



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y
NATURALES.
CATEDRA DE QUIMICA ORGANICA Y PRODUCTOS
NATURALES.

Titulo de la Tesina: “Productos bioactivos desde los residuos de la industria cerealera”.

Alumno: Octavio F. Re.

Directora: Dra. Romina P. Pizzolitto.

**“Productos bioactivos desde
los residuos de la industria
cerealera”**

Tribunal examinador:

Dra.

Firma:.....

Dr.

Firma:.....

Dr.

Firma:.....

Calificación:.....

Fecha:

1. Introducción	1
Objetivo general y objetivos específicos	12
Hipótesis y predicciones	12
2. Materiales y métodos	14
2.1. Material vegetal	14
2.2. Insecto	14
2.3. Especie Fúngica	14
2.4. Obtención de los productos bioactivos a partir de la cascarilla de arroz	15
2.5. Fraccionamiento químico de las cascarillas	15
2.5.1. Fracción compuestos lipídicos	15
2.5.2. Fracción compuestos fenólicos	16
2.6. Bioensayos	19
2.6.1. Actividad insecticida por contacto	19
2.6.2. Actividad insecticida por topicación	19
2.6.3. Test de atracción-repelencia	20
2.6.4. Actividad antifúngica	21
2.6.4.1. Preparación del inóculo fúngico	21
2.6.4.2. Evaluación del crecimiento fúngico	22
2.7. Análisis estadístico	23
3. Resultados	24
3.1. Obtención de los productos bioactivos	24
3.1.1. Fracción compuestos lipídicos	24
3.1.2. Fracción compuestos fenólicos	26
3.2. Bioensayos	27
3.2.1. Actividad insecticida	27
3.2.2. Test de atracción-repelencia	27
3.2.3. Actividad antifúngica.	28
4. Discusión	31
5. Conclusiones	37
6. Bibliografía	38

1. Introducción

El alimento siempre fue una necesidad básica para el desarrollo de la vida en el planeta, su obtención presentó dificultades para todos sus habitantes, ya sea por exposición a predadores, competencia intra o interespecífica o simplemente por el costo energético que se invierte para llegar al recurso.

Actualmente, el problema de mayor impacto por y para la humanidad viene dado por el aumento de tamaño de las poblaciones. Se sabe que la población mundial alcanzó 7.200 millones en 2014, y se espera que para el año 2050 haya aumentado más de 2.000 millones (Organización de las Naciones Unidas, 2014). Esto lleva a un aumento en la producción de alimentos, lo que hará que proporcionalmente se extienda la frontera agrícola, el uso de sustancias nocivas y a su vez la generación de residuos, siendo cada vez menor el patrimonio natural y nativo que conservaremos en el planeta. Esta problemática se intensifica aún más cuando se desconoce qué hacer con los desechos generados, por falta de instrumentos y/o conocimientos, de manera tal que se generan conflictos económicos y ambientales que apuntan directamente a las industrias. Es entonces de suma importancia que la industria de los alimentos crezca, pero aún más importante es disminuir el impacto ambiental originado por la eliminación directa de los residuos de esta y otras industrias, siendo un tema muy discutido y de gran importancia en la actualidad (Kumar et al., 2017).

Una de las industrias alimenticias de mayor participación e importancia a nivel global, es la del arroz. Este cereal ocupa el segundo lugar en la producción mundial después del maíz, generándose en promedio unas 756,7 millones de toneladas por año, equivalentes a 502,2 millones de toneladas de arroz elaborado y listo para consumo. En porcentajes de producción los primeros en encabezar el listado son países orientales tales como China, Filipinas, Indonesia, Vietnam y Tailandia, que en conjunto registraron un total de 684,2 millones de toneladas producidas, equivalentes al 90,4% de lo generado mundialmente en el año 2016. África alcanzó las 31 millones de toneladas (4,1%) a fines del mismo año y América, con una participación de algo menos de 6% del total mundial, llegó a 45,5 millones de toneladas siendo los

principales productores Brasil, Estados Unidos, Perú y Colombia, en menor proporción, Ecuador, Argentina, Venezuela y Uruguay (Figura 1). En Argentina el arroz se cultiva en las Provincias de Santa Fe, Chaco, Formosa, Corrientes y Entre Ríos, que durante el año 2015 aportaron, a la producción mundial un total de 1,5 millones de toneladas (Figura 2) (Moreno, 2016).

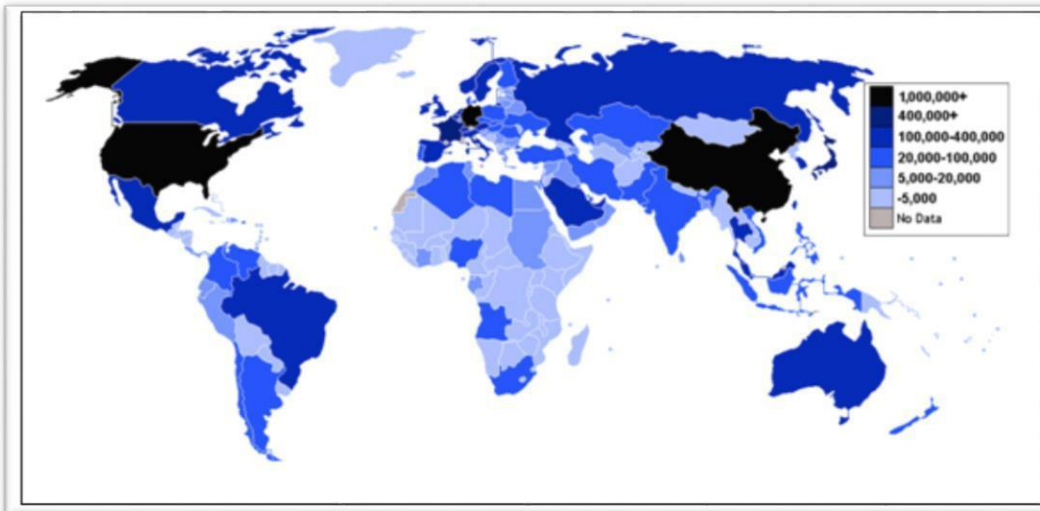


Figura 1. Detalle de exportación de arroz en toneladas por cada región.

Fuente: es.actualitix.com/pais/wld/arroz-paises-exportadores

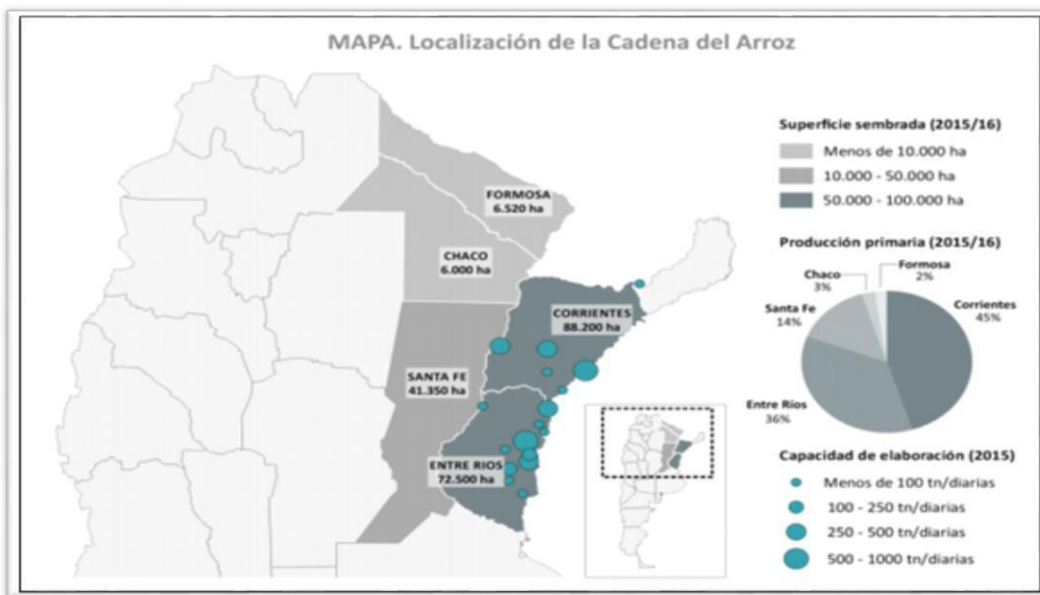


Figura 2. Cultivo de arroz en Argentina.

Fuente: www.bolsacer.org.ar

Este grano es la base alimenticia de muchos países de oriente y muy consumido globalmente pero a su vez es uno de los productos agrícolas que más residuos genera antes de estar preparado para su introducción al mercado y posterior consumo humano. El desecho más abundante es la cascarilla que queda luego del trillado en los molinos. En un primer momento, luego de la recolección, el arroz recibe la denominación “Praddy” que refiere a su estado previo al consumo, equivalente a llamarlo, “verde”. Luego de aplicar procesos de separación y secado, comienza la trilla. Durante la trilla la gluma es eliminada de los granos, quedando por un lado el arroz cargo o pardo (descascarillado) que en términos de rendimiento equivale a un 70% de lo cosechado, el porcentaje restante se corresponde en un 20% a la cascarilla, 8% salvado de arroz y 2% germen de arroz (Hoed et al., 2006).

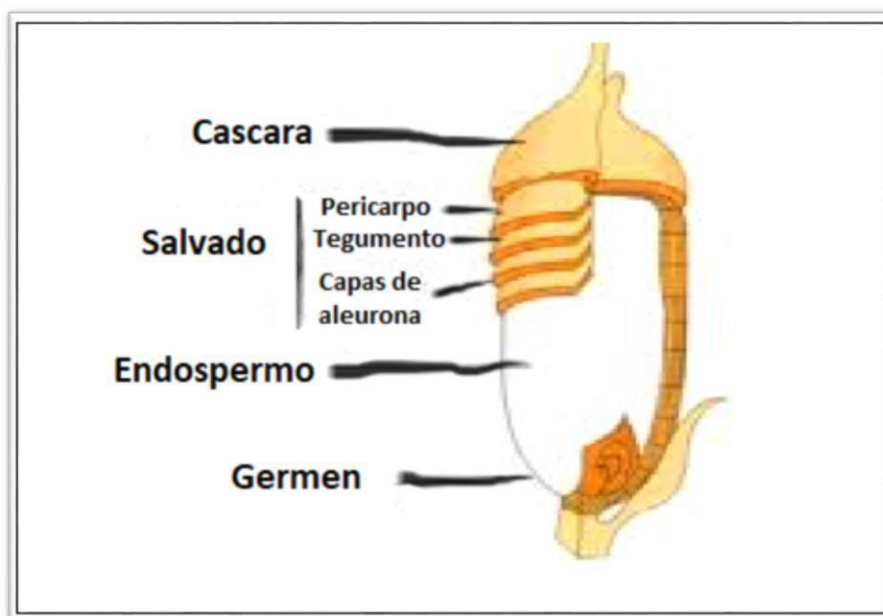


Figura 3. Grano de arroz sin tratamiento.

Fuente: <http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/semillas>. Año 2013

En la actualidad el salvado y el germen de arroz se recogen como un subproducto, siendo a veces acompañado por arroz partido, que se corresponde a los granos que se rompen durante la molienda. Como se aprecia en la Figura 3, estos productos secundarios se corresponden al pericarpio, tegumento, capas de aleurona y adherido al endospermo está el germen. Todas estas partes son ricas en grasas (12-18%),

almidón (21-28%), proteínas constituidas por aminoácidos esenciales, abundante fósforo (1,35%), el cual está en mayor parte en fitatos (90%) y son una buena fuente de vitamina B y D (Gallinder et al., 2003) relación presente en peso húmedo. Rodeando a estas estructuras está la cascarilla, de consistencia quebradiza, abrasiva, cuyo color varía de pardo rojizo a púrpura oscuro, su densidad es baja y por su alto contenido de sílice (20%) es poco biodegradable (Camargo, 2005). Además la cáscara de arroz contiene un sistema de defensa antioxidante, que incluye compuestos grasos y polifenólicos, para proteger los materiales internos de la desecación y del estrés oxidativo (Esa et al., 2013).

Dada la baja tasa de degradación y gran acumulación de este residuo, han sido muchas las alternativas propuestas para aprovechar la cascarilla en diversos campos, con la aplicación de distintas metodologías para poder lograr materiales o recursos que se utilicen de manera inmediata y directa o a través de etapas que viabilicen el uso posterior del residuo (Mafla, 2009., Vargas et al., 2013). Las experiencias más relevantes son:

- | | |
|---|--|
| A. Obtención de etanol por vía fermentativa. | filtrante para aguas residuales. |
| B. Tostado para su uso como sustrato en el cultivo de flores. | G. Obtención de materiales adsorbentes. |
| C. Generación de energía (ladrilleras, secado de arroz y cereales) | H. Fuente de sustancias químicas. (carboximetilcelulosa de sodio, dióxido de SiO ₂ , Nitruro de silicio, furfural). |
| D. Combustión controlada para uso como sustrato en cultivos hidropónicos. | I. Producción de aglomerados. |
| E. Obtención de concreto, cemento y cerámicas. | J. Material aislante. |
| F. Aprovechamiento en compostaje y como lecho | K. Cama de avicultura y en transporte de ganado. |

(Aguilar, 2009)

En el presente trabajo se tomó como alternativa el uso de las cascarillas de arroz para obtener compuestos químicos con el fin de determinar sus efectos contra plagas que aparecen durante el almacenamiento de maíz en silos.

Actualmente, como se aprecia en la Figura 4, el maíz es uno de los cereales más

cultivados a nivel mundial, generándose aproximadamente 700 millones de toneladas por año (Ranum & Pe, 2014). En Argentina la producción de este cereal se incrementó aproximadamente en un 45%, convirtiéndose en los últimos años en uno de los cultivos de mayor importancia nacional junto con la soja y el trigo. Cerca del 65% del maíz producido en nuestro país es exportado, siendo Argentina el 3º exportador a nivel mundial. A nivel local, Córdoba, es la provincia de mayor producción de maíz, aportando un 38% a la producción nacional (Maizar, 2015).

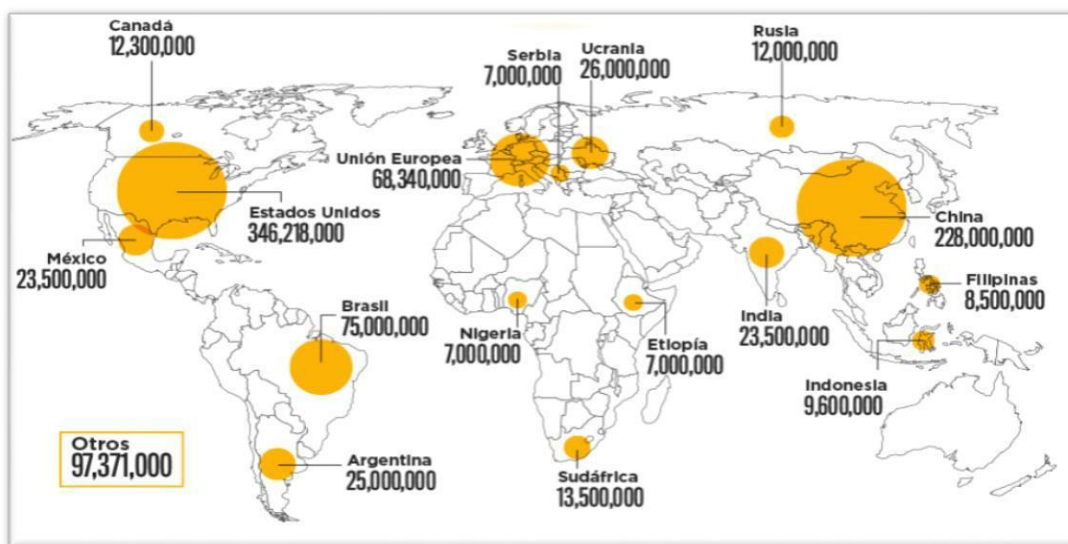


Figura 4. Producción mundial de maíz en toneladas durante el año 2015.

Fuente: elnuevodiario.com (producción mundial de maíz por país)

Un silo es un sistema artificial generado por el hombre para conservar los granos antes de comercializarlos o consumirlos, y es parte integrante del ciclo de acopio de la agricultura. Los alimentos almacenados son dañados por un gran número de plagas, las cuales producen pérdidas importantes tanto de características cualitativas como cuantitativas. Dentro de un silo existe la posibilidad de encontrar un gran número de interacciones biológicas, tales como grano-hongo, grano-insecto y hongo-insecto las cuales pueden generar grandes pérdidas económicas debido al deterioro de la calidad del grano y la presencia de micotoxinas por parte de la micoflora presente (Cox & Collins, 2001). Entre las principales plagas que se encuentran en los granos de maíz almacenados en Argentina se destacan insectos como *Sitophilus*

zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) y hongos filamentosos como *Fusarium verticillioides* (García et al., 2007).

El género *Sitophilus*, incluye otras especies de gorgojos reconocidas como importantes plagas de granos almacenados y sus productos, como el gorgojo del arroz, *Sitophilus oryzae* (L.) y el gorgojo del trigo, *Sitophilus granarius* (L.).

Sitophilus zeamais conocido vulgarmente como gorgojo del maíz (Figura 5), es el mayor responsable de los problemas que ocurren en el almacenamiento de este grano, afectando entre el 15% y 25 % del mismo en zonas subtropicales; en regiones tropicales donde la humedad relativa es mayor, el porcentaje de pérdidas aumenta considerablemente, llegando a ser equivalentes al 50% de lo almacenado (Taque et al., 2003). El daño puede traducirse en muerte del embrión, pérdida de la germinación y disminución del contenido de proteínas, aceite y almidón, lo que afecta su valor nutritivo y comercial. Por otro lado el ataque de este insecto es la puerta de entrada a plagas secundarias como *Tribolium* y otras infecciones fúngicas o bacterianas (Yuya et al., 2009; Pizarro et al., 2013).

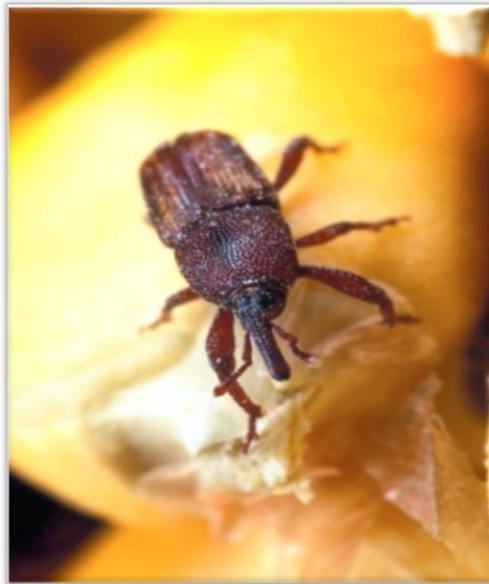


Figura 5. *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)

Fuente:(Gale, 1993)

Sitophilus zeamais es holometábolo, en otras palabras tiene metamorfosis completa,

presentando 4 estadios a lo largo de su ciclo vital (Figura 6), todos dependientes del grano de maíz. Su ciclo de metamorfosis dura aproximadamente 36 días a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y $69 \pm 3 \%$ humedad relativa y vive entre 3 y 4 meses (FAO, 1974).

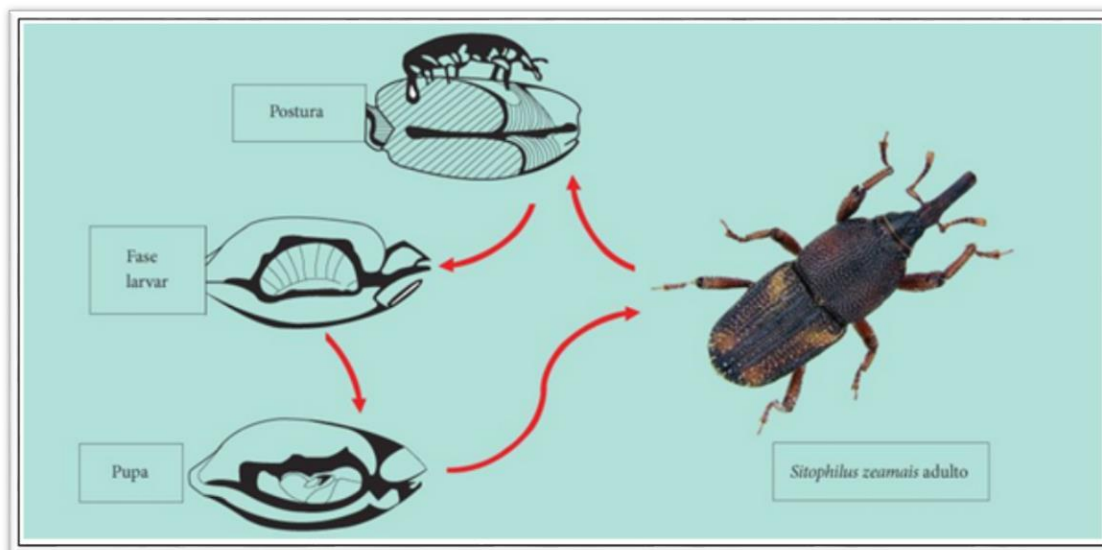


Figura 6.Ciclo de vida de *Sitophilus zeamais*.

Fuente: www.agronecios.eu (plagas de los cereales) 2011.

Morfológicamente, los huevos de *S. zeamais* se caracterizan por ser de color blanco opaco y por su diminuto tamaño, rara vez se los observa ya que se encuentran en el interior del grano. Las larvas ápodas, barrenadoras, presentan cuerpo blanco y grueso y cabeza pequeña de color marrón claro. La Pupa es blanca a los primeros días y cerca de la eclosión muestra una tonalidad de marrón claro, siendo más notable la presencia de una probóscide larga hacia el interior y patas dobladas hacia el cuerpo. Hacia finales del ciclo, los adultos miden entre 2,5 y 4 mm de largo y son de color marrón-rojizo en un principio y marrón oscuro a la madurez, cuerpo cilíndrico y alargado, cabeza prolongada en un pico o probóscide curva y delgada, sus alas funcionales usadas más que nada para propulsión (Narro, 2009).

Con su aparato bucal la hembra perfora los granos de maíz y ovipone, 1 huevo por postura, luego cubre la perforación con un mucilago a modo de protección. Más de una hembra puede oviponer en cada grano de maíz, sin embargo, solo una larva llegará a desarrollarse hasta adulto debido al canibalismo entre ellas (Bastida, 2016).

Al cabo de 3 a 7 días emerge la larva, que luego pasará por 4 estadios larvales hasta comenzar a construir el cocón, con desechos y secreciones, y pasará al estadio de pupa. Luego de 3 a 6 días el adulto emerge del cocón pero permanece dentro del grano por varios días hasta que su cutícula se endurece. Una vez que emergen del grano las hembras se desplazan a la superficie del acopio de granos y segregan feromonas sexuales para atraer a los machos y nuevamente repetir el ciclo (Nukenine, 2010).

Sitophilus zeamais se lo coincidiera un vector de hongos filamentosos como *Fusarium verticillioides*, quien tendrá su desarrollo favorecido debido a la susceptibilidad generada en los granos gracias al insecto (Barney et al., 1995; Mejía, 2003.). Este género fúngico tiene distribución mundial. Generalmente se lo encuentra asociado a cultivos de maíz, pudiendo estar alojado en cualquier órgano de la planta, lo que lo convierte en uno de los principales patógenos a campo y un gran limitante de la productividad debido a las pérdidas generadas en sitios de almacenamiento (Doraly et al., 2006). Este patógeno es capaz de causar la muerte de los tejidos hospedantes; luego, sobrevive como saprofito en el rastrojo hasta adquirir un estado de latencia. Durante los períodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biotrofa, de manera tal que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables y dependiendo de factores tales como la virulencia de la cepa, el genotipo y la etapa de desarrollo del maíz, esta plaga puede comportarse como un organismo necrótrofo que infecta los tejidos del cultivo, a tal punto que provoca la descomposición de las estructuras vegetales, siendo la mazorca uno de los principales blancos (Torre Hernández et al., 2014) (Figura 7).

El alto grado de incidencia de *F. verticillioides* sobre las plantas y los granos de maíz viene dado en parte por las distintas formas del hongo para llegar a su hospedador. Una de ellas conocida como forma sistemática ocurre durante la germinación de los granos de maíz, ya que como se mencionó antes las esporas pueden permanecer en estado de latencia, lo que puede ocurrir dentro o fuera de los granos, hasta que las condiciones sean favorables y permitan la continuación del ciclo infeccioso (Murillo

et al., 1999). Otra vía de llegada es por factores abióticos, como agua o viento que son agentes transportadores de propágulos, estos se depositarán sobre el área cultivada llegando en muchas ocasiones al cuerpo de la planta. Aquellas que caigan sobre el estigma de la mazorca germinarán e ingresarán al interior del organismo hospedador (Duncan et al., 2010).



Figura 7. Espiga de maíz infectada por *F. verticillioides*.

Fuente: <http://herbariofitopatologia.agro.uba.ar>

Una tercera forma de colonización por parte del hongo, conocida como infección mecánica, viene dada por el transporte de las conidias por otros seres vivos, tal es la relación que existe entre este hongo y *S. zeamais* (Torre Hernández et al., 2014; Brito et al., 2019). *Fusarium verticillioides* es considerado uno de los principales productores de toxinas contaminantes de tejidos y granos de maíz (Dambolena et al., 2008). La liberación de micotoxinas descompone los tejidos vegetales (Arias et al., 2016), y además genera alteraciones tanto en la salud humana como animal. *Fusarium verticillioides* es el principal productor de las micotoxinas denominadas fumonisinas (Moss, 1998).

Fumonisin B₁ (FB₁) es el diéster del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico, 2-amino-12,16-dimetil 3, 5,10,14,15 pentahidroieicosano, es la más abundante (70%) y, desde el punto de vista toxicológico, la más estudiada. Fumonisin B₂, FB₃ y FB₄ son menos frecuentes y difieren estructuralmente de la FB₁ en el número y ubicación de grupos hidroxilo en la molécula, en el caso de la FB₂ la ausencia del grupo hidroxilo en el C-10 y en FB₃ en el C-5 (Humpf & Voss, 2004)

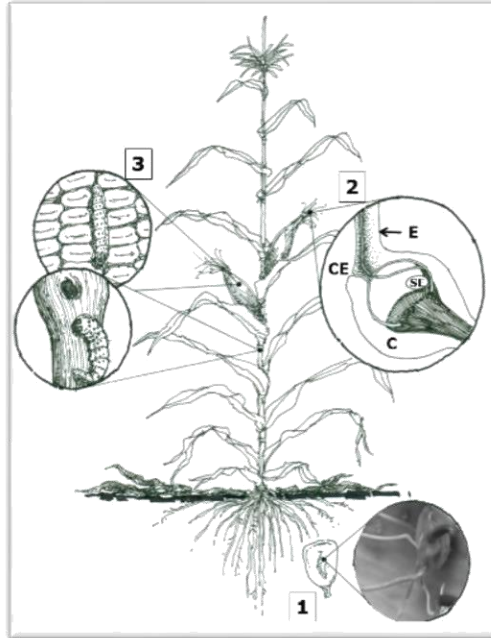


Figura 8. Rutas de entrada de *Fusarium verticillioides* a la planta de maíz. 1. Infección sistémica de plántulas. 2. Infección a través del E: estigma, CE: canal estilar, C: carpelo, SE: saco embrionario. 3. Infección mecánica. (Torre hernández et al., 2014).

La Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC), ha clasificado a la FB₁ dentro del grupo 2B, en el cual se encuentran compuestos posiblemente carcinógenos para humanos, ya que existen evidencias que las asocian con el aumento de la incidencia de cáncer de esófago en Sudáfrica, China, NE de Italia y SE de Estados Unidos (Torres & Lopez, 2010).

Está claro que la llegada de una especie favorece la presencia de otra, es por ello que se han conseguido buenos resultados con la exclusión física del insecto, ya que sin él no aparece la plaga secundaria.

El control químico es la estrategia más prevalente, a pesar de no ser siempre efectiva (Mejía, 2003). Esta se lleva a cabo con la aplicación de insecticidas sólidos como organofosforados o carbamatos y fumigaciones directas sobre los granos almacenados utilizando bromometano o fosfina. El gorgojo es muy sensible al efecto de estas sustancias como también lo es a piretroides y al diclorodifeniltricloroetano (DDT), ambos compuestos clasificados como de segunda generación debido a su origen sintético y su actividad neurotóxica. En el caso de los piretroides, son ésteres derivados del ácido crisantémico y actúan aumentando la

permeabilidad de los canales sodio; al igual que el DDT, ambos generan hiper excitabilidad por la inhibición del neurotransmisor GABA (Ponce et al., 1991), el mismo efecto de hiper excitabilidad viene dado por compuestos organofosforados o carbamatos debido a la inhibición de la enzimas acetilcolinesterasa (Houghton & Howes, 2006). Pero el uso de estos compuestos en muchas ocasiones es desmedido, lo que se traduce a un mal manejo de los mismos, apareciendo consecuencias tales como problemas ambientales debido a que perduran en la naturaleza y adoptan formas que no pueden ser degradadas, tal es el caso de los compuestos organofosforados (Romero et al., 2012) y no sólo eso, si que no también pueden perjudicar la sanidad del producto almacenando, corriéndose riesgos de salud en el consumidor final. Otro caso es del gas fosfina el cual es extremadamente tóxico tanto para insectos como para humanos y otros animales, es también corrosivo y capaz de auto encenderse (Abadía et al., 2013). Otro inconveniente que se ha reportado es el desarrollo de resistencia por parte de las plagas (Staetz, 2012) y más específicamente en Argentina desde los años 70 se viene anunciando sobre especies de *Sitophilus* resistentes a principios activos (Dyte, 1974). 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 que eleva innecesariamente los costos de producción.

A pesar de la prevalencia del tratamiento químico, existen diversas estrategias para el control de plagas durante el almacenamiento entre las que se destacan el control de temperatura, el nivel de oxígeno, la humedad relativa del ambiente, métodos que conducen hacia un manejo integrado de plagas (MIT), técnicas donde el uso de plaguicidas es la última opción. Los fundamentos de la MIT proponen incorporar diferentes estrategias y prácticas de control para limitar el daño de las plagas de la forma más económica posible, al mismo tiempo que preserva la inocuidad del grano y minimizando el impacto ambiental, dentro de estos principios, los productos naturales podrían jugar un rol importante en la persecución de este objetivo

(Abadía et al., 2013).

En vista de los problemas con los actuales agentes pesticidas, existe un interés mundial enfocado en estrategias alternativas, que incluyen el desarrollo o la búsqueda de nuevas sustancias químicas amigables con el ambiente.

Por lo tanto, las actividades principales de este trabajo están basadas en la problemática de los residuos generados en la industria del arroz, en la presencia de plagas dentro de los silos de almacenamiento de maíz y el uso de pesticidas sintéticos.

Palabras claves: Arroz, Maíz, *Sitophilus zeamais*, *Fusarium verticillioides*.

Objetivo general

Evaluar la biomasa residual de la industrialización de granos de arroz como fuente de productos bioactivos.

Objetivos específicos

1. Evaluar a escala laboratorio la actividad biológica de la biomasa residual de la industrialización de granos de arroz, como insecticida contra *Sitophilus zeamais*.
2. Determinar el efecto de los principios bioactivos obtenidos de la biomasa residual sobre aspectos conductuales de *S. zeamais*.
3. Evaluar la capacidad antifúngica contra *Fusarium verticillioides* de la biomasa residual de la industrialización de granos de arroz.

Hipótesis y predicciones

En la biomasa residual de la industrialización de los granos de arroz se pueden encontrar moléculas con propiedades insecticidas, repelente y antifúngicas. Se

espera encontrar en la fracción de los lípidos compuestos con propiedades insecticidas (Aider et al., 2016; Samuel, et al., 2015), mientras que en la fracción fenólica, se espera que presente propiedades antifúngicas (Dambolena et al., 2008).

2. Materiales y métodos

2.1. Material vegetal

Las cascarillas de arroz fueron provistas por “La Cooperativa arrocera de Villa Elisa” (Entre Ríos, Argentina).

2.2. Insecto

Se utilizaron adultos de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleóptera: Curculionidae) cepa proveniente de Metán, Salta, Argentina. *Sitophilus zeamais*, fueron criados en contenedores de plásticos herméticamente cerrados. La dieta de cría consistió en granos de maíz libres de insecticida, esterilizados con frío (- 4°C).

La colonia creció a temperatura y humedad controladas (28°C y 60-70%) con un régimen de luz/oscuridad de 12:12h (FAO, 1974).

Los experimentos se llevaron a cabo en completa oscuridad, a 28°C y 60-70% humedad relativa (HR). Los adultos que se utilizaron no se diferenciaron por sexo ni por edad.

2.3. Especie fúngica

Los inóculos fúngicos fueron preparados con la cepa *Fusarium verticillioides* M3125 (Sacc) Nirenberg (*F. moniliforme* Sheldon teleomorph *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito y Kimura) (Leslie & Summerel, 2006) provistos por Dr. Robert Proctor, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Servicio de Investigación Agrícola, Centro Nacional para la Investigación de la Utilización Agrícola, Peoria IL, Estados Unidos.

2.4. Obtención de los productos bioactivos a partir de cascarillas de arroz

A partir de las cascarillas de arroz se extrajeron los compuestos con disolventes orgánicos verdes aceptados por la normativa europea REACH (<http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/reglamento-reach/>) y seleccionados en base a la naturaleza del compuesto (ej. acetato de etilo, acetona, etanol).

Para la obtención de la fracción lipídica de las cascarillas de arroz se utilizó un equipo de extracción constituido por un recipiente de 500 mL dentro del cual se colocaron 50 g de la cascarilla de arroz y 250 mL de éter de petróleo 60-80, la mezcla permaneció en oscuridad durante 24h. Luego de ese tiempo, las cascarillas se filtraron y dejaron secar para así separarlas del solvente. Una vez que el residuo fue deslipidizado se lo utilizó para hacer la extracción de la fracción fenólica de las cascarillas. Las mismas cascaras se colocaron en el equipo de extracción anterior durante 24h, utilizando 250 mL de una solución compuesta por etanol:agua (80:20 v/v) como solvente de extracción. Pasado el tiempo establecido de interacción entre las cascarillas y el solvente, se filtraron y dejaron secar.

La obtención de los productos deseados y la recuperación de los disolventes orgánicos se realizaron mediante evaporación en un rotavapor a 60°C, garantizando así la obtención de un producto puro libre de disolventes.

2.5. Fraccionamiento químico de las cascarillas

2.5.1. Fracción de compuestos lipídicos

Identificación por GC-MS

La identificación de los componentes presentes en los extractos de ceras se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Clarus SQ 8T GC (Perkin Elmer). La metodología utilizada fue la reportada por Nawrot et al. (2010) con algunas modificaciones. Se utilizó una columna Perkin Elmer Elite 5MS (30 m X 0,25 mm x 0,25 mm de espesor). La temperatura se programó a una velocidad de 4 °C /min y la corrida comenzó desde los 40 °C hasta un máximo de 320 °C, seguido de una

corrida isotérmica de 20 min. Se usó helio como vehículo y la temperatura del inyector fue de 300 °C sin fraccionamiento de la columna.

El espectrómetro de masas se equipó con una fuente de ionización electrónica calibrada a 70 eV, a una temperatura de 230 °C y la temperatura de la interfaz fue de 280 °C con un retraso del disolvente de 6 minutos.

Los espectros de masas se registraron desde m/z 45-400 unidades de masa atómica (amu) en el modo de exploración completa. La identificación de los compuestos se llevó a cabo utilizando la biblioteca NIST2005.

2.5.2. Fracción de compuestos fenólicos

Separación por cromatografía en columna

Los fenoles totales obtenidos, se fraccionaron por cromatografía sólido líquido en columna utilizando Sephadex-L20 como agente de separación. Se diluyeron 10 g de Sephadex-L20 en 25 mL de etanol. Una vez formada dicha solución, se la colocó en el interior de una columna de separación, una vez seca la solución se lavó con etanol. Luego, se sembró 1 mL de fenoles totales.

Este sistema permitió separar los compuestos en base al tamaño de las moléculas que los constituyen (Figura 8). Las fracciones obtenidas se secaron mediante el uso de un evaporador rotatorio, el cual se configuró a 60 °C.

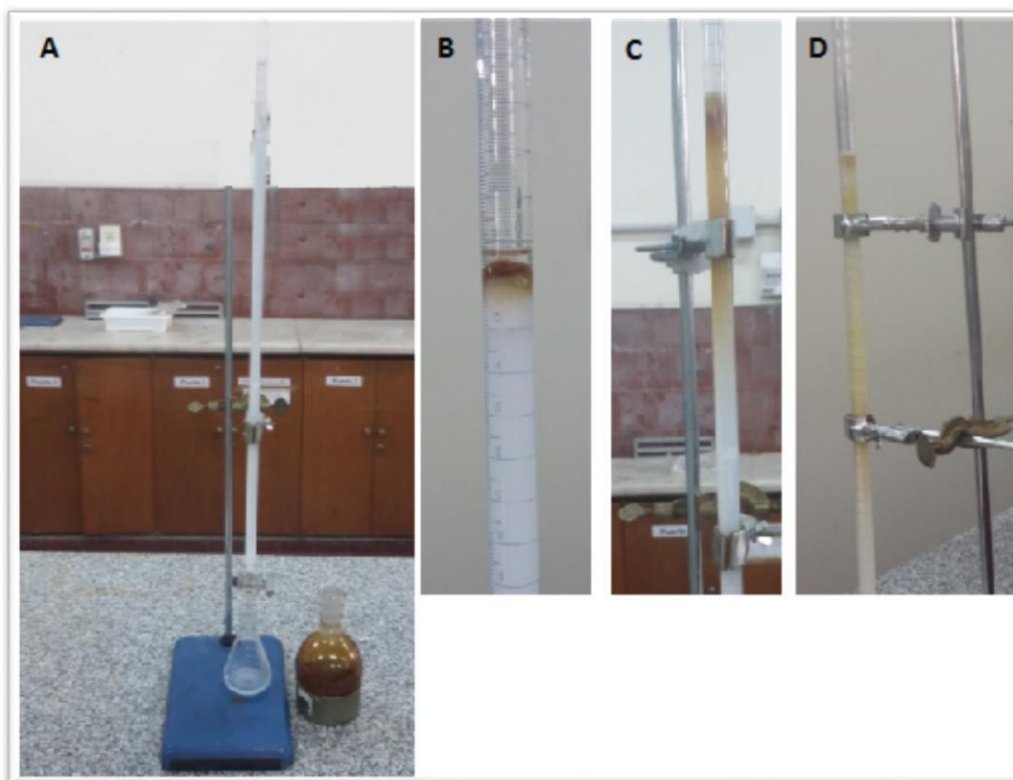


Figura 8. Columna de cromatografía sólido – líquido, distintas fases de separación. **A)** Lavado. **B)** Siembra. **C y D)** Separación.

Identificación por HPLC-MS

Los extractos fenólicos se redisolieron en etanol/agua (8:2 v/v) a una concentración final de 50 mg/mL, se filtraron con un filtro Whatman (0,22 μ m) y se colocaron en un vial color ámbar hasta su análisis por cromatografía líquida de alta precisión.

La composición de los extractos se determinó empleando un Sistema Dionex Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, San José, CA, EE. UU.), equipado con un detector de diodos acoplado a un detector de masas de ionización por electropulverización (LCDAD-ESI/MSn).

La separación cromatográfica se logró con una columna Waters Spherisorb S3 ODS-2C18 (3 m, 4,6 mm x 150 mm, Waters, Milford, MA, EE. UU.) termostaticada a 35 °C. La fase móvil utilizada fue: (A) ácido fórmico al 0,1% en agua, (B) acetonitrilo. El gradiente de elución establecido fue isocrático 15% B (5 min), 15% B a 20% B (5 min), 20–25% B (10 min), 25–35% B (10 min), 35–50% B (10 min), y reequilibrio de la columna, utilizando un caudal de 0,5 mL / min. La detección se llevó a cabo en el DAD utilizando 280 y 370 nm como longitudes de onda seleccionadas y en un espectrómetro de masas (MS) conectado al sistema HPLC a través de la salida de la célula DAD. La detección de MS se realizó en modo negativo, utilizando un espectrómetro de masas Linear Ion Trap LTQ XL (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EE. UU.) Equipado con una fuente ESI. El nitrógeno sirvió como gas envolvente (50 psi), el sistema se operó con un voltaje de rociado de 5 kV, una temperatura de fuente de 325 °C, un voltaje capilar de -20 V. El desplazamiento de la lente del tubo se mantuvo a un voltaje de -66 V. El escaneo completo cubrió el rango de masa desde m/z 100–1500. La energía de colisión utilizada fue de 35 (unidades arbitrarias). Los compuestos fenólicos se identificaron comparando sus tiempos de retención, UV-vis y espectros de masas con los obtenidos a partir de compuestos estándar o información obtenida con los datos disponibles publicados en la literatura. Para el análisis cuantitativo, se construyó una curva de calibración para cada estándar fenólico disponible en base a la señal UV. Los resultados se expresaron como g/g de extracto.

Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Huang & Ng (2012).

Se realizaron diluciones seriadas de ácido gálico, las cuales permitieron construir una curva de calibración para cuantificar el contenido de fenoles totales en los extractos obtenidos a dos longitudes de onda diferentes, 725 y 750 nm.

Para ello, se colocaron 100 μ L de cada dilución de ácido gálico en diferentes tubos, por otro lado 100 μ L de cada dilución de fenoles y como tubo blanco se utilizaron 100 μ L de etanol.

Luego, a cada tubo se le agregó: 900 μ L de agua destilada y 0,5 mL de solución Folin-Ciocalteu diluida (1:1). Pasado 1 min, se colocaron en cada tubo 2,5 mL de carbonato de sodio (20% P/V) y se dejó reposar 40 minutos cada preparado. Finalmente, se realizaron las mediciones correspondientes utilizando un espectrofotómetro y los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (GAE) mg de ácido gálico/100 mL solución.

2.6 Bioensayos

2.6.1. Actividad insecticida por contacto

La evaluación de la actividad insecticida por contacto sobre *S. zeamais* con los extractos de las cascarillas de arroz se llevaron a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Herrera et al (2015 a). Se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los extractos, utilizando n-hexano para la parte lipídica y etanol la parte fenólica colocándose una concentración de 63,6 mg/cm². Alícuotas de 0,5 mL de cada dilución fueron aplicadas en discos de papel de filtro de 9 cm de diámetro los cuales se colocaron en la base de las cápsulas de Petri (9 cm de diámetro). Después de evaporado el solvente durante 2 min, 10 adultos de *S. zeamais* fueron colocados en las placas de Petri para cada una de las réplicas de tratamiento y control. Se llevaron a cabo cinco réplicas por tratamiento. La mortalidad se determinó después de 24 horas de exposición a 28°C en oscuridad.

2.6.2. Actividad insecticida por topicación

La evaluación de la actividad insecticida por topicación de los extractos lipídicos y fenólicos se llevó a cabo aplicando en el dorso de los gorgojos 1 mg/ μ L de cada

muestra por separado. Como control se utilizaron hexano y etanol. Para cada tratamiento se utilizaron 10 insectos por réplica, los cuales luego fueron situados en capsulas de Petri. La mortalidad se determinó después de 24 horas de exposición a 28°C en oscuridad.

2.6.3. Test de atracción-repelencia

La respuesta fisiológica de *S. zeamais* a las extracciones fenólicas y lipídicas, se determinaron de acuerdo a la metodología propuesta por Herrera et al., (2015 b) utilizando un olfatómetro de dos vías. Brevemente, los equipos utilizados constituidos por dos Erlenmeyers de vidrio de 250 mL, conectados mediante un tubo de vidrio de 30 cm x 1 cm de diámetro con una perforación central de 1 x 1 cm equidistante a los dos recipientes. Los extremos del tubo se colocaron ajustadamente a través de tapones conectados a los Erlenmeyer. La zona de unión tapones-Erlenmeyer fue sellada aplicando film, para evitar la fuga de gases. Dentro de cada recipiente se colocó un papel de filtro, en uno de los Erlenmeyer se incorporó la solución fenólica o lipídica a una concentración de 2,14 mg/L, y en el otro el solvente en el que se diluyó la correspondiente muestra, siendo hexano para los fenoles y cloroformo para las ceras (frasco control). Los recipientes se cerraron herméticamente quedando apoyados en una estructura de sostén para evitar movimientos y asegurar la estabilidad. Una vez construido el sistema de experimentación, se colocaron 20 adultos de *S. zeamais* en el centro del tubo a través del orificio central, que posteriormente fue tapado con papel de filtro y sellado con cinta de papel, con el fin de estudiar el comportamiento gregario frente a un estímulo químico (figura 9). Los dispositivos se mantuvieron dentro de una estufa en condiciones de oscuridad a una temperatura de 28 °C y 70 % de HR, durante una hora y media. Al finalizar dicho tiempo, se registró el número de insectos correspondientes en cada frasco. Se realizaron cinco réplicas por dosis en diferentes días, los insectos se utilizaron una sola vez. Todos los experimentos fueron llevados a cabo entre las 10:00 am y 4:00 pm.

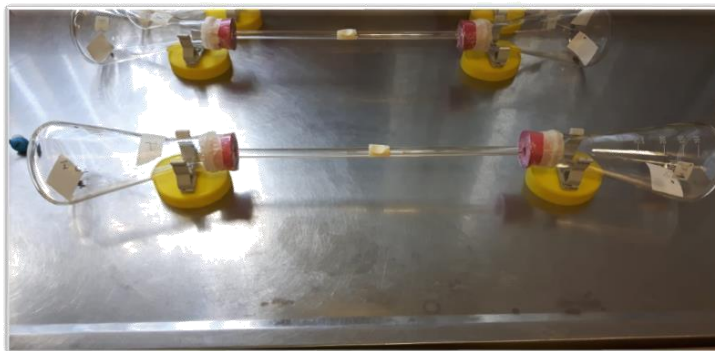


Figura 9. Olfatómetro de dos vías.

El índice de respuesta (IR) se calculó usando la siguiente ecuación:

$$IR = \left(\frac{T - C}{T_{Tot}} \right) \times 100 \text{ (Phillips et al., 1993)}$$

Donde T es tratamiento, C control y Tot el total de tratamientos realizados.

2.6.4. Actividad antifúngica

2.6.4.1. Preparación del inóculo fúngico

El inóculo fue preparado según la técnica descrita por Dambolena et al. (2008). La cepa de *F. verticillioides* M3125 se cultivó en agar-Czapek y fueron incubadas a 28 °C durante siete días. A las placas con la cepa fúngica desarrollada, se les agregó una solución acuosa estéril de Tween 80 (2,5 %) y su superficie fue frotada con espátula de Drygalsky con el objeto de remover los conidios fúngicos. La suspensión resultante se transfirió a un tubo cónico estéril, el cual fue vigorosamente agitado en un vortex durante 15 segundos. La concentración de conidias se ajustó a 1×10^6 conidias/ml a través de recuento en hemocitómetro.

2.6.4.2 Evaluación del crecimiento fúngico

Para la determinación de la actividad antifúngica de los extractos fenólicos y lipídicos contra *F. verticillioides* M3125, los medios de cultivo (Czapek-dox agar) fueron esterilizados en autoclave a 121° C durante 15 min, y posteriormente enfriados en baño termostatzado a 45-50° C. Luego, los extractos fueron agregados al medio de cultivo disueltos en dimetil sulfoxido (DMSO) en el caso de los lípidos y etanol para los fenoles, en cantidades adecuadas para obtener concentraciones finales de 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 ppm.

Para el caso de los fenoles se probó el extracto total (FT) y las 3 fracciones (fracción I, fracción II y fracción III) obtenidas por cromatografía solido-liquido en columna. En el caso de los lípidos sólo se probó la fracción pura. Como controles se utilizaron placas con medio de cultivo sin el agregado de las fracciones, con DMSO o etanol por separado.

Luego, las placas se inocularon centralmente con 10 µL de la suspensión de conidias (1×10^6 conidias/mL), las mismas se incubaron a 28°C hasta que el crecimiento radial completó la placa. Todos los tratamientos se repitieron cuatro veces.

Para evaluar el crecimiento fúngico, se tomaron medidas diariamente, las mismas fueron realizadas sobre dos diámetros perpendiculares de las colonias en crecimiento (mm) hasta que la misma cubrió por completo la placa. El área de la colonia se determinó a través de la fórmula:

$$A = \pi \times r^2$$

Los radios de las colonias se representaron en función del tiempo y se aplicó una regresión lineal para obtener la tasa de crecimiento como la pendiente de la recta. El efecto de cada compuesto químico en la fase Lag para el crecimiento, quedó definido como el tiempo (días) en el que cada colonia alcanzó 5 mm de diámetro (Pizzolitto et al., 2015). El porcentaje de inhibición se representó frente a la concentración de cada compuesto respecto al control.

2.7. Análisis estadístico

En el ensayo de atracción y repelencia los datos se analizaron mediante una prueba t student de a pares con un alfa de 0,05. En el ensayo antifúngico, los datos se analizaron mediante, análisis de varianza unidireccional (ANOVA). La normalidad de los datos se probó utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre los conjuntos de datos de control y tratamiento se llevaron a cabo usando el test de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (prueba DGC), (Di Rienzo et al., 2015) con un nivel de significación del 5%.

3. Resultados

3.1. Obtención de los productos bioactivos a partir de cascarillas de arroz

De los residuos de cascarillas de arroz utilizados el rendimiento fue de aproximadamente $2,27 \pm 0,83$ gramos de cera y $4,57 \pm 1,14$ gramos de fenoles por cada kilogramo de muestra con base húmeda.

3.1.1. Fraccionamiento e identificación de los compuestos lipídicos

La cascarilla de arroz se caracterizó por la presencia de hidrocarburos y ácidos grasos (tabla 1). De los compuestos identificados los más abundantes y representativos de las muestras fueron los hidrocarburos tales como: 3-metileno-ciclohexeno ($18,69 \pm 0,94$), metil-,4-ciclohexadieno ($17,21 \pm 1,25$), 1-metil-1,3-ciclohexadieno ($20,28 \pm 6,06$), n-octano ($15,50 \pm 3,39$), 4 metiloctano ($9,21 \pm 1,79$), 3,3,5-trimetil-ciclohexeno ($6,39 \pm 0,74$), 3,5,5-trimetil ciclohexeno ($7,60 \pm 1,46$), 1,4 dimetilciclohexano ($4,47 \pm 0,90$). Por otro lado los compuestos lipídicos más significativos encontrados en el extracto fueron los siguientes: sitosterol ($3,03 \pm 0,72$), campesterol ($0,68 \pm 0,15$), etil palmitato ($0,63 \pm 0,15$).

Tabla 1. Identificación y cuantificación del extracto lipídico de la cascarilla de arroz

Pico	IR	Compuestos	Porcentaje relativo \pm D.E
1	770	2-Metil-1,3-ciclohexadieno	4,62 \pm 1,86
2	778	1-Metil-1,3-ciclohexadieno	20,28 \pm 6,06
3	782	3-Metileno-ciclohexeno	18,69 \pm 0,94
4	800	n-Octano	15,50 \pm 3,39
5	808	Metil-, 4-Ciclohexadieno	17,21 \pm 1,25
6	822	3,3,5-Trimetil-ciclohexeno	6,39 \pm 0,74
7	835	3,5,5-Trimetil-ciclohexeno	7,60 \pm 1,46
8	840	1,4-Dimetilciclohexano	4,47 \pm 0,90
9	860	4-Metiloctano	9,21 \pm 1,79
10	872	3-Metiloctano	3,97 \pm 0,35
11	900	n-Nonano	0,65 \pm 0,36
12	954	4-Metilnonano	1,25 \pm 0,98
13	1000	n-Decano	1,50 \pm 0,47
14	1087	Butilciclohexano	0,90 \pm 0,27
15	1090	3,7-Dimetil-6-octen-1-in-3-ol	0,73 \pm 0,21
16	1100	m-Undecano	0,15 \pm 0,05
17	1127	4-Metil-1-undeceno	0,24 \pm 0,08
18	1200	n-Dodecano	0,08 \pm 0,02
19	1300	n-Tridecano	0,17 \pm 0,05
20	1400	n-Tetradecano	0,06 \pm 0,05
21	1500	n- Pentadecane	0,05 \pm 0,06
22	1600	n- Hexadecano	0,04 \pm 0,04
23	1700	n-Heptadecano	0,06 \pm 0,07
24	1800	n-Octadecano	0,04 \pm 0,03
25	1889	Etil Palmitato	0,63 \pm 0,15
26	1900	n-Nonadecano	0,31 \pm 0,25
27	2200	4,8,12,16-Tetrametilheptadecan-4-olido	0,37 \pm 0,09
28	2000	n-Eicosano	0,03 \pm 0,01
29	2170	Campesterol	0,68 \pm 0,15
30	2174	Estigmasterol	0,85 \pm 0,16
31	2186	Sitosterol	3,03 \pm 0,72
32	2202	Stigmasta-3,5-dien-7-ona	0,38 \pm 0,11

IR: índice de retención calculado.

3.1.2. Fraccionamiento e identificación compuestos fenólicos

El contenido total de fenoles se determinó por el método de Folin-Ciocalteu. El valor obtenido para el extracto fenólico total fue de 0,462 mg/mL, lo que equivale a un total de 0,055 g de fenoles por cada g de cáscara de arroz con base húmeda.

Cuando se llevó a cabo la separación del extracto fenólico empleando la columna con Sephadex L20 se observaron tres fracciones diferentes las cuales fueron identificadas como: fracción I, fracción II y fracción III, criterio definido por la velocidad de elución debido al mayor tamaño de las moléculas presentes en cada una, siendo la fracción I la que eluyó primero y así sucesivamente.

Tabla 2. Identificación y cuantificación del extracto fenólico de la cascarilla de arroz

Pico	Rt (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Concentración (mg/g extracto)	Identificación tentativa
1	9.55	320	179	179, 135 (100)	0,34 ± 0,09	Ácido cafeico
2	11.27	285, 320	163	163, 119 (100)	0,66 ± 0,15	Ácido <i>m</i> -cumárico
3	13.77	309	163	163, 119 (100)	0.60 ± 0,17	Ácido <i>cis-p</i> -cumárico
4	14.9	309	163	163, 119(100)	0,51 ± 0,16	Ácido <i>trans-p</i> -cumárico
5	20.81	331	187	187, 125 (100), 97 (100)	0	No identificado 1
6	32.44	283, 319	677	677, 659, 593, 451, 367	0	No identificado 2
7	37.77	329	329	329, 314 (100), 299 (50)	0,59 ± 0,26	Isómero de ramnazina
8	38.19	323	329	329, 314 (100), 299 (50)	0,29 ± 0,10	Isómero de ramnazina
9	39.3	316	525	525, 329 (100), 314, 299	0,23 ± 0,07	Ramnazina acilado
					3,21 ± 0,89	Compuestos fenólicos totales

Tiempo de retención (Rt), longitudes de onda de absorción máxima en la región visible (λ_{max}), datos de espectros de masas e identificación de compuestos fenólicos en cascarillas de arroz.

Por otro lado, se llevó a cabo la identificación y cuantificación por HPLC-MS del perfil de compuestos fenólicos presentes en la cascarilla de arroz y los resultados se presentan en la Tabla 2. La cascarilla de arroz se caracterizó por la presencia de ácido cafeico, los isómeros de ácido cumárico y de ramnazina, siendo los compuestos más abundantes ácido *m*-cumárico (0,66 mg/g), ácido *cis-p*-cumárico (0,60 mg/g), isómero de ramnazina (0,59 mg/g) y ácido *p*-cumárico (0,51 mg/g), seguidos por ácido cafeico (0,34 mg/g) y el isómero de ramnazina (0,29 mg/g) y ranazina acilado (0,23 mg/g).

3.2. Bioensayos

3.2.1. Actividad insecticida

Cuando se evaluó la actividad insecticida de los compuestos lipídicos y fenólicos empleando la metodología por contacto a la concentración de 63,6 mg/cm² no se observó efecto sobre *S. zeamais*. Luego, cuando las fracciones fueron evaluadas por la metodología de topicación a 1 mg/μL no se reportaron insectos muertos luego de 24 de exposición, indicando que las fracciones obtenidas a partir de las cascarillas de arroz no presentaron actividad insecticida a las concentraciones ensayadas.

3.2.2. Test de atracción-repelencia

Para evaluar el efecto de los extractos lipídicos y fenólicos sobre el comportamiento de *S. zeamais* se llevó a cabo el Test de atracción-repelencia. Los resultados obtenidos indican que ninguno de ellos funcionan como atractores y/o repelentes ya que no se observan diferencias significativas entre los tratamientos y los controles (Figura 10). Si se puede notar que el porcentaje de atracción a los fenoles es mayor respecto a los controles y en el caso de las ceras el porcentaje de atracción a las mismas es menor con respecto a los controles.

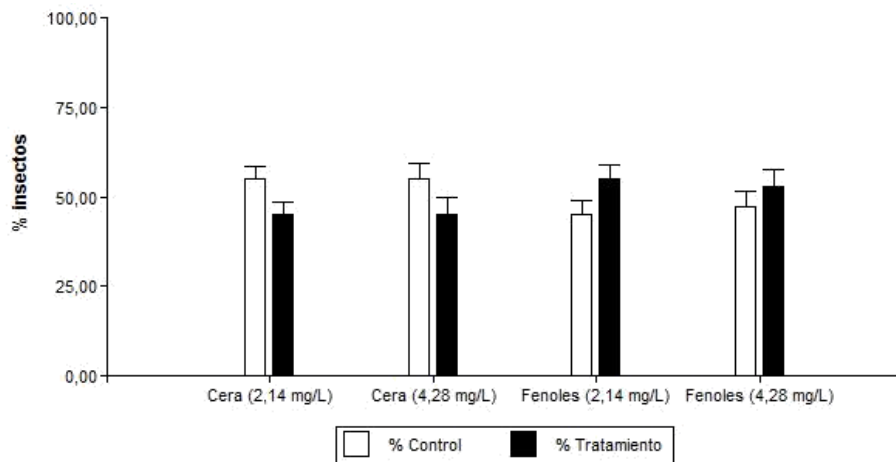


Figura 10. Test de atracción repelencia. Porcentaje de individuos que respondieron a los tratamientos. Se analizaron los datos mediante una prueba t pareada con $p < 0.05$. No se observan diferencias significativas.

3.2.3. Actividad antifúngica

Se evaluó el efecto de extractos fenólicos (Fracción total, Fracción I, Fracción II y Fracción III) y lipídicos sobre el crecimiento de *F. verticillioides* M3125 en un rango de concentraciones comprendido entre 500 y 31,25 ppm. Los resultados muestran que los parámetros de crecimiento se vieron afectados por la presencia de los extractos en el medio, los mismos fueron dependientes de la dosis, siendo más activas los fenoles respecto a los lípidos. En la Tabla 3 se observan los resultados de porcentaje de inhibición, donde la fracción III fue la más eficiente mostrando una inhibición del crecimiento de *F. verticillioides* del 36,65% a 125 ppm, seguida por la fracción II a 250 ppm, la fracción I, la fracción total y la fracción lipídica a 500 ppm con una inhibición fúngica del 36,93 %, 37,21 % y 28,30 % y 20,14 %, respectivamente.

Cuando se evaluaron los parámetros de crecimiento de *F. verticillioides* M3125 (Tabla 4) los resultados mostraron que fueron afectados dependiendo del tratamiento y de la concentración ensayada. La más activa fue la fracción III, mostrando diferencias respecto al control a 125 y 62,5 ppm, seguida por la fracción II en el rango de concentraciones entre 250 y 62,5 ppm. Luego, fracción I a todas las concentraciones ensayadas y la fracción total entre los 500 y 125 ppm.

Por último en los ensayos llevados a cabo con el extracto lipídico, la dosis más alta (500 ppm) afectó el desarrollo de la cepa.

Tabla 3. Inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* M 3125 por los extractos fenólicos y lipídico

Tratamiento	Inhibición (%)				
	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62,50 ppm	31,25 ppm
Fenoles totales	28,30 ± 0,59 ^{a*}	15,6 ± 0,64 ^{b*}	8,81 ± 1,48 ^c	-1,80 ± 0,99 ^c	-4,87 ± 2,09 ^c
Fracción I	37,21 ± 6,22 ^{a*}	17,2 ± 1,87 ^{b*}	13,32 ± 2,15 ^{b*}	11,64 ± 1,92 ^{b*}	ND
Fracción II	ND	36,93 ± 5,4 ^{a*}	22,13 ± 2,52 ^{b*}	20,02 ± 1,87 ^{b*}	14,23 ± 6,48 ^c
Fracción III	1,81 ± 0,69 ^c	-1,19 ± 1,16 ^c	36,65 ± 1,62 ^{a*}	4,76 ± 1,12 ^c	-9,83 ± 1,20 ^{b*}
Extracto lipídico	20,14 ± 1,3 ^{b*}	11,64 ± 3,09 ^c	6,09 ± 4,29 ^c	6,76 ± 2,03 ^c	5,65 ± 1,92 ^c

Los valores son expresados como la media ± D.E. La inhibición crecimiento fúngico fue determinado el día 5 post inoculación. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo al test DGC ($p < 0.05$). *indica diferencia significativa con el control. ND: no determinados.

Los datos reportados en la tabla 5 muestran los valores de fase lag, tiempo que tarda en llegar a los 5 mm el diámetro de la colonia, bajo el sistema de estudio. Los ensayos revelaron que la fase lag se vio afectada por la presencia de los extractos en el medio.

Tabla 4. Efecto de los extractos fenólicos y lipídico sobre la tasa de crecimiento (mm/día) de *Fusarium verticillioides* M 3125

Tratamiento	Tasa de crecimiento (mm/día)				
	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62,5 ppm	31,25 ppm
Fracción total	3,01 ± 0,06 ^{b*}	3,64 ± 0,06 ^{c*}	3,48 ± 0,10 ^{b*}	3,91 ± 0,18 ^d	4,42 ± 0,05 ^{e*}
Fracción I	3,06 ± 0,07 ^{b*}	3,16 ± 0,14 ^{b*}	3,47 ± 0,04 ^{c*}	3,39 ± 0,05 ^{b*}	ND
Fracción II	ND	3,22 ± 0,16 ^{b*}	3,73 ± 0,06 ^{c*}	3,60 ± 0,06 ^{c*}	4,04 ± 0,20 ^d
Fracción III	4,05 ± 0,04 ^d	4,14 ± 0,07 ^d	2,28 ± 0,09 ^{a*}	3,30 ± 0,08 ^{b*}	4,53 ± 0,02 ^{e*}
Extracto lipídico	3,78 ± 0,08 ^{c*}	4,03 ± 0,06 ^d	4,00 ± 0,19 ^d	4,23 ± 0,06 ^d	4,17 ± 0,21 ^d
Etanol	4,16 ± 0,16 ^d	-	-	-	-
DMSO	4,21 ± 0,09 ^d	-	-	-	-

Los valores son expresados como la media ± D.E. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a test DGC ($p < 0.05$). *indica diferencia significativa con el control. ND: no determinados.

En el tratamiento de fenoles totales se observaron diferencias significativas a las concentraciones de 500, 125 y 62,5 ppm en comparación con el control. Para la

fracción I a todas las concentraciones evaluadas se reportaron diferencias significativas con el control. Finalmente, en las fracciones II y lipídica no se observaron diferencias significativas con el control a las dosis ensayadas.

Tabla 5. Efecto de los extractos fenólicos y lipídico sobre la fase lag (h) de *Fusarium verticillioides* M 3125

Tratamiento	Fase lag (h)				
	500 ppm	250 ppm	125 ppm	62,5 ppm	31,25 ppm
Fenoles totales	14,34 ± 2,04 ^{b*}	23,72 ± 2,93 ^c	16,65 ± 4,17 ^{b*}	15,43 ± 2,02 ^{b*}	30,8 ± 0,66 ^c
Fracción I	17,44 ± 4,50 ^{b*}	11,8 ± 4,87 ^{b*}	16,51 ± 0,50 ^{b*}	13,24 ± 2,07 ^{b*}	ND
Fracción II	ND	26,39 ± 6,13 ^c	34,85 ± 0,56 ^c	30,29 ± 1,05 ^c	34,51 ± 2,08 ^c
Fracción III	28,4 ± 1,34 ^c	25,88 ± 1,24 ^c	-9,06 ± 1,89 ^{a*}	12,7 ± 1,45 ^{b*}	29,66 ± 0,64 ^c
Extracto lipídico	27,73 ± 1,90 ^c	25,52 ± 2,94 ^c	24,12 ± 1,45 ^c	28,48 ± 1,33 ^c	24,86 ± 2,77 ^c
Etanol	27,39 ± 2,04 ^c	-	-	-	-
DMSO	24,71 ± 1,46 ^c	-	-	-	-

Los valores son expresados como la media ± D.E. Inhibición crecimiento fúngico fue determinado el día 5 post inoculación. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a test DGC ($p < 0.05$). *indica diferencia significativa con el control. ND: no determinados.

4. Discusión

La industria agrícola está afectando negativamente el ambiente como consecuencia de la eliminación directa de los residuos. A su vez teniendo en cuenta el impacto negativo del empleo de pesticidas sintéticos sobre la salud humana y animal y el ecosistema, en los últimos años ha tenido gran interés la utilización de residuos de los cultivos para encontrar agentes químicos que sean capaces de funcionar como plaguicidas orgánicos y una forma de control biológico; siendo los productos naturales una de las soluciones más pasivas para proteger los productos almacenados.

En el presente trabajo se tomó como alternativa el uso de las cascarillas de arroz para obtener compuestos químicos con el fin de determinar su actividad contra plagas que atacan al maíz durante su almacenamiento, *S. zeamais* y *F. verticillioides*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que los compuestos extraídos a partir de las cascarillas de arroz no presentaron propiedades para poder ser utilizadas como insecticidas de acción inmediata sobre *S. zeamais* o con actividad atrayente o repelente. Este efecto puede deberse a la preferencia que existe por parte del insecto hacia los granos de maíz, haciendo nulo el interés por los compuestos aromáticos obtenidos en los extractos de arroz. Por otro lado, estudios donde se aplican ácidos grasos por topicación revelaron efectos secundarios que afectan la aptitud de los individuos puestos a prueba; se reportó que insectos del orden Coleóptera tratados con ácidos grasos sufrieron modificaciones en funciones como fecundidad, capacidad reproductiva y viabilidad de los huevos, disminuyendo así la población en las siguientes generaciones (Aider et al., 2016). Por lo que esta área podría permitir continuar las investigaciones con los extractos de arroz y *S. zeamais*.

La relación que existe entre *S. zeamais* y *Zea mays*, permite establecer hipótesis de carrera armamentista. Esto se interpreta como una coadaptación por ambos miembros, donde la planta de maíz desarrolla formas de resistencia a las plagas y el insecto métodos para evadir las mismas. En ambos casos se tienen adaptaciones especializadas, que no podrían originarse de otra forma que no sea genética, por lo que la resistencia opuesta por el maíz, podría ser la base para el posible control de la

plaga. Algunos de los compuestos encontrados en el pericarpo y aleurona de semillas de especies resistentes de maíz, están presentes también en los extractos fenólicos de las cáscaras de arroz, tal es el caso del ácido cumárico y ácido cafeico, ambos intermediarios en la formación de lignina y el fortalecimiento estructural de ambos granos y que además influyen sobre la accesibilidad, digestibilidad y adherencia a los granos (Taquer et al., 2003). Por lo que entonces, los productos químicos de la cáscara de arroz no funcionan como insecticidas, pero se cree que podrían ser utilizados, junto con el reciclaje de otros residuos, para la elaboración de sustratos orgánicos que controlen el fitness de la plaga.

Lo que respecta al ensayo de olfatometría, se expresaron datos a modo de porcentajes, en ambos casos se observaron tendencias. En caso de los fenoles totales funcionarían como atrayentes de *S. zeamais*, pudiendo deberse a la presencia de ácido cumárico y ácido cafeico, sustancias a las cuales, ecológicamente el insecto ya reconocería naturalmente por su interacción con el maíz.

Por otro lado, la capacidad de un compuesto aromático para funcionar como repelente y por ende aumentar su actividad semiótica, está relacionada con los sitios donde se dan sustituciones en los carbonos presentes en los anillos aromáticos, siendo mayor este efecto cuando se le agrega a algunos de los carbonos un agente -OH en los carbonos número 3, 2 y 1, siendo ese orden de tipo creciente (Omolo et al., 2004; Odalo et al., 2005). A continuación en la Figura 11 se observan los detalles de las sustituciones en el precursor del ácido cafeico y p-cumárico. En los resultados de olfatometría, no se observó diferencia significativa en el porcentaje de atracción por los compuestos aromáticos, pero si una tendencia de los insectos en ir hacia ellos, eso podría deberse a que en ambos casos la sustitución por un grupo -OH se da en el carbono 4 y en caso del ácido cafeico también en el carbono 5 como se ve en la Figura 12.

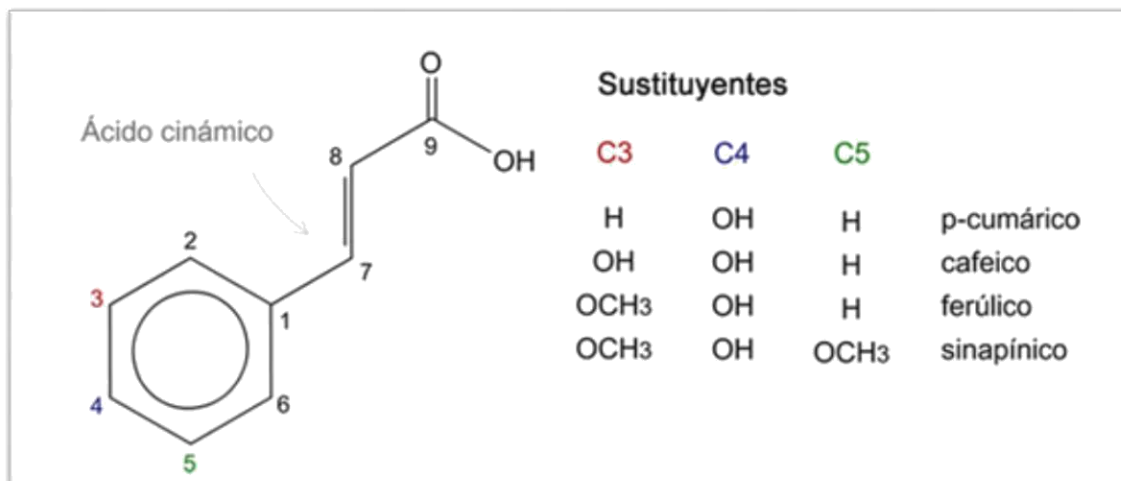


Figura 11. Detalle del origen del ácido cafeico y ácido p-cumárico.

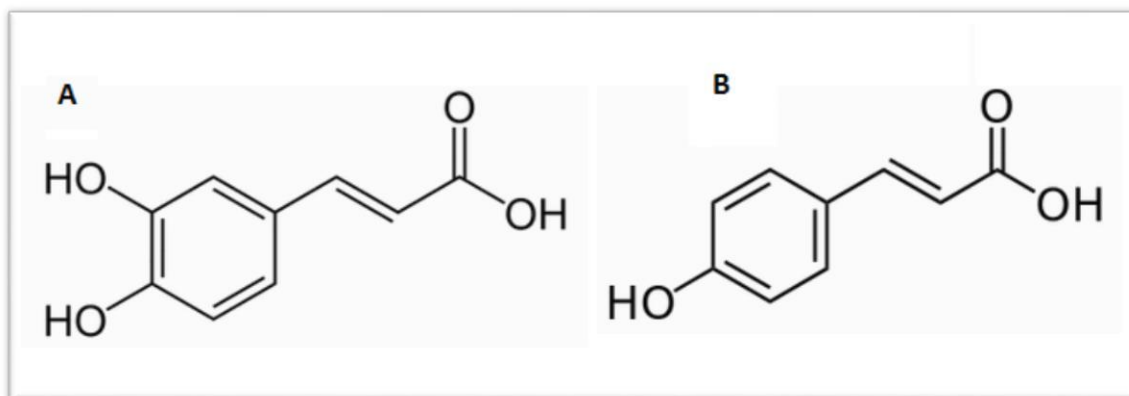


Figura 12. A) Acido Cafeico. B) Acido p-cumárico.

Estudios afirman que el grado de repelencia también está relacionado al grado de acceso al grupo hidroxilo (Omolo et al., 2004; Odalo et al., 2005), además los resultados obtenidos en el análisis de los compuestos fenólicos de las cascarillas de arroz demostró la presencia de los 3 isómeros de ácido p-cumárico, existiendo la posibilidad de continuar los ensayos con los compuestos en estado puro ya que en este caso lleva un sólo sustituyente en el carbono 4 a diferencia en el ácido cafeico donde lo tenemos en el carbono 4 y 5 lo que podría estar generando impedimento estérico y por ende anulando la función aromática de la molécula.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, es posible darle un valor agregado a los compuestos aromáticos de la cáscara de arroz, ya que son

precursores de sustancias que podrían funcionar como atrayentes, tal como la vainillina a la cual se llega por biotransformación desde el ácido ferúlico (Kavitha et al., 2005).

En el caso de las ceras, la tendencia es la de actuar como repelente, de todos los compuestos encontrados, solamente el dehidrolinalool (3,7-Dimethyl-6-octen-1-yn-3-ol) ha sido reportado en investigaciones de olfatometría, donde se buscan sustancias capaces de repeler a *Aedes aegypti*. Al sumar el compuesto previamente mencionado a sustancias que ya eran repelentes de este insecto, se vieron significativos aumentos de la actividad repelente (Kline et al., 2003). Si bien la abundancia relativa de estos compuestos en los extractos de arroz es baja ($0,73 \pm 0,21$ %), da respaldo a la tendencia vista en los ensayos de olfatometría.

Por otro lado, el ethyl palmitato (Figura 13) representa un $0,53 \pm 0,22$ % del total de los compuestos encontrados en nuestros extractos lipídicos y es uno de los volátiles liberados por bacterias presentes en suelos, la liberación de este compuesto junto con otros, compone la atracción de micro fauna como nematodos (Hao et al., 2011). Por lo que, con el montaje de los estudios necesarios podríamos seguir agregando valor a los residuos del arroz.

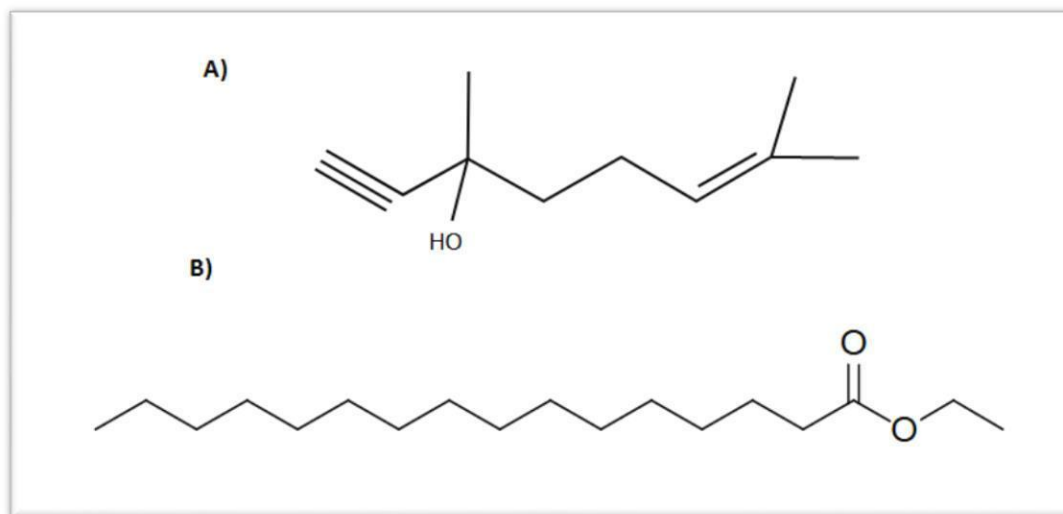


Figura 13. A) Dehydrolinalool. B) Ethyl palmitate.

Los datos obtenidos con la cepa fúngica mostraron que todas fracciones fenólicas presentaron actividad biológica contra *F. verticillioides* M3125, siendo las activas la

fracción III a 125 ppm, seguida por la fracción II a 250 ppm y las fracciones I y fenoles totales a 500 ppm. Mientras que el extracto lipídica mostró menor efecto inhibitorio del crecimiento fúngico respecto a la fracción fenólica (20% inhibición a 500 ppm). Por otro lado, cuando se analizaron los parámetros de crecimiento fúngico, las distintas fracciones fenólicas mostraron efecto sobre la fase de latencia y la tasa de crecimiento de *F. verticillioides*, modificando significativamente el desarrollo del hongo.

Se ha reportado que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos afecta la germinación de las conidias fúngicas (García et al., 2012; Morales et al., 2014) pudiendo ser este el motivo por el que se vio afectado el desarrollo de la cepa evaluada.

De los compuestos fenólicos identificados en los extractos de cascarillas de arroz, Macancela et al. (2009) demostraron que el ácido cafeico y ácido p-cumárico tienen capacidad inhibitoria sobre el crecimiento de cepas fúngicas del género *Fusarium*, entre ellas *F. verticillioides*, demostrando dosis dependencia, resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo. Por otro lado Romero et al. (2009) han documentado que el ácido cafeico tiene capacidades antifúngicas y antimocotocogénicas contra *Aspergillus carbonarius*, mostrando efectos de total inhibición a concentraciones de 500 ppm. Por lo que el ácido cafeico y el ácido p-cumárico podrían ser los responsables de la inhibición del crecimiento de la cepa fúngica del presente trabajo.

Además, en los últimos tiempos ha aumentado el interés por el posible papel de los compuestos fenólicos naturales en la producción de toxinas por hongos toxigénicos como por ejemplo *Aspergillus flavus* y varias especies de *Fusarium* (Beekrum et al. 2003; Mahoney et al., 2004; Samapundo et al., 2007). Es conocido que la actividad antioxidante de extractos polifenólicos reprimen la expresión y/o síntesis de micotoxinas, tal es el caso de los tricotecenos del grupo B, donde se bloquea la expresión de genes responsables de la regulación de las vías metabólicas que conducen a la formación de dicha micotoxina, algunos responsables de estos efectos son ácidos tales como el cafeico y cumárico (Boutign et al., 2010) los mismos que están presentes en nuestros extractos. La síntesis de micotoxinas es un punto que

queda pendiente para continuar investigando los efectos de los extractos de las cáscaras de arroz sobre *F. verticillioides* M3125.

De los compuestos encontrados en las ceras, ethyl palmitato, se han reportado efectos de toxicidad contra bacterias y hongos tales como, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* (Essien et al., 2011). En el caso de nuestro trabajo, sólo se ven efectos significativos a altas concentraciones, debido al porcentaje que presenta esta molécula en el extracto de ceras es posible que a mayor concentración y junto con la acción sinérgica de los otros presentes, pueda atribuírsele los efectos de inhibición observados.

5. Conclusiones

El presente estudio mostró que la cascarilla de arroz es una fuente potencial de compuestos fenólicos con capacidad de inhibir el crecimiento de *F. verticillioides* M3125, afectando la tasa de crecimiento y la fase de latencia. Estos resultados sugieren que las cascarillas de arroz, un producto de desecho de la industria arrocera de bajo valor económico, pero de alto contenido de componentes activos, podría ser una alternativa natural al uso de fungicidas sintéticos.

6. Bibliografía

- ABADÍA, B. (Ed.); BARTOSIK, R. (Ed.) & HOYOS, M. (2013). (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.
- AGUILAR, J. S. (2009). ALTERNATIVAS DE APROVECHAMIENTO DE LA CASCARILLA DE ARROZ EN COLOMBIA.
- Aider, F. A., Kellouche, A., Fellag, H., & Debras, J. F. (2016). Evaluation of the bio-insecticidal effects of the main fatty acids of olive oil on *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera-Bruchidae) in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.)). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(5), 235–245.
- Arias, S. L., Mary, V. S., Otaiza, S. N., Wunderlin, D. A., Rubinstein, H. R., & Theumer, M. G. (2016). Phytochemistry Toxin distribution and sphingoid base imbalances in *Fusarium verticillioides*-infected and fumonisin B1-watered maize seedlings. *Phytochemistry*, 125, 54–64.
- Bastida Hernandez Luis Miguel (2016). Evaluación de Extractos Vegetales como una Alternativa de Control para el Picudo de Maíz (*Sitophilus zeamais* Motschulsky). Universidad autónoma agraria Antonio Narro división de Agronomía departamento de parasitología.
- Barney, R. J., Price, B. D., Sedlacek, J. D., & Siddiqui, M. (1995). *Fungal species composition and abundance on stored corn as influenced by several management practices and maize weevil (Coleoptera: Curculionidae)*. *Crop Protection*, 14(2), 159–164.
- Beekrum, Sharlynn & Govinden, Roshini & Padayachee, Thiri & Odhav, Bharti. (2003). Naturally occurring phenols: A detoxification strategy for fumonism B1. Food additives and contaminants. 20. 490-3.
- Boutigny, A., Barreau, C., & Richard-forget, F. (2010). Natural phenolic acids from wheat bran inhibit *Fusarium culmorum* trichothecene biosynthesis in vitro by repressing Tri gene expression, 275–286.
- Brito V. D., Achimon F., Dambolena J. S., Pizzolitto R. P., Zygadlo J. A. (2019). Trans-2-hexen-1-ol as a tool for the control of *Fusarium verticillioides* in stored

- maize grains. *Journal of Stored Products Research* Volume 82, Pages 123-130.
- Camargo, J. V. (2005). Diseño, construcción y puesta a punto de un prototipo de quemador para la combustión continua y eficiente de la cascarilla de arroz. *El Hombre Y La Maquina*, (25), 128–135.
- C.E. DYTE. (1974). Problems Arising from insecticide Resistance in Storage Pests. Pest Infestation Control Laboratory, Slough (United Kingdom). 275-289 (1974)
- Cox, P. D., & Collins, L. E. (2001). Factors affecting the behaviour of beetle pests in stored grain, with particular reference to the development of lures. *Journal of Stored Products Research*, 38(2), 95–115.
- DI RIENZO, J; CASANOVES, F; BALZARINI, M; GONZALEZ, L; TABLADA, M; ROBLEDO, C. 2015. Infostat Versión Libre 2015. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Dyte, C. E. (1974). *Problems Arising from Insecticide Resistance in Storage Pests. EPPO Bulletin*, 4(3), 275–286.
- Gallinder, C., Suárez, D., Barrera, R., Azcona, J., & Schang, M. (2003). Rice bran : nutritive value and potential use in broiler feeds. *Rev. Arg. Prod. Anim*, 23(1), 13–24.
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2012). International Journal of Food Microbiology Effect of Equisetum arvense and Stevia rebaudiana extracts on growth and mycotoxin production by Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides in maize seeds as affected by water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 21–27.
- García, S., Carrillo, E., & Bergvinson, D. J. (2007). *Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control*.
- Hao Y., Mou G., He A., Xi J., Yang F., Mo M. (2011). Phylogenetic diversity characteristics of soil bacteria producing nematode-attracting volatiles and identification of their active compounds. 51(11),1454-60.
- Hoed, V. Van, Depaemelaere, G., Ayala, J. V. V., Santiwattana, P., Verhe, R., & Greyt, W. De. (2006). Influence of chemical refining on the major and minor components of rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), 315–321.

- Houghton, P. J., & Howes, M. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi, 181–199.
- Huang, S. H., & Ng, L. T. (2012). Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1–2), 122–127.
- Humpf, H., & Voss, K. A. (2004). Review Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins, 255–269.
- Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Zunino, M. P., Dambolena, J. S., & Zygadlo, J. A. (2015 a). *Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize. Journal of Stored Products Research*, 62, 74–80.
- Herrera, J. M., Zunino, M. P., Dambolena, J. S., Pizzolitto, R. P., Gañan, N. A., Lucini, E. I., & Zygadlo, J. A. (2015 b). *Terpene ketones as natural insecticides against Sitophilus zeamais. Industrial Crops and Products*, 70, 435–442.
- Kline, D.L., Ulrich R. B., Kenneth H and Barnard, D.R. (2003). Olfactometric Evaluation of Spatial Repellents for *Aedes aegypti*. Center for Medical, Agricultural, and Veterinary Entomology, USDA - ARS, Gainesville. *J. Med. Entomologic*. 40(4): 463 - 467.
- 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.
- Kumar, K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., & Dhaliwal, H. S. (2017). Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 18.
- Leslie, J.; Summerel, B. A. (2006). *Fusarium Laboratory Manual*.
- Macancela, J. J., Ariño, M. A (dir.) ; Herrera S. M. (2012). Inhibición del crecimiento y de la biosíntesis de micotoxinas de mohos del G⁰ Fusarium mediante el uso de ácidos fenólicos. Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Área de Nutrición y Bromatología.
- Mafla, A. (2009). Uso de la cascarilla de arroz como material alternativo en la construcción. *Inventum No.6*, 4(6), 74–78.

- Maizar. 2017. <http://www.maizar.org.ar/maizar.php>. Recuperada: Noviembre de 2015.
- Mahoney, Noreen & Molyneux, Russell. (2004). Phytochemical Inhibition of Aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by Constituents of Walnut (*Juglans regia*). *Journal of agricultural and food chemistry*. 52. 1882-9.
- Manual, A. I., & Nelson, I. (1983). *Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, University Park.
- Mejía, D. 2003. (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.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H. A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M., & Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium spp* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194–205.
- Moreno, P. (2016). Cadena del arroz. *Ministerio de Agroindustria*, 15.
- Moss, M. O. (1998). Recent studies of mycotoxins. *Symposium Series (Society for Applied Microbiology)*, 62–76.
- Murillo, I., Cavallarin, L., & Segundo, B. S. (1999). Cytology of Infection of Maize Seedlings by *Fusarium moniliforme* and Immunolocalization of the Pathogenesis-Related PRms Protein. *Phytopathology*, 89(9), 737–747.
- Narro, A., & Agronomía, D. D. E. (2009). TESIS *Sitophilus zeamais*.
- Nawrot, J., Gawlak, M., Szafranek, J., Szafranek, B., Synak, E., Warchalewski, J. R., ... Fornal, J. (2010). The effect of wheat grain composition, cuticular lipids and kernel surface microstructure on feeding, egg-laying, and the development of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.). *Journal of Stored Products Research*, 46(2), 133–141.
- Nukenine, E. N. (2010). *Sitophilus zeamais*. *Journal of Applied Entomology*, 41(2), 91–141.
- Organización de las Naciones Unidas. (2014). La situación demográfica en el mundo. Informe conciso. *Madrid: Departamento de Asuntos Económicos Y Sociales*, 1–30.
- 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 Tropica*, 95(3), 210–218.

- 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*(20), 2797–2802.
- 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). *Journal of Chemical Ecology*, *19*(4), 723–734.
- Pizarro, D., Silva, G., Tapia, M., Rodríguez, J. C., Urbina, A., Lagunes, A., ... Aguilar-Medel, S. (2013). Actividad insecticida del polvo de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromaticas*, *12*(4), 420–430.
- Pizzolitto, R., Herrera, J., Zaio, Y., Dambolena, J., Zunino, M., Gallucci, M., & Zygadlo, J. (2015). Bioactivities of Ketones Terpenes: Antifungal Effect on *F. verticillioides* and Repellents to Control Insect Fungal Vector, *S. zeamais*. *Microorganisms*, *3*(4), 851–865.
- Ponce, G., Flores, A., Badii, M., & Zapata, R. (1991). Modo de acción de los insecticidas. Facultad de Ciencias Biológicas, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León (Monterrey, N.L.; México).
- Ranum, P., & Pe, J. P. (2014). Global maize production, utilization, and consumption, *1312*, 105–112.
- Romero-Romano, Carlos Osvaldo; Ocampo-Mendoza, Juventino; Sandoval-Castro, Engelberto; Tobar-Reyes, J. R. (2012). *Ra Ximhai*. *Ra Ximhai*, *8*(3), 41–49.
- Romero, S. M., Alberto, M. R., Cristina, M., Nadra, M. De, & Vaamonde, G. (2009). Inhibition of growth and ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus carbonarius* by flavonoid and nonflavonoid compounds, 165–170.
- Russin, J. S., Guo, B. Z., Tubajika, K. M., Brown, R. L., Cleveland, T. E., & Widstrom, N. W. (1997). Comparison of Kernel Wax from Corn Genotypes Resistant or Susceptible to *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, *87*(5), 529– 533.
- Samuel, M., Oliver, S. V, Wood, O. R., Coetzee, M., & Brooke, B. D. (2015). Evaluation of the toxicity and repellence of an organic fatty acids mixture (C8910) against insecticide susceptible and resistant strains of the major

- malaria vector *Anopheles funestus* Giles (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*, 8, 321.
- Samapundo, S., Demeulenaer, B., Oseinimoh, D., Lamboni, Y., Debevere, J., & Devlieghere, F. (2007). *Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage?* *Food Microbiology*, 24(5), 465–473.
- Staetz, C. (2012). *Directrices sobre la prevención y manejo de la resistencia a los plaguicidas.*
- Taque, A. L. A., Zeamais, D. E. S. I., Oleoptera, C., Lara, S. G., Burt, A. J., Serratos, J. A., ... Arnason, J. T. (2003). *D n g m a s (m , c : c) : m b r **, 22(3), 138–145.
- Torre hernández, M. E. De, Sánchez rangel, D., Galeana sánchez, E., & Plasencia. (2014). *Fumonisin – Síntesis y función en la interacción Fusarium verticillioides-maíz*, 17(1), 77–91.
- Torres-Sánchez, L., & López-Carrillo, L. (2010). *Consumo de fumonisin y daños a la salud humana.* *Salud Publica de Mexico*, 52(5), 461–467.
- Vargas, J., Alvarado, P., Vega Baudrit, J., & Porras, M. (2013). *Caracterización del subproducto cascarilla de arroz en búsqueda de posibles aplicaciones como materia prima en procesos.* *Revista Científica*, 23(1), 87–102.
- Yuya, A. I., Tadesse, A., Azerefegne, F., & Tefera, T. (2009). *Efficacy of combining Niger seed oil with malathion 5% dust formulation on maize against the maize weevil, Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae).* *Journal of Stored Products Research*, 45(1), 67–70.