



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Ciencias Biológicas



2019



**Efectos del aceite esencial de *Mentha* sp. sobre larvas
de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae)**

Tesinista: Paula Alejandra Olivera

Firma:

Directora: Dra. María Teresa Defagó

Firma:

Co-directora: Biól. Julieta Soledad Arena

Firma:

CONICET



IMBIV

Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal

**Efectos del aceite esencial de *Mentha* sp. sobre larvas de *Alphitobius diaperinus*
Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)**

TRIBUNAL EXAMINADOR

Dra. Sánchez, Mariela Eugenia

Firma:

Dr. Visintin, Andrés Mario

Firma:

Dr. Dambolena, José Sebastián

Firma:

CALIFICACIÓN:

FECHA:

Índice

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
MATERIALES Y MÉTODOS	7
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIONES	22
AGRADECIMIENTOS	22

**Efectos del aceite esencial de *Mentha* sp. sobre larvas de *Alphitobius diaperinus*
Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae)**

RESUMEN

En la búsqueda de alternativas para el manejo de plagas los aceites esenciales son una de las opciones consideradas en la actualidad. *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) conocido como “escarabajo de la cama”, constituye una de las principales plagas en sistemas de producción avícola por las pérdidas económicas que genera. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el aceite esencial (AE) de *Mentha* sp tiene efecto tóxico sobre larvas de éste coleóptero y determinar si dosis subletales afectan el desarrollo. El aceite de menta utilizado en este trabajo fue obtenido mediante destilación por arrastre con vapor de agua y posteriormente analizado en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Los compuestos principales del AE fueron mentofurano (40%), carvona (23%), 1,8-cineol (14%), mentona (8%), limoneno (5%) y pulegona (4%). Se estableció un criadero de *A. diaperinus* en el laboratorio el que se mantuvo bajo condiciones controladas (T $26 \pm 1^\circ$ C, HR $65 \pm 5\%$, en oscuridad). Para evaluar la actividad insecticida se probaron distintas concentraciones del AE a través de ensayos de contacto, fumigante e ingesta. Para las pruebas por contacto e ingesta cada solución de aceite se dispuso en papel de filtro o en media oblea de trigo respectivamente, mientras que para evaluar la acción fumigante se colocó el AE en papel de filtro fuera del alcance de las larvas. Para las experiencias se emplearon larvas de 1 cm de longitud las que fueron expuestas al AE (por las distintas vías de aplicación) durante 24 horas, posteriormente se registró la mortalidad. A partir de estos datos se calculó la concentración letal 50 (CL₅₀). En los ensayos de contacto e ingesta se obtuvo una respuesta dosis-dependiente lineal sobre la supervivencia larval, registrándose valores de CL₅₀ de 0,058 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ y 4,099 $\mu\text{l}/\text{g}$ de oblea respectivamente. Para la actividad fumigante se registró un 100% de mortalidad con la concentración de 26,7 $\mu\text{l}/\text{l}$ de aire. Para evaluar si el AE afecta el desarrollo larval se realizaron ensayos de alimentación forzada donde se les administró a las larvas media oblea de trigo tratada con dosis subletales (1,37 y 2,74 $\mu\text{l}/\text{g}$ de oblea) durante 28 días. El tiempo de desarrollo de larva-pupa y de larva-adulto fueron afectados significativamente, la supervivencia larval y los individuos que alcanzaron el estado adulto no se diferenciaron entre tratamientos. Los índices nutricionales indicarían un efecto postingestivo, ya que no fue afectada la tasa relativa de consumo, sí la tasa de

crecimiento y la eficiencia de utilización del alimento ingerido. Estos resultados sugieren que el aceite esencial de *Mentha* sp. podría ser incorporado como otra alternativa para el manejo de este insecto plaga.

Palabras clave: aceite esencial, efecto tóxico, escarabajo de la cama, contacto, fumigante, ingesta

INTRODUCCIÓN

Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae), también conocido como “escarabajo de la cama”, “gusano menor de la harina” o “escarabajo oscuro”, constituye una de las principales plagas en sistemas de producción avícola que ocasiona grandes pérdidas económicas a nivel mundial. Este coleóptero ha logrado adaptarse a los ambientes húmedos y con temperatura controlada de las instalaciones de cría de aves de corral, ocasionando problemas sanitarios y económicos (Chernaki-Leffer *et al.*, 2002). Este insecto se ha convertido en plaga y se lo encuentra durante todo el año en las granjas, es omnívoro ya que su dieta incluye el alimento balanceado de las aves, materia fecal, huevos rotos y detritos que se acumulan en la cama de las gallinas (Axtell, 1999). Se ha demostrado que actúa como vector mecánico y potencial reservorio de varios patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, virus de la leucosis aviar, enfermedad de Newcastle y Marek, influenza aviar, coccidiosis, entre otros (Axtell y Arends, 1990), favoreciendo la ocurrencia de enfermedades. La presencia de *A. diaperinus* reduce la productividad de carne y/o huevos, como así también ocasiona importantes daños en las instalaciones, provocados principalmente por las larvas que hacen túneles en distintos materiales para pupar (Despins *et al.*, 1991). Por otra parte, los pollitos que consumen larvas de estos escarabajos durante los primeros días de desarrollo muestran un bajo aumento de peso y signos de estrés (Despins y Axtell, 1995).

La mayoría de las tácticas que se emplean para manejar este coleóptero están basadas en la utilización de insecticidas químicos de “corto efecto residual” (piretroides, organofosforados, entre otros) (Gonçalves Marques *et al.*, 2013). Estos productos generalmente se aplican rociando las paredes y el piso, después de retirar los desechos y antes de colocar las aves del siguiente ciclo de producción (Axtell y Arends, 1990). Sin embargo, el ciclo de vida relativamente corto de este insecto y su comportamiento dificultan su manejo, ya que las larvas y adultos se refugian en grietas, debajo de los

comederos y suelo, cerca de las columnas que sostienen los galpones (Chernaki-Leffer *et al.*, 2002).

El uso desmedido de insecticidas sintéticos ha generado distintos problemas, como por ejemplo intoxicación de personas y animales no blanco, contaminación de aguas subterráneas, aparición de plagas secundarias (Dubey, 2011) y desarrollo de resistencia (Pimentel *et al.*, 2009, 2010). Por estos motivos es que existe un gran interés en la búsqueda de alternativas que presenten un menor riesgo para el ambiente y para la salud. Los productos botánicos, entre los que se encuentran los aceites esenciales (AEs), son una de las opciones tenidas en cuenta en la actualidad para el manejo de ciertas plagas. Esta alternativa, conocida también como “plaguicidas verdes”, cuenta con la ventaja de que se encuentran en la naturaleza, son de fácil obtención, de degradación rápida, de bajo costo y no generan residuos (Prado, 2007), y ecológicamente compatibles con el ambiente en relación a los insecticidas sintéticos (Isman y Machial, 2006). A su vez, pueden combinarse con otros métodos de control y son de baja toxicidad para el hombre y otros animales (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

Los AEs son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, cuyas características le proporcionan diversas funciones: (1) son parte de sus mecanismos defensivos contra patógenos y plagas, (2) atraen o repelen insectos, y (3) las protegen del calor o del frío (Koul *et al.*, 2008; Miresmailli e Isman 2014). Están presentes en diferentes estructuras de las plantas como flores, brotes, semillas, hojas, frutas y raíces. Por lo general estos aceites son líquidos y la mayoría pasan a estado gaseoso a temperatura ambiente sin sufrir cambios en su composición (Koul *et al.*, 2008). Los AEs, en general, están compuestos por dos grupos químicos que proceden de distintas rutas biosintéticas (Croteau *et al.*, 2000; Pichersky *et al.*, 2006). El grupo principal corresponde a terpenos y terpenoides y el otro consta de compuestos aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por un bajo peso molecular (Bakkali *et al.*, 2008).

Varios estudios revelaron que los AEs tienen el potencial de actuar como repelentes, insecticidas y/o reguladores del crecimiento sobre varias especies de insectos (Mondal y Khalequzzaman, 2011; Nenaah, 2014; Sousa *et al.*, 2014). La acción insecticida puede estar asociada a un compuesto mayoritario, pero frecuentemente los AEs completos presentan mayor bioactividad que sus componentes individuales (Isman, 2000; Akhtr & Isman, 2004; Abbassy *et al.*, 2009; Ayvaz *et al.*, 2010). En particular, sobre este coleóptero se conoce que en ensayos de contacto, fumigación y rociado,

diferentes AEs afectaron negativamente la supervivencia de larvas y adultos (Gonçalves Marques *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Arena *et al.*, 2018). También se ha reportado que la incorporación de ciertos AEs a la dieta del insecto tiene acción antialimentaria, afectando el crecimiento y desarrollo de las larvas (Szczepanik *et al.*, 2012; Szolyga *et al.*, 2014; Szczepanik *et al.*, 2017).

El género *Mentha* pertenece a la familia de plantas aromáticas Lamiaceae e incluye 25-30 especies. Las especies de *Mentha* L. son originarias de Asia Central y Medio Oriente (Harley, 1972), las cuales fueron distribuidas por los árabes durante el Medioevo por Europa y Norte de África; posteriormente fueron introducidas en América y cultivadas en regiones subtropicales (Ribeiro y Diniz, 2008). Las especies de menta tienen una gran importancia por su empleo en medicina, cosmética, industria alimenticia, etc. Tal es así que hojas, flores, y tallos de menta son usados con frecuencia en infusiones, como aditivos en mezclas comerciales de especias para dar aroma y sabor a ciertos alimentos (Kothari y Singh, 1995; Moreno *et al.*, 2002) o como remedio popular para el tratamiento de náuseas, bronquitis, flatulencia, anorexia, entre otras (İşcan *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2002). Además, es utilizada como insecticida para controlar distintos estados de desarrollo (larvicida o adulticida) aunque son escasos los estudios que abordan el efecto que el AE de menta tiene sobre el comportamiento de éstos artrópodos (Kumar *et al.*, 2011a).

El porcentaje de cada compuesto y la composición total de los AEs del género *Mentha* varía de una especie a otra y dentro de la misma especie. Algunos AEs son ricos en mentol/mentona como *Mentha piperita* (ESCOP, 1997), otros poseen carvona como *Mentha spicata* (Kokkini *et al.*, 1995) o pulegona/piperitona (Pino *et al.*, 1996; Lawrence, 1998). Esto puede deberse a factores relacionados con el ambiente, como la temperatura, la humedad relativa, la irradiación y el fotoperíodo (Chauhan *et al.*, 2009). A su vez, las prácticas de cultivo y el método de extracción también pueden provocar variaciones en el porcentaje de los compuestos y en la composición química total del aceite (Pavela, 2009). Las condiciones agronómicas y genotípicas son otros factores que afectan la composición del AE (Telci *et al.*, 2010; Angioni *et al.* 2006).

Si bien hay evidencias del uso de AEs provenientes de distintas especies de plantas sobre *A. diaperinus*, la bibliografía acerca del empleo del AE de menta sobre larvas de esta especie es escasa. Con respecto a la actividad insecticida que presentan los aceites obtenidos de especies de *Mentha* hay suficiente evidencia que apoya su uso

en el manejo de plagas, entre los que se destacan ensayos de actividad repelente y adulticida realizados con coleópteros y dípteros. Se demostró un marcado aumento en la mortalidad de adultos de distintas especies de Coleoptera (Lee *et al.*, 2001; Varma y Dubey 2001, Lee *et al.*, 2002; Al-Jabar 2006). En cuanto a la actividad larvicida se registraron altos porcentajes de mortalidad en dípteros (Ansari *et al.*, 2000; Amer y Mehlhorn, 2006; Koliopoulos *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011b). Respecto a la actividad sobre el crecimiento y la reproducción se observaron malformaciones durante la metamorfosis, inhibiendo el desarrollo larval de diferentes estadios de una especie de Bruchidae (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta que los aceites esenciales afectan una gran diversidad de insectos, en el presente trabajo se evaluó el efecto del AE de *Mentha* sp., a través de distintas formas de aplicación, sobre la supervivencia y desarrollo de larvas de *A. diaperinus*

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos biológicos del AE de *Mentha* sp. sobre larvas de *A. diaperinus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar y cuantificar la composición química del AE de *Mentha* sp.
2. Evaluar el efecto de distintas concentraciones del AE de menta por contacto, fumigante e ingesta, sobre larvas de *A. diaperinus*.
3. Estudiar los efectos de la ingesta de dosis subletales del AE de menta sobre el crecimiento y desarrollo de larvas del coleóptero.

HIPÓTESIS

El AE de *Mentha* sp. tiene efecto tóxico sobre larvas de *A. diaperinus*, y suministrado en dosis subletales afectará el consumo de alimento lo que impactará directamente en su desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría

Se estableció un criadero de *A. diaperinus* bajo condiciones controladas de temperatura $26 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa $65 \pm 5\%$ y se los mantuvo en oscuridad, siguiendo la metodología propuesta por Rice y Lambkin (2009), con modificaciones. Se

utilizaron recipientes plásticos (240 x 140 x 120 mm) en los cuales se ubicó el medio de cría compuesto por salvado de trigo (75%) y alimento balanceado para pollos de engorde (25%). En la base de cada recipiente se colocó una plancha de poliestireno de alta densidad de 20 mm de espesor, sustrato que fue empleado por las larvas para pupar. Sobre esta plancha se ubicó media manzana, para que aporte agua al medio (Figura 1a). En cada caja se ubicaron aproximadamente 80 adultos provenientes de establecimientos avícolas de la Provincia de Entre Ríos (Figura 1b).

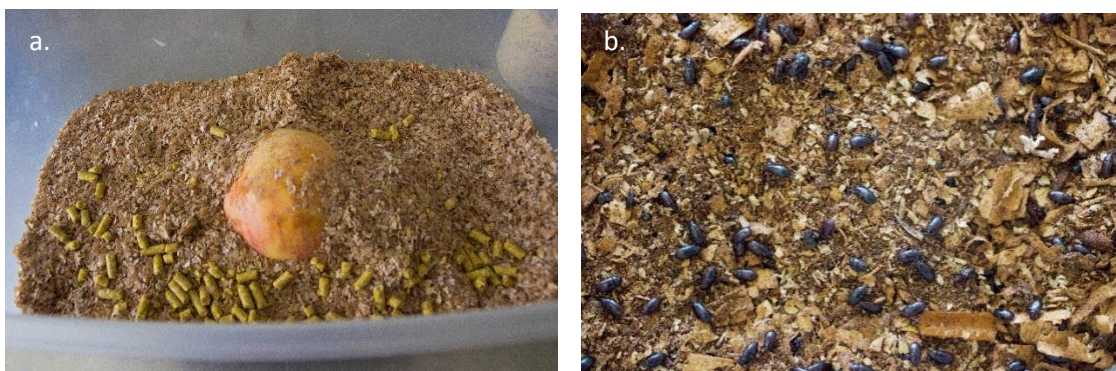


Figura 1. a.- Medio de cría para *A. diaperinus* en laboratorio. b.-. Adultos de *A. diaperinus* en el medio de cría de la granja.

Pasados cinco días, se retiraron los adultos para evitar que éstos comieran los huevos o las larvas en estadios tempranos, y para asegurar numerosa descendencia de aproximadamente la misma edad. Las larvas se mantuvieron bajo condiciones controladas, después de 25 días del inicio de cada cohorte se extrajeron aquellas larvas que reunían las condiciones para llevar a cabo los ensayos (Figura 2) (estadio VII, según el largo del cuerpo, siguiendo el criterio de Schafer da Silva *et al.*, 2005).



Figura 2. Larvas de 1 cm de *A. diaperinus*.



Figura 3. Ensayo de contacto. Base de la cápsula forrada con papel de filtro donde se aplicó el AE o acetona (control), evaporado el solvente se ubicaron las larvas.

Destilación y análisis del AE

El AE se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua a partir de hojas de *Mentha* sp., recolectada en la Ciudad de Córdoba, Argentina. El AE obtenido se

almacenó a -8°C , y fue posteriormente analizado en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) para conocer y cuantificar sus componentes. El AE se estudió utilizando dos sistemas analíticos: i) El análisis de GC se llevó a cabo utilizando un aparato Perkin Elmer 500 equipado con un FID y una columna capilar DB-5 (30 mx 0,25 mm i.d. y 0,25 μm de espesor de película). La temperatura inicial de la columna fue de 60°C durante 5 minutos y luego aumentó hasta alcanzar 250°C con un incremento de $5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, y un tiempo de mantenimiento final de 10 minutos. El inyector y detector se programaron a 250 y 280°C respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre con una velocidad de flujo de 1 ml/minuto. ii) El análisis de GC-MS se realizó utilizando un sistema Perkin-Elmer 600-SQ8 GC-MS acoplado a un analizador de cuadrupolo, bajo las mismas condiciones de GC capilar descritas anteriormente. Una muestra de 2 μl de aceite diluida en hexano en una relación de 1:100 se inyectó manualmente. Se utilizó helio como gas portador con un flujo de 0,9 ml/minuto, y la ionización se realizó por impacto de electrones a 70 eV. Los índices de retención (IR) de los componentes de la muestra de AE se determinaron usando como base una serie estándar de n-alcanos homólogos de grado analítico (C6-C18; ICN biochemical Co.). Los compuestos se identificaron comparando sus índices de retención y espectros de masas con datos publicados previamente (Adams, 1995) y con información disponible en las bibliotecas NIST y Adams. Los componentes principales se identificaron además mediante co-inyección de estándares auténticos (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Se usó fenchona como estándar interno en una concentración de 0,1 mg/ml de diclorometano. Los compuestos se cuantificaron por normalización del área del pico, y el factor de respuesta para cada componente se consideró igual a 1.

Evaluación de la actividad por contacto del AE

La toxicidad del AE de menta sobre larvas de *A. diaperinus* fue determinada mediante un bioensayo de contacto utilizando la metodología descrita por Stefanazzi *et al.* (2011), con modificaciones. Se prepararon diluciones del AE en acetona, y se aplicaron 200 μl de cada una sobre un papel de filtro colocado en la base de una placa de Petri de vidrio de 6 cm de diámetro, alcanzando concentraciones de 0,100; 0,075; 0,050; 0,025 y 0,010 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. En el caso del control se utilizó solo acetona. Luego de evaporado el solvente, se introdujeron en cada placa 10 larvas de 1 cm de largo (Figura 3). Se realizaron entre 5 y 8 réplicas por tratamiento, y a las 24 horas de iniciada la experiencia se registró el número de insectos muertos.

Evaluación de la actividad fumigante del AE

La toxicidad fumigante del AE sobre larvas de éste coleóptero se probó utilizando la metodología descrita por Wang *et al.* (2006) con algunas modificaciones. Se colocó papel aluminio y papel de filtro en la tapa (3 cm de diámetro) de frascos de vidrio color caramelo de 50 ml. Distintas cantidades del AE puro fueron aplicadas en las piezas de papel de filtro para alcanzar concentraciones de 6,7; 16,7; 26,7; 33,3 y 50 $\mu\text{l/l}$ de aire (Figura 4). En el caso del control se utilizó papel de filtro sin tratar. Diez larvas de 1 cm se colocaron en el frasco. Para evitar el posible contacto directo de las larvas con el papel de filtro, se añadió una tela de voile entre la tapa a rosca y la boca del frasco. Todos los tratamientos, así como el control, se repitieron cinco veces. La mortalidad se registró después de 24 horas de iniciado el ensayo.



Figura 4. Ensayo fumigante. Larvas expuestas a los compuestos volátiles del AE o solvente (control). Tapa con papel de aluminio, papel de filtro y tela de voile.

Evaluación de la actividad por ingesta del AE

Se evaluó la toxicidad del AE a través de la ingesta de alimento tratado con aceite. Se prepararon una serie de diluciones del AE en acetona, y se aplicó 200 μl sobre media oblea de trigo dispuesta en una placa de Petri de vidrio, alcanzando concentraciones de 10,26; 6,84; 3,42 y 1,37 $\mu\text{l/g}$ de oblea (Figura 5). Se dejó evaporar el solvente y luego se colocaron 10 larvas en cada cápsula. Como control se aplicó solo 200 μl de acetona sobre la oblea. Se realizaron 5 réplicas por tratamiento y el número de insectos muertos fue registrado a las 24 horas de iniciada la experiencia.



Figura 5. Ensayo de ingesta. Diez larvas expuestas a media oblea de trigo tratadas con AE de *Mentha* sp. o acetona (control)

Efecto de la ingesta de dosis subletales del AE

Para evaluar el efecto de la incorporación del aceite en la dieta de larvas de *A. diaperinus* se siguió la metodología descrita por Szolyga *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Una oblea de trigo se ubicó en una cápsula de petri de 6 cm de diámetro sobre la cual se aplicaron 200 µl del AE empleando una dosis subletal previamente determinada, o acetona como control. Se dejó evaporar completamente el solvente y se registró el peso inicial de las obleas tratadas. Luego fue depositada una larva (previamente pesada) de 1 cm en cada cápsula. Se realizaron entre 10 y 18 réplicas por tratamiento. El peso de las larvas y de las obleas fue registrado cada siete días, el tiempo de desarrollo hasta llegar a pupa y adulto se contabilizó dentro de los 28 días en que se llevó a cabo el ensayo. Se determinó el número de insectos que llegó a adulto, la supervivencia fue registrada diariamente. Se calculó la ganancia de peso de las larvas y el alimento consumido a los 7 días de iniciado el ensayo. Los índices nutricionales se calcularon según las fórmulas descritas por Huang *et al.* (1997), la Tasa Relativa de Crecimiento (TRCr) = $(A - B) / B \times \text{día}$, donde A es el peso de los insectos vivos en el séptimo día (mg) / número de insectos vivos en el séptimo día. B representa el peso inicial de los insectos (mg) / número de insectos al comienzo del bioensayo. La Tasa Relativa de Consumo (TRCo) = $D / B \times \text{día}$, donde D es biomasa ingerida (mg) / número de insectos vivos en el séptimo día. Eficiencia en la Conversión del alimento Ingerido = (ECI) (%) = $(TRCr) / (TRCo) \times 100$; y el Índice de Disuasión Alimentaria (IDA) (%) = $[(C - T) / C] \times 100$, donde C es el consumo de discos de control y T el consumo de discos tratados.

Análisis de datos

Los datos de mortalidad obtenidos de los ensayos de toxicidad se analizaron mediante análisis Probit, utilizando el software estadístico SPSS versión 23.0 (2015). Se calcularon las concentraciones letales 50 y 95 (CL₅₀ and CL₉₅) y sus respectivos intervalos de confianza con un nivel de probabilidad del 95%. Los datos de cantidad de alimento consumido, peso larval, tiempo de desarrollo y los índices nutricionales se evaluaron mediante análisis de la varianza (ANAVA), seguido por test de Tukey, con un nivel de probabilidad de $P < 0,05$, utilizando el software InfoStat (2018). Las probabilidades de supervivencia en función del tiempo para el ensayo de ingesta de dosis subletales se estimaron mediante el método Kaplan-Meier utilizando el paquete “survival” con el software estadístico R versión 3.5.1 (R Core Team, 2018).

El porcentaje de insectos que completó su desarrollo hasta adulto durante el tiempo de ensayo se analizó mediante un modelo lineal generalizado, usando una función de enlace “log” y distribución de los errores binomial, con el software R.

RESULTADOS

Composición química del aceite esencial

Se identificaron 17 componentes en el AE de *Mentha*. Los compuestos mayoritarios fueron mentofurano y carvona, los cuales representaron más del 60% del aceite (Tabla 1). Por su parte, 1,8-cineol y mentona estuvieron presentes en porcentajes altos respecto al resto de los componentes. En cantidades menores se encontraron limoneno y pulegona. Los componentes principales, excepto limoneno, corresponden al grupo químico de los monoterpenos oxigenados (91,53%), seguidos por los monoterpenos hidrocarburos (8,09%). El 0,38% restante corresponde a los sesquiterpenos (β -Cariofileno y β -Cubebeno).

Tabla 1. Composición química del AE de *Mentha* sp.

IR ^a	COMPONENTES	%
912	Triciclina	0,91
934	α -Pino	0,13
971	Sabineno	1,39
985	β -Mirceno	0,33
1029	Limoneno	5,34
1032	1,8-cineol	14,53
1105	Octen-1-ol (3Z)	0,05
1154	Mentona	8,36
1163	Mentofurano	39,54
1169	δ -terpineol	0,33
1171	Isoborneol	0,33
1194	α -Terpineol	0,61
1197	cis-dihidrocarvona	1,19
1238	Pulegona	3,90

1242	Carvona	22,70
1421	β -Cariofileno	0,31
1482	β -Cubebeno	0,07

^aIR: Índices de retención

Actividad insecticida por contacto

La actividad insecticida por contacto del AE de menta sobre las larvas de *A. diaperinus* fue dosis dependiente (Figura 6). El porcentaje de mortalidad promedio de larvas, expuestas a las diferentes diluciones del aceite durante 24 horas, mostró una respuesta positiva, obteniendo una mortalidad promedio del 2% con la concentración de 0,010 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ (valor mínimo), y la mayor mortalidad (98%) se obtuvo con la dosis de 0,100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

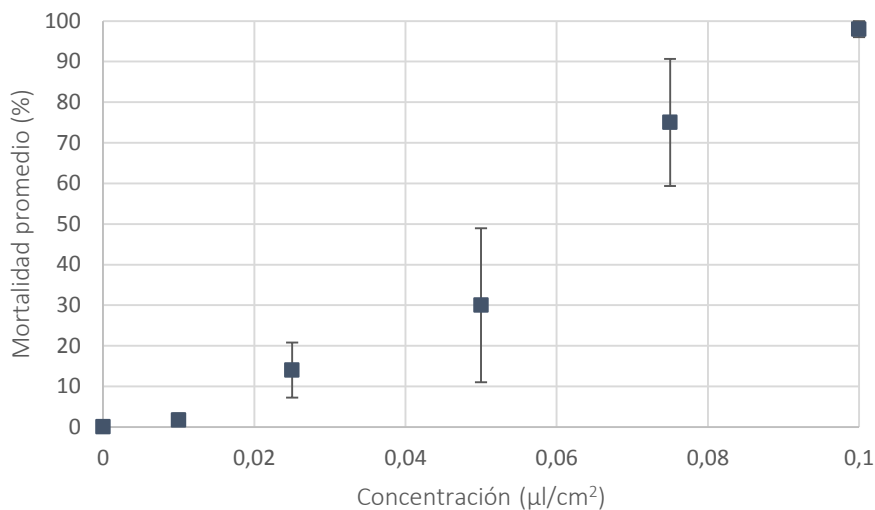


Figura 6. Mortalidad de larvas de *A. diaperinus* (promedio) tratadas por contacto con distintas concentraciones de AE de *Mentha* sp. o acetona (control). Cada punto representa el promedio de 5-8 réplicas, las barras corresponden al error estándar.

El análisis Probit arrojó valores de CL_{50} de 0,058 (0,053 – 0,062) $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ y una CL_{95} de 0,096 (0,088 – 0,108) $\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

Actividad insecticida por fumigación

La exposición a las distintas concentraciones del AE de menta mediante fumigación afectó la supervivencia de las larvas, sin embargo, con las dosis aquí empleadas la respuesta no fue lineal, por lo que no se pudo calcular la CL_{50} y CL_{95} .

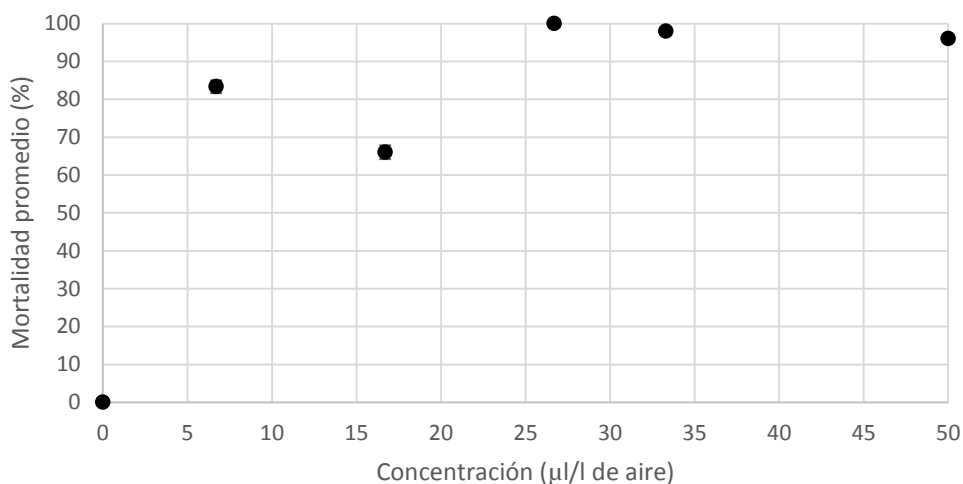


Figura 7. Mortalidad promedio de larvas de *A. diaperinus* tratadas por fumigación con diferentes concentraciones del AE de *Mentha* sp. o en ausencia del mismo (control). Cada punto representa el promedio de 5 réplicas y las barras corresponden al error estándar.

Se observó mortalidad del 100% cuando las larvas se expusieron a la concentración de 26,7 µl/l de aire, mientras que el porcentaje de mortalidad promedio fue de 66% para la dosis de 16,7 µl/l de aire (Figura 7).

Actividad insecticida por ingesta

El porcentaje de mortalidad observado en las larvas expuestas durante 24 horas al alimento tratado con el AE fue dosis-dependiente (Figura 8). El valor máximo se registró con la concentración de 10,26 µl/g de oblea, mientras que el mínimo se obtuvo con una concentración de 1,37 µl/g de oblea. En los controles no se registró mortalidad.

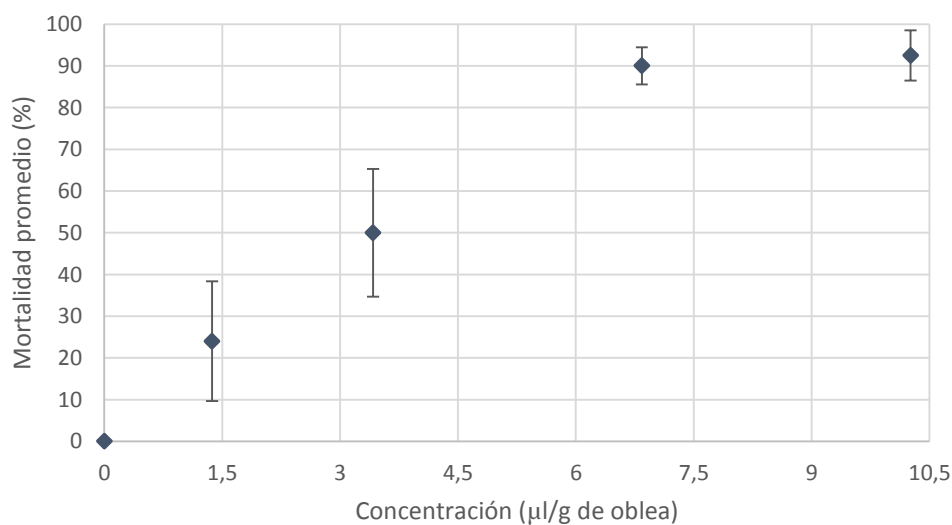


Figura 8. Mortalidad promedio de larvas de *A. diaperinus* alimentadas con obleas de trigo tratadas con diferentes dosis AE de *Mentha* o acetona (control). Cada punto representa el promedio de 5 réplicas y las barras corresponden al error estándar.

Se obtuvo un valor de CL₅₀ sobre las larvas de *A. diaperinus* de 4,099 (1,686 – 7,173) µl/g de oblea, y una CL₉₅ de 8,871 (6,247 – 20,357) µl/g de oblea.

Efecto de AE sobre el desarrollo

No se observaron diferencias significativas en la cantidad de alimento consumido en 7 días entre los distintos tratamientos y el control en el ensayo de ingesta de dosis subletales del AE ($F = 0,64$; $gl = 2$; $P = 0,53$). Tampoco se observaron diferencias en la ganancia de peso de las larvas entre tratamientos a los 7 días de comenzado el ensayo ($F = 2,58$; $gl = 2$; $P = 0,09$) (Tabla 2).

Tabla 2. Ganancia de peso y consumo de alimento para larvas de *Alphitobius diaperinus* expuestos a alimento tratado con AE de *Mentha* sp. o con solvente (control)

	GANANCIA DE PESO	ALIMENTO CONSUMIDO
CONTROL	-0,0001 ± 0,0002a	0,0041 ± 0,0006a
1,37	-0,0006 ± 0,0004a	0,0035 ± 0,0006a
2,74	-0,0009 ± 0,0002a	0,0039 ± 0,0004a

Los valores están expresados como la media ± ES. Los valores seguidos de letras iguales en la misma columna no difieren significativamente entre sí $P < 0,05$.

No hubo diferencias significativas en la probabilidad de supervivencia larval, en un periodo de 28 días, entre los tratamientos con las dosis subletales del aceite y el control ($P = 0,6$) (Figura 9).

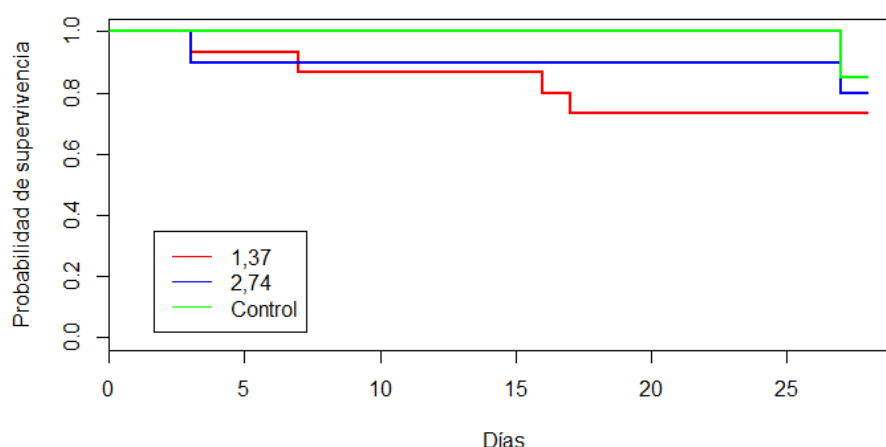


Figura 9. Probabilidad de supervivencia de larvas de *A. diaperinus* alimentadas con obleas de trigo tratadas con dosis subletales de AE (1,37 y 2,74 µl/g de oblea) o acetona (control) en un lapso de 28 días.

En cuanto al tiempo promedio de desarrollo, se registraron diferencias significativas en el número de días que necesita la larva para pasar a pupa ($F = 3,99$; gl

= 2; $P = 0,03$), como así también en el tiempo promedio que se demoran los insectos en pasar de larva a adulto ($F = 4,25$; $gl = 2$; $P = 0,02$), ambos en el tratamiento de $1,37 \mu\text{l/g}$ de oblea respecto al control (Figura 10).

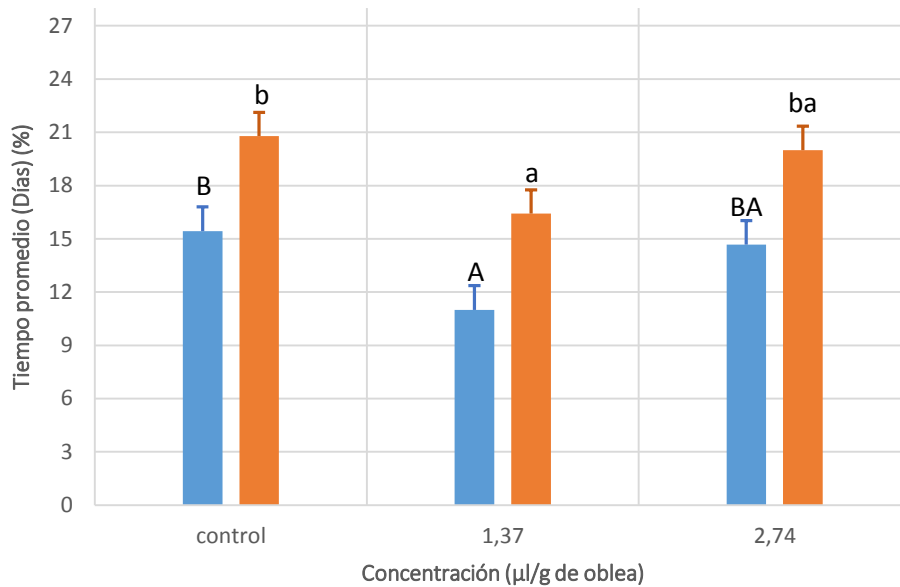


Figura 10. Tiempo promedio (en días) que necesitaron las larvas de *A. diaperinus* para pasar a pupa o adulto. Las columnas azules representan el tiempo necesario para pasar de larva a pupa, las naranjas de larvas a adultos. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos (mayúsculas para larva-pupa y minúsculas para larva-adulto). Las barras sobre las columnas indican error estándar

Si bien se registró un mayor porcentaje de insectos que alcanzaron el estado adulto en el control, después de 28 días, respecto al observado en los tratamientos con AE, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,38$) (Figura 11).

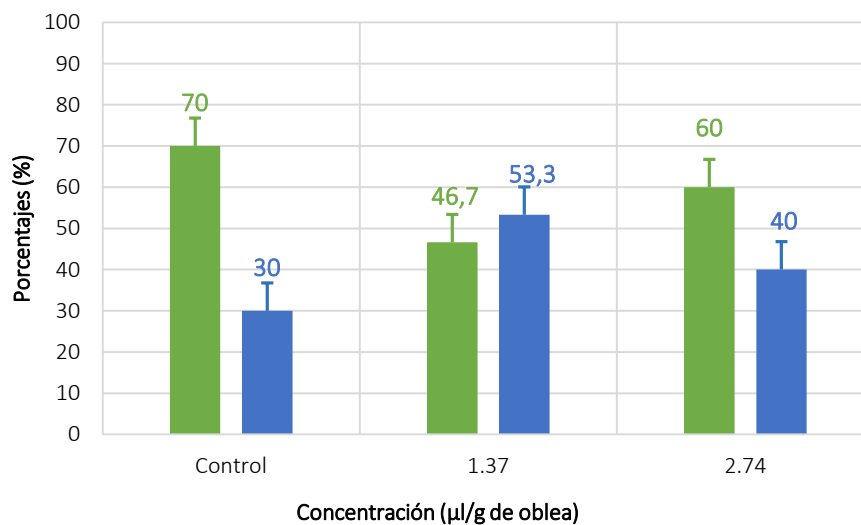


Figura 11. Porcentaje de larvas y adultos después de 28 días de exposición a obleas tratadas con solución de AE o solo acetona (control). Columnas verdes corresponden a los adultos y azules a las larvas, con sus respectivos porcentajes. Las barras sobre las columnas indican error estándar.

Los índices nutricionales (Tabla 3) muestran que la alimentación forzada sobre obleas tratadas con dosis subletales de AE afecta negativamente el desarrollo de las larvas de *A. diaperinus* después de 7 días de exposición. La tasa relativa de crecimiento (TRCr) fue 2,3 veces mayor cuando se empleó la dosis más baja respecto al control. Mientras que para la dosis de 2,74 µl/g de oblea, fue inferior al control. La tasa relativa de consumo (TRCo) no difirió entre los tratamientos. El valor de eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECI) fue similar entre el control y la concentración mínima (1,37 µl/g de oblea) y 5,3 veces menor al emplearse la mayor dosis de AE. Los valores de índices de disuasión de la alimentación (IDA), por su parte, fueron similares entre los tratamientos. Al realizar los análisis estadísticos no observamos diferencias entre los tratamientos posiblemente debido a que el número de repeticiones fue bajo.

Tabla 3. Índices nutricionales y de disuasión alimentaria para larvas de *Alphitobius diaperinus* expuestos a ½ oblea de trigo tratados con AE de *Mentha* sp. o el solvente (control)

Dosis (µl/g de oblea)	TRCr (mg/mg/día) ^a	TRCo (mg/mg/día) ^a	ECI (%) ^a	IDA (%) ^a
1,37	0,19 ± 0,281	0.33 ± 0,077	24.60	18.74
2,74	0,01 ± 0,088	0.36 ± 0,036	4.67	10.40
control	0,08 ± 0,040	0.40 ± 0,046	24.16	

^a TRCr: Tasa relativa de crecimiento; TRCo: Tasa relativa de consumo; ECI: Eficiencia de conversión de alimentos ingeridos; IDA: Índice de disuasión de la alimentación. Valores expresados como la media ± ES.

DISCUSIÓN

Extracción del aceite esencial e identificación de sus componentes

La composición química del AE empleado en este estudio, se caracteriza por altos valores de mentofurano y carvona, difiere tanto en el número de compuestos que lo integran como en el porcentaje de cada uno, en relación a lo registrado en otros trabajos donde emplearon otras especies de *Mentha*. Además, se registró mentona, 1,8-cineol, pulegona, los alcoholes y cetonas presentes pertenecen al grupo de monoterpenos oxigenados (compuestos de 10 carbonos, oxigenados), también hidrocarburos monoterpénicos (compuestos de 10 carbonos como limoneno, triciclina, α-pineno y sabineno) y sesquiterpénicos (compuestos de 15 carbonos como el β-cariofileno y cubebeno). Como mencionamos en la introducción las causas pueden ser varias, entre las que se destacan factores relacionados con el ambiente (temperatura, humedad relativa, irradiación o fotoperiodo) (Chauhan *et al.*, 2009); las prácticas de

cultivo y el método de extracción (Pavela, 2009); condiciones genotípicas y agronómicas (Telci *et al.*, 2010; Angioni *et al.*, 2006); el origen geográfico y el período de recolección de las plantas (Miguel *et al.*, 2005; Noudjou *et al.*, 2007; Oyedeji y Afolayan, 2006). Trabajos realizados en Argentina con diversas especies del género *Mentha* arrojaron un perfil químico similar, solo en cuanto a los precursores, respecto al obtenido en el presente trabajo. Meloni *et al.* (2015) en su estudio mostraron variación en la composición química del AE de *Mentha arvensis* L., relacionados posiblemente con el momento del año en que realizaron el corte de la parte aérea de la planta; ya que obtuvieron altos porcentajes de mentol, mentona e isomentona. Por su parte, menta que crece también en la provincia de Córdoba (*Mentha aff. saveolens* Ehrh), fue analizada por Velasco-Negueruela *et al.* (1996) y el AE obtenido se caracterizó por presentar como compuestos mayoritarios mentol, pulegona y mentona. Ambas especies presentaron un pequeño porcentaje de mentofurano, lo que podría deberse según Piccaglia *et al.* (1993), al fotoperiodo como principal causante de la síntesis de mentofurano o mentol, ya que comparten pulegona como precursor (Croteau *et al.* 2000). Retta *et al.* (2016) estudiaron el perfil químico de tres especies de menta, y observaron que el porcentaje de cada compuesto varía a lo largo de los años; así, *Mentha pulegium* L. fue rica en pulegona, *Mentha rotundifolia* L. presentó el quimiotipo de piperitenona y *Mentha spicata* L. mostró altos valores de carvona.

Actividad insecticida por contacto del AE de *Mentha*

Los aceites esenciales o sus componentes aislados han sido considerados como una alternativa para el control de muchos insectos, ya sean de importancia médica como agropecuaria. Las plantas aromáticas se han utilizado tradicionalmente para la protección integrada de productos almacenados; pero el interés en los aceites se renovó cuando se demostró la marcada actividad fungicida e insecticida por contacto en una amplia gama de artrópodos plagas en la década de los '90 (Isman, 2000; Stefanazzi *et al.*, 2011). La actividad insecticida por contacto del aceite esencial de *Mentha* sp. ha presentado una respuesta dosis-dependiente sobre las larvas de *A. diaperinus*. Efectos similares se obtuvieron sobre larvas de éste coleóptero cuando se emplearon aceites extraídos de *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *Eucalyptus viminalis* Labill (Myrtaceae) (Pinto-Junior *et al.*, 2010), *Cryptantha angustifolia* (Torr.) Greene (Lamiaceae) (Do Prado *et al.*, 2013), *Citrus limonum* L. (Rutaceae), *Litsea cubeba* (Lour.) (Lauraceae), *Cinnamomum cassia* Presl (Lauraceae), y *Allium sativum* L.

(Amaryllidaceae) (Wang *et al.*, 2014). Pinto-Junior *et al.*, (2010) evaluaron el efecto de aceites de sazafrán y eucalipto sobre larvas y adultos de *A. diaperinus* y vieron que las larvas fueron más susceptibles respecto a los adultos para ambos aceites.

A su vez, se han reportado efectos tóxicos del AE del género *Mentha*, sobre insectos plaga de productos almacenados; Al-Jabr (2006) corroboró la toxicidad del AE de *Mentha viridis* sobre adultos de *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae) y *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Por otra parte, el aceite de *Mentha arvensis*, con alto contenido de mentol y mentona, ha sido eficaz contra *Meligethes aeneus* (Fabricius) (Coleoptera: Nitidulidae) (Pavela, 2011).

Actividad fumigante del AE de *Mentha*

El AE como fumigante fue marcadamente tóxico para las larvas de *A. diaperinus* en todas las concentraciones empleadas. Hasta el momento no se había registrado la actividad fumigante del AE de menta sobre larvas de éste coleóptero. Los AEs de *Citrus limonum*, *Litsea cubeba*, *Cinnamomum cassia*, y *Allium sativum* tuvieron un marcado efecto tóxico por fumigación sobre larvas y adultos de *A. diaperinus* (Wang *et al.*, 2014).

Una amplia variedad de monoterpenos volátiles han demostrado ser muy tóxicos como fumigantes de insectos. Se ha explorado el potencial fumigante de algunos AEs y sus componentes mayoritarios. Carvona causa 24 veces más mortalidad cuando se aplica como fumigante que cuando es aplicado de manera tópica en estudios realizados sobre *Rhizopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae) (Tripathi *et al.*, 2003), éste compuesto también fue efectivo sobre *T. castaneum* (Ebadollahi & Sendi, 2013). Mientras que, 1,8-cineol exhibe toxicidad tanto por topicado como fumigante sobre larvas y adultos de *T. castaneum*, donde los adultos mostraron ser más susceptibles que las larvas (Tripathi *et al.*, 2001). Estos estudios demuestran la efectividad de los monoterpenos oxigenados como fumigantes, siendo éste tipo de compuestos los más abundantes en el aceite aquí utilizado.

Actividad insecticida del AE de *Mentha* por ingesta

La mortalidad de las larvas por ingesta presentó una respuesta dosis dependiente. Si bien el consumo de alimento en este ensayo no se cuantificó, sí se observó que las obleas habían sido “roídas” por las larvas. El efecto de AEs por ingesta fue medido sobre algunas especies de insectos plaga, tanto en larvas como en adultos, pero por

primera vez en este trabajo se evaluó con el aceite de menta. Canale *et al.* (2013) evaluaron la toxicidad por ingesta de tres aceites esenciales de Lamiaceae sobre adultos de *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae) encontrando altos porcentajes de mortalidad en pruebas a campo.

Actividad del AE de *Mentha* sobre el desarrollo larval e índices nutricionales

La actividad del AE de *Mentha* sp. incorporado en el alimento afectó el desarrollo larval, reduciendo el tiempo que necesitan para pasar de larva a pupa y de larva a adulto para una de las dosis evaluadas. La cantidad de alimento ingerido y el porcentaje de individuos que llegaron al estado adulto fue similar en los distintos tratamientos. Al tratarse de dosis subletales, la mortalidad no se vio marcadamente afectada entre los tratamientos a lo largo del ensayo.

La actividad de los aceites esenciales como inhibidor del desarrollo sobre coleópteros ha sido registrada por varios investigadores. Szczepanik *et al.*, (2017) empleando aceites de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) y de *Artemisia dracunculus* L. (Asteraceae) observaron que cuando se incorporaron a la dieta afectaron el desarrollo larval de *A. diaperinus*. Registraron disminuciones en los porcentajes de pupación y emergencia de adultos con el AE de *O. vulgare*, no así con el de *A. dracunculus* a la misma concentración. Cabe destacar, que estos investigadores evaluaron el efecto de los AEs sobre larvas de diferentes tamaños y observaron que las mayores, similares a las empleadas en nuestro trabajo, solo se diferenciaron del control en el peso y el número de individuos que llegó a adulto con la aplicación del AE de *O. vulgare*, en cambio las larvas jóvenes fueron significativamente afectadas (Szczepanik *et al.*, 2017). Por otro lado, éstos investigadores (Szczepanik *et al.*, 2012) evaluando el AE de tomillo observaron que, larvas del mismo tamaño a las empleadas en este trabajo, al ingerir alimento tratado con la menor dosis de aceite (1%) disminuyeron de peso en cambio las alimentadas con el 2% aumentaron de peso sin llegar a ser significativos en ninguno de los casos; estas variaciones son similares a las observadas en este trabajo. A diferencia de lo registrado en nuestros ensayos, el número de pupas y adultos sufrió una disminución significativa respecto al control. Por su parte Szolyga *et al.* (2014) no registraron diferencias en la mortalidad larval de este coleóptero ni el peso final de los adultos cuando ingirieron alimento tratado con AEs de *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae) y *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae). Khosravi & Sendi, (2013)

observaron el efecto de AEs sobre el desarrollo de las larvas de *Xanthogaleruca luteola* Müller (Coleoptera: Chrysomelidae) donde los aceites provocan un aumento en la duración del tiempo larval y pupal, cuando se emplearon las concentraciones altas, además, la emergencia de adultos disminuyó significativamente. La ingesta de AEs de tres especies de *Chrysanthemum* afectó la supervivencia larval de *T. castaneum* según el tiempo de la exposición y el origen de los AEs (hojas o flores) (Haouas *et al.*, 2012). La mayor mortalidad observada en el estado inmaduro fue atribuida a que los adultos cuentan con barreras físicas (exoesqueleto) y químicas (sistema enzimático) que los protegen de los aleloquímicos de las plantas. El efecto tóxico de los AEs, no solo está dado por la variabilidad de los patrones fitoquímicos que presentan, sino que están implicados otros factores como el punto de entrada de los compuestos que pueden ser inhalados, ingeridos o pueden atravesar el tegumento (Tripathi *et al.*, 2009). La falta de efecto nocivo registrado en larvas de mayor tamaño podría deberse a un aumento en la cantidad de grasa almacenada durante éste estado, y como los aceites son solubles en grasa esto permitiría su acumulación en esos tejidos; o pueden almacenarse en el tegumento aumentando así su grosor (Gillott, 2005).

Con el aceite de *Mentha* sp. se vio como la tasa relativa de crecimiento (TRCr) aumenta cuando se empleó la concentración más baja de aceite y disminuye con un aumento de la dosis del aceite, respecto al control. No registrar diferencias en la tasa relativa de consumo (TRCo) indicaría que estas dosis subletales no tienen ningún efecto sobre el comportamiento de alimentación, como se había propuesto en la hipótesis. En ambas concentraciones, los índices de disuasión alimentaria (IDA) muestran valores bajos, lo que se traduce a una débil/nula actividad disuasiva. Pero se observó que el valor de la eficiencia de conversión de alimento (ECI) disminuyó con la mayor concentración de aceite. La ECI es una medida general que permite inferir la capacidad de un insecto para utilizar el alimento que ingiere para crecer, la disminución de este valor indica que se está empleando para producir energía en otras rutas metabólicas y menos se está convirtiendo en biomasa. Esta disminución en el crecimiento larval es considerada por varios autores como un efecto tóxico crónico (Wheeler & Isman, 2001). En muchos casos, los componentes principales de los AE generan éste efecto sobre el crecimiento, pero no se puede ignorar el papel de los compuestos minoritarios y la interacción/es antagonista/sinérgica entre todos los componentes del AE (Don-Pedro, 1996; Regnaut-Roger, 1997; Szolyga *et al.*, 2014).

La inhibición del crecimiento de larvas de varias especies de insectos después de una aplicación de AE o sus componentes principales puede tener diferentes causas. La mayoría de ellos son repelentes o antialimentarios (Szczepanik *et al.*, 2005, 2008, 2012). Pero también pueden alterar la digestión y la absorción de nutrientes, reducir la eficiencia de conversión de los alimentos ingeridos y modificando así los índices nutricionales (Stefanazzi *et al.*, 2011; Shekari *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 1997). Algunos de los compuestos presente en nuestro AE como 1,8-cineol, carvona y dihidrocarvona, han demostrado actividad disuasiva sobre insectos plaga de productos almacenados, comportamiento no observado en este trabajo cuando se emplearon las dosis subletales. Además, 1,8-cineol tuvo un mayor efecto disuasivo (1,2 veces) sobre adultos de *T. castaneum* comparado con sus larvas (Tripathi *et al.*, 2001); así mismo Tripathi *et al.*, (2003) vieron la misma tendencia cuando evaluaron carvona y dihidrocarvona, sobre adultos *Sitophilus oryzae*, *T. castaneum*, *Rhysopertha dominica* en relación a las larvas *T. castaneum*.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que el AE de *Mentha* tiene un efecto tóxico sobre larvas de *A. diaperinus* por las tres vías de aplicación evaluadas. La incorporación del aceite a la dieta mostró cierto efecto sobre el desarrollo larval. Esto nos permite considerar que el conocimiento generado a partir de este trabajo es un primer paso para el posible desarrollo de un bioinsecticida a partir del AE de menta. Sin embargo, sería interesante realizar experimentos enfocados, por ejemplo, a la identificación de los compuestos responsables de la actividad insecticida, y determinar las interacciones sinérgicas que podrían estar ocurriendo entre componentes del aceite, a fin de lograr una formulación más eficiente para el manejo de *A. diaperinus*. En todo momento lo que se busca con el empleo de estos compuestos es mejorar la calidad del área de trabajo de los empleados de las granjas y del sitio de cría de las aves.

AGRADECIMIENTOS

A Córdoba, por ser mí casa estos 6 años.

A la UNC, la Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, por ser mí casa de estudio, de donde no solo me llevo conocimiento académico.

A mis directoras Marisa y Julieta, por brindarme un espacio donde trabajar, por la paciencia y la dedicación.

A mi mamá, porque me vio tomar mi camino y respetó cada decisión. Gracias a ella por ser la persona incondicional en mi vida.

A mi tía Esther, por estar siempre para mí.

A Mauro y Agustina, por los años de convivencia, por cada paño frío y pastilla para las migrañas.

A toda la gente que me crucé en la carrera y que hoy son amigxs, por cada palabra de aliento cuando todo era estrés y llanto, por las salidas de campo, juntadas y risas que hicieron que mi tiempo en Córdoba siempre pareciera corto hasta volver a casa.

A las familias Oliveras-Brambilla, Bordunale-Giordano, Juaneda-Allende, por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir en familia.

A Benja y Nina, por escuchar cada cosa fascinante que aprendo y les quiero transmitir.

A mi papá, por enseñarme que una partida no es más que una lección de vida que nos hace crecer un poco más.

BIBLIOGRAFÍA

Abbassy, M. A., Abdelgaleil, S. A. M., & Rabie, R. Y. A., 2009. Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131(3), 225-232.

Adams, R. P., 1995. Identification of volatile oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL. pp. 811.

Akhtr, Y., & Isman, M. B., 2004. Comparative growth inhibitory and antifeedant effects of plant extracts and pure allelochemicals on four phytophagous insect species. *Journal of Applied Entomology*, 128(1), 32–38.

Al-Jabar, A. M., 2006. Toxicity and repellency of seven plant essential oils to *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)*, 7(1), 49–60.

Amer, A. & Mehlhorn, H., 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*, 99(4), 466–472.

Angioni, A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P., 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp.

stoechas essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4364–4370.

Ansari, M. A., Vasudevan, P., Tandon, M., & Razdan, R. K., 2000. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresource Technology*, 71(3), 267–271.

Arena, J. S., Omarini, A. B., Zunino, M. P., Peschiutta, M. L., Defagó, M. T., & Zygadlo, J. A., 2018. Essential oils from *Dysphania ambrosioides* and *Tagetes minuta* enhance the toxicity of a conventional insecticide against *Alphitobius diaperinus*. *Industrial Crops and Products*, 122, 190–194.

Axtell, R. C. & Arends, J. J., 1990. Ecology and Management of Arthropod Pests of Poultry. *Annual Review of Entomology*, 35(1), 101–126.

Axtell, R. C. 1999. Poultry integrated pest management: status and future. *Integrated Pest Management Reviews*, 4(1), 53-73.

Ayvaz, A., Sagdic, O., Karaborklu, S., & Ozturk, I., 2010. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects. *Journal of Insect Science*, 10(27), 1–13.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.

Canale, A., Benelli, G., Conti, B., Lenzi, G., Flamini, G., Francini, A., & Cioni, P. L., 2013. Ingestion toxicity of three Lamiaceae essential oils incorporated in protein baits against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera Tephritidae). *Natural Product Research*, 27(22), 2091–2099.

Chauhan, R. S., Kaul, M. K., Shahi, A. K., Kumar, A., Ram, G., & Tawa, A., 2009. Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India. *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), 654–656.

Chernaki-Leffer, A., Biesdorf, S., Almeida, L., Leffer, E., & Vigne, F., 2002. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 4(3), 243-247.

Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G., 2000. Natural products (secondary metabolites), 1250-1268. In Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists: Rockville, MD.

Despins, J. L. & Axtell, R. C., 1995. Feeding behavior and growth of broiler chicks fed larvae of the Darkling Beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Poultry Science*, 74(2), 331-336.

Despins, J. L., Turner, E., & Pfeiffer, D. G., 1991. Evaluation of methods to protect poultry house insulation from infestations by lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural Entomology*, 8(3), 209-217.

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. InfoStat version (2018). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Do prado, G. P., Stefani, L. M., Da silva, A. S., Smaniotto, L. F., Garcia, F. R., & De moura, N. F., 2013. *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) susceptibility to *Cunila angustifolia* essential oil. *Journal of Medical Entomology*, 50(5), 1040-1045.

Don-Pedro, K. N., 1996. Investigation of single and joint fumigant insecticidal action of citrus peel oil components. *Pesticide Science*, 46(1), 79–84.

Dubey, N. K., 2011. Natural products in plant pest management. London, CAB International. pp. 293

Ebadollahi, A. & Sendi, J. J., 2013. A review on recent research results on bio-effects of plant essential oils against major Coleopteran insect pests. *Toxin Reviews*, 43(2), 1-16.

ESCOP, 1997. *Menthae piperitae* folium and *Menthae piperitae* aetheroleum. Monograph on the Medicinal Uses of Plant Drugs. Exeter, U.K.: European Scientific Cooperative on Phytotherapy, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.503.9>

Gillott, C., 2005. Entomology. 3rd edition. Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 834

Gonçalves Marques, C. R., Yatie Mikami, A., Pissinati, A., Boiani Piva, L., Andrade Pais Santos, O. J., & Ursi Ventura, M., 2013. Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) por óleos de nim e citronela. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6), 2565.

Harley, R. M., 1972. Notes on the genus *Mentha* (Labiatae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 65(2), 250-253.

Hauas, D., Cioni, P. L., Ben Halima-Kamel, M., Flamini, G., & Ben Hamouda, M. H., 2012. Chemical composition and bioactivities of three *Chrysanthemum* essential

oils against *Tribolium confusum* (du Val) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Pest Science*, 85(3), 367-379.

Huang, Y., Tan, J. M. W. L., Kini, R. M., & Ho, S. H., 1997. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of Stored Products Research*, 33(4), 289-298.

IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.

İşcan, G., Kirimer, N., Kürkcüoğlu, M., Başer, K. H. C., & Demirci, F., 2002. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3943-3946.

Isman M. B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8-10), 603–608.

Isman, M. B. & Machial, C. M., 2006. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Advances in phytomedicine*, 3, 29-44.

Khosravi, R. & Sendi, J. J., 2013. Toxicity, development and physiological effect of *Thymus vulgaris* and *Lavandula angustifolia* essential oils on *Xanthogaleruca luteola* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of King Saud University – Science*, 25(4), 349-355.

Kokkini, S., Karousou, R., & Lanaras, L., 1995. Essential oil of spearmint (carvone rich) plants from the island of Crete (Greece). *Biochemical Systematics and Ecology*, 23(4), 425–430.

Koliopoulos, G., Pitarokili, D., Kioulos, E., Michaelakis, A., & Tzakou, O., 2010. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha*, *Salvia*, and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*. *Parasitology Research*, 107(2), 327-335.

Kothari, S. K., & Singh, U. B., 1995. The effect of row spacing and nitrogen fertilization on scotch spearmint (*Mentha gracilis* Sole). *Journal of Essential Oil Research*, 7(3), 287–297.

Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G. S., 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*, 4(1), 63–84.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S., 2011a. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802–817.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S., 2011b. Repellent, larvicidal and pupicidal properties of essential oils and their formulations against the housefly, *Musca domestica*. *Medical and Veterinary Entomology*, 25(3), 302-310.

Lawrence, B. M., 1998. Progress in essential oils. *Perfumer-and-Flavorist*, 23, 63–68.

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(6), 548–553.

Lee, B. H., Lee, S. E., Annis, P. C., Pratt, S. J., Park, B. S., & Tumaalii, F., 2002. Fumigant toxicity of essential oils and monoterpenes against the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 5(2), 237–240.

Meloni, D. A., Arraiza, M. P., Garay, F., Silva, D. M., Abdala, G., David, R. N., Jose Vicente Lopez, J. V., & Beltran, R. E., 2015. Biomass and essential oil yields of cornmint (*Mentha arvensis* L.) grown in the irrigation area of Río Dulce, Santiago del Estero, Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 27(2), 148-152.

Miguel, M. G., Duarte, F., Venancio, F., & Tavares, R., 2005. Variation in the main components of the essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8162 – 8168.

Miresmailli, S., & Isman, M. B., 2014. Botanical insecticides inspired by plant-herbivore chemical interactions. *Trends in Plant Science*, 19(1), 29–35.

Mondal, M. & Khalequzzaman, M., 2011. Ovicidal Activity of Essential Oils against Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Bio-Science*, 17, 57-62.

Moreno, L., Bello, R., Primo-Yúfera, E., & Esplugues, J., 2002. Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh. *Phytotherapy Research*, 16(S1), 10–13.

Nenaah, G. E., 2014. Chemical composition, toxicity and growth inhibitory activities of essential oils of three *Achillea* species and their nano-emulsions against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Industrial Crops and Products*, 53, 252–260.

Noudjou, F., Kouninki, H., Ngamo, L. S. T., Maponmestsem, P. M., Ngassoum, M., Hance, T., Haubruge, E., Malaisse, F., Marlier, M., & Lognay, G. C., 2007. Effect of Site Location and Collecting Period on the Chemical Composition of *Hyptis*

spicigera Lam. an Insecticidal Essential Oil from North-Cameroon. *Journal of Essential Oil Research*, 19(6), 597-601

Oyedepi, O. A. & Afolayan, A. J., 2006. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil isolated from South African *Mentha longifolia* (L.) subsp. *capensis* (Thunb.) Briq. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 57-59.

Pavela, R., 2009. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products*, 30(2), 311–315.

Pavela, R., 2011. Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against of the pollen beetle, *Meligethes aeneus* (Fabricius) adults. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 888–892.

Pichersky, E., Noel, J. P., & Dudareva, N., 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311(5762), 808–811.

Piccaglia, R., Dellacecca, V., Marotti, M., & Giovanelli, E., 1993. Agronomic factors affecting the yields and the essential oil composition of peppermint (*Mentha x piperita* L.). *Acta Horticulturae*, 344, 29–40.

Pimentel, M. A. G., Faroni, L. R. D., Guedes, R. N. C., Sousa, A. H., & Tótoia, M. R., 2009. Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 45(1), 71–74.

Pimentel, M. A. G., Faroni, L. R. D., Silva, F. H. da, Batista, M. D., & Guedes, R. N. C., 2010. Spread of phosphine resistance among brazilian populations of three species of stored product insects. *Neotropical Entomology*, 39(1), 101–107.

Pino, J. A., Rosado, A., & Fuentes, V., 1996. Chemical Composition of the Essential Oil of *Mentha pulegium* L. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*, 8(3), 295–296.

Pinto-Junior, A. R., Carvalho, R. I. N., Pellico-Netto, S., Weber, S. H., Souza, E., & Furiatti, R. S., 2010. Bioatividade de óleos essenciais de sassafrás e eucalipto em cascudinho. *Ciênc Rural*, 40(3), 637-643.

Prado, G. P. 2007. Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de *Cunila angustifolia* Benth (Lamiaceae) sobre *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Comunitária Regional de Chapecó. Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Chapecó.

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Regnault-Roger, C., Ribodeau, M., Hamraoui, A., Bateau, I., Blanchar, P., Gil-Munoz, M. I., & Barberan, F. T., 2004. Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*, 40(4), 395-408.

Regnault-Roger, C., Vincent, C., & Arnason, J. T., 2012. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual Review of Entomol*, 57(1), 405–24.

Retta, D. S., González, S. B., Guerra, P. E., van Baren, C. M., Di Leo Lira, P., & Bandoni, A. L. (2016). Essential oils of native and naturalized Lamiaceae species growing in the Patagonia region (Argentina). *Journal of Essential Oil Research*, 29(1), 64–75.

Rice, S. J. & Lambkin, T. A., 2009. A new culture method for lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. *Journal of Applied Entomology*, 133(1), 67-72.

Ribeiro, P. G. F. & Diniz, R. C., 2008. Plantas aromáticas e medicinais; cultivo e utilização. Londrina (Brasil). Instituto Agronomico do Parana. pp 218.

Schafer da Silva, A., Hoff, G., Doyle, R. L., Santurio, J. M., & Gonzalez Monteiro, S., 2005. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratório. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(2), 177-181.

Shekari, M., Sendi, J. J., Etebari, K., Zibae, A., & Shadparvar, A., 2008. Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on nutritional physiology and enzyme activities of elm leaf beetle, *Xanthogaleruca luteola* Mull. (Coleoptera: Chrysomellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91(1), 66–74.

Sousa, R. M. O. F., Rosa, J. S., Silva, C. A., Almeida, M. T. M., Novo, M. T., Cunha, A. C., & Fernandes-Ferreira, M., 2014. Larvicidal, molluscicidal and nematocidal activities of essential oils and compounds from *Foeniculum vulgare*. *Journal of Pest Science*, 88(2), 413–426.

Stefanazzi, N., Stadler, T., & Ferrero, A., 2011. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science*, 67(6), 639–646.

Szczepanik, M., Szumny, A., Grudniewska, A., & Wawrzęczyk, C., 2005. Feeding deterrent activity of α -methylenelactones against the lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus* Panzer). *Pestycydy*, 4, 25-32.

Szczepanik, M., Dams, I., & Wawrzęczyk, C., 2008. Terpenoid lactones with the p-menthane system as feeding deterrents to the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128(2), 337-345.

Szczepanik, M., Zawitowska, B., & Szumny, A., 2012. Insecticidal activities of *Thymus vulgaris* essential oil and its components (thymol and carvacrol) against larvae of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). *Allelopathy Journal* 30(1), 129-142.

Szczepanik, M., Walczak, M., Zawitowska, B., Michalska-Sionkowska, M., Szumny, A., Wawrzęczyk, C., & Brzezinska, M. S., 2017. Chemical composition, antimicrobial activity and insecticidal activity against the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) and *Artemisia dracunculus* L. essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(2), 767–774.

Szołyga, B., Gniłka, R., Szczepanik, M., & Szumny, A., 2014. Chemical composition and insecticidal activity of *Thuja occidentalis* and *Tanacetum vulgare* essential oils against larvae of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 151(1), 1-10.

Telci, I., Demirtas, I., Bayram, E., Arabaci, O., & Kacar, O., 2010. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). *Industrial Crops and Products*, 32(3), 588-592.

Tripathi, A. K., Prajanpati, V., Aggarwal, K. K., & Kumar, S., 2001. Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1, 8-cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(4), 979–983.

Tripathi, A. K., Prajapati, V., & Kumar, S., 2003. Bioactivity of l-carvone, d-carvone and dihydro-carvone towards three stored product beetles. *Journal of Economic Entomology*, 96(5), 1594–1601.

Tripathi, A. K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M., & Bhattacharya, P. R., 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 1(5), 52–63.

Varma, J. & Dubey, N. K., 2001. Efficacy of essential oils of *Caesulia axillaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 68(3), 207–210.

Velasco-Negueruela, A., Pérez-Alonso, M. J., Esteban, J. L., García Vallejo, M. C., Zygadlo, J. A., Guzmán, C. A., & Ariza-Espinar, L., 1996. Essential Oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi and *Mentha off. suaveolens* Ehrh., Grown in Córdoba, Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 8, 81-84.

Wang, J., Zhu, F., Zhou, X. M., Niu, C. Y., & Lei, C. L., 2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 42(3), 339–347.

Wang, X., Li, Q., Shen, L., Yang, J., Cheng, H., Jiang, S., Jiang, C., & Wang, H., 2014. Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. *Journal of Insect Science*, 14(1), 75-76.

Wheeler, D. A. & Isman, M. B., 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 98(1), 9-16.