y la obtención de diferentes variables independientes que caractericen a la serie química, también denominados predictores (*X<sub>i</sub>*).

Se desarrollaron modelos *QSAR* para los datos de toxicidad aguda, mediante ensayos de actividad insecticida por contacto; y la actividad como inhibidores de actividad acetilcolinesterasa (AChE) mediante ensayos de inhibición enzimática *in vitro*. Las variables cuantitativas obtenidas en cada una fueron la Concentración Letal necesaria para aniquilar al 50% de la muestra (*LD<sub>50</sub>*); y la Concentración de Inhibición del 50% de la actividad enzimática de la muestra (*IC<sub>50</sub>*) respectivamente.

Se recabó información de 17 parámetros moleculares, incluyendo propiedades fisicoquímicas (punto de fusión y ebullición, densidad específica, volumen molar, peso molecular, entre otros); topológicos (Factor de Insaturación), electrónicos (constante de disociación ácida, momento dipolar, entre otros), geométricos (volumen molecular, área de superficie polar, entre otros), entre otros (Tabla 4) (Ver Anexo II y III).

Tabla 4 – Predictores recabados para este estudio

Nombre	Símbolo	Unidad
Peso Molecular	PM	g/mol
Volumen Molar	V	cm <sup>3</sup> /mol
Volumen Molecular	Vm	Å <sup>3</sup>
Densidad Específica	δ	g/cm <sup>3</sup>
Tensión superficial	Ts	dina/cm
Número de onda (Espectroscopía IR)	λ	cm <sup>-1</sup>
Índice de Refracción a 20°C	n	-
Punto de Fusión a 1 atm	Pf	°C
Punto de Ebullición a 1 atm	Peb	°C
Presión de vapor a 25°C	Pvap	hPa
Momento Dipolar	μ	Debye (D)
Constante de Disociación ácida	pKa	-
Parachor	Par	-
Coefficiente de Partición Octanol-Agua	LogP	-
Coefficiente de Distribución a pH=7.4	LogD	-
Factor de Bioconcentración a pH=7,4	BCF	-
Área Topológica de Superficie Polar	SP	Å <sup>2</sup>
Polarizabilidad	Pol	Å <sup>3</sup>
Refractividad Molar	MR	cm <sup>3</sup> /mol
Fracción de Insaturación	Fsp3	-

<sup>6</sup> Un descriptor es un predictor que presenta una correlación con el punto final del modelo y su correlación con otros descriptores debe ser baja o nula, es decir, los descriptores deben ser independientes entre sí (Roy y col., 2015). Los descriptores son todos aquellos predictores que nos ayudan a explicar la actividad de los compuestos estudiados.

<sup>7</sup> El punto final o respuesta, caracteriza el comportamiento de cada compuesto frente al sistema biológico elegido y puede ser tanto una actividad como una propiedad y generalmente se obtiene por métodos experimentales.

Los predictores moleculares se obtuvieron principalmente mediante una “minería” o extracción de datos a partir de distintas bases abiertas disponibles en la Web, como Molinspiration, Chemicalize, Chemspider, Pitt Quantum Repository (Ver Bibliografía). Otros fueron obtenidos directamente de la información brindada por el fabricante, como en el caso de la temperatura de fusión ( $T_f$ ). El único caso de un predictor calculado directamente fue el parámetro Parachor ( $Par$ ).

El producto final de la primera etapa fue una gran matriz de datos que incluyó los valores obtenidos para las variables predictoras para cada uno de los compuestos estudiados junto a sus respectivas actividades. Para procesar toda la información, los datos consignados en la matriz fueron sujetos a un Análisis de Regresión Lineal Múltiple. La selección de descriptores se llevó a cabo utilizando métodos de selección de variables explicativas en pasos sucesivos o *Stepwise*. Para cada punto final se obtuvieron varios modelos posibles. Utilizando criterios estadísticos se seleccionaron aquellos que presentaron las mejores cualidades de ajuste. La validación de los modelos se basó en los siguientes parámetros de ajuste:

- Valor  $p$  del modelo y los diferentes descriptores incluidos en él. Para un valor de significativo ( $p < 0.05$ ) se considera que el valor estimado para el coeficiente de regresión parcial  $a_i$  para el descriptor  $X_i$  es significativamente diferente de cero (hipótesis nula). Para el modelo, implica que la relación lineal es significativamente diferente de la horizontal.
- Coeficiente de determinación ajustado ( $R_{aj}^2$ ). El coeficiente de determinación corregido en un modelo de regresión lineal mide el porcentaje de la varianza observada que es posible explicar debido al modelo. Un modelo útil debería tener un valor de  $R_{aj}^2 > 70\%$ .
- Error Medio Cuadrático de Predicción ( $RMSPE$ , por sus siglas en inglés). Para un modelo de ajuste el valor de  $RMSPE$  representa la estimación del porcentaje de error entre el modelo ajustado y el modelo real (no observable). Se emplea principalmente en el proceso de validación cruzada de un modelo para estimar la capacidad de predicción o la capacidad de generalizar el modelo para un conjunto de datos independientes. Idealmente se deberían considerar valores de  $RMSPE < 10\%$ .
- Diagnóstico visual de la distribución de errores. En un análisis de regresión lineal se supone que los errores se distribuyen independientemente. Este supuesto se puede comprobar a partir de un diagrama de dispersión en intervalos de los desvíos predichos en el eje vertical por los valores de error observados en el eje horizontal. Para que el modelo sea aceptable no se deben observar anomalías en la distribución de los puntos y se debe obtener una relación lineal significativa.

A partir de los descriptores obtenidos de aquellos modelos que presentaban las mejores propiedades de ajuste se profundizó en las implicancias de la información brindada por cada uno de ellos y se intentó dar nueva información u otro tipo de aporte hacia el esclarecimiento del mecanismo de acción por el cual los compuestos fenólicos generan las respuestas observadas en el gorgojo del maíz (Capítulo VI).

## RESULTADOS

### Actividad AntiAChE

La actividad anticolinesterasa medida en términos de  $IC_{50}$  fue correlacionada utilizando un modelo *QSAR*. No se pudo incluir aquellos compuestos que no presentan al menos un único grupo  $Ph - OH$  debido probablemente a que los compuestos Estragol y Anetol presentaron una actividad relativamente promedio a pesar de presentar predictores relativamente alejados de los demás compuestos fenólicos.

El modelo relaciona la capacidad de inhibir la enzima AChE con los descriptores *Parachor* y el *Coefficiente de Partición Octanol-Agua* obtenido de la base de datos Molinspiration (ec. 6). Se validaron los supuestos de linealidad e independencia de los errores. En cuanto a los parámetros de ajuste, el modelo es estadísticamente significativo ( $p = 0.0003$ ), logra explicar una buena proporción de la variabilidad de los datos ( $R_{aj}^2 = 80\%$ ), aunque el error medio es relativamente grande ( $RMSPE = 23.35\%$ ) por lo que carecería de buena predictibilidad (Fig. 9).

$$\text{Log}_{100} \left( \frac{10^5}{IC_{50}} \right) = (0.51 \pm 0.09) \text{Log}P + (0.003 \pm 0.001) Par - (0.44 \pm 0.39) \quad (\text{ec. 6})$$

Debido a que el modelo se validó para la variable  $IC_{50}$  transformada, la interpretación del modelo debe hacerse teniendo en cuenta la siguiente relación de proporcionalidad (ec. 7):

$$\text{Actividad AntiAChE} \propto \log_{100} \left( \frac{10^5}{IC_{50}} \right) \quad (\text{ec. 7})$$

De lo que se deduce que la capacidad de inhibir la actividad de la enzima aumenta de hecho con el aumento de los valores de  $LogP$  y  $Par$ . Además el aporte del valor de  $LogP$  sería cuantitativamente varias veces más significativo que el efecto debido al valor de  $Par$ , lo que puede observarse comparando las pendientes estimadas para cada variable (ec. 6).

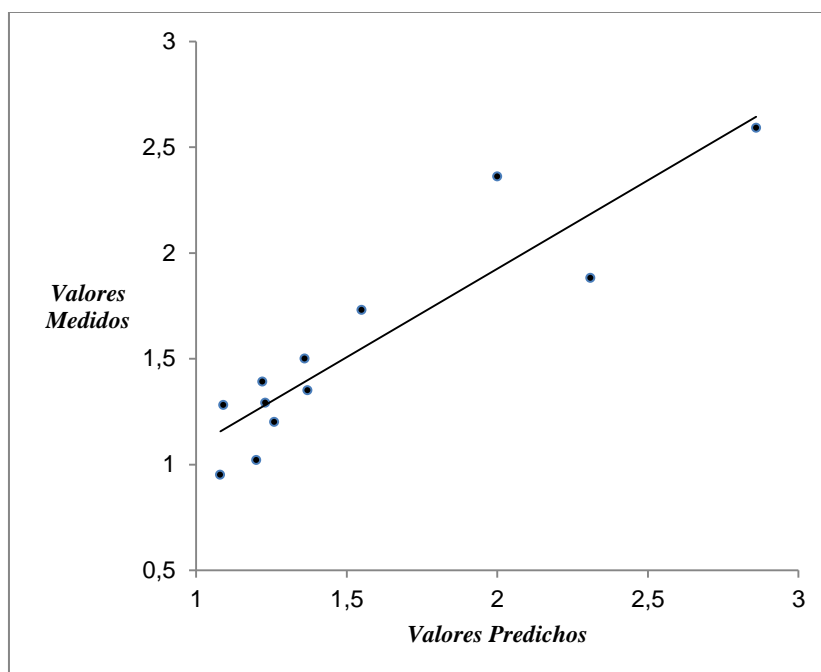


Figura 9 – Valores predichos para el modelo de actividad AntiAChE frente a los valores medidos

## Actividad Insecticida

No fue posible encontrar descriptores que expliquen la actividad insecticida de todos los compuestos principalmente debido a que Estragol y Anetol presentaron actividad insecticida una orden de magnitud mayor que todos los fenoles medidos y no fue posible capturar esta variabilidad con los predictores disponibles. Incluso aquellos ajustados para compuestos fenólicos únicamente no pudieron ser validados ya que los valores obtenidos para los parámetros de ajuste fueron poco satisfactorios.

Sin embargo, durante el análisis de datos observamos que existía una buena correlación lineal entre los valores de  $pLD_{50}$  y los valores medidos de  $IC_{50}$  ( $r_{pearson} = -0.39$ ). Se observó además que el valor de correlación aumentaba al agregar los compuestos Estragol y Anetol, y quitando el compuesto Isoeugenol<sup>8</sup>, hasta un valor de (-0.54). En base a las diversas referencias bibliográficas que dan cuenta de la relación entre la actividad insecticida y la capacidad de inhibir la enzima AChE se decidió incluir los valores medidos de  $IC_{50}$  como predictor dentro del análisis QSAR para actividad insecticida. Como resultado se obtuvo el siguiente modelo (ec. 8):

$$\text{Log} \left( \frac{10^5}{LC_{50}} \right) = (0.02 \pm 0.03)pK_a - (0.01 \pm 0.002)IC_{50} + (2.53 \pm 0.07) \quad (\text{ec. 8})$$

El valor de significancia del modelo fue  $p < 0.0001$ , siendo significativos los valores de los coeficientes de regresión parcial para la constante de disociación ácida ( $pK_a$ )<sup>9</sup> y el valor de  $IC_{50}$  obtenido en los ensayos de actividad antiAChE (Valor  $p$  de 0.0001 y 0.0031 respectivamente). El coeficiente de determinación tuvo un valor alto ( $R_{aj}^2 = 89\%$ ) y el error de predicción fue del 6.5% lo que nos denota una buena predictibilidad (Fig. 10). Se validaron los supuestos de independencia y normalidad de los errores. La interpretación del modelo debe hacerse teniendo en cuenta que la toxicidad es proporcional al valor de la variable transformada (ec. 9).

$$\text{Toxicidad Aguda por contacto} \propto \text{Log} \left( \frac{10^5}{LC_{50}} \right) \quad (\text{ec. 9})$$

<sup>8</sup> El compuesto Isoeugenol no pudo ajustarse realmente porque presenta una actividad insecticida demasiado baja mientras que es un muy buen inhibidor de la enzima AChE y sus parámetros moleculares son muy similares a los de Eugenol, cuya toxicidad es mucho mayor.

<sup>9</sup> Los valores de  $pK_a$  para Estragol y Anetol se tomaron según las estimaciones de Ripin & Evans (2005) para la acidez de un grupo  $Ph - H$  en agua ( $pK_a \sim 4.3$ ).



Los efectos de ambas variables sobre la toxicidad serían similares, aunque debe tenerse en cuenta que los valores de  $IC_{50}$  varían en un rango mucho más amplio que los valores de  $pK_a$ .

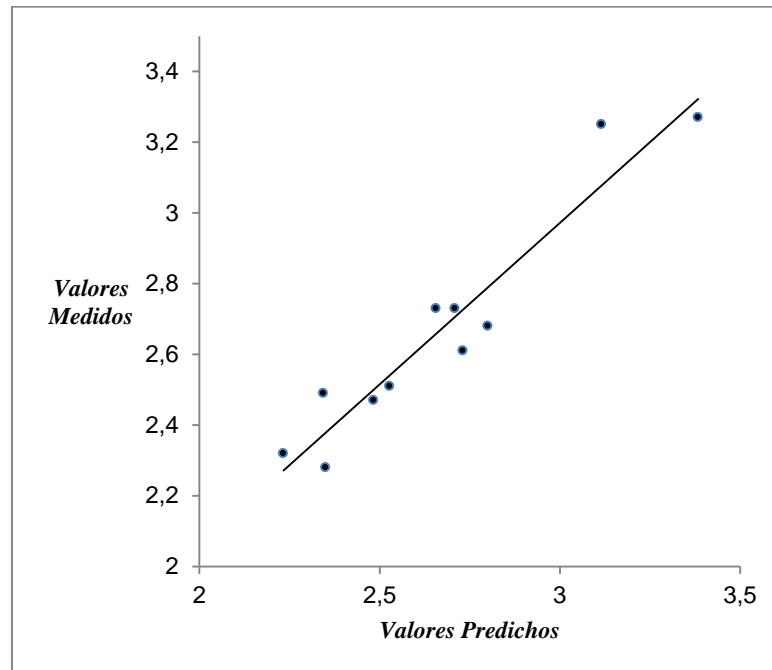


Figura 10 - Valores predichos para el modelo de actividad insecticida frente a los valores medidos

# CAPÍTULO VI

## DISCUSIÓN FINAL Y CONCLUSIONES

## Actividad como semioquímicos

Las características estructurales y fisicoquímicas que están relacionados con la capacidad de un compuesto de producir repelencia no han sido aún esclarecidas, sin embargo algunos estudios han realizado algunos avances en este sentido mostrando que algunos descriptores como lipofilicidad, presión de vapor, punto de ebullición, longitud molecular y momento de inercia, entre otros, pueden explicar parte de la actividad repelente de estos compuestos en diferentes especies de dípteros (Skinner & Johnson, 1980; Davis, 1985; Suryanarayana y col., 1991; Katritzky y col., 2006; Wang y col., 2008).

Hidrocarburos naturales, relacionados al p-Cimeno presentan propiedades similares a las observadas por nosotros para este compuesto frente a *S.zeamais* (Figura 11). El compuesto  $\alpha$ -Pinenos es capaz de inhibir levemente la alimentación en *S.zeamais* (Huang y col., 1998);  $\beta$ -Mirceno es un muy buen repelente de *T.castaneum*, otro insecto plaga (Caballero-Gallardo y col., 2011); y  $\alpha$ -Limoneno presenta actividad repelente frente a *S.oryzae* y otras especies de insectos (Yoon y col., 2007; Gillij y col., 2008). No hemos registrado estudios realizados en estos compuestos u otros estructuralmente relacionados para poder dar una explicación más acabada de este comportamiento. Sería de interés contar con datos sobre la actividad repelente de compuestos estructuralmente similares como Benceno y Tolueno, y compuestos naturales relacionados, como Cumeno, Mesitileno, Terpineno, Limoneno, etc. para poder hacer comparaciones sobre los efectos del agregado de una función oxigenada sobre la capacidad repelente.

Existe una serie de observaciones que parecerían apuntar a que el agregado de una función oxigenada aumenta la capacidad repelente frente a artrópodos (Nerio y col., 2010):

- Los derivados hidroxilados de algunos monoterpenoides mostraron un aumento de su capacidad repelente con respecto a las moléculas originales frente a *T.castaneum* (García y col., 2005).
- Caballero-Gallardo y col. (2011) obtuvieron resultados similares en *T.castaneum*: los compuestos oxigenados presentaban una mayor capacidad repelente aunque a mayores concentraciones mientras que aquellos compuestos sin funciones oxigenadas eran repelentes suaves en un amplio rango de concentraciones.
- De los 21 metabolitos aislados en el estudio realizado por Toloza y col. (2006) en *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), los tres principios de mayor actividad fueron compuestos hidroxilados.
- Ensayos de repelencia realizados en *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) parecen apoyar esta idea y sugieren que la actividad depende del tipo de carbono al que está unida la función  $-OH$ , siendo en orden creciente Terciario < Secundario < Primario (Omolo y col., 2004; Odalo y col., 2005).
- En nuestros resultados observamos que p-Cimeno presentó una capacidad repelente relativamente menor que Carvacrol y Timol, que presentan el mismo esqueleto hidrocarbonado más el agregado de una función oxigenada (Figura 12).

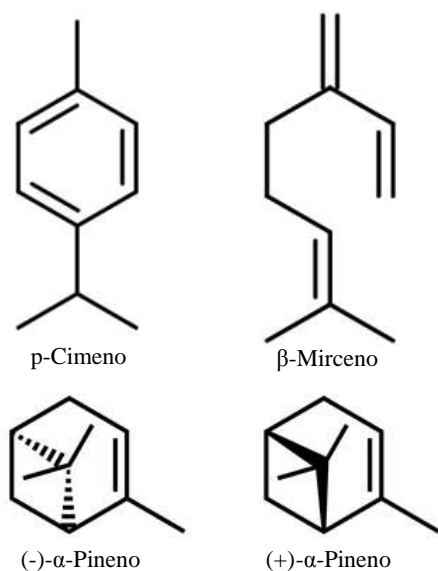


Figura 11 – Hidrocarburos naturales con propiedades repelentes frente a distintas especies de insectos.

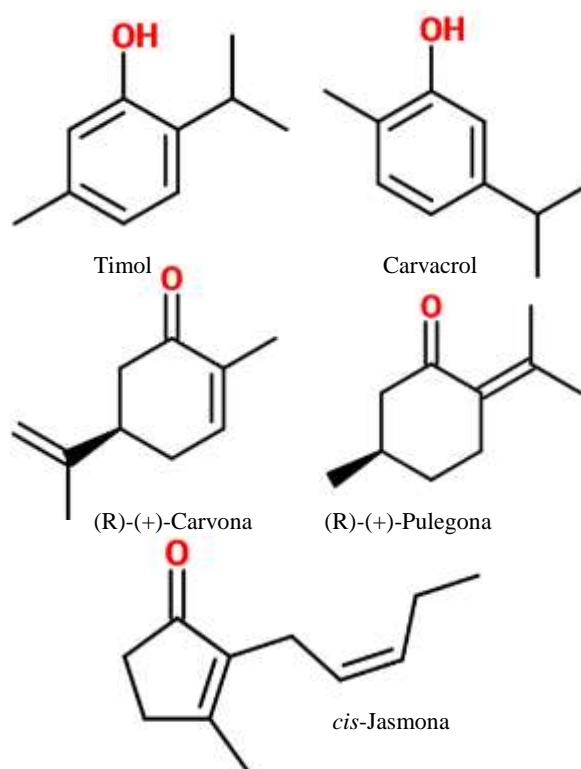


Figura 12 – Timol, Carvacrol y cetonas estructuralmente relacionadas con capacidad repelente.

El grado de repelencia pareciera estar correlacionado, además, con la accesibilidad de la función  $-OH$ , (Omolo y col., 2004; Odalo y col., 2005), por ejemplo la actividad repelente observada para Fenol y *p*-Cresol es mayor que para *o*-Cresol y *m*-Cresol.

Cabe mencionar que los compuestos con funciones cetonas (Figura 12) parecer tener un enorme potencial como repelentes, especialmente para este género de insectos (Germinara y col., 2008; Herrera y col., 2015b): como ejemplo de esto los estereoisómeros del compuesto Carvona, estructuralmente relacionados a Timol y Carvacrol, presentaron una mejor actividad repelente que estos compuestos frente a *S.oryzae* (Yoon y col., 2007) y otros insectos (Gillij y col., 2008; Caballero-Gallardo y col., 2011). Otro gran aporte a esta observación lo constituye la tesis doctoral realizada por la bióloga Herrera, M.J., en la que se midió la respuesta de adultos de *S.zeamais* al tratamiento con cetonas terpénicas (como Carvona, Pulegonaa, Timoquinona, Tuyona, Mentona, entre otras), se determinó que 9 de los 12 compuestos ensayados presentaron una actividad repelente significativa con un  $IR > 40\%$  (Herrera & Zigadlo, 2017). La capacidad de estos compuestos para generar repelencia en los insectos puede estar relacionado con sustancias de defensa producidas por distintas especies vegetales como respuesta al ataque de insectos, como el compuesto *cis*-Jasmona (Figura 12) (Birkett y col., 2000).

Sobre la actividad atrayente, los compuestos que forman el otro gran bloque en principio presentarían al menos algún tipo de interferencia estérica sobre el grupo  $-OH$ , debido a la presencia de sustituyentes en posiciones generalmente *orto*, excepto por el *m*-Cresol. Además, si no tenemos en cuenta este último, todos los demás especímenes presentan un patrón de sustitución similar con un grupo alcóxido en posición *orto* (función éter), mucho más polar que un sustituyente alquilo normal (como en el caso del Timol/Carvacrol); y un sustituyente alquilo en posición *para* (Fig. 13) lo que parece indicar un tipo de patrón estructural común.

Es probable que otros compuestos relacionados a los isómeros Eugenol e Isoeugenol actúen también como atrayentes de *S.zeamais* (Figura 14). El compuesto Metil Eugenol, por ejemplo, es un conocido atrayente de la mosca de la fruta oriental, *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) y de otras especies de dípteros de las familias Drosophilidae, Muscidae y Phoridae (Asquith & Kido, 1994). Similarmente el compuesto 2-Allyl-4,5-dimetoxifenol es conocido por ser una feromona de agregación para *Bactrocera papayae* (Diptera: Tephritidae) (Nishida y col., 2004). En un estudio comparativo, Steiner (1952) determinó la capacidad atractiva de los compuestos Isoeugenol y Metil Isoeugenol con respecto a la actividad de Metil Eugenol en *B.dorsalis*, arribando a la conclusión de que esta disminuía para ambos compuestos derivados, siendo más pronunciada la pérdida de capacidad atractiva para Isoeugenol.

La vainillina es el único compuesto con una función aldehído dentro de nuestra serie química. Esto es particularmente interesante ya que se han reportado otros compuestos orgánicos con esta función con propiedades atractivas en otras especies del género *Sitophilus* tal como Pentanal, (E,E)-2,4-Heptadienal y fenilacetaldehído a bajas concentraciones (Germinara y col., 2008; Phillips y col., 1993). Otro caso es el de los escarabajos del género *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae) que se ven atraídos diferencialmente por un gran número de compuestos estructuralmente relacionados a los fenilpropanoides producidos por las flores de especies del género *Cucurbita* como *cis*-Cinnamaldehído y su derivado reducido *cis*-Cinnamol (Metcalf, 1994). Se ha demostrado para este grupo que el agregado de la función aldehído al esqueleto básico aumenta la capacidad atractiva para este género, como es el caso del 4-metoxi-*E*-Cinnamaldehído derivado *para* sustituido de Estragol, que a diferencia de este último funciona como un compuesto atrayente de *D.barberi* (Metcalf & Lampman, 1989) (Fig. 15).

La pregunta es, ¿hasta qué punto es extrapolable la información disponible sobre atrayentes en otras especies con respecto al gorgojo del maíz, *S.zeamais*? Si bien la mayoría de los compuestos atrayentes parecen estar relacionados con la familia química de los fenilpropanoides, es evidente a la atracción sería un fenómeno estrechamente relacionado con la ecología del insecto, como se observa en los insectos del género *Diabrotica* con las plantas del género *Cucurbita*.

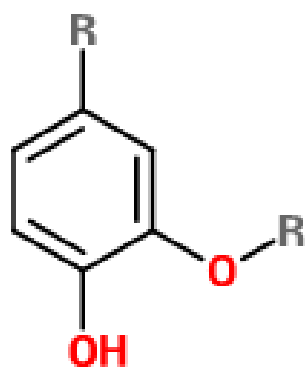


Figura 13 - Estructura hipotética de un atrayente fenólico genérico.

En el caso del compuesto Vainillina podemos establecer un vínculo en la actividad atrayente y la ecología del insecto *S.zeamais*: este compuesto es el producto de biotransformación del ácido Ferúlico, un compuesto que actúa como refuerzo de la pared celular en el grano de maíz, en un proceso en el que participan microorganismos fúngicos (Kavitha y col., 2005); la presencia de Vainillina podría actuar como una señal química que indique al insecto la presencia de granos de pared blanda, susceptibles de ser atacados. La capacidad atractiva de este compuesto fue demostrada para otros gorgojos como *S. granarius* y *S. oryzae* (Germinara y col., 2008; Phillips y col., 1993), siendo este último capaz además de detectar esta molécula mediante quimiorreceptores ubicados en las sensillas de sus antenas (Germinara y col., 2002). Analizando los datos disponibles sobre estudios similares en individuos del género *Sitophilus* podemos postular que la presencia de dos funciones oxigenadas adyacentes en el anillo aromático pueden generar atracción, como en el caso de Vainillina y Eugenol; al igual que la presencia de funciones aldehído, como en el caso del Fenilacetaldehído (Germinara y col., 2008). Sin embargo, datos obtenidos recientemente en nuestros laboratorios parecen refutar esta idea por lo menos para aquellos fenilpropanoides con una función aldehído, como los derivados del Cinnamaldehído.

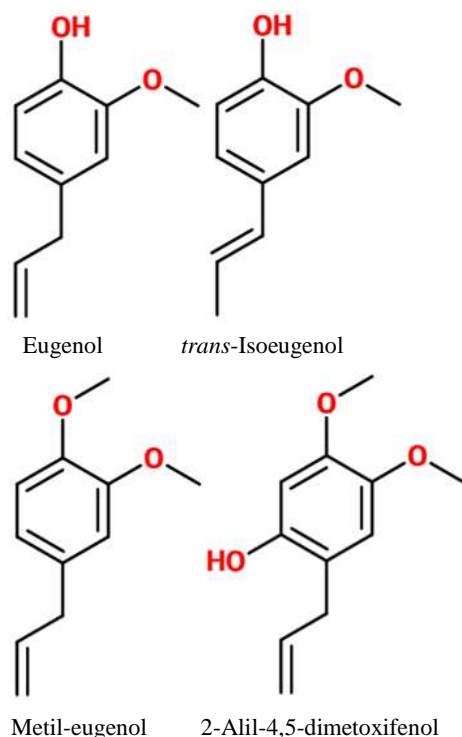


Figura 14 – Atractantes estructuralmente relacionados al compuesto Eugenol.

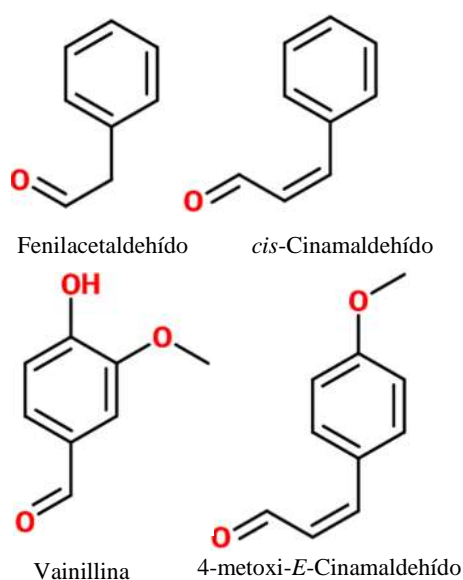


Figura 15 – Compuestos estructuralmente relacionados al compuesto Vainillina con actividad atrayente frente a diferentes especies de insectos

## Actividad AntiAChE

La conclusión que deriva del análisis del modelo *QSAR* para esta bioactividad es que la capacidad de inhibir la actividad de la enzima estaría relacionada con el aumento de los valores de *LogP* y *Par*. La actividad inhibitoria estaría principalmente relacionada con el carácter lipofílico del compuestos medido en términos del *coeficiente de partición octanol-agua* (ec. 6) (Klopman y col., 1994). La relación entre estas dos variables surge naturalmente si consideramos que la enzima AChE de insecto es una proteína que se encuentra embebida en membrana (Gerolt, 1983) por lo que el carácter lipofílico del compuesto fenólico puede ser crucial para que este alcance el sitio de acción sobre la superficie de la enzima en ensayos realizados *in vitro* en extractos de tejidos blandos del insecto.

El papel del descriptor *Parachor* en la inhibición nos puede dar pistas sobre la forma en que afectan los fenoles la actividad de la enzima AChE. La estructura de esta enzima ha sido estudiada extensamente desde la década de 1990 y se sabe que esta evolutivamente conservada conteniendo regiones similares a otras serina-hidrolasas. El sitio activo se ubica al fondo de una pequeña cavidad donde se encuentran dos regiones de importancia en la catálisis, el *sitio esteárico* responsable de la ruptura del enlace ester de ACh y el *sitio aniónico principal* o  $\alpha$  responsable de la correcta orientación del neurotransmisor (Pohanka, 2011).

Precediendo la entrada al sitio activo se encuentra una región denominada *garganta aromática*, compuesta por residuos aromáticos que generan una zona de carácter hidrofóbico que es responsable de la alta especificidad de la

enzima. Es debido a la estrechez de esta cavidad que la enzima AChE no es capaz de hidrolizar esteres de colina de alto peso molecular como si lo hacen otras colinesterasas, como la Butirilcolinesterasa (Pohanka, 2011).

El parámetro *Parachor* está relacionado positivamente con el tamaño de una molécula. El aumento del tamaño molecular debería disminuir la actividad inhibitoria de una molécula si esta pudiese interactuar directamente con sitio activo. Sin embargo en nuestro modelo se observa el fenómeno opuesto: la capacidad inhibitoria esta correlacionada positivamente con el aumento del tamaño molecular, al menos para el rango de valores de este parámetro observado en los compuestos fenólicos.

La explicación más plausible que encontramos para este hallazgo es que la porción aromática de los compuestos fenólicos es capaz de interactuar con la garganta aromática obstruyendo la entrada al sitio activo. Este fenómeno puede posiblemente estar relacionado con la presencia de otra región dentro de la enzima que funciona como un sitio de unión de muchos moduladores o reguladores alostéricos de la actividad enzimática, denominado *sito aniónico periférico* o  $\beta$ , localizado en la superficie de la enzima alrededor de la entrada de la cavidad (Pohanka, 2011). El sitio aniónico  $\beta$  podría establecer relaciones polares con la función oxigenada en los fenoles orientando y fijando la molécula sobre la entrada de la cavidad.

Esta hipótesis parecería explicar la razón por la cual el compuesto Carvacrol es sensiblemente más activo que su isómero: el grupo polar  $-OH$  se encuentra en posición *meta* con respecto al sustituyente más voluminoso de manera que un extremo de la molécula interactuaría con el sitio aniónico  $\beta$  mientras que el residuo isopropil de mayor tamaño favorecería la obstrucción de la cavidad interactuando con la garganta aromática. El efecto de obstrucción disminuye con la polaridad del sustituyente, debido probablemente a la imposibilidad de establecer interacciones con la garganta aromática, esta es probablemente la razón por la cual los compuestos Vainillina y ácido Ferúlico presentan una actividad similar a Guaiacol, el cual carece de un grupo *para* o *meta* sustituido.

La presencia de un sustituyente en posición *orto* con respecto al hidroxilo fenólico parece tener importancia en la actividad, como es el caso del compuesto *o*-Cresol cuyo desempeño fue superior al de sus dos isómeros. Sin embargo el efecto parece depender de la polaridad del sustituyente, si observamos el caso del compuesto Creosol presenta una actividad similar a *o*-Cresol a pesar de contar con un grupo apolar *para* sustituido. La carencia de sustituyentes en posiciones 2 y 4 en el compuesto Fenol lo convertiría en el peor compuestos inhibidor junto con *m*-Cresol.

El hecho de que no se haya podido ajustar un modelo para toda la serie de compuestos medidos nos indica que probablemente Estragol, Anetol y *p*-Cimeno actúen mediante un mecanismo alternativo (Roy y col., 2015) producto posiblemente de la carencia de un grupo *Ph - OH* necesario para fijar la interacción entre el compuesto y los sitios de regulación antes mencionados.

## Actividad Insecticida

Los resultados obtenidos a partir del análisis *QSAR* pueden aportarnos nueva información sobre el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos y derivados frente al gorgojo del maíz. Lo más interesante de este modelo es el hecho de que la toxicidad aguda al estar relacionada positivamente con la actividad antiAChE nos da evidencias a favor de la hipótesis de que los compuestos fenólicos naturales ejercen su efecto insecticida a través de un mecanismo que involucra la inhibición de la enzima AChE del insecto. Los insecticidas neurotóxicos inhibidores de AChE normalmente actúan insensibilizando las sinapsis colinérgicas que ocurren en el neuropilo de los ganglios del sistema nervioso central del insecto (Gerolt, 1983). La capacidad de un espécimen de atravesar barreras selectivas es esencial ya que alrededor del sistema nervioso central existe una barrera hematoencefálica de alta selectividad en la interfase hemolinfa-tejido nervioso y en el contacto de este con el sistema de tráqueas.

La gran diferencia de actividades observadas para entre los compuestos fenólicos y los éteres Estragol y Anetol fue capturada por la variabilidad de la constante de disociación ácida (ec. 8). El papel que juega *pKa* con la toxicidad aguda podría estar relacionado con la farmacocinética de los compuestos, es decir, movimiento de las sustancias hacia el interior, a través del organismo y hacia el exterior de éste. Debido a que la mayor parte de las moléculas orgánicas son ácidos o bases débiles, el conocimiento del valor que toma este descriptor nos permite predecir en que forma iónica se encontrara una especie química bajo distintas condiciones de acidez del medio, y esto es particularmente importante ya que la ionización afecta la velocidad a la que es capaz de difundir a través de sistemas de membranas biológicas y otras barreras de permeabilidad selectiva (Manallack, 2007).

Mientras mayor sea el valor de *pKa* es probable que el compuesto sea capaz de alcanzar mucho más rápido y en mayor cantidad el sitio de acción. Esta puede ser una de las razones por las cuales se observó una capacidad insecticida particularmente alta para Estragol y Anetol, los cuales carecen de un grupo ionizable evidente. También nos ayudaría a explicar por qué los monoterpenoides con funciones prácticamente no ionizables como aldehído, cetona y epóxido presentan relativa mayor toxicidad aguda frente a *S.zeamais* que otros monoterpenoides con funciones oxigenadas, como alcoholes y ácidos carboxílicos (Yildirim y col., 2013).

Otro aspecto a considerar es la relación entre el valor de pKa, la polaridad del grupo fenólico y la volatilidad del compuesto en cuestión: un aumento de la polaridad se traduce con valores de pKa bajos, y una menor volatilidad. En ensayos de toxicidad por contacto realizados en cámara es posible que la volatilidad de un compuesto sea un factor importante ya que la vía de entrada suele ser a través del sistema de tráqueas. Este fenómeno no ocurre durante ensayos de toxicidad por aplicación tópica donde el compuesto se deposita sobre la superficie del insecto directamente. Esta puede ser la razón por la cual Isoeugenol, que se encuentra en fase sólida a temperatura ambiente, a pesar de ser un muy buen inhibidor de la enzima AChE tiene muy baja actividad insecticida, mientras que en ensayos de actividad insecticida por contacto mediante aplicación tópica en *S.zeamais* Eugenol, Isoeugenol y Metileugenol (Eugenil metil éter) presentaron la misma toxicidad aguda (Huang y col., 2002), mientras que Eugenol tuvo 10 veces mejor desempeño que Isoeugenol en ensayos de fumigación realizados en *P.americana* (Ngoh y col., 1998).

Existen evidencias adicionales que apoyan esta hipótesis:

- Timol presenta el doble de actividad insecticida que Carvacrol cuando es aplicado de forma tópica en especímenes de *M.domestica*. Sin embargo, la toxicidad del timol relativa a su isómero disminuye abruptamente cuando se prueba en ensayos fumigantes (Rice & Coats, 1994<sup>a</sup>) siendo este un sólido a temperatura ambiente mientras que Carvacrol se encuentra en estado líquido.
- La sustitución sobre la posición -OH del anillo aromático en Eugenol, Timol y Carvacrol disminuye o no modifica la toxicidad medida en estudios realizados mediante aplicación tópica en *M.domestica* (Rice & Coats, 1994b; Lee y col., 1997a; Grodnitzky & Coats, 2002).
- En estudios donde se analizó la capacidad insecticida de derivados éter de Timol, como timil-etil-eter y timil-isopropil-eter, por aplicación tópica realizados en *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) se observó que no existían diferencias significativas con respecto a la toxicidad del timol no sustituido (Grodnitzky & Coats, 2002).

Sin embargo debemos tener precaución a la hora de hacer conclusiones ya que los valores de pKa empleados para Estragol y Anetol son estimaciones, y es posible que el efecto de la volatilidad haya quedado capturado por el valor extremo de este descriptor, pudiendo incluso llegar a ser más importante que el efecto de movilidad interna del compuesto. Podemos elucubrar que un modelo matemático tipo QSAR para esta técnica que incluya otro tipo de compuestos aromáticos, como hidrocarburos, cetonas, éteres y aldehídos, incluiría algún término adicional que dé cuenta de las diferencias de volatilidad entre los compuestos ensayados.

El mecanismo de acción insecticida de los monoterpenoides no ha sido aun completamente esclarecido (Rajendran & Sriranjini, 2008). El mecanismo más plausible implica inhibición de AChE, sin embargo no siempre se ha observado una correlación entre la actividad AntiAChE *in vitro* y la toxicidad de un compuesto (por ej. Grundy & Still, 1985; Ryan & Byrne, 1998) por lo que se han propuesto otros mecanismos alternativos que involucran receptores GABA (Hold y col., 2000) y receptores de octopamina (Enan, 2001) en insectos. Cabe mencionar que Grodnitzky & Coats (2002) advierten que es posible que incluso compuestos estrechamente relacionados, como los monoterpenoides aromáticos y no aromáticos, tengan mecanismos de acción diferentes.

A pesar de estas reservas, nuestros datos parecen apoyar la idea de este mecanismo involucraría un efecto neurotóxico mediado por inhibición de AChE por lo menos para compuestos aromáticos simples con funciones oxigenadas, aunque puede que exista más de un mecanismo posible, como sería el caso de Eugenol que podría además actuar mediante unión a receptores de octopamina (Enan, 2001). Es interesante notar que a lo largo de la bibliografía disponible sobre el tema de los compuestos bioactivos en insectos, a pesar de las diferencias naturales, en general se observan relaciones de toxicidad similares entre los monoterpenoides en distintas especies de insectos, lo que puede hablarnos de un mecanismo común de acción.

## MISCELÁNEA

A lo largo de este trabajo se han sugerido numerosas ampliaciones a las que podemos agregar la realización de estudios sobre efectos sinérgicos entre nuestros compuestos y otros estudiados previamente (lo que puede ayudar a dilucidar otros aspectos sobre el mecanismo de acción de estas moléculas); o el estudio de mezclas de compuestos naturales con insecticidas comerciales en concentraciones menores a las utilizadas a campo (Huang y col., 2002).

Otra aproximación interesante para mejorar las cualidades de los monoterpenoides con potencial insecticida es realizar mezclas en las que se incluyan otros compuestos conocidos por ser inhibidores selectivos de los mecanismos enzimáticos de desintoxicación, de manera de obtener formulaciones con efectos sinérgicos. Particularmente en *S.oryzae* se han ensayado mezclas que contienen Estragol o Anetol adicionadas con inhibidores del sistema glutatión-S-transferasa (López y col., 2010).

Además, si bien se mencionó que los monoterpenoides no son compuestos fumigantes muy efectivos debido a su baja presión de vapor existen estudios que se han realizado con la intención de mejorar este aspecto utilizando formulaciones que incluyen nanoparticulas (Ziaee y col., 2014)

No obstante, si bien existen muchos estudios sobre extractos vegetales, AEs y compuestos naturales con potencial para posibles aplicaciones en el manejo integrado de plagas, existen aún muchos aspectos que se deben soslayar antes de que esto sea factible y viable, como estudios a campo, viabilidad económica, efectos de toxicidad cruzada, estudios ambientales y de mercado, entre otros (Katz y col., 2008; Nerio y col., 2010).

La motivaciones para continuar con los trabajos de investigación son importantes: nuestro país se posiciona a partir del año 2016 como el segundo mayor exportador de maíz a nivel mundial (Cazada & Di Yenno, 2016) y el gorgojo del maíz, *S.zeamais*, es la principal plaga causa de pérdida de granos de maíz almacenados, que en nuestro país puede alcanzar hasta un 15% de la producción (Huerga & San Juan, 2005). Los nuevos estándares de calidad ambiental y sanidad del grano, junto con el cambio en el uso y manejo de la tierra en la agricultura moderna, han impulsado el reemplazo paulatino de los métodos tradicionales de control químico con pesticidas sintéticos de amplio espectro por el uso bioplaguicidas selectivos y de baja toxicidad para mamíferos basados en aceites esenciales y extractos vegetales, y el uso integrado de distintas herramientas de control de plagas. Además por cuestiones de salubridad y estándares de calidad en nuestro país se encuentra prohibida la comercialización y exportación de granos con insectos vivos (Abadía y col., 2013), por lo que el control de esta plaga es un tema relevante y de interés para distintos sectores nacionales.

## CONCLUSIONES

- De los compuestos ensayados por su actividad como semioquímicos del gorgojo del maíz destacan como atrayentes Guaiacol ( $IR_{40\mu M} = 77$ ) y Eugenol ( $IR_{0.4\mu M} = 51$ ), siendo este último de particular interés por presentar alta actividad a bajas concentraciones. La capacidad atrayente está relacionada a la ecología del insecto. Estos compuestos parecen estar relacionados estructuralmente con la familia química de los fenilpropanoides, metabolitos secundarios de plantas. Del estudio se desprende que la presencia de interferencias estéricas sobre el grupo  $-OH$ , debido a la presencia de sustituyentes en posiciones generalmente orto; y la presencia de grupos aldehído dentro de la molécula afectan a la capacidad atractiva de los compuestos estudiados.
- Los compuestos Timol, Carvacrol, Estragol y Anetol presentaron alta actividad repelente ( $IR < -45$ ), siendo Carvacrol el que mejor se desempeña a bajas concentraciones ( $IR_{0.4\mu M} = -47$ ). Las características estructurales y fisicoquímicas que están relacionadas con la capacidad de un compuesto de producir repelencia no han sido aún esclarecidas.
- Los compuestos que presentaron mayor actividad AntiAChE fueron, en orden descendente: Carvacrol, Isoeugenol, Timol y Eugenol. La capacidad de inhibir la enzima AChE parece estar relacionada con la capacidad del compuesto de interactuar con estructuras de membrana donde se encuentra embebida dicha enzima y el tamaño de la molécula. Se ha sugerido un mecanismo de acción para los fenoles donde el extremo polar de la molécula establece interacciones con el sitio aniónico  $\beta$  de la enzima mientras el otro extremo, apolar, interacciona con la garganta aromática que se abre a la cavidad donde se encuentra el sitio de unión a colina, obstruyéndola e inhibiendo así la actividad catalítica.
- Los compuestos Anetol, Estragol, Eugenol y Timol presentaron la mejor actividad insecticida por contacto, sin embargo ninguno presenta una toxicidad comparable a los insecticidas de uso comercial. La capacidad insecticida parece estar gobernada por la capacidad del compuesto de alcanzar los sitios de acción, determinada por el valor de su pKa, y su capacidad de inhibir la enzima AChE, de manera de ejercer un efecto neurotóxico.



## BIBLIOGRAFÍA

- ABADÍA, B. (Ed.); BARTOSIK, R. (Ed.) & HOYOS, M. (2013). *Manual de buenas prácticas en poscosecha de granos: hacia el agregado de valor en origen*. Proyecto de Eficiencia Poscosecha. Ediciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina, Ch.II: 95-142, ISBN 978-987-679-264-6.
- ANDERSON, J.A. & COATS, J.R. (2012). *Acetylcholinesterase inhibition by nootkatone and carvacrol in arthropods*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 102: 124–128.
- APPERT, J. (1987). *The storage of food grains and seeds*. The Tropical Agriculturist, Macmillan, London.
- ARNASON, J.T.; BEYSSAC, B.C., PHILOGÉNE, B.J.R.; BERGVINSON, D.J.; SERRATOS, J.A. & MIHM, J.A. (1997). *Mechanisms of resistance in maize grain to the maize weevil and the larger grain borer*. In: *Insect resistant maize: recent advances and utilization*. Proceedings of an International Symposium held at the International Maize and Wheat Improvement Center, 91-95.
- ARNOT, J.A. & GOBAS F.A.P.C. (2006). *A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms*. *Environ. Rev.* 14: 257-297.
- ASQUITH, A. & KIDO, M. (1994). *Native Hawaiian insects attracted to the semiochemical methyl eugenol, used for male annihilation of the Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae)*. *Environ. Entomol.*, 23: 1397-408.
- ATHANASSIOU C. G., KAVALLIERATOS N. G., EVERGETIS E., KATSOULA A. M., HAROUTOUNIAN S. A. (2013). *Insecticidal efficacy of silica gel with Juniperus oxycedrus ssp. Oxycedrus (Pinales: Cupressaceae) essential oil against Sitophilus oryzae (Coleoptera: Curculionidae) and Tribolium confusum (Coleoptera: Tenebrionidae)*. *Journal of Economic Entomology*, 106: 1902-1910.
- BALASUBRAHMANYAM, S.N. (2008). *Einstein, 'parachor' and molecular volume: Some history and a suggestion*. *Current Science*, 94(12): 1650-1658.
- BAVIN, P.M.G. & CANADY, W.J. (1957). *Correlation of O–H stretching frequencies with pK<sub>a</sub> values for some phenols*. *Can. J. Chem.* 35(12): 1555-1560, 10.1139/v57-203.
- BEDINI, S.; BOUGHERRA, H.H.; FLAMINI, G.; COSCI, F.; BELHAMEL, K.; ASCRIZZI, R. & CONTI, B. (2016). *Repellency of anethole- and estragole-type fennel essential oils against stored grain pests: the different twins*. *Bulletin of Insectology* 69 (1): 149-157, ISSN 1721-8861.
- BIRCH, L.C. (1944). *The effect of the temperature and dryness on the survival of the eggs of Calandra oryzae (L) (small strain) and Rizopertha dominica Fab. (Coleoptera)*. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. Adel.* 22: 265-269.
- BIRKETT, M.A.; CAMPBELL, C.A.M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A.J.; MARTIN, J.L.; MATTHES, M.; NAPIER, J.A.; PETERSSON, J.; PICKETT, J.A.; POPPY, G.M.; POW, E.M.; PYE, B.J.; SMART, L.E.; WADHAMS, G.H.; WADHAMS, L.J. & WOODCOCK, C.M. (2000). *New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense*. *PNAS* 97(16): 9329–9334.
- BOHMAN, B.; NORDLANDER, G.; NORDENHEM, H.; SUNNERHEIM, K.; BORG-KARLSON, A.K. & UNELIUS, C.R. (2008). *Structure–Activity Relationships of Phenylpropanoids as Antifeedants for the Pine Weevil Hylobius abietis*. *J Chem Ecol.* 34:339–352, DOI 10.1007/s10886-008-9435-1.
- BOUGHERRA H. H.; BEDINI S.; FLAMINI G.; COSCI F.; BELHAMEL K. & CONTI B. (2015). *Pistacia lentiscus essential oil has repellent effect against three major insect pests of pasta*. *Industrial Crops and Products*, 63: 249-255.
- BRATTSTEN, L. B. (1983). *Cytochrome P-450 involvement in the interactions between plant terpenes and insect herbivores*. In: HEDIN, P.A. (Ed.), *Plant resistance to insect*, 10: 173-195. American Chemical Society, Washington, DC.
- CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. & STASHENKO, E.E. (2011). *Repellent Activity of Essential Oils and Some of Their Individual Constituents against Tribolium castaneum Herbst*. *J. Agric. Food Chem.* 59: 1690–1696.
- CASIDA, J. E. & QUISTAD, G.B. (1998). *Golden Age of Insecticide Research: Past, Present, or Future?* *Annual Review of Entomology*, 43:1-16.
- CHAMP, B.R. & DYTE, C.E. (1976). *Report of the FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests*. FAO Plant Production and Protection Series No. 5.

- CALZADA J. & DI YENNO, F. (2016). *En la 2015/2016 Argentina cada vez mejor como líder en el mercado mundial de granos y subproductos*. Informativo Semanal, Bolsa de Comercio de Rosario, AÑO XXXIV, 1780: 3-6, URL: < [http://www.bcr.com.ar/Publicaciones/Informativo%20semanal/bcr2016\\_10\\_14.pdf](http://www.bcr.com.ar/Publicaciones/Informativo%20semanal/bcr2016_10_14.pdf) >
- CHEMICALIZE, URL: <<https://chemicalize.com/>> (Nov, 2016). ChemAxon (Dev.) (<<http://www.chemaxon.com>>).
- CHEMSPIDER, URL: <<http://www.chemspider.com/>> (Nov, 2016). Royal Society of Chemistry.
- CHULZE, S.N.; RAMIREZ, M.L.; TORRES, A. & LESLIE, J.F. (2000). *Genetic variation in Fusarium section Liseola from no-till maize in Argentina*. Appl. Environ. Microbiol.; 66(12): 5312-5315.
- COATES, J.P. & MEYERS, R.A. (Ed.).(2000). *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 10815–10837. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd.
- CONTI B.; CANALE A.; CIONI P. L. & FLAMINI G. (2010). *Repellence of essential oils from tropical and Mediterranean Lamiaceae against Sitophilus zeamais*. Bulletin of Insectology 63: 197-202.
- CONTI B.; CANALE A.; CIONI P. L.; FLAMINI G. & RIFICI A. (2011). *Hyptis suaveolens and Hyptis spicigera (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against Sitophilus granarius (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae)*.- Journal of Pest Science, 84: 219-228.
- COLLINS, L.E.; BRYNING, G.P.; WAKEFIELD, M.E., CHAMBERS, J. & COX, P.D. (2007). *Progress towards a multi-species lure: Identification of components of food volatiles as attractants for three storage beetles*. J. Stored Prod. Res. 43(1): 53–63.
- COX, P.D. (2004). *Potential for using semiochemicals to protect stored products from insect infestation*.J. Stored Prod. Res. 40:1–25.
- COX, P.D. & COLLINS, L.E. (2002). *Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures*.J. Stored.Prod. Res. 38: 95–115.
- CRAVEDI, P. & QUARONI, S. (1982). *Modi e mezzi di diffusione dei microorganismi negli alimenti ad opera degli insetti*. Proc. Dif. Antiparassit. Industr. Aliment. Protez. 3: 167-172.
- CUBILLOS, A. (Ed.). (1983). *Estudio de evaluación de pérdidas de granos básicos poscosecha*. Proyecto FAO PFL/CHI/001, Documento de Campo N°1. URL: <http://www.fao.org/docrep/X5030S/x5030S01.htm>.
- DAMBOLENA, J.S.; ZYGADLO, J.A. & RUBINSTEIN, H.R. (2011). *Antifumonisin activity of natural phenolic compounds a structure-property-activity relation study*.Int. J. Food Microbiol. 145: 140–146.
- DAMBOLENA, J.S.; LOPEZ, A.G.; MERILES, J.M.; RUBINSTEIN, H.R. & ZYGADLO, J.A. (2012). *Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on Fusarium verticillioides. A structure-property-activity relation study*. Food Control, 28(1), 163-170.
- DAVIS, E.E. (1985). *Insect repellents concepts of their mode of action relative to potencial sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. J. Med. Entomol. 22: 237–243.
- DAVISON, A.C. & RICARD, I. (2010). *Comparison of Models for Olfactometer Data*. J. of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics, 16(2): 157–169, DOI: 10.1007/s13253-010-0042-6.
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M. & ROBLEDO C.W. (2016) InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <<http://www.infostat.com.ar>>
- DRESDEN, D. & KRIJGSMAN, B. J. (1948). *Experiments on the physiological action of contact insecticides*. Bulletin of Entomological Research, 38(4): 575-578.
- DOHI, S.; TERASAKI, M. & MAKINO, M. (2009). *Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils*. Journal of Agricultural Food Chemistry 57: 4313–4318.
- DYTE, C.E. (1974). *Problems arising from insecticide resistance in storage pests*.EPPO Conference on Storage Pests and Diseases, Paris, Bull 4(3): 275-289.
- ENAN, E. (2001). *Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action*. Comp. Biochem. Physiol., C Toxicol. Pharmacol. 130, 325-337.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; VALENTINO, A.; FEATHERSTONE, R.M. (1961). *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical Pharmacology, 7: 88-95.
- ERTL, P.; ROHDE, B. & SELZER, P. (2000). *Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties*.J. Med.

Chem. 2000, N 43, ISSN 3714-3717. LUTZ, B. T. G.; LANGOOR, M. H. & VAN DER MAAS, J. H. (1998). *The sensorial potentials of the OH-stretching mode: phenols*. *Vibr.Spectrosc.*, 18, pp.111-121.

EXNER, O. (1962). *Conception and significance of the parachor*. *Nature*, 196: 890-891.

EYER, P. & WOREK, F. (2009). *The determination of human erythrocyte acetylcholinesterase (Ery-AChE) in a modified Ellman assay*. *Clinical Toxicological Analysis*, pp. 755-774.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), UNITED NATIONS. URL: [www.fao.org/home/es/](http://www.fao.org/home/es/) (2015). *Sitophilus zeamais* (greater grain weevil), datasheet. Last modified: 05 May 2015. URL: <http://www.cabi.org/isc/datasheet/10926>

FERREIRA-CASTRO, F.; POTENZA, M.; ROCHA, L. & CORREA, B. (2012). *Interaction between toxigenic fungi and weevils in corn grain samples*. *Food Control* 26, 594-600.

FUZEAU-BRAESCH, S.; GENIN, E.; JULLIEN, R.; KNOWLES, E. & PAPIN, C. (1988). *Composition and role of volatile substances in atmosphere surrounding two gregarious locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria**. *J. Chem. Ecol.* 14: 1023-1033.

GARCÍA, M.; DONADEL, O.J.; ARDANAZ, C.E.; TONN, C.E. & SOSA, M.E. (2005). *Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum**. *Pest Manage. Sci.* 61, 612-618.

GERMINARA, G.S.; DE CRISTOFARO, A. & ROTUNDO, G. (2008). *Behavioral responses of adult *Sitophilus granarius* to individual cereal volatiles*. *Chem Ecol* 34:523-529.

GERMINARA, G. S.; ROTUNDO, G.; DE CRISTOFARO, A. & GIACOMETTI, R. (2002). *Risposte elettroantennografiche di *Sitophilus granarius* (L.) e *S. zeamais* Motschulsky a sostanze volatili dei cereali*. *Tec. Molit.* 53:27-34.

GEROLT, P. (1969). *Mode of entry of contact insecticides*. *J. Insect Physiol.*, 15: 563-580.

GEROLT, P. (1983). *Insecticides: their route of entry, mechanism of transport and mode of action*. *Biol. Rev.* 58: 233-274.

GILLIJ, Y. G.; GLEISER, R. M. & ZYGADLO, J. A. (2008). *Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina*. *Bioresour. Technol.*, 99: 2507-2515.

GOULDEN, J.D.S. (1954). *The OH -vibration frequencies of carboxylic acids and phenols*. *Spectroc. Acta Vol 6, Issue 2*, 129-133, DOI 10.1016/0371-1951(54)80362-6.

GRODNITZKY, J.A. & COATS, J.R. (2002). *QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4576-4580.

GRUNDY, D.L. & STILL, C.C. (1985). *Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 23, 383-388.

HERRERA, M.J. & ZIGADLO, J.A. (2017). *Compuestos volátiles como agentes de protección contra la acción de insectos granívoros: *Sitophilus zeamais* Motschulsky*. Tesis doctoral, Doctorado en Ciencias Biológicas. FCEFyN -UNC.

HERRERA, J.M.; ZUNINO, M.P.; DAMBOLENA, J.S.; PIZZOLITTO, R.P.; GAÑAN, N.A.; LUCINI, E.I.; ZYGADLO, J.A. (2015)<sup>a</sup>. *Terpene ketones as natural insecticides against *Sitophilus zeamais**. *Industrial Crops and Products*, Elsevier 70: 435-442.

HERRERA, J.M.; PIZZOLITTO, R.P.; ZUNINO, M.P.; DAMBOLENA, J.S.; ZYGADLO, J.A. (2015)<sup>b</sup>. *Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize*. *Journal of Stored Products Research*, Elsevier 62 : 74e80.

HOLD, K.M.; SIRISOMA, N.S.; IKEDA, T.; NARAHASHI, T. & CASIDA, J.E.R. (2000). *Thujone (the active component of absinthe):  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification*. *PNAS*, 97, 3826-3831.

HOUGHTON, P.J.; REN, Y. & HOWES, M.J. (2006). *Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi*. *Natural Products Reports* 23, 181-199.

HUANG, Y.; HEE, S.K. & HO, S.H. (1998). *Antifeedant and growth inhibitory effects of  $\alpha$ -pinene on the stored-product insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch.* *International Pest Control*, 40(1): 18-20.

- HUANG, Y.; HO, S.H.; LEE, H.C. & YAP, Y.L. (2002). *Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of Sitophilus zeamais Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. J. Stored Prod. Res. 38: 403–412.
- HUERGA, M. & SAN JUAN, S. (2005). *El Control de las Plagas en la Agricultura Argentina*. Estudio sectorial Agrícola Rural Banco Mundial/Centro de inversiones, FAO, Argentina.
- ISMAN M. B.(2000). *Plant essential oils for pest and disease management*. Crop Protection, 19: 603-608.
- ISMAN M. B.(2006). *Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world*. Annual Review of Entomology, 51: 45-66.
- JUKIC, M.; POLITEO, O.; MAKSIMOVIC, M.; MILOS, M. & MILOS, M. (2007). *In Vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone*. Phytother. Res. 21 : 259–261.
- KATRITZKY, A.R.; SILD, S. & KARELSON, M. (1998). *General Quantitative Structure-Property Relationship Treatment of the Refractive Index of Organic Compounds*. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 38: 840-844.
- KATRITZKY, A.R.; DOBCHEV, D.A.; TULP, I.; KARELSON, M. & CARLSON, D. A. (2006). *QSAR study of mosquito repellents using Codessa Pro*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16: 2306–2311.
- KATZ, T. M.; MILLER, J. H. & HEBERT, A. A. (2008). *Insect repellents: historical perspectives and new developments*. J. Am. Acad. Dermatol. 58, 865–871.
- KAVITHA, S., SHYAMALA, H., MURALIKRISHNA, G., VARADARAJ, M.C. & RATI RAO, E. (2005). *Starch and cell wall degrading enzymes from fungal organisms grown on cereal and millet brans*. Eur. Food Res. Technol. 220:560–564.
- KINUGASA, S.; TANABE, K. & TAMURA, T. *Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)*. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan.SDBSWeb :<http://sdbs.db.aist.go.jp> (Nov, 2016).
- KLOPMAN, G.; LI, J.Y.; WANG, S. & DIMAYUGA, M.(1994). *Computer Automated logP Calculations Based on an Extended Group Contribution Approach*. J.Chem.Inf.Comput.Sci., 34: 752.
- KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M. & METE, E. (2008). *Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish Origanum acutidens and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene*. Biores. Tech. 99: 8788–8795.
- KORUNIĆ, Z.; ROZMAN, V. & KALINOVIĆ, I. (2008). *The potential use of natural essential oils in the fumigation of stored agricultural products*. CAF 2008-Controlled Atmosphere and Fumigation-Green, safe, Harmony and Development.
- KUNAL, R.; SUPRATIK, K.; RUDRA NARAYAN, D. (2015). *A Primer on QSAR/QSPR Modeling: Fundamental Concepts*. SpringerBriefs in Molecular Science, DOI 10.1007/978-3-319-17281-1.
- MACKAY, D. (1982). *Correlation of Bioconcentration Factors*. Environ. Sci. Technol., 16: 274-278.
- MAGA, J.A. (1978). *Cereal volatiles, a review*. J. Agric. Food Chem. 26:175-178.
- MAGAN, N.; HOPE, R.; CAIRNS, V. & ALDRED, D. (2003). *Postharvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain*. Eur. J. Plant Pathol. 109:723–730.
- MALLANACK, D.T. (2007). *The pKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery*. Perspectives in Medicinal Chemistry 2007: 1 25–38.
- MATA, A.T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F. & ARAÚJO, M.E.M. (2007). *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices*. Food Chem. 103:778–786.
- MATTESON, P.C. (1995). *The “50% pesticide cuts” in Europe: a glimpse of our future?* Am. Entomol. 41: 210–220.
- MEJÍA, D. (2003). *Maize: Post-harvest Operations*. Post-Harvest Compendium, International Information System for the Agricultural Science and Technology (AGRIS), Information Network on Post-Harvest Operations (INPhO), FAO. URL: <http://www.fao.org/3/a-av007e.pdf>
- METCALF, R.L. (1994). *Chemical ecology of Diabroticites*. In: *Novel aspects of the biology of Chrysomelidae*, JOLIVET, P.H.; COX, M.L. & PETITPIERRE, E. (Eds.), (1994), Springer, Netherlands, 8: 153-169, ISBN 978-94-011-1781-4.

- METCALF, R.L & LAMPMAN, R.L. (1989). *Estragole Analogues as Attractants for Corn Rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae)*. J. Econ. Entomol. 82(1): 123-129.
- MILLER, J.D.(2008). *Mycotoxins in Small Grains and Maize: Old Problems, New Challenges*. Food Addit. Contam. 25, 219–230.
- MILLS, J.(1989). *Spoilage and heating of stored agricultural products: prevention, detection and control*. Agric. Canada Pub.p.101; 1823E.
- MIKOLAJCZAK, K.L., ZILKOWSKI, B.W., SMITH, C.R. JR.& BURKHOLDER, W.E. (1984). *Volatile food attractants for *Oryzaephilus surinamensis* (L.) from oats*. J. Chem. Ecol. 10:301-309.
- MIYAZAWA, M. & YAMAFUJI, C. (2005). *Inhibition of acetylcholinesterase activity by tea tree oil and constituent terpenoids*. Flavour Fragr. J., 20: 617–620.
- MONDAL, M. & KHALEQUZZAMAN, M. (2010). *Toxicity of naturally occurring compounds of plant essential oil against *Tribolium castaneum* (Herbst)*. J. Biol. Sci. 10: 10.
- MOLINSPIRATION, *Property Calculator* (2016) © Molinspiration Cheminformatics. URL: <<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>>.
- NARA, J.M., LINDSAY, R.C.& BORKHOLDER, W.E. (1981). *Analysis of volatile compounds in wheat germ oil responsible for an aggregation response in *Trogoderma glabrum* larvae*. Agric. Food Chem. 29:68-72.
- NAWROT, J.& HARMATHA, J. (1994). *Natural products as antifeedants against stored product insects*. PostHarvest News and Information 5, 17N–21N.
- NERIO L. S.; OLIVERO-VERBEL J. & STASHENKO E. E. (2009). *Repellent activity of essential oils from seven aromatics plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera)*. Journal of Stored Product and Research, 45: 212-214.
- NERIO, L.S.; OLIVERO-VERBEL, J. & STASHENKO, E. (2010). *Repellent activity of essential oils: A review*. Bioresource Technology, 101: 372–378.
- NGOH, S.P.; CHOO, L.E.W.; PANG, F.Y.; HUANG, Y.; KINI, M.R. & HO, S.H. (1998). *Insecticidal and Repellent Properties of Nine Volatile Constituents of Essential Oils against the American Cockroach, *Periplaneta americana* (L.)*. Pestic. Sci., 54: 261-268
- NISHIDA, R.; TAN, K.H.; WEE, S.L.; HEE, A.K.W. & TOONG, Y.C. (2004). *Phenylpropanoids in the fragrance of the fruit fly orchid, *Bulbophyllum cheiri*, and their relationship to the pollinator, *Bactrocera papayae**. Bioch. System. and Eco. 32: 245–252.
- LADD, T. L., STINNER, B. R. & KRUEGER, H. R. (1983). *Eugenol, a new attractant for the Northern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)*. J. Econ. Entomol., 76: 1049-51.
- LEE, S.E.; LEE, B.H.; CHOI, W.S.; PARK, B.S.; KIM, J.G. & CAMPBELL, B.C. (2001). *Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.)*. Pest management science 57, 548-553.
- LEE, E.J.; KIM, J.R.; CHOI, D.R. & AHN, Y.J. (2008). *Toxicity of Cassia and Cinnamon Oil Compounds and Cinnamaldehyde-Related Compounds to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)*. J. Econ. Entomol. 101(6): 1960-1966.
- LEE, S.K.; TSAO, R. & COATS, J.R. (1997)<sup>a</sup>. *Insecticidal activities of monoterpenoid derivatives against several insect pests*. In: *Insecticidal properties of monoterpenoids and their derivatives as a new natural means of crop protection*. LEE, S.K. Iowa State University, Retrospective Theses and Dissertations, 11478(3): 51-74.
- LEE, S.K.; TSAO, R.; PETERSON, C. & COATS, J.R. (1997)<sup>b</sup>. *Insecticidal Activity of Monoterpenoids to Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae), and House Fly (Diptera: Muscidae)*. J Econ. Entomol. 90(4): 883-892.
- LIENX, E.J.; GUO, Z.R.; LI, R.L. & SU, C.T. (1982). *Use of Dipole Moment as a Parameter in Drug-Receptor Interaction and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies*. Journal of Pharmaceutical Sciences 71(6): 641-655.
- LINDSEY, E.G. (1944). *Natural sources, habitats, and reservoirs of insects associated with storeid food products*. Hilgardia 16(4):185-224. DOI:10.3733/hilg.v16n04p185.
- LOIZZO, M.R.; MENICHINI, F.; CONFORTI, F.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; SAAB, A.M.; STATTI, G.A.; DE CINDIO, B.; HOUGHTON, P.J.; MENICHINI, F. & FREGA, N.G. (2009). *Chemical analysis, antioxidant,*

*antiinflammatory and anticholinesterase activities of Origanum ehrenbergii* Boiss and *Origanum syriacum* L. essential oils. Food Chemistry, Elsevier 117:174–180.

- LONGSTAFF, B.C. (1981). *Biology of the grain pest species of the genus Sitophilus (Coleoptera: Curculionidae): a critical review*. Protection Ecology, 2: 83-130.
- LOPEZ, M.D.; CONTRERAS, J. & PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. (2010). *Selection for tolerance to volatile monoterpenoids in Sitophilus oryzae (L.), Rhyzopertha dominica (F.) and Cryptolestes pusillus (Schonherr)*. J. Stored Products Res. 46, 52–58, doi:10.1016/j.jspr.2009.09.003.
- OBENG-OFORI, D.; TORTO, B.; NJAGI, P.G.N.; HASSANALI, A. & AMIANI, H. (1994). *Fecal volatiles as part of the aggregation pheromone complex of the desert locust, Schistocerca gregaria (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae)*. J. Chem. Ecol. 20: 2077–2087.
- ODALO, J.O.; OMOLO, M.O.; MALEBO, H.; ANGIRA, J.; NJERU, P.M.; NDIEGE, I.O. & HASSANALI, A. (2005). *Repellency of essential oils of some plants from the Kenyan coast against Anopheles gambiae*. Acta Trop. 95, 210–218.
- OKIWELU, S.N.; ADU, O.O. & OKONKWO, V.N. (1987). *The effect of Sitophilus zeamais (Mots) (Coleoptera: Curculionidae) on the quality and viability of stored maize in Nigeria*. Insect Science and its Application. 8: 3, 379-384.
- OMOLO, M.O.; OKINYO, D.; NDIEGE, I.O.; LWANDE, W. & HASSANALI, A. (2004). *Repellency of essential oils of some Kenyan plants against Anopheles gambiae*. Phytochemistry 65, 2797–2802.
- ORHAN, I.; KARTAL, M.; KAN, Y. & SENER, B. (2008). *Activity of essential oils and individual components against acetyl- and butyrylcholinesterase*. Z. Naturforsch C. 63: 547–553.
- ORTEGA-NIEBLAS, M.M.; ROBLES-BURGUEÑO, M.R.; VÁZQUEZ-MORENO, L.; CORTEZ-MONDACA, E.; GONZÁLEZ-LEÓN, A.; MORALES-TREJO, A. & GONZÁLEZ-RIOS, H. (2014). *Toxic and Persistent Effect of Oregano's Essential Oil against Zabrotes subfasciatus (Coleoptera: Bruchidae) in Stored Dry Beans*. Southwest. Entomol. 39:147-161.
- ÖZTÜRK, M.; KOLAK, U.; TOPCU, G.; OKSUZ, S. & CHOUDHARY, I. (2011). *Antioxidant and anticholinesterase active constituents from Micromeria cilicica by radical-scavenging activity-guided fractionation*. Food Chemistry, Elsevier 126: 31–38.
- PARK, B.S.; CHOI, W.S.; KIM, J.H. & LEE, S.E. (2005). *Monoterpenes from thyme (Thymus vulgaris) as potential mosquito repellents*. J. Am. Mosq. Control Assoc. 21, 80–83.
- PERRY, N.S.L.; HOUGHTON, P.J.; THEOBALD, A.; JENNER, P. & PERRY, E.K. (2000) *In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes*. J. Pharm. Pharmacol., 52: 895–902.
- PHILLIPS, T. W., JIANG, X.-L., BURKHOLDER, W. E., PHILLIPS, J. K. & TRAN, H. Q. (1993). *Behavioral responses to food volatiles by two species of stored-product Coleoptera, Sitophilus oryzae (Curculionidae) and Tribolium castaneum (Tenebrionidae)*. J. Chem. Ecol. 19:723–734.
- PHILLIPS, T. W. (1997). *Semiochemicals of stored-product insects: research and applications*. J. Stored Prod. Res. 33:17–30.
- PICOLLO, M.I.; TOLOZA, A.C.; MOUGABURE CUETO, G. ; ZYGADLO, J. & ZERBA, E. (2008). *Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids*. Fitoterapia, Elsevier 79: 271–278
- PIESIK, D.; WEAVER, D.K.; RUNYON, J.B.; BUTELER, M.; PECK, G.E. & MORRILL, W.L. (2008). *Behavioural responses of wheat stem sawflies to wheat volatiles*. Agricultural and Forest Entomology, 10, pp 245–253, DOI 10.1111/j.1461-9563.2008.00380.x.
- PIMENTEL, M.A.G.; FARONI, L.R.D'A.; BATISTA, M.D. & DA SILVA, F.H. (2008). *Resistance of stored-product insects to phosphine*. Pesq. agropec. bras. 43(12), ISSN 1678-3921.
- PITT QUANTUM REPOSITORY. URL: <<http://pqr.pitt.edu/>> (Nov, 2016). Copyright © 2016, University of Pittsburgh Department of Chemistry.
- PIZZOLITTO, R.P.; BARBERIS, C.L.; DAMBOLENA, J.S.; HERRERA, J.M.; ZUNINO, M.P.; MAGNOLI, C.E.; RUBINSTEIN, H.R.; ZYGADLO, J.A. & DALCERO, A.M. (2015). *Inhibitory effect of natural phenolic compounds on Aspergillus parasiticus growth*. Hindawi PubCorp, J. of Chem., DOI 10.1155/2015/547925.

- POHANKA, M. (2011). *Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology*. Biomed.Pap.Medicine Faculty University of Palacky, Olomouc, Czech Republic. Sep, 155(3):219–230. DOI 10.5507/bp.2011.036.
- PRASANNA, S. & DOERKSEN, R.J. (2009). *Topological Polar Surface Area. A useful descriptor in 2D-QSAR*. Current Medicinal Chemistry, 2009, 16, 21-4, ISSN 0929-8673/09.
- PRICE, N. (1996). *Methyl bromide in perspective*. In: Bell CH, Price N, Chakrabarti B (Eds.), *The Methyl Bromide Issues*. Wiley, Chichester, UK, pp.1–26 (Agrochemicals and Plant Protection 1).
- RAJENDRAN, S. (2002). *Postharvest pest losses*. In: PIMENTEL, D. (Ed.), *Encyclopedia of Pest Management*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 654–656.
- RAJENDRAN, S. & SRIRANJINI, V. (2008). *Plant products as fumigants for stored-product insect control*. J. Stored Prod. Res. 44:126–135.
- RAPPOPORT, Z. (Ed.). (2003). *The Chemistry of Phenols*. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 0-471-49737-1.
- RICE, P.J. & COATS, J.R. (1994a). *Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Curculionidae: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae)*. J. Econ. Entom. 87(5): 1172-1179.
- RICE, P.J. & COATS, J.R. (1994b). *Insecticidal properties of monoterpenoid's derivatives to the house fly (Diptera: Muscidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae)*. Pestic. Sci. 41: 195-202.
- RILEY, E.D. & CURTIS E.B. (1992). *Understanding public concern about pesticides: an empirical examination*. J. of Consumer Affairs, 26(2), ISBN 0022-0078/0002-000.
- RIPIN, D.H. & EVANS, D.A. (2005). *PKa Table*. Harvard University, URL: <[http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/evans\\_pKa\\_table.pdf](http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/evans_pKa_table.pdf)>
- ROBERTS J.R. & REIGART J.R. (2013). *Recognition and management of pesticide poisonings*. Environmental Protection Agency (EPA). United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs. Sixth Edition.
- RODRIGUEZ, A.M.; DAMBOLENA, J.S. & ZUNINO, M.P. (2016). *Normalización de datos de olfatometría a dos vías para el gorgojo del maíz, Sitophilus zeamais L.* Informe de Ayudantía de Investigación (Resol. HCD 706/2015), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.
- RODRIGUEZ, A.M.; ZUNINO, M.P. & DAMBOLENA, J.S. (2017). *Innovación metodológica para ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa en insectos*. Revista Facultad de Ciencias exactas, Físicas y Naturales (en revisión), Universidad Nacional de Córdoba.
- ROY, K.; KAR, S. & DAS, R.N. (2015). *A Primer on QSAR/QSPR modeling. Fundamental concepts*. SpringerBriefs Molec. Sci., DOI 10.1007/978-3-319-17281-1.
- RYAN, M. F. & BYRNE, O. (1998). *Plant-Insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase*. J. Chem. Ecol. 14: 1965-1975.
- SANTOS, J.P.; MAIA, J.D.G & CRUZ, I.(1990). *Damage to germination of seed corn caused by maize weevil (Sitophilus zeamais) and Angoumois grain moth (Sitotroga cerealella)*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 25(12): 1687-1692.
- SALLAM, M.N.; MEJIA, D (Ed.) & BEVERLY, L. (Ed.).(1999). *Insect Damage: Post-harvest Operations*. International Information System for the Agricultural Science And Technology (AGRIS), Information Network on Post-Harvest Operations (INPhO), FAO, Post-Harvest Compendium. URL: <http://www.fao.org/3/a-av013e.pdf>
- SAUER, D. B.; STOREY, C. L. & WALKER, D. E. (1984). *Fungal populations in US farming-stored grain and their relationship to moisture, storage time, regions and insect infestation*. Phytopathology 74:1050–1053.
- SEIBER, J.N.; COATS, J.; DUKE, S.O. & GROSS, A.D.(2014). *Biopesticides: State of the art and future opportunities*. Journal of agricultural and food chemistry 62: 11613-11619.
- SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA Y MONITOREO DE PLAGAS (SiNaViMo), Arg. (2016). Base de datos fitosanitarios: *Sitophilus zeamais*. Última modificación: 14 de Junio, 2016. URL: <http://www.sinavimo.gov.ar>
- SINHA, R.N. 1973. *Ecology of storage*. Ann. Tech. Agric. 22:351-369.
- SKINNER, W. A.; JOHNSON, H. L. (1980). *The design of insect repellents*. Drug Design 10: 277–302.

- STEINER, L. F. (1952). *Methyl eugenol as an attractant for oriental fruit fly*. J. Econ. Entomol., 45: 241-48.
- SURYANARAYANA, M.V.S.; PANDEY, K.S.; PRAKASH,S.; RAGHUVVEERAN, C.D.; DANGI, R.S.; SWAMY, R.V. & RAO, K.M. (1991). *Structure-activity relationship studies with mosquito repellent amides*. J. Pharm. Sci. 80: 1055–1057.
- TOLOZA, A.C.; ZYGADLO, J.; MOUGABURE CUETO, G.; BIURRUN, F.; ZERBA, E. & PICOLLO, M.I. (2006). *Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina*. J. Med. Entomol. 43, 889–895.
- TYMAN, J.H.P (Ed.). (1996). *Studies in Organic Chemistry, Vol.52:Synthetic and Natural Phenols*. 1st ed. Amsterdam, Holanda: Elsevier Science B.V. ISBN: 0-444-88164-6.
- VISWANADHAN, V.N.; GHOSE, A.K.; REVANKAR, G.R. & ROBINS, R.K. (1989). *Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics*. J.Chem.Inf.Comput.Sci., 29(3): 163-172.
- VODA, K.; BOH, B. & VRTACNIK, M. (2004). *A quantitative structure-antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis*. J. Mol. Model. 10: 76–84.
- WALGENBACH, C.A.; BURKHOLDER, W.E.; CURTIS, M.J. & KHAN, Z.A. (1987). *Laboratory trapping studies with *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)*. J. Econ. Entomol.80:763- 767.
- WALIWITIYA, R.; ISMAN, M.B.; VERNON, R. & RISEMAN, A. (2005). *Insecticidal Activity of Selected Monoterpenoids and Rosemary Oil to *Agriotes obscurus* (Coleoptera: Elateridae)*. J. Econ. Entomol. 98(5): 1560-1565.
- WANG, Z.; SONG, J.; CHEN, J.; SONG, Z.; SHANG, S.; JIANG, Z. & HAN, Z. (2008). *QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six-member-ring*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 2854–2859.
- WANG J. L.; LI Y. & LEI C. L. (2009). *Evaluation of monoterpenes for the control of *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motschulsky*. Natural Products Research, 23: 1080-1088.
- WIGGLESWORTH, V. B. (1942). *Some notes on the integument of insects in relation to the entry of contact insecticides*. Bulletin of Entomological Research, 33(3): 205-218.
- YANG, K.; ZHOU, Y.X.; WANG, C.F.; DU, S.S.; DENG, Z.W.; LIU, Q.Z. & LIU, Z.L. (2011). *Toxicity of *Rhododendron anthopogonoides* essential oil and its constituent compounds towards *Sitophilus zeamais**.Molecules, 16: 7320.
- YILDIRIM, E.; EMSEN, B. & KORDALI, S. (2013). *Insecticidal effects of monoterpenes on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)*. J.Applied Botany and Food Quality 86: 198 - 204 , DOI:10.5073/JABFQ.2013.086.027
- YEOM, H.; KANG, J.S.; KIM, G. & PARK, I. (2012). *Insecticidal and Acetylcholine Esterase Inhibition Activity of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against Adults of German Cockroach (*Blattella germanica*)*. J. Agric. Food Chem. 2012, 60, 7194–7203
- YOON, C.; KANG, S.; JANG, S.; KIM, Y. & KIM, G. (2007). *Repellent efficacy of caraway and grapefruit oils for *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)*. J. Asia-Pacific Entomol. 10(3): 263-267.
- ZHANG, Q.H.; SCHLYTER, F.; BATTISTI, A.; BIRGERSSON, G. & ANDERSON, P. (2003). *Electrophysiological responses of *Thaumetopoea pityocampa* females to host volatiles: implications for host selection of active and inactive terpenes*. J. Pest Science 76, 103–107, ISSN 1436-5693.
- ZIAEE; M.; MOHARRAMIPOUR, S. & MOHSENFAR, A. (2014). *Toxicity of *Carum copticum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum**.J. Appl. Entomol. 138: 763-771.
- ZUNINO, M.P.; ARECO, V.A.& ZYGADLO, J.A. (2012). *Insecticidal activity of essential oils against two soybean pests: *Sternechus pinguis* and *Rhyssomatus subtilis**.BLACPMA 11, 269–277.



# ANEXOS

## Anexo I – Descripción de los compuestos empleados

Compuesto	Nomenclatura Sistemática	Tipo	Fuente Natural
<i>Fenol</i>	Hidroxibenceno	Fenol	AE's de tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> , Solanaceae) y de agujas de pino ( <i>Pinus sylvestris</i> , Pinaceae).
<i>orto-Cresol</i>	2-Metilfenol	Alquil Fenol	Productos de la degradación natural de la lignina y presente en la creosota de madera.
<i>meta-Cresol</i>	3-Metilfenol	Alquil Fenol	
<i>para-Cresol</i>	4-Metilfenol	Alquil Fenol	
<i>Timol</i>	2-Isopropil-5-metilfenol	Alquil Fenol	AE's de tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> , Lamiaceae) mejorana ( <i>Origanum majorana</i> , Lamiaceae) y de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> , Lamiaceae).
<i>Carvacrol</i>	2-Metil-5-isopropilfenol	Alquil Fenol	
<i>Guaiacol</i>	2-Metoxifenol	Alcoxifenol, derivado de Catecol	Productos de la degradación natural de la lignina, presente en la creosota de madera y en el AE's de guaiacum ( <i>Guaiacum</i> sp, Zygophyllaceae).
<i>Creosol</i>	2-Metoxi-4-metilfenol	Alcoxifenol	Es un producto de reducción de la vainillina (ver más abajo) que está presente como glicósido en las vainas verdes de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> , Orchidaceae). También está presente en la creosota de madera.
<i>Eugenol</i>	2-Metoxi-4-(2-propenil)fenol	Alcoxifenol, Fenilpropanoide	Presente en el AE's del clavo de olor ( <i>Syzygium aromaticum</i> , Myrtaceae), la nuez moscada ( <i>Myristica</i> sp, Myristicaceae) y la canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> o <i>Cinnamomum verum</i> , Lauraceae).
<i>trans-Isoeugenol</i>	2-Metoxi-4-( <i>E</i> -1-propenil)fenol	Alcoxifenol, Fenilpropanoide	Presente en el AE's de ylang-ylang ( <i>Cananga odorata</i> , Lamiaceae).
<i>Vainillina</i>	4-Hidroxi-3-metoxibenzaldehido	Aldoalcoxifenol	Presente en el AEs de vainilla ( <i>Vanilla planifolia</i> , Orchidaceae).
<i>Ácido Ferúlico</i>	Ácido ( <i>E</i> )-3-(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)propil-2-enoico	Ácido Fenólico; Ácidos hidroxicinámicos	Se encuentra presente en la pared celular vegetal y otorga rigidez estructural y resistencia al ataque de microorganismos.
<i>Estragol</i>	1-Metoxi-4-(prop-2-en-1-il)benceno	Alcoxialquilbenceno, Fenilpropanoide	Presente en el AE's de albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> , Lamiaceae) y estragón ( <i>Artemisia dracuncululus</i> , Asteraceae).
<i>trans-Anetol</i>	<i>trans</i> -1-Metoxi-4-(prop-1-enil)benceno	Alcoxialquilbenceno, Fenilpropanoide	Presente en el AE's del anís ( <i>Pimpinella anisum</i> , Apiaceae) e hinojo ( <i>Foeniculum vulgare</i> , Apiaceae)
<i>para-Cimeno</i>	4-Isopropiltolueno	Alquilbenceno, Hidrocarburo, Monoterpenoide.	AEs de comino ( <i>Cuminum cyminum</i> L., Apiaceae) y tomillo ( <i>Thymus</i> sp. L., Lamiaceae).
<i>Clorpirifós</i>	<i>O, O</i> -dietil <i>O</i> -3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato	Organofosforado	-
<i>Diclorvós (DDVP)</i>	2,2-diclorovinil-dimetil fosfato	Organofosforado	-
<i>Ácido Propiónico</i>	Ácido propanoico	Ácido carboxílico	-
<i>Reactivo de Ellman (DTNB)</i>	Ácido 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoico)	-	-
<i>Yoduro de Acetiltiocolina (AThChI)</i>	Yoduro de acetato de 2-mercapto-N,N,N-trimetiletilamina	Tioester de colina	-

Anexo II – Predictores empleados en el análisis QSAR

Nombre	Símbolo	Unidad	Descripción	Fuente
Peso Molecular	PM	g/mol	-	Datos provistos por el proveedor.
Volumen Molar	V	cm <sup>3</sup> /mol	-	(Chemspider).
Volumen Molecular	Vm	Å <sup>3</sup>	Representación del volumen englobado por la superficie abstracta a través de la cual, se supone, una molécula es capaz de interactuar con otras. En QSAR es empleado como para modelar fenómenos en el que el tamaño molecular es un factor determinante, como la capacidad de una molécula de atravesar canales transmembrana en la absorción intestinal y penetración de la barrera hematoencefálica (Molinspiration).	Cálculo <i>in silico</i> basado en fragmentos (Molinspiration)
Densidad Específica	δ	g/cm <sup>3</sup>	-	Datos provistos por el proveedor.
Tensión superficial	Ts	dina/cm	-	(Chemspider).
Número de onda (Espectroscopía IR)	λ	cm <sup>-1</sup>	Inversa de la frecuencia del pico de absorción correspondiente al estiramiento del enlace O – H del grupo hidróxilo fenólico medida en centímetros. Integra información tanto del número y tipo de sustituyente asociados al anillo fenólico como del ambiente en el que se encuentra el grupo hidroxilo y su accesibilidad (Lutz y col., 1998; Coates & Meyers, 2000; Rapoport, 2003)*.	Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada de Japón (AIST) (Kinugasa, Tanabe & Tamura).
Índice de Refracción a 20°C	n	-	Propiedad física: relación entre la velocidad de la luz en el vacío y su velocidad en un medio compuesto por la sustancia de interés pura. Se relaciona con distintas propiedades ópticas, eléctricas y magnéticas de las sustancias (Katritzky y col., 1998).	Datos provistos por el proveedor.
Punto de Fusión a 1 atm	Pf	°C	-	Datos provistos por el proveedor.
Punto de Ebullición a 1 atm	Peb	°C	-	Datos provistos por el proveedor.
Presión de vapor a 25°C	Pvap	hPa	-	(Chemspider).
Momento Dipolar	μ	Debye (D)	Momento permanente resultante de la distribución no uniforme de cargas dentro de una molécula. Como predictor integra información sobre la capacidad de un compuesto de establecer interacciones polares con otras moléculas. Se ha utilizado con éxito en el estudio de interacciones receptor-ligando, específicamente en el estudio de la actividad anticolinesterasa de carbamatos y compuestos aromáticos (Lienxs y col., 1982).	(Pitt Quantum Repository).
Constante de Disociación ácida	pKa	-	Es un parámetro fisicoquímico clave en el diseño de principios activos ya que explica una buena parte del comportamiento de las moléculas en solución e influencia numerosas características biofarmaceuticas (Manallack, 2007).	Estimación a partir de distribución parcial de cargas (Chemicalize).

			<p>Representa el volumen molar de una sustancia a la temperatura a la cual su tensión superficial es la unidad (Balasubrahmanyam, 2008). Es un importante parámetro molecular empleado como una medida de la naturaleza estérica de un átomo o grupo de átomos (Roy y col., 2015). Se calcula mediante la expresión (Exner, 1962):</p>	
<i>Parachor</i>	Par		$Par = \gamma^{1/4} \frac{PM}{\rho} = \sum Par_i$ <p>Donde <math>\gamma</math> es la tensión superficial, <math>PM</math> el peso molecular y <math>\rho</math> la densidad de la molécula.</p> <p>Este predictor es considerado como una cantidad aditiva, en el sentido que puede ser expresado como la sumatoria de los incrementos <math>Par_i</math> correspondientes a los átomos individuales o grupos dentro de la molécula (Exner, 1962).</p>	Calculado según Exner (1962)
<i>Coefficiente de Partición Octanol-Agua</i>	LogP	-	<p>Representa la lipofilidad de una molécula. Este tipo de predictores conforman una serie de propiedades fisicoquímicas que nos permiten analizar la capacidad de una molécula de interaccionar con otras fases o moléculas dependiendo de su polaridad (Klopman y col., 1994).</p> <p>Se calculan como el logaritmo en base decimal de razón de repartición de una molécula entre una fase acuosa y una fase apolar compuesta por n-octanol. El coeficiente <math>P</math> se define de la siguiente manera:</p> $P = \frac{[A]_{octanol}}{[A]_{aq}}$ <p>Usualmente se considera hidrofóbico a un compuesto cuando <math>LogP &lt; 1</math>. En el caso de que una especie química sea susceptible a sufrir una reacción de ionización, tal que:</p> $AH \rightarrow A^- + H^+$ <p>se suele utilizar el Coeficiente de Distribución ya que este tiene en cuenta las diferentes especies derivadas de esta reacción dentro de su definición:</p> $D = \frac{[AH]_{octanol} + [A^-]_{octanol}}{[AH]_{aq} + [A^-]_{aq}}$ <p>De esta ecuación se deduce que el valor de LogD varía con el aumento o descenso de la acidez ya que el grado de ionización de una molécula depende del pH de la solución, por lo que este suele medirse a pH estandarizado de 7,4 por su similitud al pH fisiológico.</p>	Cálculo <i>in silico</i> basado en incrementos atómicos (Viswanadhan y col., 1989) (Chemicalize & Molinspiration)
<i>Coefficiente de Distribución a pH=7,4</i>	LogD	-		
<i>Factor de Bioconcentración a pH=7,4</i>	BCF	-	<p>La bioconcentración es el fenómeno por el cual una sustancia química es absorbida por un organismo desde el entorno a través de su sistema respiratorio o superficies dérmicas (piel, escamas, cutícula, etc.). El BCF mide el grado de afinidad de una sustancia química por un tejido vivo. Es un parámetro utilizado en evaluaciones de riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Arnot &amp; Gobas, 2006).</p>	Correlación a partir de datos de LogP, según Mackay (1982), (Chemspider).
<i>Área Topológica de Superficie Polar</i>	SP	Å <sup>2</sup>	<p>Área que ocupan en conjunto todos los grupos polares presentes en la molécula.</p> <p>Existen numerosos métodos para su estimación y se ha empleado exitosamente en la exploración de las interacciones polares para un amplio rango de moléculas que actúan como ligandos alternativos en reacciones enzimáticas (Ertl y col., 2000; Prassana &amp; Doerksen, 2009).</p>	Cálculo <i>in silico</i> basado en fragmentos (Chemicalize).

<i>Polarizabilidad</i>	Pol	Å <sup>3</sup>	Medida de la capacidad de una molécula de formar dipolos instantáneos. Determina la respuesta dinámica de un conjunto de enlaces frente a un campo externo. Integra información sobre la estructura electrónica interna de una molécula. Puede estimarse como una propiedad aditiva de la polarizabilidad atómica ( $A_i$ )(Roy y col, 2015).	Cálculo <i>in silico</i> basado en incrementos atómicos (Roy y col., 2015) (Chemicalize).
<i>Refractividad Molar</i>	MR	cm <sup>3</sup> /mol	Medida del volumen que ocupan un átomo o un grupo de ellos. Está relacionado con la naturaleza estérica de la molécula. Se calcula mediante la siguiente ecuación (Roy y col., 2015): $MR = \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{PM}{\rho}$ Donde $n$ representa el índice de refracción, $PM$ el peso molecular y $\rho$ la densidad de la molécula.	(Chemicalize).
<i>Fracción de Insaturación</i>	Fsp3	-	Proporción de átomos que se encuentran formando parte de una insaturación dentro de una molécula.	(Chemicalize).

\* La frecuencia de vibración del enlace  $O - H$  se encuentra linealmente correlacionado con el valor de pKa para fenoles en agua, por lo que estos dos predictores no son independientes (Goulden, 1954; Bavin & Canady, 1957).

Anexo III – Valores de los predictores para cada compuesto

<i>Predictores</i>	Fenol	<i>p</i> -Cresol	<i>m</i> -Cresol	<i>o</i> -Cresol	Creosol
PM	94,113	108,138	108,138	108,138	138,164
V	87,9	104,1	104,1	104,1	128,1
Vm	94,11	108,62	108,62	108,14	134,17
δ	1,071	1,034	1,034	1,048	1,092
Ts	41	38,8	38,8	38,8	37,3
λ	3229	3322	3329	3408	3616
RfrI	1,553	1,54	1,54	1,54	1,537
Pf	41,5	33	11,5	32	5,5
Peb	181	201,5	203	191	221
Pvap	0,4	0,2	0,2	0,2	0,1
μ	1,31	1,86	1,98	1,59	1,56
pKa	9,94	10,17	10,81	10,81	10,27
Par	222	261	261	258	313
LogP (Mol)	1,46	1,91	1,88	2,33	1,73
LogP (Chem)	1,48	1,94	1,94	1,94	1,65
LogD	1,63	2,09	2,09	2,09	1,83
BCF	10,13	22,61	22,6	22,62	14,52
SP	20,23	20,23	20,23	20,23	29,46
Pol	10,94	12,7	12,7	12,71	15,21
MR	28,04	33,08	33,08	33,08	39,54
Fsp3	0	0,14	0,14	0,14	0,25

	Timol	Carvacrol	Guaiacol	Eugenol	Isoeugenol
PM	150,218	150,218	124,137	164,201	164,201
V	154,2	154,2	111,9	156,3	152,8
Vm	158,57	158,57	117,61	162,14	161,59
δ	0,965	0,9765	1,129	1,068	1,08
Ts	35	35	38,7	36,6	39
λ	3175	3372	3611	3618	3614
RfrI	1,523	1,526	1,543	1,541	1,577
Pf	50,5	2	29,5	-12	-10
Peb	232	237	205	252,5	267
Pvap	0	0	0,2	0	0
μ	1,44	1,45	1,82	1,86	1,25
pKa	10,59	10,38	9,97	10,29	10,15
Par	379	374	274	378	380
LogP (Mol)	3,34	3,81	1,3	2,1	2,38
LogP (Chem)	3,28	3,28	1,19	2,2	2,45
LogD	3,08	3,08	1,34	2,48	2,55
BCF	129,32	129,27	6,1	45,12	51,11
SP	20,23	20,23	29,46	29,46	29,46
Pol	18,16	18,16	13,45	18,73	18,81
MR	47,27	47,27	34,5	48,79	49,86
Fsp3	0,4	0,4	0,14	0,2	0,2

	Vainillina	Estragol	Anetol	(E)-Ferulato	<i>p</i> -Cimeno	
PM	152,147	148,202	148,202	194,184	134,218	
V	123,5	157,9	154,4	147,5	155,8	
Vm	136,59	154,12	153,57	172,03	150,55	
$\delta$	1,06	0,965	0,991	1,3	0,86	
Ts	47,3	30	31,9	56,2	28,5	
$\lambda$	3174	-	-	-	-	
RfrI	1,588	1,521	1,561	1,627	1,49	
Pf	82	-	21,5	172,5	-68	
Peb	330,993	215,5	233,5	372,3	177	
Pvap	0	0,2	0,1	0	1,7	
$\mu$	2,64	1,25	1,21	3,93	0,18	
pKa	7,78	.*	.*	9,98**	.*	
Par	376	359	355	409	361	
LogP	(Mol)	1,07	2,82	3,1	1,25	3,9
	(Chem)	1,19	3,15	3,17	1,64	4,02
LogD	1,14	3,14	3,08	-1,38	4,13	
BCF	3,96	142,53	130,06	1	810,27	
SP	46,53	9,23	9,23	66,76	0	
Pol	15,36	18,16	18,24	19,35	17,62	
MR	41,09	46,81	47,88	51,5	45,29	
Fsp3	0,12	0,2	0,2	0,1	0,4	

\* El valor de pKa de estos compuestos no puede estimarse debido a que no tienen grupos donadores de protones evidentes.

\*\* Se tomó el valor de pKa del grupo -OH fenólico.