

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Efecto de Extractos Botánicos Sobre la Tolerancia de *Sitophilus granarius*  
L. (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) a Insecticidas

Por:

**JORGE ARMANDO OLIVAR CHÁVEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efecto de Extractos Botánicos Sobre la Tolerancia de *Sitophilus granarius* L.  
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) a Insecticidas

Por:

**JORGE ARMANDO OLIVAR CHÁVEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor Principal



Omegaer Hernández Bautista

Coasesor



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Coasesor

Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2017

## RESUMEN

El sorgo en México representa el grano forrajero con mayor presencia en nuestro país, ya que es el principal ingrediente en la formulación de alimentos balanceados en el sector pecuario.

Los insecticidas sintéticos han sido los mayormente utilizados para controlar esta plaga, sin embargo, han tenido impactos tanto en salud humana como en el medio ambiente así como la expresión de resistencia a ciertos productos. Por lo anterior, este trabajo se realizó con la finalidad de encontrar una alternativa al uso de los plaguicidas sintéticos, para lo cual se evaluaron cinco extractos vegetales (*Tomillo, Ruda, Romero, Pimienta negra* y Chile) y un testigo absoluto.

Los individuos resistentes a los extractos fueron incubados en el laboratorio de toxicología del departamento de Parasitología Agrícola, durante el periodo de Junio a Octubre del 2016, donde los insectos se mantuvieron bajo condiciones controladas en una cámara bioclimática del Departamento de Parasitología.

El método utilizado fue a base de una serie de pruebas bioquímicas (ensayos en microplacas), los métodos en microplacas se tuvieron que adaptar a partir de los métodos ya descritos para mosquitos (Brogdon *et al.*, 2007), para poder determinar los niveles de  $\alpha$ -esterasas,  $\beta$ -esterasas, oxidasas, glutatión s-transferasas y acetilcolinesterasa en *S. granarius*. Teniendo como objetivo determinar a través de varios métodos de diagnóstico la susceptibilidad y los mecanismos de resistencia de *S. granarius* (L).

**Palabras clave;** Picudo del sorgo Esterasas, Oxidasas, Acetilcolinesterasas, Glutathion S-Transferasas, actividad enzimática, proporción de resistencia. Correo electrónico; Jorge Armando Olivar Chavez; [jaoch\\_golivar72@hotmail.com](mailto:jaoch_golivar72@hotmail.com)

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A Dios.***

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.*

### ***A mi UAAAN.***

*Gracias a mi ALMA TERRA MATER por convertirse en mi hogar, gracias por haberme permitido formarme en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso.*

*A los profesores del Departamento de Parasitología por haber sido parte importante en mi formación académica, por brindarme su aprendizaje y compartir su sabiduría e impulsarme a ser cada día mejor*

### **Dr. Ernesto Cerna Chávez**

*Con mucho respeto y admiración por su valiosa aportación de conocimientos y asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.*

### **Dra. Yisa Ochoa Fuentes,**

*Por su valiosa colaboración y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.*

### **Dr. Omegar Hernández Bautista,**

*Por su apoyo y colaboración brindada durante la realización del presente trabajo, por la confianza que tuvo para realizar este proyecto*

## DEDICATORIA

### ***A mis Padres.***

*Gracias a Dios que me ha heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo "sus padres". A mi padre **Rosendo Olivar Anrrubio** y a mi madre **Griselda Chávez Zúñiga** quienes sin escatimar esfuerzo alguno estuvieron en cada una de mis triunfos y mis derrotas y sacrificaron gran parte de su vida para educarme.*

*A mis hermanos **Nayeli y Alekx Olivar Chavez** quienes la ilusión de su vida ha sido verme convertido en un hombre de provecho. Y a todas aquellas personas que comparten conmigo este triunfo.*

### ***A mis Familiares***

*Que estando lejos siempre tuve su apoyo y su confianza, a mis abuelos **Celso Chávez Mendez y Elpidia Zuñiga Hernadez**, a mis tíos, a mis primos y a mis primas **Mayra y Janine Espinoza Chávez** que estuvieron siempre en todo momento estado al pendiente de mi.*

### ***A mis tíos***

***Rigoberto Chavez Zuñiga y Teresa Acevedo** por estar siempre al pendiente de mi a pesar de la distancia.*

### ***A mis Amigos***

*A mis amigos que durante 4 años y medio mas que una compañía se volvieron la familia que uno escoge, hermanos y amigos que se quedan para toda la vida el compa **Rigui, Johny, Nico dinamita, Choco, Juanito Gary, Marco, Frutos, Molina, el compa Tacambaro, David.***

### ***A la Familia López Gutiérrez***

*Que más que amigos se portaron como una segunda familia en el inicio de este sueño, ese apoyo que necesitas cuando te encuentras lejos de casa, **Andrea** por ser una gran amiga, compañera y confidente en todo momento, al **sr. Ernesto y la sra. Ileana** que siempre me ofrecieron un techo y una amistad de las que se quedan para toda la vida.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Justificación .....	3
Objetivo.....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
Importancia del Sorgo en México .....	4
Plagas de granos almacenados .....	4
Descripción General de picudo del sorgo <i>Sitophilus granarius</i> (L). .....	5
Origen y distribución geográfica .....	5
Descripción morfológica y Biología.....	6
Huevo .....	6
Larva .....	6
Pupa.....	6
Adulto .....	7
Importancia Económica .....	8
Alternativas de Control .....	8
Control Biológico .....	8
Control Físico .....	9
Control Cultural.....	9
Control Botánico .....	9
Características de los extractos vegetales como insecticidas .....	10
Chile ( <i>Capsicum spp.</i> ) .....	10
Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) .....	11
Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	12
Ruda ( <i>Ruta chalepensis</i> ) .....	12
Pimienta Negra ( <i>Piper nigrum</i> ) .....	13
Control Químico.....	15
Descripción de los productos utilizados.....	15

Características de Deltametrina .....	15
Características de Abamectina.....	16
Características de Endosulfán.....	17
Resistencia .....	17
Resistencia de insectos a insecticidas.....	17
Clasificación de Resistencia .....	18
Resistencia por comportamiento .....	18
Resistencia fisiológica .....	18
Resistencia cruzada .....	19
Resistencia Múltiple .....	19
Resistencia metabólica .....	19
Resistencia debida al comportamiento.....	19
Determinación de resistencia .....	19
Bioensayos.....	20
Métodos bioquímicos .....	20
Pruebas moleculares.....	20
Pruebas bioquímicas.....	20
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
Ubicación.....	21
Material utilizado.....	21
Diseño Experimental .....	21
Bioensayos.....	22
Pruebas bioquímicas .....	23
Cuantificación de proteína .....	23
Preparación de reactivos .....	23
Preparación de homogenatos.....	23
Lectura de absorbancias .....	24
Prueba de esterasas elevadas no específicas ( $\alpha$ y $\beta$ -Esterasas) .....	24
Preparación de reactivos.....	24
Lectura de absorbancias .....	24
Prueba de reacciones de oxidasa .....	25
Preparación de reactivos.....	25

Lectura de absorbancias .....	25
Prueba Glutathión S- Transferasas .....	25
Preparación de reactivos.....	26
Lectura de absorbancias .....	26
Prueba de Acetilcolinesterasa .....	26
Preparación de reactivos.....	26
Lectura de absorbancias .....	27
Análisis estadístico .....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>51</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Cuadro de los Metabolitos Secundarios de los extractos.....	13
<b>Cuadro 2.</b> Concentración letal media de los extractos de los extractos evaluados.....	29
<b>Cuadro 1.</b> Comparación de concentración letal media de Deltametrina y extractos evaluados.....	31
<b>Cuadro 4.</b> Comparación de concentración letal media de Endosulfan y extractos evaluados.....	32
<b>Cuadro 5.</b> Comparación de concentración letal media de Abamectina y extractos evaluados.....	33
<b>Cuadro 6.</b> Comparaciones de medias de las absorbancias de $\alpha$ -esterasas.....	34
<b>Cuadro 7.</b> Comparaciones de medias de las absorbancias de $\beta$ -esterasas.....	36
<b>Cuadro 8.</b> Comparaciones de medias de las absorbancias de oxidasas.....	37
<b>Cuadro 9.</b> Comparaciones de medias de las absorbancias de Glutathion S- Transferasas.....	38
<b>Cuadro 10.</b> Comparaciones de medias de las absorbancias de Acetilcolinesterasa.....	40

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de la enzima $\alpha$ - Esterasas en población de <i>Sitophilus granarius</i> .....	35
<b>Figura 2.</b> Distribución de la enzima $\beta$ - Esterasas en población de <i>Sitophilus granarius</i> .....	36
<b>Figura 3.</b> Distribución de la enzima oxidasas en población de <i>Sitophilus granarius</i> .....	38
<b>Figura 4.</b> Distribución de la enzima Glutathion S- Transferasas en población de <i>Sitophilus granarius</i> .....	39
<b>Figura 5.</b> Distribución de la enzima acetilcolinesterasa en población de <i>Sitophilus granarius</i> .....	40

## INTRODUCCIÓN

El valor económico, alimenticio, agrícola e industrial asociado a los granos y semillas, demanda cuidados especiales en el almacén para garantizar la conservación de su calidad; ésta debe mantenerse durante el tiempo que permanecerán en condiciones de almacenamiento y aun hasta el momento en que serán utilizados (Casini y Santajuliana., 2014).

Los granos almacenados de productos como arroz (*Oriza sativa* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), maíz (*Zea mays* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L.), constituyen el peso fundamental en la nutrición de varios países (Padin *et al.*, 2012). A nivel mundial, las pérdidas en la etapa de postcosecha de *Sorghum bicolor* L. oscilan entre el 5 y el 30 % del peso total de los granos; y dentro de este, entre el 5 y el 10 % de estos daños son causados directamente por los insectos plagas (Casini y Santajuliana., 2014).

Sin embargo, Maes (2005), refiere que estos valores pueden superar el 70 %. En México no existen cifras precisas que indiquen el volumen de pérdida de grano de sorgo; sin embargo, se estima que anualmente se pierde entre el 5% y el 25% de la producción total de sorgo, siendo uno de los principales granos básicos del país.

Según la FAO (2015), los efectos principales del ataque de insectos a estos productos son la pérdida de peso del grano, la disminución del poder germinativo de la semilla y el aumento de la temperatura por la densidad de la población, además de ocasionar afectaciones en su valor nutritivo, sabor y olor.

Estos daños varían negativamente la cantidad y calidad del producto durante su almacenamiento (Agüero, 2008, Rodríguez y Herrera, 2009). Uno de los problemas fundamentales de lograr una adecuada conservación es que las altas temperaturas, humedad de los granos y su agrupamiento, proporcionan las condiciones para el desarrollo de estas plagas (Reyes, 2006).

La producción y protección de granos almacenados constituyen una necesidad alimenticia, social y económica. El almacenaje de granos ha sido una actividad de subsistencia del ser humano, el consumo de granos almacenados es una fuente importante de carbohidratos y proteínas para la gente de escasos recursos en el mundo.

No obstante, existen unas 1000 especies de insectos que infestan los productos en la etapa de postcosecha, dentro de las que se destacan por su importancia económica *Sitophilus granarius* (L). y *Sitophilus oryzae* (L). (Nerio *et al.*, 2009). Estas dos plagas se encuentran clasificadas como plagas primarias debido a su alta especialización en la perforación de la testa de la semilla (Shadia, 2011) y son los más importantes en el ataque a cereales (Franquet *et al.*, 2006).

Diferentes métodos permiten controlar estas plagas, desde el uso de temperaturas extremas, envases herméticos, atmósfera controlada, hasta el empleo de insecticidas sintéticos. Estos últimos han derivado, inevitablemente, en el surgimiento de resistencia, acumulación en el ambiente e intoxicación (Fragoso *et al.* 2013).

El hombre se ha visto en la necesidad de buscar soluciones teniendo siempre en cuenta como primera respuesta el control químico como una forma de combatirlas, con ello contribuyendo a la resistencia con aplicaciones innecesarias prolongando la vida del insecto. A pesar de la existencia de estas técnicas, muchas de ellas no están al alcance de los agricultores, sea por el costo o por el riesgo que puede implicar el uso inadecuado de ellas (Silva 2013).

Debido a estas limitaciones, en los últimos años se ha retomado la utilización de las plantas como fuente de compuestos con actividad anti-insecto. Las plantas producen sustancias químicas y metabolitos secundarios que les permiten defenderse del ataque de los insectos plagas (Silva 2013).

## **Justificación**

Buscar nuevas alternativas para el control de plagas en granos almacenados, para la reducción de daños a la salud del ser humano y el impacto en el medio ambiente con la utilización de extractos de productos vegetales para la eliminación de *Sitophilus granarius* (Linnaeus).

## **Objetivo**

El presente trabajo tiene los siguientes objetivos:

1. La evaluación *in vitro* de la efectividad de cinco extractos vegetales para el control de *Sitophilus granarius* (L).
2. Determinación de las concentraciones letales medias de tres insecticidas convencionales (Abamectina, Deltametrina y Endosulfan), con poblaciones tolerantes a los extractos botánicos.
3. Determinar el contenido de enzimas detoxificantes ( $\alpha$  y  $\beta$ -Esterasas, Oxidasas, Glutathion S-Tranferasas y Acetilcolinesterasas), en cada una de las poblaciones tolerantes.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## **Importancia del Sorgo en México**

El sorgo representa el grano forrajero con mayor presencia en nuestro país, ya que es el principal ingrediente en la formulación de alimentos balanceados en el sector pecuario. La superficie dedicada a este cultivo alcanzó un promedio de 2 millones de hectáreas en los últimos diez años, con un volumen cercano a los 6.5 millones de toneladas anuales. El rendimiento alcanzó en los últimos cinco años entre 3.7 y 3.9 ton/ha (FAO, 2015).

## **Plagas de granos almacenados**

Diversos estudios realizados en América Central muestran que el 70 % de los granos que se malogran en la etapa de almacenamiento se debe al ataque de cerca de 100 especies de insectos (García, 2007). A nivel mundial más de 250 especies de insectos están relacionadas con los granos almacenados y de estas unas 20 tienen importancia económica, encontrándose principalmente en los órdenes Coleóptera y Lepidóptera (Serrantes, 2011).

Los insectos que atacan los granos almacenados tienen características propias que les distinguen y diferencian de los que se encuentran afectando la mayor parte de los cultivos en el campo. Estos son pequeños, prefieren los sitios oscuros, capaces de esconderse en grietas muy reducidas y se caracterizan por su elevada capacidad de reproducción, lo que permite que pocos insectos formen una población considerable en muy poco tiempo. Por esta razón, una pequeña infestación inicial puede dañar dentro de pocos meses a una gran cantidad de granos almacenados (Viñuela, 2006).

En México tenemos más de 25 especies que atacan estos productos. De estas especies una docena constituyen plagas primarias; sin embargo, la experiencia ha demostrado que las que ocasionan mayor daño a los granos y a las harinas son unas 15 especies de insectos primarios y secundarios, coleópteros y lepidópteros. Afortunadamente no todos ellos poseen la misma capacidad destructiva (Gutiérrez, 2013).

### **Descripción General de picudo del sorgo *Sitophilus granarius* (L).**

#### **Origen y distribución geográfica**

Originario de la India (Gutiérrez, 2013). Padin (2012), menciona que el gorgojo de los graneros *S. granarius*, probablemente no es nativo de América del Norte, pero es el mejor adaptado a estas áreas, que las otras dos especies. En México está registrado escasamente en algunas localidades del Norte-Centro de la república; Sonora, Chihuahua, Tamaulipas, Jalisco, Hidalgo y en la parte alta del estado de Morelos (Gutiérrez y Pérez, 2012).

#### **Clasificación Taxonómica**

El gorgojo de los cereales está situado según Borror *et al.* (1981,2005), citados por Gutiérrez y Pérez (2012) es la siguiente:

Reyno: Animal

Phylum: Artrópoda

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Orden: Coleóptera

Suborden: Polyphaga

Género: *Sitophilus*

Especie: *granarius* (L)

## **Descripción morfológica y Biología**

### **Huevo**

Los huevecillos son aproximadamente de 0.6 a 0.8 mm de largo, de forma más o menos elíptica, de color blanco opaco, en la parte superior algo aplanada y tiene una protuberancia redondeada que encajen en cubierta, la cual sostiene al huevecillo en el lugar que fue colocado. Eclosionan entre los cuatro a 15 días de acuerdo a las condiciones de temperatura y de la humedad del medio ambiente (Gutiérrez y Güemes, 2011).

### **Larva**

La larva llega a tener de 2.5 a 2.7 mm de largo, de color blanco perla, del cuerpo muy grueso, la cabeza color café claro con los márgenes anteriores de la mandíbula mucho más oscuras y más largas que anchas los ojos están representados por un par de ocelos. Tienen 8 segmentos abdominales, más pequeños que los segmentos típicos; inmediatamente después de emerger empiezan a alimentarse y a perforar galerías a través de la cubierta del grano. Tienen tres estadios larvales (Gutiérrez y Güemes, 2011).

### **Pupa**

La pupa es de 3.75 a 4.25 mm de largo, de color blanco al principio, con cabeza redonda, la probosis alargada y con dos espinas prominentes hacia delante del vertex; el abdomen posee 7 terguitos dorsales claramente perceptibles; el noveno segmento soporta dos espinas pleurales prominentes. Se encuentra en una celda preparada por la larva y requiere de 5 a 7 días para su desarrollo (Gutiérrez y Güemes, 2011).

## **Adulto**

Las hembras excavan dentro de los granos y depositan sus huevecillos en la parte medio; sobre él descargan un material gelatinoso, el cual nivela hasta dejarlo en la superficie del grano. Los huevecillos son depositados en cualquier parte del grano o semilla, pero preferentemente cerca de un extremo (Gutiérrez y Güemes, 2011).

Los insectos adultos son resistente a las temperaturas bajas y pueden sobrevivir a inviernos muy fríos. Empiezan sus actividades de ovoposición tan pronto como se eleve la temperatura; son capaces de sobrevivir sin alimentos por relativamente largos períodos. El tiempo de desarrollo de huevecillo a huevecillo es de aproximadamente de 35 días. En lugares cálidos se reproducen continuamente y en sitios fríos o durante el invierno invernán como adultos y como larvas (Gutiérrez y Güemes, 2011).

El gorgojo adulto está sexualmente maduro al término de 15 a 20 días después de haber abandonado el pupario. Generalmente el adulto mide desde 4.8 mm de largo, es de color café oscuro con pequeñas cavidades en formas ovales en el tórax (Gutiérrez y Güemes, 2011). Probocis al menos 5 veces más larga que ancha, los ojos más anchos que largos, élitros a menudo fusionados, alas no funcionales (Gutiérrez, 2013).

## **Daños por *Sitophilus granarius* (L).**

Podemos distinguir dos tipos de daños, el daño directo, el cual es provocado por el consumo del grano, a fin de alimentarse del embrión o endospermo, lo que causa pérdida de peso, reducción de poder germinativo, disminución de la cantidad de nutrientes y de la calidad de comercialización y el daño indirecto que hacer más susceptibles la contaminación de los granos a enfermedades fúngicas (González *et al.*, 2011).

## **Importancia Económica**

Se estima que de 5 a 10 % de la producción mundial de granos se pierde a causa de los insectos plaga, lo que equivale a la cantidad de granos necesaria para alimentar a 130 millones de personas anualmente (Casini y Santajuliana, 2008). En América Latina, entre 30 y 40 % de la producción de maíz se pierde durante su almacenamiento (Lagunés *et al.*, 2010). De las plagas asociadas a los granos almacenados, *Sitophilus zeamais* Motschulsky se considera la que más daño puede provocar (Ainsworth *et al.*, 2005).

## **Alternativas de Control**

A través del tiempo, el hombre ha aprendido a establecer una lucha competitiva con los insectos por la defensa del alimento de manera que ha desarrollado diferentes métodos de control que incluye medidas físicas, químicas, y biológicas (Gutiérrez y Güemes, 2011). En la actualidad, el hombre en conjunto con los avances tecnológicos ha desarrollado una variada gama de técnicas de control, basadas en el conocimiento preciso de la biología y comportamiento de las especies consideradas como plagas (Lagunés y Rodríguez, 2009).

## **Control Biológico**

Los hongos entomopatógenos poseen extrema importancia en el control de insectos, virtualmente todos los insectos son susceptibles a las enfermedades fungosas y existen aproximadamente 700 especies y alrededor de 100 géneros de hongos entomopatógenos. Dentro de los más importantes se mencionan: *Metarhizium spp*, *Beauveria spp*, *Aschersonia spp*, *Entomophthora spp*, *Zoophthoraspp*, *Erynia spp*, *Eryniopsis spp*, *Akanthomyces spp*, *Fusarium spp.*, *Hirsutella spp.*, *Hymenostilbe spp*, *Paecilomyces spp* y *Verticillium spp*,

pertenecientes a la clase Zygomycetes y Ascomycetes (López y Hans Börjes, 2011).

### **Control Físico**

El cambio o manipulación de la temperatura ya sea disminuyendo o aumentándola, se ha utilizado para controlar las plagas de granos almacenados lo anterior se basa en que el intervalo de temperatura en que se desarrollan los insectos se encuentra comprendido entre los 13 y 35°C y fuera de él los insectos generalmente mueren, sin embargo, este método no puede ser adoptado por los agricultores de escasos recursos (Fields, 2006).

### **Control Cultural**

Después de la cosecha, se deben eliminar al máximo los granos quebrados, los residuos de cosecha, polvo y los restos de tierra e insectos vivos o muertos, ya que el grano sucio o dañado se deteriora más rápido en el almacén y facilita el calentamiento y el desarrollo de plagas y enfermedades (Lindblad, 2009).

### **Control Botánico**

Los extractos de origen vegetal han sido usados como productos insecticidas desde la antigüedad. En muchas regiones del mundo, especialmente en las comunidades indígenas donde se produce para el autoconsumo, esta práctica se ha seguido usando a través de generaciones y representan un recurso renovable, más accesible y económico que los insecticidas químicos sintéticos.

Ecológica en los países industrializados, que autoriza el uso de estos compuestos, ha hecho resurgir su interés económico y la búsqueda de plantas

con nuevas actividades insecticidas. La comercialización de insecticidas de origen botánico, basados en extractos de plantas activas, ha experimentado un incremento considerable en los últimos años. Actualmente, representan un 1% del mercado mundial de insecticidas y con incrementos anuales entre el 10 y el 15% (George *et al.*, 2010)

### **Características de los extractos vegetales como insecticidas**

La primera generación de insecticidas de origen botánico incluye extractos y compuestos derivados metabolitos secundarios de plantas tales como piretrinas, rotenoides y alcaloides. Algunos de estos compuestos fueron la base para la elaboración de insecticidas sintéticos de segunda generación, como es el caso de las piretrinas naturales obtenidas de flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae) que dieron origen a los piretroides sintéticos. Entre los rotenoides, la rotenona, obtenida principalmente de las raíces de algunos géneros la familia Leguminosae (*Derris*, *Lonchocarpus*), ha sido ampliamente usada como insecticida. El alcaloide más importante como insecticida es la nicotina, que se extrae de las hojas de al menos 18 especies del género *Nicotiana* (Solanaceae) (George *et al.*, 2010).

### **Metabolito secundario**

Son compuestos químicos sintetizados de bajo peso molecular cuya respuesta es la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores.

### **Chile (*Capsicum spp.*)**

El chile piquín, es una planta anual que también crece y se desarrolla de manera continua en zonas tropicales. Además de los usos culinarios se ha reportado su actividad en problemas cardiovasculares, enfermedades crónicas degenerativas, estimulante, digestiva y colerético, así como su capacidad de

reducir los riesgos de contraer cáncer y como bactericida (Lagunés y Rodríguez, 2009).

### **Modo de Acción**

Disuelve y destruye la capa de ácidos grasos de la cutícula de los insectos permitiendo una mejor penetración y contacto del producto, con lo cual se aumenta el control. Efecto anti alimentario, actúa por ingestión causando trastornos digestivos en el insecto que deja de alimentarse, en algunos casos irritación del exoesqueleto, los bisulfatos de dialil actúan en el sistema nervioso de los insectos, provocando confusión en los sentidos y su desorientación. La capsicina actúa en base a un mecanismo irritante-repelente alterando el sistema nervioso del insecto, además es un inhibidor de ingesta (George *et al.*, 2010).

### **Romero (*Rosmarinus officinalis*)**

La planta del romero (*Rosmarinus officinalis*) es un arbusto aromático de hoja perenne, perteneciente a la familia de las labiadas, que presenta un tallo leñoso y muy ramificado de entre 1 y 2 metros de altura. Sus hojas, muy abundantes, largas y estrechas, crecen directamente sobre el tallo sin pedúnculo, con unas dimensiones de entre 1,5 y 3 cm de longitud por 2 o 3 mm de anchura. Presentan un color verde oscuro por la cara y una tonalidad blanquecina por el envés. En las plantas más jóvenes se recubren de abundantes pelos que desaparecen al crecer (Lagunés y Rodríguez, 2009).

### **Modo de Acción**

Presenta un mecanismo de acción que actúa como antagonista parcial de la acetil-colina, con acción reforzada de los flavonoides (López y Estrada, 2005; Zamora, 2008).

### **Tomillo (*Thymus vulgaris*)**

Es una planta originaria de la zona del Mediterráneo occidental, muy utilizada en gastronomía como aromatizante de diversas comidas; su aceite esencial es empleado en licorería, cosmética, perfumería y aromaterapia (George *et al.*, 2010).

#### **Modo de Acción**

El romero presenta una sustancia cristalina incolora llamada timol la cual es perteneciente al grupo de los terpenos que presentan como mecanismo de acción como repelentes y disuasorios, interfieren en el desarrollo de la hormona de la muda y de la hormona juvenil, inhibidores de la síntesis de quitina (López y estrada 2005; Zamora, 2008).

### **Ruda (*Ruta chalepensis*)**

La pimienta es una planta perenne originaria de la India, cultivada actualmente en las zonas tropicales de Asia, América y África. Procede del arbusto *Piper nigrum* L., perteneciente a la familia de las Piperáceas, del que se comercializan sus frutos aromáticos que también reciben el nombre de pimienta. El fruto es una drupa (aproximadamente 5 mm) que se puede usar entera o en polvo obteniendo variedades como la negra, blanca o verde, con la única diferencia del grado de maduración del grano (Lagunés y Rodríguez, 2009).

#### **Modo de Acción**

De acuerdo a Mora *et al.*, (2008), interfieren en la replicación de DNA, interfieren con el transporte en membranas, inhibición de enzimas, antagonista de la Acetil-colina la ruda posee distintos tipos de principios activos entre los que destacan un glucósido flavónico; la rutina, que por hidrólisis puede degradarse

en quercitina, como la genina o aglucona y las gluconas; glucosa y ramnosa (Lagunés y Rodríguez, 2009).

### **Pimienta Negra (*Piper nigrum*)**

Este insecticida de extracto de pimienta es biodegradable, no cambia el olor y sabor de las frutas y vegetales. Actúa como plaguicida contra insectos en los cultivos, plantaciones, flores y plantas. Elimina minadores, chupadores, barrenadores y masticadores, áfidos, gusano del manzano, pulgones, escarabajo de la patata, gorgojos, gusano de alambre, lagarto cogollero, mariposa de la col, tortuguilla del frijol. Utilizar en flores, ornamentales, vegetales, frutales, gramíneas, legumbres y viñedos (López y Estrada, 2005; Zamora, 2008).

### **Modo de Acción**

Presentan como mecanismo de acción en la interferencia en la replicación de DNA, interfieren con el transporte en membranas, inhibición de enzimas, antagonista de la Acetil-colina y actúa por ingestión, causando trastornos digestivos en el insecto, que deja de alimentarse (Caballero, 2004).

**Cuadro 1.** Cuadro de Principales Metabolitos Secundarios en extractos utilizados (Caballero, 2004).

<b>Extracto</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Modo de Acción</b>
<b>Pimienta negra</b>	Alcaloides	Interfieren en la replicación de DNA, Interfieren con el transporte en membranas, Inhibición de enzimas, Agonista de la Acetil Colina.
	Terpenoides	Repelentes y disuasorios Interfieren en el desarrollo de la hormona de la muda y de la hormona juvenil,

		Interfieren en el desarrollo de la hormona de la muda y de la Inhibición de hormonas digestivas, Inhibidores de la síntesis de quitina.
<b>Tomillo</b>	Flavonoides	Inhibición de NADH deshidrogenasa en el transporte respiratorio de electrones.
	Saponinas	Repelentes y disuasivos, Alteran la estructura de las membranas
<b>Ruda</b>	Alcaloides	Interfieren en la replicación de DNA, Interfieren con el transporte en membranas, Inhibición de enzimas, Agonista de la Acetil Colina.
	Cumarinas	Reaccionan de forma irreversible con el DNA.
	Saponinas	Repelentes y disuasivos, Alteran la estructura de las membranas.
<b>Romero</b>	Alcaloides	Interfieren en la replicación de DNA, Interfieren con el transporte en membranas, Inhibición de enzimas, Agonista de la Acetil Colina.
	Cumarinas	Reaccionan de forma irreversible con el DNA.

	Flavonoides	Inhibición de NADH deshidrogenasa en el transporte respiratorio de electrones.
<b>Chile</b>	Alcaloides	Interfieren en la replicación de DNA, Interfieren con el transporte en membranas, Inhibición de enzimas, Agonista de la Acetil Colina.

### **Control Químico**

En la actualidad el uso de productos químicos para controlar plagas de granos almacenados ha progresado desde el uso de productos inorgánicos de principio de siglo a la aparición y uso de un gran número de compuestos orgánicos altamente efectivos (Brown, 2007).

A largo plazo, los insecticidas pueden llegar a ser inefectivos debido al desarrollo de una población de insectos resistentes; sin embargo, también debe ser reconocido que presentan muchas ventajas y que si son usados correctamente pueden marcar la diferencia entre un buen cultivo o el fracaso total del mismo (Grajales, 2006).

### **Descripción de los productos utilizados**

#### **Características de Deltametrina**

En México los insecticidas que se encuentran autorizados para el control de *S. granarius* (L). en grano de sorgo son Deltametrina que es un insecticida

formulado a base de un piretroide. Posee amplio espectro de acción contra los insectos que atacan los cultivos agrícolas. Actúa por contacto e ingestión y posee un efectivo poder de volteo. Su acción repelente ayuda a evitar las reinfestaciones. Alto poder residual, es estable a la luz y no se lava con el agua de lluvia ni de riego. Es un insecticida moderadamente tóxico para el hombre y los animales de sangre caliente. A las dosis recomendadas no presenta fitotoxicidad en ningún cultivo (DEAQ, 2016).

### **Modo de Acción**

Afecta al sistema nervioso despolarizando la membrana de la neurona y por lo consiguiente el bloqueo de los impulsos nerviosos (IRAC, 2014).

### **Características de Abamectina**

La abamectina es un derivado de compuestos obtenidos por fermentaciones en laboratorio de la bacteria del suelo *Streptomyces avermitilis*. La abamectina es el producto de la fermentación natural de esta bacteria. Insecticida de acción translaminar y sistémica localizada, de amplio espectro (DEAQ, 2016).

### **Modo de Acción**

Las abamectinas bloquean la transmisión eléctrica de las células de los nervios y músculos, causando un flujo de iones de cloro hacia las células llegando a paralizar el sistema neuromuscular (IRAC, 2014).

## **Características de Endosulfán**

Endosulfán es un insecticida y acaricida organoclorado. Es un disruptor endocrino y es altamente tóxico en forma aguda. Es un insecticida orgánico que actúa por contacto e ingestión sobre insectos chupadores y masticadores. Con alta temperatura actúa por vaporización luego de la aplicación. Es estable a la luz y se metaboliza en la planta (Diccionario de Especialidades Agroquímicas, 2016). Actualmente, representan un 1% del mercado mundial de insecticidas y con incrementos anuales entre el 10 y el 15% (DEAQ, 2016).

## **Modo de Acción**

Bloquean la transmisión del impulso nervio a nivel neuromuscular, es decir, bloquean el flujo clorinado dependiente del ácido gammaaminibutirico (GABA), hacia el complejo acarreador de iones del receptor clorinado de GABA, es la encargada de mandar impulsos a la célula nerviosa activadora y los músculos receptores relacionados con la contracción (Brown, 2007).

## **Resistencia**

Se define como el desarrollo de la capacidad de tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de los individuos de una población de la misma especie (FAO, 2015). Resultado de la selección intensiva, por lo que el insecto adquiere la aptitud de sobrevivir en un ambiente contaminado (Metcalf, 1989),

## **Resistencia de insectos a insecticidas**

Lagunés y Villanueva (2014), definen la resistencia como la habilidad complementaria y hereditaria propia de un individuo o conjunto de ellos, que los capacita fisiológica y etológicamente para bloquear la acción tóxica de un insecticida por medio de mecanismos metabólicos y no metabólicos, y en consecuencia sobrevivir a la exposición que para otros sería letal.

## **Clasificación de Resistencia**

### **Resistencia por comportamiento**

Se presenta en especies muy hiperactivas, un indicador es la preferencia para descansar en áreas no tratadas, o bien la tendencia de detectar el insecticida y tratar de evitarlo (Carrillo, 2014). Resistencia morfológica.- mecanismo físico dado por la formación de estructuras cuticulares, no permiten que el toxico penetre la cutícula del insecto, la velocidad de penetración dependerá de las características moleculares del insecticida y de las propiedades del integumento del insecto, la cual varía considerablemente entre los estadios de vida (Barbera, 1989).

### **Resistencia fisiológica**

Esta puede ser de dos formas: No metabólico, por la insensibilidad en el sitio de acción, resistencia al derribo, Acetilcolinesterasa Insensible, penetración reducida, mayor almacenamiento y Excreción (Vais et al., 1997). Resistencia metabólica, por la adición de sistemas enzimáticos, donde los insecticidas son metabolizados y transformados en productos menos tóxicos. Las enzimas responsables para la detoxificación en los organismos son transcritas por Esterasas, Oxidasas y Glutación S-Transferasas (GST) (Flores *et al.*, 2001).

El mecanismo de resistencia más común en insectos es provocado por la actividad de esterasas detoxificativas que metabolizan (hidrolizan enlaces éster) un amplio rango de insecticidas comprendidas en familias proteicas pertenecientes a las  $\alpha$  y  $\beta$  hidrolasas (Cygler *et al.*, 1993).

### **Resistencia cruzada**

Es la resistencia simultánea de un organismo a distintos insecticidas que presentan un mismo modo de acción (Flores *et al.*, 2001).

### **Resistencia Múltiple**

Es la resistencia simultánea adquirida de un organismo a distintos insecticidas que presentan un distinto modo de acción (Carrillo, 2014).

### **Resistencia metabólica**

Los insectos resistentes pueden detoxificar o destruir la toxina más rápido que los susceptibles. Es el mecanismo más común de resistencia (Flores *et al.*, 2001).

### **Resistencia debida al comportamiento**

Los insectos resistentes pueden detectar el peligro y evadir la acción de la toxina. Los insectos se dejan de alimentar o pasan a zonas de la planta o el lote donde el insecticida no está presente (Flores *et al.*, 2001).

### **Determinación de resistencia**

Como consecuencia, la resistencia profiere cambios genéticos alterando procesos bioquímicos a nivel individual, se hace notable en una población cuando la proporción de resistencia sea tal, que se refleje en una falla en el control (Devonshire, 1990), convencionalmente se puede detectar la resistencia mediante:

## **Bioensayos**

Conocidos también como pruebas de susceptibilidad, son técnicas de laboratorio basado en la dosis-mortalidad (Lagunés y Villanueva, 2014), donde se pretende por medio de un proceso experimental conocer la efectividad biológica del pesticida, determinando la magnitud del estímulo mediante la respuesta del insecto, generalmente involucran comparaciones de la DL50, DL90 o de la concentración letal (Twine y Reynolds, 1980).

## **Métodos bioquímicos**

Técnicas sensitivas y precisas que proporcionan información de los mecanismos involucrados, pudiendo ser adaptados para detectar y monitorear la resistencia de muchas especies (Brown y Brogdon, 2007); generalmente correlacionan niveles de una enzima o una reacción enzimática específica, pueden ser cualitativos o cuantitativos, generalista o altamente específicos (Lagunés y Villanueva, 2014).

## **Pruebas moleculares**

Incrementa la precisión y reduce la variabilidad asociada a los bioensayos (Devonshire, 1990), se obtienen patrones de banda de ADN que son utilizado como marcadores genéticos para una especie (French *et al.*, 2014).

## **Pruebas bioquímicas**

Son ensayos múltiples que permiten analizar a una población de insectos cuantifican los niveles de una reacción enzimática (Brown y Brogdon, 2007). Desarrollados para cuantificar niveles de Esterasas (Brogdon y Dickinson, 2007).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Ubicación

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Toxicología de insectos, ambos del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) ubicado sobre calzada Narro 1923 a un costado de la Carretera Saltillo- Zacatecas en Buenavista Saltillo, Coahuila de Zaragoza, México.

### Material utilizado

Para establecer el experimento, se utilizó una población de *S. granarius* previamente identificada y proporcionada por el laboratorio de Toxicología del departamento de Parasitología, para realizar dichos bioensayos, se mantuvieron en frascos de 4 L con 2 kg de sorgo, en una cámara bioclimática en condiciones de temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

Los extractos vegetales fueron proporcionados por el laboratorio de toxicología, conservados durante las pruebas de bioensayos en condiciones de oscuridad y temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ , con la finalidad de evitar el deterioro de la formulación de aceites por los rayos de luz.

### Diseño Experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos y seis repeticiones cada uno las cuales fueron concentraciones de 10000 ppm, 7000 ppm, 5000 ppm, 3000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm y un testigo absoluto.

## Bioensayos

La metodología usada fue película residual propuesta por el IRAC (2014), con ligeras modificaciones, el cual consistió en obtener una solución madre emulsificada de cada uno de los extractos, utilizando una parrilla calefactora con agitador de imán a una velocidad durante 5 minutos.

Una vez que se obtuvo la concentración deseada se aplicó un mililitro de emulsión a cada caja Petri, dispersándolo por toda la superficie de la caja para formar una cobertura total; realizando cada una de las concentraciones establecidas (de 10000 ppm, 7000 ppm, 5000 ppm, 3000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm y un testigo absoluto) para posterior a esto, se dejó reposar hasta secar, una vez secadas las cajas se colocaron 30 insectos adultos de *S. granarius* en cada una de las cajas Petri. Dejándolos durante 24 horas para evaluar la mortalidad de cada una de las concentraciones.

Los adultos de *S. granarius* sobrevivientes a cada uno de los extractos fueron incubados en envases de 1 litro con medio kilo de sorgo para lograr su reproducción e incrementar la población.

Después las poblaciones resistentes se evaluaron con los siguientes productos y a las siguientes concentraciones Deltametrina (5000 ppm, 3000 ppm, 1000 ppm, 800 ppm, 500 ppm, 300 ppm), Abamectina ( 1 ppm, 0.5 ppm. 0.25 ppm, 0.1 ppm, 0.05 ppm, 0.001 ppm), Endosulfán (30,000 ppm, 25,000 ppm, 20,000 ppm, 15,000 ppm, 10,000 ppm, 7,000 ppm, 5,000 ppm 3,000 ppm) cada concentración contando con 30 insectos adultos de *S. granarius*, Una vez que se obtuvo la concentración deseada se aplicó un mililitro de la concentración a cada caja Petri, dispersándolo por toda la superficie de la caja para formar una cobertura total, dejando la caja Petri cerrada con los insectos durante 24 horas para evaluar la mortalidad de cada uno de los ingredientes activos utilizados y así los individuos sobrevivientes poder realizarles el diagnostico de enzimas de resistencia.

## **Pruebas bioquímicas**

Manejo de material biológico de laboratorio para la determinación de enzimas se mantuvieron en tubos de eppendorf de 2 ml donde se etiquetaron y se mantuvieron en refrigeración.

## **Cuantificación de proteína**

Para conocer la cantidad de proteína total se empleó la metodología descrita por Brogdon (2007). Dicho método consiste en cuantificar una proteína de referencia “Albumina sérica bovina” (BSA) para la obtención de una curva estándar, donde se consideraran los datos comprendidos entre 80 y 140 Tg/mL de proteína.

## **Preparación de reactivos**

Se disolvió 20 mL de colorante (reagente) con 80 mL de H<sub>2</sub>O esterilizada, se pasó por papel filtro para obtener una dilución, posteriormente la preparación de Buffer (KPO<sub>4</sub>), se disolvió 6.6 g de fosfato dibásico con 1.7 g fosfato monobásico, aforando a 1000 mL de H<sub>2</sub>O esterilizada.

## **Preparación de homogenatos**

En tubos eppendorf de 2 mL se colocaron 6 muestras con 3 insectos, cada muestra con 12 repeticiones. Se agregó 500 TL de diluyente buffer KPO<sub>4</sub> (fosfato de potasio), se trituraron con un homogenizador de tejidos, se aforó a 1 mL adicionándole 900 TL de diluyente.

### **Lectura de absorbancias**

Se empleó una microplaca de 96 pozos, en cada cavidad se colocaron 20 TL de homogenato, se agregaron 80 TL de buffer (KPO<sub>4</sub>) y 200 TL de colorante diluido, estos pasos se realizan por triplicado para cada repetición. Consecutivamente se colocaron en el lector de placas obteniendo los valores de absorbancia con un filtro de 630 nM, sin filtro diferencial.

### **Prueba de esterasas elevadas no específicas ( $\alpha$ y $\beta$ -Esterasas)**

Mide los niveles de  $\beta$ -Esterasas no específicas presentes.

### **Preparación de reactivos**

Acetato de  $\alpha$  y  $\beta$ -naftil: se disolvió 56 mg de  $\beta$ -naphthyl acetato en 20 mL de acetona y se agregó 80 mL de buffer (KPO<sub>4</sub>). Para preparar O-Dianisidina (fast-blue), se disolvió 50 mg de O-Dianisidine (fast-blue) en 50 mL De H<sub>2</sub>O esterilizada. Este último reactivo se preparó inmediatamente antes de usarlo, ya que se degrada fácilmente, un indicador es su coloración, cuando adquiere una tonalidad ámbar se descarta y se prepara uno nuevo.

### **Lectura de absorbancias**

En cada pozo de la microplaca, se colocaron 100 TL del homogenato de insectos, se agregó 100 TL de acetato de  $\beta$ -naftil, se dejó incubar por 10 minutos, pasado el tiempo, agregando 100 TL de Dianisidina, se dejaron incubar durante 2 minutos y se corre en el lector de placas usando un filtro de 540 nM. Una vez arrojadas las lecturas de absorbancias, se promedian según su muestra y su repetición para el análisis de resultados.

## **Prueba de reacciones de oxidasa**

Mide los niveles de peroxidasas

### **Preparación de reactivos**

Buffer de Acetato de Na (0.25 M): se disolvió 16.6 mL de 3M Sodium Acetate en 180 mL de H<sub>2</sub>O esterilizada, después se aforó a 200 mL, ajustando el pH 5.0 adicionándole ácido acético glacial. Para el TMBZ, se disolvió 50 mg de 3, 3', 5, 5'-Tetramethyl-Benzidina Dihydrochloride, en 25 mL de Metanol, agregando 75 mL de 0.25 M Na Acetato buffer, se dejó disolver durante varios minutos. Por último para el Cytochrome-C: se pesaron 10 mg de Cytochrome-C (de corazón de bovino) y fueron disueltos en 100 mL de Buffer de Acetato de Na (0.25 M) pH 5.

### **Lectura de absorbancias**

Se colocaron 100 TL del homogenato de insectos, se agregan 200 TL de TMBZ, agregado una gota (25 TL) de peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3%, se dejó incubar por 5 minutos, pasado el tiempo se corrió en el lector de placas usando un filtro de 620 nM. Una vez arrojadas las lecturas de absorbancias, se promediaron según su muestra y repetición para el análisis de resultados.

## **Prueba Glutathión S- Transferasas**

Mide los niveles de Glutathion S-transferasa presentes.

### **Preparación de reactivos**

Reduced glutathione: se disolvieron 61 mg de reduced glutathione en 100 mL de buffer ( $\text{KPO}_4$ ). Para cDNB, fueron disueltos 20 mg de 1-chloro-2,4'-dinitrobenzene en 10 mL de Acetona y se agregaron 90 mL de buffer ( $\text{KPO}_4$ ); este reactivo es viable de 3 a 4 días a 4 °C.

### **Lectura de absorbancias**

Se colocó 100 TL del homogenato de insectos, se agregaron 100 TL de Reduced glutathione, y 100 TL de cDNB, estos pasos se realizaron por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se corrió inmediatamente ( $T_0$ ) en el lector de placas usando un filtro de 340 nM, se volvió a correr transcurridos 5 minutos ( $T_5$ ). Las lecturas de absorbancias, se promediaron según su muestra y su repetición en donde se tomaron en cuenta las diferencias de ambos tiempos ( $T_5 - T_0$ ) para el análisis de resultados.

### **Prueba de Acetilcolinesterasa**

Mide la cantidad de acetilcolinesterasa presente.

### **Preparación de reactivos**

ATCH: se disolvió 70 mg de Acetylthiocholine iodide (ATCH) en 10 mL de acetona y se agregó 90 mL de buffer ( $\text{KPO}_4$ ); para el DTNB, se prepararon 13 mg de Dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) y fueron agregados 100 mL de buffer ( $\text{KPO}_4$ ), este reactivo puede durar de 3 a 4 días a 4 °C.

### **Lectura de absorbancias**

Se colocaron 100 TL del homogenato de insectos, se agregaron 100 TL de ATCH y 100 TL de DNTB, estos pasos se realizan por duplicado para cada repetición de las 20 localidades, se corrieron inmediatamente ( $T_0$ ) en el lector de placas usando un filtro de 414 nM, se volvió a correr transcurridos 10 minutos ( $T_{10}$ ). Las lecturas de absorbancias se promediaron según su muestra y su repetición en donde se tomarón en cuenta las diferencias entre ambos tiempos ( $T_{10} - T_0$ ) para el análisis de resultados.

### **Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron para obtener las proporciones de resistencia mediante el método gráfico, para poder referenciar las poblaciones respecto a su contenido de enzimas cuantificadas en absorbancias, las cuales fueron arrojadas por un espectrofotómetro, leídos con diferentes filtros según la enzima a analizar; posteriormente se obtuvieron los porcentajes de la proporción de resistencia para cada enzima en cada población.

La finalidad es el de conocer el contenido de enzimas de los individuos de la población, los resultados se realizaron a través del software R 3.1, se realizó una regresión Probit para obtener las concentraciones letales medias de los extractos y de los insecticidas y se obtuvieron los límites fiduciales mediante el método de máxima verosimilitud, para contrastar los valores de las absorbancias por enzima para cada extracto, se realizó un análisis de varianza al 5 % de significancia y las comparaciones de medias mediante Tukey.



## RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se presentan los resultados de los extractos evaluados, Pimienta negra (*Piper nigrum*), Chile (*Capsicum sp.*) Romero (*Rosmarinus officinallis*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Ruda (*Ruta chalepensis*) para el control de *Sitophilus granarius* (L.); pimienta negra presenta una  $CL_{50}$  de 675.86 ppm, siendo el extracto botánico con la concentración requerida más baja respecto a los demás, seguido de tomillo con 1181.19 ppm, aproximadamente 1.76 veces mayor que Pimienta, posteriormente Ruda y Romero con 3857.912 y 4470.68 ppm respectivamente, por último, Chile fue el extracto que requirió la mayor concentración de 7732.226 ppm para matar una probabilidad del 50 % de la población, estas concentraciones comparados con Pimienta negra son 5.70, 6.61 y 11.44 mayores para Ruda, Romero y Chile respectivamente (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Concentración letal media de los extractos evaluados

Extracto	dF	Ppm	LFI	LFS	$CL_{05}$	$CL_{95}$	Ecuación	P Valor
Tomillo	5	1181.19	969.175	1410.621	296.944	4698.559	$y=8.427+2.743(x)$	2.919e-24
Ruda	5	3857.912	2377.874	5274.598	1397.649	10648.94	$y=13.377 + 3.730 (x)$	0.0004
Romero	5	4470.68	4104.185	4826.018	2428.416	8230.457	$y= -22.653 +6.205 (x)$	1.127e-20
Chile	5	7732.226	5494.781	13135	386.82	154561.1	$y= -4.916 +1.264(x)$	7.801e-09
Pimienta	5	675.8626	379.208	977.845	85.1439	5364.92	$y=-5.173 + 1.828 (x)$	4.578e-09

dF: Grados de libertad,  $CL_{50}$ : Dosis letal media en ppm; LFI: Limite fiducial inferior en ppm, LFS: Limite fiducial superior en ppm, Intercepto y pendiente son parámetros de regresión probit y p-valor es la significancia de la pendiente.

Estudios realizados anteriormente con extracto de Pimienta negra (*Piper nigrum* L.) han comprobado su eficiencia contra *Sitophilus zeamais*, dichas investigaciones lo reportan como un agente repelente, retrasa el incremento de la población y recomiendan incluirlo en el manejo integrado de este insecto (Almeida *et al.*, 2009; Leão, 2007 y Procópio *et al.*, 2003)

Por otra parte, investigaciones con aceites esenciales (AE) de (*Thymus vulgaris*), han demostrado su acción repelente y toxico; presentando un alto porcentaje de mortalidad y efectivo contra arribo de enfermedades fúngicas; los resultados han sido notables sobre insectos de granos almacenados como maíz y frijol, los aceites esenciales podrán ser considerados como una alternativa de control sustentable sobre insectos plaga de granos almacenados (Mateeva *et al.*, 2007).

De acuerdo con Mora *et al.*, (2008), los extractos de Ruda (*Ruta chalepensis*) posee distintos tipos de principios activos para el control de gusano barrenador *Hypsipyla grandella* Zeller, en cultivos de ajo y cebolla los resultados indicaron que la ruda provocó una mortalidad del 70% de las larvas.

Varios autores han comprobado la efectividad del Chile (*Capsicum spp.*), los cuales lo han generalizado como una opción en el uso de los bioinsecticidas producidos a partir de éste, como apoyo para el control de *B. tabaci* al desarrollo de una agricultura sustentable y ecológica, trae consigo la necesidad de validar su efectividad biológica para el control de una gama cada vez más amplia de plagas de interés agrícola (López y Estrada 2005; Zamora, 2008).

López *et al.* (2011), en sus investigaciones realizadas con Romero (*Rosmarinus officinallis*) demostró su una gran eficacia insecticida para el control de plagas en cultivo de chile, el extracto de romero se sugieren por su eficacia en campo como una alternativa más para brindar a los productores en los programas de manejo integrado de mosca blanca y su efecto de control en el arribo de enfermedades fúngicas y bacterianas.

### Concentración letal media de los insecticidas + extractos

Los resultados de las concentraciones letales medias de deltametrina sobre individuos tolerantes de *Sitophilus granarius* a Pimienta negra (*Piper nigrum*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). Para el caso de pimienta negra presenta una  $CL_{50}$  de 393.045 ppm, siendo el extracto botánico con la concentración más baja respecto a los demás, seguido de Tomillo con 610.707 ppm, aproximadamente 1.55 veces mayor que Pimienta, la línea de referencia requirió una mayor concentración de 1664.97 ppm. Los resultados demuestran que la  $CL_{50}$  de los extractos de Tomillo y Pimienta, disminuyen respectivamente 63.33% y 76.39% considerablemente en comparación con la línea de referencia (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Comparación de concentración letal media de Deltametrina y extractos evaluados

Insecticida	Extracto	$CL_{50}$	LFI	LFS	$CL_{05}$	$CL_{95}$
Deltametrina	Referencia	1664.97	1114.46	2837.54	332.2301	8343.996
	Tomillo	610.707	505.82	717.877	20.44054	18246.26
	Pimienta	393.045	319.47	459.474	63.81166	2420.95

$CL_{50}$ : Dosis letal media en ppm; LFI: Limite fiducial inferior en ppm, LFS: Limite fiducial superior en ppm, Intercepto y pendiente son parámetros de regresión probit y p-valor es la significancia de la pendiente.

Por otra parte, resultados de otras investigaciones, Georghiu *et al.* (2009), reportaron una  $CL_{50}$  de 29 ppm para el ingrediente activo deltametrina trabajando con una población del Ácaro de los granos almacenados (*Glyciphagus domesticus*), resultado muy bajo a lo reportado en esta investigación.

La concentración letal media de deltametrina se redujo en las poblaciones tratadas (tolerantes) a los extractos, esto representa que ambos extractos

pueden utilizarse en un manejo de la resistencia *Sitophilus* a deltametrina e incluso a algunos insecticidas piretroides.

Los resultados de los extractos evaluados de Pimienta negra (*Piper nigrum*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) se presentan en el cuadro 4, la concentración letal de la línea de referencia presenta una  $CL_{50}$  de 155.10 ppm, siendo la población con la concentración más baja respecto a los demás, seguido de tomillo con 6654.424 ppm, aproximadamente 42.90 veces mayor que la línea de referencia, posteriormente pimienta negra que requirió una mayor concentración con 12499.41 ppm siendo 80.59 veces mayor que la línea de Referencia, ya que requirió la mayor concentración para matar una probabilidad del 50 % de la población (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Comparación de concentración letal media de Endosulfán y extractos evaluados

Insecticida	Extracto	$CL_{50}$	LFI	LFS	$CL_{05}$	$CL_{95}$
Endosulfan	Referencia	155.102	145.093	170.371	7.511	343.806
	Tomillo	6654.424	21501.04	490.0358	61.64632	718313
	Pimienta	12499.41	15593.86	10271.54	166.4634	938555.9

$CL_{50}$ : Dosis letal media en ppm; LFI: Limite fiducial inferior en ppm, LFS: Limite fiducial superior en ppm, Intercepto y pendiente son parámetros de regresión probit y p-valor es la significancia de la pendiente.

George *et al.* (2010), en investigaciones en granos almacenados, reporta al endosulfán con una  $CL_{50}$  de 149.31 ppm, en Palomilla de los cereales (*Sitotroga cerealella*), este producto que se restringe a utilizarlo en no más de una aplicación por temporada, lo cual explica los valores bajos de  $CL_{50}$  para evitar los riesgos de intoxicación en seres humanos y evitar resistencia en insectos que se encuentren en almacenes de guardado.

En este caso la concentración letal media incremento en las poblaciones tratadas (tolerantes) con ambos extractos, por lo que no es recomendable la

combinación de pimienta y tomillo con insecticidas organoclorados convencionales en especial Endosulfán o cuando existan indicios de resistencia a este grupo toxicológico, con el fin de tener un buen manejo de la resistencia en poblaciones de *Sitophilus*.

Los resultados reportados de los extractos evaluados, Pimienta negra (*Piper nigrum*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*), este último presenta una  $CL_{50}$  de 0.0092 ppm, siendo el tratamiento con la concentración más baja respecto a los demás, seguido de Pimienta con 0.052 ppm, este valor es 6 veces mayor referente a Tomillo, la población de referencia requirió una mayor concentración con 1664.97 ppm para matar una probabilidad del 50 % de la población, por lo que los individuos tolerantes a la  $CL_{50}$  de los extractos de Tomillo y Pimienta, al ser evaluados con una aplicación de Abamectina, su  $CL_{50}$  disminuye considerable y significativamente en comparación a la población de referencia hasta 4,916.66 x y 819.44 x menos para pimienta y tomillo respectivamente.

**Cuadro 5.** Comparación de concentración letal media de Abamectina y extractos evaluados

Insecticida	Extracto	$CL_{50}$	LFI	LFS	$CL_{05}$	$CL_{95}$
Abamectina	Referencia	45.233	37.188	53.187	5.523	194.354
	Tomillo	0.0092	0.024636	0.0016	8.202e-05	1.048756
	Pimienta	0.0552	0.094198	0.0306	0.0003191	9.563866

$CL_{50}$ : Dosis letal media en ppm; LFI: Limite fiducial inferior en ppm, LFS: Limite fiducial superior en ppm, Intercepto y pendiente son parámetros de regresión probit y p-valor es la significancia de la pendiente.

En estudio similares en granos almacenados, para el ácaro de las semillas (*Tyroglyphus grioti*), reportan una  $CL_{50}$  en Abamectina de 233 ppm en el estado de Zacatecas, en la región productora de frijol, dichos autores explican las siguientes causas por las que es utilizado este insecticida: su alta precisión de selección, 94 % de los productores usan sólo acaricidas para controlar el ácaro de los granos, 70 % usan sólo Abamectina para control de esta plaga; el uso racional de plaguicida abate la densidad de población (Rodríguez *et al.*, 2010).

En este caso, en nuestro estudio, la concentración letal media es muy baja en las poblaciones tratadas (tolerantes) con ambos extractos, por lo que es recomendable la combinación de Pimienta y Tomillo por sus bajas concentraciones de Abamectina para un manejo.

### Medias de absorbancias

Los resultados presentados de las medias de absorbancia (Cuadro 6), para cada una de las poblaciones tolerantes para  $\alpha$ -esterasas, los valores obtenidos fueron los siguientes: 0.452, 0.602, 0.635, 1.103, 0.635, 0.514, para las poblaciones tratadas de línea de Referencia, Tomillo, Pimienta, Chile, Ruda, Romero respectivamente. El extracto de Chile generó una gran cantidad de  $\alpha$ -esterasas, seguidos respectivamente de Pimienta (0.6356667), los cuales se encuentran en el mismo grupo estadístico, seguido de Ruda (0.6256667), Tomillo (0.6022555), Romero (0.5144167) y la línea de Referencia (0.4523333) la cual fue la que generó una menor cantidad dicha enzima a comparación del extracto de Chile.

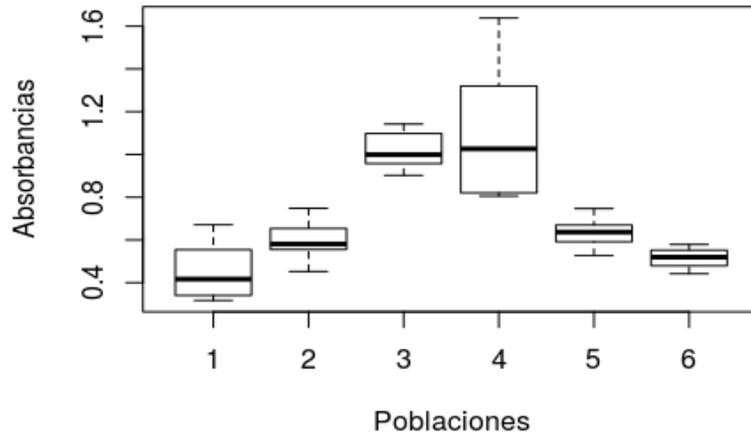
**Cuadro 6.** Comparaciones de medias de las absorbancias de  $\alpha$ -esterasas.

<b><math>\alpha</math> - esterasas.</b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Agrupación*</b>
Referencia	0.4523333	0.128	C
Tomillo	0.6022555	0.086	BC
Pimienta	0.6356667	0.082	A
Chile	1.1036667	0.312	A
Ruda	0.6256667	0.068	B
Romero	0.5144167	0.045	BC

SD: Desviación estándar, \*: Tratamientos con diferente letra son estadísticamente significativos

En investigaciones similares se han registrado que una alta presencia de  $\alpha$ -esterasas generadoras de un mecanismo de resistencia a insecticidas

organofosforados y carbamatos (Atkinson, 2001) .El rango de distribución de estos no es estático. Al respecto Tilak (2006), en sus investigaciones demostró que algunas especies de *Aedes* tiene una alta presencia  $\alpha$ -esterasas las cuales se han extendido a gran parte del territorio Asiático y América Latina, incrementando el riesgo de transmisión de dengue en estas áreas.



**Figura 2 .** Distribución de la enzima  $\alpha$ - Esterasas en población de *Sitophilus granarius* (L).

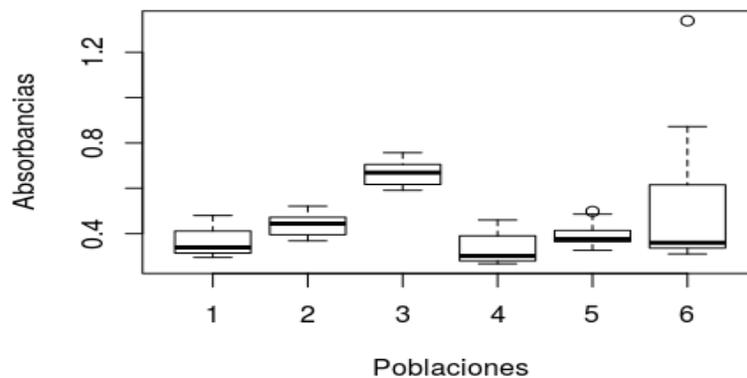
Los valores de media de absorbancia obtenidos para cada una de las poblaciones tratadas (cuadro 7), así mismo con los siguientes valores obtenidos de 0.36, 0.43, 0.66, 0.33, 0.39, 0.052, para la línea de Referencia, Tomillo, Pimienta, Chile, Ruda, Romero respectivamente siendo el extracto botánico de pimienta con mayor concentración de  $\beta$ -esterasas, seguido respectivamente de Romero (0.5233333), Tomillo (0.4343333), línea de Referencia (0.3677767), Ruda (0.3994999) y Chile (0.3333333) siendo esta la que produjo menor cantidad de dicha enzima.

**Cuadro 7.** Comparaciones de medias de las absorbancias de  $\beta$ -esterasas.

$\beta$ - Esterasas			
Tratamiento	Media	SD	Agrupación*
Referencia	0.3677767	0.06	BC
Tomillo	0.4343333	0.05	BC
Pimienta	0.6665665	0.05	A
Chile	0.3333333	0.07	C
Ruda	0.3994999	0.05	BC
Romero	0.5233333	0.31	B

SD: Desviación estándar, \*: Tratamientos con diferente letra son estadísticamente significativos.

Respectivamente Ortiz *et al.*, (2007), realiza investigaciones en garrapata de ganado (*Boophilus microphilus*), por su alta resistencia a insecticidas, demostrando que la enzima responsable de generar resistencia a estos eran las  $\beta$ - esterazas que estas son un grupo asociado al fenómeno de resistencia y asociadas a la producción masiva de enzimas hidrolíticas. Sin embargo presentes estudios con otros insectos como *Myzus persicae* nos demuestran que son que son un insecto capaz de realizar sobreproducciones de  $\beta$ - esterazas a través de las esterazas E4 y FE4 las cuales son capaces de degradar insecticidas y generar resistencia (Devonshire, 1990).



**Figura 3.** Distribución de la enzima  $\beta$ - Esterasas en población de *Sitophilus granarius* (L).

Los resultados conseguidos puede observarse la media de absorbancias de las oxidasas (cuadro 8), así mismo reportándose los siguientes valores de

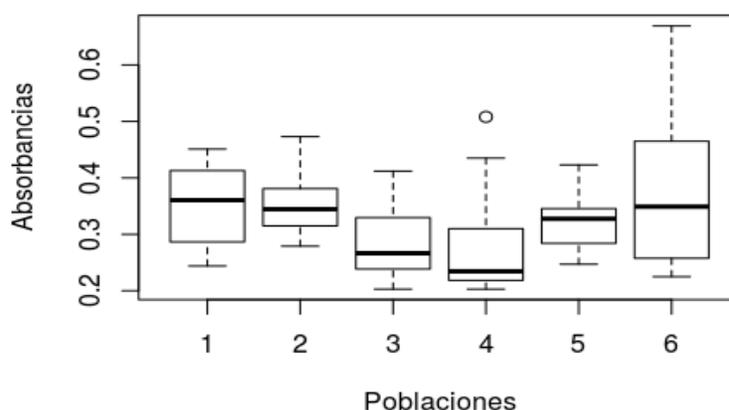
0.349, 0.352, 0.287, 0.279, 0.321, 0.374, para las poblaciones de línea Referencia, Tomillo, Pimienta, Chile, Ruda, Romero respectivamente siendo el extracto botánico de Romero (0.3745000) con mayor concentración de oxidasas, respectivamente Tomillo (0.3524167), línea de Referencia (0.3496667), Ruda (0.3217500), Pimienta (0.2870000) y Chile (0.2792500), tomando en cuenta a las oxidasas, fue la enzima que más se encuentra presente, y por lo que también se puede atribuir como un mecanismo enzimático de resistencia presente en el insecto ya que se presenta en mayor proporción que en cuanto a porcentajes de resistencia con un 100 %, los resultados nos han demostrado que las oxidasas son uno de los factores responsables de la resistencia ya que estas enzimas metabolizan dichos compuestos y los hacen menos tóxicos.

**Cuadro 8.** Comparaciones de medias de las absorbancias de oxidasas

<b>Oxidasas</b>			
<b>Tratamiento</b>	<b>MEDIA</b>	<b>SD</b>	<b>Agrupación*</b>
Referencia	0.3496667	0.072	A
Tomillo	0.3524167	0.052	A
Pimienta	0.2870000	0.072	A
Chile	0.2792500	0.101	A
Ruda	0.3217500	0.053	A
Romero	0.3745000	0.141	A

S.D: Desviación estándar, \*: Tratamientos con diferente letra son estadísticamente significativos.

Pimentel *et al.*, (2008), mencionan que las oxidasas juegan un papel fundamental en la detoxificación de diversos compuestos de plaguicidas, participando directamente en la inhabilitación del producto u oxidándolo para que entren otros sistemas enzimáticos y puedan ser detoxificados.



**Figura 4.** Distribución de la enzima oxidasas en población de *Sitophilus granarius* (L).

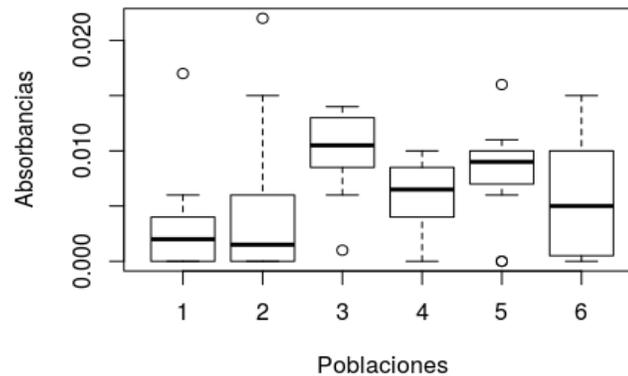
En el Cuadro 9 se presentan los valores de medias de absorbancia reportados para Glutathion S - Transferasas obtenidos para cada uno de las poblaciones tratadas, así mismo se pueden observar los siguientes resultados, siendo la línea de Referencia con mayor concentración de Glutathion S-Transferasas, respectivamente para la población de Ruda (0.003250000), Tomillo (0.004583333) Romero (0.005416667), Chile (0.006083333), Pimienta (0.009916667) la que genera menor cantidad de dicha enzima de todos los tratamientos.

**Cuadro 9.** Comparaciones de medias de las absorbancias de Glutathion S-Transferasas

Glutathion S- Transferasas			
Tratamiento	MEDIA	S.D	Agrupación*
Referencia	0.003250000	0.004	A
Tomillo	0.004583333	0.007	BA
Pimienta	0.009916667	0.003	B
Chile	0.006083333	0.003	BA
Ruda	0.008083333	0.004	BA
Romero	0.005416667	0.005	BA

S.D: Desviación estándar, \*: Tratamientos con diferente letra son estadísticamente significativos.

Sin embargo Bautista Hernández (2011), en presentes investigaciones a las GST's, demuestra que existen poblaciones de *Tribolium castaneum* que presentan niveles elevados de esta enzima, por lo que también se puede atribuir a la producción de GST's como un mecanismo enzimático de resistencia para la población, esto concuerda con investigaciones que han demostrado que las GST's son uno de los factores responsables de la resistencia a varios insecticidas.



**Figura 5.** Distribución de la enzima Glutathion S- Transferasas en población de *Sitophilus granarius* (L).

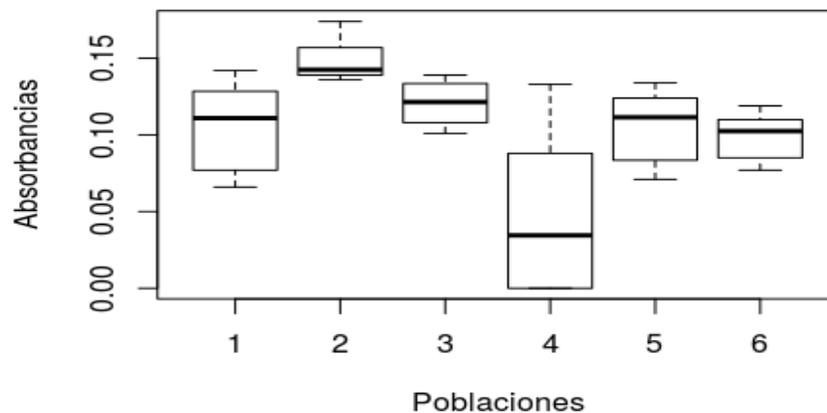
Los valores registrados de las medias de absorbancia de las acetilcolinesterasas (cuadro 10), obtenidos para cada uno de las poblaciones, así mismo los valores reportados presentan al extracto botánico de Tomillo (0.1481667) con mayor concentración de acetilcolinesterasas, respectivamente de Pimienta (0.1209167), Ruda (0.1058333), línea de Referencia (0.1047500), Romero (0.0987500) los cuales pertenecen al mismo grupo estadístico y no se encuentra una diferencia significativa y Chile (0.0470000) que es que se encuentra como el menor de los extractos que produjo dicha enzima.

**Cuadro 10.** Comparaciones de medias de las absorbancias de acetilcolinesterasas.

Acetilcolinesterasas			
Tratamiento	MEDIA	S.D	Agrupación*
Referencia	0.1047500	0.027	B
Tomillo	0.1481667	0.013	A
Pimienta	0.1209167	0.013	BC
Chile	0.0470000	0.052	C
Ruda	0.1058333	0.024	B
Romero	0.0987500	0.014	B

S.D: Desviación estándar, \*: Tratamientos con diferente letra son estadísticamente significativos.

Al respecto Devonshire (1990), quien reporta este grupo de enzimas como un factor enzimático importante en la resistencia en poblaciones de insectos. A dichas enzimas en algunas especies de insectos se han relacionado un incremento en la actividad con la resistencia a los insecticidas, también señalan que las poblaciones de insectos han sido sometidas a una elevada presión de selección con piretroides, como resultado varios autores mencionan que su actividad enzimática también está asociada con resistencia a este grupo químico (Brogdon y Barber, 1990; Flores *et al.*, 2005, 2006).



**Figura 6.** Distribución de la enzima acetilcolinesterasas en población de *Sitophilus granarius* (L).

Relacionando el contenido de enzimas y las concentraciones letales de las poblaciones tolerantes a la concentración media de tomillo y pimienta podemos deducir lo siguiente: para el caso de Deltametrina, en el extracto de Pimienta hay una disminución significativa de GST (Cuadro 9) así como una reducción de la  $CL_{50}$  de su  $CL_{50}$ , en el caso del extracto de Tomillo no encontramos ninguna referencia con las GST por lo que pudiera haber otro mecanismo detoxificativo para disminuir la concentración matar un 50% de la población, este mismo fenómeno se observa en el caso de Abamectina, por otra parte difiere en el caso de Endosulfan, en donde ambos extractos aumentan la  $CL_{50}$ , para el caso de Tomillo hay un aumento en ATCH y el resto de las enzimas se mantienen estadísticamente iguales, en Pimienta, aumentaron significativamente el contenido de  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas, por lo que este aumento en la actividad enzimática es proporcional a la  $CL_{50}$ , cabe mencionar que en todos los casos el contenido de GST disminuyeron pero solo afectó a Deltametrina y Abamectina.

## CONCLUSIONES

Los 5 extractos utilizados durante la investigación tienen un eficaz resultado para el control de poblaciones de *Sitophilus granarius*. Pimienta negra presenta una  $CL_{50}$  de 393.045 ppm, siendo el extracto botánico con la concentración más baja respecto a los demás.

La concentración letal media de Deltametrina se redujo en las poblaciones tratadas (tolerantes) con los extractos, mismo fenómeno observado en Abamectina, ambos extractos pueden utilizarse en un manejo de la resistencia *Sitophilus* a Deltametrina e incluso a algunos insecticidas piretroides así como insecticidas del grupo de las Lactonas Macroclínicas o Avermectinas.

Por otra parte Endosulfán, la concentración letal media incremento en las poblaciones tratadas, por lo que no es recomendable la combinación de Pimienta y Tomillo con insecticidas organoclorados convencionales en especial Endosulfán o cuando existan indicios de resistencia a este grupo toxicológico.

Referente al contenido de enzimas, en Deltametrina y Abamectina tratados con Pimienta, hay una reducción en GST que permiten la disminución de la  $CL_{50}$ , mientras que las tratadas con Tomillo, presentan un aumento de ATCH, pero no afecta sus  $CL_{50}$ s. para el caso de Endosulfán, aumentan significativamente  $\alpha$  y  $\beta$  esterasas en Pimienta y ATCH en Tomillo.

La elección de un extracto botánico tiene que ser en función al efecto en la concentración letal media, ya que permitirá un mejor manejo de la resistencia a insecticidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agüero**, M. (2008) Determinación de la efectividad del caisimón de anís *Piper auturium* HBK en varias preparaciones contra *Sitophilus oryzae* (L). (Coleoptera, Curculionidae). Universidad Central de Las Villas, Pág. 55
- Ainsworth**, G.C. (2005). Introduction any keys to higher taxa. En. Ainsworth, G.C. Sparrow, F.K, Saussan, A.S. The fungi an advaneedrestisc New York Academic Press Inc. Vol. IV A. 621pp.
- Almeida**, S. A.; Almeida, F. De A.C.; Santos, N. R. Dos; Medeiros, S. S. A.; Alves, H. Da S. (2005). Controle do caruncho *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleóptera: Bruchidae) utilizando extratos de Piper nigrum L. (Piperaceae).
- Atkinson** TH, Wadleigh RW, Koehler PG, Patterson RS.(2001). Pyrethroid resistance and synergism in a field strain of the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae),
- Avalos** G. A. (2009). Metabolitos secundarios de plantas. Reduca (Biología) serie, Fisiología Vegetal. Pág. 39
- Barbera** C. (2009). Pesticidas Agrícolas. Cuarta Edición. Ediciones Omega S.A. Pág. 505-507.
- Bautista**, H. Omegar. (2011). Determinación de Enzimas de Resistencia en Poblaciones de *Bactericera cockerelli* (Sulc) (HEMIPTERA: TRIOZIDAE) Procedentes de la Zona Papera de Coahuila y Nuevo León.
- Borror**, D. y Dwight M. De Long. 2005. *Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects*.

- Brogdom**, W. G and Dickinson. (2007.) Improved detection of insecticide resistences throught conversonal and molecular techniques. Ann. Rev. Entomol. 32: 145-162.
- Brown**, T. M. and Brogdom, W.G. (2007). A microssay system for measuring esterase activity and protein concentration in small samples and in high pressure liquid cromatographphy aluate fractions. Pág. 499-503.
- Caballero** G. C. (2004) Efectos naturales terpenoides naturales y hemisinteticos sobre "*Leptinotarsa decemlineata*" (say) (Coleoptera: chrysomelidae) y *Spodoptera exigua* (hübner)(lepidoptera: noctuidae). Pág. 45.
- Carrillo**, R. H. (2014). Análisis de acción conjunta de insecticidas en larvas de gusano cogollero del maíz (J.E Smith). (Lepidóptera: Noctuidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Entomología y Acarologia. Colegio de Posgraduados Chapingo, México, Pág. 82.
- Casini**, C & Santajuliana, M. 2008. Control de plagas en granos almacenados. Disponible:  
[http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/Control Plagas GranosAlmacenados.](http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/Control%20Plagas%20GranosAlmacenados)
- Casini**, C. y Santajuliana, M. (2014). Control de Plagas en granos almacenados.
- Clark**, J.M., J.G. Scott, F. Campos and J.R. Bloomquist JR. 1995. Resistance to ivermectins: extent, mechanisms, and management. Ann. Rev. Entomol. 40: 1-30.
- Cosude**, (2004). Programa Regional de Transferencia de Tecnologia en Postcosecha.
- Cyglar**, M. Schrang, J. M. Sussman J.L. (2003) Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a largue family of esterases, lipases and related proteins. Pág. 366-382.
- DEAQ** (Diccionario de Especialidades Agroquímicas). 2016.

- Devonshire**, A. L. 1990. Biochemical and molecular genetic analysis of insects populations resistant to insecticides. Brighton crop protection conference. Pest and Diseases. Pp 889-896.
- FAO**. (2015). La aplicación de los plaguicidas sin la debida seguridad provoca daños al medio ambiente. ROMA, 29 de Mayo. Disponible en línea: <http://www.fao.org/ag/ags/agse/prs.htm>
- Fields**, P. and Muir W. (2006). Physical control. Subramanyam, B. y D. Hangstrum (Eds). Integrated Management of insects in stored products. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. Pág. 195-222.
- Flores** E. A; Badii, M. H. y Ponce, G.G. (2001). Resistencia a insecticidas e insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. Vol. No. 2. Pág. 8.
- Fragoso**, D. B. Guedeja, R. N & Oliveirac, M. G. (2013) Partial characterization of glutathione S- Transferasas in pyrtroid resistant and susceptible populations of the maze weevil, *Sitophilus zeamais*. J. Stored products. Pág. 167.
- Franquet**, B. B (2006). Paises Economía del arroz: Variedades y Mejora. Pág. 35.
- French**, C.M. H., Stechen j.c brun, L.O. (2014). A molecular for endosulfan insecticide resistance in the coffee Berry, borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) Bull. Entomol. Pág. 11-16.
- García**, L.S.; Espinosa, C.C.; Bergvinson, D.J. 2007. Manual de Plagas en Granos Almacenados y Tecnologías Alternas para su Manejo y Control. CIMMYT. 55 p.
- George**, J, Bais H. P. Y Ravinshakar G. A. (2010). Biotechnological production of plant based insecticides. Critical Reviews in Biotechnology. Pag 49-47.
- Gomero**, L. (2012). Plantas que protegen a otras plantas. Una alternativa a los cultivos GM resistentes a plagas. Revista Agroecología. 15-17.

- Gonzales**, S. M., Pino, R., Valenciaga N. F. y D. S. (2011). Potenciaidades de los polvos de *Lonchocarpus punctatus* en el control de *Sitophilus Zeamais*. Pág. 89.
- Grajales**, J. S. (2006). Mechanisms of insecticides in field populations *Aedes aegypti* (L.) from Quintana Roo, Souther Mexico. J. Am Mosq. Control. Pag. 672-677.
- Georghiou**, G. P. (2009). The evolution of resistance to pesticides. Annu. Rev. Ecol. Syst. 3: 133–168.
- Gutierrez** Leañes María L., Perez Gómez José A., Narro Sánchez Jesus, Elvira Cortés Baheza y José Guadalupe Rivera Reyes (2012). Silo hermético para el control de plagas de granos almacenados en Guanajuato, México. Agric. Téc. Méx vol.33 no.3 México sep./dic. 2012.
- Gutiérrez**, Guillermo. (2009). Manejo y conservación de granos. Editorial Hemisferio Sur.
- Gutiérrez**, Guillermo. (2013). Manejo y conservación de granos 2da Edicion. Editorial Hemisferio Sur.
- Gutierrez**, J. y Guemes, A. (2011). Insectos y ácaros plagas y su control en el cultivo de arroz en América Latina. Ed. Federación Nacional de Arroceros. Bogotá, Colombia. pp: 50-54.
- IRAC** (Insecticide Resistance Action Committee). (2014). Susceptibility test methods series. [Http://www.irc-online.org/content/uploads/Method\\_006\\_v3\\_june009.pdf](http://www.irc-online.org/content/uploads/Method_006_v3_june009.pdf)
- Lagunés**, A. y Rodriguez C. (2009). Búsqueda de tecnología apropiada para el combate de plagas del maíz almacenado en condiciones rusticas. Montecillo, Mexico: CONACYT/ Colegio de Posgraduados. 150 pág.

- Lagunés**, T. A y J. Villanueva (2014). Toxicología Y Manejo de Insecticidas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México. 264 pág.
- Lalah** JO, Chien CI, Motoyama N, Dauterman WC. (2005). Glutathione S-transferase: a-Naphthyl acetate activity and possible role in insecticide resistance. J Econ Entomol(4):768-70.Lal
- Leão**, J. D. J. (2007). *Bioatividade de extratos vegetais no controle de sitophilus oryzae (LINNÉ, 1763) em arroz, 91 f.* Tesis Doctorado en Agronomía. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.
- Lindblad**, C. y Druben L. (2009). Almacenamiento del grano: manejo-secado en silos. Control de insectos y roedores. Editorial Concepto. México D.F. 331 Pág.
- Liu**, N and Scott, J. G. (2007). Phenobarbital induction of is due to trans acting for autosome 2 in house filies, Musca domestica. Insect. Mol. Biol. Pág. 77-81.
- López** Díaz María Teresa y Jesús Estrada Ortiz, (2005). Los bioinsecticidas del Nim en el control de plagas insectos en cultivos económicos. Pág. 41-49.
- López** L. V., Hans Borje J. (2011). Biodiversidad del suelo: Control biológico de nematodos Fitopatógenos por hongos nematofagos, Cuaderno de Biodiversidad. Pág. 12-15.
- Maes**, J. M. (2008). El extraño mundo de los insectos. Loa gorgojos del frijol alamacenado.
- Mateeva**, A., S. Stratieva and D. Andonov. (2007). The effect of some plant extracts on Acanthoscelides obtectus Say. Med. Fac. Landb. Toeg. Biol. Wetensch. 62:513-515.
- Metcalf**, R. L. (2009). Insecticide Resistance to Insecticides. Pestic: 333-358 pág.

- Mounches** J, Small GJ, Monro AG. (2008). Possible mechanisms of organophosphate and carbamate insecticides resistance in german cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) from different geographical areas. J Econ Entomol.
- Nerio**, L. Olivero-Verbel, J, y Stashenko, E. (2009). Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). J. stored products: 212-214.
- Ortiz** C, Enriquez D, Bisset JA. (2007). Status of resistance to insecticides in field strains of the *Blattella germanica* species (Dictyoptera: Blattellidae) from Pinar del Rio municipality. Rev. Cubana.
- Padin**, S. dal Bello, G y Fabricio, M. (2012). Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthocelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. 69-74 pág.
- Pimentel**, M. E., M. Z. da Silva, A. Raga, and M. F. Souza. (2008). Abamectin resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): selection, cross-resistance and stability of resistance. Neotropical Entomol. 34: 991–998.
- Procópio**, S. De O. Vendramin, J. D.; Júnior, J. I. R.; Santos, J. B. (2003). Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae)”, *Ciência Agrotecnologia*, Lavras..
- Ramírez**, S. (2005). Plantas con acción repelente e inhibitoria de la reproducción de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera; Bruchidae). Pag. 53
- Reyes**, V. (2006). Efectos de residuos de plantas sobre *Sitophilus oryzae* (L). Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central de Las Villas. Pag.46.

- Rodríguez, C.** (2010). Propiedades de los plaguicidas del epazote *Teloxis ambrosoides* (Chenopodiaceae). Simposio Nacional sobre sustancias Vegetales y Minerales para el combate de Plagas. Pág. 95-110.
- Rodríguez MM, Bisset JA, Molina D, Díaz C, Soca LA.** Adaptation of microtitration plate methods for quantification of the activity of esterases and glutathione-S-transferase in *Aedes aegypti*. Rev Cubana Med Trop 2001;53(1):32-6.
- Rodríguez SM, Koehler PG, Brenner RJ.** (2001). Comparative insecticide susceptibility and detoxification enzyme activities among pestiferous blattodea. Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol.
- Rodríguez, R.R.; Herrera, R.F.J.** (2009). Insectos y Hongos en los Granos Almacenados en Yucatán. Revista de la UADY, No. 227. 10 pág.
- Rodríguez, R.R.; Herrera, R.F.J.** (2010). Insectos y Hongos en los Granos Almacenados en Yucatán. Revista de la UADY, No. 228.
- Serrantes, Hilda Emilia** (2011). Insectos y ácaros del grano almacenado. Biología, daños y control. Buenos Aires.
- Shadia, E.; Abd, El Aziz.** 2011. Estrategias de Control de Plagas de Productos Almacenados. Revista de Entomología, 8: 101-122.
- Silva, G.** (2013). Insecticidas vegetales In: Radcliffes IPM World Text Book. University of Minnesota. National IPM Network CICP. USA. Pág. 117-128.
- Tilak R, Agrawal VK, Dutta J. Field.** (2006). performance of cyphenothrin: an integrated insecticide strategy against German cockroaches (Dictyoptera:Blatellidae).J Vector Borne Dis.
- Twine, H. Williamson, M. S., Hick, C. A., Eldursi, N.** (2008). Relative susceptibility and resistance of the tobacco budworm to methyl parathion and synthetic pyrethroids in southern California. Pag. 239-242.

- Vais**, H. Williamson, M. S., Hick C. A., Devonshire A. L. (2007). Functional analysis of a rat sodium channel carrying a mutation for insect knock-down resistance to pyrethroids. 427-432.
- Viñuela**, E. – Plagas de los productos almacenados. Hojas divulgadoras 1/93 HD. Unidad de Protección de Cultivos E.T.S.I.A. Madrid. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España.
- Vidal** CJ (2005) Expression of cholinesterases in brain and non brain tumor. Chem Biol Interact 157-158: 227- 232.
- Yunchuan** D, Ortelli F, Rossiter L, Hemingway J, Ranson H. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. BMC Genomics 2003;4(1):35-43.
- Zamora**, H. M. (2008). Control de plagas con aplicación de insecticidas naturales. VII Encuentro Internacional de Agricultura orgánica y sostenible.
- Zhou**, Z. H. and Syvannen, M. A. (2007). A complex glutathione transferase gene family in the house fly *Musca domestica*. Mol. Gen Genet.. Pag. 187-194.

## ANEXOS

Cuadro 9. Aplicación de Deltametrina en población de *S. granarius*

Concentración ppm	Vivos	Muertos	% Mortalidad
5000	0	20	100
3000	9	11	55
1000	14	6	30
800	16	4	20
500	17	3	15
300	19	1	5

Cuadro 10. Aplicación de Endosulfan en población de *S. granarius*

Concentración ppm	Vivos	Muertos	% Mortalidad
30,000	0	20	100
25000	0	20	100
20000	2	18	90
15000	4	16	80
10000	5	15	75
7000	8	12	60
5000	15	5	25
3000	18	2	10

Cuadro 11. Aplicación de Abamectina en población de *S. granarius*

Concentración ppm	Vivos	Muertos	% Mortalidad
1	0	20	100
0.5	0	20	100
0.25	0	20	100
0.1	1	19	95
0.5	3	17	85
0.01	4	16	80
0.001	9	11	55

Cuadro 12. Poblacion resistente de *S. granarius* a extracto de tomillo con aplicaci3n d Endosulfan.

Endosulfan	Vivos	Muertos	Mortalidad	
30,000	0	20	100	1
25000	9	11	55	0.55
20000	9	11	55	0.55
15000	7	13	65	0.65
10000	13	7	35	0.35
7000	11	9	45	0.45
5000	11	9	45	0.45
3000	11	9	45	0.45
1000	13	7	35	0.35

Cuadro 13. Poblacion resistente de *S. granarius* a extracto de tomillo con aplicaci3n de abamectina

Abamectina	Vivos	Muertos	% de Mortalidad	
1	0	20	100	
0.5	1	19	95	0.95
0.25	1	19	95	0.95
0.1	6	14	70	0.7
0.5	8	12	60	0.6
0.01	12	8	40	0.4
0.001	13	7	35	0.35

Cuadro 14. Poblaci3n resistente de *S. granarius* a extracto de tomillo con aplicaci3n de Deltametrina

Deltametrina	Vivos	Muertos	Mortalidad	
5000	3	17	85	0.85
3000	5	15	75	0.75
1000	7	13	65	0.65
800	9	11	55	0.55
500	11	9	45	0.45
300	13	7	35	0.35

Cuadro 15. Población resistente de *S. granarius* a extracto de pimienta negra con aplicación de Deltametrina

Deltametrina	Vivos	Muertos	% de Mortalidad	
5000	2	20	90.909091	0.9090909
3000	1	19	95	0.95
1000	3	17	85	0.85
800	5	15	75	0.75
500	9	11	55	0.55
300	12	8	40	0.4

Cuadro 16. Población resistente de *S. granarius* a extracto de pimienta negra con aplicación de Endosulfan

Endosulfam	Vivos	Muertos		
30,000	10	20	66.666667	0.6666667
25000	10	20	66.666667	0.6666667
20000	14	16	53.333333	0.5333333
15000	16	14	46.666667	0.4666667
10000	16	14	46.666667	0.4666667
7000	18	12	40	0.4
5000	19	11	36.666667	0.3666667
3000	22	8	26.666667	0.2666667
1000	24	6	20	0.2

Cuadro 17. Población resistente de *S. granarius* a extracto de pimienta negra con aplicación de Abamectina.

Abamectina	Vivos	Muertos		
1	2	18	90	0.9
0.5	4	16	80	0.8
0.25	7	13	65	0.65
0.1	10	10	50	0.5
0.5	12	8	40	0.4
0.01	14	6	30	0.3
0.001	17	3	15	0.15