



PROBIOL: PROGRAMA DE POSTGRADO EN BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

**ACTIVIDAD INSECTICIDA, EFICACIA Y PROPIEDADES ANTIXENÓTICAS DE
LA ALÚMINA NANOESTRUCTURADA (NSA) EN *SITOPHILUS ORYZAE*
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE), PLAGA PRIMARIA DE GRANOS
ALMACENADOS.**

Guillermo Pablo López García

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Biología de la Universidad
Nacional de Cuyo.

Director de Tesis: Dr. Teodoro Stadler

Codirector de Tesis: Dra. Adriana Ferrero

Mendoza, 2018.

Prólogo

El reciente hallazgo de nanomateriales con propiedades insecticidas, de baja toxicidad para el hombre y el ambiente, abre nuevas fronteras para la sustitución de pesticidas convencionales por tecnologías innovadoras y de bajo riesgo. Estos productos con base nanotecnológica poseen un alto potencial para ser utilizados para el control de plagas en el marco de proyectos de agricultura sustentable, en la industria y en programas para el control de vectores de enfermedades que afectan la salud humana y animal.

Desde el año 2010, a partir del descubrimiento del efecto insecticida de la alúmina nanoestructurada (NSA), el grupo de trabajo del Laboratorio de Toxicología Ambiental (IMBECU, CONICET, CCT-Mendoza) intensificó las investigaciones sobre el espectro de acción de la NSA, sus efectos sub-letales y su mecanismo de acción insecticida. Por otra parte, en colaboración con el Departamento de Ingeniería Mecánica e Industrial de la Universidad de Montana EEUU (Montana State University – Bozeman USA), fue posible introducir algunas variantes en el proceso de síntesis y caracterización de la NSA, que contribuyeron a mejorar la performance de este nuevo insecticida.

Históricamente, el descubrimiento de un nuevo principio activo siempre estuvo asociado a un largo proceso de investigación y desarrollo. Del mismo modo la NSA se encuentra sometida actualmente a un proceso de evaluación intensiva y extensiva, con la finalidad de dilucidar las diferentes variables de las que depende su mecanismo de acción, el espectro de especies plaga susceptibles a la NSA y su grado de susceptibilidad, las diferentes alternativas para formular y aplicar el producto, así como la identificación de la clase toxicológica y ecotoxicológica a la que pertenece la NSA. Actualmente, todos estos estudios se encuentran en desarrollo y sus resultados son esenciales para la aprobación del producto por las autoridades regulatorias, su correcto uso y optimización. En presente trabajo de tesis doctoral presenta nuevos resultados sobre la eficacia de la NSA en insectos plaga de los granos almacenados, que incluyen además de la toxicidad por contacto, efectos complementarios como la toxicidad por ingestión, efectos sobre la producción de progenie (F1) y efectos antixenóticos como la “excitorrepelencia”

y la fagodisuasión; cuyos resultados representan un aporte sustancial al proyecto general de evaluación de este nuevo principio activo.

Actividad insecticida, eficacia y propiedades antixenóticas de la alúmina nanoestructurada (NSA) sobre *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), plaga primaria de granos almacenados

Resumen

En el presente trabajo de tesis doctoral se evaluó las toxicidades agudas por contacto y por ingestión de la alúmina nanoestructurada (NSA), así como los efectos sub-letales de este nuevo principio activo, como efectos sobre la progenie, efecto excitorrepelente y fagodisuasivo de la NSA, en bioensayos sobre adultos del gorgojo del arroz, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) bajo condiciones de laboratorio. *Sitophilus oryzae* fue seleccionado como modelo experimental para los bioensayos, debido a que se trata de una de las especies plaga más importante y de distribución mundial, que infesta un amplio espectro de cereales y productos derivados, causando daños de hasta el 50% del total de la producción de granos almacenados.

Los resultados de los bioensayos de exposición por contacto de *Sitophilus oryzae* a trigo tratado con NSA, muestran que luego de 7 días de exposición continua, el efecto insecticida de la NSA fue mayor que el obtenido con los dos polvos inertes evaluados con fines comparativos (Protect-It® y DiatomiD). La eficacia insecticida de la NSA queda en evidencia a partir de los valores de concentración letal media obtenidos. Estos fueron $CL_{50} = 97$ (90-104) ppm para NSA, $CL_{50} = 152$ (140-165) ppm para Protect-It® y $CL_{50} = 324$ (289-371) ppm para DiatomiD®.

La toxicidad por ingestión de la NSA para *Sitophilus oryzae* fue evaluada en laboratorio mediante bioensayos de alimentación utilizando discos de harina (alimento artificial), para lo cual fue necesario diseñar y validar previamente una técnica para ensayos con polvos inertes. Para estos bioensayos se prepararon suspensiones de 500, 350, 250, 125, 75 y 36 ppm de NSA en harina de trigo y agua. El mismo procedimiento se repitió con tierra de diatomeas (DE). Los discos

de harina para los controles fueron preparados con agua y harina. Después de 35 días de exposición al alimento tratado, los valores de concentración letal media (CL_{50}) calculados fueron: $CL_{50}= 200$ (186-216) ppm para NSA, $CL_{50}= 232$ (214-251) ppm para Protect-It® y $CL_{50}= 535$ (480-615) ppm DiatomiD®. Estos resultados revelaron que la mortalidad por ingestión es un factor secundario pero relevante, que en principio ocurre durante la exposición de los insectos al sustrato tratado.

La eficacia de la NSA en condiciones de laboratorio en pequeños silos fue evaluada en el marco de la exposición de *Sitophilus oryzae* a trigo tratado vs trigo control. La supervivencia parental, el daño producido en granos (peso del grano-producción de *frass*) y la producción de progenie (efectos transgeneracionales) fueron medidos a concentraciones de 250 ppm y 500 ppm y contrastados con DE (DiatomiD® y Protect-It®.) Los ensayos de eficacia fueron conducidos en recipientes de 400 ml de chapa de hierro galvanizada (silos pequeños), un modelo experimental utilizado por primera vez con nanoinsecticidas como la NSA. La supervivencia parental obtenida fue alta en los controles (no tratados), seguidos en orden decreciente por DiatomiD®, Protect-It® y NSA. Los tratamientos con NSA, Protect-It® y DiatomiD® redujeron la pérdida de peso del grano y la producción de *frass* en el trigo infestado de modo estadísticamente significativo. Hubo un efecto significativo de los tratamientos con polvos insecticidas sobre el consumo de trigo por *Sitophilus oryzae* al día 21 ($F= 194,5$; g.l.= 6,28, $P<0.0001$) así como también en el *frass* producido ($F= 74.93$; g.l.= 6, 28; $P<0.0001$). La producción más baja de *frass* se obtuvo en el trigo tratado con NSA. Se observó una relación directa entre la supresión de la progenie (F1) con el producto y el tratamiento. La F1 se redujo significativamente en el trigo tratado con NSA ($F= 456,4$; g.l.= 6, 28; $P<0.0001$).

Las propiedades antixenóticas (excitorrepelencia y fagodisuasión) fueron estudiadas. La excitorrepelencia se evaluó en bioensayos de laboratorio con un nuevo método adaptado para polvos inertes y los datos obtenidos fueron analizados usando la ecuación para el porcentaje de excitorrepelencia (PER %). Los resultados indican que la NSA así como el DiatomiD® y Protect-It® utilizados

en el estudio no provocan excitorrepelencia. Además, se observó una respuesta de "acoplamiento" o aumento de la interacción de los insectos con la superficie tratada con NSA. La ausencia del fenómeno de excitorrepelencia se debe, en principio, al origen inorgánico de la NSA (Al_2O_3) y a que se trata de una sustancia no reactiva, no volátil e insoluble. La ausencia del efecto excitorrepelente contribuye a prolongar el tiempo de contacto del insecto con la NSA, optimizando su eficacia en los bioensayos de exposición por contacto.

El efecto fagodisuasivo de la NSA fue evaluado a través de bioensayos de preferencia con posibilidad de elección, basado en el cálculo del índice fagodisuasivo (IF%) El IF calculado mostró que tanto la NSA como DE poseen una fuerte acción fagodisuasiva sobre los insectos [NSA (IF) = 125 ppm = 44,01; 250 ppm = 83,06; 500 ppm = 96,21], [Protect-It® (IF) = 125 ppm = 45,89; 250 ppm = 85,11; 500 ppm = 92,57], [DiatomiD® (IF) = 125 ppm = 36,93; 250 ppm = 55,28; 500 ppm = 86,80]. Los resultados señalan el alto potencial de la NSA para la protección de granos almacenados. Además, el efecto subletal de la NSA puede tener un considerable impacto sobre la alimentación mediante restricciones mecánicas en los órganos de alimentación y eficiencia alimentaria, afectando el acceso y la asimilación de los nutrientes.

Los resultados de los bioensayos de laboratorio por exposición, por ingestión, excitorrepelencia y fagodisuasión, así como los de eficacia en silos (supervivencia parental, daño en granos, producción de progenie) revelan el gran potencial de la NSA para el control de plagas de granos almacenados, incluso a concentraciones subletales. Los resultados obtenidos, justifican futuras investigaciones sobre el desarrollo de nuevas variantes del nanoinsecticida NSA mediante la introducción de modificaciones en el proceso de síntesis para lograr mayor eficacia insecticida, así como en la búsqueda de potenciales aplicaciones de la NSA en diferentes ámbitos.

Palabras clave: Nanoinsecticidas. Plagas. Grano almacenado. *Sitophilus oryzae*. Eficacia insecticida. Excitorrepelencia. Fagodisuasión.

Insecticide activity, efficacy and antixenotic properties of nanostructured alumina (NSA) on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), a primary stored grain insect pest

Abstract

The acute exposure toxicity and intake toxicity of nanostructured alumina (NSA), sub-lethal effects, effects on the progeny, excitorepellency and feeding deterrence effect was assessed using the adult rice weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), in laboratory bioassays. The rice weevil was selected as model insect for these studies because its worldwide economic importance in stored product management. This insect pest species damages a broad spectrum of cereals and derivatives, causing losses of up to 50% of the total grain production worldwide.

The results of contact exposure bioassays using *Sitophilus oryzae* adults exposed to NSA-treated wheat kernels, show after 7 days of continuous exposure a higher efficacy of NSA contrasting two commercial inert dust pesticides Protect-It® y DiatomiD®. The median lethal concentration values (LC_{50}) obtained were $LC_{50}= 97$ (90-104) ppm for NSA, $LC_{50}= 152$ (140-165) ppm for Protect-It® and $LC= 324$ (289-371) ppm for DiatomiD®.

The intake toxicity of the NSA for *Sitophilus oryzae*, was assessed in laboratory through feeding bioassay using flour disc (artificial food), for this, was necessary to design and validate a new technique adapted for inert dusts. For these bioassays were prepared suspensions of 500, 350, 250, 125, 75 and 36 ppm of NSA into wheat flour and water. The same procedure was repeated for diatomaceous earth (DE); the controls were prepared with wheat flour and water. After 35 days of exposure to the treated food, the median lethal concentration (LC_{50}) value calculated were $CL_{50}= 200$ (186-216) ppm for NSA, Protect-It® $CL_{50}= 232$ (214-251) and DiatomiD® $CL_{50}= 535$ ppm (480-615) ppm. These results revealed that mortality by ingestion is a significant secondary factor, which, in principle, occur during exposure of the insects at treated substrate.

The efficacy of NSA in small metal silos under laboratory conditions was measured in the framework of exposure of *Sitophilus oryzae* to treated wheat grain

vs control. Parental survival, grain damage (grain weight - frass production) and progeny production (transgenerational effects) were measured at concentrations of 250 ppm and 500 ppm, contrasting with DE (DiatomiD® and Protect-It®). The tests were conducted in 400mL galvanized steel jars (smaller silos), an experimental model used for the first time with nanoinsecticides as NSA. Parental survival obtained was highest in the untreated controls, followed in order by DiatomiD®, Protect-It® and NSA. Treatments with NSA, Protect-It® and DiatomiD® reduced weight loss and frass production in wheat infested at statistically significant way. There was a significant insecticide treatment effect with inert dust on wheat consumed by *S.oryzae* at day 21 ($F= 194,5$; d.f.= 6,28, $P<0.0001$) as well as in produced frass ($F= 74.93$; d.f.= 6, 28; $P<0.0001$). The lowest frass production was attained in wheat treated with NSA. The degree of progeny suppression was directly related to the product and treatment rate, progeny being significantly suppressed by NSA in wheat ($F= 456,4$; d.f.= 6, 28; $P<0.0001$).

Antixenotic properties (excitorepellency and feeding deterrence) were tested. Excitorepellency was assessed by a new method adapted for inert dusts and the obtained data were analyzed using the formula for excitorepellence percentage (ERP %). Results indicated that NSA as well as DiatomiD and Protect-It used in study, are not excitorepellent to *Sitophilus oryzae*. In addition, an “engagement” response was observed or increased interaction of the insects with the NSA treated surface. The absence of repellency phenomenon it is due, in principle, to the inorganic origin of NSA ($Al_2 O_3$), because it is a non-reactive substance, non-volatile and insoluble. The absence of excitorepellent effect of NSA contribute to increase contact exposure time of insects with NSA, optimizing its effectiveness by exposure.

The feeding deterrence effect of NSA on insects was evaluated through preference bioassays with possibility to choice based on the feeding deterrence index (IF %). The calculated FI showed that NSA as DE had strong feeding deterrent action [NSA (FI) = 125 ppm = 44,01; 250 ppm = 83,06; 500 ppm = 96,21], [Protect-It® (FI) = 125 ppm = 45,89 ; 250 ppm = 85,11 ; 500 ppm = 92,57], [DiatomiD® (FI) = 125 ppm = 36,93 ; 250 ppm = 55,28; 500 ppm = 86,80]. The

results show the high potential of NSA for stored grain protection. Furthermore, the sub-lethal effect of NSA could have a considerable impact on feeding insects through the mechanical constraints on insect feeding organs and feeding efficiency, affecting the access and assimilation of nutrients.

The results of exposure laboratory bioassays, by intake, excitorepellence activity and feeding deterrence, as well as efficacy in small silos (parental survival, grain damage and progeny production) reveal the great potential of NSA as nanoinsecticide for the control of stored grain pest, even in sub-lethal concentrations. Results obtained justify further research on development of the new kind of NSA, through process modifications in the synthesis to achieve greater insecticide effectiveness, as well as in the search for potential application of NSA in different topic areas.

Key words: Nanoinsecticide. Pests. Stored grain. Insecticide efficacy. Excitorepellency. Antifeedant.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Teodoro Stadler por su apoyo y constancia a lo largo de mi formación de posgrado, tanto en el presente trabajo de tesis doctoral en biología, como en otra instancia de tesis de maestría. Investigador y director, quien me ayudó a ordenar las preguntas e ideas de esta tesis mediante fértiles espacios de reflexión y conversación. Quien abrió las puertas del Laboratorio de Toxicología Ambiental IMBECU, CCT CONICET Mendoza, donde pude aprender nuevas técnicas y desarrollar los experimentos necesarios para el presente trabajo. Además, pude nutrirme como profesional y al mismo tiempo que aprendía el valor de un buen trabajo realizado y la camaradería. Un especial agradecimiento a la Dra. Adriana Ferrero, investigadora en el Laboratorio de Zoología de Invertebrados II y docente de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, quien brindó su apoyo al codirigir este trabajo de tesis doctoral. También quiero agradecer a la Dra. Micaela Buteler del INIBIOMA, CCT CONICET Comahue, S.C. de Bariloche, Río Negro, por sus aportes al presente trabajo y su colaboración en el análisis de datos. Además agradezco, al Ing. Mariano Agustín Bernardo de la empresa Nidera S.A., por proveer de las semillas de trigo con identificación varietal para los bioensayos. También, quiero agradecer a la institución CONICET, al Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU) y a la Carrera de Doctorado en Biología de la Universidad Nacional de Cuyo (PROBIOL) por darme la posibilidad y herramientas útiles para la realización del presente trabajo de tesis doctoral.

Mi agradecimiento a mi compañera de vida Julia Victoria Mouradian y a mi hijo León Benicio López Mouradian, por el respeto a las largas horas de escritura y por su cálida compañía. En adición, también quiero agradecer la melódica compañía durante la etapa de escritura de la presente tesis a: Alfredo Kraus, Beniamino Gigli, Giuseppe di Stefano, Luigi Alba, Leopold Simoneau, Nicolai Gedda, Mario del Mónaco, Mario Lanza, Marcelo Álvarez, Michael Spyres, José Carreras, Luciano Pavarotti, Francisco Sánchez Gómez, Hilario Cuadros y Carlos Gardel. Por último, quiero agradecer la felina compañía de Hilario López Mouradian y Jacinta López Mouradian.

ÍNDICE

Prólogo	1
Resumen	2
Palabras clave	4
Abstract	5
Key words	7
Agradecimientos	8
Índice	9
Índice de figuras	14
Índice de tablas	16
Capítulo1. Introducción general	18
Plagas agrícolas y plaguicidas.....	18
Plagas de granos y productos almacenados.....	21
Daños ocasionados por plagas de productos almacenados y su impacto económico.....	22
Control de insectos plaga de productos almacenados.....	23
1. Control químico.....	23
2. Control físico por atmósferas controladas y radiaciones ionizantes.....	24
3. Control biológico.....	25
4. Otros métodos alternativos para el control de plagas en granos almacenados.....	25
Polvos inertes con actividad insecticida.....	26
Clasificación de los PIs.....	27
Mecanismo de acción insecticida de los PIs.....	29
1. Actividad insecticida por contacto de los PIs (fenómenos de superficie).....	29
2. Efectos complementarios a la toxicidad por contacto de los PIs.....	31
Hacia el reemplazo de los insecticidas convencionales de síntesis orgánica por productos biorracionales.....	32
Insecticidas con base nanotecnológica.....	32

Nanomateriales para la formulación de insecticidas.....	33
1. Nanoemulsiones.....	33
2. Insecticidas nanoformulados.....	33
Nanomateriales con actividad insecticida: nanoinsecticidas.....	34
Mecanismo de acción de nanoinsecticidas particulados.....	34
1. Mecanismo de acción insecticida de la Nanosílica.....	34
2. Mecanismo de acción insecticida de la alúmina nanoestructurada.....	35
Carga electrostática de las partículas del nanoinsecticida.....	35
Triboelectrificación en insectos.....	35
Adsorción de las partículas de NSA sobre la cutícula del insecto.....	37
El efecto “secuestrante” de la NSA sobre las ceras cuticulares del insecto.....	38
Objetivo general de la tesis.....	39
Hipótesis general de la tesis.....	41
Capítulo 2. Descripción de los materiales generales utilizados en los bioensayos.....	42
1. Material biológico.....	42
<i>Sitophilus oryzae</i> (Linnaeus, 1763).....	42
Clasificación Taxonómica.....	42
Características morfológicas distintivas de la especie.....	43
Descripción de los estados de desarrollo.....	43
Ciclo de vida.....	44
Status de plaga, distribución geográfica e importancia económica de <i>Sitophilus oryzae</i>	46
Daños provocados por <i>Sitophilus oryzae</i> en cereales y productos almacenados.....	47
Cría de <i>Sitophilus oryzae</i> en condiciones de laboratorio.....	47
2. Sustancias insecticidas utilizadas en los bioensayos.....	49
DiatomiD® (Tierra de Diatomeas).....	49
Características físico- químicas de la tierra de diatomea.....	49
Tamaño de partícula y morfología.....	50

Protect-It®.....	51
Características físico- químicas del Protect-It®.....	51
Tamaño de partícula y morfología.....	52
Alúmina nanoestructurada (NSA).....	53
Síntesis de la NSA.....	53
Características físico-químicas de la NSA.....	54
Tamaño de partículas y morfología.....	55

Capítulo 3. Evaluación de la actividad insecticida por exposición a trigo tratado con NSA, sobre adultos de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio..... 56

Introducción.....	56
Objetivos específico.....	59
Hipótesis.....	59
Materiales y métodos.....	59
1. Material biológico.....	59
2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos.....	59
Bioensayos de exposición por contacto en condiciones de laboratorio.....	59
Análisis de datos.....	61
Resultados.....	61
Discusión.....	63
Conclusiones del capítulo 3.....	64

Capítulo 4. Evaluación de la actividad insecticida por ingestión de la NSA en adultos de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio..... 65

Introducción.....	65
Objetivos específicos.....	66
Hipótesis.....	67
Materiales y métodos.....	67
1. Material biológico.....	67
2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos.....	67
Preparación del alimento artificial.....	67

Bioensayo de toxicidad por ingestión con alimento artificial.....	68
Análisis de datos.....	68
Resultados.....	69
Discusión.....	72
Conclusiones del capítulo 4.....	74

Capítulo 5. Evaluación del efecto insecticida de la NSA sobre la población parental, la producción de progenie (F1) y el daño provocado por *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) en grano almacenado en condiciones de laboratorio.....75

Introducción.....	75
Objetivo específico.....	77
Hipótesis.....	77
Materiales y métodos.....	77
1. Material biológico.....	77
2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos.....	77
Bioensayos de eficacia en silos.....	77
Análisis de datos.....	80
Resultados.....	80
Evaluación del daño.....	80
Supervivencia parental.....	81
Efectos de la NSA sobre la progenie de <i>S. oryzae</i>	82
Discusión.....	83
Conclusiones del capítulo 5.....	85

Capítulo 6. Evaluación de los efectos antixenóticos de la NSA sobre *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio.....86

Consideraciones generales.....	86
1. Evaluación del efecto repelente de la NSA en adultos de <i>S. oryzae</i>.....	88
Introducción.....	88
Objetivos específicos.....	90
Hipótesis.....	90

Materiales y métodos.....	90
1. Material biológico.....	90
2. Sustancias insecticidas utilizadas en los bioensayos.....	91
Bioensayos de excitorrepelencia.....	91
Análisis de datos.....	92
Resultados.....	92
Discusión.....	95
Conclusiones del capítulo 6 (excitorrepelencia).....	97
2. Evaluación del efecto fagodisuasivo de la NSA en adultos de <i>S. oryzae</i>...	98
Introducción.....	98
Objetivos específicos.....	100
Hipótesis.....	100
Materiales y métodos.....	100
1. Material biológico.....	100
2. Sustancias insecticidas utilizadas en los bioensayos.....	100
Preparación del alimento artificial.....	101
Bioensayos de fagodisuasión.....	101
Análisis de datos.....	102
Resultados.....	103
Discusión.....	108
Conclusiones del capítulo 6 (Fagodisuasión).....	109
Capítulo 7. Conclusiones generales de la tesis.....	110
Recomendaciones y perspectivas futuras.....	110
Aplicaciones y usos potenciales del nanoinsecticida (NSA).....	112
Artículos publicados y presentaciones a congresos.....	113
Referencias bibliográficas.....	114

Índice de figuras

Figura 1. Modificado de Sparks & Nauen, 2015.....	24
Figura 2. Clasificación de polvos inertes (PIs) (Stadler, 2016).....	28
Figura 3. Cargas eléctricas acumuladas (expresadas en picocoloumb, pC) en insectos en reposo y en movimiento (tomado de McGonigle et al., 2002).....	36
Figura 4. Cargas acumuladas por un insecto en movimiento (tomado de McGonigle et al., 2002).....	37
Figura 5. Insecto control (a). Insecto expuesto a trigo tratado con NSA (b). (Tomado de Stadler & Buteler, 2016).....	38
Figura 6. Adulto de <i>Sitophilus oryzae</i> . Extraído de http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/135846	43
Figura 7. Larvas de <i>Sitophilus oryzae</i> , extraída del interior de grano de trigo. Tomado de http://www.nbair.res.in/Insectpests/Sitophilus-oryzae.php	44
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Sitophilus oryzae</i> en condiciones de laboratorio ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a 70% de HR).....	45
Figura 9. Distribución mundial por país de <i>Sitophilus oryzae</i> . Adaptado de Invasive Species Compendium. Datasheets, maps, images, abstracts and full text on invasive species of the world. http://www.cabi.org/isc/datasheet/10887	46
Figura 10. Daño en semillas producido por <i>Sitophilus oryzae</i> (Tomado de Agro Link http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/secure/ProblemaDetalhe.aspx?p=1909).....	47
Figura 11. Recipientes de cría con <i>Sitophilus oryzae</i> sobre granos de trigo variedad baguette 501 (NIDERA). Cámara de cría del Laboratorio de Toxicología Ambiental IMBECU CONICET CCT-Mendoza.....	48
Figura 12. Micrografía MEB de tierra de diatomeas (DiatomiD®), proveniente de algas fósiles unicelulares. Magnificación: 1100X.....	50
Figura 13. Distribución de tamaño de partículas de DE, utilizando el análisis dinámico de imágenes (DIA) y el análisis dinámico de dispersión de luz (DLS) (tomado de http://www.eposters.net/pdfs/complete-size-characterization-of-diatomaceous-earth.pdf).....	51
Figura 14. Micrografía MEB de Protect-It® (tierra de diatomeas y 10% de silica gel). 1000X.....	52
Figura 15. Distribución de tamaño de partículas de Protect-It®, dispersión en agua con polimetacrilato de amonio como dispersante, Zetasizer Nano ZS. Gráfico superior en	

escala linear e histogramas en escala logarítmica (tomado de Stadler et al., 2012).....	53
Figura 16. Micrografía MEB de agregados de Alúmina nanoestructurada, a partir de nanopartículas de 40-60nm. Alta Tensión Extra (EHT): 1KV. Distancia de trabajo (WD): 5 mm. Magnificación: 13.06 KX.....	54
Figura 17. Distribución de tamaño de partículas de NSA, dispersión en agua con polimetacrilato de amonio como dispersante, Zetasizer Nano ZS. Gráfico superior en escala linear e histogramas en escala logarítmica (tomado de Stadler et al., 2012).....	55
Figura 18. Placa de Petri con trigo tratado con NSA, utilizadas para contener 20 adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> , en bioensayo de toxicidad por contacto.....	60
Figura 19. Aspecto general de los bioensayos de toxicidad por contacto.....	60
Figura 20. Porcentaje de mortalidad obtenido con adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> después de 7 días de exposición a trigo tratado con los PIs, en bioensayo de toxicidad por contacto en condiciones de laboratorio. Para las concentraciones de 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm y 500 ppm, de los tres productos ensayados.....	61
Figura 21. Porcentaje de mortalidad después de 35 días de exposición a alimento tratado con 500 ppm y control en bioensayos de alimentación (toxicidad por ingestión) en condiciones de laboratorio con adultos de <i>Sitophilus oryzae</i>	70
Figura 22. Porcentaje de mortalidad después de 35 días de exposición a alimento tratado con 36 ppm, 75 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 350 ppm y 500 ppm de NSA en bioensayos de alimentación (toxicidad por ingestión) en condiciones de laboratorio con adultos de <i>Sitophilus oryzae</i>	70
Figura 23. Porcentaje de mortalidad después de 35 días de exposición a alimento tratado con 36 ppm, 75 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 350 ppm y 500 ppm de Protect-It® en bioensayos de alimentación (toxicidad por ingestión) en condiciones de laboratorio con adultos de <i>Sitophilus oryzae</i>	71
Figura 24. Porcentaje de mortalidad después de 35 días de exposición a alimento tratado con 36 ppm, 75 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 350 ppm y 500 ppm de DiatomiD® en bioensayos de alimentación (toxicidad por ingestión) en condiciones de laboratorio con adultos de <i>Sitophilus oryzae</i>	71
Figura 25. Recipiente cilíndrico de hierro galvanizado (silo), utilizado en los bioensayos. Medidas: 1mm de espesor por 7 cm de diámetro y 12 cm de altura. Capacidad: 400 ml.....	79
Figura 26. Esquema general de la metodología utilizada en el bioensayo de eficacia en silos.....	79

Figura 27. Residuo “Frass” compuesto por excrementos de insectos, aserrín proveniente de la ingesta y restos de insectos muertos, en adición a los restos de semillas de trigo dañadas por <i>Sitophilus oryzae</i>	80
Figura 28. Placa de Petri utilizada para bioensayos de exitorrepelencia con dos secciones semicirculares equivalentes. Una de las mitades se cubrió con el material de ensayo, mientras que la otra mitad se mantuvo libre de partículas.....	92
Figura 29. Ejemplo de la arena en placa de petri utilizada en bioensayos de fagodisuasión (preferencia con posibilidad de elección), utilizando alimento artificial control vs tratados con NSA, Protect-It® y DiatomiD® respectivamente.....	102
Figura 30. Índice fagodisuasivo IF (%) obtenido para NSA, Protect-It® y DiatomiD®, en bioensayos de preferencia con adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> . Para una concentración de 125 ppm.....	106
Figura 31. Índice fagodisuasivo IF (%) obtenido para NSA, Protect-It® y DiatomiD®, en bioensayos de preferencia con adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> . Para una concentración de 250 ppm.....	106
Figura 32. Índice fagodisuasivo IF (%) obtenido para NSA, Protect-It® y DiatomiD®, en bioensayos de preferencia con adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> . Para una concentración de 500 ppm.....	107
Figura 33. Índices fagodisuasivo IF (%) por tratamiento, por producto y concentración, en bioensayos de preferencia con NSA, Protect-It® y DiatomiD® en adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> . Valores con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05).....	107

Índice de tablas

Tabla 1. Actividad insecticida por exposición (toxicidad por contacto) a trigo tratado comparada de los tres PIs sobre <i>Sitophilus oryzae</i> : resultados del análisis de la varianza para modelos mixtos (SAS 9.3 2011). Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05).....	62
Tabla 2. Análisis Probit de los datos de mortalidad de <i>Sitophilus oryzae</i> expuesto a trigo tratado con NSA, Protect-It® y DiatomiD®. Tiempo de exposición = 7 días; n = 20; sustrato = granos de trigo tratados.....	63
Tabla 3. Análisis Probit de los datos de mortalidad de <i>Sitophilus oryzae</i> expuesto a alimento artificial tratado con NSA, DiatomiD® y Protect-It®. Valores de la concentración letal (CL) y parámetros de la curva de regresión. Tiempo de exposición = 35 días; n=20.....	73
Tabla 4. Valores medios de pérdida de peso de trigo, producción de frass, después de 21 días de exposición a granos tratados y sin tratar de la generación parental. Número de adultos de <i>Sitophilus oryzae</i> emergidos en F1 después de 42 días de desarrollo a	

27 ± 1 °C y 75 ± 5% HR. Tasa de multiplicación obtenida y promedio de mortalidad de la población parental a los 7, 14 y 21 días.....81

Tabla 5. Nº promedio de individuos muertos/réplica obtenido en *Sitophilus oryzae* después de 21 días de exposición a trigo tratado vs trigo sin tratar (control) en silos, bajo condiciones de laboratorio. Resultados del análisis de la varianza (SAS 9.3 2011), tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05). N (n° de réplicas) = 5.....82

Tabla 6. Porcentaje de supervivencia medio de la población parental de adultos de *Sitophilus oryzae* a los 7, 14 y 21 días de exposición.....82

Tabla 7. Resultados del screening para el bioensayo de exitorrepelencia con NSA, Protect-It® y DiatomiD® en *Sitophilus oryzae*. PER%= porcentaje de exitorrepelencia. Hs= horas a partir del inicio del ensayo. R= número de réplicas. CV=coeficiente de variación (cociente entre desviación estándar y promedio). Números positivos indican exitorrepelencia, números negativos indican atractancia. n (número de insectos por réplica)= 16.....93

Tabla 8. Resultados de los bioensayos de exitorrepelencia con NSA, Protect-It® y DiatomiD®. Número de insectos por réplica =16. Tiempo de ensayo= 6hs. PER% (porcentaje de exitorrepelencia) = 2 x (C-50). R = réplicas. (Números positivos indican exitorrepelencia, números negativos indican atractancia). (F=0, 68; df=3; P<0,5787).....94

Tabla 9. Resultados del análisis de la varianza para modelos mixtos (SAS 9.3 2011) del efecto exitorrepelente de NSA, Protect-It® y DiatomiD® sobre *Sitophilus oryzae*. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05).....94

Tabla 10. Efecto fagodisuasivo en *Sitophilus oryzae*: consumo (mg de alimento) de *Sitophilus oryzae* por tratamiento en bioensayos de preferencia. R = réplicas. C = disco control. 125 ppm, 250 ppm y 500 ppm = discos tratados. IF (%) = Índice Fagodisuasivo.....104

Tabla 11. Efecto fagodisuasivo en *Sitophilus oryzae*: consumo medio (mg de alimento) de *Sitophilus oryzae* por tratamiento en bioensayos de preferencia. C = disco control. 125 ppm, 250 ppm y 500 ppm = discos tratados. IF (%) = Índice Fagodisuasivo medio.....105

Tabla 12. Efecto fagodisuasivo de NSA, Protect-It® y NSA y DiatomiD® en *Sitophilus oryzae*: resultados del análisis de la varianza para modelos mixtos (SAS 9.3 2011). Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05).....105

Capítulo 1

Introducción general

Plagas agrícolas y plaguicidas

La práctica de la agricultura y de la ganadería ha sido, sin lugar a dudas, el cambio más drástico de la especie humana en toda su historia evolutiva. Éstas prácticas dieron lugar a los asentamientos humanos con elevada densidad poblacional y su a posterior desarrollo sociocultural. Para garantizar la estabilidad de los asentamientos humanos, el hombre desarrolló técnicas eficientes de producción de alimentos, como la domesticación de animales y el cultivo de especies vegetales, asegurando así cierta independencia del medio natural. Sin embargo, la consecuencia del uso de la tierra y los recursos, fue la proliferación de enfermedades animales y plagas agrícolas. Adicionalmente, para garantizar el suministro de alimentos en épocas de escasez, el hombre desarrolló técnicas de almacenamiento y conservación en postcosecha. Esto trajo como consecuencia directa un nuevo problema: la proliferación de las plagas de productos almacenados, que compiten con el hombre por el mismo recurso, debido a su rápido desarrollo poblacional y altas tasas de reproducción (De los Mozos Pascual, 1997; Benzi, 2013).

La producción de alimentos y el control de las enfermedades son y serán dos de los mayores desafíos asociados al aumento de la población mundial que la humanidad enfrenta desde principios del siglo XX. El incremento exponencial de la población conduce al aumento de la demanda de alimentos, poniendo en riesgo los recursos para las generaciones futuras (Godfray et al., 2010). La población mundial crece 1,3% por día, superó los 7200 millones de habitantes en 2014, y se estima que crecerá hasta los 9000 millones de habitantes para el año 2070 (Fischetti, 2015). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), en los próximos 20 años se necesitarán anualmente alrededor de 1.000 millones de toneladas de cereales para satisfacer la demanda mundial de alimentos (FAO, 2010, 2012; Vessuri & de Montevideo, 2016).

En este contexto mundial, tanto en pre como en postcosecha, la presencia de plagas y enfermedades de los cultivos tienen serias repercusiones, afectando la producción agrícola mundial entre un 20 y un 40% (FAO, 2012, 2016). Las plagas agrícolas son una de las mayores amenazas a las que se enfrentan los países productores y exportadores de cereales, siendo los insectos los principales responsables de las pérdidas económicas, tanto en cultivos como en productos almacenados (FAO, 2010; INTA, 2012).

Desde principios de la revolución agrícola, las principales herramientas para el control de plagas, en general, fueron y continúan siendo los insecticidas de síntesis orgánica, a pesar de su perfil toxicológico y sus efectos ambientales indeseables. Los plaguicidas son omnipresentes debido a que se utilizan en la agricultura, ganadería y se encuentran en trazas en muchos de nuestros alimentos. Menos obvio es el hecho de que muchas personas utilizan pesticidas en sus hogares e incluso sobre su piel (repelentes). De acuerdo con el NIH (National Institute of Environmental Health Sciences), los efectos asociados a la utilización y contaminación con plaguicidas incluyen cáncer y daño en los sistemas nervioso, endocrino y reproductivo, además de diabetes y efectos neurológicos (<https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/pesticides/> [revisado el 1/02/2017]).

Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), los plaguicidas son la manera más efectiva para controlar a las plagas (<http://www.epa.gov/oecaagct/ag101/pestbenefits.html> [revisado el 1/02/2017]) y como consecuencia, su uso está arraigado de manera rutinaria en la vida de las personas. Los consumidores obtienen beneficios del uso de pesticidas a través de la reducción de los costos en la producción, sanidad de los alimentos y prolongación de la vida media de éstos, debido a que las poblaciones de plagas se mantienen controladas. Además, los pesticidas permiten el control de poblaciones de insectos y roedores transmisores de enfermedades. Los plaguicidas también son necesarios para la protección de infraestructuras (casas, edificios, etc.) de los daños estructurales causados por insectos, como por ejemplo termitas y hormigas carpinteras.

A pesar de los múltiples beneficios que aportan los pesticidas convencionales a la agricultura, la economía y al control de vectores de enfermedades, estos productos poseen una faceta negativa de gran relevancia (Cooper & Dobson, 2007; Aktar et al., 2009). Compuestos tales como organofosforados, carbamatos, piretroides y sulfonilureas son responsables de intoxicaciones agudas, frecuentes en personas relacionadas con la aplicación de estos productos. Los efectos de la exposición a largo plazo a pequeñas cantidades de estos plaguicidas aún están en discusión, pero los estudios disponibles los relacionan con una amplia variedad de enfermedades como diabetes, cáncer y defectos neurológicos. Específicamente, los carbamatos y los organofosforados afectan el sistema nervioso interrumpiendo la transmisión del impulso nervioso (<http://www.epa.gov/pesticides/health/human.htm> [revisado el 1/02/2017]).

Otros estudios han demostrado que la exposición crónica a dosis bajas de plaguicidas aumenta el riesgo de deterioro cognitivo y enfermedades como Alzheimer y Parkinson (Kamel, 2013). Un estudio en más de 30.000 aplicadores vinculó la exposición a siete plaguicidas que contienen compuestos clorados (incluyendo dos herbicidas, dos insecticidas organofosforados y dos organoclorados) a un mayor riesgo de desarrollar diabetes. La exposición a los plaguicidas también se correlaciona con el aumento de infertilidad en mujeres y problemas de desarrollo en niños (Sanborn et al., 2007; <http://www.niehs.nih.gov/news/newsroom/releases/2008/june04/> [revisado 1/02/2017]; Lepori et al., 2013)

Afortunadamente, el uso de plaguicidas es monitoreado y regulado por agencias gubernamentales y organizaciones internacionales como la OMS (Organización Mundial de la Salud). Asimismo en las últimas décadas, la inocuidad y calidad de los alimentos se ha transformado en el requisito principal de los mercados a nivel internacional y entre los consumidores. La progresiva imposición de restricciones en los límites máximos de residuos de insecticidas de síntesis en alimentos es cada vez mayor, de modo que el número de productos disponibles para tal fin se ve proporcionalmente limitado. Sobre la base de estos antecedentes, los científicos y la industria han enfocado su atención en el desarrollo de nuevos pesticidas más amigables con la salud y el medio ambiente,

como productos a base de extractos vegetales, aceites esenciales y/o polvos inorgánicos (<http://npic.orst.edu/reg/intreg.es.html>; Liu & Ho, 1999; Altieri & Nicholls, 2000; Lorini & Beckel, 2006; Stadler et al., 2010a; Stefanazzi, 2011; Frederick & Subramanyam, 2016). Es deseable entonces que estos esfuerzos se conviertan en parte de la solución permanente hacia una agricultura de menor impacto para la salud y el ambiente.

Plagas de granos y productos almacenados

Los granos almacenados constituyen un ecosistema de postcosecha o agroecosistema complejo, que soporta múltiples niveles tróficos debido a las interacciones entre semillas, luz, temperatura, humedad y agentes bióticos como insectos y hongos. La mayoría de las plagas se alimentan directamente de las semillas o de las mezclas de desechos de grano y hongos, y estas a su vez sostienen a poblaciones de artrópodos parásitos y predadores. Finalmente, los roedores y aves plagas están presentes de manera oportunista. El grano almacenado proporciona un ambiente protegido, único con alimento abundante y nutritivo para las especies adecuadamente adaptadas y también, proporciona el potencial para la dispersión local y global de especies plaga a través del transporte y las redes de comercialización. En Argentina, el grano normalmente se almacena durante 6 meses o más (Bragachini et al., 2003), períodos suficientemente largos como para que los productos almacenados sean afectados por diferentes especies de plagas y hongos (Flinn et al., 2010).

Al menos 1900 especies de artrópodos se desarrollan en granos almacenados o se asocian con alimentos a base de grano, y docenas de éstos afectan directamente la calidad de los productos y sub-productos a nivel global (Hagstrum & Subramanyam 2009). Según algunos autores, estas plagas son clasificadas de acuerdo con su ciclo de vida. Las especies cuyas larvas se desarrollan dentro de la semilla (Hagstrum et al., 2012), causando daños físicos significativos en el grano, son consideradas las plagas más destructivas y son llamadas primarias. Las mismas están representadas por unas pocas especies como *Sitophilus oryzae* Linneaus 1763 (Curculionidae), *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Curculionidae), *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792)

(Bostrichidae) y *Sitotroga cerealella* Olivier, 1789 (Gelechiidae). Las plagas secundarias incluyen decenas de especies de coleópteros, ácaros y lepidópteros (Hagstrum et al., 2012). Sus larvas y adultos se alimentan de granos rotos, polvo de grano, harina, esporas y micelios de hongos. Entre las plagas secundarias importantes se encuentran *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) y *Tribolium confusum* Jaquelin Du Val, 1863 (Tenebrionidae), *Cryptolestes ferrugineus* Stephens, 1830 (Laemophloeidae). También otras especies como *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Silvanidae), *Prostephanus truncatus* (Horn, 1878) (Bostrichidae), *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Tenebrionidae), *Trogoderma granarium* Everts, 1899 (Dermestidae) y *Lasioderma serricorne* (Fabricius, 1792) (Anobiidae), son relevantes y presentan una amplia distribución (De los Mozos Pascual, 1997; Kalinović et al., 2002; Rees, 2004; Pascual-Villalobos, 2006; Sahaf et al., 2008). El trigo y otros cereales son infestados durante o después de la cosecha por insectos presentes en cosechadoras, camiones, contenedores o elevadores, atravesando así el sistema de comercialización y no hay evidencia publicada que asegure que las infestaciones por *S. oryzae* y *R. dominica* se desarrollen en el campo antes de la cosecha (Hagstrum et al., 2010).

En Estados Unidos por ejemplo, la comercialización del trigo se realiza sobre la base de la densidad aparente del grano, los niveles de material fino o *frass* (residuo compuesto por aserrín proveniente de la alimentación y excreciones de los insectos), la ausencia de insectos vivos perjudiciales y la proporción de granos dañados, entre otros factores. Por lo tanto, las plagas secundarias como *T. castaneum* y *C. ferrugineus* y las primarias más comunes como *R. dominica* y *S. oryzae*, han sido el foco de muchas investigaciones recientes para refinar estrategias de manejo de plagas clave del cereal almacenado (Hagstrum et al., 2010). En Argentina, según Descamps (2002), las especies plaga de los granos almacenados más relevantes son *S. oryzae* y *T. castaneum*.

Daños ocasionados por plagas de productos almacenados y su impacto económico

Se estima que, en todo el mundo, las pérdidas anuales en postcosecha rondan el 20%, del cual el 10% corresponde al daño ocasionado por insectos y el

resto a aves, roedores y microorganismos (Gillott, 2005). En países desarrollados, las pérdidas por insectos rondan de 5 a 10%, mientras que en países emergentes pueden alcanzar el 30% (Vilchez & Miller, 2006; INTA, 2008). En Argentina las pérdidas ocasionadas por insectos y/o ácaros asociados a granos almacenados y productos derivados, rondan el 10% de la producción total (Viale, 1996; INTA, 2012; <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/ControlPlagasGranosAlmacenados.asp> / [revisado 1/02/2017]).

Control de insectos plaga de productos almacenados

Entre las primeras medidas documentadas para la protección de productos almacenados, se citan la utilización de carbonato sódico, grasas, cenizas de excrementos animales para aplicar sobre las paredes de los silos y la fumigación con inciensos preparados a base de resinas, gomas y especias (Levinson & Levinson, 1989). A partir del advenimiento de los insecticidas químicos de síntesis orgánica, la mayoría de estas técnicas cayeron en desuso y fueron reemplazadas por otras prácticas como:

1. Control químico

En la actualidad, las medidas de control de plagas se basan principalmente en la aplicación de insecticidas de síntesis química (Dal Bello & Padín, 2006; Sahaf et al., 2008). En Argentina y en gran parte del mundo, los más utilizados son los insecticidas convencionales como organofosforados (diclorvos, malatión, metilclorpirifós, metilpirimifós), piretroides (deltametrina) y piretrinas (Perez-Mendoza, 1999; CASAFE, 2005; Alleoni & Ferreira, 2006; Fields, 2006). Por otra parte, se utilizan fumigantes como el bromuro de metilo, fosfina y el fluoruro sulfúrico (Ducom et al., 2002; Navarro, 2006). A pesar de tratarse de tecnologías de bajo costo y fácil aplicación, éstas son perjudiciales para la salud y el ambiente, además son difícilmente sustentables debido al fenómeno de la resistencia.

La presión de selección ejercida con los insecticidas de síntesis orgánica sobre las poblaciones de insectos plaga, conduce a la aparición de fenómenos de resistencia que llevan a la pérdida de su eficacia (Pacheco et al., 1990; Corrêa et al., 2006; Araújo et al., 2006; Sousa et al., 2009; Spark & Nauen, 2015). Por

ejemplo, a mediados de los años noventa, ya se habían registrado 550 especies resistentes a insecticidas sintéticos (Metcalf, 1994), llegando a 586 especies resistentes en 2014 (Spark & Nauen, 2015). La Figura 1 muestra claramente el “círculo vicioso” de los plaguicidas, en el que el fenómeno de resistencia impulsa a que la industria desarrolle nuevos productos insecticidas, que a su vez pierden eficacia debido al desarrollo de resistencia. Este fenómeno se ve potenciado porque una especie plaga puede desarrollar resistencia a uno o más principios activos. En la Figura 1 (a) se observa que existen 586 especies plaga que han desarrollado resistencia y en la Figura 1 (b) se observa que hay 325 tipos de insecticidas disponibles (Spark & Nauen, 2015).

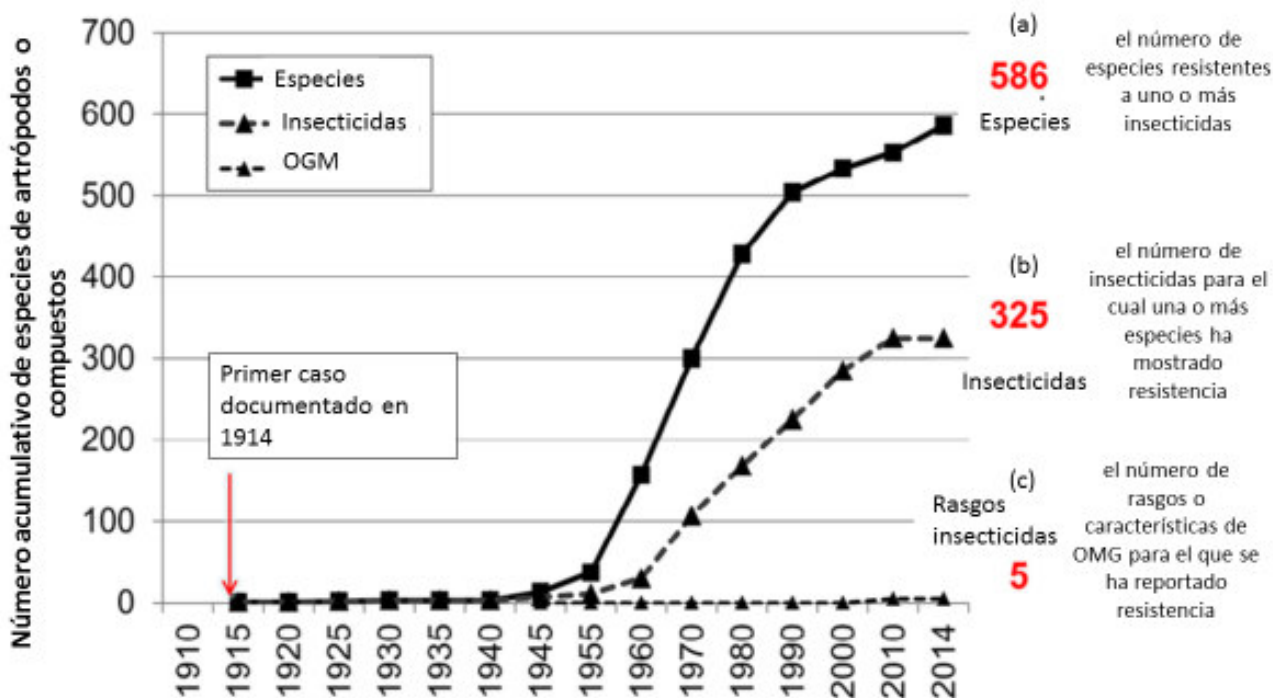


Figura 1. Modificado de Sparks & Nauen, 2015. Número acumulativo de insecticidas y especies resistentes.

En la Argentina, el primer caso de resistencia en insectos plaga de granos almacenados fue detectado en poblaciones de *T. castaneum* y *S. oryzae* en 1985 (Picollo de Villar et al., 1985), hallazgos que posteriormente se generalizaron (Ferrero, 1988; Picollo de Villar et al., 1992; Descamps, 2002; Stadler et al., 2003).

2. Control físico por atmósferas controladas y radiaciones ionizantes

El control físico de insectos a través de atmósferas modificadas (AM) forma parte de las renovadas tecnologías utilizadas para el control de plagas en productos almacenados. Si bien este método ha sido utilizado durante siglos, actualmente el empleo de AM combinadas con altas temperaturas forma parte de las nuevas técnicas que han permitido reemplazar con gran éxito a los fumigantes convencionales (Soderstrom et al., 1992; Bell & Conyers, 2002; Navarro, 2006). Otros métodos físicos efectivos pero más costosos son las radiaciones ionizantes y el almacenamiento hermético. Por otro lado, otros métodos físicos como el uso de sustancias inorgánicas o “polvos inertes” han adquirido nuevamente auge en los últimos años (Mansour & Al-Blacheer, 1995; Subramanyam & Roesli, 2000; Adler et al., 2000; Fields, 2006; Korunic & Fields, 2006; Lorini & Beckel, 2006; Ignatowicz & Olejarski, 2008; Korunic, 2013).

3. Control biológico

El control biológico de plagas de granos almacenados ha sido propuesto por varios autores, y se basa en la utilización de enemigos naturales para reducir la densidad de población de las plagas. Los enemigos naturales utilizados en el control de plagas de grano almacenado incluyen parasitoides del orden Hymenoptera y predadores de los órdenes Coleoptera, Hemiptera y Acari (Collatz et al., 2007). Otro grupo interesante de enemigos naturales son los hongos entomopatógenos (de Conte Carvalho de Alencar et al., 2008). Sin embargo, hasta el momento, el control biológico de plagas de granos almacenados no fue llevado a la práctica.

4. Otros métodos alternativos para el control de plagas en granos almacenados

La gama de prácticas para el control de plagas en granos almacenados y las alternativas al uso de insecticidas convencionales es amplia. Además de los métodos físicos como los polvos inertes y el control biológico, también fueron evaluados extractos vegetales, aceites esenciales, feromonas y reguladores de crecimiento (IGRs), entre otros. Sin embargo, estas alternativas aún no fueron llevadas a la práctica como consecuencia de la complejidad de su implementación,

en contraste con el bajo costo y simplicidad de las aplicaciones de insecticidas convencionales. Actualmente, a partir de la concientización del público y de las autoridades fitosanitarias acerca de los peligros que representan los insecticidas convencionales para la salud humana y el medio ambiente, surgió una rápida revalorización de tecnologías y productos que habían sido desechados por costo y complejidad. A pesar de ello, la transición desde el uso de paquetes tecnológicos basados en el empleo de productos fitosanitarios convencionales a métodos sustentables representa un cambio sustancial de mentalidad a la hora del manejo y control de plagas (Butenandt et al., 1959; de Fluiter, 1964; Jacobson, 1966; Butler, 1967; Caltagirone, 1981; Gooding, 1990; Thacker, 2002; Van Driesche & Simberloff, 2016).

Polvos inertes con actividad insecticida

Los polvos minerales o polvos inertes (PIs) con propiedades insecticidas son productos que reúnen muchas de las características del insecticida ideal (Coats, 1982) tales como baja toxicidad para el hombre y el ambiente, bajo costo y baja probabilidad de causar resistencia en los insectos (Ebeling 1971; Banks & Fields 1995; D'Atonio, 1997; Golob, 1997; Subramanyam & Roesli, 2000). Los polvos insecticidas, sin embargo, a pesar de poseer cualidades como agentes para el control de plagas, están asociados a prácticas agrícolas ancestrales y de baja tecnología (Glenn & Puterka, 2005). Los primeros casos documentados del uso de PIs datan de 2000 a.C. y se refieren al control de plagas con tierra de diatomeas (Kieselguhr) en China (Allen, 1972). Las cenizas y el carbonato de sodio fueron utilizados en el antiguo Egipto (1500 a.C.), y su tecnología de aplicación quedó en forma de recomendaciones escritas (Panagiotakopulu et al., 1995).

La utilización de polvos insecticidas inorgánicos como tierra de diatomeas (DE) y cenizas para controlar plagas en productos almacenados posee varias ventajas. Por un lado, la baja toxicidad para el hombre los hace seguros para los aplicadores en las áreas de almacenamiento (Bridgeman, 2000), en contraste con los pesticidas altamente tóxicos como fosfina y bromuro de metilo, que requieren medidas y equipamiento especiales de protección. A diferencia de los fumigantes

como fosfina (PH_3), los PIs no controlan los insectos de manera eficiente en granos húmedos (Le Patourel, 1986; Aldryhim, 1993), pero proporcionan una protección duradera (White et al., 1966) en comparación con los insecticidas convencionales (fosfina, organofosforados, etc) que disipan y se degradan rápidamente (Afridi et al., 2001).

Clasificación de los PIs

Los PIs utilizados para la protección de granos almacenados fueron inicialmente clasificados en cuatro grupos (Figura 2) (Banks & Fields, 1995): En el primero se encuentran las arcillas, arenas, cenizas provenientes de material vegetal y cenizas volcánicas. Estos materiales son efectivos contra las plagas de productos almacenados a altas concentraciones (>10 g/kg o 10.000 ppm), salvo la ceniza volcánica, que puede ser eficaz en un rango de concentraciones de 5000 ppm a 10000 ppm (Subramanyam & Roesli, 2000; Buteler et al., 2011). La mayoría de estos polvos han sido utilizados en países en desarrollo y en economías de subsistencia, pero debido a las altas concentraciones utilizadas, no son aceptables para los estándares modernos (Golob & Webley 1980; Subramanyam & Roesli, 2000).

El segundo grupo consiste en minerales tales como dolomita, magnesita, oxiclورو de cobre, roca fosfórica y tierra de azufre, cal (hidróxido de calcio), piedra caliza (carbonato de calcio), y cloruro de sodio o sal común (Golob, 1997). Estos minerales han sido evaluados experimentalmente y parecen ofrecer cierta protección a los granos almacenados, a concentraciones superiores a 10 g/kg o 10.000 ppm (Jenkins, 1940; Parkin, 1944; Subramanyam & Roesli, 2000).

El tercer grupo abarca los polvos que contienen sílice natural, tal como la tierra de diatomeas (DE) compuesta por esqueletos fosilizados de algas unicelulares (diatomeas) que se obtienen de yacimientos de diatomito de espesor y profundidad variables, que son explotados en diferentes partes del mundo. El mineral crudo es extraído, molido, secado a bajas temperaturas y refinado. La DE está compuesta principalmente por dióxido de silicio (SiO_2) o sílice amorfa, también contiene óxidos de aluminio, calcio, hierro, magnesio, entre otros. La DE protege los granos almacenados del ataque de insectos a concentraciones de

500ppm a 5000ppm, en comparación con las cenizas de residuos vegetales y otros polvos minerales antes mencionados que utilizan concentraciones mayores a 10.000 ppm (Quarles, 1992; Subramanyam & Roesli, 2000).

El cuarto grupo incluye a los PIs que contienen una mezcla de DE con silicagel (sílice sintética (SiO₂)). El silicagel es un material ligero e higroscópico, fabricado a partir de la evaporación de una solución acuosa de silicato de sodio. Las sílices producidas sintéticamente son microparticuladas y se componen de 99,5% de dióxido de silicio (Quarles, 1992). En la actualidad, el silicagel se agrega para mejorar la eficacia de las DE naturales y reducir la dosificación a un rango de los 300 ppm a los 750 ppm, manteniendo la eficacia (Quarles, 1992; Subramanyam & Roesli, 2000; Arthur, 2002). Ejemplos de esto son las formulaciones comerciales Protect-It® y Dryacide®.

A partir del descubrimiento de los nano insecticidas se ha agregado un quinto grupo (Figura 2) a estos cuatro tipos tradicionales de PIs (Stadler, 2016). Por el momento se incluyen en este nuevo grupo la Nanoalúmina, Nanosílica y Nanoplata a los cuales probablemente se agreguen nuevos nano insecticidas en función de los rápidos progresos en el desarrollo de la nanotecnología y productos nanoformulados (Stadler et al., 2010a; Stadler et al., 2010b; Debnath et al., 2011; Arjunan et al., 2012; Stadler et al., 2012; Kah & Hofmann, 2014; Buteler et al., 2015).

Polvos inertes con actividad insecticida				
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Arcillas, arenas, ceniza de cascarilla de arroz, cenizas de madera y cenizas	Dolomita, magnesita, oxiclورو de cobre, roca fosfórica, tierra de azufre, cal	Sílice natural, tierra de diatomeas (DE).	Sílice sintética (SiO ₂) Silica gel.	Nanoalúmina Al₂O₃ Nanosílica SiO₂ “Nanoplata Ag⁺”

Figura 2. Clasificación de polvos inertes (PIs) (Stadler, 2016).

Mecanismo de acción insecticida de los PIs

1. Actividad insecticida por contacto de los PIs (fenómenos de superficie)

A principios de la década de 1920, se emplearon los PIs como *carriers* de insecticidas tales como el arseniato de plomo (polvos mojables) y se obtuvieron niveles de control de plagas más elevados que los alcanzados con el principio activo solamente (Mote et al., 1926). Los insectos tratados con estos formulados mostraron comportamientos inusuales, como las reacciones de “autolimpieza” (self-cleaning behavior) previos a la muerte por ingestión del producto (Mote et al., 1926). Sobre la base de estas observaciones, Hockenyos (1933) postuló que estos polvos minerales poseen propiedades “desecantes”, fenómeno que más tarde fue considerado el principal mecanismo de acción insecticida de los PIs (Maxwell, 1937). Asimismo, Chiu (1939 b) observó una correlación inversa entre el tamaño de partícula y la toxicidad del polvo.

Un relevante aporte al estudio del mecanismo de acción de los PIs surge del trabajo de Briscoe (1943), quién demostró que los PIs provocan deshidratación y muerte por desecación. Luego, Alexander et al. (1944a, b) señalaron que el fenómeno de desecación de los insectos por acción de PIs se debe a la “absorción de la epicutícula” o a la “penetración de los PIs en la misma”, esta acción es independiente de la composición química del PI y de su reactividad. Además, demostró que la mortalidad de insectos expuestos a PIs se correlaciona inversamente con el tamaño de partícula, con la estructura angular de la misma y con el incremento de la dureza intrínseca del material. Este autor también observó que bajos porcentajes de mortalidad en insectos expuestos a PIs se encuentran asociados con altos valores de humedad relativa en el medio de ensayo (Alexander et al., 1944a, b). Finalmente, el mecanismo de acción insecticida fue definido como la suma de fenómenos de abrasión y absorción de las ceras epicuticulares, que conducen a la desecación de los insectos (Kalmus, 1944; Wigglesworth, 1944), mientras que la eficacia de los diferentes PIs correlaciona con las propiedades físicas del polvo (tamaño de partícula, densidad, superficie específica, dureza) y factores exógenos como la humedad relativa (Alexander et al., 1944a, b; David & Gardiner, 1950).

A partir del desarrollo de técnicas para cuantificar la capacidad de los PIs para absorber y remover las ceras de la cutícula de insectos, se comprobó que los PIs no abrasivos como montmorillonita (hidroxisilicato de magnesio y aluminio) y atapulgita (silicato de aluminio y magnesio hidratados) remueven la capa de cera de la cutícula de termitas (Ebeling & Wagner, 1959). Ebeling (1961) comprobó que las partículas $\geq 20 \text{ \AA}$ absorben moléculas de ceras cuticulares con cadenas de más de C30, presentes en la cutícula de la mayoría de las especies de insectos.

Por otro lado, Cook et al. (2008) demostraron el efecto secuestrante de lípidos cuticulares que poseen las partículas de las formulaciones (Silico-Sec®, Protect-It®, Dryacide®) utilizando ácaros como modelo biológico. Estos autores pudieron cuantificar tridecano y lípidos de cadena larga (C23 y C25) provenientes de las partículas que permanecieron en contacto con los ácaros, después de 72 h de exposición a los PIs. También verificaron la presencia de ácidos grasos de cadena media como ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico, que fueron detectados en DE a la que fueron expuestos gorgojos de los géneros *Callosobruchus* y *Acanthoscelides* después de 6,5 horas de exposición (Cook et al., 2008).

Sobre la base de estos antecedentes, Stadler et al (2010a, 2010 b, 2012 y 2017) demostraron que, en general, los PIs no ejercen su acción insecticida a través de mecanismos bioquímicos, como sucede con los pesticidas de síntesis orgánica, sino a través de fenómenos físicos como la abrasión, adsorción de hidrocarburos cuticulares y desecación. La actividad insecticida de los PIs, incluyendo la nanoalúmina, se encuentra estrechamente relacionada con la superficie específica del material, que aumenta en función de la reducción del tamaño de la partícula. Las partículas ultrafinas son en general más tóxicas que sus equivalentes de mayor tamaño, como consecuencia de la correlación directa entre la relación superficie/volumen por unidad de peso y la energía de superficie de la partícula, de la que depende directamente su actividad biológica (Paull & Lyons, 2008).

Además del tamaño de partícula, existen otras variables corresponsables de la actividad insecticida de los polvos inorgánicos. La forma y la estructura de

las partículas (amorfa, acicular, cilíndrica, placa, etc.) que afectan directamente la cinética de la deposición, el ingreso y la translocación de las mismas dentro de un organismo (Jia et al., 2005). La composición química de las partículas y la presencia de distintos elementos o sus diferentes combinaciones afecta su actividad biológica (sustancias simples o compuestas como óxidos, sales, etc.). Sin embargo, una de las variables más relevantes que contribuyen a la eficacia de los polvos insecticidas es la carga electrostática de las partículas (cargas elementales de ambos tipos y dipolos), cuyo origen es el proceso de combustión (Karasev et al., 2004; Stadler et al., 2010b) en el caso de los nanomateriales sintéticos y el fenómeno de emisión termoiónica a altas temperaturas para las nanopartículas provenientes de erupciones volcánicas (Buteler et al., 2011).

2. Efectos complementarios a la toxicidad por contacto de los PIs

Chiu (1939a, b) postuló que la mortalidad en insectos por acción de PIs se debía principalmente a la actividad de superficie (deseccación), a la que se suman fenómenos o efectos como la intoxicación por ingestión, reacciones químicas a nivel de la cutícula del insecto y acción mecánica directa, entre otros efectos. Por otro lado, distintos autores sugieren la existencia de fenómenos complementarios a la toxicidad por contacto, por ejemplo, el efecto repelente de algunos PIs como el caolín, sobre el comportamiento de búsqueda del insecto o reconocimiento de plantas hospederas (Golob, 1997). A este fenómeno, que puede llamarse antixenótico, se suma el efecto sobre la alimentación llamado fagodisuasión (comportamientos de rechazo o no preferencia por el alimento). Por otro lado, los autores sugieren efectos subletales como la toxicidad por ingestión causada por las partículas de polvo (Wille & Fuentes, 1975; Edwards & Schwartz, 1981; Buteler et al., 2011). Estos antecedentes dejan en evidencia que además del principal mecanismo de acción de desecación, derivado del efecto insecticida por contacto (Hockenyos, 1933; Briscoe, 1943; Alexander et al., 1944a, b; Cook et al., 2008), los PIs presentan aparentemente efectos secundarios como la fagodisuasión, la repelencia y subletales como la toxicidad por ingestión, que probablemente desempeñen un papel relevante en el marco de la actividad insecticida de los PIs.

Hacia el reemplazo de los insecticidas convencionales de síntesis orgánica por productos biorracionales

A nivel internacional, existe una marcada tendencia hacia la reducción del uso de insecticidas de síntesis orgánica y su reemplazo por sustancias biorracionales selectivas y de baja toxicidad para mamíferos. Esta tendencia surge, en parte, de la necesidad de encontrar nuevas alternativas a los insecticidas convencionales, debido al desarrollo de resistencia por parte de los insectos (Picollo de Villar et al., 1992; Descamps, 2002; Stadler et al., 2003), así como de la preocupación de los consumidores y entes reguladores sobre los residuos de pesticidas en los alimentos. Esto ha llevado a la prohibición, en algunos países, de ciertos productos considerados de alta toxicidad y con un alto grado de impacto ambiental, como por ejemplo el bromuro de metilo (Quarles & Winn, 1996; Korunic & Ormesher, 1996; <https://web.archive.org/web/20091017081855/http://www.epa.gov:80/spdpublc/mbr/> [revisado el 12/02/2017]). Entre las alternativas posibles a los insecticidas de síntesis orgánica, existe gran interés en evaluar el uso de extractos vegetales y aceites esenciales (Broussalis et al., 1999; Procopio et al., 2003; Lorini & Beckel, 2006; Stefanazzi et al., 2011; Ogendo et al., 2008; Stefanazzi, 2011), así como PIs para el control de insectos plaga del grano almacenado, tales como DE, el caolín y los nanoinsecticidas, lo cual queda en evidencia en los trabajos científicos publicados sobre este tema (Ebeling, 1971; Golob, 1997; Kavallieratos et al., 2005; Athanassiou et al., 2007; Vardeman et al., 2007; Stadler et al., 2010 a,b).

Insecticidas con base nanotecnológica

La nanotecnología es una ciencia en rápido desarrollo enfocada en lo “ultra-pequeño” (1 a 100 nanómetros), una escala en la cual los materiales exhiben nuevas propiedades, tales como la conductividad eléctrica, actividad de superficie y reactividad. Estas nuevas propiedades surgen a partir de la reducción del tamaño de partícula hacia el rango nanométrico, ampliando así su espectro de aplicaciones (Kah & Hofmann, 2014; Athanassiou et al., 2017).

Durante la última década se produjo un aumento exponencial del interés por los nanomateriales en el ámbito académico e industrial. La rápida incorporación de

la nanotecnología en diversos ámbitos como la medicina, ingeniería, electrónica y la agroindustria es la prueba de su enorme potencial para el desarrollo de nuevos productos. La investigación sobre la aplicación de nanotecnología para el uso de la agricultura tiene cada vez más desarrollo y se orienta principalmente hacia los nanosensores, fertilizantes y nanopesticidas (Kah & Hofmann, 2014; Athanassiou et al., 2017; Sinha et al., 2017). La nanotecnología se presenta como una herramienta muy prometedora para el control de plagas, aunque su desarrollo se encuentra en su etapa inicial (Pérez de Luque & Rubiales, 2009; Parr-Vasquez et al., 2010; Stadler et al., 2010a, Stadler et al., 2010b; Sinha et al., 2017).

Nanomateriales para la formulación de insecticidas

1. Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son dispersiones homogéneas de líquidos inmiscibles cuya fase dispersa se compone de partículas de tamaño nanométrico. Por ejemplo, las nanoemulsiones de permetrina mostraron mayor eficacia que el ingrediente activo puro y una reducción de los efectos sobre organismos no blanco (Anjali et al., 2010).

2. Insecticidas nanoformulados

Los nanoinsecticidas formulados a base de polímeros como el polietilenglicol (PEG) (Shakil et al., 2010), permiten la liberación lenta del ingrediente activo en comparación con las formulaciones convencionales, para una variedad de principios activos (Adak et al., 2012; Sarkar et al., 2012; Pankaj et al., 2012; Kaushik et al., 2013; Loha et al., 2011; Athanassiou et al., 2017; Sinha et al., 2017).

Formulaciones a base de nanoesferas y nanogeles: Cumplen con los estándares de la agricultura ecológica al ser utilizados para la liberación lenta de principios activos y la protección contra la degradación en condiciones ambientales (Yin et al., 2012; Bhagat et al., 2013).

Nanofibras: El electrospinning o “electrohilado”, produce fibras a escala nanométrica a partir de la interacción de cargas eléctricas de polímeros que

permiten la distribución homogénea de un principio activo como insecticidas o feromonas en una matriz polimérica (Xiang et al., 2013; Hellman et al., 2011).

Nanoformulaciones híbridas: Se obtienen a partir de *nanopartículas lipídicas sólidas o liposomas recubiertos* y también pueden ser utilizadas como sistemas de liberación lenta y protección del principio activo a altas temperaturas y fotodegradación (Pardeshi et al., 2012; Nguyen et al., 2012; Bang et al., 2009; Hwang et al., 2011; Kang et al., 2012; Athanassiou et al., 2017; Sinha et al., 2017).

Carrier poroso: Un tipo de nanoformulación ampliamente difundida es el empleo de nanopartículas inorgánicas como soporte o *carrier* poroso, asociados a ingredientes activos orgánicos, lo que permite la liberación lenta del principio activo (Kah et al., 2013; Qian et al., 2011; Song et al., 2012; Mingming et al., 2012; Athanassiou et al., 2017).

Nanomateriales con actividad insecticida: nanoinsecticidas

Como ejemplos conocidos de nanopartículas como ingredientes activos se destacan la *nanoplatina*, el *cobre* y el *dióxido de titanio* por sus propiedades antimicrobianas (Kim et al., 2012). Arjunan et al. (2012) describen la actividad insecticida de la nanoplatina sobre larvas de *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, y *Culex quinquefasciatus*, vectores de malaria, filariasis y dengue. Stadler et al. (2010a) describen la eficacia de la *nanoalúmina* para el control de plagas de granos almacenados y luego Debnath et al. (2011) desarrolla un trabajo similar con la nanosilica. El hallazgo del efecto insecticida de los PIs con base nanotecnológica dio lugar al desarrollo de una serie de investigaciones para desentrañar el mecanismo de acción de la alúmina nanoestructurada (Stadler et al., 2010a, 2010b, 2012, Buteler et al., 2015; Stadler et al., 2017).

Mecanismo de acción de nanoinsecticidas particulados

1. Mecanismo de acción insecticida de la Nanosilica

Al igual que la NSA, la Nanosilica posee un mecanismo de acción basado en fenómenos físicos. Los resultados de Debnath et al. (2011) y Rouhani et al. (2012) revelaron que el mecanismo de acción de la nanosilica se basa en las

propiedades de abrasión y sorción de ceras cuticulares del exoesqueleto. Estos autores concluyeron que las nanopartículas de silicio poseen una alta superficie específica en comparación con su contraparte micrométrica, causando un mayor daño en el exoesqueleto de los insectos. La barrera cuticular formada por hidrocarburos cuticulares (ceras) cuya función es evitar la pérdida de agua del cuerpo del insecto, queda deteriorada y estos comienzan con un proceso de deshidratación o desecación que termina con la muerte del insecto.

2. Mecanismo de acción insecticida de la alúmina nanoestructurada

A diferencia de los insecticidas convencionales, la alúmina nanoestructurada (NSA) posee un mecanismo de acción basado en fenómenos físicos en lugar de bioquímicos-toxicológicos como los que son propios de insecticidas orgánicos de síntesis (Stadler et al. 2017). En principio, la actividad insecticida de este nanomaterial depende de la carga electrostática de las partículas y de la carga triboeléctrica de los insectos. En aquellos insectos que exhiben cargas electrostáticas generadas por triboelectrificación (McGonigle et al., 2002) los agregados de NSA de carga opuesta se adhieren firmemente a la superficie corporal y la capa de cera de la cutícula del insecto es adsorbida “secuestrada” por la NSA, como consecuencia de su alta superficie específica ($14\text{m}^2.\text{g}^{-1}$; Mimani & Patil, 2001), fenómeno que conduce a la muerte del insecto por deshidratación (Stadler et al., 2010). Los fenómenos que dan lugar a este novedoso mecanismo de acción son:

Carga electroestática de las partículas del nanoinsecticida: En los nanomateriales obtenidos a partir de síntesis por oxidación de metales, como por ejemplo la NSA, las partículas resultantes poseen cargas eléctricas fijas (Chacón, 2007) que promueven la formación de agregados con resistencia a las fuerzas de disociación.

Triboelectrificación en insectos: Diferentes autores han demostrado que los insectos pueden acumular carga electroestática de diferentes formas: 1) por fricción durante el vuelo, 2) por desplazamiento sobre una superficie, 3) por

inducción a través de un campo eléctrico, 4) por transferencia iónica a través de la cutícula vía glándulas dermales, canalículos o poros; 5) por unión o fijación de partículas cargadas a la cutícula (McGonigle & Jackson, 2002).

Las cargas eléctricas son transferidas de una superficie a otra por contacto o fricción, fenómeno que ocurre cuando un insecto se desplaza sobre una superficie. La acumulación de cargas en el cuerpo del insecto es en general positiva y directamente proporcional a la distancia recorrida, como consecuencia la tasa de acumulación de carga está directamente relacionada con la marcha del insecto. Cuando un insecto se encuentra en reposo o el movimiento es mínimo (Figura 3), la ganancia de carga es mínima en comparación con las de un insecto activamente en movimiento, que alcanza un nivel de saturación de cargas (Figura 4). En este caso, el incremento de la carga es exponencial en función del número de pasos, hasta alcanzar un plateau propio para cada especie de insecto y tipo de sustrato (McGonigle et al., 2002; Jackson & McGonigle, 2005).

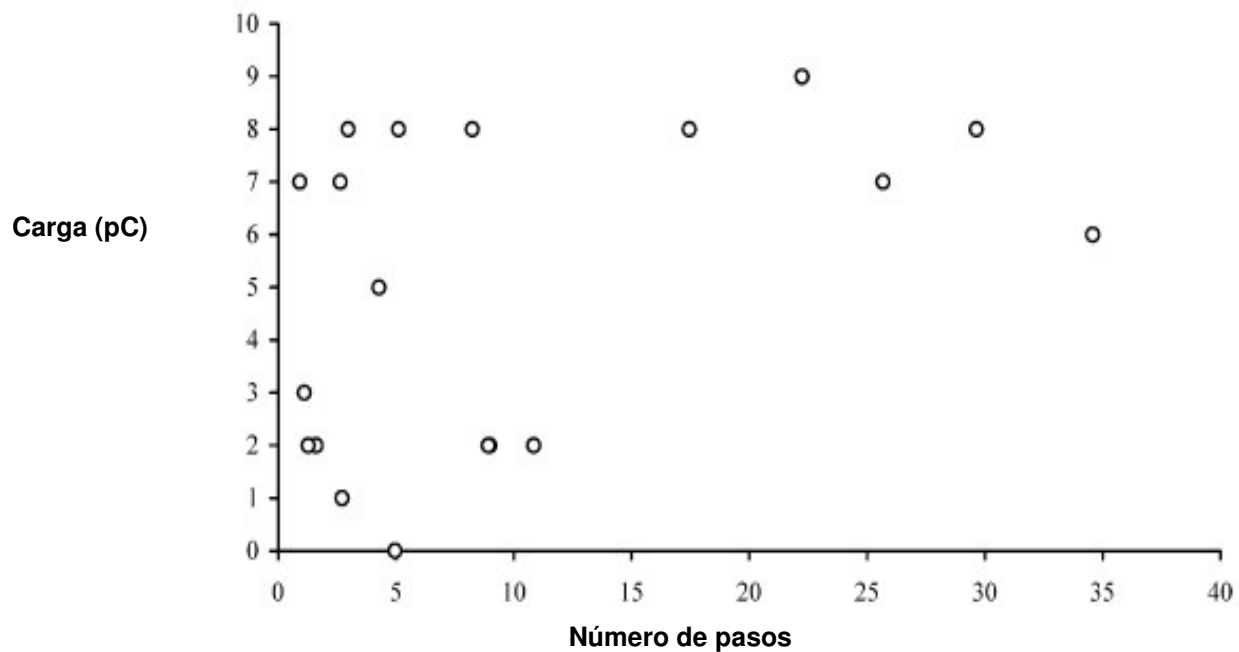


Figura 3. Cargas eléctricas acumuladas (expresadas en picocolomb, pC) en insectos en reposo y en movimiento (tomado de McGonigle et al., 2002).

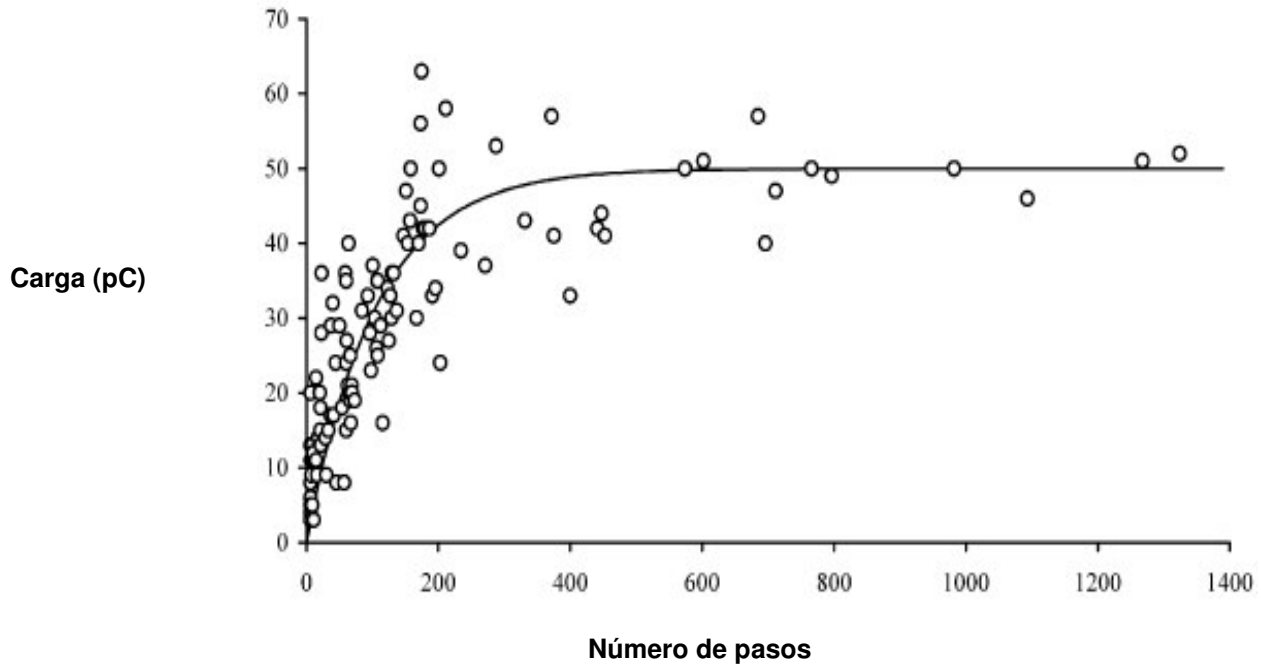


Figura 4. Cargas acumuladas por un insecto en movimiento (tomado de McGonigle et al., 2002).

Adsorción de las partículas de NSA sobre la cutícula del insecto: La Figura 5 b muestra el fenómeno de adsorción de las partículas de NSA al cuerpo del insecto como consecuencia de la diferencia en el signo de las cargas electrostáticas de las partículas y del cuerpo del insecto.

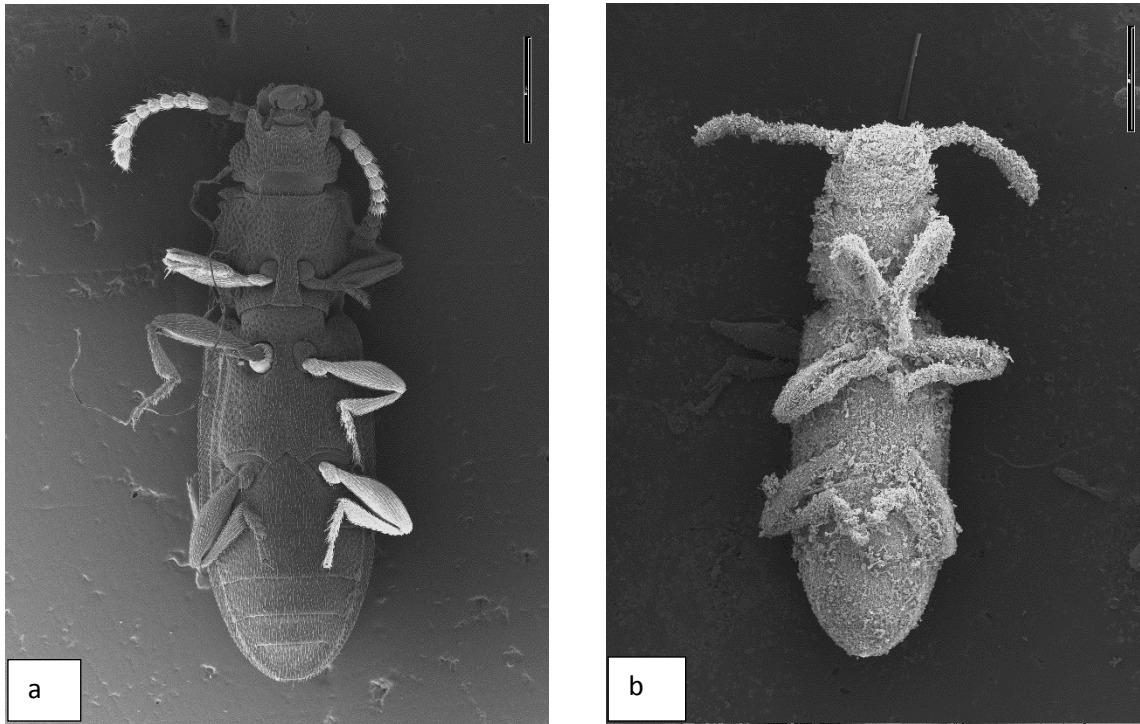


Figura 5. Insecto control (a). Insecto expuesto a trigo tratado con NSA (b). (Tomado de Stadler & Buteler, 2016).

El efecto “secuestrante” de la NSA sobre las ceras cuticulares del insecto: El mecanismo de acción insecticida de la NSA inicia con la adherencia de las partículas de NSA (con carga electrostática de signo opuesto a la del cuerpo del insecto) a la cutícula del insecto cargado por triboelectrificación (Figura 5b). Las micropartículas ensambladas por nanopartículas le confieren a la NSA un alto valor absoluto de superficie específica ($14\text{m}^2.\text{g}^{-1}$), los aglomerados conformados por las nanopartículas “secuestran” las ceras de la cutícula del insecto a través de fenómenos de adsorción y absorción (sorción). La remoción de las ceras cuticulares de la superficie corporal del insecto lo exponen a la evaporación y finalmente a la muerte por deshidratación (Stadler et al., 2017).

A pesar de los importantes avances realizados en el estudio de la eficacia y mecanismo de acción de la NSA en insectos, quedan aún por explorar otros fenómenos que contribuyen a dicha eficacia, tales como los efectos complementarios (toxicidad por ingestión) y sub-letales y antixenóticos (“repelencia” y fagodisuasión), como así también, desarrollar la metodología para

estudiar dichos efectos en insecticidas sólidos inorgánicos insolubles, como los PIs, considerando que prácticamente la totalidad de la bibliografía sobre “repelencia” y fagodisuasión se basa en bioensayos con sustancias orgánicas solubles como insecticidas de síntesis orgánica, extractos vegetales y aceites esenciales (Mc Donald et al., 1970; Talukder & Howse, 1993; Stefanazzi, 2011). Otro tema hasta el momento inexplorado es el efecto de la NSA sobre la producción de progenie (F1) de los insectos expuestos al nanoinsecticida, así como también la cuantificación del daño que provoca *Sitophilus oryzae* en granos almacenados tratados con NSA, considerando el tiempo que transcurre entre la exposición al producto y el efecto.

Fenómenos como la toxicidad por ingestión, los efectos sobre la progenie, así como la repelencia y la fagodisuasión, son considerados efectos secundarios a la actividad insecticida por contacto de la NSA, pero representan un importante complemento a la eficacia del nanoinsecticida. El estudio de estos fenómenos, en el marco de la presente tesis representa un aporte fundamental al conocimiento del mecanismo de acción de un nuevo ingrediente activo. A partir de los antecedentes presentados, el objetivo e hipótesis generales propuestos en el presente trabajo de tesis doctoral son los siguientes:

Objetivo general de la tesis

Evaluar la actividad insecticida, efectos poblacionales, sub-letales y antixenóticos de la alúmina nanoestructurada (NSA), en forma comparativa con otros polvos minerales insecticidas de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), utilizando adultos de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) como organismo modelo, con la finalidad de aportar información acerca de la eficacia y mecanismo de acción de este nuevo insecticida.

Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad insecticida de la NSA sobre adultos de *Sitophilus oryzae*, a través de bioensayos de exposición por contacto a trigo tratado, en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), en condiciones controladas de laboratorio.
2. Desarrollar y validar una técnica experimental específica (bioensayo) que permita determinar la actividad insecticida por ingestión de la NSA, independiente de los efectos de la exposición por contacto a insecticidas sólidos (PIs), en insectos plaga de granos almacenados
3. Evaluar la actividad insecticida por ingestión de la NSA, en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) en adultos de *Sitophilus oryzae*, a través de un bioensayo específico para insecticidas sólidos, basado en la ingestión de alimento artificial tratado y sin tratar.
4. Evaluar los efectos de la NSA sobre *Sitophilus oryzae* en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), en un modelo experimental de mayores dimensiones que el método de bioensayo tradicional, con la finalidad de cuantificar la supervivencia parental, el daño en granos y el efecto sobre el desarrollo poblacional (progenie o F1).
5. Desarrollar y validar una técnica experimental específica (bioensayo) para determinar el efecto excitorrepelente de la NSA, independientemente de la toxicidad por contacto y otros posibles efectos antixenóticos como la fagodisuasión.
6. Estudiar el efecto excitorrepelente de la NSA, en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), en adultos de *Sitophilus oryzae* a través de un bioensayo de excitorrepelencia en condiciones controladas de laboratorio.

7. Diseñar, desarrollar y validar una técnica experimental específica (bioensayo) para determinar cuali-cuantitativamente el efecto fagodisuasivo de la NSA, independientemente de los efectos tóxicos por contacto y de otros posibles efectos antixenóticos como la exitorrepelencia.

8. Estudiar la actividad fagodisuasiva de la NSA, en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) en adultos de *Sitophilus oryzae*, a través de un bioensayo específico de “preferencia de alimento con posibilidad de elección” basado en la oferta de alimento artificial tratado y sin tratar.

Hipótesis general de la tesis

La alúmina nanoestructurada (NSA) posee actividad insecticida, provoca efectos poblacionales, sub-letales y antixenóticos en *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae), con una eficacia mayor a la de Protect-It® y DiatomiD®, para el control de esta plaga primaria.

Capítulo 2

Descripción de los materiales generales utilizados en los bioensayos

1. Material biológico

Sitophilus Oryzae (Linnaeus, 1763)

Con 4600 géneros y más de 51.000 especies, los curculiónidos se encuentran en un amplio rango de hábitats, la mayoría son fitófagos y muchas especies son importantes plagas de la agricultura, horticultura y forestales. Los miembros del género *Sitophilus* son las plagas más importantes en grano almacenado, por ejemplo: *S. oryzae*, *S. zeamais*, *Sitophilus granarius*, *Sitophilus linearis*, entre otros (Larraín, 1994; Hill, 2002; Rees, 2004, Anderson & Marvaldi, 2014). Los adultos de *Sitophilus oryzae* que se utilizaron como modelo biológico en los bioensayos, fueron obtenidos de la cría de insectos disponible en el Laboratorio de Toxicología Ambiental IMBECU CONICET CCT-Mendoza. El laboratorio cuenta con una cría de insectos plagas de granos y productos almacenados con fines experimentales, desde el año 2008. Asimismo, previo al inicio de los bioensayos, se reconfirmo la especie por la Dra. Adriana Marvaldi del Laboratorio de Entomología perteneciente al IADIZA CONICET CCT-Mendoza.

Clasificación Taxonómica (Anderson & Marvaldi, 2014)

Phylum Arthropoda

Clase Insecta

Orden Coleoptera

Suborden Polyphaga

Serie Cucujiformia

Superfamilia Curculionoidea

Familia Curculionidae

Subfamilia Dryophthorinae

Tribu Rhynchophorini

Subtribu Litosomina

Género *Sitophilus* Schoenherr, 1838

Especie *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763)

Características morfológicas distintivas de la especie

Sitophilus oryzae presenta el disco del pronoto con puntuaciones en su mayoría subcirculares, las estrías de los élitros en su mayoría aparecen tan anchas o mayores que los intervalos sobre el disco; metepisternum posee al menos dos filas de puntuaciones, tan amplio como el intervalo lateral elitral adyacente; alas bien desarrolladas. Longitud, excluyendo la cabeza y rostro, usualmente menos de 3 mm (Figura 6). El dorso del aedeagus es igualmente convexo en su sección transversal, liso en su superficie dorsal, sin sulci longitudinal dorsal y de color rojizo (Zimmerman, 1993).

Descripción de los estados de desarrollo

- Adulto: De color marrón oscuro, mide entre 2,5 y 4 mm, dependiendo del tamaño de la semilla de la cual emerge. Posee un par de manchas oblicuas anaranjadas en cada élitro (Figura 6). La determinación del sexo se realiza fácilmente mediante características externas. Las hembras poseen un rostrum más delgado y largo, con puntuaciones de distribución regular, en tanto que en los machos el rostrum es más corto, robusto y las puntuaciones presentan una distribución irregular (Halstead, 1963; Rees, 2004).

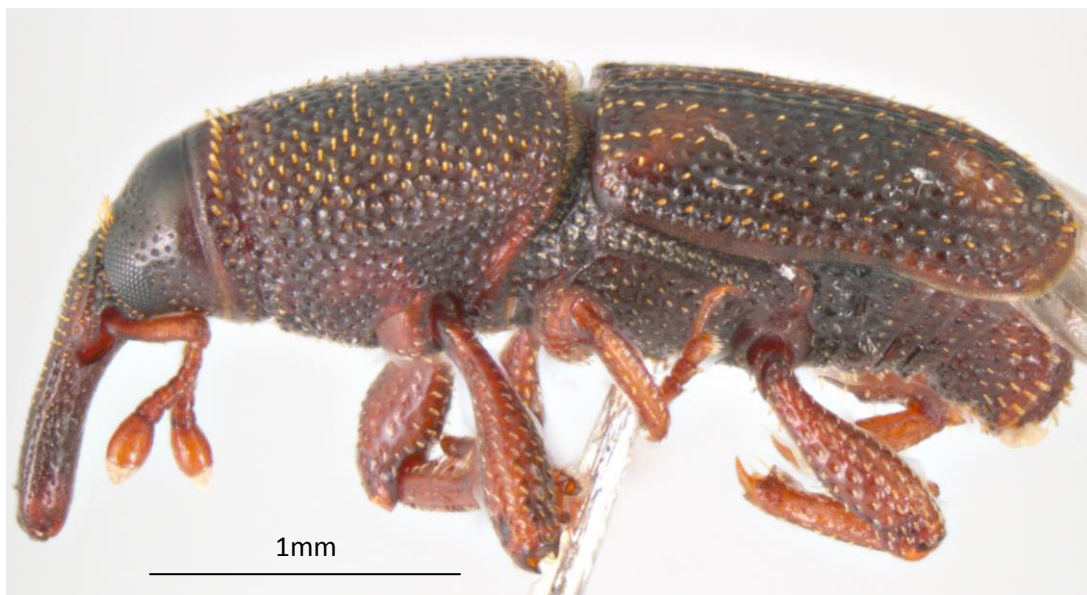


Figura 6. Adulto de *Sitophilus oryzae*. Extraído de <http://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/main/135846>

- Huevos: de color blanco, ovals y depositados en el interior del grano a través de un pequeño orificio realizado por la hembra.
- Larvas: ápodas, robustas y de coloración blanquecina (Figura 7). Se desarrollan en el interior del grano. En este estado es muy frecuente el canibalismo.



Figura 7. Larvas de *Sitophilus oryzae*, extraída del interior de grano de trigo. Tomado de <http://www.nbair.res.in/Insectpests/Sitophilus-oryzae.php>

- Pupa: esta se desarrolla dentro del grano después del cuarto estadio larval, la pupa es de tipo libre y de color amarillo pálido.

Ciclo de vida

La hembra produce hasta 150 huevos y ovipone durante toda su vida adulta, aunque el 50% de los mismos son colocados en las primeras 4 a 5 semanas. Los huevos son introducidos individualmente en pequeños orificios perforados por la hembra en los granos de cereales, siendo estos sellados con una secreción serosa, de modo que el huevo queda protegido dentro de la semilla. La duración de este estado es de aproximadamente 6 días a 25 °C. La oviposición es posible en un rango de temperatura de 15° a 35 °C, con una humedad

intrínseca del grano de más del 10%. La tasa de oviposición desciende por debajo de los 20 °C o por sobre los 32 °C, y por debajo de 12% de humedad del grano (Birch, 1944).

Tras la eclosión, la larva comienza a alimentarse en el interior del grano, ahuecándolo. El desarrollo larval comprende cuatro estadios en un lapso de 25 a 30 días en condiciones de laboratorio (Figura 8). Otros factores que pueden influir en el tiempo de desarrollo del estado larval son la variedad, tipo y calidad del grano infestado (Birch, 1944; Howe, 1952). La pupación se produce 35 días después de la eclosión y el estado de pupa puede durar entre 4 a 6 días en condiciones favorables hasta alcanzar el estado adulto. Luego, el adulto que emerge del pupario, perfora y abandona la semilla dejando un orificio de salida característico. En función de la temperatura y de la humedad, el tiempo de desarrollo varía de 35 días en condiciones óptimas, a más de 110 días en condiciones desfavorables. Según Birch (1944), los adultos son longevos y pueden vivir de 3 hasta 6 meses como máximo. No obstante, otros autores sugieren una longevidad de machos y hembras de 114 y 120 días (Adetunji, 1990; Bhuiyan, et al., 1990) (Figura 8).

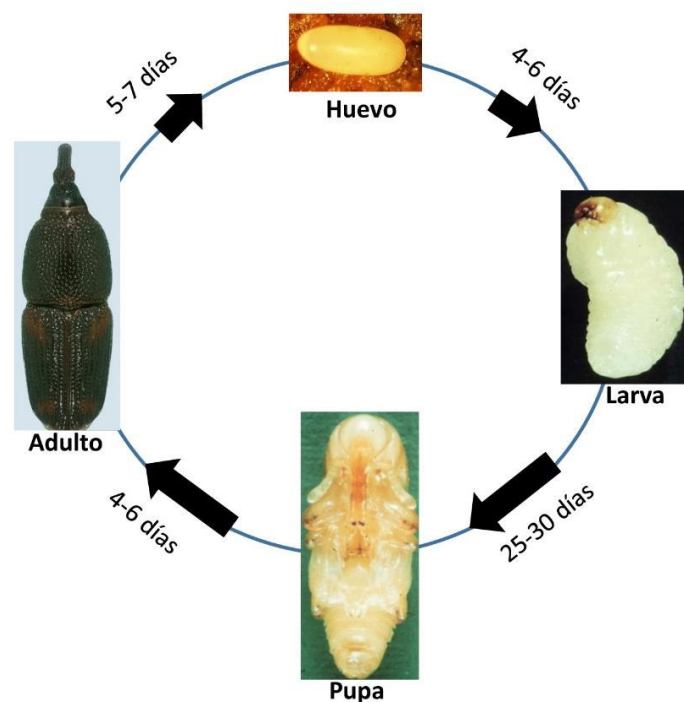


Figura 8. Ciclo de vida de *Sitophilus oryzae* en condiciones de laboratorio (27 ± 1°C y a 70% de HR).

Status de plaga, distribución geográfica e importancia económica de *Sitophilus oryzae*

S. oryzae es la plaga primaria de granos almacenados más destructiva en todo el mundo (Hill, 2002), ocasionando pérdidas de hasta 20 % a nivel mundial (Eyidozehi et al., 2014). Es un insecto cosmopolita que se encuentra en todas las regiones cálidas y tropicales del mundo, aunque también se lo puede encontrar en los climas templados (Figura 9). *S. oryzae*, es la principal plaga del arroz y trigo, pudiendo atacar otros productos almacenados. Las infestaciones pueden provocar grandes daños y producir pérdida consecuente de la calidad del grano, por lo que es considerada una plaga de infestación primaria (Larraín, 1994; Hill, 2002; Rees, 2004).

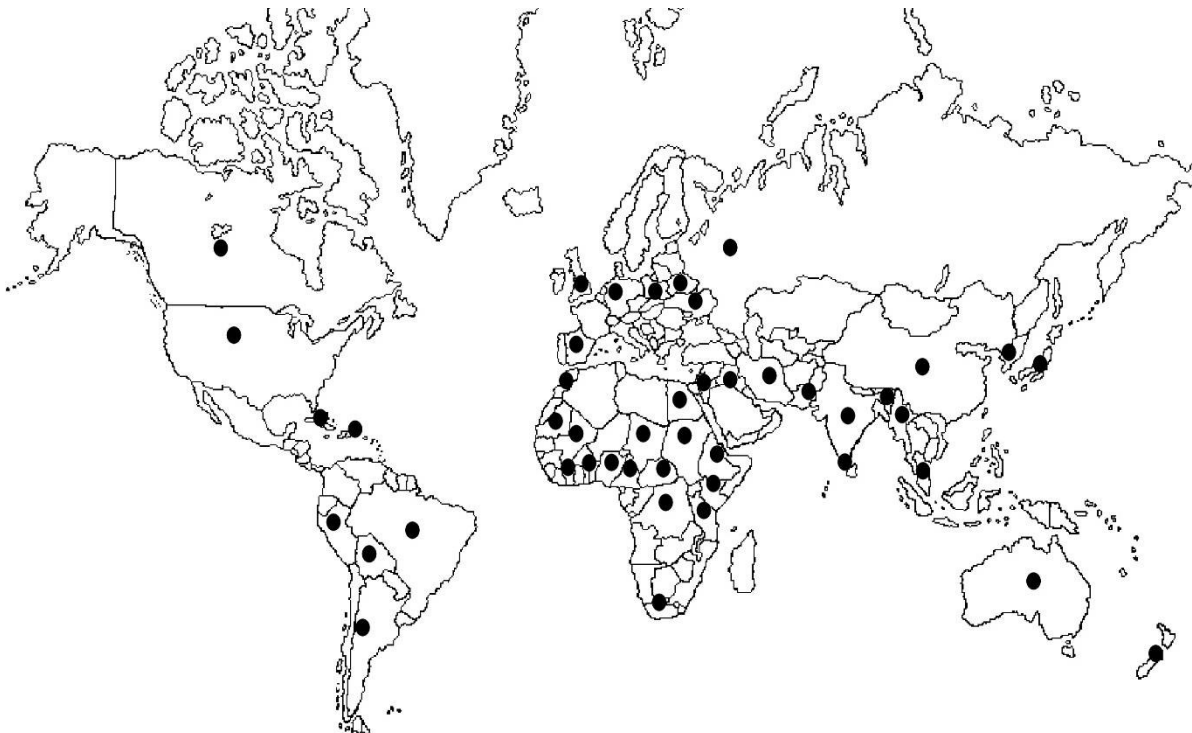


Figura 9. Distribución mundial por país de *Sitophilus oryzae*. Adaptado de Invasive Species Compendium. Datasheets, maps, images, abstracts and full text on invasive species of the world. <http://www.cabi.org/isc/datasheet/10887>.

Daños provocados por *Sitophilus oryzae* en cereales y productos almacenados

La alimentación de los adultos y de las larvas de esta especie es la principal causa de los daños externos e internos de los granos de cereal (Figura 10). El daño provocado por *S.oryzae* favorece el ataque de plagas secundarias y el desarrollo de hongos por el aumento de temperatura y humedad dentro del silo. *S. oryzae* también puede dañar otros productos almacenados, especialmente cuando los adultos se desplazan desde los granos a otros productos derivados que se encuentran en el mismo ambiente (Larraín, 1994; Hill, 2002; Rees, 2004; Hill, 2008).



Figura 10. Daño en semillas producido por *Sitophilus oryzae* (Tomado de Agro Link <http://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/secure/ProblemaDetalhe.aspx?p=1909>)

Cría de *Sitophilus oryzae* en condiciones de laboratorio

Consiste en la utilización de recipientes mantenidos en la cámara de cría del Laboratorio de Toxicología Ambiental IMBECU CONICET CCT-Mendoza, en condiciones de $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $70 \pm 5\%$ de HR y en oscuridad (Figura 11). En cada

recipiente de cría se colocaron 50 insectos adultos sin sexar, de edad indefinida, de la especie *S. oryzae* como población inicial. La selección de los insectos adultos (machos y hembras) fue al azar, con el fin de aproximarse a las condiciones reales de las poblaciones naturales de *S.oryzae* en los silos. En cada recipiente de cría, se agregaron 200 gramos de trigo NIDERA variedad baguette 501 para proporcionar sustrato y alimento a los insectos.

Para todos los bioensayos del presente trabajo de tesis doctoral, se utilizaron adultos de *S.oryzae* procedentes de la cría mantenida en el Laboratorio de Toxicología Ambiental IMBECU CONICET CCT-Mendoza. La HR deseada se mantuvo con una solución saturada de cloruro de sodio en agua (Winston & Bates, 1960). Todos los bioensayos se llevaron a cabo en las mismas condiciones de temperatura y humedad ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $70 \pm 5\%$ de HR)



Figura 11. Recipientes de cría con *Sitophilus oryzae* sobre granos de trigo variedad baguette 501 (NIDERA). Cámara de cría del Laboratorio de Toxicología Ambiental IMBECU CONICET CCT-Mendoza.

2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos

En la siguiente descripción de materiales insecticidas, pueden apreciarse las diferencias en las características físico-químicas, morfológicas y de tamaño de partículas de los PIs utilizados en los distintos bioensayos a lo largo de la presente tesis doctoral.

DiatomiD® (Tierra de Diatomeas)

DiatomiD®, es un polvo insecticida comercial obtenido de canteras en San Juan, Argentina, cuyo ingrediente activo es diatomito (98%) secado y molido. En términos generales, la DE es un insecticida que se utiliza para la protección de granos almacenados, para controlar plagas domiciliarias, de jardín y en cultivos orgánicos (Quarles, 1992; Subramanyam & Roesli, 2000). La DE es obtenida de yacimientos de diatomita, una roca sedimentaria silíceo depositada durante la era Cenozoica y formada por microfósiles de algas unicelulares que secretan un esqueleto silíceo (diatomeas). Los yacimientos de diatomito pueden variar en profundidad, espesor y contenido de materia orgánica, etc. (Quarles, 1992; Subramanyam & Roesli, 2000). Las características físico-químicas mencionadas a continuación corresponden a DE en general, no se disponen de las características específicas de DiatomiD®, debido a que la DE es un producto obtenido por un proceso industrial, por lo que cada lote o partida tiene sus propias características dependiendo de la cantera donde fue obtenida, de su profundidad, impurezas, especies de diatomeas dominantes y del proceso de molienda utilizado.

Características físico- químicas de la tierra de diatomeas

Densidad de $0,54\text{g/cm}^3$ y pH de 9,4. Las tecas de las diatomeas son porosas, característica que le confieren un alto valor de superficie específica, el cual está ligado a su actividad insecticida (Ebeling, 1971; Le Patourel, 1986; Aldryhim, 1990; Banks & Fields, 1995; Golob, 1997; Korunic, 1998). Desde el punto de vista químico, la DE esta compuesta por sílice amorfa ($\text{SiO}_2 \cdot n \cdot \text{H}_2\text{O}$), y contiene impurezas como óxidos de Al, Ca, Fe y Mg (Harries-Rees, 1994) (Figura 12).

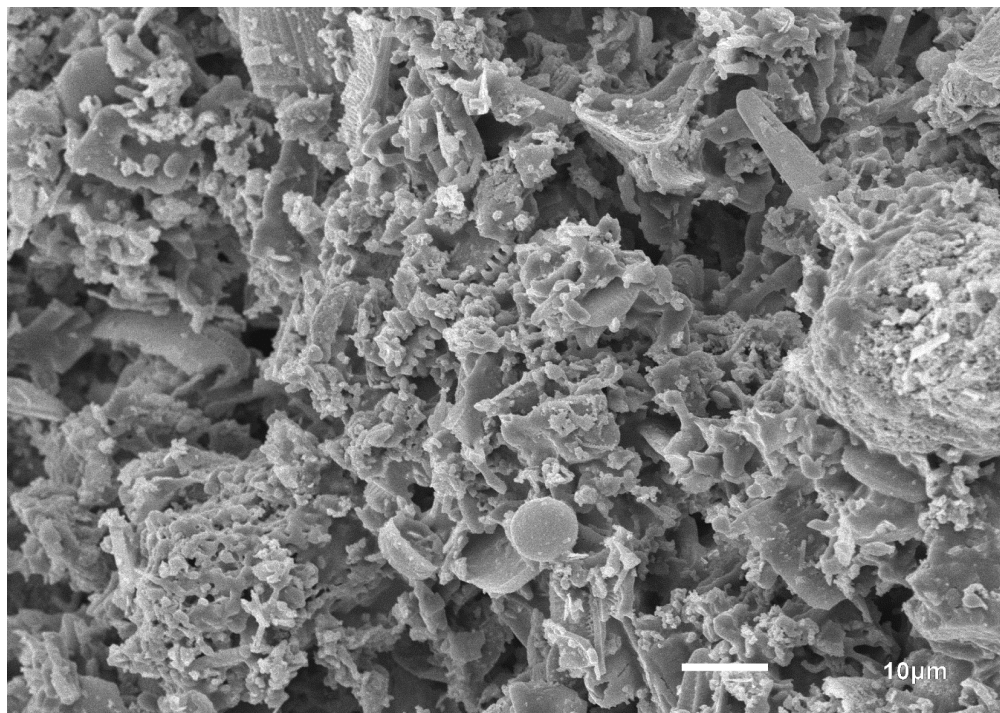


Figura 12. Micrografía MEB de tierra de diatomeas (DiatomiD®), proveniente de algas fósiles unicelulares. Magnificación: 1100X.

Tamaño de partícula y morfología

Según Subramanyam & Roesli (2000), el rango de granulometría de la tierra de diatomeas es variable, entre 1 a 50 µm (Figura 13). La tierra de diatomeas es el producto de un proceso industrial, por lo que cada partida tiene sus propias características dependiendo de la cantera donde fue obtenida y del proceso de molienda utilizado. La morfología de las partículas depende de la especie de diatomea mayoritariamente en esa cantera y del impacto de la molienda sobre la estructura de las tecas.

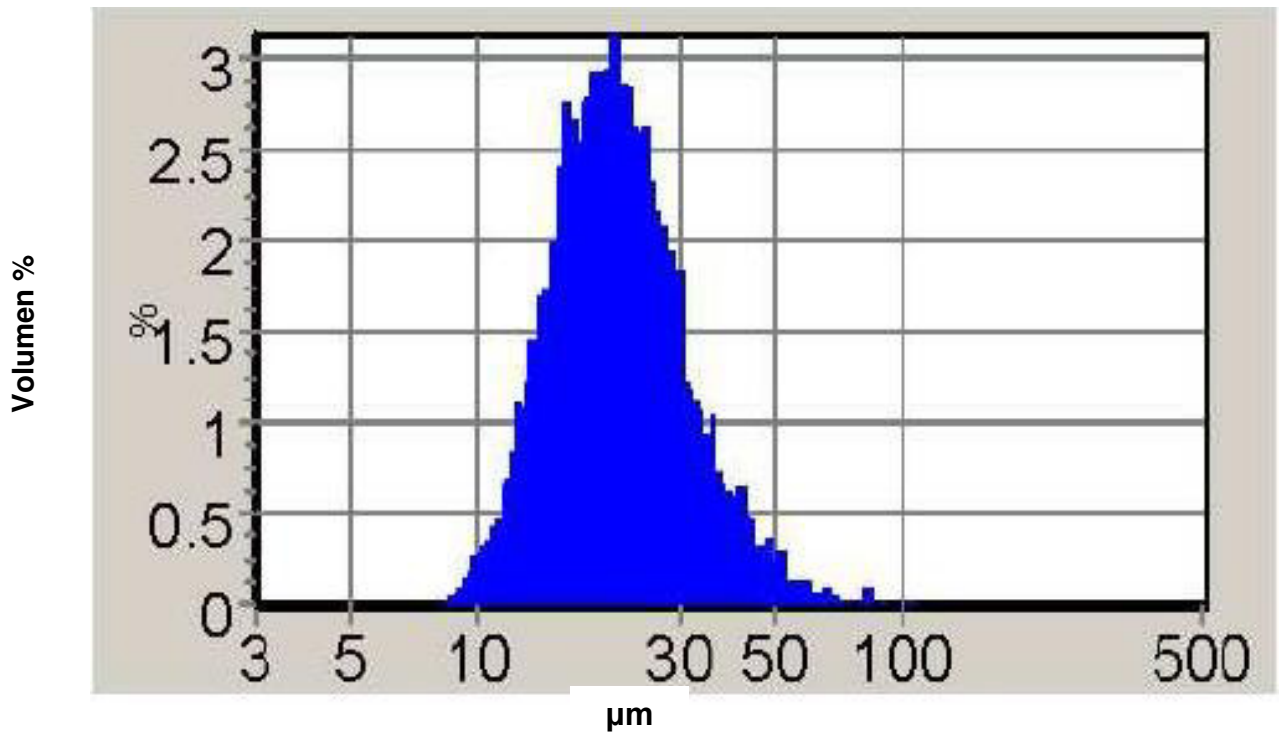


Figura 13. Distribución de tamaño de partículas de DE, utilizando el análisis dinámico de imágenes (DIA) y el análisis dinámico de dispersión de luz (DLS) (tomado de <http://www.eposters.net/pdfs/complete-size-characterization-of-diatomaceous-earth.pdf>).

Protect-It®

Protect-It®, es una formulación que contiene tierra de diatomeas (DE) y silica gel, obtenido de Hedley Technologies Ltd. (Grand Junction CO, USA). Es una mezcla de DE con 10% de silica gel (Korunic & Fields, 1998; Subramanyam & Roesli, 2000).

Características físico- químicas de Protect-It®

Densidad de $0,20\text{g/cm}^3$ y pH de 5,7 (Korunic et al., 1996; Subramanyam & Roesli, 2000). Contiene 87% de dióxido de silicio amorfo (SiO_2), 3% de óxido de aluminio (Al_2O_3), 1% de óxido férrico (Fe_2O_3), menos de 1% de CaO, MgO, TiO_2 , P_2O_3 , y de 3 a 6% de agua (Figura 14).

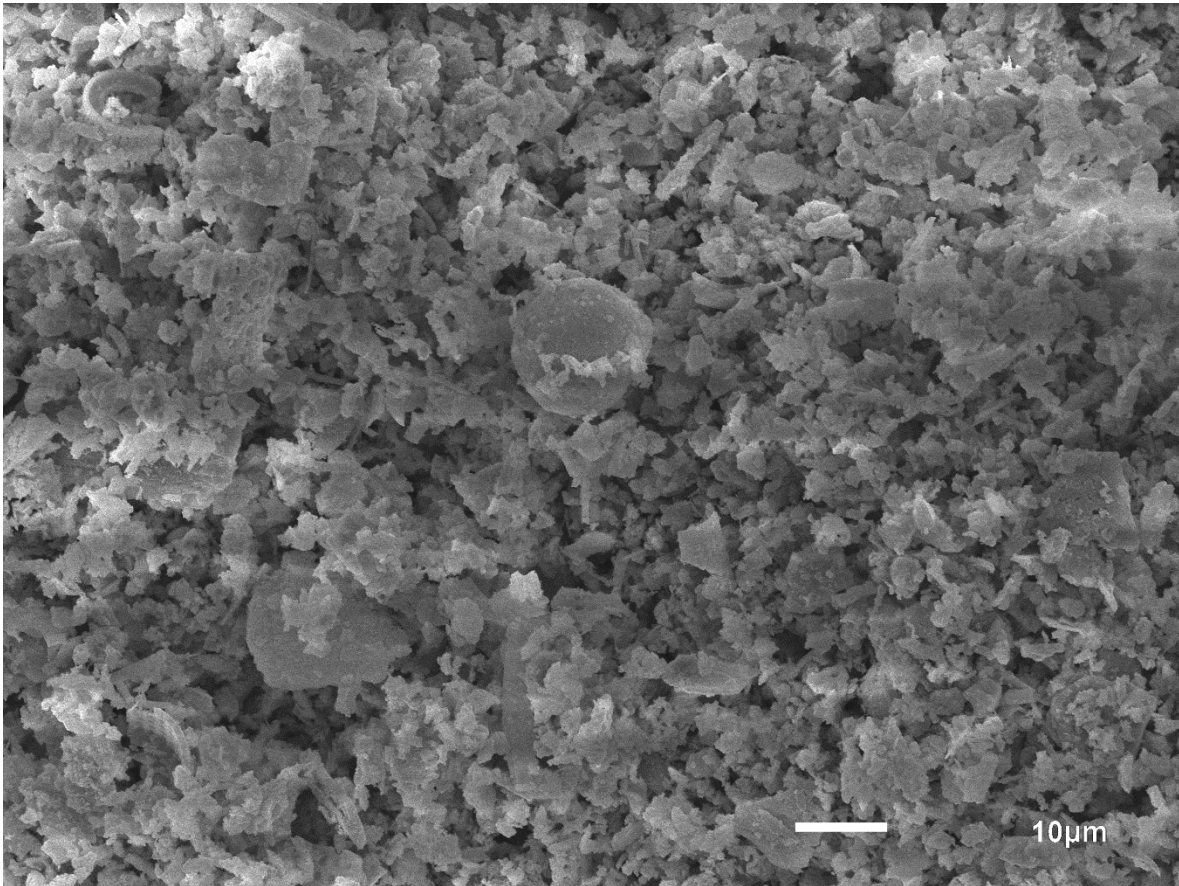


Figura 14. Micrografía MEB de Protect-It® (tierra de diatomeas y 10% de silica gel). 1000X.

Tamaño de partícula y morfología

La granulometría media de Protect-It® es de 5,4 μm (Korunic et al., 1996; Subramanyam & Roesli, 2000). La mayoría de las partículas tienen aproximadamente un diámetro de 3 a 6 μm y poseen una distribución bi-modal de las partículas (1,1 μm y 200 nm), que sirve para incrementar la superficie de área total del polvo. El análisis de tamaño de partícula en la Figura 15, también muestra la alta carga volumétrica de las partículas cercanas a los 5 μm , con una distribución de partículas pequeñas alcanzando los 700 nm.

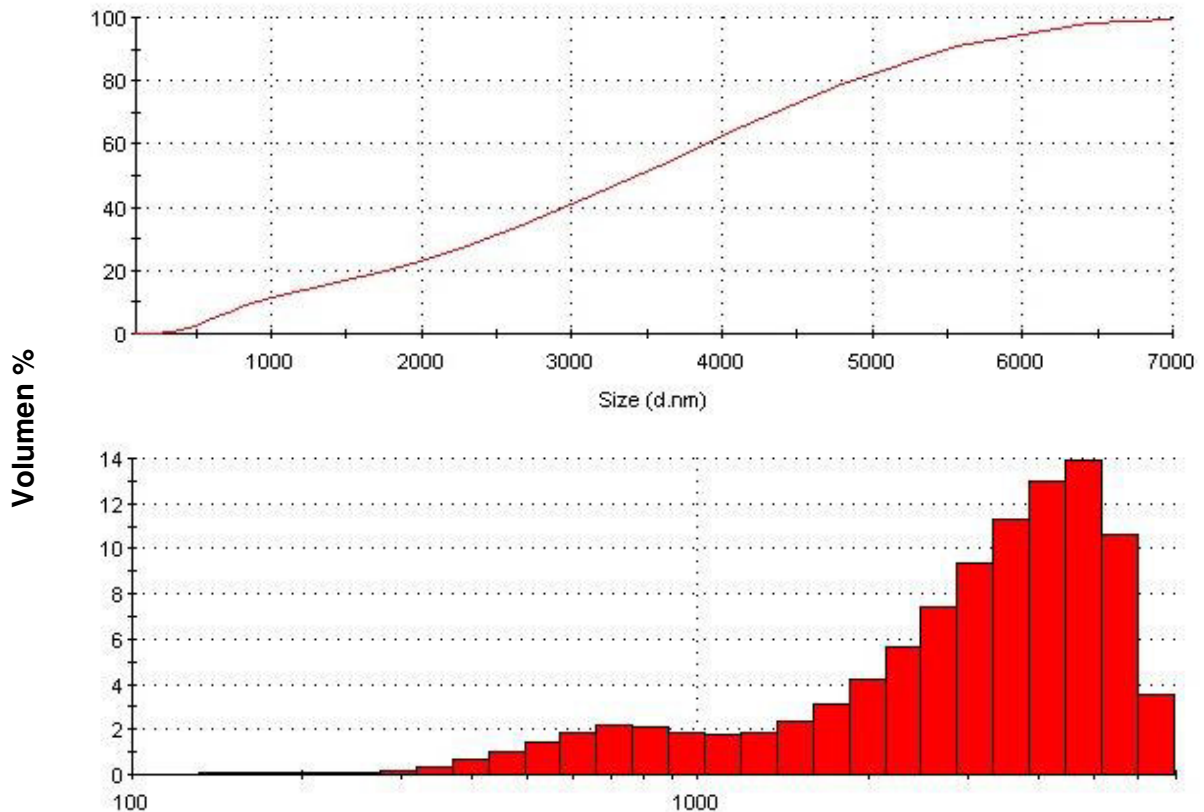


Figura 15. Distribución de tamaño de partículas de Protect-It®, dispersión en agua con polimetacrilato de amonio como dispersante, Zetasizer Nano ZS. Gráfico superior en escala lineal e histogramas en escala logarítmica (tomado de Stadler et al., 2012).

Alúmina nanoestructurada (NSA)

Síntesis de la NSA

La NSA fue obtenida a través de la técnica de síntesis por combustión de Toniolo et al. (2005), un proceso sencillo, seguro y rápido para producir polvos homogéneos de alta pureza (Sousa et al., 1999; Kiminami, 2001; Toniolo et al., 2005). La combustión glicina-nitrato produce N_2 , H_2O y CO_2 como productos gaseosos y C, H y Al como elementos reducidos. La alúmina nanoestructurada utilizada para el desarrollo de los bioensayos realizados en el marco de la presente tesis fue sintetizada en el Laboratorio de Toxicología Ambiental (IMBECU).

Características físico-químicas de la NSA

En cuanto a su composición química, es óxido de aluminio (Al_2O_3) y la densidad de la alúmina se midió en $0,108 \text{ g/cm}^3$.

El análisis de superficie de área fue llevado a cabo sobre polvo calcinado y polvo disperso (Particle Technology Labs, Downers Grove, IL). La NSA se caracteriza por la formación de aglomerados de partículas (Figura 16) y por una alta superficie específica de $14 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ (Toniolo et al., 2005; Stadler et al., 2012).

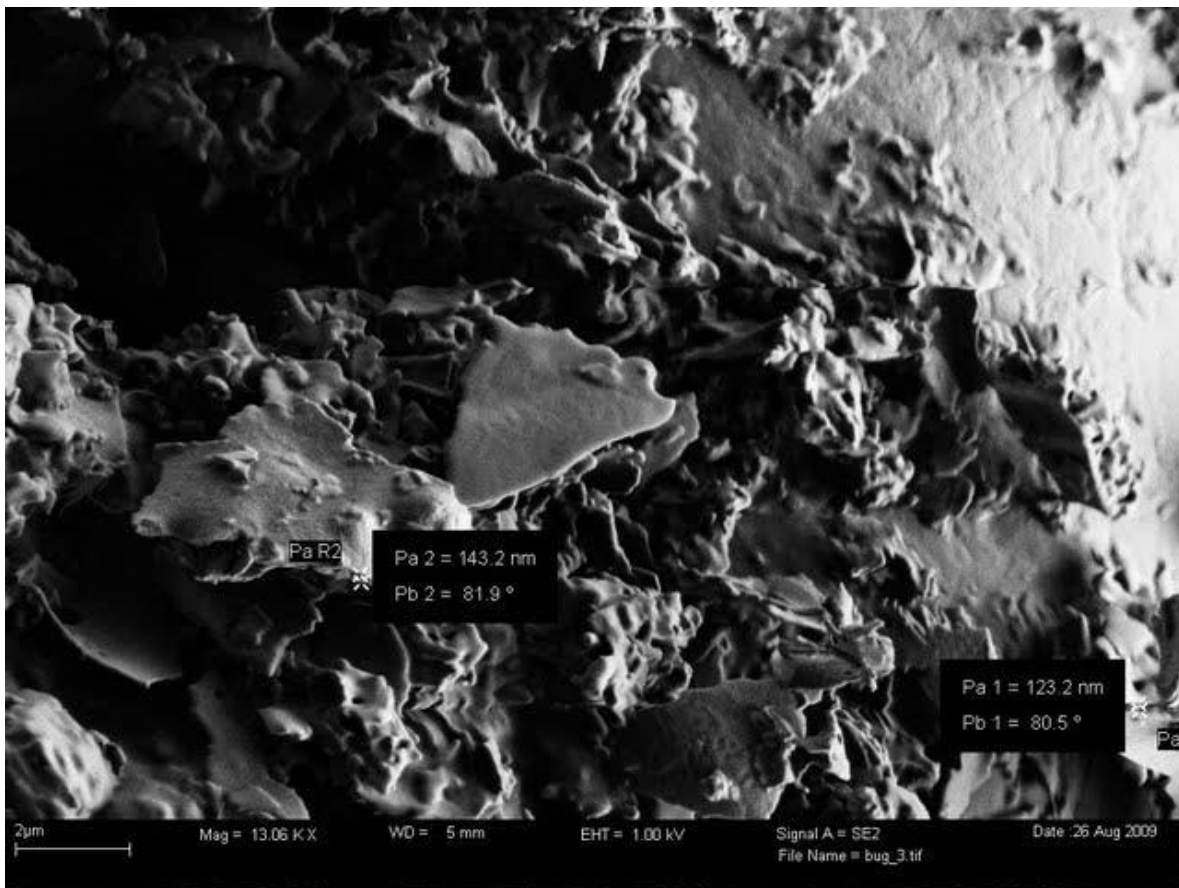


Figura 16. Micrografía MEB de agregados de Alúmina nanoestructurada, a partir de nanopartículas de 40-60nm. Alta Tensión Extra (EHT): 1KV. Distancia de trabajo (WD): 5 mm. Magnificación: 13.06 KX.

Tamaño de partículas y morfología

La alúmina nanoestructurada mostró una diferencia en morfología en comparación con Protect-It®. Mientras que las partículas parecen más densas, el tamaño es sustancialmente menor y es evidente la formación de nanoestructuras de 45 nm de espesor, en el caso de la NSA. El análisis de tamaño de partículas indica también una distribución bi-modal (Figura 17), debida a la morfología que presenta de formación de placas o nanoestructuras y a las condiciones utilizadas en el análisis. La mayor carga volumétrica de partículas grandes es indicada a los 1,5 μm con una distribución de partículas más pequeñas de 350 nm) (Stadler et al., 2012).

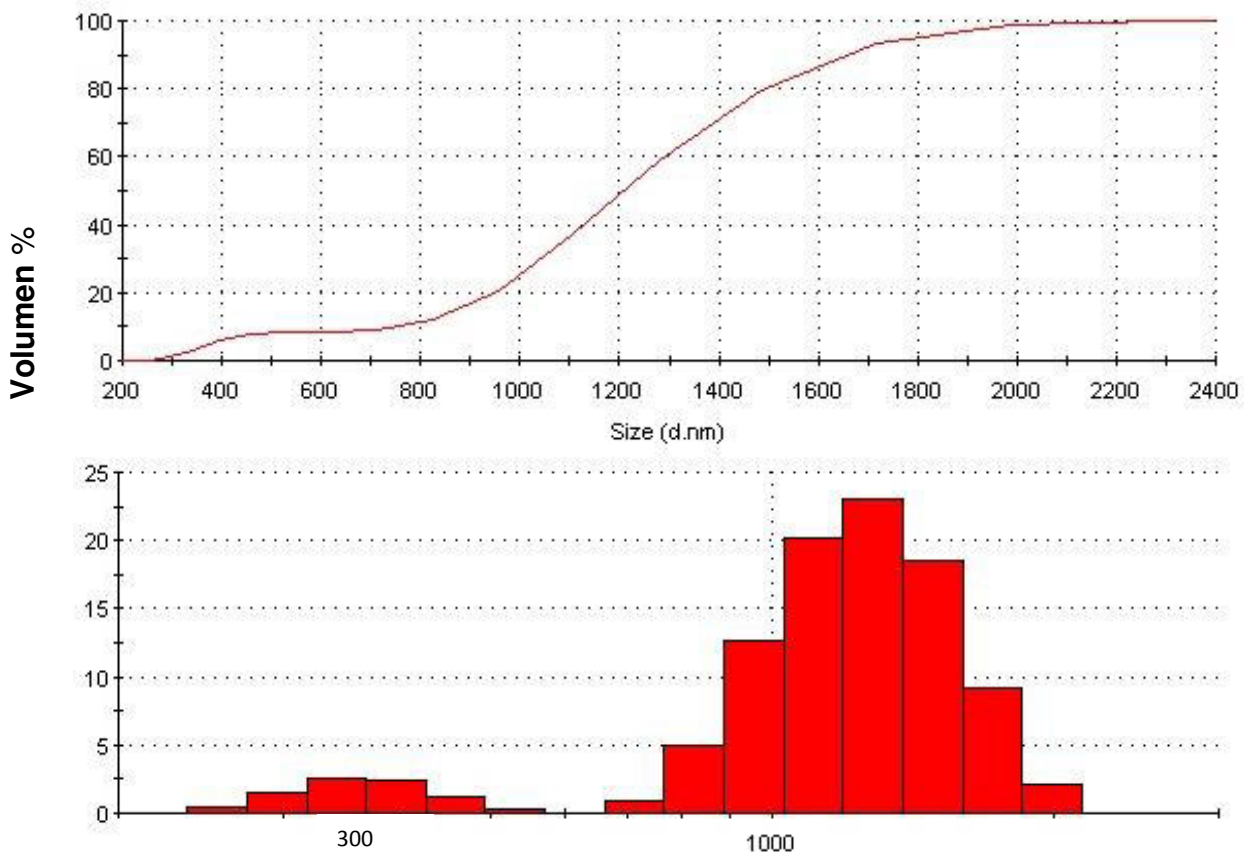


Figura 17. Distribución de tamaño de partículas de NSA, dispersión en agua con polimetacrilato de amonio como dispersante, Zetasizer Nano ZS. Gráfico superior en escala lineal e histogramas en escala logarítmica (tomado de Stadler et al., 2012)

Capítulo 3

Evaluación de la actividad insecticida por exposición a trigo tratado con NSA, sobre adultos de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio

Introducción

Durante los últimos 60 años, el uso de insecticidas convencionales de síntesis orgánica destinados a la protección de cultivos, combatir vectores de enfermedades humanas y animales, se ha incrementado progresivamente. A pesar de esto, existe un creciente interés en el desarrollo de nuevas alternativas a los pesticidas convencionales, debido al aumento de casos de resistencia a insecticidas por parte de plagas (Ferrero, 1988; Picollo de Villar et al., 1992; Descamps, 2002; Stadler et al., 2003), a la preocupación por la salud humana y a los efectos sobre el ambiente (Edwards, 1973; Pimentel et al., 1992; Gevao et al., 2000; Kamrin, 2010; Silva & Beauvais, 2010; Goullson, 2013; Byard et al., 2015; Sapozhnikova & Lehotay, 2015). Por otro lado, la demanda por una agricultura de bajo impacto ha impulsado a los investigadores y a la industria a trabajar en el desarrollo de pesticidas alternativos, menos tóxicos y ecológicamente aceptables. Consecuentemente, se ha intensificado la búsqueda de productos por fuera de la síntesis orgánica, explorando diferentes sustancias de origen natural como extractos vegetales, aceites e insecticidas inorgánicos sólidos como polvos inertes (PIs) (Liu & Ho, 1999; Altieri & Nicholls, 2000; Stadler *et al.*, 2010a; Stefanazzi, 2011; Conway & Barbier, 2013).

Los productos naturales con propiedades insecticidas, especialmente los PIs como la tierra de diatomeas (DE) y el caolín, exhiben características deseables tales como: baja toxicidad para mamíferos, bajo impacto ambiental, bajo costo y baja probabilidad de generar resistencia (Banks & Fields, 1995; D'Antonio, 1997; Golob, 1997; Subramanyam & Roesli, 2000). En particular, existe gran interés en los PIs para el control de insectos plaga, lo cual se evidencia por el creciente número de trabajos científicos publicados sobre este tema (Ebeling, 1971; Golob 1997; Arthur, 2002; Kavallieratos et al., 2005; Athanassiou et al., 2007; Vardeman et al. 2007; Debnath et al., 2011, Buteler, 2015; Frederick & Subramanyam, 2016),

dando lugar a nuevos usos y productos comerciales. A diferencia de la mayoría de los insecticidas de síntesis orgánica, que poseen mecanismos de acción bioquímicos para un sitio de acción específico (Krämer & Schirmer, 2007), la actividad insecticida de los PIs está ligada a fenómenos muy diversos como: repelencia, intoxicación por ingestión, disuasión de la oviposición, efectos fagodisuasivos, incertidumbre durante el reconocimiento de la planta hospedera, interferencias en la sujeción al hospedero y mortalidad por contacto directo (Chiu, 1939a,b; Puterka et al., 2000).

Como se mencionó en la introducción general, la eficacia insecticida de los PIs depende de la capacidad de estos de adsorber las ceras cuticulares de la superficie del exoesqueleto del insecto, por contacto directo con las partículas. También está relacionada con el valor absoluto de la superficie específica del PI (metros cuadrados por gramo), la humedad y temperatura ambiente, la especie de insecto y la formulación (Ebeling, 1961; Fields & Korunic, 2000; Subramanyam & Roesli, 2000; Vardeman et al., 2007, Korunic, 2013). La mayoría de los PIs que se encuentran en el mercado contienen sílice natural (SiO_2), tal como es el caso de la DE. También se encuentran polvos formulados a base de sílice sintética (silicagel), que son más eficaces que las DE naturales (Quarles, 1992; Subramanyam & Roesli, 2000; Korunic, 2013). Otro tipo de aluminosilicatos como la caolinita ($\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), controla plagas de cultivos agrícolas, actuando como repelente y/o barrera física (Glenn et al., 1999). Las partículas de caolinita depositadas sobre la superficie foliar, actúan como barrera contra el ataque de los insectos haciendo que la planta hospedera resulte irreconocible para el insecto, afectando así su reproducción y supervivencia (Puterka et al., 2000; Cottrell et al., 2002; Wyss & Daniel, 2004).

Los PIs a base de sílice natural como DE tienen una alta eficacia contra *Sitophilus oryzae*, si se los utiliza a concentraciones mayores de 1,5 g/kg (1500 ppm), obteniendo entre el 90 y 100% de mortalidad a los 7 y 8 días de exposición al trigo tratado (Subramanyam & Roesli, 2000). Lorini & Beckel (2006), obtuvieron una eficacia del 100% de mortalidad, después de 20 días de exposición a trigo tratado con 1000 ppm de DE. Otros autores sugieren concentraciones de 2000

ppm, 3500 ppm y 5000 ppm, para la protección de los granos almacenados (Quarles, 1992). En el caso de formulaciones con Silicagel (Protect-It®), se utilizan concentraciones de 0,3 g/kg (300 ppm), 0,5 g/kg (500 ppm) y 0,75 g/kg (750 ppm) (Quarles, 1992; Korunic & Ormesher 2000; Subramanyam & Roesli, 2000; Arthur, 2002).

El descubrimiento de la actividad insecticida de la alúmina nanoestructurada (NSA) generó nuevas perspectivas en el manejo de plagas con PIs a base de nanomateriales, debido a las bajas concentraciones requeridas (125 ppm y 250 ppm), que resultaron suficientes para obtener un 80% y 95% de mortalidad sobre *S. oryzae* y un 70 y 95% de mortalidad en *Rhizopertha dominica* después de 9 días de exposición a trigo tratado (Stadler et al., 2010a). La eficacia de la NSA fue mayor a la obtenida con los polvos insecticidas disponibles en el mercado a base de DE. Asimismo, los resultados obtenidos en bioensayos por contacto con diferentes niveles de humedad relativa, después de 15 días de exposición de *S. oryzae* a trigo tratado, aportaron información relevante sobre las variables que pueden afectar la actividad insecticida de la NSA e interferir en su mecanismo de acción (Stadler et al., 2012).

Por otra parte, Debnath et al. (2011), utilizaron nanopartículas de sílice en un rango de 15 a 30 ηm y concentraciones de 500 ppm, 1000 ppm y 2000 ppm. Los autores registraron una mayor mortalidad de *S.oryzae* expuesto a granos tratados con nanosílica, en comparación con los insectos expuestos a semillas tratadas con tierra de diatomeas en un rango de 100-400 ηm . Estos autores demostraron que la eficacia del SiO_2 aumenta en función de la reducción del tamaño de partícula.

Sobre la base de los antecedentes presentados y considerando que la nanotecnología representa una herramienta prometedora para el control de plagas, que aún se encuentra en vías de desarrollo (Pérez de Luque & Rubiales, 2009; Parr-Vasquez et al, 2010; Stadler et al., 2010b), el objetivo e hipótesis propuestos en el presente capítulo son:

Objetivo específico

Evaluar la actividad insecticida de la NSA sobre adultos de *Sitophilus oryzae*, a través de bioensayos de exposición por contacto a trigo tratado, en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), en condiciones controladas de laboratorio.

Hipótesis

La actividad insecticida por exposición a trigo tratado con NSA, es mayor que la obtenida con otros PIs de referencia como Protect-It® y DiatomiD®, para el control de *Sitophilus oryzae*, en bioensayos de toxicidad por contacto bajo condiciones controladas de laboratorio.

Materiales y Métodos

1. Material biológico

Sitophilus oryzae

Se utilizó el mismo material biológico y método de cría descritos en el capítulo 2, página 42 a 48.

2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos

Se utilizaron los mismos materiales insecticidas descritos en el capítulo 2, página 49 a 55.

Bioensayos de exposición a trigo tratado en condiciones de laboratorio (toxicidad por contacto)

Se llevaron a cabo bioensayos de laboratorio para evaluar la actividad insecticida por contacto de la NSA, Protect-It® y DiatomiD®. Los PIs fueron dosificados a concentraciones de 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm y 62,5 ppm por cada 20 gramos de trigo respectivamente y homogeneizados agitando energicamente durante un minuto según la metodología de Stadler et. al. (2010a). Se utilizaron placas de Petri de PVC de 9,5 cm de diámetro para contener los granos tratados, separados de los granos controles sin tratamiento. Por placa, se colocaron 20 insectos adultos sin sexar de 1 a 2 semanas de edad y se realizaron 10 réplicas por concentración para cada tratamiento (Figura 18 y 19). Las condiciones de los bioensayos fueron controladas en cámara oscura a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y

a $70 \pm 5\%$ de HR. En todos los tratamientos la mortalidad fue evaluada a los 7 días de comenzados los bioensayos.



Figura 18. Placa de Petri con trigo tratado con NSA, utilizadas para contener 20 adultos de *Sitophilus oryzae*, en bioensayo de toxicidad por contacto.



Figura 19. Aspecto general de los bioensayos de toxicidad por contacto

Análisis de datos

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba de la varianza ANOVA para modelos mixtos PROC MIXED (SAS 9.3 2011), con la mortalidad como variable respuesta y concentración, tratamientos e interacciones como efectos principales. Las réplicas de las placas de Petri fueron incluidas como un factor aleatorio. La comparación de medias se realizó con test de Tukey.

La concentración letal CL_{50} y CL_{95} (ppm) con 95% de límite de confianza (CLs95) fueron calculados con el análisis Probit (SAS 9.6 2011) después de 7 días de exposición continua al sustrato (trigo tratado y trigo sin tratar). El P valor chi cuadrado se utilizó para medir la bondad de ajuste de la regresión lineal de Probit.

Resultados

Del análisis de los resultados se obtiene que la NSA, Protect-It® y DiatomiD® producen mortalidad en adultos de *S.oryzae* después de 7 días de exposición a trigo tratado en placas de Petri (Figura 20).

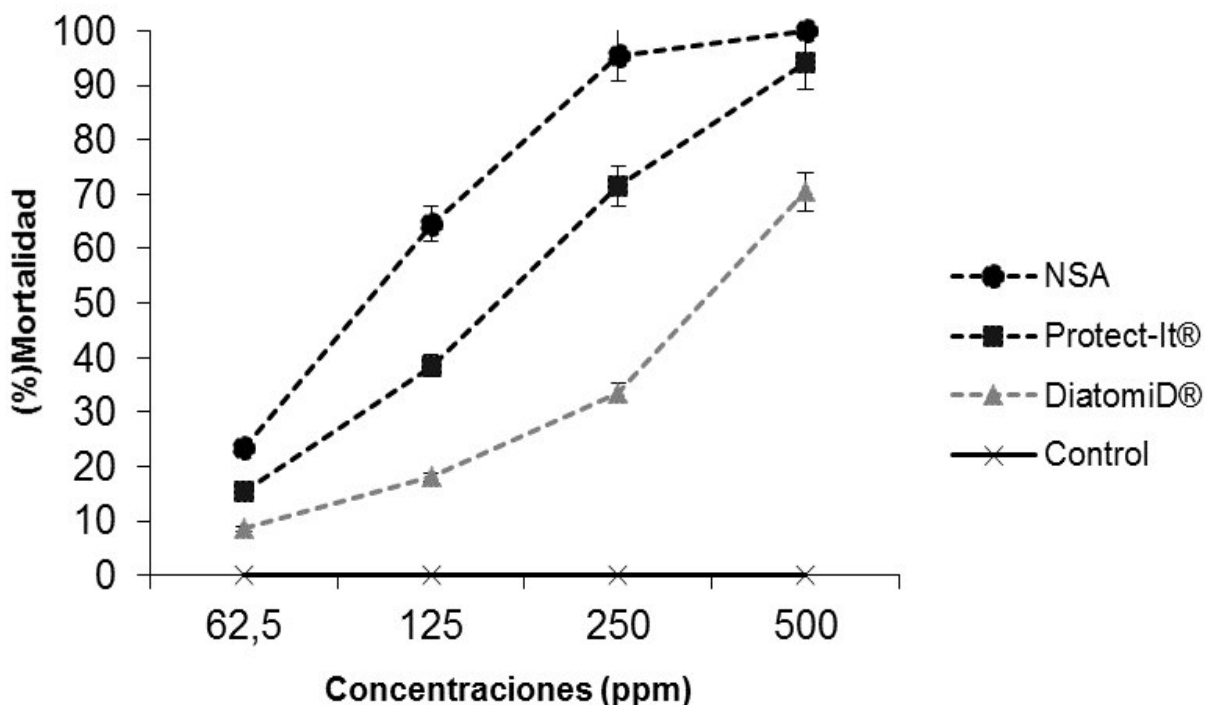


Figura 20. Porcentaje de mortalidad obtenido con adultos de *Sitophilus oryzae* después de 7 días de exposición a trigo tratado con los PIs, en bioensayo de toxicidad por contacto en condiciones de laboratorio. Para las concentraciones de 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm y 500 ppm, de los tres productos ensayados.

El porcentaje de mortalidad en *S.oryzae* aumentó en función del incremento de las concentraciones de NSA, Protect-It® y DiatomiD® en trigo (F= 1231,14; g.l = 3; P<0,0001). La actividad insecticida por exposición (toxicidad por contacto) de los PIs evaluados en condiciones de laboratorio, queda expresada en el valor del porcentaje de mortalidad, que para la NSA es mayor que el calculado para DiatomiD® en todas las concentraciones (de 62,5 ppm a 500 ppm) y mayor que el calculado para Protect-It® en las concentraciones de 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, pero similar para 500 ppm (Figura 20, tabla 1). No se registró mortalidad en los controles después de 7 días de exposición (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad insecticida por exposición (toxicidad por contacto) a trigo tratado comparada de los tres PIs sobre *Sitophilus oryzae*: resultados del análisis de la varianza para modelos mixtos (SAS 9.3 2011). Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05).

Tratamiento	Concentración	Mortalidad media	Grupo Letra
NSA	500	100	A
NSA	250	97,68	A
Protect-It®	500	96,93	A
Protect-It®	250	84,51	B
DiatomiD®	500	83,91	B
NSA	125	80,28	B
Protect-It®	125	61,80	C
DiatomiD®	250	57,64	C
NSA	62,5	48,36	D
DiatomiD®	125	42,25	E
Protect-It®	62,5	38,99	E
DiatomiD®	62,5	28,84	F
Control	0	0	G

Las diferencias en la actividad insecticida por exposición (toxicidad por contacto) de los PIs evaluados resultaron significativas estadísticamente (F=595,53; g.l=2; P<0,0001), también se observaron diferencias significativas en la interacción productos-concentraciones (F= 30,26; g.l=6; P<0,0001). La toxicidad de la NSA es mayor, en comparación con Protect-It® y DiatomiD®. Los resultados obtenidos del análisis Probit, muestran valores de CL₅₀ y CL₉₅ menores en valor

absoluto para la NSA (CL₅₀= 97 ppm, CL₉₅=250 ppm) y mayores para Protect-It® (CL₅₀= 152 ppm, CL₉₅= 584 ppm) y DiatomiD® (CL₅₀= 324 ppm, CL₉₅= 1901 ppm), dejando en evidencia la mayor eficacia del nanoinsecticida (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis Probit de los datos de mortalidad de *Sitophilus oryzae* expuesto a trigo tratado con NSA, Protect-It® y DiatomiD®. Tiempo de exposición = 7 días; n = 20; sustrato = granos de trigo tratados.

Tratamiento	CL ₅₀ (ppm) 95% LC	CL ₉₅ (ppm) 95% LC	Pendiente (EE)	Bondad de ajuste Chi-cuadrado/ P- valor
NSA	97 (90-104)	250 (222-288)	4,01(0,27)	0,39/0,99
Protect-It®	152 (140-165)	584 (498-712)	2,81(0,17)	0,41/0,99
DiatomiD®	324 (289-371)	1901 (1407-2837)	2,14(0,16)	0,42/0,99

LC (Límite de confianza del 95%). EE (Error estándar)

Discusión

De los resultados obtenidos en el presente estudio se obtiene que la NSA posee mayor eficacia insecticida que Protect-It® y DiatomiD® para el control de *S.oryzae*, después de 7 días de exposición a trigo tratado en bioensayos de exposición por contacto, en condiciones de laboratorio (Tabla 2). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Stadler (2010a), no obstante, se observa una concentración letal (CL) menor, que puede deberse a diferencias en la susceptibilidad de las diferentes cepas de *S.oryzae* y/o a diferencias en la variedad de trigo utilizado para los bioensayos.

Los resultados obtenidos ponen en evidencia el potencial de la NSA, cuya actividad insecticida por exposición en *S.oryzae* es, en principio, mayor que la obtenida con los PIs a base de sílice disponibles comercialmente. Las concentraciones efectivas de NSA (entre 125 ppm y 250 ppm) son menores que las recomendadas para la DE (DiatomiD®) (entre 500 ppm y 5000 ppm) y para formulaciones de DE con sílica gel (Protect-It®) (de 300 ppm a 750ppm) (Cotton & Frankenfeld, 1949; Quarles, 1992; Subramanyam & Roesli, 2000; Arthur, 2002; Lorini & Beckel, 2006; Stadler et al., 2010a).

Los PIs ejercen su acción insecticida a través de fenómenos físicos como la abrasión y adsorción de hidrocarburos cuticulares, provocando deshidratación y la

muerte del insecto (Subramanyam & Roesli, 2000). Principalmente, el tamaño de partícula de los PIs es la característica clave que se correlaciona de modo inverso con la toxicidad en insectos. El rango de tamaño de las nanopartículas que forman los aglomerados de NSA se encuentra entre 40-60 nm (Stadler, 2010a), mientras que el rango de tamaño de las micropartículas de DiatomiD®, se encuentra entre 1-50 µm (Subramanyam & Roesli, 2000) y en el caso de Protect-It® el tamaño medio es de 5,4 µm (Korunic et al., 1996). El menor tamaño de partículas, explica la mayor toxicidad de la NSA y de los nanoinsecticidas en general, como por ejemplo la nanosilica (Debnath et al., 2011), en comparación con los PIs micrométricos utilizados regularmente.

Los resultados de los bioensayos del presente estudio sugieren que la NSA es una alternativa promisorio para el control de plagas de granos almacenados, por tratarse de un producto inerte en cuanto a su composición química, eficaz por su baja dosificación y con reducidas probabilidades de provocar resistencia a corto o mediano plazo; debido a que su mecanismo de acción está basado en fenómenos físicos.

La hipótesis se verifica, la actividad insecticida por exposición a trigo tratado con NSA es mayor que la obtenida con otros PIs de referencia como Protect-It® y DiatomiD®, en bioensayos de exposición por contacto, bajo condiciones de laboratorio y dentro de plazos aceptables para el manejo de plagas de granos almacenados.

Conclusiones del capítulo 3

1) La actividad insecticida por exposición a trigo tratado con NSA, en bioensayos de toxicidad por contacto con *Sitophilus oryzae*, es mayor que la obtenida con los PIs de referencia contrastados (DiatomiD® y Protect-It®).

2) En bioensayos de toxicidad por contacto en condiciones controladas de laboratorio, luego de 7 días de exposición a trigo tratado con 250 ppm de NSA, se obtiene el 100% de mortalidad en adultos de *Sitophilus oryzae*.

Capítulo 4

Evaluación de la actividad insecticida por ingestión de la NSA en adultos de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio

Introducción

Los trabajos de investigación sobre toxicidad por ingestión de productos químicos en insectos fueron desarrollados mayoritariamente para sustancias líquidas, hidrosolubles/liposolubles, como insecticidas de síntesis orgánica, extractos vegetales, aceites esenciales y metabolitos bacterianos (Talukder & Howse, 1993; Xie et al., 1996, Gols et al., 1996; Bowen et al., 1998; Novo et al., 1998; Betz et al., 2000; Hooper-Bui & Rust, 2000; Bailey et al., 2005; Isman, 2006; Stefanazzi et al., 2011). Por ejemplo, algunos investigadores evaluaron en bioensayos de laboratorio, la toxicidad por ingestión del extracto de neem (*Azadirachta indica*) en plagas de granos almacenados (Xie et al., 1996). Prates et al. (1998) estudiaron aceites esenciales como el eucalyptol en *Rhyzopertha dominica* y *Tribolium castaneum*. Asimismo, Stefanazzi et al. (2011) evaluaron la toxicidad por ingestión de extractos de *Tagetes terniflora* (Asteraceae) y *Cymbopogon citratus* (Poaceae), sobre *S.oryzae* y *T. castaneum*. De manera similar, Taghizadeh & Mohammadkhani (2016), evaluaron los extractos vegetales de *Berberis thunbergii* (Berberidaceae) y *Alhagi maurorum* (Fabaceae), sobre *T. castaneum*.

De la bibliografía disponible puede dilucidarse que las sustancias evaluadas en cuanto a su toxicidad por ingestión (toxicidad oral o alimentaria), tanto en plagas de granos almacenados como de la agricultura son, en general, sustancias solubles y que los métodos de bioensayo utilizados son específicos para las mismas. En cambio, la evaluación de la toxicidad en insectos de sustancias insolubles como los PIs, se basa en ensayos por contacto, por exposición a superficies tratadas (ej. granos almacenados). A través de este tipo de bioensayo no es posible comprobar si junto con la toxicidad por contacto (fenómenos de superficie sobre la cutícula del insecto) se presenta algún efecto adicional, como la toxicidad oral o alimentaria. Un dilema similar surge de publicaciones sobre “toxicidad alimentaria” en las que el autor utiliza bioensayos en los que expone

insectos a un sustrato preparado a partir de la mezcla de harina y PIs (Shostak, 2014). En estos casos tampoco es posible discriminar entre los fenómenos de toxicidad por contacto y por ingestión.

Por otra parte, como se mencionó en el capítulo 1, algunos autores citan posibles efectos o fenómenos complementarios al principal mecanismo de acción de sorción/abrasión de ceras cuticulares de los PIs, tales como efectos sobre la alimentación y/o la interrupción de la actividad digestiva a causa de la ingestión de partículas (Wille & Fuentes, 1975; Edwards & Schwartz, 1981; Buteler et al., 2011). Otros, consideran que la actividad por contacto no sería el único mecanismo responsable de la acción insecticida de los PIs, ya que la exposición a concentraciones sub-letales afectan la supervivencia y el desarrollo en diferentes especies de insectos de distinta manera (Chiu 1939 a, b; Subramanyam & Roesli, 2000; Kabir et al., 2011; Fernandez-Ahrex et al., 2013; Buteler et al., 2014). Sin embargo, estas referencias son subjetivas, ya que en la bibliografía disponible no se encuentran antecedentes sobre técnicas de bioensayo específicas para la evaluación de la toxicidad por exposición a alimento tratado con PIs en insectos.

Para evaluar cuali-cuantitativamente los posibles efectos de la actividad insecticida por ingestión de PIs en insectos, resulta indispensable en primer lugar, desarrollar técnicas específicas para evaluar la toxicidad por ingestión y diferenciar este fenómeno de la toxicidad por contacto cuando los insectos son expuestos a semillas tratadas con PIs.

Objetivos específicos

1. Desarrollar y validar una técnica experimental específica (bioensayo) que permita determinar la actividad insecticida por ingestión de la NSA, independiente de los efectos de la toxicidad por contacto a insecticidas sólidos (PIs), en insectos plaga de granos almacenados
2. Evaluar la actividad insecticida por ingestión de la NSA, en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) en adultos de *Sitophilus oryzae*, a través de un bioensayo específico para insecticidas sólidos, basado en la ingestión de alimento artificial tratado y sin tratar.

Hipótesis

La NSA, así como los PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) resultan tóxicos por ingestión para adultos de *Sitophilus oryzae*.

Materiales y Métodos

1. Material biológico

Sitophilus oryzae

Se utilizó el mismo material biológico y método de cría descritos en el capítulo 2, página 42 a 48.

2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos

Se utilizaron los mismos materiales insecticidas descritos en el capítulo 2, página 49 a 55.

La toxicidad por ingestión de PIs en *S. oryzae* se determinó a través de bioensayos de alimentación (Xie et al., 1996) adaptados para polvos minerales insecticidas, utilizando discos de alimento artificial. Los discos control se prepararon con harina de trigo y agua, mientras que los discos tratados se prepararon incorporando los polvos insecticidas a la mezcla de harina y agua respectivamente.

Preparación del alimento artificial

Los discos tratados se prepararon como una suspensión de 500 ppm de NSA, harina de trigo y agua mQ. En un vaso de precipitado de vidrio de 250 mL se mezclaron 99,95g de harina de trigo (000), 50 mg del insecticida y 150 mL de agua destilada (calidad MQ). La mezcla fue homogeneizada mediante un agitador magnético utilizando una microbarra recubierta con teflón. Cinco suspensiones de 350 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 75 ppm y 36 ppm de NSA fueron preparadas utilizando el mismo procedimiento. El control se preparó a partir de una mezcla de harina y agua. La técnica se repitió con Protect-It® y DiatomiD®. Alícuotas de 100 a 200 mL de las suspensiones fueron aplicadas secuencialmente sobre una placa de vidrio a intervalos de 1cm. La placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 24h para el secado de los discos de harina tratados y control. Finalmente,

los discos se colocaron en cámara de incubación a $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $70 \pm 5\%$ de HR durante 24 h para estabilizar su contenido de humedad. El peso de los discos de harina tratado y control estuvo en un rango de 80 a 170 mg. La variabilidad en el peso de los discos de harina se debió a la utilización de alícuotas de 100 a 200 mL.

Bioensayo de toxicidad por ingestión con alimento artificial

Placas de Petri de 9,5 cm de diámetro fueron utilizadas como arena para el ensayo y en cada una se colocó un disco de alimento. En cada placa, se colocaron 20 adultos de *S.oryzae* sin sexar de 1 a 2 semanas de edad. Las concentraciones utilizadas para NSA, Protect-It® y DiatomiD®, fueron 36 ppm, 75 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 350 ppm y 500 ppm, además del alimento artificial sin tratamiento (control). Se realizaron 5 réplicas por tratamiento, se midió la mortalidad a partir de los 7 días y el punto final del ensayo se estableció a los 35 días, después de alcanzar el 100% de mortalidad con la máxima concentración de NSA (500 ppm). Previo a la realización de los bioensayos de actividad insecticida por ingestión, se desarrollaron ensayos preliminares (“screening”) con adultos de *S. oryzae*, para determinar el inicio de la mortalidad de los insectos luego de ingerir el alimento artificial tratado, además de establecer el punto final del bioensayo. Simultáneamente, se llevó a cabo un ensayo de inanición, donde se corroboró que los adultos de *S.oryzae* sobreviven hasta 9 días sin alimentarse. Esta información permitió independizarse de medir el consumo del alimento mediante el peso de los discos al final del ensayo, porque la sobrevivencia de los insectos superó los 9 días en presencia de los discos de alimento. Confirmando de manera indirecta el consumo de alimento.

Análisis de datos

Los resultados de los ensayos se analizaron mediante la prueba de la varianza ANOVA para modelos mixtos PROC MIXED (SAS 9.3 2011) con la mortalidad producida por la actividad insecticida por ingestión (toxicidad oral), como variable respuesta y la concentración, tratamiento y su interacción como

efectos principales. La concentración letal (CL_{50} y CL_{95}) fue calculada para el punto final del ensayo (35 días) utilizando el análisis Probit (SAS 9.6 2011).

Resultados

Una vez iniciado el bioensayo de toxicidad por ingestión, los primeros casos de mortalidad se presentaron a partir de los 7 días de exposición al alimento tratado con la máxima concentración de NSA y Protect-It®. Mientras que los primeros casos de mortalidad con el alimento tratado con la máxima concentración de DiatomiD®, se presentaron a partir de los 15 días de exposición (Figura 21). El 100% de mortalidad se obtuvo con la máxima concentración de 500 ppm, en el tratamiento con NSA, a los 35 días de iniciado el bioensayo. Mientras que con Protect-It® la mortalidad fue del 93% con la concentración de 500ppm. La mortalidad de *S. oryzae* por exposición al alimento tratado con DiatomiD®, a los 35 días de exposición y con la máxima concentración de 500 ppm fue de 38% (Figura 21). Los resultados de los bioensayos de alimentación con alimento artificial, mostraron que la mortalidad por ingestión en *S. oryzae* es dosis-dependiente. La NSA provocó un 100% de mortalidad con la concentración de 500 ppm, seguido por un 92%, 64%, 27%, 15% y 6% de mortalidad correspondiente a las concentraciones de 350 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 75 ppm y 36 ppm, a los 35 días de iniciado el ensayo (Figura 22). Los tratamientos con Protect-It®, alcanzaron el 93% y 79% de mortalidad con las concentraciones de 500ppm y 350 ppm, seguido de un 58% con la concentración de 250ppm a los 35 días de exposición. Mientras que con concentraciones de 125 ppm, 75 ppm y 36 ppm la mortalidad alcanzada fue de 29%, 18% y 4% después de 35 días de exposición, respectivamente (Figura 23). La eficacia de los tratamientos con DiatomiD® fue menor, en comparación con los otros PIs evaluados (Figura 24).

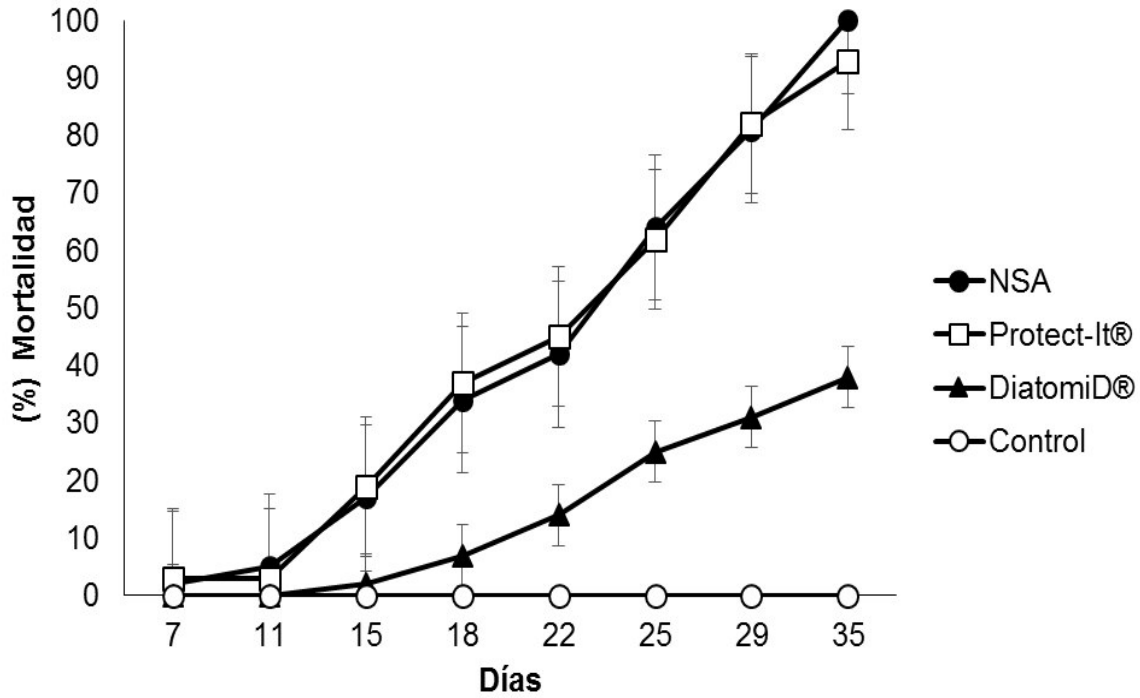


Figura 21. Porcentaje de mortalidad hasta los 35 días de exposición a alimento tratado con 500 ppm y control en bioensayos de alimentación (toxicidad por ingestión) en condiciones de laboratorio con adultos de *Sitophilus oryzae*.

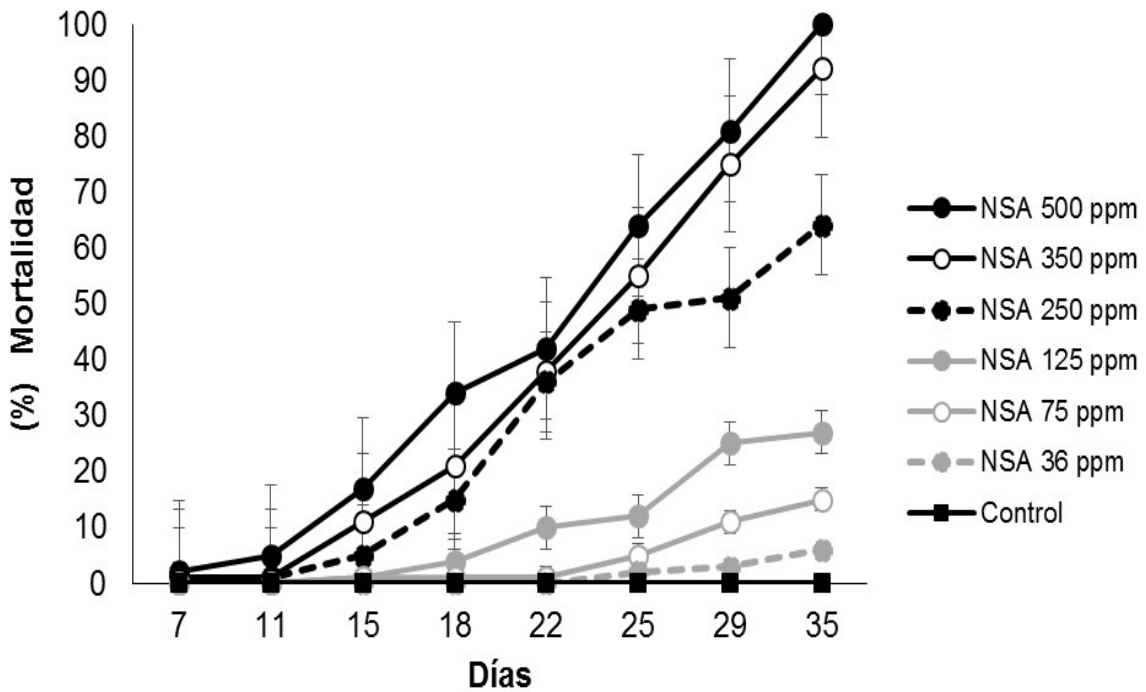


Figura 22. Porcentaje de mortalidad hasta los 35 días de exposición a alimento tratado con 36 ppm, 75 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 350 ppm y 500 ppm de NSA en bioensayos de alimentación (toxicidad por ingestión) en condiciones de laboratorio con adultos de *Sitophilus oryzae*.

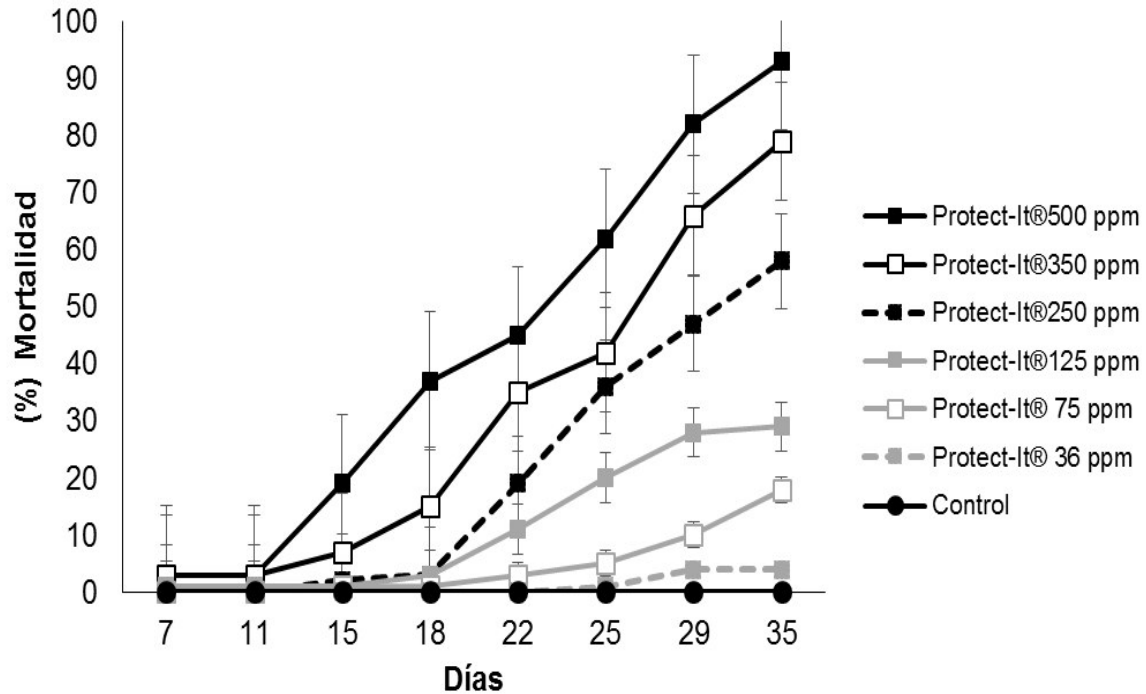


Figura 23. Porcentaje de mortalidad hasta los 35 días de exposición a alimento tratado con 36 ppm, 75 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 350 ppm y 500 ppm de Protect-It® en bioensayos de alimentación (toxicidad por ingestión) en condiciones de laboratorio con adultos de *Sitophilus oryzae*.

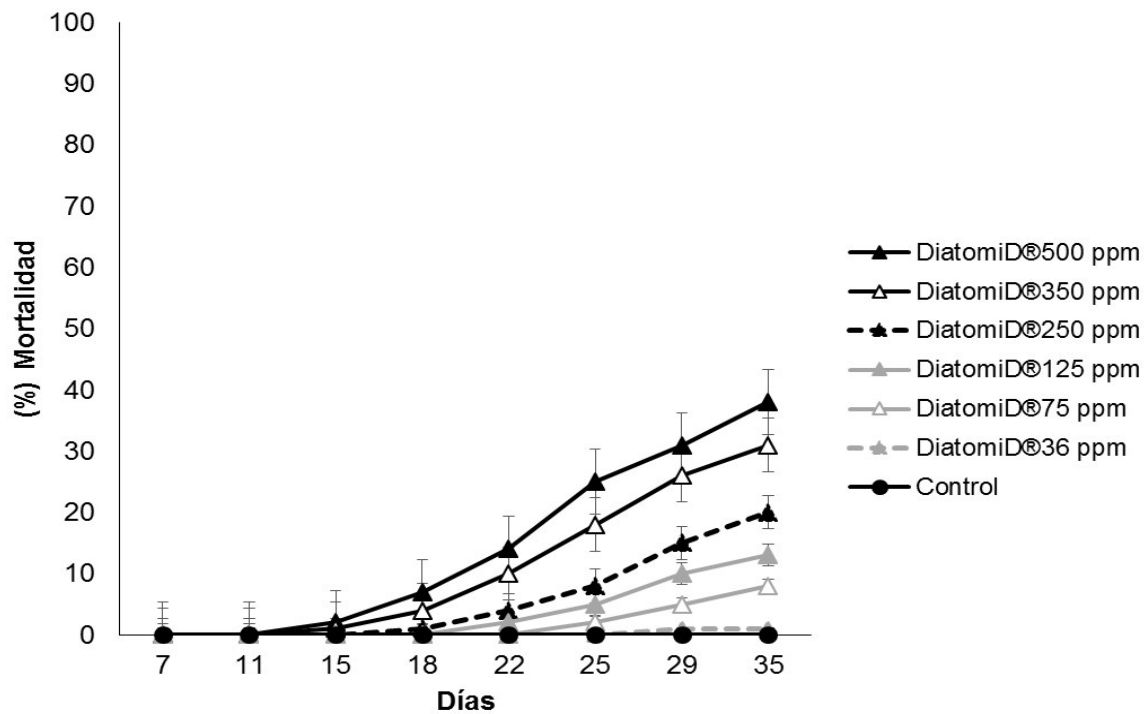


Figura 24. Porcentaje de mortalidad hasta los 35 días de exposición a alimento tratado con 36 ppm, 75 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 350 ppm y 500 ppm de DiatomiD® en bioensayos de alimentación (toxicidad por ingestión) en condiciones de laboratorio con adultos de *Sitophilus oryzae*.

Las diferencias entre los tratamientos, que consistieron en alimento a base de harina tratados con PIs, fueron estadísticamente significativas ($F=316,13$; $g.l=3$; $P<0,0001$). También se observaron diferencias significativas en la interacción entre productos y las concentraciones ($F= 23,30$; $g.l=11$; $P<0,0001$). La actividad insecticida por ingestión producida por la NSA es mayor, en comparación con Protect-It® y DiatomiD®. Los resultados obtenidos del análisis Probit, expusieron una concentración letal para el 50% y 95% de la población (CL_{50} y CL_{95}) menor en valores absolutos para NSA y mayor para Protect-It® y DiatomiD® (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis Probit de los datos de mortalidad de *Sitophilus oryzae* expuesto a alimento artificial tratado con NSA, DiatomiD ® y Protect-It®. Valores de la concentración letal (CL) y parámetros de la curva de regresión. Tiempo de exposición = 35 días; n=20.

	CL₅₀ (ppm) 95% CL	CL₉₅ (ppm) 95% CL	Pendiente (EE)	Intercepto (EE)
NSA	200 (186-216)	381 (353-418)	0,016(0,001)	-3,27(0,22)
Protect-It®	232 (214-251)	484 (445-533)	0,011(0,0008)	-2,71(0,19)
DiatomiD®	535 (480-615)	1044(904-1260)	0,005(0,0007)	-3,09(0,22)

LC (Límite de confianza del 95%). EE (Error estándar)

Discusión

Según la bibliografía disponible sobre eficacia y mecanismo de acción de los PIs, el principal factor de mortalidad de los insectos en ensayos de exposición por contacto es la deshidratación (Ebeling, 1971; Quarles, 1992; Golob 1997, Subramanyam & Roesli, 2000; Kavallieratos et al., 2005; Athanassiou et al., 2007; Vardeman et al., 2007; Cook et al., 2008; Stadler et al., 2010a, b; Debnath et al., 2011; Stadler et al., 2012; Kah & Hoffman, 2014). Sin embargo, aunque este es el principal factor de mortalidad, no parece ser el único efecto de los PIs (Wille & Fuentes, 1975; Edwards & Schwartz, 1981; Subramanyam & Roesli, 2000; Kabir et al., 2011; Buteler et al., 2011; Fernandez-Ahrex et al., 2013; Buteler et al., 2014).

Con la finalidad de disponer de un modelo experimental apropiado para alcanzar los objetivos planteados en el presente estudio, se diseñó y validó una técnica específica para evaluar la actividad insecticida por ingestión de PIs en

insectos, que permite independizar por completo el fenómeno de toxicidad por ingestión del de toxicidad por contacto.

Los resultados del presente bioensayo muestran los efectos de la toxicidad por ingestión producida por los PIs y corroboran lo mencionado por otros autores, que sugieren la existencia de posibles efectos complementarios como la toxicidad por ingestión (Chiu 1939 a, b; Wille & Fuentes, 1975; Edwards & Schwartz, 1981; Subramanyam & Roesli, 2000; Buteler et al., 2011; Kabir et al., 2011; Fernandez-Ahrex et al., 2013; Buteler et al., 2014). Por otro lado, los resultados también indican que la actividad insecticida por ingestión de los PIs es dosis-dependiente (Figuras 21, 22, 23 y 24).

Los insecticidas suelen tener varios sitios de acción, primarios (aquel a través del cual ejercen su principal efecto) y secundarios. Por ejemplo, el sitio de acción primario de los fosforados y carbamatos es la acetilcolinesterasa de la sinapsis, pero además inhiben otras esterasas en el organismo. En el caso de los piretroides, el sitio de acción primario son los canales de sodio dependientes de voltaje, pero también pueden afectar otros canales iónicos. La mayoría de los insecticidas restantes actúan directamente sobre receptores neuronales y/o canales iónicos, provocando síntomas de intoxicación (Casida, 2009). Por consiguiente, cuando se aplican con frecuencia productos que suelen tener un único sitio de acción primario en poblaciones de plagas con un elevado número de individuos y alta tasa reproductiva, el riesgo de desarrollo de resistencia será mayor que con los plaguicidas que actúan sobre varios sitios de acción en el insecto (Narahashi et al., 2007; FAO, 2012). De aquí se desprende que la coexistencia de un mecanismo de acción principal (toxicidad por contacto) en PIs, acompañado por la ahora comprobada toxicidad por ingestión, incidiría de un modo diferente en la aparición de fenómenos de resistencia por parte de insectos, al no poseer un único sitio de acción primario.

A partir de los resultados del presente estudio, queda demostrado que la actividad insecticida por ingestión (toxicidad oral o alimentaria) de los PIs, en insectos es un factor de mortalidad relevante y complementaria a la mortalidad producida por la toxicidad por contacto (estudiada y verificada en el capítulo 3).

La hipótesis se verifica, la NSA así como los PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) son tóxicos por ingestión para los adultos de *S. oryzae*.

Conclusiones del capítulo 4

1) La nueva técnica diseñada para determinar la actividad insecticida por ingestión de la NSA en laboratorio es específica, reproducible y apropiada para la evaluación de insecticidas minerales sólidos a base de nanopartículas y micropartículas (PIs).

2) Los PIs estudiados, tanto los nanoestructurados (NSA) como los microparticulados (Protect-It® y DiatomiD®) resultan tóxicos por ingestión para los adultos de *Sitophilus oryzae* en bioensayos de laboratorio, a partir de los 7 días de exposición al alimento.

3) La actividad insecticida por ingestión de los PIs puede ser considerada como un fenómeno complementario y simultáneo a la toxicidad por contacto provocada por la exposición de los insectos a semillas tratadas con NSA.

4) La toxicidad por ingestión de los PIs puede considerarse como un factor de mortalidad secundario.

Capítulo 5

Evaluación del efecto insecticida de la NSA sobre la población parental, la producción de progenie (F1) y el daño provocado por *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) en grano almacenado en condiciones de laboratorio

Introducción

En el periodo de postcosecha los insectos causan importantes daños en los granos almacenados en silos, estos se traducen en pérdida de masa, generación de calor metabólico y aumento de la humedad en granos. Estas condiciones favorecen el desarrollo microbiano, el deterioro de las propiedades organolépticas de las semillas y la reducción del poder germinativo. La expansión del daño en las semillas, depende de la voracidad de cada especie de insecto y de la velocidad en el incremento de la densidad poblacional (Ebeling, 1971; Fields & Korunic, 2000; Subramanyam & Roesli, 2000; Korunic, 2013).

La mayoría de los bioensayos para evaluar la eficacia de PIs, que se encuentran en la literatura fueron realizados en condiciones de laboratorio y algunos, como el caso de la tierra de diatomeas (DE) en condiciones de semi-campo y campo. En estos se evaluó la mortalidad de los insectos en diferentes condiciones de temperatura y humedad, la producción y supervivencia de F1, pérdida de peso de los granos y producción de polvo o *frass* (Ebeling, 1971; Quarles, 1992, 1997; Korunic & Mackay, 1999; Fields & Korunic, 2000; Subramanyam & Roesli, 2000; Arthur, 2002; Kavallieratos et al., 2005; Athanassiou et al., 2007; Chanbang et al., 2007; Vardeman et al., 2007; Korunic, 2013). En bioensayos con PIs nanoparticulados, como NSA y nanosilica, se evaluó la mortalidad de los insectos en condiciones de laboratorio bajo diferentes humedades relativas (Stadler et al., 2010a; Debnath et al., 2011; Stadler et al., 2012).

Las variables más relevantes que afectan los resultados de los bioensayos con Pis son el contenido de agua de las semillas y la humedad relativa en el ambiente de ensayo; en todos los casos se observa que la mortalidad de los insectos resulta inversamente proporcional a estas variables (Nair, 1957; Carlson

& Ball, 1962; La Hue, 1965; Ebeling, 1971; Maceljski & Korunic, 1972; Desmarchelier & Dines, 1987; Aldryhim, 1993; Fields & Korunic, 2000; Stadler et al., 2012; Buteler et al., 2015).

Athanassiou et al. (2005) evaluaron la eficacia insecticida, el desarrollo poblacional y los efectos transgeneracionales (desarrollos de progenie F1) en los tratamientos con tierra de diatomeas (Silicosec®) en condiciones de laboratorio sobre *S. oryzae*. Estos autores registraron que la emergencia de F1, se produjo principalmente a los 22 °C. Tefera et al. (2011) llevaron a cabo bioensayos para medir la densidad poblacional final de *S. zeamais*, el daño en maíz y la producción de *frass*, luego de 60 días de incubación en recipientes cilíndricos con 200 gramos de maíz, en condiciones de 65% de H.R. y de 28 ± 2 °C. Por otro lado, Arthur (2002), estudió la supervivencia de *S.oryzae* y la producción de F1, en trigo tratado con Protect-It® a diferentes concentraciones, densidades poblacionales, temperaturas y humedades relativas. El autor determinó que la producción de progenie de *S. oryzae* es significativamente menor en trigo tratado con PIs en comparación con el control. También demuestra que la producción máxima de progenie (F1), tiene lugar a los 27 °C y 75% HR, obteniendo una F1 de 200 individuos a partir de una población parental de 20 insectos. Con respecto a la producción de progenie en trigo tratado con diferentes concentraciones de NSA, Stadler et al. (2012) demostraron en bioensayos de laboratorio con placas de Petri, que la NSA resultó más eficaz para suprimir la F1 en *S. oryzae*, en comparación con Protect-It®.

Los resultados de los trabajos anteriormente mencionados muestran que la producción de progenie en *S. oryzae* y el daño en semillas (pérdida de peso y producción de *frass*) son criterios importantes de evaluación, para medir a largo plazo la eficacia insecticida de los PIs como la NSA.

Hasta el presente, la evaluación de la eficacia de la NSA fue realizada sobre la base de bioensayos de exposición bajo condiciones de laboratorio, usando pequeñas cantidades de trigo (30 gramos) en placas de Petri de 90 mm de diámetro (Stadler et al., 2010a; 2012). Para el presente estudio, se amplió el tamaño del modelo experimental incrementando la masa de trigo y el número de

insectos del grupo parental, con la finalidad de evaluar el efecto de la NSA sobre la supervivencia de la generación parental, la producción de progenie (F1) y el daño ocasionado en semillas (pérdida de peso en trigo y producción de *frass*) por *S.oryzae*.

Objetivo específico

Evaluar los efectos de la NSA sobre *Sitophilus oryzae* en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), en un modelo experimental de mayores dimensiones que el método de bioensayo tradicional, con la finalidad de cuantificar la supervivencia parental, el daño en granos y el efecto sobre el desarrollo poblacional (progenie o F1).

Hipótesis

El efecto de la NSA sobre la supervivencia parental, el daño en granos y el impacto sobre desarrollo poblacional (F1) de *Sitophilus oryzae*, es mayor que el que se obtenido con los PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®)

Materiales y Métodos

1. Material biológico

Sitophilus oryzae

Se utilizó el mismo material biológico y método de cría descritos en el capítulo 2, página 42 a 48.

2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos

Se utilizaron los mismos materiales insecticidas descritos en el capítulo 2, página 49 a 55.

Bioensayos de eficacia en silos

Los polvos minerales (NSA), Protectt-I® y DiatomiD® fueron dosificados a concentraciones de 250 ppm y 500 ppm, por cada 200 gramos de trigo respectivamente y homogeneizados agitando enérgicamente durante tres minutos. El grano fue colocado en recipientes cilíndricos de chapa galvanizada (silos) de 1mm de espesor, 7 cm de diámetro y 12 cm de altura, con una capacidad de 400

cm³, para contener los granos tratados y sin tratamientos (control) respectivamente (Figura 25). Se colocaron 200 insectos adultos por silo y se llevaron a cabo 5 réplicas por tratamiento, incluidos los controles. Los silos fueron cubiertos en su parte superior mediante tul con la finalidad de bloquear la abertura, permitiendo el intercambio de aire. Los silos fueron colocados en una cámara DBO, en oscuridad, a 27° ± 1°C y a 75% ± 5% de HR. Para todos los tratamientos fue evaluada la supervivencia de la población parental a los 7, 14 y 21 días de comenzado el bioensayo

Después de 21 días de exposición, los insectos de la población parental de todos los tratamientos fueron removidos y fue evaluada la supervivencia. Los silos fueron colocados nuevamente en la cámara DBO hasta la emergencia de la progenie (F1) (Figura 26). Con la finalidad de monitorear el ensayo en silos sin causar disturbios en el desarrollo de las poblaciones, se preparó simultáneamente una placa de Petri con 30 gramos de trigo y 100 individuos de *S.oryzae* de edad y sexo indeterminado. La remoción de los insectos de los silos se realizó acorde con la evolución de la población de la placa de Petri. La placa de Petri fue monitoreada a intervalos de 48 horas hasta el pico de emergencia de insectos (F1), que se produjo el día 42, cuando se procedió a realizar el recuento de los individuos de la F1 en todos los silos (Figura 26). La tasa de multiplicación se calculó a través de la siguiente fórmula:

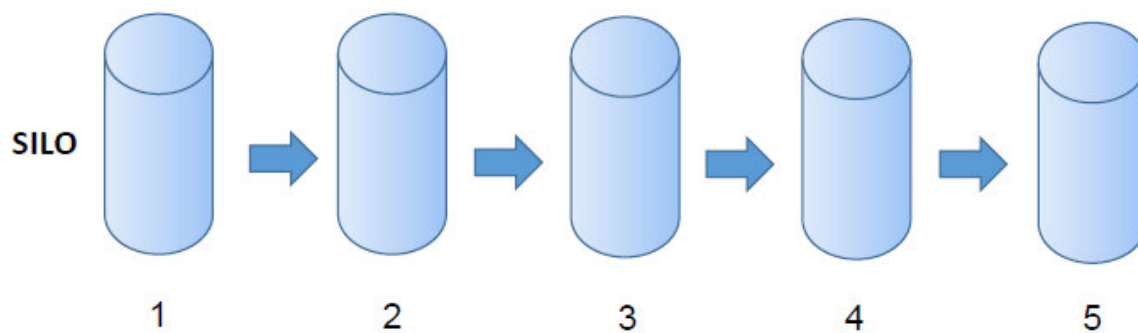
TM = (N° de insectos de la F1 / N° de insectos parentales) ¹ / n – 1. Donde n = 3 semanas, es el tiempo en el que la generación parental fue sometida al trigo tratado y sin tratar.

Para cuantificar la producción de frass (residuo compuesto mayoritariamente por excrementos de los insectos y aserrín proveniente de la alimentación) (Figura 27), después de 21 días de exposición, el contenido de cada silo fue tamizado por una malla de 0,6 mm separando el trigo del *frass* para pesar ambos por separado. El daño se calculó a través de la diferencia de peso del grano al inicio y al final del ensayo. El porcentaje de pérdida de peso, tanto en el

trigo tratado como en el control fue calculado usando la ecuación: **peso inicial - peso final / peso inicial) x 100**.



Figura 25. Recipiente cilíndrico de hierro galvanizado (silo), utilizado en los bioensayos. Medidas: 1mm de espesor por 7 cm de diámetro y 12 cm de altura. Capacidad: 400 ml.



- 1: Inicio del ensayo, colocación de insectos en silos (día 1)
- 2: Recuento de insectos vivos y extracción de muertos (7, 14 y 21 días).
- 3: Extracción del resto de insectos vivos a los 21 días.
- 4: Evaluación de daño a los 21 días.
- 5: Recuento de la progenie (F1) a los 42 días

Figura 26. Esquema general de las etapas seguidas en la metodología utilizada en bioensayo de eficacia insecticida en silos.



Figura 27. Residuo “Frass” compuesto por excrementos de insectos, aserrín proveniente de la ingesta y restos de insectos muertos, en adición a los restos de semillas de trigo dañadas por *Sitophilus oryzae*.

Análisis de datos

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de la varianza ANOVA para modelos mixtos PROC MIXED (SAS 9.3 2011), con la mortalidad de los adultos como variable respuesta y concentración, tratamientos y sus interacciones como efectos principales. La comparación de medias se realizó con test de Tukey.

Resultados

Evaluación del daño

En los tratamientos con NSA, Protect-It® y DiatomiD® se observó una reducción significativa de la pérdida de peso del grano y en la producción de *frass* en el trigo infestado con *S. oryzae* (Tabla 4). Después de 21 días de exposición, el efecto sobre el consumo de trigo tratado por parte de los insectos fue significativo en comparación con el consumo en los controles ($F= 194,5$; g.l.= 6, 28; $P<0.0001$), así como también en la producción de *frass* ($F= 74.93$; g.l. = 6, 28; $P<0.0001$). La producción más baja de *frass* fue alcanzada en el trigo tratado con

500 ppm de NSA y Protect-It® respectivamente, seguidos por DiatomiD® y los controles (Tabla 4). La reducción de peso del trigo fue similar en los tratamientos con NSA y Protect-it® y significativamente menor en comparación con los tratamientos con DiatomiD®.

Tabla 4. Valores medios de pérdida de peso de trigo y producción de *frass*, después de 21 días de exposición a granos tratados y sin tratar de la generación parental. Número de adultos de *Sitophilus oryzae* emergidos en F1 después de 42 días de desarrollo a 27 ± 1 °C y $75 \pm 5\%$ HR. Tasa de multiplicación obtenida y promedio de mortalidad de la población parental a los 7, 14 y 21 días.

Tratamientos (ppm)	Pérdida de peso en granos (%)	<i>frass</i> (gramos)(E.E)	N° adultos F1 (E.E)	Tasa de multiplicación (F1)	% mortalidad parental (promedio)(E.E)		
					7 días	14 días	21 días
CONTROL	17,46	1,85(0,15)	2171 (49,1)	5,42	5,6 (1,4)	7,1(1,1)	8,4
DiatomiD 250	1,64	0,92(0,02)	1363 (15,6)	3,40	16,9(2,1)	38,8(1,1)	64,5(4,2)
DiatomiD 500	0,25	0,46(0,12)	816 (47,2)	2,04	32,3(1,9)	62,6(3,3)	82,7(2,1)
Protect it 250	0,19	0,32(0,04)	574 (41,3)	1,43	26,7(3,2)	62,1(3,6)	82,0(0,9)
Protect it 500	0,23	0,27(0,05)	434 (26,4)	1,08	33(6,9)	85,0(2,7)	97,8(1,0)
NSA 250	0,15	0,22(0,03)	306 (14,6)	0,76	64,0(2,7)	86,6(1,4)	100(0)
NSA 500	0,12	0,13(0,002)	214 (14,6)	0,53	80,0(1,8)	100(0)	100(0)

Supervivencia parental

El porcentaje de mortalidad aumentó en el grupo parental en función de los tratamientos de NSA, Protect-It® y DiatomiD® en trigo ($F= 135,72$; g.l.= 2,78; $P<0.0001$), en función del tiempo de exposición ($F=191,64$; g.l.= 2,78; $P<0.0001$), independientemente de cada PIs utilizado y en función de las concentraciones ($F= 56,89$; g.l.= 2, 78; $P<0.0001$) (Tablas 4 y 5). La supervivencia de la población parental fue alta en los controles, seguida en orden por los tratamientos con DiatomiD®, Protect-it® y NSA. (Tabla 6).

Tabla 5. N° promedio de individuos muertos/réplica obtenido en *Sitophilus oryzae* después de 21 días de exposición a trigo tratado vs trigo sin tratar (control) en silos, bajo condiciones de laboratorio. Resultados del análisis de la varianza (SAS 9.3 2011), tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05). N (n° de réplicas) = 5.

Tratamientos	Medias(n° de insectos)	N	Grupo letra
Control	16,8	5	A
DiatomiD® 250	129,2	5	B
Protectt-I® 250	164	5	C
DiatomiD® 500	165,4	5	C
Protectt-I® 500	195,6	5	D
NSA 250	200	5	D
NSA 500	200	5	D

Tabla 6. Porcentaje de supervivencia medio de la población parental de adultos de *Sitophilus oryzae* a los 7, 14 y 21 días de exposición.

Tratamientos (ppm)	% supervivencia parental (media) (E.E)		
	7 días	14 días	21 días
CONTROL	94,4(1,3)	92,9(1,2)	91,6(0,8)
DiatomiD 250	83,1(2,1)	61,2(1,3)	35,5(4,1)
DiatomiD 500	67,7(1,9)	37,4(2,8)	17,3(2,08)
Protect it 250	73,3(3,3)	37,9(3,6)	18(1,04)
Protect it 500	67(6,9)	15(2,7)	2,2(1,03)
NSA 250	36(2,7)	13,4(1,4)	0 (0)
NSA 500	20(1,7)	0 (0)	0 (0)

Efectos de la NSA sobre la progenie de *Sitophilus oryzae*

Con las condiciones de bioensayo especificadas, con una población parental de 200 individuos, la población inicial de *S. oryzae* produce luego de 21 días de exposición a trigo sin tratar (control) y 42 días de incubación una progenie media de 2171 individuos; aproximadamente diez veces más que la población parental inicial y significativamente mayor que la obtenida con el trigo tratado (Tabla 4). Los resultados de los bioensayos muestran que la supresión de la

progenie está relacionada con la clase de PIs y la concentración utilizada. El número de individuos de la F1 es significativamente menor en los tratamientos con NSA, seguidos por Protect-it® y DiamotiD® ($F= 456,4$; g.l.= 6, 28; $P<0.0001$), en comparación con los controles. El mayor nivel de supresión de progenie en *S.oryzae* se obtuvo en trigo tratado con 500 ppm de NSA, seguido por Protect-it® y DiamotiD®. Estos resultados revelan el alto impacto de la NSA sobre la dinámica de poblacional de la plaga en comparación con Protect-it® y DiamotiD® (Tabla 4).

Discusión

Los resultados del presente estudio concuerdan con los obtenidos por Stadler et al. (2010a, 2012), la NSA posee mayor eficacia insecticida que los PIs a base de DE natural y silicagel (DiatomiD® y Protect-it®) (Tablas 4, 5 y 6). La baja mortalidad registrada en trigo tratado con DE natural (DiatomiD®), puede deberse a que las concentraciones de 250 ppm y 500 ppm son bajas para un PIs de estas características, teniendo en cuenta que las concentraciones habitualmente utilizadas son mayores a 1000 ppm (Quarles, 1992; Subramanyam & Roesli 2000; Lorini & Beckel, 2006).

Diversas investigaciones sugieren que la eficacia de los PIs depende de la humedad del grano y de la H.R. (Nair, 1957; Carlson & Ball, 1962; Simons & Hare, 1965; Ebeling 1971; Desmarchelier & Dines, 1987; Aldryhim, 1993, Fields & Korunic, 2000; Stadler et al., 2012, Buteler et al., 2015). En el caso del presente estudio, la H.R. fue de $75\% \pm 5\%$ y la temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, las condiciones óptimas para que *S.oryzae* se desarrolle (Arthur, 2002) y la mortalidad en los controles se mantenga por debajo del 10%. Si bien, las condiciones controladas mencionadas son las mismas que las presentes en los bioensayos de toxicidad por contacto, en los que se utilizaron placas de Petri (materiales y métodos, capítulo 3). En los bioensayos con recipientes cilíndricos (silos), fueron necesarios 14 días de exposición para obtener el 100% de mortalidad de *S.oryzae* con una concentración máxima de 500 ppm de NSA, en comparación con los 7 días necesarios en los bioensayos con placas de Petri. Esta diferencia de 7 días en el tiempo de exposición, puede deberse a la utilización de la malla de tul en los silos

que permiten la circulación de aire húmedo, incrementando la H.R en su interior y la humedad intrínseca de los granos (las mejores condiciones para el desarrollo *S.oryzae* y las más difíciles el funcionamiento de un PI).

Los resultados del presente estudio, coinciden con lo postulado por diversos autores que afirman que los PIs son eficaces en la reducción del daño en semillas (pérdida de peso de las semillas) y en la reducción de la producción de *frass* (Ebeling 1971, Quarles, 1992; Fields & Korunic, 2000; Subramanyam & Roesli, 2000; Arthur, 2002; Chanbang et al., 2007). Los tratamientos en el presente bioensayo tuvieron una alta eficacia en la reducción del daño producido en trigo por *S.oryzae*, luego de 21 días de exposición (Tabla 4). El consumo de trigo en los tratamientos con NSA y Protect-it® no difiere entre sí, mientras que las diferencias en el consumo de trigo tratado con DE natural (DiatomiD®) y con el control son significativas. Del mismo modo, se produjo un efecto de los tratamientos sobre la producción de *frass* (Tabla 4).

A pesar que la mortalidad en la población parental de *S. oryzae* expuesta a NSA fue del 100%, la inhibición de la producción de progenie no fue total, debido a que el tiempo de exposición (7 a 14 días) fue suficiente para que algunos insectos logren oviponer. Coincidiendo con Arthur (2002), la F1 obtenida de los controles fue aproximadamente 10 veces mayor a la población parental inicial en condiciones de 27 ± 1 °C y $75\% \pm 5\%$ H.R. A diferencia de los resultados obtenidos por Tefera et al. (2011) donde la progenie resultante fue 3 veces mayor a la población parental en condiciones de 65% de H.R y de 28 ± 2 °C.

De manera similar a los resultados obtenidos por Stadler et al. (2012), en bioensayos de laboratorio con placas de Petri, la NSA resultó eficaz para suprimir la progenie (F1) de *S. oryzae* en condiciones controladas de almacenamiento, utilizando granos de trigo en silos pequeños. La hipótesis se verifica, el efecto de la NSA sobre la supervivencia parental, el daño en granos y sobre la progenie (F1) de *S. oryzae* es mayor que el obtenido con otros PIs de referencia a base de sílice (Protect-It® y DiatomiD®).

Conclusiones del capítulo 5

1) En condiciones controladas de almacenamiento de trigo en silos pequeños, la NSA muestra mayor eficacia insecticida en comparación con Protect-It® y DiatomiD®, reduciendo la supervivencia de insectos adultos (población inicial/parental), el daño en semillas (pérdida de peso en granos y producción de *frass*) y el desarrollo poblacional (F1).

2) En condiciones controladas de almacenamiento en silos con trigo tratado con NSA, se observa una significativa reducción en el consumo de alimento por parte de los adultos de *Sitophilus oryzae* en comparación con el consumo de alimento medido en los silos con trigo sin tratamiento (control).

Capítulo 6

Evaluación de los efectos antixenóticos de la NSA sobre *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) en condiciones de laboratorio

Consideraciones generales

El comportamiento de los insectos, a diferencia de los vertebrados, está principalmente vinculado a señales químicas de su entorno y en menor medida a señales visuales, táctiles y auditivas (Dahanukar et al., 2005, Champman, 2009). Los quimiorreceptores (receptores moleculares) para el olfato y gusto se localizan principalmente en antenas y tarsos, son responsables de la respuesta del insecto a compuestos atrayentes y repelentes (Gillot, 2005; Gullan & Cranston, 2010). Por otra parte, los mecanorreceptores diferenciados en externoceptores, internoceptores y propioceptores (pelos táctiles, sensilias campaniformes, sensilias tricoides, etc.), permiten al insecto percibir las señales mecánicas a partir del contacto con objetos, vibraciones a través del aire y del sustrato. También le permiten percibir distorsiones del cuerpo y de las extremidades, generadas por cambios en la posición del cuerpo, movimientos del insecto o por la misma gravedad. Por lo tanto, los mecanorreceptores para los insectos son equivalentes a los sentidos del tacto, del oído y del equilibrio (Champman, 2013).

En los insectos, las reacciones de aceptación y rechazo (antixenosis) dependen de estímulos externos como el olor, color y textura, así como del estado interno del insecto. Los receptores olfatorios, gustativos, mecánicos y visuales transmiten impulsos al sistema nervioso central, de manera que la respuesta de los insectos esta modulada por la sumatoria de estímulos de diferente origen (Dethier, 1982; Jackson, 1990; Champman, 2013). Los ejemplos que se encuentran en la bibliografía acerca de las respuestas de antixenosis (no preferencia o rechazo) y preferencia, por parte de insectos son muy diversos y abarcan desde vegetales que poseen repelentes químicos y fagodisuasivos que inhiben la alimentación, hasta aquellas plantas que contienen compuestos atrayentes, colores, texturas y características físicas que afectan el comportamiento de recolección de néctar y de la oviposición (Derridj et al., 1989;

Menzel & Backhaus,1989; Foster et al., 1997; Reza & Parween, 2006; Saldúa, 2013).

El mecanismo de antixenosis o no preferencia, fue definido por Painter (1951, 1958), como la capacidad de las plantas de no compatibilizar con el insecto, evitando que éste las utilice para su alimentación, oviposición y refugio. Según Jackson (1990), existen tres formas generales de antixenosis, que están estrechamente asociadas al comportamiento del insecto:

- 1) La planta no es localizada por los insectos, porque estos simplemente no pueden, o no tienen la capacidad para encontrarlas. Los insectos fallan en la localización de la fuente de alimento porque ésta carece de ciertos atractivos. No existe el estímulo externo como el olor o el color (Jackson, 1990).
- 2) La planta es atractante a la distancia, pero carece de estímulos específicos que permitan la aceptación para la ovoposición y/o alimentación. Esta característica es determinante cuando el insecto toma contacto con la planta (Jackson, 1990).
- 3) Los insectos rechazan las plantas debido a la presencia de sustancias específicas fagodisuasivas y repelentes. Diferentes especies de plantas no hospederas contienen repelentes o fagodisuasivos químicos que previenen la ovoposición y la alimentación de ciertas especies de insecto (Jackson, 1990).

Si bien, los ejemplos mencionados involucran vegetales, estas formas generales de antixenosis o rechazo pueden ser aplicadas a cualquier posible fuente de alimento, superficie y/o sustancia. Con la finalidad de evaluar los posibles tipos de antixenosis o comportamientos de rechazo que podría provocar la NSA en *S. oryzae* se procedió a evaluar el fenómeno de exitorrepelencia y de fagodisuasión.

1. Evaluación del efecto excitorrepelente de la NSA en adultos de *S. oryzae*

Introducción

El término “repelente” ha sido utilizado ampliamente para explicar diferentes fenómenos que se han catalogado como repelentes, como por ejemplo la fagodisuasión y la excitorrepelencia; esto se debe a la flexibilidad del término “repelencia” en la entomología aplicada y a que históricamente se los ha utilizado para explicar una amplia variedad de fenómenos (White et al., 1966; Quarles, 1992; Rigaux et al., 2001; Moan & Fields, 2002; Obermayr, 2015; White & Moore, 2015). “Repelencia” se define como *el desplazamiento del insecto orientado en sentido opuesto a la fuente de estímulo. Los repelentes son sustancias que actúan localmente o a distancia, disuadiendo a los insectos de aproximarse o de posarse sobre la superficie que contiene el repelente* (Schoonhoven, 1982; Blackwell et al., 2003; Choochote et al., 2007; Nerio et al., 2009). Por lo tanto, se considera repelentes a una extensa variedad de sustancias, desde compuestos volátiles activos en fase gaseosa, hasta compuestos persistentes (Alzogaray et al., 2000). Browne, 1977 definió el término repelente como *un químico que, actúa en fase de vapor y evita que un insecto alcance un objetivo al que de otra manera sería atraído*. Sin embargo, esta definición y las anteriores no incluyen productos químicos que no actúan a través de la fase de vapor. Consecuentemente, Roberts, 1993 utilizó el término “excitorrepelencia” para definir *el contacto por parte de los tarsos de los insectos con una sustancia en fase no volátil*. Diferenciándolo de la “repelencia espacial” la cual definió como *la interacción con un químico en la fase de vapor, que resulta en una reacción de evitación por parte del insecto*. Además, clasificó a las sustancias como *irritantes* cuando se requiere contacto con el tarso y *repelentes* cuando no hay contacto con los tarsos. Teniendo en cuenta todas las definiciones propuestas, resulta conveniente utilizar el término “excitorrepelencia” en vez de “repelencia” para el caso de la NSA y los demás PIs utilizados en el presente capítulo, debido a que estos productos no se encuentran en fase de vapor. Sin embargo, es un concepto que debería revisarse en trabajos futuros para el caso de los PIs.

Por otro lado, Schlyter et al. (2004) aplican el término “repelente” a la respuesta olfatoria del insecto, mientras que el término “fagodisuasivo” lo aplican a la respuesta gustativa del insecto, diferenciando ambos efectos.

La mayor parte de los estudios sobre el fenómeno de repelencia en insectos fueron desarrollados sobre la base de bioensayos con productos como extractos vegetales, aceites esenciales e insecticidas de síntesis orgánica (McCabe et al., 1954; Mc Donald et al., 1970; Jilani & Su, 1983; Roberts, 1993; Talukder & Howse, 1993; Liu & Ho, 1999; Cosimi et al., 2009; Stefanazzi et al., 2011; Jahromi, et al., 2014). Mientras, que la bibliografía disponible sobre el efecto “repelente” y/o “excitorrepelente” producido por sustancias inorgánicas es escasa y poco precisa. Por ejemplo, algunos autores estudiaron un efecto “llamado repelente” de la tierra de diatomeas (DE), utilizando semillas de trigo entero e incorporando el PI en harina, en bioensayos con *Sitophilus granarius*, *Rhizopertha dominica* y *Tribolium castaneum*. Estos autores describieron a la DE como una sustancia “repelente” (White et al., 1966; Quarles, 1992; Rigaux et al., 2001; Moan & Fields, 2002). Sin embargo, a través del tipo de bioensayo utilizado, no es posible diferenciar entre dos fenómenos diferentes que ocurren en forma simultánea (fagodisuasión y repelencia), teniendo en cuenta la definición de Schlyter et al. (2004). Cabe señalar, además que el término “repelente” no debería ser usado en el contexto de la fagodisuasión según Schoonhoven (1982). Por otra parte, y de modo más preciso, Buteler et al. (2014) describen el efecto de otro tipo de polvo inorgánico (ceniza volcánica) a partir de bioensayos de laboratorio con ceniza mezclada con el alimento de *S. oryzae*, describiéndolo como un efecto “fagodisuasivo”. Estos autores también describen el efecto de la ceniza volcánica sobre la locomoción de los insectos, observando que las partículas favorecen la sujeción de éstos a la superficie tratada con ceniza, fenómeno que podría considerarse opuesto al de “excitorrepelencia” y que otros autores describen como “acoplamiento” (Miller et al., 2009). Este término se aplica a la interacción insecto-partículas y su efecto sobre la locomoción, a través de la interacción con la fuente de estímulo o sustrato (Miller et al., 2009). El “acoplamiento” está mediado por receptores táctiles o mecanorreceptores conocidos como exteroceptores y propioceptores (pelos

táctiles, sensilias tricoides, placas, sensilias camponiformes) que se encuentran en la superficie del cuerpo, antenas y patas del insecto (Zill & Moran, 1981; Barth, 2004; Comer & Baba, 2011; Champman, 2013).

Sobre la base de estos antecedentes y considerando la exigua bibliografía disponible sobre técnicas de bioensayos para la evaluación del efecto de “exitorrepelencia” con sustancias en fase sólida como los PIs, resulta necesario el desarrollo y la validación de una técnica específica que permita determinar y cuantificar la “exitorrepelencia” en productos sólidos, como los PIs insecticidas. Determinar la posible presencia de este fenómeno para la NSA permitirá identificar o descartar una variable que representa un sesgo en resultados con bioensayos de toxicidad de insecticidas.

Objetivos específicos

1. Desarrollar y validar una técnica experimental específica (bioensayo) para determinar el efecto excitorrepelente de la NSA, independiente de la toxicidad por contacto de la NSA y otros posibles efectos antixenóticos como la fagodisuasión.
2. Estudiar el efecto excitorrepelente de la NSA, en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), en adultos de *Sitophilus oryzae* a través de un bioensayo en condiciones controladas de laboratorio.

Hipótesis

La NSA así como otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) no provocan excitorrepelencia en adultos de *Sitophilus oryzae*.

Materiales y Métodos

1. Material biológico

Sitophilus oryzae

Se utilizó el mismo material biológico y método de cría descritos en el capítulo 2, página 42 a 48.

2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos

Se utilizaron los mismos materiales insecticidas descritos en el capítulo 2, página 49 a 55.

Bioensayos de excitorrepelencia

Para la evaluación del efecto excitorrepelente de la NSA se utilizó el método estándar N° 3 de McDonald et al. (1970) modificado y adaptado para insecticidas sólidos y en ausencia de alimento. Los bioensayos se llevaron a cabo en arenas de prueba diseñadas en el interior de placas de Petri de 9,5 cm de diámetro, divididas en dos secciones semicirculares equivalentes. La superficie de una de las mitades se cubrió de forma homogénea con el material de ensayo y se utilizó adhesivo vinílico para mantener las partículas adheridas a la superficie, mientras que la otra mitad se mantuvo libre de partículas (Figura 28). Los tratamientos utilizados fueron NSA, Protect-It® y DiatomiD® respectivamente. También se realizó un control que consistió en una mitad cubierta con adhesivo y otra mitad sin este. Antes de iniciar los ensayos, las placas de Petri tratadas fueron colocadas en estufa a 40 °C durante 24 hs para eliminar el solvente del adhesivo vinílico (acetato de polivinilo). Para descartar posibles fenómenos fagodisuasivos y de toxicidad por contacto, antes de colocar los insectos se eliminaron todas aquellas partículas que no estuviesen adheridas a la base de la de la arena a través del adhesivo. Previo a la realización de los bioensayos de excitorrepelencia se desarrollaron ensayos preliminares (“screening”) con adultos de *S. oryzae*. La evaluación se realizó contabilizando los insectos ubicados en cada sector de la arena (tratado y sin tratar) luego de 2, 4, 6 y 8 horas de iniciado el ensayo. Asimismo, se evaluó la distribución de los insectos en arenas sin ningún tratamiento (controles) donde no se observaron diferencias significativas al modificar la orientación espacial de las cajas dentro de la cámara de incubación. Se calculó el coeficiente de variación (CV) como el cociente entre la desviación estándar y la media aritmética para cada observación (2, 4, 6 y 8 horas) con el fin de seleccionar el tiempo de exposición óptimo a las superficies tratadas.

Los bioensayos de excitorrepelencia se llevaron a cabo colocando en cada arena 16 adultos de *S. oryzae* sin sexar, con una edad de 1 a 2 semanas, se realizaron 5 réplicas por tratamiento. Las placas de Petri fueron mantenidas en cámara de cría a 27 °C y 75% HR y en oscuridad. Luego de 6 horas de exposición

se observó y se cuantificó la distribución de los insectos, en cada sección semicircular de todas las placas de Petri. A partir de los datos obtenidos se calculó el porcentaje de exitorrepelencia (PER%) adaptado de Talukder & Howse (1993) con la siguiente ecuación:

PER (%)= 2 x (C – 50) donde C = es el porcentaje de insectos presentes en la sección control; 2 y 50 son constantes. Valores positivos de RP indican “exitorrepelencia” y los valores negativos atracción (Talukder & Howse, 1993).

Análisis de datos

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba de la varianza ANOVA para modelos mixtos PROC MIXED (SAS 9.3 2011) con el porcentaje de exitorrepelencia como variable respuesta y los tratamientos como efectos principales. La comparación de medias se realizó por el test de Tukey.

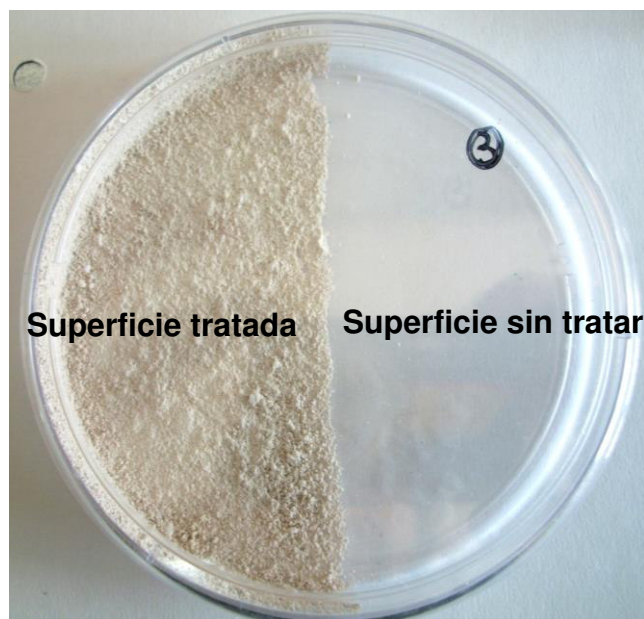


Figura 28. Placa de Petri utilizada para bioensayos de exitorrepelencia con dos secciones semicirculares equivalentes. Una de las mitades se cubrió con el material de ensayo, mientras que la otra mitad se mantuvo libre de partículas.

Resultados

De los resultados del *screening* se obtiene que el plazo de 6 horas resulta, el más representativo de los tiempos de exposición evaluados, debido al menor coeficiente de variación obtenido (Tabla 7). La tabla 8 muestra los PER%

calculados, a partir de los datos de los bioensayos de excitorrepelencia con NSA, Protect-It® y DiatomiD® en *S.oryzae*. La NSA, así como los otros PIs evaluados, arrojó valores negativos de PER% que prueban “atractancia” o preferencia, debido a que los insectos prefieren desplazarse, sujetarse y/o permanecer sobre la superficie tratada. A diferencia de los controles donde se desplazan de manera homogénea en ambas mitades de las placas de Petri. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los PER% entre los tratamientos con NSA, Protect-It® y DiatomiD® para los adultos de *S.oryzae* (F=0, 68; g.l=3; P<0,5787) (Tablas 7, 8 y 9).

Tabla 7. Resultados del *screening* para el bioensayo de excitorrepelencia con NSA, Protect-It® y DiatomiD® en *Sitophilus oryzae*. PER%= porcentaje de excitorrepelencia. Hs= horas a partir del inicio del ensayo. R= número de réplicas. CV=coeficiente de variación (cociente entre desviación estándar y promedio). Números positivos indican excitorrepelencia, números negativos indican atractancia. n (número de insectos por réplica)= 16

Tratamiento	Evaluación N°	Hs	PER%					CV
			R1	R2	R3	R4	R5	
NSA	1	2	-50	-87,5	-87,5	-87,5	-75	-0,21
	2	4	-62,5	-62,5	-62,5	-62,5	-87,5	-0,16
	3	6	-37,5	-100	-100	-75	-87,5	-0,32
	4	8	-62,5	-37,5	-50	-75	-50	-0,26
Protect-It®	1	2	-37,5	-75	-37,5	-87,5	-50	-0,39
	2	4	-50	-37,5	-25	-100	-62,5	-0,52
	3	6	-62,5	-12,5	-87,5	-87,5	-25	-0,63
	4	8	-100	-87,5	0	-37,5	-50	-0,72
DiatomiD®	1	2	-87,5	-50	-75	-100	-37,5	-0,37
	2	4	-37,5	-25	-50	-25	-50	-0,33
	3	6	-75	-50	-50	-25	-100	-0,47
	4	8	-25	-62,5	-75	-75	-75	-0,34
Control	1	2	0	12,5	-12,5	0	25	2,87
	2	4	25	-50	-37,5	12,5	0	-3,23
	3	6	0	25	0	12,5	-12,5	2,85
	4	8	12,5	0	25	87,5	-25	2,1

Tabla 8. Resultados de los bioensayos de exitorrepelencia con NSA, Protect-It® y DiatomiD®. Número de insectos por réplica =16. Tiempo de ensayo= 6hs. PER% (porcentaje de exitorrepelencia) = 2 x (C-50). R = réplicas. (Números positivos indican exitorrepelencia, números negativos indican atracción). (F=0, 68; df=3; P<0,5787).

Tratamiento	R	PER%
NSA	1	-37,5
	2	-100
	3	-100
	4	-75
	5	-87,5
Protect-It®	1	-62,5
	2	-12,5
	3	-87,5
	4	-87,5
	5	-25
DiatomiD®	1	-75
	2	-50
	3	-50
	4	-25
	5	-100
Control	1	0
	2	25
	3	0
	4	12,5
	5	-12,5

Tabla 9. Resultados del análisis de la varianza para modelos mixtos (SAS 9.3 2011) del efecto exitorrepelente de NSA, Protect-It® y DiatomiD® sobre *Sitophilus oryzae*. Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05).

Tratamiento	Medias	E.E	Grupo letra	N
NSA	-80,00	12,05	A	5
Protect-It®	-60,00	12,05	A	5
DiatomiD®	-55,00	12,05	A	5
Control	5	12,05	B	5

Discusión

Los resultados obtenidos sugieren que la NSA no provoca “excitorrepelencia” (no irritante) en adultos de *S. oryzae* cuando estos son expuestos a superficies o sustratos con las partículas del polvo firmemente adheridas y en ausencia de alimento. La exposición de los insectos a estas superficies provoca un efecto de sujeción o “preferencia” (“atrayente”), opuesto al efecto de “no preferencia o antixenosis” postulado por Jackson (1990). Resultados similares se obtuvieron con los tratamientos de Protect-It® y DiatomiD® (Tablas 7-9). Asimismo, los resultados coinciden con los obtenidos para otros polvos inorgánicos minerales, en condiciones experimentales similares, como por ejemplo la ceniza volcánica (Buteler et. al. 2014).

Los resultados del presente estudio difieren de los obtenidos por otros autores, que utilizaron la “técnica de dispersión directa” del polvo insecticida sobre el alimento (semillas o harina), para evaluar el fenómeno llamado “repelencia” en insectos (White et al., 1966; Quarles, 1992; Rigaux et al., 2001; Moan & Fields, 2002). Los autores de estos trabajos concluyeron que los PIs provocan un efecto repelente (valores positivos de porcentaje de repelencia) en los insectos. Cabe señalar, que esta diferencia surge a partir de una discrepancia metodológica en los trabajos citados. Los autores incorporan un sesgo en sus ensayos al utilizar la técnica de dispersión directa en o sobre el alimento, la cual no permite discriminar entre los fenómenos de repelencia y fagodisuasión (Schoonhoven, 1982). Además, de no poder discriminar entre fenómenos de contacto y toxicidad por ingestión, que pueden presentarse simultáneamente al utilizar la técnica de dispersión.

Estos antecedentes justifican el desarrollo y la validación de una técnica de bioensayo que permita evaluar el fenómeno de excitorrepelencia, en ausencia de una fuente de alimento (harina y/o granos de trigo), con la finalidad de evitar la interferencia de otros fenómenos, tales como fagodisuasión, toxicidad por ingestión y por contacto, que puedan sesgar el resultado del bioensayo. Los resultados obtenidos a partir de esta nueva técnica de bioensayo, proporcionan

exclusivamente información sobre el efecto excitorrepelente de una sustancia sólida, no volátil.

Los porcentajes de excitorrepelencia PER% calculados (Tablas 7, 8 y 9) muestran valores con signo negativo, típico de sustancias sin efecto excitorrepelente. Sin embargo, de la evaluación del comportamiento de los insectos durante el bioensayo y de las propiedades físico-químicas de los PIs, se desprende que este resultado puede estar relacionado con estímulos táctiles, a partir del contacto con superficies tratadas (sustratos rugosos) propicios para la sujeción y el desplazamiento (Figura 23), en comparación con superficies sin tratar (sustratos lisos) (Miller et al., 2009; Buteler et al., 2014). Si bien, el comportamiento de los artrópodos está condicionado principalmente por señales químicas (Dahanukar et al., 2005), en el caso del bioensayo desarrollado en el presente estudio, los quimiorreceptores no deberían tener un papel significativo en presencia de sólidos inertes, siendo los mecanorreceptores los responsables aparentes de la respuesta de preferencia por el sustrato tratado rugoso (Zill & Moran, 1981; Barth, 2004; Comer & Baba, 2011; Chapman, 2013).

La hipótesis se verifica, la NSA, así como otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), no producen un efecto “excitorrepelente” en adultos de *S.oryzae*.

Conclusiones del capítulo 6 (excitorrepelencia)

- 1) La técnica desarrollada para la evaluación del efecto “excitorrepelente” de la NSA en insectos, es específica, reproducible y apropiada para el estudio de la excitorrepelencia de insecticidas sólidos (nanoparticulados y microparticulados).

- 2) La NSA, así como otros PIs evaluados (Protect-It® y DiatomID®), no provocan excitorrepelencia en adultos de *Sitophilus oryzae*.

- 3) La exposición a superficies recubiertas con PIs provoca en los adultos de *Sitophilus oryzae* provoca un efecto de preferencia hacia superficies rugosas. Se trata de un comportamiento de “sujeción” relacionado con estímulos táctiles mediados por mecanorreceptores, responsables de la respuesta de preferencia por este tipo de sustrato.

2. Evaluación del efecto fagodisuasivo de la NSA en adultos de *S. oryzae*

Introducción

En general, la alimentación en los insectos depende de una combinación de señales químicas, visuales y mecánicas que les permite localizar, seleccionar y finalmente ingerir el alimento. Inicialmente, el insecto es atraído hacia la fuente de alimento por señales visuales u olfativas y posteriormente realiza el reconocimiento del alimento a través de sus receptores gustativos. El proceso de ingesta depende de estímulos sobre receptores presentes en la cavidad bucal, palpos, antenas (Schoonhoven, 1982; Nation, 2002; Gillott, 2005) y/o quimiosensilias con receptores gustativos selectivos para sustancias fagoestimulantes y fagodisuasivas (promotoras o inhibidoras de la alimentación, respectivamente) (Isman, 2002). Estas sustancias estimulan el sistema nervioso de manera directa o indirecta a través del sistema digestivo (Giordano et al., 2000; Cornell & Hawkins, 2003).

La fagodisuasión se define como *“el efecto de una sustancia que reduce el consumo de un alimento”*. Es la modificación del comportamiento del insecto, mediado por una sustancia que actúa sobre las quimiosensilias en general y sobre receptores gustativos en particular, siendo responsable del fenómeno de fagodisuasión (Isman, 1994). Asimismo, los compuestos fagodisuasivos también pueden actuar durante la ingestión o durante el proceso de absorción del alimento, provocando un efecto tóxico subletal en el insecto (Isman, 2002). Aquellas sustancias (volátiles y no volátiles) fagodisuasivas que actúan a nivel preingestivo, son también considerados compuestos antialimentarios por definición (Mansson, 2005; Koul, 2008).

Son muchos los sinónimos de fagodisuasión que se encuentran en la literatura, por ejemplo: efecto antialimentario, rechazo alimentario, efecto fagodisuasivo (Munakata, 1975). Algunos autores utilizan el término “antialimentario” o “deterrente alimentario” como sinónimo de sustancias que previenen o interrumpen la alimentación (Schoonhoven, 1982).

La mayoría de los estudios sobre el efecto fagodisuasivo de diferentes sustancias químicas en insectos fueron realizados sobre la base de bioensayos

con productos como extractos vegetales, aceites esenciales e insecticidas de síntesis orgánica (Talukder & Howse, 1993; Xie et al., 1996, Gols et al., 1996; Novo et al., 1998; Isman, 2006; Stefanazzi et al., 2011). Mientras que el efecto fagodisuasivo de PIs parece ser de origen físico, debido a que las partículas sólidas y químicamente inertes (no reactivas) no deberían afectar a los quimiorreceptores gustativos. Este fenómeno fue observado en adultos de *Plagiodera versicolora* (Laicharting, 1781) (Coleoptera: Chrysomelidae), en larvas de *Chilo suppressalis* Walker, 1863 (Lepidoptera: Crambidae) y de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentados con plantas de arroz con alto contenido de sílice, con hojas de sauce y hojas de hierbas ricas en oxalatos (CaC_2O_4) (Shanks & Chase, 1981; Raupp 1985; Korth et al., 2006; Bueteler et al., 2014). Es un hecho conocido que las barreras físicas afectan directamente el proceso de ingestión en los insectos, limitándolos cuali-cuantitativamente y restringiendo el acceso a nutrientes y su asimilación (Raupp 1985; Clissold et al., 2006; Bueteler et al., 2014).

Cabe señalar que efectos similares han sido registrados en mamíferos herbívoros que fueron alimentados con balanceado fabricado con partes vegetales con un mayor contenido de compuestos abrasivos (Müller et al., 2014). Por otro lado, se produjo un efecto similar en animales que se alimentaron con pasturas expuestas a ceniza volcánica (Caselli et al., 2010). En ambos estudios mencionados, se concluye que el alto contenido de material abrasivo en el alimento provocó el desgaste prematuro de la dentadura en los animales, en adición a los trastornos digestivos provocados por la acumulación de ceniza en sistema digestivo (Caselli et al., 2010; Müller et al., 2014).

Las técnicas disponibles para bioensayos de fagodisuasión utilizando PIs en insectos, son escasas y poco específicas. A partir aquí, es que surge la necesidad de diseñar, desarrollar y validar técnicas experimentales específicas, que permitan identificar cuali-cuantitativamente el efecto fagodisuasivo de PIs en insectos. Y de esta manera, poder distinguir el efecto fagodisuasivo del efecto repelente, así como de los fenómenos de superficie derivados de la exposición por contacto.

Objetivos específicos

1. Diseñar, desarrollar y validar una técnica experimental específica (bioensayo) para determinar cuali-cuantitativamente el efecto fagodisuasivo de la NSA, independientemente de los efectos tóxicos por contacto y de otros posibles efectos antixenóticos como la excitorrepelencia.

2. Estudiar la actividad fagodisuasiva de la NSA, en forma comparativa con otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) en adultos de *Sitophilus oryzae*, a través de un bioensayo específico de “preferencia de alimento con posibilidad de elección” basado en la oferta de alimento artificial tratado y sin tratar.

Hipótesis

La NSA así como los PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) producen fagodisuasión en adultos de *Sitophilus oryzae*.

Materiales y Métodos

1. Material biológico

Sitophilus oryzae

Se utilizó el mismo material biológico y metodología de cría descritos en el capítulo 2, página 42 a 48.

2. Sustancias insecticidas utilizados en los bioensayos

Se utilizaron los mismos materiales insecticidas descritos en el capítulo 2, página 49 a 55.

Con la finalidad de evaluar el efecto fagodisuasivo de la NSA sobre la ingesta de los insectos, se desarrolló una técnica estándar basada en la exposición de *S. oryzae* a alimento artificial (control vs tratado), con el polvo nanoparticulado en estudio y los PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®).

Preparación del alimento artificial

Se utilizó el mismo método que el descrito en el capítulo 4, página 67. En el presente bioensayo se utilizaron 3 concentraciones (125 ppm, 250 ppm y 500 ppm) para todos los PIs ensayados.

Bioensayos de fagodisuasión

Para evaluar el efecto fagodisuasivo de los PIs, se realizaron bioensayos de preferencia con posibilidad de elección (“*two choice test*”, Schoonhoven, 1982; Xie & Fields, 1996) modificado y adaptado para polvos minerales insecticidas. Esta nueva técnica consiste en la utilización de arenas de ensayo circulares en el interior de placas de Petri de 9,5 cm de diámetro, en las que se colocaron 2 discos de alimento artificial. Con el fin de mantener una distancia equivalente entre los discos de harina (control y tratado) en todos los bioensayos y repeticiones, éstos se colocaron dentro de un aro de aluminio de 2 cm de diámetro (Figura 29). En cada arena, que contuvo un disco control y otro tratado, se colocaron 20 adultos de *S. oryzae*. Se realizaron 5 réplicas por tratamiento. Las concentraciones utilizadas para los discos de harina tratados fueron 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, para NSA, Protect-It® y DiatomiD® respectivamente. Simultáneamente se realizó un control con dos discos de harina sin tratar. Las diferentes concentraciones de PIs utilizadas fueron seleccionadas a partir de un *screening*. Las placas de Petri fueron mantenidas a $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a $70 \pm 5\%$ de HR en cámara de cría, en oscuridad. Se consideró el sexto día como punto final del ensayo a partir de los resultados obtenidos del *screening* correspondiente durante el cual se registró la variación de peso de los discos de alimento. A partir de los datos de consumo de los bioensayos se calculó el Índice Fagodisuasivo IF% (Xie *et al.*, 1996; Stefanazzi, 2011)

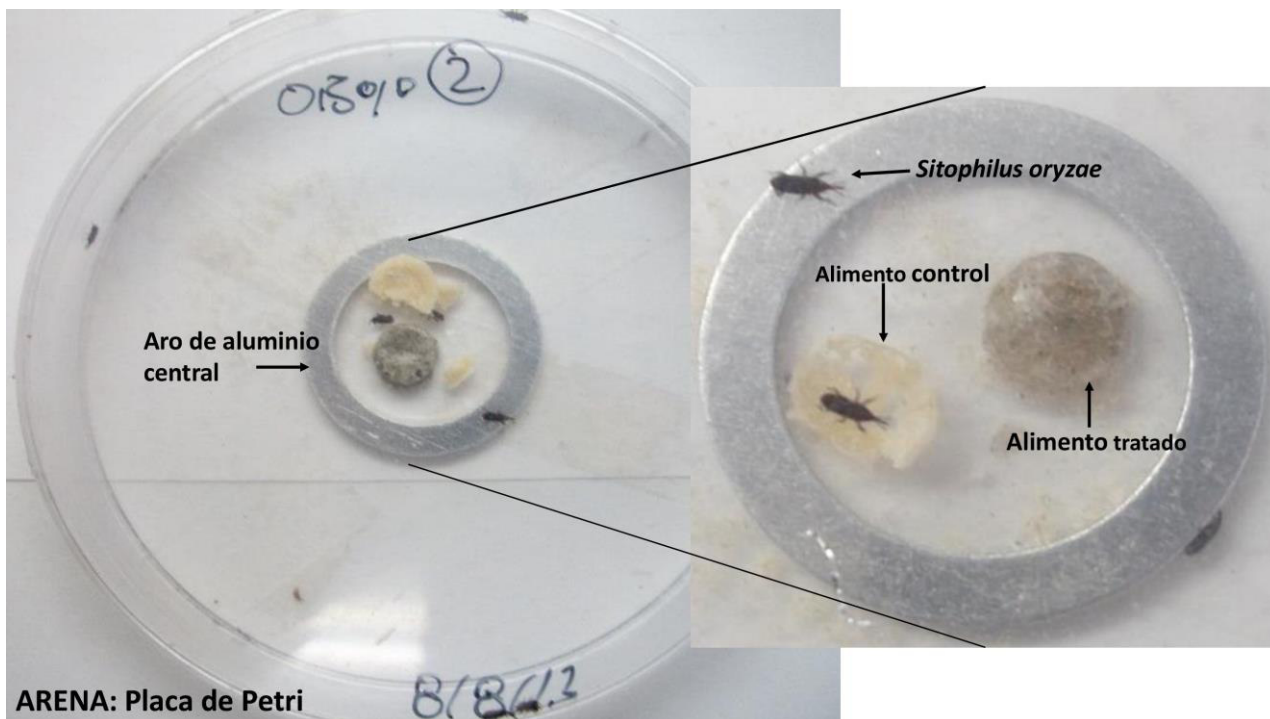


Figura 29. Ejemplo de la arena en placa de petri utilizada en bioensayos de fagodisuasión (preferencia con posibilidad de elección), utilizando alimento artificial control vs tratados con NSA, Protectt-I® y DiatomiD® respectivamente.

$$\text{Índice Fagodisuasivo} = \text{IF (\%)} = \frac{[C-T]}{C} \times 100$$

donde C= consumo de los discos en el control (mg) y T= consumo de los discos tratados (mg).

Valores positivos de IF indican fagodisuasión y los valores negativos atracción

Análisis de datos

Los resultados de los bioensayos se analizaron mediante la prueba de la varianza ANOVA para modelos mixtos PROC MIXED (SAS 9.3 2011) con el índice fagodisuasivo como variable respuesta y la concentración, tratamiento, y su interacción como efectos principales. La comparación de medias se realizó con test de Tukey.

Resultados

Del análisis de los resultados se obtiene que la NSA, DiatomiD® y Protect-It® producen fagodisuasión en adultos de *S.oryzae*. En todos los tratamientos se observó una drástica reducción del peso de los discos de harina sin tratar (control) en comparación con los tratados. El efecto fagodisuasivo o antialimentario de los PIs queda claramente expresado a través del valor absoluto del índice fagodisuasivo (IF) obtenido. Este efecto fue mayor sobre *S. oryzae*, en función del aumento de la concentración de los PIs en el alimento ($F= 60,59$, $g.l = 2$, $P<0,0001$).

El efecto fagodisuasivo producido por la NSA, es mayor que el calculado para DiatomiD® y similar al calculado para Protect-It®, en concentraciones de 125ppm y 250ppm (Tablas 10 y 11, figuras 30, 31, 32 y 33). Con la mayor concentración de 500ppm, no se observan diferencias significativas en IF% para los tres PIs comparados (Tabla 12, figuras 32 y 33). No se observan diferencias significativas en los valores de IF% de NSA y Protect-It®, sin embargo las diferencias entre estos últimos y DiatomiD® fueron significativas a bajas concentraciones ($F=9,61$, $g.l=2$, $P<0,0032$) (Tablas 10 y 12, figuras 30 y 33).

Tabla 10. Efecto fagodisuasivo en *Sitophilus oryzae*: consumo (mg de alimento) de *Sitophilus oryzae* por tratamiento en bioensayos de preferencia. R = réplicas. C = disco control. 125 ppm, 250 ppm y 500 ppm = discos tratados. IF (%) = Índice Fagodisuasivo.

	NSA			Protect-It®			DiatomiD®		
R	C(mg)	125ppm	IF	C(mg)	125ppm	IF	C(mg)	125ppm	IF
1	13,1	7,5	42,74	16,4	5,1	68,9	17,2	9,1	47,09
2	14,8	8,3	43,91	12	7,8	35	20,7	5,6	72,94
3	13,9	8,1	41,72	10,5	6,4	39,04	14,2	11	22,53
4	15,6	8,2	47,43	16,9	5,4	68,04	11	12,4	-12,7
5	13,1	7,3	44,27	11,9	9,7	18,48	12,4	5,6	54,83
R	C(mg)	250ppm	IF	C(mg)	250ppm	IF	C(mg)	250ppm	IF
1	16,8	3,1	81,54	16,4	3,5	78,65	16,7	8,8	47,3
2	15,8	2,9	81,64	17,9	2,4	86,59	16	6,4	60
3	16,7	2,5	85,02	18	2,5	86,11	15,9	7,4	53,45
4	16,2	2,6	83,95	21	2,5	88,09	12,4	5,1	58,87
5	17,2	2,9	83,13	15,1	2,1	86,09	15,5	6,7	56,77
R	C(mg)	500ppm	IF	C(mg)	500ppm	IF	C(mg)	500ppm	IF
1	18,3	1	94,53	21,2	1,7	91,98	19,5	5	74,35
2	16,7	0,8	95,2	24,9	1,8	92,77	20,7	3,5	83,09
3	17,7	0,6	96,61	21,8	1,6	92,66	23,2	2,7	88,36
4	19	0	100	20,1	1,5	92,53	24,9	1,2	95,18
5	18,9	1	94,7	18,3	1,3	92,89	23	1,6	93,04
R	C(mg)	C(mg)	IF						
1	12,7	12,1	4,72						
2	15,5	13,2	14,83						
3	12,8	16,2	-26,56						
4	14,5	13,9	4,13						
5	15,1	14,5	3,97						

Tabla 11. Efecto fagodisuasivo en *Sitophilus oryzae*: consumo medio (mg de alimento) de *Sitophilus oryzae* por tratamiento en bioensayos de preferencia. C = disco control. 125 ppm, 250 ppm y 500 ppm = discos tratados. IF (%) = Índice Fagodisuasivo medio.

	C(mg)	125ppm	IF (%)	C(mg)	250ppm	IF (%)	C(mg)	500ppm	IF (%)
NSA	14,10	7,88	44,01	16,54	2,80	83,06	18,12	0,68	96,21
Protect-It®	13,54	6,88	45,89	17,68	2,60	85,11	21,26	1,58	92,57
DiatomiD®	15,10	8,74	36,93	15,30	6,88	55,28	22,26	2,80	86,80
Control	C(mg)	C(mg)	IF (%)						
	14,12	13,98	0218						

Tabla 12. Efecto fagodisuasivo de NSA, Protect-It® y NSA y Diatomid® en *Sitophilus oryzae*: resultados del análisis de la varianza para modelos mixtos (SAS 9.3 2011). Tratamientos con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, P <0,05).

Tratamiento	Conc.(ppm)	Estimación	E.E	Grupo letra
NSA	500	2,1649	0,018	A
Protect-It®	500	2,1540	0,018	A
Diatomid®	500	2,1354	0,018	A
Protect-It®	250	2,1305	0,018	A
NSA	250	2,1240	0,018	A
Diatomid®	250	2,0219	0,018	B
NSA	125	1,9731	0,025	BC
Protect-It®	125	1,9724	0,025	BC
Diatomid®	125	1,9059	0,025	C

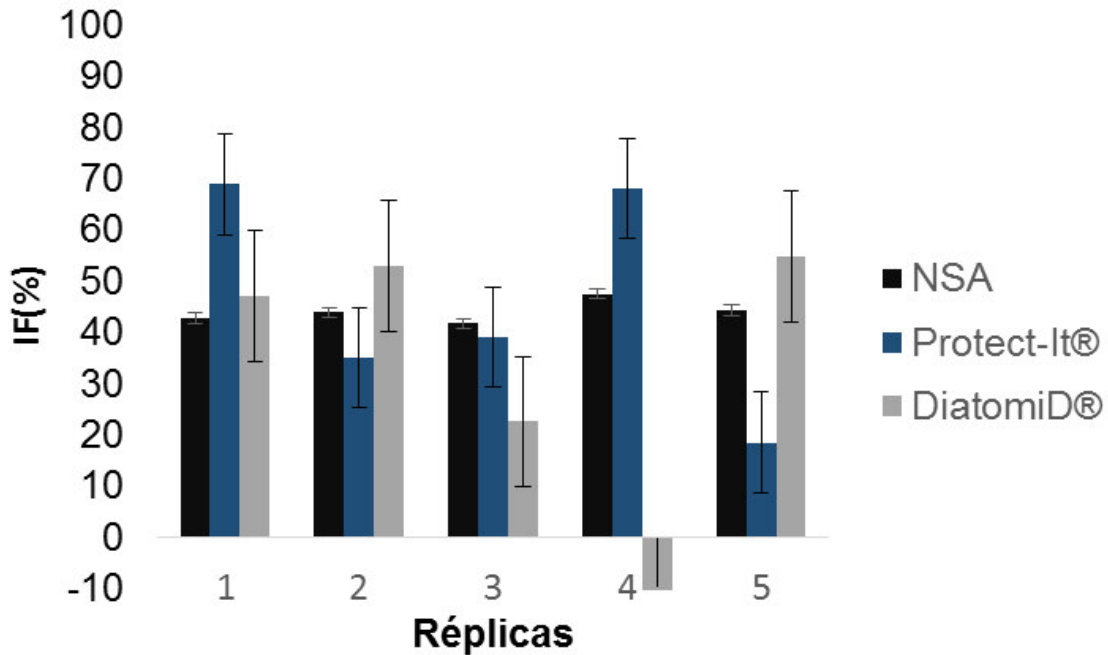


Figura 30. Índice fagodisuasivo IF (%) obtenido para NSA, Protect-It® y DiatomiD®, en bioensayos de preferencia con adultos de *Sitophilus oryzae*. Para una concentración de 125 ppm.

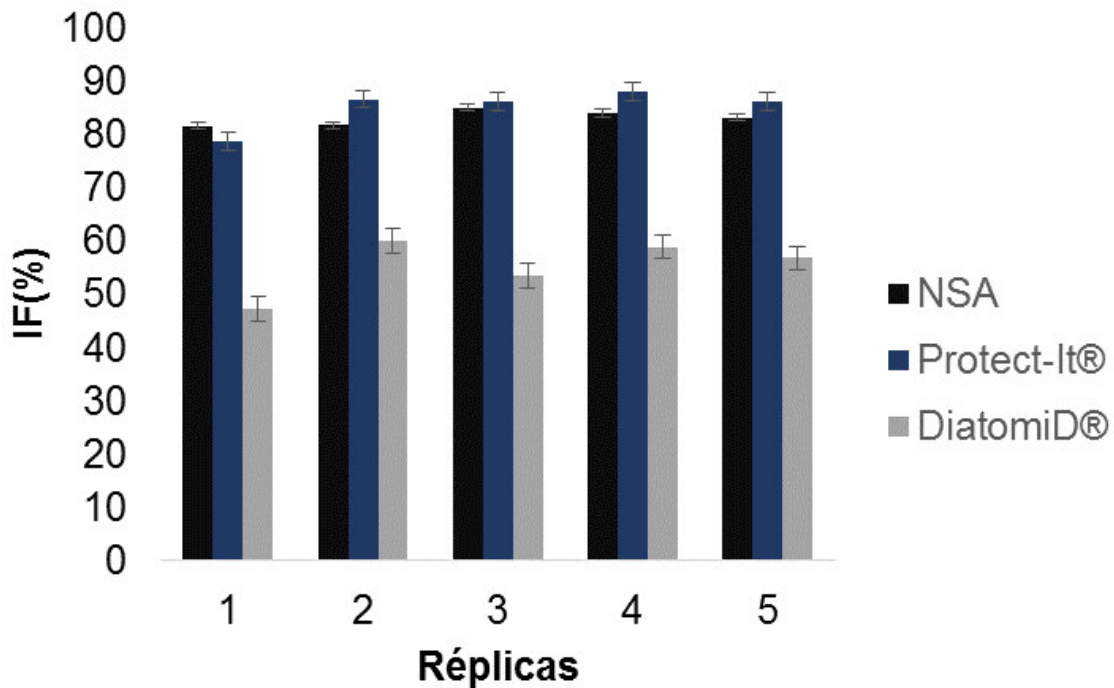


Figura 31. Índice fagodisuasivo IF (%) obtenido para NSA, Protect-It® y DiatomiD®, en bioensayos de preferencia con adultos de *Sitophilus oryzae*. Para una concentración de 250 ppm.

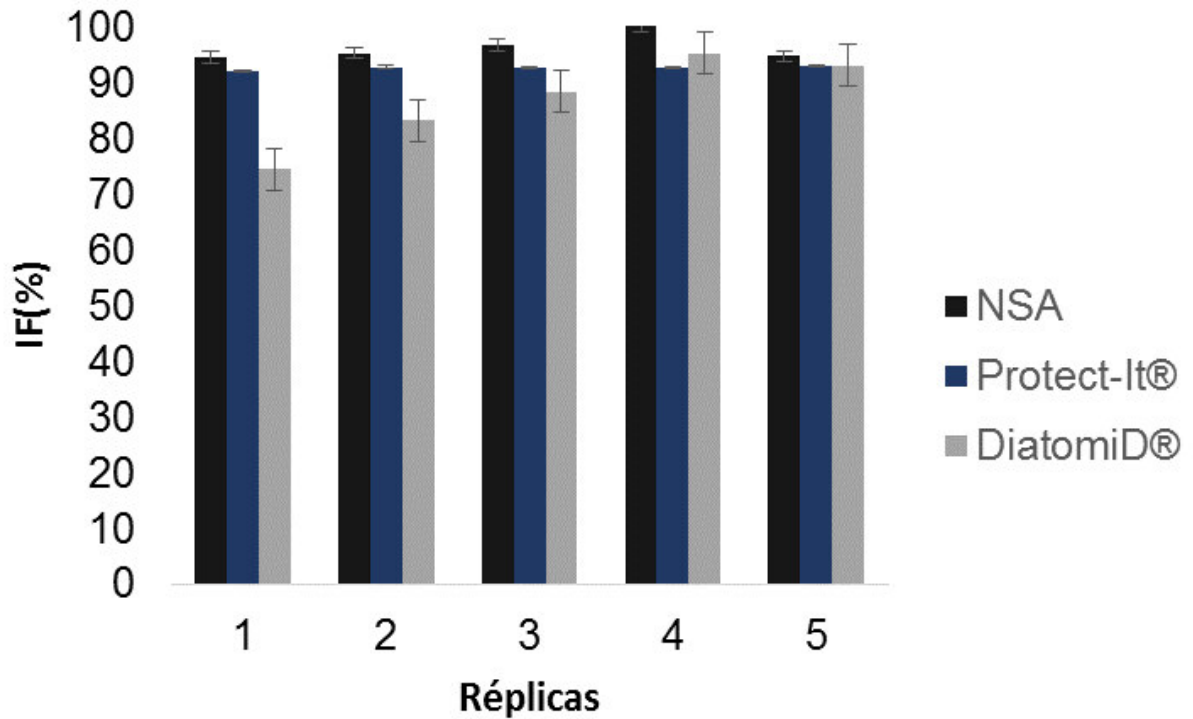


Figura 32. Índice fagodisuasivo IF (%) obtenido para NSA, Protect-It® y Diatomid®, en bioensayos de preferencia con adultos de *Sitophilus oryzae*. Para una concentración de 500 ppm.

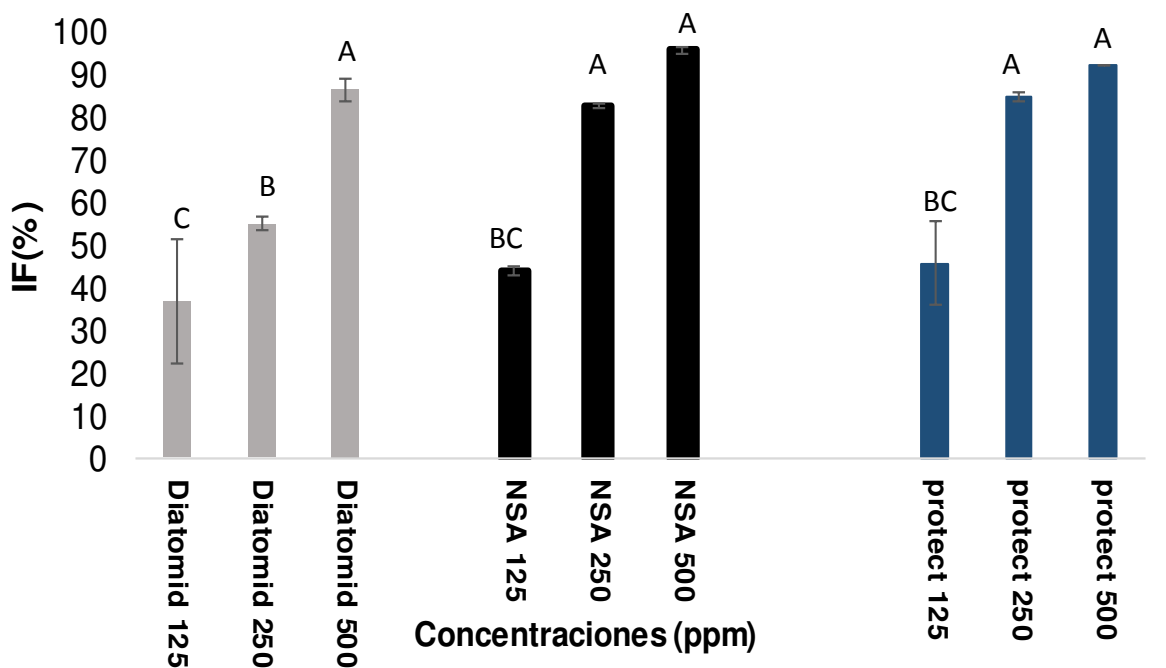


Figura 33. Índices fagodisuasivo IF (%) por tratamiento, por producto y concentración, en bioensayos de preferencia con NSA, Protect-It® y Diatomid® en adultos de *Sitophilus oryzae*. Valores con la misma letra no difieren significativamente (Tukey-Kramer, $P < 0,05$).

Discusión

De los resultados del presente bioensayo se obtiene que la NSA, así como los otros PIs estudiados (Protect-It® y DiatomiD®) producen un efecto fagodisuasivo en *S. oryzae* (Tablas 10, figuras 30, 31, 32 y 33). Estos resultados, coinciden con los obtenidos por otros autores para otros polvos inorgánicos, como por ejemplo la ceniza volcánica (Shanks & Chase, 1981; Raupp 1985; Buteler et al. 2014), de modo que los PIs en general, pueden ser categorizados como fagodisuasivos (Giordano et al., 2000; Jbilou et al., 2006). El efecto fagodisuasivo estudiado, también llamado antialimentario, probablemente se encuentre asociado a limitaciones físicas (mecánicas) producidas en el proceso de ingestión del alimento tratado (Raupp, 1985; Clissold et al., 2006; Korth et al., 2006; Buteler et al. 2014). En este caso, las quimiosensilias con receptores gustativos (Isman, 2002) no tendrían un rol relevante.

En contraste con las sustancias volátiles fagodisuasivas, que actúan sobre receptores gustativos en los insectos (Schoonhoven, 1982; Nation, 2002; Gillott, 2005), los PIs incluido la NSA, producen un efecto fagodisuasivo mediado por características abrasivas de las partículas que en consecuencia, podrían potencialmente ocasionar un efecto sobre las mandíbulas de los insectos, en adición a los posibles efectos adversos sobre el sistema digestivo, afectando potencialmente el acceso a los nutrientes e impactando sobre el desarrollo, reproducción y probablemente sobre la dinámica poblacional del insecto (Djamin & Pathak, 1969; Raupp, 1985; Giordano et al., 2000; Cornell y Hawkins, 2003; Korth et al., 2006).

Sobre esta base, es posible trazar una analogía con los efectos descritos por diferentes autores, en insectos herbívoros que se alimentan de plantas ricas en sílice y oxalatos (Djamin & Pathak, 1969; Raupp, 1985; Korth et al., 2006), así como también con los efectos producidos en las dentaduras de animales domésticos (bovinos, ovinos y caprinos) luego del consumo de pasturas contaminadas con cenizas volcánicas o de alimentos con propiedades abrasivas (Caselli et al., 2010; Müller et al., 2014).

La hipótesis planteada se verifica, la NSA así como otros PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) producen fagodisuasión en adultos de *S. oryzae*.

Conclusiones del capítulo 6 (Fagodisuasión)

- 1) La nueva técnica específica de bioensayo para determinar el efecto fagodisuasivo con PIs en insectos, demostró reproducibilidad en laboratorio.
- 2) La nueva técnica desarrollada para la evaluación del efecto fagodisuasivo de la NSA en insectos, es específica y apropiada para el estudio de dicho efecto con insecticidas sólidos no volátiles (nanopartículas y micropartículas).
- 3) La NSA, así como los PIs de referencia (Protect-It® y DiatomiD®) provocan efecto fagodisuasivo en adultos de *Sitophilus oryzae*, cuando los insectos son expuestos a alimento artificial tratado, en bioensayos de “preferencia de alimento con posibilidad de elección” para polvos inertes.
- 4) La fagodisuasión es un efecto antixenótico complementario y simultáneo a la toxicidad por contacto producida por la exposición a semillas tratadas.

Capítulo 7

Conclusiones generales de la tesis

1) La actividad insecticida de la alúmina nanoestructurada (NSA) es mayor que la de otros polvos inertes comerciales utilizados de referencia (Protect-It® y DiatomiD®), en bioensayos de exposición a un sustrato tratado utilizando como organismo modelo a *Sitophilus oryzae*.

2) La NSA posee una actividad insecticida por contacto y por ingestión, provoca efectos sub-letales (antixenóticos) como la fagodisuasión, así como efectos poblacionales (progenie/F1) en *Sitophilus oryzae*, con una eficacia mayor a la de otros polvos inertes comerciales (Protect-It® y DiatomiD®).

3) Los efectos subletales, en este caso también llamados antixenóticos (fagodisuasión) de la NSA pueden interpretarse como fenómenos complementarios y simultáneos a la toxicidad por contacto, durante la exposición a sustrato tratado.

4) La NSA es una potencial alternativa y herramienta para el control de plagas de los granos almacenados, que podría incidir de un modo diferente en la aparición de fenómenos de resistencia a corto o mediano plazo, debido a la coexistencia de distintos fenómenos simultáneos como la toxicidad por ingestión y la fagodisuasión que son complementarios al principal mecanismo de acción, la toxicidad por contacto (sorción de ceras cuticulares de la superficie corporal del insecto).

Recomendaciones y perspectivas futuras

Sobre la base de los resultados de investigaciones previas y del presente trabajo de tesis, se recomienda el estudio de la actividad insecticida (toxicidad por contacto e ingestión), eficacia, excitorrepelencia y fagodisuasión de la alúmina nanoestructurada (NSA) sobre otras especies plaga primarias y secundarias de granos almacenados como *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae), *Callosobruchus maculatus* (Chrysomelidae), *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Oryzaephilus*

surinamensis (Silvanidae), *Trogoderma granarium* (Dermestidae), además de la evaluación del posible efecto larvicida y ovicida en plagas secundarias de los granos almacenados. También se recomienda el estudio de los efectos sobre otras plagas de la agricultura (hortícolas, frutícolas, vitivinícolas y olivícolas) y sobre la fauna llamada “benéfica” o de “enemigos naturales”, en condiciones de laboratorio y en agroecosistemas.

Con fines prácticos, es recomendable escalar los ensayos de laboratorio a ensayos de semi-campo y de campo, en las condiciones naturales de humedad y temperatura que se establecen en los silos con granos almacenados de diferentes especies vegetales. Además, de desarrollar y ensayar técnicas eficientes para la aplicación homogénea de este tipo de polvos nanoparticulados a escalas de campo, ya sea en silos o en cultivos agrícolas.

En cuanto al mecanismo de acción, debería profundizarse la investigación sobre la capacidad de sorción y remoción de ceras cuticulares, tanto de la NSA como de otros PIs en diferentes especies de insectos plaga. También deberían realizarse avances en el estudio de fenómenos triboeléctricos, responsables de la afinidad de las partículas de NSA con la superficie corporal del insecto. Estos estudios ya fueron iniciados en el Laboratorio de Electroestática y Materiales Dieléctricos de la Universidad Tecnológica Nacional (UTN) sede Mendoza, en el marco del convenio entre el Laboratorio de Toxicología Ambiental CCT-Mendoza y la UTN.

En cuanto a la toxicidad de la NSA, resultaría de gran interés ampliar los escasos estudios existentes en mamíferos y de citotoxicidad “in vitro” que se encuentran en vías de desarrollo en el Laboratorio de Toxicología Ambiental del IMBECU, CONICET CCT-Mendoza.

Aplicaciones y usos potenciales del nanoinsecticida (NSA)

- 1) Control de plagas de granos y productos almacenados en general (Stadler 2010a,b; Stadler et al.,2012; Kah & Hofmann, 2014; Buteler et al.,2015)
- 2) Control de hormigas cortadoras (Hymenoptera: *Acromyrmex* y *Atta*) (Buteler et al., 2017)
- 3) Control de insectos de interés médico y veterinario, como por ejemplo, vinchuca (Hemiptera: *Triatoma infestans*) y la mosca de los cuernos (Diptera: *Haematobia irritans*) (Suárez, 2003; de CLartigue & Rossanigo, 2004; Luz et al., 2012)
- 4) “*Carriers*” o soporte inerte para la diseminación de entomopatógenos y feromonas (Kah & Hofmann, 2014, Kitherian, 2017)

Artículos publicados y presentaciones a congresos

Artículos publicados relacionados con el tema de tesis

Nanostructured alumina: biocidal properties and mechanism of action of a novel insecticide powder. 1Stadler T., 1López García G. P., 2Gitto J.G., 3Buteler M. Bulletin of Insectology 70, 2017.

Potential of nanostructured alumina for leaf-cutting ants *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) management. 1Buteler M, 2López García G.P, 3Stadler T. Austral entomology 56, 2017.

Toxicity and sub-lethal effects of volcanic ash on chewing insects using *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) as a model organism. 1Micaela Buteler, 2Guillermo P. López García, 2Aristides A. Pochettino, 3 Natalia Stefanazzi, 3Adriana A. Ferrero and 2Teodoro Stadler. Ecología Austral 24, 2014.

Insecticidal properties of ashes from the volcanic complex Puyehue-Caulle Range and their possible environmental impact. 1Buteler Micaela, 1Teodoro Stadler, 1Guillermo P. López García, 2María S.Lassa , 3Dario Trombotto Liaudat , 4Paola D'adamo y 5Valeria Fernandez. Sociedad Entomológica Argentina 70 (3-4), 2011.

Presentaciones a congresos relacionados con el tema de tesis

Assessment of nanomaterials for the control of insect pests and disease vectors. López García Guillermo P.; Buteler M.; Stadler Teodoro. XXXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Mendoza, 2016.

Nanotecnología aplicada al desarrollo de nuevos insecticidas. Stadler Teodoro; Buteler M; López García Guillermo P.; Gitto J.G. Aapresid, Rosario, Santa Fe, 2016.

Potential adverse effects of volcanic ash from Puyehue-Cordón Caulle Range on Tenebrionid larvae. López García Guillermo P.; Buteler M.; Stadler Teodoro. Fourth International Tenebrionoidea Symposium. Mendoza, Argentina, 2015.

Evaluación de la actividad fagodisuasiva de la alúmina nanoestructurada (NSA) en adultos de *Sitophilus oryzae*. López García Guillermo P.; Buteler M.; Stadler T. IX Congreso Argentino de Entomología. Posadas, Misiones, 2015.

Evaluación de la actividad repelente de la alúmina nanoestructurada (NSA) en adultos de *Sitophilus oryzae*. López García Guillermo P.; Buteler M.; Stadler T. IX Congreso Argentino de Entomología. Posadas, Misiones, 2015.

Referencias bibliográficas

- Adetunji J. F. 1990. Longevity and larval feeding of *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae) on seeds of some sorghum cultivars. *Samaru Journal of Agricultural Research*, 7: 25-32.
- Adler C., Corinth H. G. & Reichmuth, C. 2000. Modified atmospheres. En: *Alternatives to Pesticides in Stored-product IPM* (pp. 105-146). Springer US.
- Afridi I. A., Parveen Z. & Masud, S. Z. 2001. Stability of organophosphate and pyrethroid pesticides on wheat in storage. *Journal of stored products research*, 37(2): 199-204.
- Aktar W., Sengupta D. & Chowdhury A. 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1):1-12.
- Aldryhim Y. N. 1990. Efficacy of the amorphous silica dust, Dryacide, against *Tribolium confusum* Duv. and *Sitophilus granarius* (L.)(Coleoptera: Tenebrionidae and Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 26(4): 207-210.
- Aldryhim Y. N. 1993. Combination of classes of wheat and environmental factors affecting the efficacy of amorphous silica dust, Dryacide, against *Rhyzopertha dominica*(F.). *Journal of Stored Products Research*, 29(3): 271-275.
- Alexander P., Kitchener J. A. & Briscoe, H. V. A. 1944 a. Inert dust insecticides: Part I. Mechanism of action. *Annals of Applied Biology*, 31: 143-149.
- Alexander P., Kitchener J. A. & Briscoe H. V. A. 1944 b. Inert dust insecticides: Part II. Mechanism of action. *Annals of Applied Biology*, 31: 150-156.
- Allen F. 1972. A natural earth that controls insects. *Organic gardening and Farming*, 19: 50-56.
- Alleoni B. & Ferreira W. 2006. Control of *Sitophilus zeamais* Mots., 1958 and *Sitophilus oryzae* (L., 1763) weevils (Coleoptera, Curculionidae) in stored corn grain (*Zea mays* L.) with insecticide pirimiphos methyl (Actellic 500 CE). 9th International Working Conference on Stored Product Protection. General Session on Stored Grain Protection, páginas 1218-1225.
- Altieri M. & Nicholls C. I. 2000. Teoría y práctica para una agricultura sustentable. Serie Textos Básicos para la Formación Ambiental. PNUMA. Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe. México, 235.
- Alzogaray R., Fontan A. & Zerba E. 2000. Rellency of deet to nymphs of *Triatoma infestans*. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 6-10.

Anderson R. S. & Marvaldi A. E. 2014. Chapter 3.7.3 Dryophthorinae Schoenherr, 1825. Pp. 477-483. In: Leschen R. A. B. & Beutel, R. G. (Eds.). Handbook of Zoology. Arthropoda: Insecta: Coleoptera, Beetles. Volume 3: Morphology and Systematics (Phytophaga). de Gruyter; Berlín; xii + 676 pp.

Anjali C. H., Khan S. S., Margulis-Goshen K., Magdassi S., Mukherjee A. & Chandrasekaran N. 2010. Formulation of water-dispersible nanopermethrin for larvicidal applications. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(8): 1932-1936.

Arjunan N. K., Murugan K., Rejeeth C., Madhiyazhagan P. & Barnard D. R. 2012. Green synthesis of silver nanoparticles for the control of mosquito vectors of malaria, filariasis, and dengue. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(3): 262-268.

Arthur F. H. 2002. Survival of *Sitophilus oryzae* (L.) on wheat treated with diatomaceous earth: impact of biological and environmental parameters on product efficacy. *Journal of Stored Products Research*, 38(3): 305-313.

Athanassiou C. G., Kavallieratos N. G., Economou L. P., Dimizas C. B., Vayias B. J., Tomanović S. & Milutinović, M. 2005. Persistence and efficacy of three diatomaceous earth populations against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) on wheat and barley. *Journal of Economic Entomology* 98: 1404-1412.

Athanassiou C. G., Kavallieratos N. G. & Meletsis C. M. 2007. Insecticidal effect of three diatomaceous earth formulations, applied alone or in combination, against three stored-product beetle species on wheat and maize. *Journal of Stored Products Research*, 43(4): 330-334.

Athanassiou C. G., Kavallieratos N. G., Benelli G., Losic D., Usha Rani P. & Desneux N. 2017. Nanoparticles for pest control: current status and future perspectives. *Journal of Pest Science*. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0898-0>

Bailey J., Scott-Dupree C., Harris R., Tolman J. & Harris B. 2005. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. *Apidologie*, 36(4): 623-633.

Bang S. H., Yu Y. M., Hwang I. C. & Park H. J. 2009. Formation of size-controlled nano carrier systems by self-assembly. *Journal of microencapsulation*, 26 (8): 722-733.

Banks H. J. & Fields P. G. 1995. Physical methods for insect control in stored-grain ecosystems (Vol. 353). Marcel Dekker, New York.

Barth F. G. 2004. Spider mechanoreceptors. *Current opinion in neurobiology*, 14(4): 415-422.

Bell C. H. & Conyers S. T. 2002. November. Modified atmospheres at raised temperatures for treatment of durable commodities. In Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions, Orlando, Florida, USA (pp. 52-1).

EPA (Environmental Protection Agency). Benefits of Pesticide Use. (27 June 2012). <http://www.epa.gov/oecaagct/ag101/pestbenefits.html>

Benzi V. S. 2013. Productos de origen natural con bajo impacto ambiental, como fuentes alternativas para el manejo integrado de plagas, aplicados al control de *Rhyzopertha dominica* (Insecta: Coleoptera). Tesis presentada para optar al título de doctora en biología, Dpto. de Biología. Universidad Nacional del Sur. Bs. As. 160pp

Betz F. S., Hammond B. G. & Fuchs R. L. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(2): 156-173.

Bhagat D., Samanta S. K. & Bhattacharya, S. 2013. Efficient management of fruit pests by pheromone nanogels. *Scientific reports*, 3: 1-8.

Bhuiyah M. I. M., Islam N., Begum A. & Karim M. A. 1990. Biology of the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (Linnaeus). *Bangladesh Journal of Zoology*, 18 (1): 67-73.

Birch L. C. 1944. Two Strains of *Calandra oryzae* L. (Coleoptera). *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science*, 22 (4): 271-275.

Blackwell A., Stuart A. E. & Estambale, B. A. 2003. The repellent and antifeedant activity of Myrica Gale oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. *Royal Coll. Phys. Edinburgh* 33: 209–214.

Bowen D., Rocheleau T. A., Blackburn M., Andreev O., Golubeva E. & Bhartia R. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photobacterium luminescens*. *Science*, 280 (5372): 2129-2132.

Bragachini M., Bongiovanni R., Peiretti J., Scaramuzza F., Méndez A., Casini C., Rodríguez J., Bartosik R., Peiretti J. & Cabral G. 2003. Eficiencia de Cosecha y Postcosecha. Manual Técnico N° 1. INTA Manfredi.

Bridgeman B. W. 2000. Application technology and usage patterns of diatomaceous earth in stored product protection. In *Proceedings of the 7th International Working Conference on Stored-product Protection*, Beijing, China, Sichuan Publishing house of science and technology, Chengdu, Sichuan Province, Peoples Republic of China (pp. 785-789).

Briscoe H. V. A. 1943. Some new properties of inorganic dusts: Lecture I. Journal of the Royal Society of Arts, 91 (4650): 593-607.

Broussalis A. M., Ferraro G. E., Martino V. S., Pinzón R., Coussio J. D. & Alvarez, J. C. 1999. Argentine plants as potential source of insecticidal compounds. Journal of Ethnopharmacology, 67 (2): 219-223.

Buteler M., Lopez Garcia G. & Stadler, T. 2017. Potential of nanostructured alumina for leaf-cutting ants *Acromyrmex lobicornis* (Hymenoptera: Formicidae) management. Austral Entomology 56: 1-5.

Buteler M., Sofie S. W., Weaver D. K., Driscoll D., Muretta J. & Stadler T. 2015. Development of nanoalumina dust as insecticide against *Sitophilus oryzae* and *Rhyzopertha dominica*. International Journal of Pest Management, 61 (1): 80-89.

Buteler M., López García G. P., Pochettino A. A., Stefanazzi N., Ferrero A. A. & Stadler T. 2014. Insecticidal activity of volcanic ash against *Sitophilus oryzae* L. [Coleoptera: Curculionidae] under laboratory conditions. Ecología austral, 24 (1):17-22.

Buteler M., Stadler T., López García G. P., Lassa M. S., Trombotto Liaudat D., D'Adamo P. & Fernandez-Arhex V. 2011. Insecticidal properties of ashes from the volcanic complex Puyehue-Caulle Range and their possible environmental impact. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 70 (3-4): 149-156.

Butenandt A., Beckmann R., Stamm D. & Hevker E. 1959. On the sex pheromone of the silkworm moth *Bombyx mori*. Isolation and structure. Z Naturforsch B, 14: 283-284.

Butler C. G. 1967. Insect pheromones. Biological Reviews, 42(1): 42-84.

Byard J. L., Paulsen S. C., Tjeerdema R. S. & Chiavelli D. 2015. DDT, Chlordane, Toxaphene and PCB Residues in Newport Bay and Watershed: Assessment of Hazard to Wildlife and Human Health. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 235 (pp. 49-168). Springer International Publishing.

Caltagirone L. E. 1981. Landmark examples in classical biological control. Annual Review of Entomology, 26 (1): 213-232.

Carlson S. D. & Ball H. J. 1962. Mode of action and insecticidal value of a diatomaceous earth as a grain protectant. Journal of Economic Entomology, 55 (6): 964-970.

CASAFE. 2005. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. II. Tomo II. Ed. CASAFE. Bs.As. Argentina. 2080 pp.

- Caselli T. A., Vélez M. L., Augusto M. R. & Jover M. L. 2010. Manual de Procedimientos Ante Caídas de Ceniza Volcánica. Grupo de Estudio y Seguimiento de Volcanes Activos. Proyecto “Exactas con la Sociedad” Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Universidad de Buenos Aires. 108 pp.
- Casida J. E. 2009. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chemical Research in Toxicology*, 22: 609-619.
- Chacón R. R. 2007. La alúmina como material aislante en la fusión termonuclear. Efecto de la incorporación de carbono en las propiedades físicas. Tesis Doctoral. Universidad Carlos III de Madrid, Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica Instituto Álvaro Alonso Barba. 181pp.
- Chapman R. F. 2013. *The insects: structure and function*. Cambridge university press. Fifth edition. 929 pp.
- Chiu S. F. 1939 a. Toxicity studies of so-called “inert” materials with the bean weevil, *Acanthoscelidies obtectus* (Say). *Journal of Economic Entomology*, 32: 240-248.
- Chiu S. F. 1939 b. Toxicity studies of so-called “inert” materials with the Rice weevil and the granary weevil. *Journal of Economic Entomology*, 32 (6): 810-821.
- Choochote W., Chaithong U., Kamsuk K., Jitpakdi A., Tippawangkosol P., Tuetun B., Champakaew D., Pitasawat B. 2007. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia* 78, 359–364.
- Clissold F. J., Sanson G. D. & Read J. 2006. The paradoxical effects of nutrient ratios and supply rates on an outbreaking insect herbivore, the Australian plague locust. *Journal of Animal Ecology*, 75 (4): 1000-1013.
- Collatz J., Wyss U. & Steidle J. 2007. The biology of *Lariophagus distinguendus* a natural antagonist of stored grain beetles. Concerence of IOBC WPRS (OILB SROP) working group on Integrated Protection of Stored Products: 34. Poznán, Poland.
- Comer C. & Baba Y. 2011. Active touch in orthopteroid insects: behaviours, multisensory substrates and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366 (1581): 3006-3015.
- Cook D. A., Wakefield M. E. & Bryning G. P. 2008. The physical action of three diatomaceous earths against the cuticle of the flour mite *Acarus siro* L. (Acari: Acaridae). *Pest management science*, 64 (2): 141-146.
- Cooper J. & Dobson H. 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection* 26 (9): 1337–1348

Cornell H. V. & Hawkins B. A. 2003. Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. *The American Naturalist*, 161 (4): 507-522.

Corrêa A. S., Santos J. T., Cordeiro E. M. G. & Guedes R. N. C. 2006. Fluctuating asymmetry in pyrethroid-resistant and-susceptible populations of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). In Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored-Product Protection, ABRAPOS, Passo Fundo, RS, Brazil, 15-18 October 2006. (pp. 285-291). Brazilian Post-Harvest Association (ABRAPOS).

Cosimi S., Rossi E., Cioni P. L. & Canale A. 2009. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products Research*, 45 (2): 125-132.

Cotton R. T. & Frankenfeld J. C. 1949. Silica aerogel for protecting stored seed or milled cereal products from insects. *Journal of Economic Entomology*, 42 (3): 553-553.

Cottrell T. E., Wood B. W. & Reilly C. C. 2002. Particle film affects black pecan aphid (Homoptera: Aphididae) on pecan. *Journal of economic entomology*, 95 (4): 782-788.

D'Atonio L. 1997. Principais pragas de graos armazenados. In: Armazenamento de graos e sementes nas propriedades rurais. XXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Campina Grande. Paraíba. Brasil: 189-291.

Dahanukar A., Hallem E. A. & Carlson J. R. 2005. Insect chemoreception. *Current opinion in neurobiology*, 15 (4): 423-430.

Dal Bello G. & Padín S. 2006. Olfatómetro simple para evaluar la actividad biológica de aleloquímicos vegetales en *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Agrociencia*, 10 (2): 23-26.

David W. A. L. & Gardiner B. O. C. 1950. Factors influencing the action of dust insecticides. *Bulletin of Entomological Research*, 41 (1): 1-61.

de Clartigue E. & Rossanigo C. E. 2004. Insecticide and antihelminthic assessment of diatomaceous earth in cattle. *Veterinaria Argentina*, (209): 660-674.

de Conte Carvalho de Alencar J., Miozzi Rondelli V., Polanczyck R., de Carvalho J., Pratisoli D. & Andrade Pereira S. 2008. Suscetibilidade de *Sitophilus zeamais* (Mots.) (Coleoptera: Curculionidae) a isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) vuill. XXII Congresso Brasileiro de Entomologia. Área: Controle Biológico com Entomopatógenos. Resumo ID: 92-4. Uberlândia, MG.

de Fluiter H. J. 1964. Some aspects of biological and integrated control of pests. *Entomophaga*, 9(3): 219-225.

De los Mozos Pascual M. 1997. Plagas de productos almacenados. *Bol. Sociedad Entomológica Aragonesa*, 20: 93-109.

Debnath N., Das S., Seth D., Chandra R., Bhattacharya S. C. & Goswami A. 2011. Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Pest Science*, 84 (1): 99-105.

Derridj S., Gregoire V., Boutin J. P. & Fiala V. 1989. Plant growth stages in the interspecific oviposition preference of the European corn borer and relations with chemicals present on the leaf surfaces. *Entomologia experimentalis et applicata*, 53 (3): 267-276.

Descamps L. 2002. Factores que afectan el control de las plagas de los granos almacenados en el área de influencia del Puerto de Ingeniero White, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Tesis presentada para optar al título de magister en ciencias agrarias., Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Bs. As. 103 pp.

Desmarchelier J. M. & Dines J. C. 1987. Dryacide treatment of stored wheat: its efficacy against insects, and after processing. *Animal Production Science*, 27 (2): 309-312.

Dethier V. G. 1982. Mechanism of host-plant recognition. *Entomologia experimentalis et applicata*, 31(1): 49-56.

Djain A. & Pathak M.D. 1969. Role of silica in resistance to Asiatic rice borer, *Chilo suppressalis* (Walker), in rice varieties. *Journal of Economic Entomology*, 60: 337-451.

Ducom P. 2006. The Return of the Fumigants. *Fumigation and Control Atmosphere. 9th International Working Conference on Stored Product Protection*: 510-516.

Ebeling W. 1961. Physiochemical mechanism for the removal of insect wax by means of finely divided powders. *Hilgardia* 30: 531-564.

Ebeling W. 1971. Sorptive dusts for pest control. *Annual review of entomology*, 16 (1): 123-158.

Ebeling W. & Wagner R. E. 1959. Rapid desiccation of drywood termites with inert sorptive dusts and other substances. *Journal of Economic Entomology*, 52 (2): 190-207.

Edwards C. A. 1973. Pesticide residues in soil and water. In Environmental pollution by pesticides: 409-458. Springer US.

Edwards J. S. & Schwartz L. M. 1981. Mount St. Helens ash: a natural insecticide. Canadian Journal of Zoology, 59 (4): 714-715.

Eyidozehi K., Ravan S., Rigi K., Narouyi Y. & Chashak H. R. Z. Effect of *Sitophilus oryzae* on wheat cultivars. International Journal of Farming and Allied Sciences, 3(6): 611-615.

FAO (Food and Agriculture Organization). Crop prospects and food situation. 2010. N°4, 35pp. FAOSTAT On-line Statistical Service. <http://faostat3.fao.org/home/index.html>.

FAO, Who. 2010. Codex Alimentarius. Pesticide Residues in Food. http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp.

FAO. 2012. https://www.eppo.int/PPPRODUCTS/resistance/FAO_RMG_Sept_12.pdf.

Fernández-Arhex V., Buteler M., Amadio M. E., Enriquez A., Pietrantuono, A. L., Stadler T., Becker G. & Bruzzone O. 2013. The effects of volcanic ash from Puyehue-Caulle Range eruption on the survival of *Dichroplus vittigerum* (Orthoptera: Acrididae). Florida Entomologist, 96 (1): 286-288.

Ferrero A. 1988. Determinación de los factores de resistencia a malatión en una cepa de *Tribolium castaneum*. Tesis presentada para optar al título de doctora en biología, Dpto. de Biología. Universidad Nacional del Sur. Bs. As. 96pp.

Fields P. & Korunic Z. 2000. The effect of grain moisture content and temperature on the efficacy of diatomaceous earths from different geographical locations against stored-product beetles. Journal of Stored Products Research, 36 (1): 1-13.

Fields P. G. 2006. Effect of *Pisum sativum* fractions on the mortality and progeny production of nine stored-grain beetles. Journal of stored products research, 42 (1): 86-96.

Fischetti M. 2015. La población mundial crece más de lo previsto. Investigación y ciencia, 462: 1

Flinn P. W., Hagstrum D. W., Reed C. & Phillips T. W. 2010. Insect population dynamics in commercial grain elevators. Journal of Stored Products Research, 46 (1): 43-47.

Foster S. P., Howard A. J. & Harris M. O. 1997. The influence of tactile and other non-chemical factors on the ovipositional responses of the generalist herbivore *Epiphyas postvittana*. Entomologia experimentalis et applicata, 83 (2): 147-159.

Frederick J. L. & Subramanyam, B. 2016. Influence of temperature and application rate on efficacy of a diatomaceous earth formulation against *Tribolium castaneum* adults. *Journal of Stored Products Research*, 69: 86-90.

Gevao B., Semple K. T. & Jones K. C. 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental pollution*, 108 (1): 3-14.

Gillott C. 2005. *Entomology*. Springer. Third edition. 831 pp.

Giordano O., Sosa M. & Tonn C. 2000. Actividad Biológica de Metabolitos Secundarios de Plantas frente a *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas Fisicas y Naturales*, 52: 13-17.

Glenn D. M. & Puterka, G. J. 2005. Particle films: a new technology for agriculture. *Horticultural reviews*, 31: 1-44.

Godfray H.C., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M. & Toulmin C. 2010. Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327 (5967): 812-818.

Golob P. & Webley D. J. 1980. *The use of plants and minerals as traditional protectants of stored products*. London, UK. 38pp

Golob P. 1997. Current status and future perspectives for inert dusts for control of stored product insects. *Journal of Stored Products Research*, 33 (1): 69-79.

Gols G. J. Z., Loon J. V. & Messchendorp L. 1996. Antifeedant and toxic effects of drimanes on Colorado potato beetle larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 79 (1): 69-76.

Gooding R. H. 1990. Genetic aspects of quality control in tsetse colonies. *Insect Science and Application*, 11: 385-398.

Goulson D. 2013. Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50 (4): 977-987.

Gullan P. J. & Cranston P. S. 2010. *Insect systematics: phylogeny and classification*. *The Insects: an Outline of Entomology* (4th ed.). John Wiley and Sons: 189-222.

Hagstrum D. W. & Subramanyam B. 2009. A review of stored-product entomology information sources. *American Entomologist*, 55 (3): 174-183.

- Hagstrum D. W., Flinn P. W., Reed C. R. & Phillips T. W. 2010. Ecology and IPM of insects at grain elevators and flat storages. *Biopesticides International*, 6 (1): 1-20.
- Hagstrum D. W., Phillips T. W. & Cuperus G. 2012. *Stored Product Protection*. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. 358pp.
- Halstead D. G. H. 1963. External sex differences in stored-products Coleoptera. *Bulletin of Entomological Research*, 54 (01): 119-134.
- Harries-Rees K. J. 1994. DIATOMITE- STABILITY UNDER THREAT?. *Industrial minerals*, (319): 31-43.
- Hellmann C., Greiner A. & Wendorff J. H. 2011. Design of pheromone releasing nanofibers for plant protection. *Polymers for advanced technologies*, 22 (4): 407-413.
- Hill D. S. 2002. *Pests of stored foodstuffs and their control*. Springer Science & Business Media. 476 pp.
- Hill D. S. 2008. *Pests of crops in warmer climates and their control*. Springer Science & Business Media. 704 pp.
- Hockenyos G. L. 1933. Effect of dusts on the oriental roach. *Journal of Economic Entomology*, 26 (4): 792-794.
- Hooper-Bui L. M. & Rust M. K. 2000. Oral toxicity of abamectin, boric acid, fipronil, and hydramethylnon to laboratory colonies of Argentine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of economic entomology*, 93 (3): 858-864.
- Howe R. W. 1952. The biology of the rice weevil, *Calandra oryzae* (L.). *Annals of Applied Biology*, 39 (2): 168-180.
- Human Health Issues. (17 October 2014). Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/pesticides/health/human.htm>
- Hwang I. C., Kim T. H., Bang S. H., Kim K. S., Kwon H. R., Seo M. J., Jin P. H., Chisa Y-A & Yu, Y. M. 2011. Insecticidal effect of controlled release formulations of etofenprox based on nano-bio technique. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 56 (1): 33-40.
- Ignatowicz S. & Olejarski P. 2008. Implementation of methyl bromide alternatives in Poland. *Integrated Protection of Stored Production*. IOBC/WPRS Bulletin 40: 3-7.

INTA. 2008. Eficiencia de poscosecha, generación, desarrollo y difusión de tecnologías para aumentar la eficiencia de acondicionamiento, secado y almacenaje de cereales, oleaginosas y cultivos industriales del país. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/balcarce/precop/2008/efic.htm>.

INTA. 2012. Un círculo virtuoso: valor agregado en origen. XI (126). Disponible en: www.intainforma.inta.gov.ar.

Isman M. 2002. Insect antifeedants. *Pesticide outlook*, 13 (4): 152-157.

Isman M. B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51: 45-66.

Isman M. B. 1994. Botanical insecticides and antifeedants: New sources and perspectives. *Pesticide Research Journal*, 6(1): 11-19.
Protection of Stored Products, páginas 17-18. Poznań, Poland.

Jackson C. & McGonigle D. 2005. Direct monitoring of the electrostatic charge of house-flies (*Musca domestica* L.) as they walk on a dielectric surface. *Journal of electrostatics*, 63 (6): 803-808.

Jackson D. M. 1990. Plant-insect behavioral studies: examples with *Heliothis* and *Manduca* species. *Florida Entomologist*: 378-391.

Jacobson M. 1966. Chemical insect attractants and repellents. *Annual review of entomology*, 11 (1): 403-422.

Jahromi M. G., Pourmirza A. A. & Safaralizadeh M. H. 2014. Repellent effect of sirinol (garlic emulsion) against *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) by three laboratory methods. *African Journal of Biotechnology*, 11 (2): 280-288.

Jbilou R., Ennabili A. & Sayah F. 2006. Insecticidal activity of four medicinal plant extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *African Journal of Biotechnology*, 5 (10): 936-940.

Jenkins C.F.H. 1940. Notes on Control of Weevils in Wheat. *Journal of the Department of Agriculture for Western Australia, Ser. 2*, 17 (4): 411-417.

Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., Zhao Y & Guo X. 2005. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environmental science & technology*, 39 (5): 1378-1383.

Jilani G. & Su H. C. 1983. Laboratory studies on several plant materials as insect repellents for protection of cereal grains. *Journal of Economic Entomology*, 76 (1): 154-157.

Kah M. & Hofmann T. 2014. Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environment international*, 63: 224-235.

Kah M., Beulke S., Tiede K. & Hofmann, T. 2013. Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43 (16): 1823-1867.

Kalinović I., Rozman V., Guberac V. & Marić S. 2002. Insecticidal activity of some aromatic plants from Croatia against lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica* f.) on stored wheat. *Advances in Stored Product Protection. 8th International Working Conference on Stored Product Protection. Chemical and Physical Control.* : 768-775

Kalmus H. 1944. Action of inert dusts on insects. *Nature*, 153 (3893): 714-715.

Kamel F. 2013. Paths from Pesticides to Parkinson's. *Science*, 341 (6147): 722-723.

Kamrin M. A. 2010. *Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate.* CRC press. 685 pp

Kang M. A., Seo M. J., Hwang I. C., Jang C., Park H. J., Yu Y. M. & Youn Y. N. 2012. Insecticidal activity and feeding behavior of the green peach aphid, *Myzus persicae*, after treatment with nano types of pyrifluquinazon. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15 (4): 533-541.

Karasev V. V., Onischuk A. A., Glotov O. G., Baklanov A. M., Maryasov A. G., Zarko V. E., Panfilova V. N., Levykin A. I & Sabelfeld K. K. 2004. Formation of charged aggregates of Al₂O₃ nanoparticles by combustion of aluminum droplets in air. *Combustion and Flame*, 138 (1): 40-54.

Kaushik P., Shakil N. A., Kumar J., Singh M. K., Singh M. K. & Yadav S. K. 2013. Development of controlled release formulations of thiram employing amphiphilic polymers and their bioefficacy evaluation in seed quality enhancement studies. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 48 (8): 677-685.

Kavallieratos N. G., Athanassiou C. G., Pashalidou F. G., Andris N. S. & Tomanović Ž. 2005. Influence of grain type on the insecticidal efficacy of two diatomaceous earth formulations against *Rhyzopertha dominica* (F) (Coleoptera: Bostrychidae). *Pest management science*, 61 (7): 660-666.

Kim S. W., Jung J. H., Lamsal K., Kim Y. S., Min J. S. & Lee Y. S. 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40 (1): 53-58.

Kiminami R. H. G. A. 2001. Combustion synthesis of nanopowder ceramic powders. *Kona*, 19: 156-165.

Kitherian S. 2017. Nano and Bio-nanoparticles for Insect Control. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology*: 1-7.

Korth K. L., Doege S. J., Park S. H., Goggin F. L., Wang Q., Gomez S. K., Liu G., Jia L. & Nakata P. A. 2006. *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant Physiology*, 141 (1): 188-195.

Korunic Z. & Fields P. 1998. U.S. Patent No. 5,773,017. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Korunic Z. & Fields P. G. 2006, October. Susceptibility of three species of *Sitophilus* to diatomaceous earth. In Proceedings of the 9th International Conference on Stored-Product Protection. ABRAPOS, Rodovia : 681-686.

Korunic Z. & Mackay A. 1999. Grain surface layer treatment of diatomaceous earth for insect control. hedzk@atglobal.net.

Korunic Z. & Ormesher P. 1996 May. Diatomaceous earth-an alternative to methyl bromide. In Proceedings Workshop on Alternative to Methyl Bromide, Toronto, Ontario.

Korunic Z. & Ormesher P. 2000. Evaluation and standardized testing of diatomaceous earth, pp. 738-744. In J. Zuxun, L. Quan, L. Yongsheng, T. Xianchang and G. Lianghua (Eds.). 7th Intl. Working Conf. Stored-Prod. Prot., Sichuan Publishing House of Science & Technology, Chengdu, Sichuan Province, Peoples Republic of China.

Korunic Z. 1998. Review Diatomaceous earths, a group of natural insecticides. *Journal of Stored Products Research*, 34 (2): 87-97.

Korunic Z., Fields P. G., Kovacs M. I. P., Noll J. S., Lukow O. M., Demianyk C. J. & Shibley K. J. 1996. The effect of diatomaceous earth on grain quality. *Postharvest Biology and Technology*, 9 (3): 373-387.

Korunic, Z. 2013. Diatomaceous earths: Natural insecticides. *Pesticidi i fitomedicina*, 28 (2): 77-95.

Koul O. 2008. Phytochemicals and insect control: an antifeedant approach. *Critical reviews in plant sciences*, 27(1): 1-24.

Krämer W. & Schimer U. 2007. *Modern Crop Protection Compounds Vol. III*. John Wiley & Sons, New York. 748-1137

Larraín P. 1994 Manejo integrado de plagas en granos almacenados. Investigación y Progreso Agropecuario, La Platina v. 81: 10-16.

Le Patourel G. N. J. 1986. The effect of grain moisture content on the toxicity of a sorptive silica dust to four species of grain beetle. Journal of Stored Products Research, 22 (2): 63-69.

Lepori E. C. V., Mitre G. B. & Nassetta M. 2013. Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 29: 25-43.

Levinson H. Z. & Levinson A. R. 1989. Food storage and storage protection in ancient Egypt. In Proceedings of a Scientific Congress. Barcelona, Spain, 25-28 October 1988: Parasitology 88: 475-482. Secretaría General Técnica.

Liu Z. L. & Ho S. H. 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research, 35 (4): 317-328.

Loha K. M., Shakil N. A., Kumar J., Singh M. K., Adak T. & Jain S. 2011. Release kinetics of β -Cyfluthrin from its encapsulated formulations in water. Journal of Environmental Science and Health Part B, 46 (3): 201-206.

Long-term pesticide exposure may increase risk of diabetes. (4 June 2008). National Institute of Environmental Health Sciences. <http://www.niehs.nih.gov/news/newsroom/releases/2008/june04/>

Lorini I. & Beckel, H. 2006. October. Efficacy of “diatomaceous earth” to control the main stored grain pests. In Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored-Product Protection, ABRAPOS, Passo Fundo, RS, Brazil, 15-18 October 2006. :. 863-867. Brazilian Post-Harvest Association (ABRAPOS).

Luz C., Rodrigues J. & Rocha L. F. 2012. Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. Acta Tropica, 122, 29-35.

Mansour M. Y. & Al-Bacheer M. 1995. Gamma irradiation as a disinfestation and quarantine treatment for faba bean seeds infested with *Bruchus dentipes* Baudi (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Applied Entomology, 119 (1-5): 631-636.

Mansson P. E. 2005. Host selection and antifeedants in *Hylobius abietis* pine weevils (Vol. 2005, No. 16).

Maxwell K. E. 1937. The biology and control of the hairy chinch bug, *Blissus hirtus* Montd., infesting turf in Long Island (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis, Cornell Univ., Ithaca, NY).

McCabe E. T., Barthel W. F., Gertler S. I. & Hall S. A. 1954. Insect repellents. III. N, N-Diethylamides. The Journal of Organic Chemistry, 19 (4):493-498.

McDonald L. L., Guy R. H. & Speirs R. D. 1970. Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents, and attractants against stored-product insects-1. Marketing Research Report, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture: n° 882

McGonigle D. F. & Jackson C. W. 2002. Effect of surface material on electrostatic charging of houseflies (*Musca domestica* L). Pest management science, 58 (4): 374-380.

McGonigle D. F., Jackson C. W. & Davidson J. L. 2002. Triboelectrification of houseflies (*Musca domestica* L.) walking on synthetic dielectric surfaces. Journal of electrostatics, 54 (2): 167-177.

Menzel R. & Backhaus W. 1989. Color vision in honey bees: phenomena and physiological mechanisms. Facets of vision. Springer, Berlin: 281-297.

Metcalf, R. L., & Luckmann, W. H. (Eds.). 1994. Introduction to insect pest management (Vol. 101). John Wiley & Son, 661 pp.

Miller J. R., Siegert P. Y., Amimo F. A. & Walker E. D. 2009. Designation of chemicals in terms of the locomotor responses they elicit from insects: an update of Dethier et al. (1960). Journal of economic entomology, 102 (6): 2056-2060.

Mimani T. & Patil K. C. 2001. Solution combustion synthesis of nanoscale oxides and their composites. Materials Physics and Mechanics (Russia), 4 (2): 134-137.

Mingming A, Yuncong Z, Shun H, Deguang L, Pingliang L, Jianqiang L, 2012. Preparation and characterization of 1-naphthylacetic acid-silica conjugated nanospheres for enhancement of controlled-release performance. Nanotechnology, 24 (3): 035601.

Mote D. C., Wilcox J. & Davis E. G. 1926. The Natural "cleaning up" habit of insects. Journal of Economic Entomology, 19 (5): 745-748.

Müller J., Clauss M., Codron D., Schulz E., Hummel J., Fortelius M., Kircher P. & Hatt J. M. 2014. Growth and wear of incisor and cheek teeth in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) fed diets of different abrasiveness. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology, 321 (5): 83-298.

Munakata K. 1975. Insect antifeeding substances in plant leaves. Pure and Applied Chemistry, 42(1-2): 57-66.

Nair M. R. G. K. 1957. Structure of waterproofing epicuticular layers in insects in relation to inert dust action. *Indian Journal of Entomology*, 10:37-49.

Narahashi T., Zhao X., Ikeda T., Nagata K. & Yeh J.Z. 2007. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human and Experimental Toxicology* 26 (4): 361–366

Nation J. 2002. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press. 485 pp.

Navarro S. 2006. New global challenges to the use of gaseous treatments in stored product. 9th International Working Conference on Stored Product Protection. Plenary session 6. Fumigation and Control Atmosphere. Keynotes, pp 495-509.

Nerio L.S., Olivero-Verbel J. & Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology*, 101: 372-378.

Nguyen H. M., Hwang I. C., Park J. W. & Park H. J. 2012. Enhanced payload and photo-protection for pesticides using nanostructured lipid carriers with corn oil as liquid lipid. *Journal of microencapsulation*, 29 (6): 596-604.

Novo R. J., Viglianco A. & Nassetta M. 1998. Efecto antialimentario de extractos de cuatro plantas sobre *Anticarsia gemmatalis* Hub. (Lepidoptera: Noctuidae). *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 24(3): 525-530.

Obermayr U., 2015. Excitorepellency. En: Debboun M., Frances S. P. & Strickman D. A. (Eds.). *Repellents Handbook*. CRC Press, pp. 91-115.

Ogendo O., Kostyukovsky M., Ravid U., Matasyoh J., Deng A., Omolo E., Kariuki S. & Shaaya E. 2008. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two of its constituents against five insect pests attacking stored food products. *Journal of Stored Products Research*, 44 (4): 328-334.

Pacheco I. A., Sartori M. R. & Taylor R. W. D. 1990. Levantamento de resistência de insetos-praga de grãos armazenados à fosfina, no Estado de São Paulo. *Coletânea do ITAL*, 20 (2): 144-154.

Painter R. H. 1951. Insect resistance in crop plants. *Soil Science*, 72 (6), 481.

Painter, R. H. 1958. Resistance of plants to insects. *Annual Review of Entomology*, 3 (1): 267-290.

Panagiotakopulu E., Buckland P. C. Day P. M. & Doumas C. 1995. Natural insecticides and insect repellents in antiquity: a review of the evidence. *Journal of Archaeological Science*, 22 (5): 705-710.

Pankaj Shakil N. A., Kumar J., Singh M. K. & Singh K. 2012. Bioefficacy evaluation of controlled release formulations based on amphiphilic nano-polymer of

carbofuran against *Meloidogyne incognita* infecting tomato. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 47 (6): 520-528.

Pardeshi C., Rajput P., Belgamwar V., Tekade A., Patil G., Chaudhary K. & Sonje A. 2012. Solid lipid based nanocarriers: An overview/Nanonosači na bazi čvrstih lipida: Pregled. Acta Pharmaceutica, 62(4): 433-472.

Parkin E. A. 1944. Control of the granary weevil with finely ground mineral dusts. Annals of Applied Biology, 31 (1): 84-88.

Parr-Vasquez C. L., Bugusu B. & Yada, R. Y. 2010. A brief overview of science and technology in food and food products at the nanoscale level. <<http://www.foodsciencecentral.com/fsc/ixid15901>>

Pascual-Villalobos M. J., Ortells R. C., Riudavets J., Aguilar M., Yanguas J. M. B., García M. C., Soler A., Baz A. & del Estal Padillo P. 2006. Plagas del arroz almacenado y sus enemigos naturales en España. Boletín de sanidad vegetal. Plagas, 32 (2): 223-230.

Paull J. & Lyons K. 2008. Nanotechnology: the next challenge for organics. Journal of Organic Systems, 3 (1): 3-22.

Pérez de Luque A. & Rubiales, D. 2009. Nanotechnology for parasitic plant control. Pest management science, 65 (5): 540-545.

Perez-Mendoza J. 1999. Survey of insecticide resistance in Mexican populations of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research, 35 (1): 107-115.

Pesticides. (24 March 2015).NIH. <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/pesticides/>.

Picollo de Villar M. I., Seccacini E. & Zerba E. N. 1985. Resistencia a Malati3n en insectos plaga de grano almacenado de la Rep3blica Argentina. IDIA: 41-444.

Picollo de Villar M., Ferrero A., Seccacini E. & Zerba E. 1992. Perfil de toxicidad de insecticidas en cepas susceptibles y resistentes al malati3n en *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Revista de la Sociedad Entomol3gica Argentina, 51:71-78.

Pimentel D., Acquay H., Biltonen M., Rice P., Silva M., Nelson J., Lipner V., Giordano S., Horowitz A. & D'amore, M. 1992. Environmental and economic costs of pesticide use. BioScience, 42 (10): 750-760.

Prates H. T., Santos J. P., Waquil J. M., Fabris J. D., Oliveira A. B. & Foster J. E. 1998. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and

Tribolium castaneum (Herbst). Journal of Stored Products Research, 34 (4): 243-249.

Procopio S., Vendramin J. & Ribeiro J. & Santos J. 2003. Bioatividade de diversos pós de origen vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots.(Coleoptera: Curculionidae). Ciencia e Agrotecnologia, 27:1231-1236.

Puterka G. J., Glenn D. M., Sekutowski D. G., Unruh T. R. & Jones S. K. 2000. Progress toward liquid formulations of particle films for insect and disease control in pear. Environmental Entomology, 29 (2): 329-339.

Qian K., Shi T., Tang T., Zhang S., Liu X. & Cao Y. 2011. Preparation and characterization of nano-sized calcium carbonate as controlled release pesticide carrier for validamycin against *Rhizoctonia solani*. Microchimica Acta, 173(1-2): 51-57.

Quarles W. & Winn P. S. 1996. Diatomaceous earth and stored product pests. IPM practitioner, 18 (5/6): 1-10.

Quarles W. 1992. Diatomaceous earth for pest control. The IPM Practitioner. Volume XIV, Number 5-6: 16pp.

Raupp M. J. 1985. Effects of leaf toughness on mandibular wear of the leaf beetle, *Plagioderma versicolora*. Ecological Entomology, 10(1): 73-79.

Rees D. 2004. Insects of Stored products. CSIRO. Australia. 181pp.

Reza A. M. S. & Parween S. 2006. Differential preference of colored surface in *Tribolium castaneum* (Herbst). Invertebrate Survival Journal, 3: 84-88.

Rigaux M., Haubruge E. & Fields P. G. 2001. Mechanisms for tolerance to diatomaceous earth between strains of *Tribolium castaneum*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 101(1): 33-39.

Rouhani M., Samih M. A. & Kalantari S. 2012. Insecticidal effect of silica and silver nanoparticles on the cowpea seed beetle, *Callosobruchus maculatus* F.(Col.: Bruchidae). Journal of Entomological Research, 4: 297-305.

Sahaf B. Z., Moharramipour S. & Meshkatalsadat M. H. 2008. Fumigant toxicity of essential oil from *Vitex pseudo-negundo* against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.). Journal of Asia-Pacific Entomology, 11 (4): 175-179.

Saldúa, V. L. 2013. Estudios del comportamiento de *Sipha (Rungsia) maydis* Passerini 1860 (Hemiptera: Aphidoidea), en relación con las estrategias de defensa de sus plantas hospederas (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Naturales y Museo).

- Sanborn M., Kerr K. J., Sanin L. H., Cole D. C., Bassil K. L. & Vakil C. 2007. Non-cancer health effects of pesticides Systematic review and implications for family doctors. *Canadian Family Physician*, 53 (10):1712-1720.
- Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. 2015. Evaluation of different parameters in the extraction of incurred pesticides and environmental contaminants in fish. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(21): 5163-5168.
- Sarkar D. J., Kumar J., Shakil N. A. & Walia, S. 2012. Release kinetics of controlled release formulations of thiamethoxam employing nano-ranged amphiphilic PEG and diacid based block polymers in soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47 (11): 1701-1712.
- SAS Institute. 2011. SAS/IML 9.3 User's Guide. Sas Institute.
- Schlyter F., Smitt O., Sjödin K., Högberg H. E. & Löfqvist J. 2004. Carvone and less volatile analogues as repellent and deterrent antifeedants against the pine weevil, *Hylobius abietis*. *Journal of applied entomology*, 128 (9-10): 610-619.
- Schoonhoven L. M. 1982. Biological aspects of antifeedants. *Entomologia experimentalis et applicata*, 31(1): 57-69.
- Shanks C. H. Jr. & Chase D. L. 1981. Effect of volcanic ash on adult *Otiorhynchus* (Coleoptera: Curculionidae). *Melandria*, 37: 63-66.
- Shostak A.W.2014. Sublethal Exposure to Diatomaceous Earth Increases Net Fecundity of Flour Beetles (*Tribolium confusum*) by Inhibiting Egg Cannibalism. *PLoS ONE* 9 (2): e88500. doi:10.1371/journal.pone.0088500).
- Silva M. H. & Beauvais S. L. 2010. Human health risk assessment of endosulfan. I: Toxicology and hazard identification. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56 (1): 4-17.
- Simons J. W. & Hare W. W. 1965. Grain drying and storage studies in southwest Georgia (No. 1342). US Dept. of Agriculture.
- Sinha K., Ghosh J. & Sil P. C. 2017. New pesticides: a cutting-edge view of contributions from nanotechnology for the development of sustainable agricultural pest control. *New Pesticides and Soil Sensors*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00003-5>.
- Soderstrom E. L., Brandl D. G. & Mackey B. 1992. High temperature combined with carbon dioxide enriched or reduced oxygen atmospheres for control of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 28 (4): 235-238.

Song M. R., Cui S. M., Gao F., Liu Y. R., Fan C. L., Lei T. Q. & Liu D. C. 2012. Dispersible silica nanoparticles as carrier for enhanced bioactivity of chlorfenapyr. *Journal of Pesticide Science*, 37 (3): 258-260.

Sousa A. H., Faroni L. D. A., Pimentel M. A. G. & Guedes R. N. C. 2009. Developmental and population growth rates of phosphine-resistant and-susceptible populations of stored-product insect pests. *Journal of Stored Products Research*, 45 (4): 241-246.

Sparks T. C. & Nauen R. 2015. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide biochemistry and physiology*, 121: 122-128.

Stadler & Buteler, 2016. Avances tecnológicos en el control biorracional de plagas: NANOINSECTICIDAS. Agropost
<http://www.cpia.org.ar/agropost/201610/nota5.html>

Stadler T., Buteler M. & Weaver D. K. 2010a. Novel use of nanostructured alumina as an insecticide. *Pest management science*, 66 (6): 577-579.

Stadler T., Buteler M. & Weaver D. K. 2010b. Nanoinsecticidas: Nuevas perspectivas para el control de plagas. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 69 (3-4): 149-156.

Stadler T., Buteler M., Weaver D. K. & Sofie S. 2012. Comparative toxicity of nanostructured alumina and a commercial inert dust for *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) at varying ambient humidity levels. *Journal of stored products research*, 48: 81-90.

Stadler T., Lopez-Garcia G. P., Gitto J. G. & Buteler M. 2017. Nanostructured alumina: biocidal properties and mechanism of action of a novel insecticide powder. *Bulletin of Insectology*, 70: 17-25.

Stadler T., Subramanjam B. & Ferrero A. A. 2003. Monitoring for insecticide resistance in major stored product pests in Argentina: a review. *Agriscientia*, 20: 99-110.

Stadler, 2016. "Nanotecnología aplicada al desarrollo de nuevos insecticidas", XXIV Congreso de APRESID 3 al 5 de agosto, Rosario, Santa Fe.

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

Suárez V. 2003. La tierra de diatomea como insecticida natural en bovinos. Tesis de Maestría en Gestión Ambiental. Facultad de Ingeniería y Ciencias Económico-sociales. Universidad Nacional de San Luis. 62pp.

Subramanyam B. & Roesli R. 2000. Inert dusts. En: Subramanyam, B. & D.W. Hagstrum (Eds.). Alternatives to pesticides in stored-product IMP. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts, pp. 321-379.

Taghizadeh R. & Mohammadkhani N. 2016. Feeding deterrence of two medicinal plant extracts on *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Crop Protection, 5 (4): 529-539.

Talukder F. A. & Howse P. E. 1993. Deterrent and insecticidal effects of extracts of pithraj, *Aphanamixis polystachya* (Meliaceae), against *Tribolium castaneum* in storage. Journal of Chemical Ecology, 19 (11): 2463-2471.

Tefera T., Mugo S. N. & Likhayo P. 2011. Effects of insect population density and storage time on grain damage and weight loss in maize due to the maize weevil *Sitophilus zeamais* and the larger grain borer *Prostephanus truncatus*. African Journal of Agricultural Research, 6 (10): 2249-2254.

Thacker J.R.M. 2002. An Introduction to Arthropod Pest Control. Cambridge University Press: 345pp.

Toniolo J. C., Lima M. D., Takimi A. S. & Bergmann C. P. 2005. Synthesis of alumina powders by the glycine–nitrate combustion process. Materials research bulletin, 40 (3): 561-571.

Van Driesche, R. G., & Simberloff, D. 2016. Benefit–risk assessment of biological control in wildlands. Integrating Biological Control into Conservation Practice, 80-104.

Vardeman E. A., Arthur F. H., Nechols J. R. & Campbell J. F. 2007. Efficacy of surface applications with diatomaceous earth to control *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. Journal of Stored Products Research, 43 (4): 335-341.

Vessuri H. & de Montevideo U. O. 2016. La ciencia para el desarrollo sostenible (Agenda 2030). UNESCO. 20 pp

Viale J.A. 1996. Conservación de granos en silos-chacra. INTA Marcos Juárez. En: Agroindustria. 1. muestra tecnológica integral para la alimentación animal. CAFAB-FAIAPA. 13 (87): 10pp.

Vilchez R.M. & Miller O.R.R. 2006. Calidad fitosanitaria y presencia de aflatoxinas en granos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), en almacén y campo, 2005. Trabajo de diploma. Universidad Nacional Agraria. Facultad de agronomía. Managua, Nicaragua. 96 pp.

White G. D., Berndt W. L., Schesser J. H. & Fifield C. C. 1966. Evaluation of four inert dusts for the protection of stored wheat in Kansas from insect attack. ARS-USDA, 51:21 pp

White G. B. & Moore S. J. 2015. Terminology of Insect Repellents. En: Debboun M., Frances S. P. & Strickman D. A. (Eds.). Repellents Handbook. CRC Press, pp 3-30.

Wigglesworth V. B. 1944. Action of inert dusts on insects. Nature, 153 (3886): 493-494.

Wille A. & Fuentes G. 1975. Efecto de la ceniza del Volcán Irazú (Costa Rica) en algunos insectos. Revista de Biología Tropical, 23 (2): 165-175.

Wyss E. & Daniel C. 2004. Effects of autumn kaolin and pyrethrin treatments on the spring population of *Dysaphis plantaginea* in apple orchards. Journal of applied entomology, 128 (2): 147-149.

Xiang C., Taylor A. G., Hinestroza J. P. & Frey M. W. 2013. Controlled release of nonionic compounds from poly (lactic acid)/cellulose nanocrystal nanocomposite fibers. Journal of Applied Polymer Science, 127(1): 79-86.

Xie Y. S., Bodnaryk R. P. & Fields P. G. 1996. A rapid and simple flour-disk bioassay for testing substances active against stored-product insects. The Canadian Entomologist, 128 (05): 865-875.

Yin Y. H., Guo Q. M., Yun H., Wang L. J. & Wan, S. Q. 2012. Preparation, characterization and nematocidal activity of lansiumamide B nano-capsules. Journal of Integrative Agriculture, 11 (7): 1151-1158.

Zill S. N. & Moran D. T. 1981. The exoskeleton and insect proprioception. I. Responses of tibial campaniform sensilla to external and muscle-generated forces in the American cockroach, *Periplaneta americana*. Journal of Experimental Biology, 91 (1): 1-24.

Zimmerman E. C. 1993. Australian Weevils. Volume III. Nanophyidae, Rhynchophoridae, Eirrhinidae, Curculionidae: Amycterinae, literature consulted. CSIRO, Melbourne, 854 pp.