



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

Preparación sustentable y evaluación de actividad biológica de fenilpropanoides frente a la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae).

Tesista: Lic. María Emilia Pérez

Director: Dr. Juan Carlos Autino

Codirectora: Dra. Marcela Inés Schneider

Año 2016

*A Pablo, mi hermoso compañero de viaje
y a Juana, nuestro sol*

Agradecimientos

A Pablo, mi compañero, por el amor sincero, la alegría y el apoyo; y a Pablo, el biólogo, por la lectura crítica de la tesis, sus comentarios y sugerencias sumaron mucho a este trabajo. A Juana por su amor incondicional, su comprensión y por mostrarme el camino a transitar.

A mi director, Juan Carlos Autino, por ayudarme a ver y entender la química de otra manera y por las lindas charlas compartidas que me hicieron crecer no solo profesionalmente sino también como persona.

A mi codirectora, Marcela Inés Schneider por permitirme desarrollar los bioensayos en el laboratorio de Ecotoxicología.

A Gustavo Romanelli, a quien admiro profundamente, por su apoyo y confianza, la pasión contagiosa que pone en todo lo que hace y su compromiso.

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por las becas de posgrado que me permitieron realizar este trabajo.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF-UNLP) y del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) por permitirme desarrollar el trabajo de tesis en sus respectivas dependencias.

A los jurados de esta tesis, Dres. Mario Saparrat, Agustín Ponzinibbio y Carmen Rossini, por sus correcciones y sugerencias que mejoraron sustancialmente este trabajo.

Al personal del Departamento de Ciencias Biológicas y de la Secretaría de Posgrado de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

A la gente de las Cátedras de Química Orgánica y de Química General e Inorgánica de la FCAyF por el apoyo. Especialmente a Diego Ruiz por la desinteresada ayuda que me brindó.

A mis compañeras del laboratorio de Ecotoxicología, especialmente a Marina Haramboure, Luciana Mirande, Noel Ferraris y Cecilia Gabellone, por los abrazos, la ayuda durante estos años y las risas, llantos y mates compartidos. Todo fue más lindo en su compañía.

A la gente del laboratorio de Ecología de Plagas, especialmente a Gabriela Luna, Eliana Nieves, Vivina Savino y Nadia Salas. Y a Claudia Cédola, por su amistad.

Al personal administrativo y técnico del CEPAVE por todo! Jorge Barneche, Emilio Topa, Luis Giambelluca, Guillermo Reboredo, Hernán Pereira, Graciela Minardi, Gastón Cavallo, Aníbal Suriano y María Cristina Estivariz. Y a Santiago Plischuk por hacer divertidos los viajes al campo.

A Florencia Barberis que me ayudó muchísimo en la realización de los últimos ensayos.

A Rodrigo Altamirano por el asesoramiento en la realización de los análisis estadísticos.

A los productores que, desinteresadamente, me permitieron muestrear en sus cultivos: Susana Parrillo, Mariana del Pino y la gente del Colectivo Orgánico.

A Natalia Allegrucci y Andrea Armendano por las lindas charlas compartidas.

Al Servicio de Guías del Museo de La Plata, especialmente a mis amigas guías: Valeria Aguallo, Felicitas Fonseca, Soledad Scazzola, Florencia Santucci y Julia Tur y ex guías: Virginia Ramallo, Carolina Peralta, Rocío García Mancuso, Emilia Iucci, Norberto Uriz, Andrea Rodríguez y Anahí Formoso.

A las chicas del Área Educativa y Difusión Científica del Museo de La Plata, Claudia Rabanaque y Eugenia Martins, con quienes empecé a trabajar recientemente y me han dado todo su apoyo para la finalización de esta tesis.

A mis padres, a Lau, Mati, Marta, Mauri, Nano y Dai y a mis sobris: Ernestina, Balti y Juan Francisco. Me han apoyado todos estos años y comprendido las ausencias!

A la gran familia del alma, mis amigos: Jose, Caro, Cur y Delia, Pome, Eric, Jero y Romi, Nahuel, Migue (se te extraña!), Marianita y Eze, Germán y Mica, Raúl, Ale, Noé, Emi, Nico y Pey. Y a mis sobris de la vida: Martu, Simón, Sara, Uma, Siro, Sasha, Zaira, Lila, Uli y Naia.

A la hermosa gente que tuve la suerte de conocer en Los Naranjos, especialmente a Juan Balbuena, Cecilia Simiele y sus peques, Martín y Manuel, por la ayuda, los ricos mates y la buena energía.

ÍNDICE

Resumen.....	i
Capítulo 1. Introducción.....	1
Manejo integrado de plagas y modelo de estudio.....	2
Definición de plaga agrícola.....	3
Manejo integrado de plagas.....	3
Control químico de plagas.....	5
Breve reseña histórica sobre su empleo.....	5
Productos de origen botánico y análogos estructurales para el control de plagas.....	7
Manejo sanitario de cultivos hortícolas en República Argentina.....	10
Modelo de estudio: la polilla del tomate.....	11
Estrategias empleadas para el control de <i>Tuta absoluta</i> en Argentina.....	16
Compuestos fenilpropanoides: Cinamatos de alquilo y Flavonas.....	18
Compuestos fenilpropanoides.....	19
Cinamatos de alquilo.....	19
Bioactividad de cinamatos de alquilo sobre plagas agrícolas, forestales y de productos almacenados.....	21
Otras actividades biológicas.....	23
Preparación de cinamatos de alquilo.....	25
Flavonoides.....	28
Flavonas.....	31
Bioactividad de flavonas sobre plagas agrícolas, forestales y de productos almacenados.....	31
Otras actividades biológicas.....	33
Preparación de flavonas.....	34
La química verde como paradigma para el diseño y síntesis de productos orgánicos.....	37
Catálisis y catalizadores.....	40
Polioxometalatos con estructura de Preyssler- Jeannin- Pope.....	41
Propiedades de los heteropoliácidos.....	42
Capítulo 2. Objetivos e hipótesis.....	44
Objetivo general.....	45
Objetivos específicos.....	45
Hipótesis de trabajo.....	46
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	47

Cría de <i>Tuta absoluta</i> y metodología general para la realización de los bioensayos.....	48
Recolección de organismos de <i>Tuta absoluta</i> campo.....	49
Acondicionamiento del material de campo.....	50
Establecimiento de la colonia y cría de <i>Tuta absoluta</i> en el laboratorio.....	51
Metodología general para la realización de los bioensayos.....	53
Preparación de soluciones.....	55
Puntos finales evaluados en los diferentes bioensayos.....	55
Análisis estadístico.....	57
Preparación de cinamatos de alquilo y flavonas.....	58
Consideraciones generales.....	59
Procedimientos generales.....	60
Catalizadores.....	61
Preparación de los catalizadores heteropoliácidos.....	61
Catalizador $H_{14}NaP_5MoW_{29}O_{110}$ (APMo).....	61
Catalizador $H_{14}NaP_5W_{30}O_{110}$ (AP).....	62
Caracterización de los catalizadores heteropoliácidos.....	62
Cinamatos de alquilo.....	63
Preparación de cinamatos de alquilo.....	63
Comparación de catalizadores y optimización de las condiciones de reacción.....	63
Cinamato de propilo. Ensayo típico de preparación.....	64
Flavonas.....	64
Preparación de flavonas según la estrategia de Baker-Venkataraman.....	64
Benzoilación de 2-hidroxiacetofenonas.....	64
Benzoato de 2-acetilfenilo. Descripción de la preparación.....	64
Benzoato de 2-acetil-4-metoxifenilo. Descripción de la preparación.....	65
Reordenamiento de Baker-Venkataraman.....	66
2-Hidroxidibenzoilmetano. Descripción de la preparación.....	66
2-Hidroxi-5-metoxidibenzoilmetano. Descripción de la preparación.....	66
Ciclación a flavonas utilizando heteropoliácido de Preyssler como catalizador.....	67
6-Metoxiflavona.....	67
Ensayos de optimización del tiempo de reacción y la concentración del catalizador (AP).....	67
Descripción de una preparación representativa.....	67
Flavona.....	67
Ciclación a flavonas utilizando hidrogenosulfato de potasio como catalizador.....	68
Optimización de las condiciones de reacción.....	68

Influencia de la temperatura.....	68
Influencia del tiempo de reacción.....	68
Efecto de la cantidad de catalizador.....	69
Reutilizabilidad del catalizador.....	69
Descripción de una preparación representativa.....	69
Preparaciones de flavonas utilizando hidrogenosulfato de potasio como catalizador.....	69
Flavona.....	69
6-Metilflavona.....	69
7-Metilflavona.....	69
6-Cloroflavona.....	70
7-Cloroflavona.....	70
6-Bromoflavona.....	70
7-Bromoflavona.....	70
Capítulo 4. Preparación de cinamatos de alquilo y flavonas. Resultados.....	72
Caracterización de los catalizadores heteropoliácidos de Preyssler preparados.....	73
Preparación de cinamatos de alquilo.....	74
Comparación de catalizadores y optimización de las condiciones de reacción.....	74
Preparación de flavonas.....	75
Ciclación a flavonas utilizando heteropoliácido de Preyssler como catalizador.....	75
6-Metoxiflavona.....	75
Optimización del tiempo de reacción y la concentración del catalizador (AP).....	75
Flavona.....	76
Ciclación a flavonas utilizando hidrogenosulfato de potasio como catalizador.....	76
Optimización de las condiciones de reacción.....	76
Influencia de la temperatura.....	76
Influencia del tiempo de reacción.....	77
Efecto de la cantidad de catalizador.....	77
Reutilizabilidad del catalizador.....	78
Flavonas preparadas.....	79
6-Metoxiflavona.....	79
Flavona.....	79
6-Metilflavona.....	79
7-Metilflavona.....	80
6-Cloroflavona.....	80
7-Cloroflavona.....	80

6-Bromoflavona.....	81
7-Bromoflavona.....	81
Capítulo 5. Evaluación de la actividad biológica de cinamatos de alquilo sobre <i>Tuta absoluta</i>.....	82
Materiales y métodos.....	83
Bioensayos sobre huevos.....	83
Bioensayos sobre larvas de segundo estadio.....	85
Bioensayos sobre larvas de cuarto estadio.....	86
Resultados y discusión.....	86
Bioensayos sobre huevos.....	86
Bioensayos sobre larvas de segundo estadio.....	91
Exposición de larvas de segundo estadio a discos de hoja de tomate tratados con los diferentes compuestos.....	91
Tratamiento de discos de hoja de tomate conteniendo la larva en su mesófilo.....	94
Bioensayos sobre larvas de cuarto estadio.....	96
Capítulo 6. Evaluación de la actividad biológica de flavonas sobre <i>Tuta absoluta</i>.....	99
Materiales y métodos.....	100
Resultados y discusión.....	100
Bioensayos sobre huevos.....	100
Bioensayos sobre larvas de segundo estadio.....	104
Exposición de larvas de segundo estadio a discos de hoja de tomate tratados con los diferentes compuestos.....	104
Tratamiento de discos de hoja de tomate con la larva dentro del mesófilo.....	109
Bioensayos sobre larvas de cuarto estadio.....	113
Capítulo 7. Conclusiones.....	115
Referencias bibliográficas.....	122
Trabajos publicados en revistas periódicas	145

Resumen

El uso masivo de plaguicidas sintéticos en la agricultura ha desencadenado una serie de problemáticas ambientales que comenzaron a visualizarse en la década de 1960 y se agudizaron posteriormente. Las intoxicaciones de los trabajadores agrícolas y de poblaciones asentadas en esas zonas, la presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos y su persistencia en el ambiente, la ruptura de los mecanismos de control biológico natural y el desarrollo de resistencia en las poblaciones de plagas son algunos de los efectos de los plaguicidas que atentan contra la salud humana y el ambiente. En las últimas décadas, diferentes reglamentaciones ambientales han prohibido o limitado el uso de muchos de estos productos, incentivando la búsqueda de nuevos compuestos selectivos y compatibles con el ambiente y de baja toxicidad hacia el hombre. El Manejo Integrado de Plagas (MIP) se basa en la integración e implementación de diferentes estrategias de control de plagas (biológicas, químicas, culturales y físicas entre otras) que sean ambiental, económica y socialmente viables. En este contexto, los insecticidas de origen botánico constituyen una alternativa posible a los insecticidas convencionales de amplio espectro pudiendo ser compatibles con programas de MIP.

Como resultado de la coevolución con diferentes fitófagos, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos de defensa entre los que se encuentran la generación de metabolitos secundarios. Un ejemplo de estos compuestos lo constituyen los cinamatos de alquilo y flavonas pertenecientes a la familia química de los fenilpropanoides. Ambos tipos de compuestos presentan una amplia ocurrencia natural y, ya sean de origen natural o sintético, han mostrado tener efecto insecticida, repelente, atrayente y fagodisuasivo sobre diversos insectos plaga.

La síntesis en laboratorio de cinamatos de alquilo y flavonas suele utilizar solventes y reactivos de alta toxicidad y, en ciertos casos, implica elevadas temperaturas y tiempos de reacción. En respuesta a esto, la ciencia en el campo de la síntesis orgánica manifiesta una progresiva tendencia hacia el desarrollo de tecnologías limpias y procedimientos ambientalmente benignos o de reducido impacto ambiental. Esta tendencia se ha nucleado en una nueva forma de hacer química conocida como Química Verde basada en la prevención de la contaminación y la reducción de la aplicación de energía.

En este marco, se propuso como objetivo general del presente trabajo, realizar la preparación en condiciones de bajo impacto ambiental de compuestos pertenecientes a la familia de los fenilpropanoides, específicamente cinamatos de alquilo y flavonas, y evaluar su actividad biológica en laboratorio sobre diferentes estados y estadios de desarrollo de la polilla del tomate

Tuta absoluta (Lepidoptera: Gelechiidae), plaga de importancia económica no solo a nivel regional sino también mundial.

Para la preparación de los distintos cinamatos de alquilo y flavonas, se utilizó catálisis tanto en fase homogénea como heterogénea, siendo empleados para tal fin, heteropoliácidos con estructura de Preyssler e hidrogenosulfato de potasio.

El trabajo de Tesis se desarrolla en diferentes capítulos:

- **Introducción:** Se encuentra dividida en dos secciones:
 - *Manejo integrado de plagas y modelo de estudio*, desarrolla el marco teórico a través del cual es posible pensar a los productos naturales y a aquellos relacionados con éstos, como alternativas a los insecticidas convencionales para el control de plagas agrícolas en el contexto de un manejo integrado de plagas. Además, se describe el organismo modelo de estudio, *Tuta absoluta* y el manejo actual de la misma en nuestro país.
 - *Compuestos fenilpropanoides: cinamatos de alquilo y flavonas*, refiere al estado del arte en cuanto a la bioactividad de estos compuestos, y las principales reacciones utilizadas para la preparación de los mismos.
- **Objetivos e Hipótesis** que guiaron este trabajo.
- **Materiales y métodos:** Este capítulo se encuentra dividido en dos secciones:
 - *Cría de Tuta absoluta y metodología general para la realización de bioensayos*, donde se desarrolla la metodología empleada para la cría masiva de este organismo en condiciones de laboratorio, los métodos generales utilizados para evaluar la bioactividad de los diferentes cinamatos de alquilo y flavonas y el análisis estadístico a través del cual se analizaron los resultados.
 - *Preparación de cinamatos de alquilo y flavonas*: en la cual se brinda una descripción detallada de la metodología utilizada para preparar, tanto los

catalizadores como los compuestos fenilpropanoides a evaluar en cuanto a su bioactividad.

- **Preparación de cinamatos de alquilo y flavonas. Resultados:** Se desarrollan los resultados obtenidos de la optimización de las reacciones de preparación de dichos compuestos.
- **Evaluación de la actividad biológica de cinamatos de alquilo sobre *Tuta absoluta*:** En este capítulo se desarrolla la metodología específica empleada para realizar la evaluación de la bioactividad de los cinamatos de metilo y de etilo, en solución a diferentes concentraciones, sobre huevos y larvas de segundo y cuarto estadio de la plaga. Se describen y discuten los resultados de los bioensayos realizados.
- **Evaluación de la actividad biológica de flavonas sobre *Tuta absoluta*,** al igual que para cinamatos, en este capítulo se desarrolla la metodología específica empleada para evaluar la bioactividad de flavona y 6-metoxiflavona en solución a diferentes concentraciones, sobre huevos y larvas de segundo y cuarto estadio de la plaga. Se describen y discuten los resultados obtenidos.
- **Conclusiones.**

Las principales conclusiones a las que se arriba producto del presente trabajo de investigación son:

- Los catalizadores heteropoliácidos con estructura de Preyssler resultan aplicables a la preparación de flavonas y cinamatos de alquilo de cadena corta, habiéndose obtenido buenos rendimientos para las flavonas y el cinamato de propilo. A su vez, el hidrogenosulfato de potasio resultó ser un buen catalizador permitiendo obtener altos rendimientos de las flavonas preparadas siendo reutilizado en cuatro reacciones sucesivas sin disminuir prácticamente su actividad.
- Las flavonas presentan una variada e importante bioactividad sobre los diferentes estados y estadios de *Tuta absoluta* evaluados, ya que tuvieron efecto insecticida a nivel de huevos y de larvas de segundo y cuarto estadios, efectos fagodisuasivos y modificaciones en los tiempos de desarrollo de larvas de segundo estadio.

- En cambio, de los cinamatos evaluados, solo el cinamato de etilo presentó diferentes modos de acción reflejados en un efecto ovicida, fagodisuasivo y en la extensión del tiempo de desarrollo larval, mientras que el cinamato de metilo solo presentó efecto ovicida.

Dada la variada gama de bioactividades que presentan los compuestos evaluados, se considera necesario ampliar el perfil toxicológico de los mismos e incorporar otros, fundamentalmente en lo concerniente a las flavonas, así como estudios adicionales de su dinámica ambiental y comportamiento en condiciones de semicampo.

Capítulo 1

Introducción

***Manejo integrado de plagas y
modelo de estudio***

Definición de plaga agrícola

Se considera plaga agrícola a cualquier organismo cuya densidad poblacional supere determinado límite por encima del cual las pérdidas económicas ocasionadas al productor (ya sea por la reducción en el rendimiento y/o calidad del producto) justifiquen el costo de adoptar medidas para su control. Este límite artificial se conoce como Nivel de Daño Económico (NDE) y es definido como el mínimo número de organismos que causarían un daño económico (Pedigo, 1989). El NDE es específico para cada cultivo y para cada plaga y varía con las condiciones del mercado, localización geográfica del cultivo, prácticas agronómicas de manejo, condiciones climáticas y preferencias del consumidor, entre otras (Greco *et al.*, 2002; Horn, 1988).

A su vez, es de relevancia el concepto de Umbral Económico (UE) o Umbral de Acción (UA) el cual se define como la densidad poblacional de determinado organismo a la cual se debe implementar una acción de control a fin de evitar que se produzca un daño económico (Horn, 1988). El UE se determina en función del NDE y es menor que éste. Sin embargo, de acuerdo a la medida de control que vaya a aplicarse, el UE puede ser muy próximo al NDE (por ejemplo, si el control va a ser realizado mediante un insecticida de rápida acción). En cambio, si se utilizan medidas de control que implican cierto tiempo de acción (por ejemplo, el uso de insecticidas microbianos o la liberación de enemigos naturales) el UE va a ser mucho menor que el NDE.

En base a lo expuesto, la categoría plaga se configura como tal en un sentido económico, no existiendo la misma en sentido ecológico. Las plagas surgen en respuesta a fuertes modificaciones ambientales que generan un desequilibrio en la densidad poblacional de determinada especie. Ejemplos de ecosistemas modificados que propician la aparición de plagas son los ecosistemas urbanos y los agroecosistemas entendidos éstos como sistemas ecológicos en los cuales la intervención antrópica tiene como fin producir bienes y servicios de importancia económica (Sarandón, 2014).

Manejo Integrado de Plagas

El concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP) fue definido por primera vez en 1965 como ampliación del concepto de control integrado utilizado hasta ese momento. Inicialmente, el control integrado fue pensado como la conjunción de dos formas de controlar plagas: por un lado el uso de plaguicidas de síntesis (control químico) y por el otro la conservación de enemigos naturales (control biológico). En estos 50 años surgieron nuevas problemáticas en torno al manejo

de plagas y nuevas formas de intentar resolverlas, tanto el concepto como la definición de MIP fueron transformándose, sumando actores y nuevas estrategias de manejo. Para el año 2002 ya existían más de 65 definiciones de MIP (Bajwa y Kogan, 2002). Dentro de esta amplia diversidad, tomo como base para el presente trabajo la propuesta por Kogan y Bajwa (2000) quienes lo definen como “Un sistema de apoyo para la toma de decisiones en la selección y uso de los controles culturales, biológicos, químicos y otras tácticas de control de plagas, que sean compatibles con el ambiente, económicamente viables y socialmente aceptadas, para mantener poblaciones de plagas a niveles tolerables” (Shenk y Kogan, 2003).

Por lo tanto, el MIP aborda la problemática de las plagas de manera holística considerando a las mismas como parte de una red trófica dentro de un agroecosistema y no como sistemas aislados. Se propone no eliminar los organismos plaga sino mantener su densidad poblacional a niveles tolerables por debajo del NDE. Para su implementación, requiere de un exhaustivo conocimiento de la biología y ecología de la plaga en cuestión, sus enemigos naturales y otros componentes biológicos del agroecosistema así como también de los actores y procesos implicados en la cadena de producción y consumo.

Entre las técnicas de control empleadas en el MIP se encuentran (Greco *et al*, 2002):

Control Biológico, se basa en las relaciones tróficas existentes en un ecosistema. Implica la utilización de enemigos naturales para mantener la densidad poblacional de una plaga por debajo de su NDE o sin variaciones importantes de su densidad poblacional. Los enemigos naturales incluyen a depredadores, parasitoides o patógenos (hongos, protozoos, nematodos, bacterias y virus).

Técnicas Culturales, entendido como la implementación de prácticas de manejo que modifican los agroecosistemas de modo que sean menos favorables al desarrollo de plagas. Entre estas prácticas se encuentran: la preparación del suelo, la asociación de cultivos, establecimiento de cultivos barrera y cultivos trampa, fecha de siembra y cosecha, rotación de cultivos, entre otras.

Uso de variedades resistentes: clásicamente, esta técnica consiste en el uso de variedades de cultivo obtenidas mediante cruzamientos y métodos de selección artificial.

Control químico basado en la utilización de compuestos de origen inorgánico u orgánico, de fuente sintética o natural para el control de plagas. Debido a que el presente trabajo de tesis se enmarca dentro del control químico, este ítem se desarrollará en detalle a continuación.

Otras técnicas: Actualmente están muy difundidas diferentes técnicas de control de plagas como la liberación de machos estériles y el uso de feromonas (control etológico).

Control químico de plagas

Breve reseña histórica sobre su empleo

La utilización de compuestos químicos para controlar plagas constituye una práctica milenaria. Los primeros insecticidas utilizados para combatir plagas se remontan al año 2500 a.C, siendo compuestos de origen inorgánico (azufrados y derivados del arsénico) y preparaciones formuladas a partir de plantas. El uso de insecticidas de origen natural en los dos milenios subsiguientes en la antigua China, Egipto, Grecia, Irán e India se encuentra bien documentado (Albert, 1997; Pedigo, 1989; Rodríguez *et al.*, 2003). Así, se conoce el uso de extractos y polvos de la raíz de *Derris* spp. (Leguminosae), de polvo de la flor del piretro, *Tanacetum cinerariaefolium* (Asteraceae) y de cenizas de madera. Posteriormente, a partir del siglo XVII, se difunde el uso de nicotina obtenida de hojas de tabaco, *Nicotiana tabacum* (Solanaceae); de rotenona obtenida de las raíces del timbó, *Lonchocarpus nicou* (Fabaceae), y de la sabadilla, *Schoenocaulon officinale* (Melanthiaceae), entre muchas otras plantas utilizadas para combatir plagas de cultivos o de productos almacenados (Rodríguez *et al.*, 2003; Vieira *et al.*, 2007). Si bien nunca han dejado de emplearse, en parte por constituir una alternativa económica y tradicional, fueron desplazados fuertemente en muchos países por los plaguicidas sintéticos a partir de la década de 1940.

La era de los plaguicidas orgánicos de síntesis comenzó en 1939 con el descubrimiento de la actividad insecticida del DDT (diclorodifeniltricloroetano) por Paul Müller. Su uso exitoso durante la Segunda Guerra Mundial para combatir mosquitos, moscas y ectoparásitos que afectaban las tropas lo convirtieron en el mejor exponente para el control de plagas agrícolas impulsando el desarrollo de nuevos productos organoclorados. Al finalizar la guerra, las grandes compañías bélicas, que habían incursionado en la síntesis de compuestos orgánicos como armas químicas, volcaron dichos productos a la industria de los plaguicidas. Ejemplos de esto lo constituyen las empresas Bayer y su producción de organofosforados, y Dow Chemical con el desarrollo del herbicida 2,4-D (Albert, 1997; Barruti, 2013). Junto con ellos se descubrirían los carbamatos (1947)

y piretroides (1948) que se introducirían en el mercado posteriormente (Albert, 1997; Baptista, 2003; Isman y Akhtar, 2007). La era de los plaguicidas de síntesis se caracterizó por abordar la problemática del control de plagas con una visión reduccionista, tomando al organismo fuera de su ambiente, sin considerar las interrelaciones que establece con él. Bajo este modelo se buscó eliminar la plaga más que proteger a los cultivos.

Los efectos adversos del uso indiscriminado de dichos plaguicidas sintéticos se hicieron visibles rápidamente: en 1946 se conocieron poblaciones de plagas resistentes al DDT en Suecia y Dinamarca así como también se encontraron residuos de este compuesto y otros organoclorados en alimentos y en la fauna silvestre biomagnificándose a través de la cadena trófica (Pedigo, 1989). En 1962, Rachel Carson publica el libro *Primavera Silenciosa* (Silent Spring) en el cual denuncia el efecto sobre el ambiente de los plaguicidas, principalmente organoclorados. Este libro causó un gran impacto en la sociedad norteamericana e impulsó una serie de medidas en ese país.

A partir de la década de 1970 muchos organoclorados fueron prohibidos y, actualmente, crece el número de plaguicidas sintéticos que se han retirado del mercado o cuyo uso ha quedado restringido. En Argentina, el listado actualizado de plaguicidas prohibidos o de uso restringido es muy amplio pudiendo consultarse en la página web del Ministerio de Salud de la Nación (MSN 2015).

Las consecuencias negativas del mal uso de estos productos en agricultura, motivó la búsqueda de nuevos compuestos insecticidas, búsqueda guiada por el ideal de selectividad y bajo impacto sobre el ambiente y la salud humana. En este contexto se enmarcan los llamados plaguicidas biorracionales entendidos como sustancias de origen natural o sintético que, aplicadas en un contexto ecológico específico, afectan selectivamente al organismo blanco por actuar sobre procesos fisiológicos del mismo. Además de hacer uso de esta divergencia evolutiva en los sistemas fisiológicos de organismos blanco y no blanco, los plaguicidas biorracionales deben tener, a su vez, bajos o nulos efectos adversos sobre el ambiente (Horowitz *et al.*, 2009). Si bien existe un extenso debate acerca de cuáles insecticidas son considerados biorracionales, se encuentra cierto acuerdo en la bibliografía en considerar, dentro de este grupo, a los insecticidas microbianos (por ejemplo la toxina producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y los Baculovirus), los reguladores del crecimiento de insectos (denominados IGR por sus siglas en inglés) que afectan la metamorfosis y la ecdisis (juvenoides tales como el piriproxifén, las diacil-hidrazinas y las benzoilfenilureas); y los

insecticidas botánicos, los cuales se discuten a continuación (Fogel, 2012; Francesena, 2015; Horowitz *et al.*, 2009; Ntalli & Menkissoglu-Spiroudi, 2011; Rosell *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2008).

Productos de origen botánico y análogos estructurales para el control de plagas

En el contexto mencionado es que, en las últimas décadas, ha resurgido el interés en la búsqueda de compuestos presentes en las plantas para el control de plagas. De este modo, se abrió un amplio abanico de productos de origen botánico y de análogos estructurales de éstos que, aislados a partir de material vegetal o preparados sintéticamente, se han evaluado sobre diferentes organismos plaga en busca de bioactividad.

La mayoría de dichos compuestos pertenecen a unas pocas pero amplias familias químicas y se encuentran naturalmente en una gran variedad de familias vegetales. Hasta el presente y de modo general, la búsqueda de productos naturales activos se centró en los terpenoides (obtenidos de las familias Meliaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Celastraceae y Creoraceae), acetogeninas (extraídas de la familia Annonaceae), furanocumarinas (presentes en Rutaceae y Umbelliferae), cromenos (obtenidos de Asteraceae), rocaglamidas (encontradas en la familia Meliaceae), alcaloides (obtenidos de las familias Stemonaceae y Papaveraceae entre otras), naftoquinonas (aisladas de la familia Scrophulariaceae), lectinas (presentes en varias familias vegetales, entre ellas las solanáceas) y aceites esenciales constituidos por mezclas de terpenoides y fenilpropanoides (obtenidos de muchas familias vegetales, entre ellas las Lamiaceae y Lauraceae) (Isman, 2006; Isman & Akhtar, 2007; Ntalli & Menkissoglu-Spiroudi, 2011; Vandenborre *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2007).

La búsqueda de compuestos botánicos bioactivos sobre diversos organismos plaga se sostiene en dos principios fundamentales. El primero de ellos se encuentra relacionado a la idea, ampliamente difundida, de pensar a los compuestos de origen natural como prácticamente no tóxicos para organismos no blanco y de impacto reducido sobre la salud y el ambiente (Guerrero *et al.*, 2014; Isman, 2006). Sin embargo, dada la diversidad y complejidad de las moléculas biológicas, la bioactividad que presenten y su dinámica ambiental es también variable y compleja. La toxicidad de los productos de origen botánico así como su persistencia en el ambiente va a depender, además de la toxicidad propia de la molécula, de la dosis utilizada y de la forma de aplicación sobre el cultivo (Rodríguez *et al.*, 2003).

El segundo de los principios que justifica la búsqueda en los vegetales de productos naturales bioactivos se basa en el proceso de coevolución que opera, desde hace millones de años, sobre las plantas y diferentes organismos fitófagos. La presión de selección ejercida por estos últimos favoreció el desarrollo de diversos mecanismos de defensa por parte de las plantas, ya sean químicos o físicos; por ejemplo, la biosíntesis de sustancias –los aleloquímicos- que median la relación entre organismos de diferentes especies. Dentro de ellos, las alomonas refieren a aquellas señales químicas cuyo mensaje favorece al organismo que lo emite pero no al que lo recibe, pudiendo impactar sobre éste de diferentes maneras (Corrêa y Sant’Ana, 2007). Estos compuestos pueden tener acción insecticida dada por la naturaleza de su estructura química pero, más comúnmente, una alomona puede actuar afectando el comportamiento y/o el desarrollo normal del insecto que recibe la señal, hablando en estos casos de compuestos insectistáticos (Rodríguez *et al.*, 2003) los cuales pueden generar:

Inhibición de la alimentación (efecto fagodisuasivo): La alimentación de insectos fitófagos involucra varias etapas: orientación hacia la fuente de alimento, prueba, ingestión, digestión, asimilación y eliminación de los desechos. Los compuestos que actúan como repelentes modifican el comportamiento de alimentación al generar una respuesta negativa del insecto ante determinado estímulo con el cual no tomó contacto, afectando la localización y el reconocimiento de la planta hospedera. Relacionado al concepto de repelencia, se encuentra el de irritabilidad donde también el insecto responde al estímulo de manera negativa pero habiendo tomado contacto con él (Guedes *et al.*, 2009).

Anormalidades en el crecimiento y desarrollo - Malformaciones: Los compuestos pueden actuar modificando el tiempo de desarrollo larval o pupal (presentando por tanto una acción IGR), inhibiendo alguna etapa del proceso de muda y/o generando individuos deformes.

Efectos sobre la reproducción: Los compuestos también pueden actuar afectando la cópula, el número de huevos puestos (fecundidad) y/o su viabilidad (fertilidad). Sobre la fecundidad, pueden actuar ya sea en forma directa, afectando la normal segregación de hormonas juvenil y ecdisoide, o en forma indirecta, actuando sobre el sistema nervioso central modificando la segregación de hormonas relacionadas con la madurez reproductiva.

Los efectos mencionados pueden darse de manera aislada o bien encontrarse interrelacionados.

Si bien existen variados mecanismos de defensa presentes en los vegetales contra organismos fitófagos, el proceso de selección cultural ejercido sobre las plantas alimenticias cultivadas generó que muchas de dichas características defensivas presentes naturalmente se perdieran. La domesticación bajo cultivo de plantas hortícolas es un proceso coevolutivo entre plantas y humanos y puede evidenciarse en diferentes características (morfológicas, químicas, genéticas) de las plantas (León, 1987). Durante la domesticación de las plantas hortícolas, éstas fueron cambiando con respecto a los antecesores silvestres. Éstos cambios son denominados en su conjunto “síndrome de domesticación” (Gepts, 2004) y son variables para cada especie e incluso variedad. En general, para las plantas comestibles la selección dirigió la evolución de éstas hacia una uniformidad productiva (uniformidad en germinación, crecimiento y maduración), altos rendimientos y bajo contenido de sustancias tóxicas o irritantes, entre otras (León, 1987). Tal es el caso del cultivo de olivo, *Olea europaea* (Oleaceae) donde la selección cultural favoreció el crecimiento rápido de las plantas a expensas de niveles altos de compuestos secundarios defensivos tales como taninos y fenoles (Massei y Hartley, 2000) o el caso del cultivo de berenjena, *Solanum melongena* (Solanaceae) donde la selección realizada por los chinos a lo largo de los siglos generó variedades menos amargas y, por lo tanto, más palatables (Wang *et al.*, 2008). También se observó menor concentración de taninos en variedades de mandioca, *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) seleccionadas culturalmente con respecto a variedades silvestres (Mondolot *et al.*, 2008) y menores concentraciones de isoflavonoides y compuestos cianogénicos en variedades de porotos, *Phaseolus* spp. (Fabaceae) domesticados en relación a variedades silvestres (Lindig-Cisneros *et al.*, 1997).

Diferentes productos naturales son comercializados para el control de plagas. Entre ellos se encuentran el piretro, cuyo principio activo son ésteres de los ácidos crisantémico y pirétrico; la rotenona, un derivado de los isoflavonoides; la riania, alcaloide obtenido de *Ryania speciosa* (Salicaceae); la sabadilla, cuyo principio activo también es un alcaloide; la azadiractina, un limonoide obtenido de *Azadirachta indica* (Caesalpinaceae) y algunos aceites esenciales (Isman, 2006; Isman & Akhtar, 2007; Vieira *et al.*, 2007). Sin embargo, el uso de estos compuestos presenta limitaciones varias. En algunos casos, se trata de productos fotolábiles (tal como el piretro) o compuestos muy volátiles (como los aceites esenciales) que, dadas estas condiciones, requieren múltiples aplicaciones. En otros, como la rotenona, su mayor persistencia condujo a que se encontraran residuos en los alimentos. A su vez, el alto costo de ciertos productos, como la azadiractina, en relación a los plaguicidas convencionales, también se convierte en un limitante

para su empleo por parte de los productores. Esto condujo al desarrollo de productos estructuralmente análogos que no requieran aplicaciones seguidas y que tengan un menor costo económico. Los piretroides constituyen, en este sentido, el ejemplo más exitoso y difundido aunque, valga la aclaración, los piretroides comerciales presenten poca semejanza estructural con las piretrinas naturales.

Más allá de lo expuesto, las plantas siguen siendo consideradas una fuente valiosa e inagotable de compuestos químicos para el control de plagas agrícolas y de productos almacenados. Estos compuestos podrían constituir nuevos productos insecticidas e insectistáticos por si mismos o podrían servir de modelo para el diseño de moléculas bioactivas que presenten novedosos modos de acción contra organismos fitófagos.

Manejo sanitario de cultivos hortícolas en la República Argentina

La producción hortícola en Argentina se encuentra distribuida prácticamente a lo largo de toda su extensión. Dada la variabilidad de las características ecológicas de los diferentes ambientes, los cultivos hortícolas que se producen son también muy variados. De los 34 millones de hectáreas con cultivos agrícolas en nuestro país, aproximadamente 500.000 hectáreas (o sea, 1,47 %, incluyendo las legumbres) corresponden a cultivos hortícolas, tanto a cielo abierto como bajo cubierta. Anualmente se producen alrededor de 10 millones de toneladas de hortalizas y legumbres, destinadas en un 93% al mercado interno mientras que el porcentaje restante se exporta (Fernández Lozano, 2012).

De la superficie total de hortalizas implantadas, Buenos Aires, Córdoba y Mendoza concentran aproximadamente el 50% de la misma. Situándonos específicamente en la provincia de Buenos Aires, se encuentra el Área Hortícola Bonaerense (AHB), cinturón verde que abastece con hortalizas frescas a los diferentes núcleos urbanos con alta densidad poblacional de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Conurbano Bonaerense. Formando parte del AHB se encuentra el Cinturón Hortícola Platense (CHP). Datos recientes para esta región muestran que más de la mitad de la superficie hortícola implantada del AHB se encuentra en el CHP (4.902 hectáreas de hortalizas implantadas con respecto a las 8.383 que conforman el AHB) produciendo 138.407 toneladas de hortalizas al año (García, 2011).

El manejo sanitario de cultivos hortícolas que se realiza en Argentina está basado principalmente en un manejo convencional que implica un control químico sin realización de un diagnóstico

previo (monitoreo de plagas), con aplicaciones frecuentes de plaguicidas convencionales, generalmente de amplio espectro, de manera preventiva por calendario (Cappello y Fortunato, 2008). En cambio, el manejo integrado utiliza diferentes técnicas de control de plagas; entre ellas se encuentra el uso de plaguicidas que tengan un menor impacto ambiental, haciendo un uso más racional de los mismos en base a resultados de monitoreos y a los niveles máximos de tolerancia de plagas establecidos para ese cultivo (Strassera *et al.*, 2009). Otra forma de producción hortícola en Argentina que fue adquiriendo mayor relevancia en el país, es el sistema de producción orgánica, el cual se encuentra basado en la conservación de enemigos naturales espontáneos, el manejo ecológico del suelo, la rotación y diversificación de cultivos (Del Pino, 2002) y en la utilización de plaguicidas de base biológica: según datos del año 2013, la superficie agrícola orgánica en Argentina fue de 203.000 hectáreas representando la superficie cosechada de hortalizas y legumbres orgánicas un 3% del total (SENASA, 2014). Por último, y a menor escala, existen sistemas de producción que no utilizan ningún tipo de insumo externo.

En Argentina, los principales cultivos hortícolas en cuanto a su producción son en primer lugar, la papa (*Solanum tuberosum*) y, en segundo lugar, el tomate (*Solanum lycopersicum*), ambas especies pertenecientes a la familia Solanaceae (CNA, 2002). Para el caso específico del CHP, la producción de tomate alcanza las 100.000 toneladas por año (Argerich, 2011).

El cultivo de tomate ocupa una extensión de 17.000 hectáreas y se realiza principalmente en las regiones Noroeste, Noreste, Cuyo y Pampeana, tanto a cielo abierto como bajo invernáculo. Al igual que para otros cultivos, su forma de manejo predominante es la convencional pero existen a su vez y en menor escala, otros tipos de manejo (Savino, 2014). Las principales plagas de insectos asociadas a este cultivo son: moscas blancas (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) (Homoptera: Aleyrodidae), trips (*Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schultzei* y *Thrips tabaci*) (Thysanoptera: Thripidae), y lepidópteros como la polilla del tomate (*Tuta absoluta*) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Mitidieri y Polack, 2012). Esta última, por constituir el modelo de estudio de este trabajo, se desarrollará en detalle en el siguiente apartado.

Modelo de estudio: la polilla del tomate

La polilla del tomate, *T. absoluta*, es un microlepidóptero de origen sudamericano perteneciente a la familia Gelechiidae siendo su ubicación sistemática la siguiente (Pastrana, 2004):

Clase Insecta

Orden Lepidoptera

Suborden Glossata

Infraorden Heteroneura

Serie Ditrysia

Superfamilia Gelechioidea

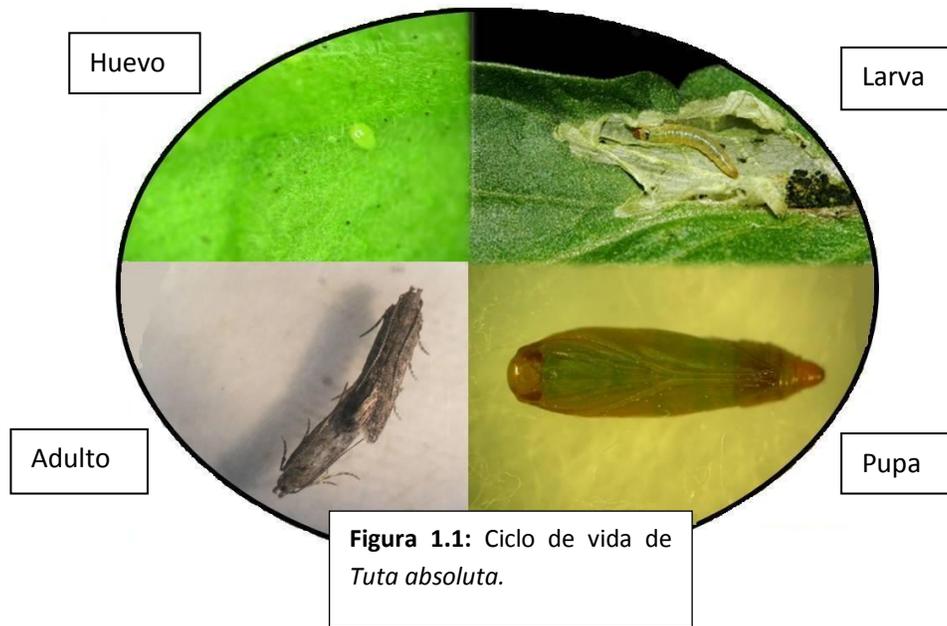
Familia Gelechiidae

Subfamilia Gelechiinae

Tuta absoluta

La especie fue descrita originariamente en 1917 por Meyrick como *Phthorimaea absoluta* en base a ejemplares colectados en la zona de Huancayo, Perú. Posteriormente fue registrada con el nombre de *Gnorimoschema absoluta* por Clarke en 1962, y como *Scrobipalpula absoluta* en 1964 y *Scrobipalpuloides absoluta* en 1987 por Povolny. Finalmente, fue descrita bajo el género *Tuta* como *Tuta absoluta* por Povolny en 1994 (Barrientos *et al.*, 1998 en Desneux *et al.*, 2010; EPPO, 2014).

Su ciclo de vida comprende diferentes estados de desarrollo: huevo – 4 estadios larvales (L₁, L₂, L₃ y L₄) – pupa – adulto (Figura 1.1). La duración de cada estado y estadio de desarrollo y, por lo tanto, del ciclo de vida, es variable dependiendo de la temperatura, humedad relativa y fotoperíodo, habiéndose observado un máximo de 76,3 días a 14 °C y un mínimo de 23,8 días a 27,1 °C (Barrientos *et al.*, 1998 en Desneux *et al.*, 2010).



Los huevos son puestos en forma aislada, rara vez se los encuentra agrupados (Figura 1.2). Sobre el tomate, la oviposición ocurre tanto en el envés como en el haz de las hojas, sobre los tallos y frutos. Los huevos son elípticos, con una longitud promedio de 0,4 mm y un ancho promedio de 0,26 mm. Presentan una superficie esculpida de pequeños hexágonos, visible bajo microscopio óptico. Su coloración es blanca amarillenta durante los primeros días de desarrollo atribuible a la presencia de lipoforinas asociadas a carotenoides en la yema. A medida que el embrión se desarrolla y las reservas se consumen, la coloración del huevo se torna más oscura pudiendo observarse bajo microscopio estereoscópico a través del corion, la larva en desarrollo (Figura 1.3).

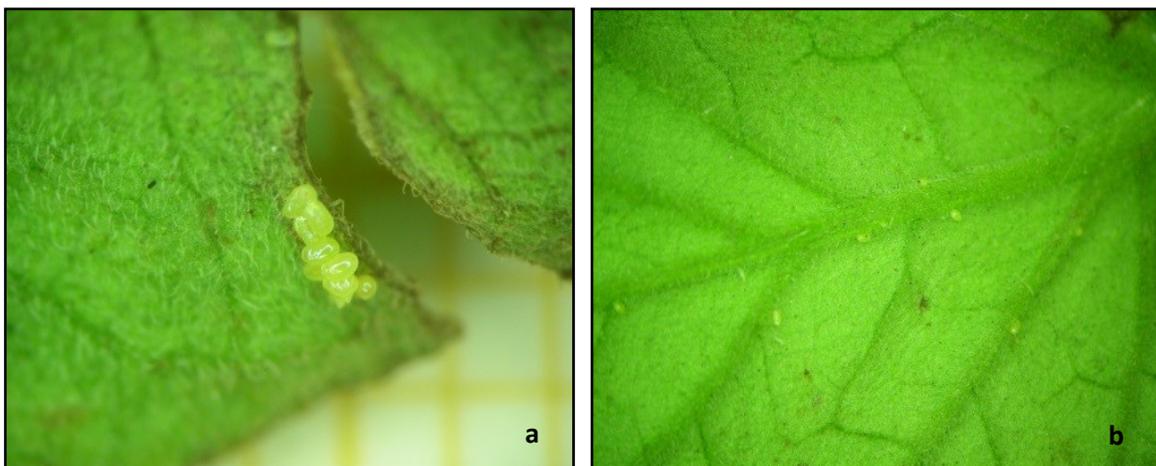


Figura 1.2: Disposición de puestas de huevos de *Tuta absoluta*. a: postura agregada; b: postura aislada.

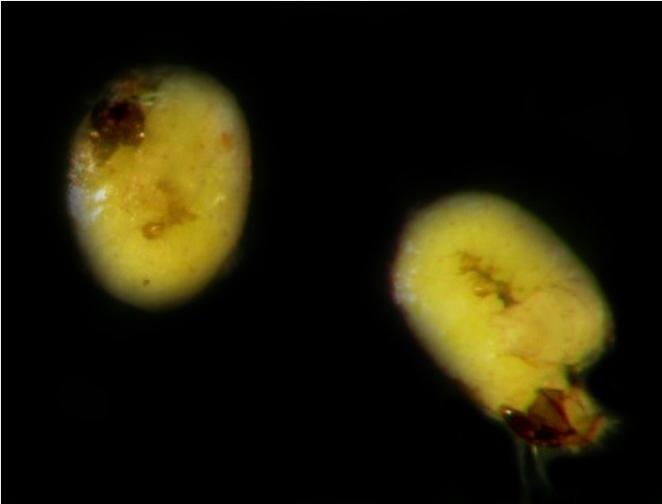


Figura 1.3: Izquierda: Embrión en estado avanzado de desarrollo. Derecha: Larva de *Tuta absoluta* emergiendo del huevo.

La larva es eruciforme, con 5 pares de pseudópodos y con una cápsula cefálica y postcefálica en el primer segmento torácico bien delimitada, ambas de color marrón oscuro. Al eclosionar, la larva es blanca y muy pequeña midiendo aproximadamente 0,85 mm de longitud. Cuando comienzan a alimentarse, las larvas se tornan color verde debido a que puede observarse a través de su pared corporal el contenido intestinal. En la fase premuda, la larva deja de alimentarse tomando un color blanquecino que perdura postmuda. El cuarto estadio larval (L_4) es el que presenta una tasa metabólica mayor siendo característico de este estado el dorso coloreado con una banda rosada. En la fase prepupal, la L_4 disminuye su movimiento y cesa su alimentación desarrollando un capullo de seda para pupar sobre la planta o en el suelo al cual llega dejándose caer por un hilo de seda.

La pupa es obtecta y tiene una longitud promedio de 4,6 mm y un ancho promedio de 1,3 mm. Recién formada presenta un color verde claro que comienza a oscurecerse a medida que prosigue el desarrollo hasta llegar a adquirir una coloración marrón oscura antes de que emerja el adulto. Las pupas presentan dimorfismo sexual dado por la ubicación de los poros genitales (Quiroz, 1976).

Los adultos de *T. absoluta* tienen una longitud de entre 5 a 7 mm, presentan antenas filiformes y escamas plateadas grisáceas siendo características sus alas anteriores con manchas negras. Al igual que las pupas, presentan dimorfismo sexual evidenciado en la diferencia de tamaño corporal: las hembras son de mayor longitud, más anchas y voluminosas con respecto a los machos. Los adultos generalmente presentan su mayor actividad durante las primeras horas de la mañana y el

crepúsculo permaneciendo ocultos durante el día. Las hembras se aparean una vez al día y hasta 6 veces durante su ciclo de vida, durando la cópula entre 4 a 5 horas (Desneux *et al.*, 2010). La máxima capacidad reproductiva se expresa dentro de los primeros 5 días (Pereyra y Sánchez, 2006). Los adultos se alimentan del néctar de las flores aunque no es necesaria la alimentación para que ocurra la cópula y oviposición.

T. absoluta fue considerada, hasta hace algunos años, como una plaga oligófaga por alimentarse únicamente de solanáceas ya sean cultivadas o no. Entre las solanáceas cultivadas se la ha citado en papa, berenjena, pepino dulce (*S. muricatum* Aiton) y tabaco. Entre las solanáceas silvestres se la encontró en el tomatillo (*S. nigrum* L.), *S. eleagnifolium* L., *S. bonariense* L., tutiá (*S. sisymbriifolium* Lam.), chamico (*Datura ferox* L.), *D. stramonium* L. y palán-palán (*Nicotiana glauca* Graham), entre otras (Desneux *et al.*, 2010; Pastrana, 2004; Tropea Garzia *et al.*, 2012). Recientemente, en la zona de Almería y Galicia (España) y en Sicilia (Italia), fue encontrada y descrita sobre cultivos de porotos, *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) (Pérez-Otero, 2012).

Si bien afecta a solanáceas en general, su principal hospedador es el tomate. Sobre este cultivo, las larvas se alimentan del mesófilo de las hojas, tallos y meristemas apicales. También puede atacar los frutos, preferentemente inmaduros, generando galerías que pueden facilitar el ingreso de patógenos secundarios que terminan pudriendo los frutos. El daño característico de *T. absoluta* se observa en las hojas donde, al alimentarse del mesófilo, forma minas lagunares que reducen la capacidad fotosintética de la planta afectando su crecimiento. En los tallos excava galerías que pueden necrosarse, mientras que el ataque sobre los brotes afecta directamente el desarrollo de la planta.

T. absoluta se encuentra ampliamente distribuida en Sudamérica excepto a altas latitudes donde las bajas temperaturas se constituyen en un factor limitante de su distribución. En general, no se la encuentra por encima de los 1000 metros sobre el nivel del mar aunque fue citada en Colombia y Perú a 2600 y 3500 metros de altitud, respectivamente (Desneux *et al.*, 2010). A Argentina ingresa desde Chile en 1964 (EPPO, 2014). Desde el 2004, forma parte de la lista de plagas recomendadas para ser reguladas como plaga cuarentenaria.

En el año 2006, ingresa a la región este de España en frutos comercializados provenientes de Sudamérica. Desde allí, se expande rápidamente por Europa alcanzando el norte de África en el

año 2008 y el este de Asia en el 2009. Desde las fechas de sus primeros registros, *T. absoluta* sigue expandiéndose por estos continentes (Figura 1.4).

En Centroamérica fue registrada recientemente en Panamá (2011) y Costa Rica (2014) presentando en ambos países una distribución restringida.

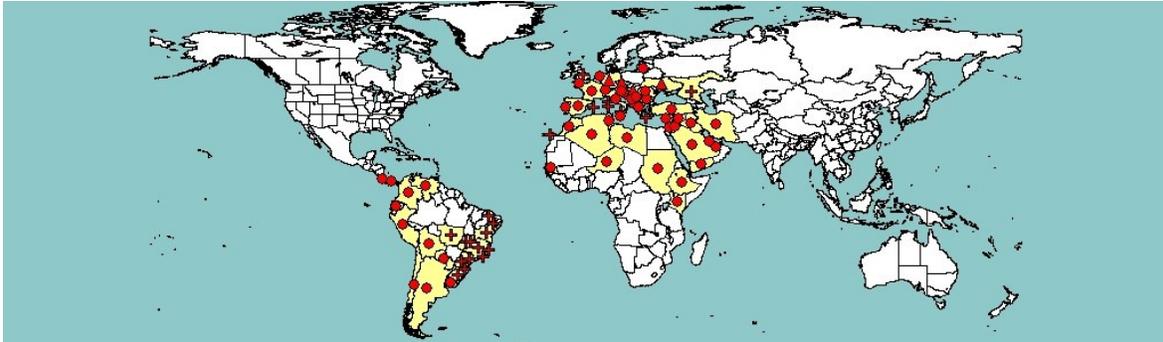


Figura 1.4: Distribución de *Tuta absoluta*. Fuente: EPPO, 2014.

Estrategias empleadas para el control de *Tuta absoluta* en Argentina:

El manejo sanitario de plagas asociadas al cultivo de tomate en nuestro país se realiza mayoritariamente a través del control químico, principalmente mediante el uso de plaguicidas convencionales (Cappello y Fortunato, 2008; Savino, 2014). La guía de productos fitosanitarios para la República Argentina Edición 2013-2015 editada por la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) cita una amplia gama de estos compuestos para el control de *T. absoluta*. Químicamente se los puede clasificar en diferentes grupos: piretroides, organofosforados, avermectinas, tiocarbamatos, diamidas antranílicas, benzoilureas, semicarbazonas, diacilhidracinas, benzofenilureas, spinosinas y neonicotinoides. Estos compuestos se aplican a los cultivos solos o combinados y presentan diferente modo de acción, persistencia y toxicidad sobre organismos acuáticos y aves. La mayoría de ellos se caracterizan por tener un modo de acción de amplio espectro afectando tanto al organismo plaga como a sus enemigos naturales. Así, se observó que algunos insecticidas utilizados para su control tales como triflumurón, clorfenapir y abamectina afectaron también al parasitoide *Trichogrammatoidea bactrae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Riquelme Virgala *et al.*, 2006). Efectos adversos sobre la fauna benéfica (ya sean enemigos naturales y/o polinizadores) también se observaron en otros países sudamericanos

y en Europa: Consoli *et al.* (1998) observaron efectos adversos de organofosforados, carbamatos, piretroides, abamectinas, diacilhidrazinas y benzoilfenilureas sobre el parasitoide *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), y Arnó y Gabarro (2011) demostraron que la azadiractina, spinosad e indoxacarb tuvieron efectos letales y subletales sobre los depredadores *Macrolophus pygmaeus* y *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). A su vez, estudios realizados por Mayes *et al.* (2003) demostraron efectos tóxicos del spinosad sobre polinizadores, mientras que Tomé *et al.* (2012) observaron efectos letales y subletales del neonicotinoide imidacloprid sobre larvas de abejas meliponas. Además, se han registrado numerosos casos de poblaciones de *T. absoluta* resistentes a plaguicidas habitualmente utilizados para su control tanto en Argentina como en otros países sudamericanos. Tal es el caso de poblaciones resistentes al spinosad, organofosforados y piretroides en Chile (Salazar y Araya, 1997; Reyes *et al.*, 2012) a los piretroides, abamectina, organofosforados y tiocarbamatos en Brasil (Siqueira *et al.*, 2000, 2001; Silva *et al.*, 2015) y a piretroides y abamectina en Argentina (Lietti *et al.*, 2005).

Actualmente, en Argentina se están comenzando a evaluar y, en algunos casos implementar, otros métodos para el control de *T. absoluta*. En este sentido, el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) generó en el 2005 un documento para la producción de tomate bajo cubierta que plantea un monitoreo de las plagas existentes, fijación de niveles máximos tolerables de plagas y uso de plaguicidas de bajo impacto ambiental junto con otras formas de manejo consideradas dentro del MIP (Mitidieri y Polack, 2005). Además, comenzaron a ser probadas experimentalmente variedades de tomate resistentes, técnicas de insectos estériles por radiación con rayos X y trampeos masivos a través del uso de feromonas (Cagnotti *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2011; Lobos, 2011).

En cambio, la evaluación de productos de origen botánico y análogos estructurales contra *T. absoluta* en Sudamérica constituye una línea de investigación creciente pero de escasa aplicabilidad. En dicha región, los estudios referentes a esta temática comenzaron a desarrollarse en Brasil en la década de 1990 y desde esa fecha se han ampliado las investigaciones en ese país (Brunherotto *et al.*, 2010; Brunherotto y Vendramim, 2001; Da Cunha *et al.*, 2005, 2006; Gonçalves-Gervásio y Vendramim 2006; Moreira *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2012; Trindade *et al.*, 2000). A diferencia de Brasil, en Argentina y Uruguay el desarrollo de esta línea de investigación es incipiente encontrándose escasos trabajos al respecto (Coll Aráoz *et al.*, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2013; Umpiérrez *et al.*, 2012).

***Compuestos fenilpropanoides:
Cinamatos de alquilo
y Flavonas***

Compuestos fenilpropanoides

Los **fenilpropanoides** son moléculas naturales con esqueletos de tipo C_6-C_3 , que provienen de la ruta biosintética del ácido shikímico. En las plantas, el primer paso para su formación es la desaminación de la fenilalanina para generar el ácido trans-cinámico; una reacción similar sobre la tirosina, genera el ácido p-cumárico. La mayoría de las plantas pueden desaminar fenilalanina mediante la fenilalanina amoniaco liasa (PAL). La desaminación de la tirosina es menos general, ocurre en especies de la familia Poaceae. Los organismos que no pueden desaminar tirosina, obtienen el ácido p-cumárico por hidroxilación del ácido cinámico.

La **ruta del ácido shikímico** (Figura 1.5) es un conjunto de reacciones metabólicas de gran significación en la biosíntesis de metabolitos secundarios. El nombre del ácido deriva de la flor del shikimi japonés, *Illicium anisatum* (Illiciaceae), planta de la que se extrajo por primera vez.

El ácido shikímico es precursor de varios intermediarios metabólicos de compuestos aromáticos, tales como el ácido p-aminobenzoico, los aminoácidos aromáticos tirosina, fenilalanina y triptofano, las aminas biógenas aromáticas, y las catecolaminas. Además, es precursor de metabolitos secundarios aromáticos como los fenilpropanoides, los taninos, los flavonoides, los lignanos y ligninas, así como también de diferentes alcaloides tales como los tetrahydroisoquinolínicos y los indólicos, incluyendo los del cornezuelo (*Claviceps purpurea*), de otros derivados del indol, y de los morfinanos, entre otros. En los compuestos aromáticos derivados del ácido shikímico, las sustituciones oxigenadas se encuentran típicamente en posiciones 1,2 (tipo catecol) o 1,2,3 (tipo pirogalol), y las monosustituciones en general dan origen a p-hidroxicompuestos (Tzin y Galili, 2010).

Cinamatos de alquilo

Los cinamatos de alquilo son ésteres formados entre el ácido cinámico (ácido 3-fenilpropenoico) u otros ácidos relacionados, y alcoholes alquílicos de cadena variable (Figura 1.6). Entre los ácidos derivados del ácido cinámico se encuentran el ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico), el ácido cumárico (ácido 4-hidroxicinámico), el ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) y el ácido sinápico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico).

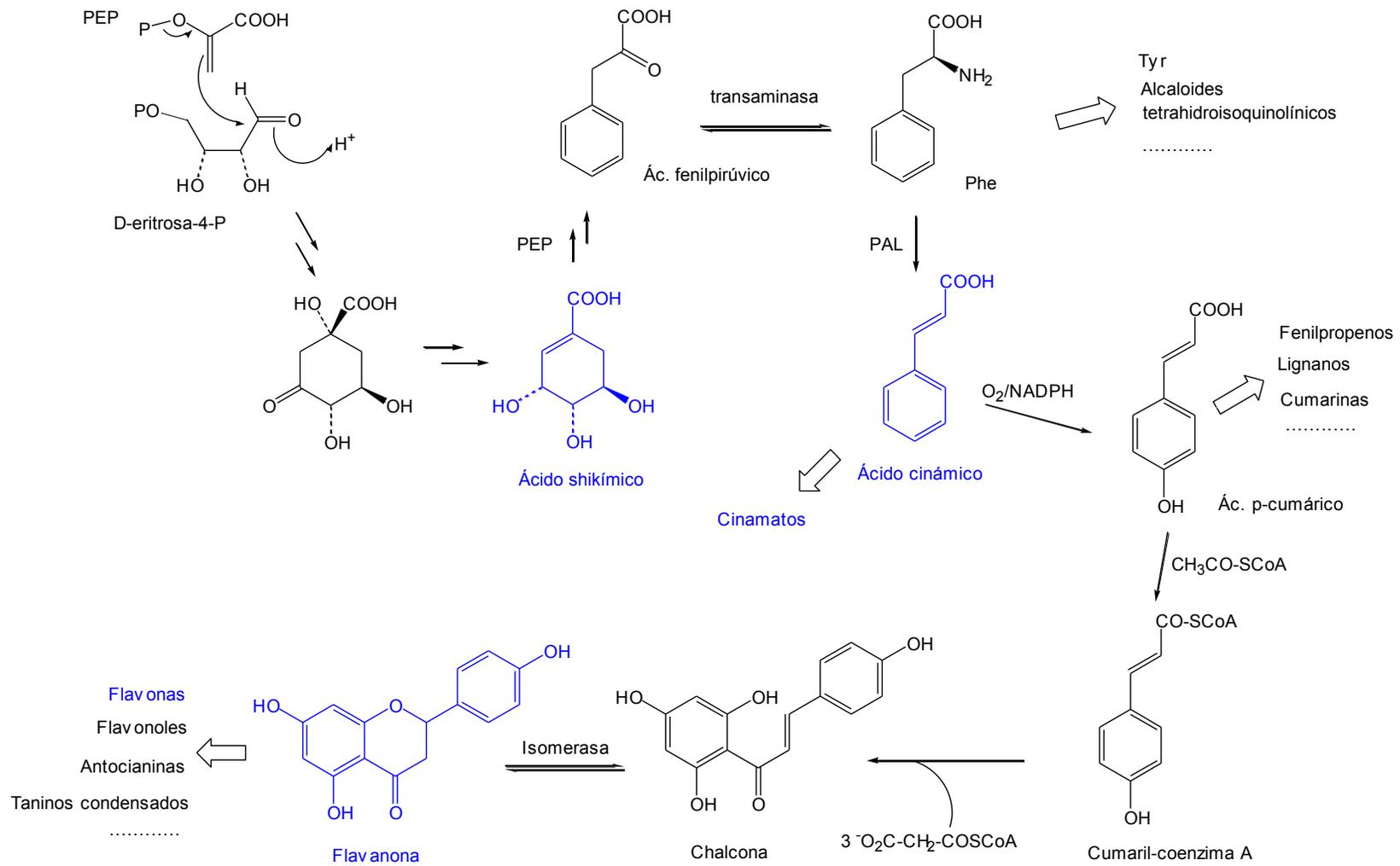


Figura 1.5: Ruta del ácido shikímico para fenilpropanoides.

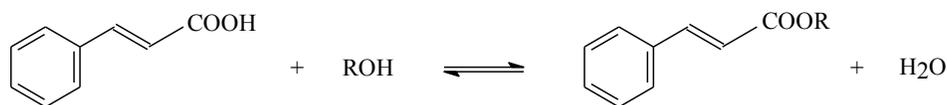


Figura 1.6: Esterificación del ácido cinámico con un alcohol alquílico de cadena variable (R).

Los cinamatos de alquilo se encuentran naturalmente en diversas especies vegetales presentando en ellas propiedades antioxidantes y aromatizantes (Dubey *et al.*, 2000).

Tienen un amplio uso en la industria cosmética –ya que son apantalladores de la luz UV-B, en un rango de longitud de onda de entre 280 y 320 nm– como componentes de lociones y perfumes, cremas faciales y corporales, jabones y shampoos (Bhatia *et al.*, 2007, a, b). También son utilizados como aditivos para detergentes y otros productos de limpieza para el hogar.

Bioactividad de cinamatos de alquilo sobre plagas agrícolas, forestales y de productos almacenados

Varios cinamatos de alquilo han sido evaluados como insecticidas, atrayentes, repelentes o fagodisuasivos para diversos organismos considerados plaga. Entre ellos, los cinamatos de metilo y etilo cuentan con la mayor cantidad de referencias.

La bioactividad de ambos cinamatos fue comunicada hace varias décadas: Roark en sus trabajos de 1935 y 1939 y Alvord y Dietz en 1933 informaron que estos compuestos presentan actividad atrayente para la polilla oriental de la fruta (*Grapholita molesta*) (Lepidoptera: Tortricidae).

El cinamato de metilo (Figura 1.7) es un sólido de color blanco con un olor fuerte y aromático. En la naturaleza, se encuentra en diversas especies tanto vegetales como de hongos. Entre ellas, fue aislado del rizoma de *Kaempferia galanga* (Feng, 2009) y del de *Alpinia galanga* (Zingiberaceae) (Dr Duke, 2015), de la frutilla *Fragaria sp.* (Rosaceae) (Viña y Murillo, 2003), del aceite esencial de *Artemisia judaica* (Asteraceae) (El-Massry *et al.*, 2002), de *Ocimum basilicum* (Lamiaceae) (Dr Duke 2015; Viña y Murillo, 2003), del fruto de *Cuminum cyminum* (Apiaceae), de las flores de *Carthamus tinctorius* (Asteraceae) (Dr Duke, 2015), de *Cinnamomum pubescens* y *C. impressicostatum* (Lauraceae) (Ali *et al.*, 2010) y del hongo *Tricholoma matsutake* (Sawahata *et*

al., 2008). Las concentraciones más altas conocidas de cinamato de metilo (98% en peso del aceite esencial, con un rendimiento en peso fresco 2-6% en las hojas y ramitas) se encontraron en *Eucalyptus olida* (Myrtaceae) (Boland *et al.*, 1991).

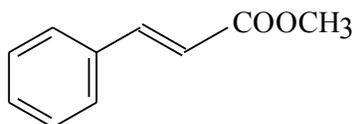


Figura 1.7: Cinamato de metilo

Por su parte el cinamato de etilo (Figura 1.8) también se encuentra presente en diversas especies vegetales. Se lo ha aislado del rizoma de *Kaempferia galanga* (Zingiberaceae) (Feng, 2009; Othman *et al.*, 2006), de la corteza de *Pinus contorta* (Pinaceae) (Bratt *et al.*, 2001), del aceite esencial de canela (*Cinnamomum verum*) (Lauraceae), de *Artemisia judaica* (Asteraceae) (Abdelgaleil *et al.*, 2008; El-Massry *et al.*, 2002) y de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) (Dubey *et al.*, 2000), de *Hedychium spicatum* (Zingiberaceae) (Lohani *et al.*, 2015), de *Origanum syriacum* (Lamiaceae), de *Umbellularia californica* (Lauraceae) y de *Micromeria fruticosa* (Lamiaceae) (Dr Duke, 2015).

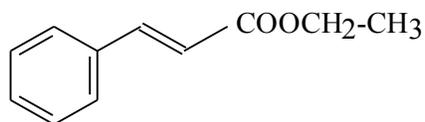


Figura 1.8: Cinamato de etilo.

Diversas investigaciones dan cuenta de la variada bioactividad del cinamato de etilo sobre diferentes organismos plaga. Se observó que tiene efecto fagodisuasivo en adultos de *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) y larvas de tercer estadio de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) sobre las cuales también presentó efecto insecticida (Abdelgaleil *et al.*, 2008; Bratt *et al.*, 2001; Sunnerheim *et al.*, 2007). A su vez, se informó actividad fungicida sobre diferentes hongos patógenos de plantas (*Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizocotonia solani* y *Botrytis fabae*) y actividad larvicida sobre el nematode *Anisakis simplex*

(Ascaridida: Anisakidae) (Abdelgaleil *et al.*, 2008; Feng, 2009). En cuanto a su actividad repelente, Sharaby *et al.* encontraron que el cinamato de etilo presenta efecto repelente contra larvas de primer estadio y adultos del lepidóptero *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) (Sharaby *et al.*, 2009).

Además de los cinamatos de metilo y etilo, otros cinamatos de alquilo han mostrado bioactividad sobre diferentes plagas. Entre ellos, con actividad insecticida en ensayos por contacto residual y actividad fumigante, los cinamatos de alilo, vinilo y el α -cianocinamato de etilo fueron activos sobre adultos del gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) (Lee *et al.*, 2008) mientras que 2,3-dimetoxicinamato de metilo, 2,4-dimetoxicinamato de metilo, 4-isopropilcinamato de metilo, cinamato de propilo y cinamato de isopropilo presentaron actividad fagodisuasiva sobre adultos del gorgojo del pino *H. abietis* con un índice antialimentario superior a 80 (Sunnerheim *et al.*, 2007). La actividad larvicida sobre *A. simplex* fue también registrada para el *p*-metoxi-*cis*-cinamato de etilo (Feng, 2009).

Otras actividades biológicas

El trans-cinamato de metilo tiene bioactividad derivada de su capacidad para inhibir ciertas enzimas; se ha demostrado que actúa provocando una fuerte inhibición de actividades monofenolasa y difenolasa de la enzima tirosinasa en hongos (Huang *et al.*, 2009). La enzima tirosinasa es la causante de la oxidación enzimática que genera que los alimentos adquieran un color pardo afectando la calidad del alimento. Dado que el cinamato de metilo es un agente microbiano, se ha propuesto que, potencialmente, podría utilizarse en la industria de los alimentos cumpliendo una doble función: por un lado evitar el desarrollo de microbios causantes de enfermedades debidas a la alimentación y por otro lado, ser usado como aditivo en los alimentos para alargar el tiempo en góndola de productos alimenticios (Huang *et al.*, 2009).

Además el *p*-metoxicinamato de etilo es un inhibidor de la monoamino oxidasa, a diferencia del ácido *p*-metoxicinámico (Noro *et al.*, 1983). Se ha informado para este compuesto actividad antiinflamatoria (Umar *et al.*, 2012).

Con respecto al cinamato de etilo, se ha demostrado su acción sedativa, vasorelajante y antinociceptiva (Feng, 2009; Othman *et al.*, 2006).

A su vez, diferentes cinamatos de alquilo han mostrado bioactividad sobre organismos patógenos, parásitos o vectores de enfermedades tanto de humanos como de animales domésticos. En este sentido, se encontró que los cinamatos de alquilo presentan:

Efecto acaricida

Los cinamatos de alilo y metilo fueron activos como acaricidas sobre los adultos de los ácaros del polvo *Dermatophagoides farinae* y *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) (Wang *et al.*, 2011). También para el cinamato de alilo, de vinilo y el α -cianocinamato de etilo se observó una importante mortalidad de adultos de *Dermanyssus gallinae* (Mesostigmata: Dermanyssidae), uno de los principales ectoparásitos de las aves de corral, luego de una exposición de 24 horas a los vapores de dichos compuestos (Na *et al.*, 2011).

Efecto antimicrobiano

El cinamato de metilo a su vez inhibió el crecimiento de diversos hongos y bacterias causantes de enfermedades en humanos tales como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* y *C. albicans* (Ali *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2009). Por su parte el cinamato de etilo también presentó actividad antifúngica sobre diferentes hongos patógenos de humanos (Dubey *et al.*, 2000).

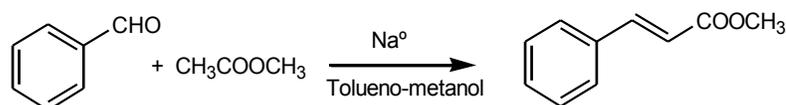
Efecto repelente e insecticida sobre dípteros

El cinamato de isopropilo presentó actividad repelente contra mosquitos de la especie *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae) (Haller, 1947). A su vez, las investigaciones realizadas por Peterson *et al.* muestran que los cinamatos con cadenas alquílicas cortas e insaturadas, tales como los cinamatos de alilo y propargilo, resultaron ser muy tóxicos cuando se aplicaron por vía tópica sobre adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (100% mortalidad a 100 μ g/mosca) mientras que el cinamato de metilo resultó menos tóxico (50% mortalidad a 100 μ g/mosca) (Peterson *et al.*, 2000). Estudios realizados por Kim *et al.* sobre el efecto insecticida de diferentes cinamatos de alquilo sobre larvas de *Culex pipiens pallens*, *Aedes aegypti* y *Ochlerotatus togoi* (Diptera: Culicidae) mostraron que el p-metoxicinamato de etilo resultó muy tóxico para las larvas de las tres especies de mosquitos, mientras que el cinamato de etilo solo tuvo actividad insecticida sobre larvas de *Culex pipiens pallens* (Kim *et al.*, 2008).

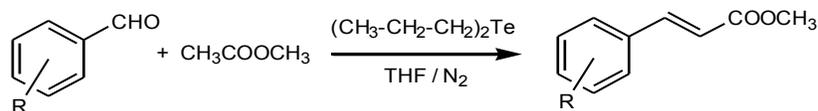
Preparación de cinamatos de alquilo

La preparación de diferentes cinamatos de alquilo relevada en la bibliografía da cuenta de diferentes procedimientos generales:

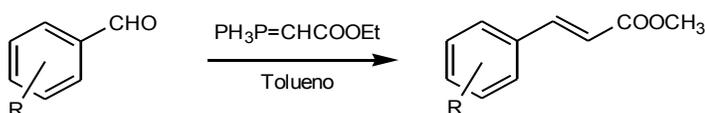
1. Condensación de Claisen-Schmidt: Mediante esta reacción se prepararon diversos cinamatos de alquilo a partir de un benzaldehído y un acetato de alquilo, en presencia de sodio metálico y un solvente (usualmente alcohol o hidrocarburo). Por ejemplo, se prepararon p-metoxicinamatos de isopropilo y de etilo obteniéndose rendimientos superiores al 70% luego de 3 a 4 horas de reacción (Yadav y Chandalia, 1999). También se utilizó esta reacción para la preparación de cinamato de metilo (Sharma, 2011).



2. Condensación de aldehídos aromáticos sustituidos, con α-haloésteres catalizada por compuestos organotelúricos. Con este método se han preparado p- nitrocinamato de metilo y m-nitrocinamato de metilo, obteniéndose rendimientos superiores al 70% (Fenjan, 2010).

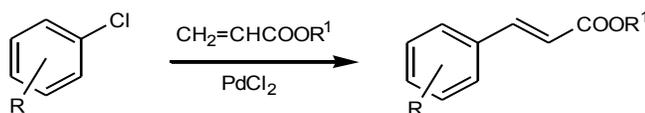


3. Reacción de Wittig: Se obtiene un alqueno a partir de compuestos carbonílicos, por el ataque nucleofílico de un iluro de fósforo sobre el carbono carbonílico.

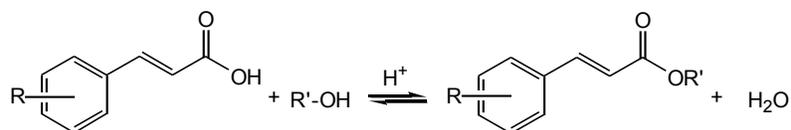


Para la preparación de diferentes cinamatos de etilo, ya sean sustituidos en el anillo o no, la reacción fue realizada en tolueno a reflujo. En este caso, en media hora el rendimiento de la reacción fue de 92 % (Zhang *et al.*, 2015).

4. Reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE): Se trata de una modificación de la reacción de Wittig en la cual se utilizan ésteres de fosfonato en vez de iluros de fósforo. Esta reacción se ha utilizado para preparar *cis*-cinamato de etilo, obteniéndose 73% de rendimiento luego de 2 horas de reacción (Zhang *et al.*, 2015).
5. Reacción de Heck: Esta reacción se llevó a cabo entre un haluro de arilo que puede estar sustituido (o un trifluorometansulfonato) y un alqueno, en presencia de una base y un catalizador de paladio, para formar un alqueno sustituido permitiendo realizar el acoplamiento selectivo C-C. Mediante esta reacción y utilizando cloruro de paladio (II) en diferentes líquidos iónicos como medios de reacción (Stefanović *et al.*, 2015), fueron preparados los cinamatos de butilo y de metilo y el *p*-metoxicinamato de metilo. El mismo catalizador también se usó en TBAB (bromuro de tetrabutilamonio, $\text{Bu}_4\text{N}^+ \text{Br}^-$), y con Na_2CO_3 como base (Zhang en Sharma, 2011). A su vez, Ambulgekar *et al.* utilizaron esta reacción para la preparación de cinamato de metilo, empleando Pd/C como catalizador, y N-metilpirrolidina como solvente (Ambulgekar *et al.* en Sharma, 2011). También se utilizaron nanopartículas de Pd soportadas sobre diatomitas como catalizador, para preparar cinamato de metilo se usó N-metilpirrolidina como solvente y trietilamina como base (Zhang *et al.* 2006 en Sharma, 2011).



6. Esterificación directa entre ácido cinámico y alcoholes: Se trata del procedimiento más clásico y utilizado para la obtención de ésteres en general, resultando el más cómodo si se puede disponer de los precursores, si bien presenta la desventaja de ser una reacción incompleta. Sin embargo, el equilibrio puede ser desplazado por ejemplo utilizando un fuerte exceso de uno de los reactivos o, además, eliminando el agua a medida que se forma, por ejemplo por destilación azeotrópica. Requiere de un catalizador ácido para ser llevado a cabo (Vogel *et al.*, 1978).



6.1. La reacción de esterificación directa entre un ácido cinámico y un alcohol fue llevada a cabo utilizando agentes activantes del grupo carboxilo, empleados estequiométricamente:

6.1.a) Cloruro de tionilo (SOCl_2), a 0°C ; obteniendo 95% de rendimiento de cinamato de etilo (Zhang *et al.*, 2015).

6.1.b) Diciclohexilcarbodiimida (DCC) o hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) (Gobec *et al.*, 2004).

6.2. También se realizó empleando catalizadores ácidos:

6.2.a) El catalizador ácido clásico, ácido sulfúrico, fue utilizado ampliamente, por ejemplo por Narasimhan *et al.* (2004), y más recientemente por Patel y Doshi (2011).

6.2.b) Otro catalizador clásico, el ácido p-toluensulfónico, fue exitosamente empleado para preparar cinamato de metilo así como los demás homólogos de la serie (Tongtao *et al.* en Wenyi *et al.*, 2013). También se publicó su uso para la preparación de p-metoxicinamato de isopropilo, en este caso el rendimiento obtenido fue de 41% en 6 horas de reacción (Yadav y Chandalia, 1999); y en la reacción de transesterificación entre p-metoxicinamato de etilo y 2-etilhexanol para obtener p-metoxicinamato de 2-etilhexilo (Yadav y Chandalia, 1999).

6.2.c) Tanto Guan *et al.* (2003) como Shibin (2003) emplearon bisulfato de sodio como catalizador. La preparación de cinamato de metilo en estas condiciones produjo en tres horas un rendimiento superior al 98%.

6.2.d) La sal doble $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ fue utilizada por Ruiming para preparar diferentes cinamatos de alquilo, obteniendo los mejores rendimientos para el cinamato de etilo luego de 7 horas de reacción (Ruiming *et al.* en Wenyi *et al.*, 2013).

6.2.e) Utilización de catalizadores ácidos de metales de transición: Para la reacción de esterificación mencionada, se relevó en la bibliografía el uso de este tipo de catalizadores.

El heteropoliácido $\text{TiSiW}_{12}\text{O}_{40}$ soportado sobre TiO_2 fue empleado por Yang *et al.* y Ruiz *et al.* (Yang *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2008) mientras que Chen utilizó $\text{SO}_4^{2-}/\text{La}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2\text{-HZSM-5}$ obteniendo buenos rendimientos en general luego de dos horas de reacción (Chen *et al.* en Wenji *et al.*, 2013).

6.3 Uso de biocatalizadores

El biocatalizador comercial Novozym 435 es una lipasa que fue utilizada para preparar cinamatos de alquilo en solución en isooctano; en 96 h de reacción se obtuvo un 35% de rendimiento (Guyot *et al.*, 1997; Jakovetic *et al.*, 2013). Fue también usado para la preparación de p-metoxicinamato de octilo y ferulato de etilo (Lee *et al.*, 2006 en Sharma, 2011).

Además se utilizó catálisis tanto por una enzima pancreática porcina (Sharma *et al.*, 2011), como una lipasa proveniente de *Bacillus licheniformis* MTCC-10498 inmovilizada en sílica (Sharma y Kanwar, 2012), y también por una lipozima ("TLIM") (Wang *et al.*, 2015).

Flavonoides

Los flavonoides son una familia de metabolitos secundarios de los vegetales, los cuales son biosintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil coenzima-A mediante la ruta biosintética de los flavonoides, la cual integra la ruta del ácido shikímico para fenilpropanoides (Figura 1.5).

La *ruta biosintética de los flavonoides* comienza cuando la fenilalanina, por acción de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se transforma en ácido cinámico, que luego es transformado en ácido p-cumárico por hidroxilación del anillo aromático; tras lo cual la acción de una Coenzima-A-ligasa lo transforma en cumarilcoenzima-A, que es el precursor de la mayoría de los fenoles de origen vegetal, entre los que se encuentran los flavonoides (Hemingway y Karchesi, 1989).

El producto de la adición de las tres moléculas de malonilcoenzima-A a la cumarilcoenzima-A es una chalcona con esqueleto de $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$, que se cicla a una flavanona mediante una enzima isomerasa.

La flavanona puede además experimentar posteriormente modificaciones del esqueleto así como adiciones de grupos funcionales. Por esto, los flavonoides son una familia de compuestos diversos, aunque todos se caracterizan por ser polifenoles que se presentan en general glicosilados, por lo cual en general son solubles en agua.

Los flavonoides son biosintetizados por todas las plantas terrestres y también por algunas algas Charophyta. La composición y concentración de flavonoides es muy variable entre especies, y aunque todas comparten la ruta biosintética central, tienen una importante variabilidad en los mecanismos de regulación de la biosíntesis; lo cual junto con la respuesta a las condiciones del ambiente, producen la variada composición química de los productos finales en cada especie. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego son traslocados hacia su destino final en las vacuolas celulares. Algunas de sus funciones metabólicas son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxa. Como ejemplo de funciones comunes, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación que produciría la luz ultravioleta del sol: acumulándose en los tejidos superficiales de las plantas absorben hasta el 90% de las radiaciones UV-B (280-320 nm) y UV-C (190-280 nm), y bloquean su efecto biocida para los tejidos internos. Además, flavonoides como los taninos condensados, que son macromoléculas constituidas por unidades de proantocianidinas, protegen a las plantas funcionando como defensa ante el herbivorismo por formación de complejos moleculares con las proteínas vegetales consumidas, haciéndolas menos digeribles; e interfiriendo además con la absorción de las proteínas, y desnaturalizando las enzimas digestivas (Hemingway y Karchesi, 1989; Van Soest, 1982).

Otra función importante que cumplen en muchas plantas es atraer los polinizadores, y las presas en el caso de las plantas carnívoras, principalmente confiriendo colores atrayentes de insectos a la planta o a sus flores, en algunos casos sólo perceptibles por los insectos por originarse en la absorción de luz UV-A (320-400 nm). De similar forma, en variadas especies atraen a los herbívoros que se alimentan de sus frutos, cumpliendo así una función de dispersión de semillas. También intervienen en el transporte de la hormona auxina.

Los flavonoides presentan variadas bioactividades, entre otras son antimicrobianos, antiproliferativos, y disminuyen el riesgo de enfermedades cardíacas.

La identificación de flavonoides es extensamente utilizada en Botánica Sistemática para establecer relaciones quimiotaxonómicas entre especies de plantas. Debido a su variabilidad, son útiles para determinar relaciones entre especies cercanamente emparentadas (o en estudios de variación entre poblaciones de la misma especie), y también son ocasionalmente útiles para determinar relaciones filogenéticas a niveles superiores (Bate-Smith, 1968; Crawford, 1978; Gornall *et al.*, 1979).

Los flavonoides pueden clasificarse en 6 clases principales (Figura 1.9): las flavonas, las flavanonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y las proantocianidinas que al oligomerizarse originan los taninos condensados (Winkel-Shirley, 2001). Todas las anteriores excepto las chalconas, tienen un anillo bencénico (anillo B) unido al C-2. Las auronas constituyen una clase adicional, siendo isómeras de las flavonas, con diferente esqueleto.

Las flavonas y los flavonoles representan aproximadamente el 80% de los flavonoides en sentido estricto. En estas moléculas, el anillo A suele estar sustituido en las posiciones 5 y 7 por grupos hidroxilo.

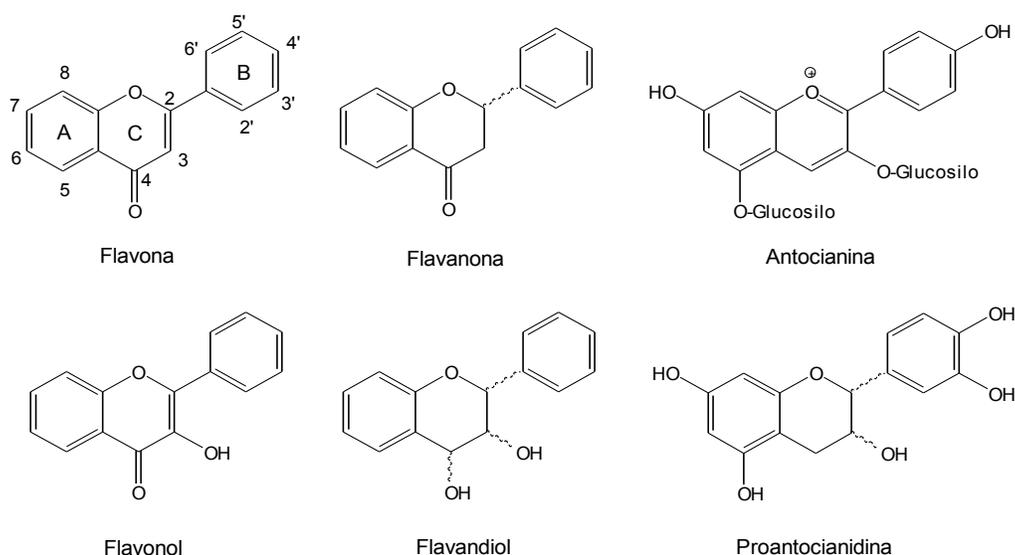


Figura 1.9: Principales flavonoides. Se muestra la denominación y numeración de los anillos sobre la flavona.

Flavonas

Las flavonas (2-fenilcromonas) pertenecen, como fue expresado, al amplio grupo de los flavonoides. Derivan biosintéticamente de las flavanonas mediante una oxidación catalizada por la enzima flavona sintasa (FS). De esta enzima, se conocen dos grupos: el I que se encuentra solo en las Apiaceae y el II el cual se encuentra ampliamente distribuido en el Reino Plantae. De hecho, las flavonas presentan una amplia ocurrencia natural habiéndose aislado de las gimnospermas, angiospermas, pteridofitas y briofitas. Las flavonas que cuentan con una mayor distribución natural se encuentran generalmente polihidroxiladas y/o glicosiladas; sin embargo, se ha encontrado flavona sin sustituir en *Daucus carota* (Apiaceae), *Apium graveolens* (Apiaceae), *Arachis hypogaea* (Fabaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), *Sculletaria baicalensis* (Lamiaceae) y *Ammi visnaga* (Apiaceae).

Las flavonas son muy diversas estructuralmente habiéndose contabilizado más de 350 flavonas (Bohm, 1998). En las plantas en las cuales se encuentran, presentan funcionalidades diversas: dado que generalmente absorben luz en la región de 250-315 nm, las flavonas protegen a las plantas terrestres de la radiación UV-B; además, actúan como antioxidantes y median interacciones entre las plantas y otros organismos. En este sentido, se sabe que las flavonas actúan como agentes antimicrobianos (ya sean virus, hongos o bacterias patógenos); que intervienen en la simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno; que incrementan la colonización de las raíces por parte de micorrizas y además participan de diverso modo en las interacciones planta-insecto donde pueden actuar atrayendo polinizadores y otros insectos así como fagodisuasivos, repelentes o estimulantes de la oviposición (Harborne y Williams, 2000; Martens y Mithöfer, 2005).

Bioactividad de flavonas sobre plagas agrícolas, forestales y de productos almacenados

Existe variedad de trabajos donde se estudia la bioactividad de flavonas sobre diversas plagas. En líneas generales, se ha visto que las flavonas actúan como:

Fagodisuasivas: Varias flavonas preparadas sintéticamente o aisladas por ejemplo de *Gnaphalium affine* (Compositae) mono o polihidroxiladas y/o metiladas han mostrado tener efecto fagodisuasivo sobre *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Morimoto *et al.*, 2000; Morimoto

et al., 2003). A partir de los resultados de estas investigaciones, los autores proponen que las flavonas que carecen de sustituyentes sobre el anillo B presentan actividad fagodisuasiva frente a dicho organismo plaga. Otras investigaciones también demuestran la actividad fagodisuasiva de otras flavonas. Así, se observó que la sideroxilina, una flavona polimetilada e hidroxilada aislada de *Eucalyptus saligna* (Myrtaceae), tuvo efecto fagodisuasivo sobre *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) y *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae) (Sarker *et al.*, 2001 en Simmonds, 2003). También, Medeiros *et al.* (1994) observaron una actividad fagodisuasiva moderada para la 6-metoxiflavona sobre *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) y Renwick *et al.* (2001) lo hicieron para la flavona isovitexina-6-O-glucósido sobre *Pieris napi oleracea* (Lepidoptera: Pieridae) donde observaron que el efecto de esta flavona sobre la alimentación de dicho insecto variaba según el estadio larval tratado.

Inhibidoras del crecimiento larval: Mahoney *et al.* (1989) observaron que tanto la flavona como la 5-metoxiflavona inhibieron el crecimiento larval del gusano de las naranjas de ombligo, *Amyelois transitella* (Lepidoptera: Pyralidae). Además, se observó inhibición del crecimiento de larvas de *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) por diversas flavonas polihidroxiladas, algunas de ellas glicosiladas (Elliger *et al.*, 1980). También se observó este efecto para las flavonas del tipo apigenina-C-glicosiladas sobre *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) (Grayer *et al.*, 1994 en Simmonds, 2001).

Insecticidas: Se encontró que la 5,6,7,8,3'-pentametoxi-4',5'-metilendioxi-6-metoxiflavona, compuesto aislado del extracto de *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) tuvo efecto insecticida sobre larvas de *Dione juno juno* (Lepidoptera: Nymphalidae) (Moreira *et al.*, 2004). Romanelli *et al.* (2010) encontraron que algunas flavonas preparadas sintéticamente, fundamentalmente aquellas halogenadas, tuvieron efecto insecticida sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Además, se citó con actividad insecticida sobre huevos y larvas de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) a la 5,7- dihidroxi- 4',6-dimetoxiflavona (Duraipandiyan *et al.*, 2015). Con respecto a otros insectos, se observó que la apigenina tuvo efecto insecticida sobre la termita *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) (Boué y Raina, 2003).

En el presente trabajo de tesis, se evaluó la bioactividad de la flavona y la 6-metoxiflavona (Figura 1.10) sobre diferentes estados y estadios de desarrollo de la polilla del tomate, *T. absoluta*. Tal como se mencionó previamente, se ha observado en diferentes investigaciones, para uno de estos compuestos o para ambos, actividad insecticida o fagodisuasiva sobre diferentes

lepidópteros (Mahoney *et al.*, 1989; Medeiros *et al.*, 1994; Morimoto *et al.*, 2003; Romanelli *et al.*, 2010).

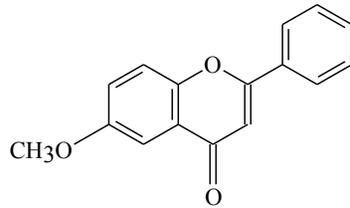


Figura 1.10: 6-Metoxiflavona

Otras actividades biológicas

Debido a la amplia distribución de las flavonas en los principales linajes de plantas terrestres, estos compuestos son parte de nuestra dieta diaria ya que se encuentran en frutas, verduras, semillas y en bebidas tales como te, vino y jugos naturales. Además, muchas plantas de uso medicinal popular tienen en su composición diversas flavonas.

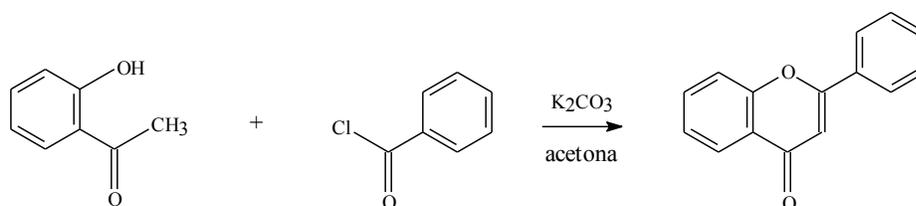
Ya sea su consumo como parte de la dieta, con un fin medicinal o ambos, las flavonas han mostrado tener actividad antioxidante ya que pueden actuar eliminando radicales libres evitando así el daño celular (Magiera y Zaręba, 2015). Además, se observó que las flavonas pueden inhibir las enzimas responsables de la producción de superóxidos, tales como la xantina oxidasa y la proteína quinasa pero también pueden ser prooxidantes, es decir, actuar oxidando compuestos (Heim *et al.*, 2002; Procházková *et al.*, 2011). También se ha propuesto que las flavonas están implicadas en la prevención de la osteoporosis y de enfermedades coronarias (Mulvihill y Huff, 2010; Shalaby *et al.*, 2011) y que presentan actividad antiproliferativa contra cáncer de mama, hígado, próstata y colorectal (Banerjee y Mandal, 2015; Radwan *et al.*, 2015; Shukla *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015). Por último, se ha demostrado la actividad antiinflamatoria (Khanapur *et al.*, 2015) y antimicrobiana de varias flavonas tanto sobre bacterias como sobre hongos además de presentar actividad antiviral (Asati *et al.*, 2015; Isobe *et al.*, 2006; Mostahar *et al.*, 2006; Said *et al.*, 2015).

Preparación de flavonas

Se han relevado en la literatura científica diversos métodos y variantes de los mismos para la síntesis de flavonas. A continuación se mencionan algunos de ellos:

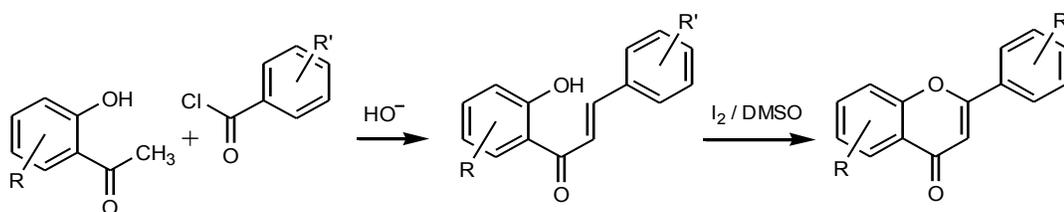
1. Síntesis de flavonas en un solo paso:

1.1. Partiendo de una 2- hidroxiacetofenona más un equivalente de cloruro de benzoilo, Chee *et al.* (2011) obtuvieron la flavona en un solo paso de síntesis. Las condiciones de reacción utilizadas fueron variables dado que como sistema base/solvente se empleó K_2CO_3 /acetona a presión atmosférica o DBU/piridina en atmósfera de N_2 . En ambos casos, los rendimientos fueron escasos, obteniéndose un 5% y un 25% de flavona respectivamente. Cuando la reacción se realizó en exceso de cloruro de benzoilo y K_2CO_3 /acetona a presión atmosférica, se obtuvo como compuesto mayoritario la flavona (65% de rendimiento).



1.2. Yatabe *et al.* (2015) describen la formación de flavonas en una reacción de un solo paso partiendo de una 2- hidroxiacetofenona y benzaldehído, mediante catálisis heterogénea por nanopartículas de oro soportadas.

2. Síntesis *vía* formación de chalconas: Esta reacción parte de una 2-hidroxiacetofenona y benzaldehído, ambos sustituidos o no, para dar una 2-hidroxichalcona por condensación alcalina. En una segunda etapa de la reacción, la chalcona se cicla para dar lugar a la flavona. Esta segunda etapa se ha realizado utilizando diversos oxidantes: dimetilsulfóxido/ I_2 (Kasthuri *et al.*, 2015; Mostahar *et al.*, 2005), dióxido de selenio, I_2 y Br_2 . Sashidhara *et al.* (2012) sintetizaron diversas flavonas mediante un procedimiento similar pero partiendo de la acetofenona y el 2-hidroxibenzaldehído y utilizando I_2 como oxidante.

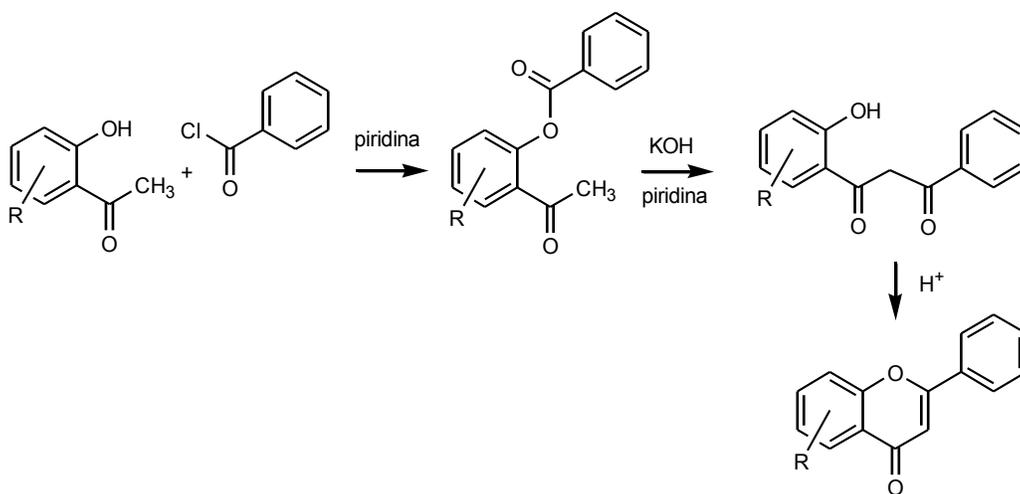


3. Síntesis de Baker-Venkataraman (Ganguly *et al.*, 2005; Wheeler, 1952): Este procedimiento es uno de los más utilizados para la síntesis de flavonas y fue el elegido para este trabajo de tesis. Se desarrolla, en general, en tres etapas:

- La primera involucra la reacción de una 2-hidroxiacetofenona con un cloruro de benzoilo en presencia de una base (piridina) para dar una aroiloxiacetofenona.
- En la segunda etapa, una base (KOH) inicialmente desprotona el grupo metilo de la aroiloxiacetofenona formando un carbanión, que ataca intramolecularmente la función éster (Reordenamiento de Baker- Venkataraman) resultando en la formación de una 1,3-dicetona (Baker, 1933; Mahal y Venkataraman, 1934) mediante un mecanismo de adición-eliminación.

Para la formación de la dicetona, se ha informado también la utilización de otros reactivos por ejemplo K_2CO_3 (Khanapur *et al.*, 2015).

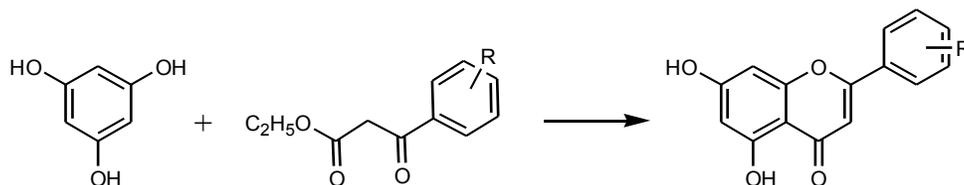
- En la última etapa, bajo condiciones ácidas, la dicetona sufre una ciclodeshidratación obteniéndose la flavona:



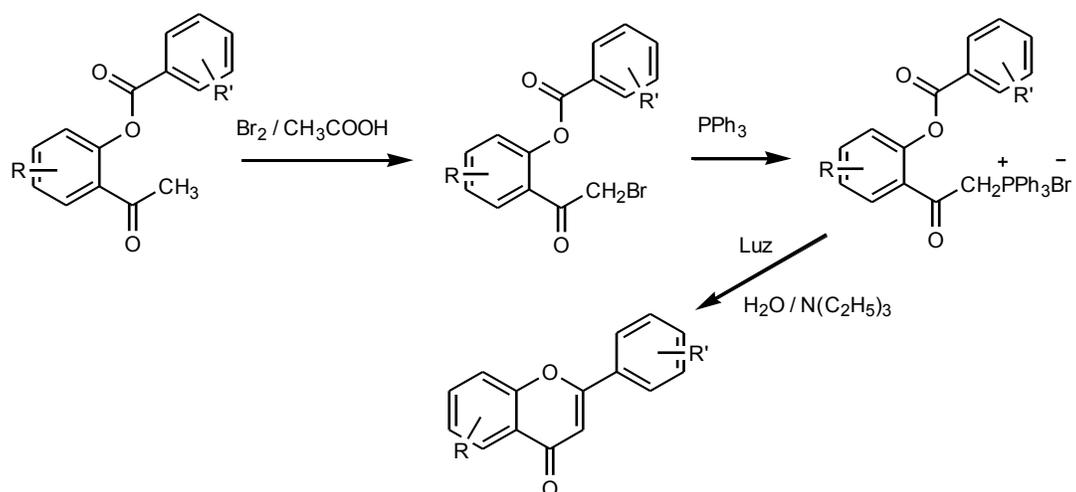
La ciclodeshidratación de la dicetona para obtener la flavona se llevó a cabo bajo diferentes condiciones. Así, se han utilizado: ácido sulfúrico como catalizador en ácido acético glacial (Mughal *et al.*, 2006), resinas de intercambio catiónico en alcohol isopropílico (Hoshino y Takeno, 1987), iodo en DMSO (Makrandi y Kumari, 1988); también se utilizaron ácidos de Lewis, por ejemplo CuCl_2 en etanol y calentamiento mediante irradiación de microondas (Kabalka y Mereddy, 2005); líquidos iónicos, por ejemplo $[\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3]^+ \text{NO}_3^-$ bajo irradiación de microondas (Sarda *et al.*, 2006); además se utilizaron heteropoliácidos, con estructuras de Keggin, de Preyssler o del tipo Wells-Dawson, tanto en condiciones homogéneas como heterogéneas, por ejemplo Gharib *et al.* (2010) y Romanelli *et al.* (2010).

Recientemente, esta etapa de la reacción se realizó en solución acuosa alcalina utilizando carbonato de potasio como base, tanto con calentamiento convencional como por irradiación de microondas obteniéndose rendimientos de alrededor del 65% (Pinto *et al.*, 2015).

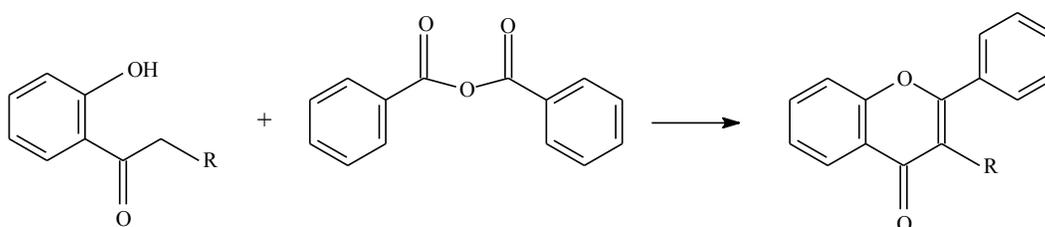
4. Reacción de Simonis: Consiste en la condensación de un polihidroxifenol con benzoilacetato de etilo, con calentamiento convencional o por irradiación con microondas (Seijas *et al.*, 2004).



6. Reacción de Wittig intramolecular: Esta reacción se ha aplicado de modo diverso a la síntesis de flavonas. Das y Ghosh (2011) la utilizaron partiendo de una 2-hidroxiacetofenona y cloruro de benzoílo en piridina, tal como se realiza la primera etapa de la síntesis de Baker-Venkataraman. El éster formado es halogenado y posteriormente reacciona con PPh_3 formando una sal de fosfonio, que por fotoirradiación en agua forma una flavona:



6. Reacción de Allan-Robinson: En esta reacción, se parte de una 2-hidroxiaril metil cetona y un anhídrido aromático para formar una flavona (Allan y Robinson, 1924). Si el anhídrido es alifático, se forma una cumarina.



La química verde como paradigma para el diseño y síntesis de productos orgánicos

Se define a la química verde como una nueva forma de pensar y de llevar a cabo diferentes procesos químicos de modo que los mismos sean más sustentables, tanto a escala de laboratorio como a escala industrial. En este sentido, se diferencia de la Química Ambiental dado que su foco está puesto en la prevención y no en la remediación.

El término química verde fue propuesto por Paul Anastas a principios de la década de 1990. Posteriormente, junto con J. Warner definirían doce principios que se convertirían en las bases

para diseñar y realizar diferentes procesos químicos de síntesis nuevos o modificar los ya existentes para que sean más benignos con el ambiente (Anastas y Warner, 1998). Estos principios son:

1. **Prevención:** Este principio refiere a evitar la formación de residuos más que tratar los ya formados.
2. **Economía atómica:** La síntesis de compuestos químicos debe ser diseñada de modo tal que en el producto final se encuentren incorporados la mayor cantidad de materiales usados durante el proceso, minimizando por tanto, la formación de subproductos.
3. **Uso de metodologías que generen productos de toxicidad reducida:** Cuando sea posible, los métodos de síntesis deben usar y generar compuestos de baja o ninguna toxicidad para el ambiente.
4. **Generación de productos eficaces de baja toxicidad:** Los compuestos químicos deberán ser diseñados de modo tal que cumplan con la función deseada presentando una toxicidad mínima.
5. **Reducción del uso de sustancias auxiliares:** En los procesos de síntesis, deben evitarse o minimizarse el uso de materiales auxiliares tales como solventes y reactivos para llevar a cabo separaciones. En caso de ser utilizados, deben ser lo más inocuos posible.
6. **Disminuir el consumo energético:** Este principio se relaciona a la reducción en el consumo de energía de modo tal de minimizar su impacto ambiental y económico. De ser posible, las reacciones de síntesis y preparación de productos orgánicos deberían desarrollarse a presión y temperatura ambiente.
7. **Utilización de materias primas renovables:** Siempre que sea técnica y económicamente viable, la materia prima debe provenir de fuentes renovables.
8. **Evitar las derivatizaciones innecesarias:** tales como el uso de grupos de protección/desprotección, el bloqueo de grupos y la modificación temporal de procesos físico-químicos.
9. **Potenciación de la catálisis:** Mediante el uso de catalizadores selectivos en vez de procesos estequiométricos. Dichos catalizadores deberán ser en lo posible reutilizables.

10. Generación de productos biodegradables: los productos químicos deberán ser diseñados de modo tal que no sean persistentes en el ambiente sino que se degraden a productos inocuos.
11. Desarrollar metodologías analíticas para el monitoreo en tiempo real: Los procesos deberán ser seguidos en tiempo real a fin de evitar la formación de sustancias peligrosas.
12. Minimizar el potencial de accidentes químicos: Los materiales utilizados en los procesos químicos deberán ser elegidos de modo de minimizar riesgos y accidentes, tales como emanaciones, explosiones e incendios.

De este modo, la química verde busca la realización de procesos químicos que utilicen eficientemente los materiales de partida y que generen productos eficaces y biodegradables con una mínima producción de residuos. En dichos procesos químicos es deseable evitar el uso de reactivos y solventes tóxicos y/o peligrosos y una reducción del consumo energético.

Para el caso de los procesos de síntesis y preparación de cinamatos de alquilo y flavonas mencionados en la primer parte del segundo apartado del presente capítulo, se observa que para muchas de estas reacciones se emplean compuestos y condiciones de reacción que no resultan sustentables. Se puede mencionar, por ejemplo, el uso de reactivos en cantidades estequiométricas, el uso de sustancias tóxicas tales como un exceso de ácido sulfúrico, tolueno o dimetilsulfóxido, altos tiempos de reacción y/o desarrollo de las mismas a altas temperaturas.

Sin embargo, también se observaba en la descripción de dichas reacciones, una tendencia cada vez mayor a transformar reacciones preexistentes de modo que sean ambientalmente más benignas. En este sentido se puede mencionar el uso de catalizadores sólidos recuperables, una reducción en el número de pasos involucrados para obtener el producto final, el uso de radiación de microondas por sobre el calentamiento convencional en baño termostático (que se traduce en tiempos de reacción mucho menores y, consecuentemente, en una disminución del consumo energético) y el desarrollo de reacciones en ausencia de solvente (solvent-free) o utilizando agua como solvente.

En el presente trabajo de tesis, se implementaron algunos de los principios de la química verde, tales como la reducción del uso de sustancias auxiliares y la potenciación de la catálisis, para la preparación de cinamatos de alquilo y flavonas. Así, para la preparación de los mencionados

cinamatos el solvente empleado en las reacciones fue el mismo alcohol que se utilizó como reactivo. Además, tanto para la preparación de cinamatos de alquilo como de flavonas, se trabajó con pequeñas cantidades de reactivos (milimoles). Por último, en la tercer etapa de preparación de las flavonas por el método de Baker-Venkataraman y en la preparación de los cinamatos de alquilo se utilizaron catalizadores heteropoliácidos con estructura de Preyssler así como, para flavonas, hidrogenosulfato de potasio en lugar de usar ácidos minerales solubles. La descripción de estos catalizadores será desarrollada a continuación.

Catálisis y Catalizadores

Los catalizadores son compuestos que tienen la capacidad de acelerar reacciones químicas, ya sea en la naturaleza o en el laboratorio, aunque no intervienen directamente en ellas. Actúan modificando la velocidad y selectividad de las reacciones y aumentando el rendimiento de las mismas, al reducir la formación de compuestos secundarios indeseables. En comparación a la cantidad de reactivos involucrados en una reacción, los catalizadores cumplen su función en pequeñas cantidades.

Existen, en las ciencias químicas, dos tipos de catálisis:

- Catálisis homogénea, en la cual el catalizador se encuentra en la misma fase que los reactivos.
- Catálisis heterogénea, donde los procesos involucrados en la reacción ocurren en una fase diferente a aquella en la que se encuentra el catalizador.

Para el presente trabajo de tesis, se utilizaron ambos tipos de catálisis. Los catalizadores empleados fueron: heteropoliácidos (HPAs) con estructura de Preyssler e hidrogenosulfato de potasio.

Si bien la catálisis en fase homogénea trae aparejada la dificultad para recuperar el catalizador, se ha observado que los HPAs involucrados en este tipo de reacciones fueron más eficientes que los ácidos minerales convencionales, mostrando una mayor actividad catalítica (Kozhevnikov, 1998). Por tanto, pueden emplearse en menores cantidades y a menores temperaturas que los catalizadores ácidos inorgánicos.

El hidrogenosulfato de potasio es usado para catalizar variadas reacciones de síntesis orgánica (por ejemplo, Heravi *et al.*, 2005; Nagarajan y Perumal, 2004; Oskooie *et al.*, 2007). Recientemente se describió su uso en la preparación de flavona (Sathicq *et al.*, 2014). La ventaja del empleo de esta sal es que puede reutilizarse; además, las reacciones se han desarrollado sin solvente y en tiempos breves.

Polioxometalatos con estructura de Preyssler-Jeannin-Pope

Los polioxometalatos (POMs) son compuestos polinucleares formados por un heteropolianión constituido por oxígeno y un metal de transición, que puede ser Mo, V o W entre otros. Los POMs se clasifican en dos grupos: isopolioxometalatos constituidos por oxígenos y un solo metal y heteropolioxometalatos, que contienen un átomo diferente, llamado heteroátomo.

En los heteropolioxometalatos, cada heteroátomo puede imaginarse centrado en un poliedro conformado por sus enlaces con átomos de oxígeno. Este poliedro comparte algún elemento geométrico, ya sea un vértice, una arista o una cara, con octaedros que se encuentran en número variable alrededor de él. Cada octaedro está constituido por un metal de transición, al que se le llama átomo apéndice, adenda o poliátomo, y átomos de oxígeno.

Los POMs con estructura de Preyssler-Jeannin-Pope fueron preparados por C. Preyssler en 1970 aunque su estructura fue dilucidada años después (Alizadeh *et al.*, 1985). Su fórmula es $[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]^{-14}$ donde cinco grupos PW_6O_{22} se fusionan en forma cíclica conformando una estructura toroidal con simetría pentagonal delimitando una cavidad central generalmente ocupada por el catión sodio (Figura 1.11). Cada uno de estos cinco grupos está conformado por un tetraedro central, resultado del enlace entre un átomo de P y cuatro átomos de oxígeno, rodeado por seis octaedros, cada uno conformado por un átomo de W enlazado a seis átomos de oxígeno (Alizadeh *et al.*, 1985). De este modo, se definen diferentes tipos de átomos de oxígeno (Fernández *et al.*, 2007):

- Oxígenos terminales: unidos a un átomo del metal de transición por un enlace doble.
- Oxígenos cavitales: unidos por enlaces simples a un átomo del metal de transición y al átomo central del tetraedro; estos oxígenos se encuentran expuestos dentro de la cavidad de la molécula.

- Oxígenos puente axiales: son los que se encuentran en la parte superior e inferior del toroide que forma la molécula.
- Oxígenos puente ecuatoriales: rodean la molécula cerca del radio central del toroide.

Lo hasta aquí descrito corresponde a la estructura primaria del polioxometalato. Además, posee una estructura secundaria que involucra al polianión en conjunto con el agua de cristalización, el catión y otras moléculas que pudieran encontrarse presentes. Por último, la estructura terciaria se relaciona al tamaño de las partículas, estructura de los poros, distribución de centros ácidos y otras características que influyen en la actividad catalítica del compuesto.

Cuando los heteropolianiones se conjugan con protones, se forman los ácidos correspondientes llamados heteropoliácidos (HPAs). Solo se conocen pocos HPAs con una estructura primaria de tipo Preyssler: $H_{14}NaP_5W_{30}O_{110}$, $H_{14}NaP_5W_{29}MoO_{110}$ y $H_{12}EuP_5W_{30}O_{110}$.

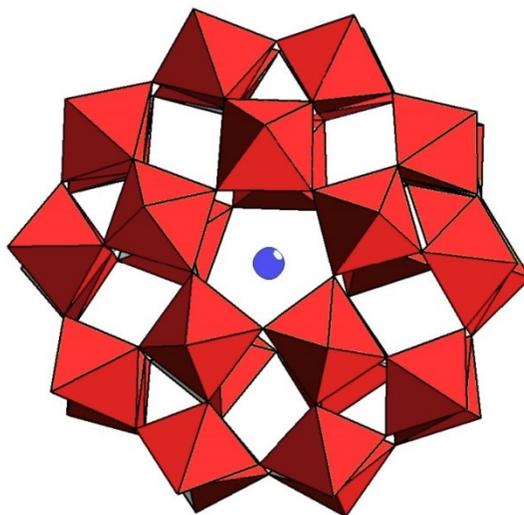


Figura 1.11: Estructura de Preyssler.

Propiedades de los heteropoliácidos

Debido a los enlaces dobles entre el átomo de metal y los de oxígeno, sobre la superficie del heteropolianión existe una baja densidad de carga y, por tanto, presentan una acidez

relativamente alta, mayor que la de los ácidos sólidos clásicos tipo sílices o alúminas y mayor que la del ácido sulfúrico.

Además, los HPAs presentan una alta conductividad protónica a temperatura ambiente encontrándose completamente disociados en solución acuosa.

Para el caso específico de los HPAs con estructura de Preyssler, el poseer una cavidad interna genera que los oxígenos cavitales queden expuestos al igual que el resto de los oxígenos de la molécula, siendo los más susceptibles de ser protonados y, por tanto, constituyendo los sitios más ácidos de la molécula (Fernández *et al.*, 2007). Además, aquellos compuestos que cuentan con Mo en su estructura, resultan ser más ácidos que los que no lo tienen, hecho que se encuentra relacionado con una distorsión en la simetría de la molécula al incorporarse el Mo.

Además de sus propiedades ácidas, los HPAs son muy solubles en solventes polares tales como agua, ciertos alcoholes y ácidos carboxílicos entre otros, e insolubles en solventes no polares como hidrocarburos.

Los HPAs son excelentes como catalizadores debido a su capacidad para donar o aceptar electrones y a su estabilidad bajo diferentes condiciones. En este sentido, pueden actuar a altas temperaturas sin descomponerse.

Además, presentan las ventajas de ser fácilmente recuperables y reutilizables, y de generar reducida cantidad de productos secundarios y residuos, en comparación con el empleo de los ácidos inorgánicos corrosivos utilizados como catalizadores clásicos.

Numerosas reacciones de síntesis orgánica han sido estudiadas utilizando los heteropoliácidos con estructura de Preyssler como catalizadores (Ruiz, 2009). Es de destacar que, recientemente, diferentes trabajos de síntesis orgánica de cumarinas (Escobar *et al.*, 2015) y de piridinas, dihidropiridinas y dihidropirimidinonas (Sánchez *et al.*, 2015) fueron realizados utilizando dichos catalizadores en condiciones de bajo impacto ambiental: sin solvente y en breves tiempos de reacción.

Capítulo 2

Objetivos e Hipótesis

Objetivo general

Realizar la preparación en condiciones de bajo impacto ambiental de compuestos fenilpropanoides, específicamente cinamatos de alquilo y flavonas, y evaluar su actividad biológica en laboratorio sobre diferentes estados y estadios de desarrollo de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), plaga de importancia económica a nivel mundial. Se espera que los resultados de estos estudios contribuyan con la generación de estrategias eco-amigables para el control de esta plaga, dentro del marco del Manejo Integrado de Plagas.

Objetivos específicos

1. Preparar y caracterizar catalizadores heteropoliácidos, para ser utilizados en la obtención de los compuestos fenilpropanoides.
2. Preparar ejemplos de cinamatos de alquilo y flavonas sin sustitución en los anillos B y C utilizando metodologías de bajo impacto ambiental. Para ello se propone aplicar metodologías limpias tales como la realización de las reacciones en ausencia de solvente y el uso de catalizadores ácidos tales como heteropoliácidos con estructura de Preyssler y un derivado de un ácido mineral, el hidrogenosulfato de potasio.
3. Evaluar la actividad insecticida (efectos letales) de dos cinamatos de alquilo y dos flavonas, a diferentes concentraciones, sobre diferentes estados de desarrollo de *T. absoluta* (huevo y larvas de segundo y cuarto estadio).
4. Evaluar los efectos subletales (tiempo de desarrollo, peso de las pupas, efecto fagodisuasivo, fecundidad y fertilidad de las hembras) de dos cinamatos de alquilo y dos flavonas, a diferentes concentraciones, sobre diferentes estados de desarrollo de *T. absoluta* (huevo y larvas de segundo y cuarto estadio).

Hipótesis de trabajo

- Es posible realizar preparaciones eficientes y de reducido impacto ambiental de cinamatos de alquilo y flavonas no sustituidas en el anillo B, catalizando las reacciones con heteropoliácidos de Preyssler-Jeannin-Pope o con hidrogenosulfato de potasio.
- Los cinamatos de alquilo y las flavonas presentan bioactividad sobre uno o más estados y/o estadios de desarrollo de *Tuta absoluta*.

Capítulo 3

Materiales y métodos

***Cría de Tuta absoluta y
metodología general para la
realización de los bioensayos***

Recolección de organismos de *Tuta absoluta* a campo

La recolección se llevó a cabo en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) ya sean orgánicos como sin historia de exposición a plaguicidas, tanto a campo como bajo cubierta (Figura 3.1), en diferentes establecimientos del Cinturón Hortícola Platense (CHP), Provincia de Buenos Aires.



Figura 3.1: Cultivo de tomate bajo invernáculo (Colectivo Orgánico - Cooperativa Creo) y a campo (Productora Susana Parrillo).

El material recolectado consistió en hojas de tomate con pupas y larvas de *T. absoluta* (Figura 3.2). Las hojas colectadas fueron colocadas en bolsas plásticas transparentes con cierre hermético las cuales fueron transportadas hasta el laboratorio en conservadoras.

Los establecimientos muestreados fueron:

- Colectivo Orgánico – Cooperativa Creo. Establecimiento de producción orgánica ubicado en la localidad de Lisandro Olmos, Partido de La Plata (Coordenadas: 35° 01'95.82'' S, 58° 06'56.97'' O).
- Productora Susana Parrillo. Establecimiento con una forma de manejo de cultivos integrada, ubicado en la localidad de Colonia Urquiza, Partido de La Plata (Coordenadas: 34° 94'13.69'' S, 58° 09'41.51'' O).
- Estación experimental “Julio Hirschhorn” dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, ubicado en la localidad de Los Hornos, partido de La Plata (Coordenadas: 34° 98'96.47'' S, 58° 00'06.15'' O). En este caso, el cultivo de tomate muestreado fue a campo y correspondió a la muestra anual “Fiesta del tomate platense”.
- La Anunciación. Establecimiento de producción orgánica ubicado en Abasto, partido de La Plata (Coordenadas: 34° 56'20.26'' S, 58° 07'26.19'' O).



Figura 3.2: Detalle del daño producido por *Tuta absoluta* en hojas de tomate.

Los muestreos se realizaron anualmente durante los meses de octubre a mayo a fin de incorporar nuevos individuos a la población de laboratorio y mantener así la variabilidad genética dentro de la misma.

Acondicionamiento del material de campo

El material recolectado a campo fue mantenido en cuarentena para descartar, previo a su multiplicación y cría en laboratorio, posibles enfermedades o parasitismo, hasta la emergencia de

individuos adultos. Las pupas fueron colocadas en cápsulas plásticas transparentes (9 cm de diámetro x 1,5 cm de altura) y las hojas con larvas, en recipientes plásticos transparentes (15 cm de diámetro x 20 cm de altura), conteniendo plántulas de tomate en su interior para alimentar a las larvas y cubiertos en su parte superior con tela de *voile* blanca para favorecer la ventilación. El material de estos recipientes fue revisado bajo microscopio estereoscópico cada dos días a fin de separar las pupas de *T. absoluta* y agregar nuevas plántulas de tomate si fuese necesario. El material proveniente del campo fue incorporado a la colonia luego de transcurridas dos generaciones.

Establecimiento de la colonia y Cría de *Tuta absoluta* en el laboratorio

La cría de *T. absoluta* se desarrolló en bioterio perteneciente al Laboratorio de Ecotoxicología: Plaguicidas y Control Biológico, del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) bajo condiciones controladas: 70% \pm 5% de humedad relativa, fotoperíodo de 16:8 (L:O) y 25°C \pm 2°C de temperatura (Figura 3.3.a).

La colonia estable de *T. absoluta* se inició con los adultos provenientes de la segunda generación de cría en laboratorio del material recolectado en el campo. Los adultos fueron liberados en una jaula de 30 cm de ancho, 40 cm de profundidad y 56 cm de altura. La misma consta de un armazón de madera cuyos lados son de tela de *voile* blanca. En la jaula se colocó una plántula de tomate como sustrato de oviposición. Los adultos fueron alimentados con una solución de miel de abejas y agua al 15% (Figura 3.3.b).

Las plántulas conteniendo los huevos de *T. absoluta* se retiraron de la jaula luego de 48 horas de exposición a los adultos, tiempo que resultó óptimo para mantener sincronizados los tiempos de desarrollo de los diferentes estadios larvales (L_1 , L_2 , L_3 y L_4). Las plántulas se colocaron en recipientes plásticos transparentes de 15 cm de diámetro x 20 cm de altura con papel absorbente en su base y cubiertos en su parte superior con tela de *voile* blanca (Figura 3.3.d). Bajo las condiciones ambientales antes mencionadas, el primer estadio larval emerge entre el quinto y sexto día de haber sido colocada la plántula de tomate en la jaula como sustrato de oviposición. A medida que las larvas crecieron y se desarrollaron, se agregó más alimento colocando nuevas plántulas de tomate en los recipientes u hojas de tomate en tubos de hemólisis, con los pecíolos sumergidos en agua (Figura 3.3.c). Cuando fue necesario, se dividió el contenido de un recipiente

en dos para contar con más espacio para colocar plántulas u hojas de tomate como alimento de modo que prosiga el desarrollo de la cría con un menor número de individuos por recipiente.



Figura 3.3: Cría de *Tuta absoluta*. **a.** Bioterio donde se desarrolló la cría. **b.** Jaula en la cual se criaron los adultos. **c.** Tubos de hemólisis preparados con hojas de tomate para alimentar la colonia. **d.** Recipientes plásticos donde se desarrollaron los diferentes estadios larvales.

Las plántulas de tomate para la oviposición y alimento fueron sembradas o adquiridas libres de plaguicidas y se trasplantaron utilizando tierra negra y perlita en una proporción 3:1. Las plántulas de tomate fueron mantenidas bajo invernáculo (Figura 3.4) siendo regadas cada 15 días con fertilizante triple NPK y hormona de crecimiento (Fertifox Potenciado®). Las hojas de tomate para alimentar la cría se obtuvieron de cultivos de tomate orgánicos o sin exposición a plaguicidas. Bajo las condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa citadas, las larvas de cuarto estadio pupan mayoritariamente entre los 17 a 20 días postoviposición y los adultos comienzan a emerger aproximadamente una semana después. De este modo, el ciclo de vida de *T. absoluta* tuvo una duración aproximada de 28 días.



Figura 3.4: Invernáculo donde se mantuvieron las plántulas de tomate para oviposición y alimento de *Tuta absoluta*.

Metodología general para la realización de los bioensayos

En este apartado se describe, de modo general, la metodología empleada para la realización de los bioensayos. La descripción más precisa de cada uno de ellos será desarrollada junto con los resultados de los mismos en capítulos posteriores de la tesis.

Los estados y estadios de desarrollo de *T. absoluta* sobre los cuales se han realizado los ensayos biológicos fueron huevos y larvas de segundo (L_2) y cuarto estadio (L_4). Para los estados y estadios mencionados, se evaluaron de tres a cuatro concentraciones de dos cinamatos de alquilo (cinamatos de metilo y de etilo) y dos flavonas (flavona y 6-metoxiflavona) mediante diferentes vías de aplicación (ver Evaluación de la actividad biológica de cinamatos de alquilo sobre *Tuta absoluta* y Evaluación de la actividad biológica de flavonas sobre *Tuta absoluta*).

La selección del estado de huevo y del segundo estadio larval (L_2) para realizar los bioensayos se fundamentó en considerar a ambos como óptimos para el control de una plaga: un compuesto

efectivo sobre huevos o larvas de los primeros estadios ejercería un control sobre la plaga antes de que la misma genere un daño importante sobre el cultivo.

Específicamente para el estado de huevo, las estructuras externas protectoras del embrión pueden dificultar la penetración de determinado compuesto. De hecho, muchos productos naturales tales como extractos de semillas de neem y de *Trichilia pallida* (Meliaceae) u otros sintéticos biorracionales como el piriproxifén no han mostrado tener efecto insecticida sobre huevos de *T. absoluta* (Thomazini *et al.*, 1999; Tomé *et al.*, 2012; Trindade *et al.*, 2000). En este sentido, realizar bioensayos sobre huevos cobra relevancia.

La aplicación para evaluar la bioactividad de los diferentes compuestos sobre huevos y L₂ se realizó por inmersión (Figura 3.5.a). La metodología de **aplicación por inmersión** implica sumergir un insecto, hoja o disco de hoja por un tiempo determinado en una solución de concentración conocida del compuesto cuya bioactividad se quiere evaluar (Silva *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2009). Si bien esta metodología no permite saber con exactitud la cantidad de compuesto que alcanza al organismo, permite simular mejor la aplicación de un compuesto a campo si se lo compara con otras metodologías como la aplicación tópica.

Por otro lado, la elección del estadio L₄, se fundamenta en ser el estadio que presenta una mayor tasa de consumo, generando amplias lagunas en el mesófilo de las hojas de tomate y, por tanto, reduciendo ampliamente la capacidad fotosintética del cultivo en muy poco tiempo. Este alto consumo de alimento genera que las larvas de este estadio estén continuamente entrando y saliendo de las minas realizadas. Por ello, la metodología de aplicación elegida para la evaluación de los diferentes compuestos fue la aplicación tópica (Figura 3.5.b). En la **aplicación tópica, por contacto o localizada**, una solución de concentración conocida de determinado compuesto se aplica directamente sobre alguna parte del cuerpo del organismo evaluado (Fogel *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2004). El compuesto se disuelve en algún solvente orgánico (para asegurar un rápido secado de la gota sobre la cutícula del insecto) y se aplica mediante una microjeringa montada en un microaplicador o un dispensador de modo tal de conocer exactamente el volumen aplicado al insecto.

Para los ensayos realizados por inmersión, las concentraciones evaluadas fueron 100, 250 y 500 µg/ml agregándose una concentración intermedia entre 250 y 500 µg/ml solo en aquellos bioensayos en los cuales no se observó mortalidad de huevos o de larvas tratados a 250 µg/ml

pero sí se observó un 100% de mortalidad de los mismos a 500 µg/ml. Para los bioensayos realizados por contacto (tópico) se evaluó la aplicación de 0,05; 0,125 y 0,25 µg del compuesto correspondiente por larva. La selección de las concentraciones mencionadas se realizó en función a los resultados de diferentes trabajos de evaluación de bioactividad de cinamatos de alquilo y flavonas sobre lepidópteros (Abdelgaleil *et al.*, 2008; Romanelli *et al.*, 2010).

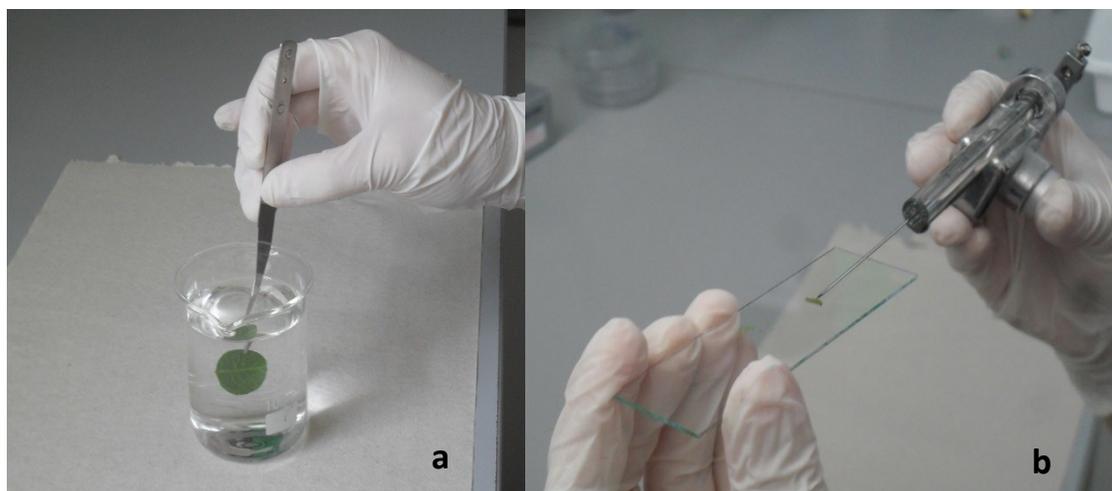


Figura 3.5: Metodología de aplicación utilizada en la realización de los bioensayos. **a.** Aplicación por Inmersión. **b.** Aplicación Tópica.

Preparación de soluciones

Para los tratamientos por inmersión, se disolvió la masa correspondiente del cinamato o la flavona en 1 ml de acetona que fue incorporado a 99 ml de agua destilada con 0.01 ml o 0.05 ml respectivamente de Tween 80® como tensoactivo. Las soluciones se agitaron suavemente, de forma manual, por un lapso de 5 minutos. La solución con la cual se trató el grupo control fue preparada análogamente (sin agregar cinamato ni flavona).

Para los tratamientos por aplicación tópica, se disolvió la masa correspondiente del cinamato o la flavona en acetona. El grupo control fue tratado con acetona únicamente.

Puntos finales evaluados en los diferentes bioensayos

- Efectos letales:
 - Mortalidad.

- Efectos subletales:
 - Tiempo de desarrollo larvario hasta alcanzar el estado de pupa y de adulto (medido en días).
 - Efecto fagodisuasivo (solo evaluado para larvas de segundo estadio).
 - Peso pupal (medido en mg).
 - Fecundidad y fertilidad acumuladas durante 6 días.

La fecundidad es definida como el número de huevos puestos por una hembra mientras que la fertilidad se define cómo el número de huevos que eclosionan. Para evaluar la fecundidad, se formaron 5 parejas por cada tratamiento utilizando para ello, adultos con 24 horas o menos de emergidos. Los adultos utilizados para el armado de las parejas provinieron de huevos y larvas de segundo y cuarto estadio que habían sido tratados con los diferentes compuestos, sobreviviendo a los mismos, pudiendo por tanto, alcanzar el estado adulto. Cada pareja fue colocada en un recipiente plástico transparente de 9 cm de diámetro x 10 cm de altura junto con un algodón impregnado con una solución de miel de abejas en agua al 15% y una hoja de tomate con su pecíolo inmerso en agua dentro de un Eppendorf®. Cada recipiente se cubrió con tela de *voile* blanca (Figura 3.6). Las hojas fueron revisadas diariamente y, de acuerdo a la cantidad de huevos que presentaran, fueron o no recambiadas. Cada una de las hojas portando huevos retiradas de los recipientes, fue colocada dentro de una cápsula plástica cilíndrica (9 cm x 1,5 cm) con su pecíolo inmerso en agua dentro de un Eppendorf®. Las hojas de tomate fueron revisadas bajo microscopio estereoscópico para contabilizar los huevos y, posteriormente, para determinar la fertilidad.



Figura 3.6: Recipientes para evaluar la fecundidad de hembras de *Tuta absoluta*.

Análisis estadístico

La supervivencia de las larvas emergidas de los huevos tratados, así como la supervivencia de larvas del segundo y cuarto estadio tratadas con los diferentes compuestos, fue analizada mediante el estimador de Kaplan-Meier y la comparación de las distintas curvas obtenidas se realizó a través del test Log-rank.

Para el análisis de los datos referentes a la emergencia de los huevos tratados, área consumida por parte de larvas de segundo estadio y a los efectos subletales de cada uno de los bioensayos realizados (tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa y de adulto, peso de las pupas, fecundidad y fertilidad acumulada) se utilizó como test paramétrico el análisis de la varianza (ANOVA) verificando previamente el cumplimiento de sus supuestos. Para ello, el supuesto de normalidad fue evaluado mediante el test de Shapiro-Wilk mientras que la homogeneidad de las varianzas fue evaluada mediante la prueba de Levene. Cuando no se cumplieron los supuestos del ANOVA, se procedió a transformar los datos utilizando la transformación $\log(x+1)$, $\sqrt{x+0.5}$ o arcoseno raíz cuadrada, según correspondiera a la naturaleza de los datos (Zar, 2010). Si aún luego de dicha transformación los datos no se ajustaron a los supuestos del ANOVA, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico de los datos. Como test a posteriori, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn/Bonferroni.

En cambio si los datos cumplieron con los supuestos del ANOVA, se realizó este análisis seguido de la prueba de Tukey como test a posteriori. En todos los casos, se consideró como significativo un $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa XLStat (Addinsoft XLStat para Excel, Paris, Francia, 2009).

***Preparación de cinamatos de
alquilo y flavonas***

Consideraciones generales

Sustancias empleadas

Reactivos generales:

- Acetato de etilo Carlo Erba RPE
- Acetato de potasio Merck p.a.
- Ácido acético glacial Cicarelli p.a.
- Ácido *trans*-cinámico: Aldrich, 97%.
- Ácido fosfórico (85% p/p) Merck puro
- Bicarbonato de sodio: Anedra.
- Cloruro de benzoílo: Biopack, puro
- Cloruro de potasio Merck p.a.
- Éter de petróleo: Sintorgan, P.E. 60-80°C
- Hidróxido de potasio Merck p.a.
- Hidróxido de sodio Merck p.a.
- Metanol: Dorwil/Anedra, p.a.
- Molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich 99%.
- Piridina: Carlo Erba, rectificada p.e.: 113-114°C
- Resina Dowex 50Wx8 (100-200 mallas).
- Silicagel: Grace-Davison, grado 62 (60 x 200 mallas).
- Sulfato de sodio anhidro: Anedra.
- Tolueno: Carlo-Erba, p.a.
- Wolframato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), Berna 99%.

Catalizadores (Los catalizadores con estructura de Preyssler fueron preparados en el laboratorio para la realización de este trabajo)

- Ácido triacontatungstoptentafosfórico con estructura de Preyssler ($\text{H}_{14}\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}$) (**AP**).
- Ácido nonacosatungstomonolibdopentafosfórico con estructura de Preyssler ($\text{H}_{14}\text{NaP}_5\text{MoW}_{29}\text{O}_{110}$) (**APMo**).
- Hidrogenosulfato de potasio Merck p.a.

Fenoles y alcoholes:

- 2-Hidroxiacetofenona: Aldrich, 99%.
- 2-Hidroxi-5-metoxiacetofenona: Aldrich, 99%.
- Alcohol etílico absoluto: Soria p.a.
- *n*-Propanol: Sintorgan rectificado p.e.: 97-98°C

Dicetonas (Preparadas en el laboratorio con anterioridad a este trabajo)

- 2-Hidroxidibenzoímetano, p.f. 119-120°C
- 4-Bromo-2-hidroxidibenzoímetano, p.f. 130-132°C
- 5-Bromo-2-hidroxidibenzoímetano, p.f. 118-119°C
- 4-Cloro-2-hidroxidibenzoímetano, p.f. 128-129°C
- 5-Cloro-2-hidroxidibenzoímetano, p.f. 112-114°C
- 4-Metil-2-hidroxidibenzoímetano, p.f. 88-89°C
- 5-Metil-2-hidroxidibenzoímetano, p.f. 89-90°C

Procedimientos generales

Los calentamientos en baño termostático se realizaron mediante un baño de aceite de siliconas o de vaselina líquida, montado sobre una platina calefactora con dispositivo de agitación magnética.

El avance de las reacciones se comprobó mediante cromatografía en capa delgada (CCD) utilizando cromatofolios de gel de sílice sobre aluminio (Merck, art. 5554). La visualización de cromatogramas se realizó con una lámpara UV de 254 nm. El criterio adoptado para considerar finalizada una reacción involucró: a) la desaparición de uno de los reactivos o b) la observación de constancia en el aspecto del cromatograma de alícuotas sucesivas.

La evaporación de los solventes se llevó a cabo en un evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío, y cuando fue necesario se completó dicha evaporación en una estufa de vacío, hasta llegar a valores constantes en el peso del residuo de evaporación.

Cuando se aisló mediante cromatografía en columna se utilizaron columnas de vidrio, empacadas con una suspensión de la fase estacionaria elegida (Silicagel 60 flash Merck de tamaño de partícula 230-400 mallas), en un solvente de relativamente baja polaridad. La aplicación de la muestra a resolver se realizó generalmente en forma de cabeza de columna con la mezcla

adsorbida en una pequeña cantidad de fase estacionaria, aunque en ocasiones se optó por la aplicación en solución. Para la elución se usaron mezclas de solventes de polaridad creciente, y las fracciones fueron reunidas teniendo en cuenta los análisis realizados mediante CCD. Respecto a las etapas de purificación por recristalización, la misma se realizó en tubos de Craig con el solvente apropiado para cada caso. Los puntos de fusión se midieron en tubos capilares cerrados utilizando un equipo Büchi-Tottoli.

Los espectros de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN fueron obtenidos a 400 MHz y a 100 MHz respectivamente, en un equipo Bruker, en general a 20°C. La muestra, entre 5 y 20 mg, fue disuelta en 0,3-0,4 ml del solvente deuterado elegido. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm respecto al tetrametilsilano, y las constantes de acoplamiento lo están en Hz.

Todos los productos fueron identificados por comparación de sus constantes físicas/espectros con los valores de la literatura, o con los correspondientes a muestras auténticas.

Catalizadores

La preparación de los compuestos objetivo de este trabajo se realizó utilizando condiciones ambientalmente sustentables –con respecto a las utilizadas en otras preparaciones habituales de los mismos–. Específicamente, se ha procurado utilizar catalizadores ácidos, en lo posible heterogéneos, dada la naturaleza de las reacciones involucradas.

Tal como fue mencionado en la Introducción, los heteropoliácidos (HPAs) son principalmente ácidos fosfowolfrámicos o fosfomolibdicos utilizados como catalizadores debido a su fuerte acidez (mayor a la del ácido sulfúrico). En este trabajo, los heteropoliácidos utilizados fueron $\text{H}_{14}\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}$ (AP), catalizador heteropoliácido con estructura de Preyssler, como también un análogo modificado con Mo: $\text{H}_{14}\text{NaP}_5\text{MoW}_{29}\text{O}_{110}$ (APMo).

Preparación de los catalizadores heteropoliácidos

Catalizador $\text{H}_{14}\text{NaP}_5\text{MoW}_{29}\text{O}_{110}$ (APMo):

Se disolvieron 23,002 g de wolframato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) y 1,203 g de molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (en una relación molar de 21:1), en 35 ml de agua destilada a 60°C. A esta solución se agregaron, gota a gota durante una hora con agitación, 22,5 ml de ácido fosfórico (85% en peso) y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas. Se agregó una gota de bromo y luego se añadieron 10 g de cloruro de potasio, precipitando $\text{K}_{12,5}\text{Na}_{1,5}(\text{NaP}_5\text{MoW}_{29}\text{O}_{110}) \cdot 15\text{H}_2\text{O}$. El sólido amarillo se separó por filtración, se lavó utilizando una solución de 10 g de acetato de potasio en 50 ml de agua destilada y se recristalizó tres veces a partir de agua.

Se disolvió la sal obtenida $\text{K}_{12,5}\text{Na}_{1,5}(\text{NaP}_5\text{MoW}_{29}\text{O}_{110})$ (**SPMo**) en 50 ml de agua destilada y la solución se pasó tres veces por una columna empacada con una resina ácida Dowex 50W x8 (tamaño de partículas 100-200 mallas). Se eliminó el agua por evaporación a 80°C y el residuo sólido se secó a la misma temperatura en una estufa de vacío durante 24 horas.

Catalizador $\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}\text{H}_{14}$ (AP):

El ácido de Preyssler **AP** fue preparado en forma análoga, a partir de una solución acuosa de wolframato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) a 60°C, a la cual se agregó ácido fosfórico (85% en peso), con agitación magnética, gota a gota durante 1 hora (Kharat *et al.*, 2003). La solución ácida se calentó a reflujo durante 24 horas y se le agregó una gota de bromo, virando el color de la solución de verde a amarillo. Luego se agregó cloruro de potasio en varias porciones, precipitando la sal del ácido: $\text{K}_{12,5}\text{Na}_{1,5}(\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}) \cdot 15 \text{H}_2\text{O}$ (**SP**). El sólido blanco se separó por filtración, se lavó con solución 2 M de acetato de potasio, y se recristalizó tres veces a partir de agua. Para la preparación del ácido (**AP**) se disolvió la sal en agua y la solución se hizo pasar reiteradamente por una columna de resina ácida Dowex 50W X8, de tamaño de partículas 100-200 mallas. Se eliminó el agua por evaporación a 80°C y el residuo se secó en una estufa de vacío durante 24 h, a la misma temperatura.

Caracterización de los catalizadores heteropoliácidos

Espectro infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR): Para esta caracterización se usó un equipo Bruker IFS 66 midiendo en el rango de 4000-400 cm^{-1} para obtener los espectros de las distintas muestras, preparadas en forma de pastillas en KBr.

Difracción de rayos X (DRX): Se realizó con un equipo Phillips modelo PW-1714 con registrador gráfico de barrido incorporado. Se usó radiación Cu K α ($\lambda=1,5417$ A), filtro de níquel; 30 mA y 40 kV en la fuente de alta tensión. Se registraron difractogramas para valores de 2θ entre 5° y 60° .

Microscopía electrónica de barrido (SEM): Se utilizó un equipo Phillips 505, operando a 14-20 KV, con magnificación de 800-1000x. La cuantificación se realizó según el microanalizador EDAX utilizando un algoritmo de corrección por número atómico, absorción y fluorescencia (método ZAF).

Cinamatos de alquilo

Entre los ésteres alquílicos de los ácidos cinámicos, se han informado numerosos con variadas propiedades y aplicaciones a nivel biológico, como por ejemplo en protectores solares y en aromatizantes, así como también con bioactividad para diversas especies plaga.

En esta sección se realiza la aplicación de los catalizadores ácidos con estructura de Preyssler, a la preparación de cinamatos de alquilo de cadena corta.

Preparación de cinamatos de alquilo

Comparación de catalizadores y optimización de las condiciones de reacción

Se prepararon tres ésteres: cinamato de etilo, cinamato de metilo y cinamato de propilo. Los ensayos tendientes a la obtención de dichos cinamatos se realizaron utilizando los dos catalizadores heteropoliácidos preparados: **AP** y **APMo**, a fin de poder compararlos. En los ensayos se utilizó la misma cantidad de sustrato y del respectivo alcohol, y luego de la reacción se realizó el aislamiento en la misma manera (ver Cinamato de propilo-Ensayo típico de preparación). Por lo tanto, para la preparación de los cinamatos de etilo y de metilo, se utilizó un procedimiento similar al empleado para el cinamato de propilo aunque ajustando la temperatura de la reacción a reflujo, al punto de ebullición de cada uno de los alcoholes-sustrato (78°C para el cinamato de etilo y 65°C para el cinamato de metilo). La identidad de los compuestos sintetizados se estableció por comparación con muestras patrón (compradas a Sigma-Aldrich) mediante cromatografía gaseosa.

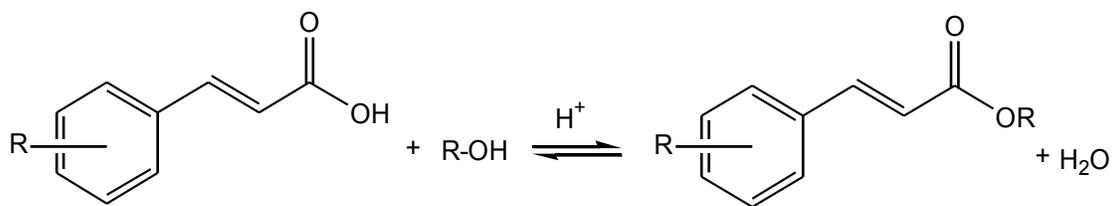


Figura 3.7: Preparación de cinamatos por esterificación directa del ácido cinámico

Cinamato de propilo

Ensayo típico de preparación

Se colocaron en un recipiente de reacción 1 milimol de ácido *trans*-cinámico y 4 ml de *n*-propanol, junto a 80 mg del catalizador respectivo (1%), a reflujo en un baño de vaselina calentado a 110°C, con agitación. El avance de la reacción se observó realizando una cromatografía en capa delgada cada dos horas, usando tolueno como solvente de desarrollo. El cinamato de propilo se extrajo con 2 ml de tolueno y se lavó con porciones de solución de NaHCO₃ al 5% (2 x 2 ml), y luego con agua destilada (1 x 2 ml), y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro. La solución en tolueno con el cinamato de propilo se diluyó con 2 ml de éter de petróleo, y se resolvió mediante cromatografía en columna utilizando como solvente una mezcla 1:1 de éter de petróleo y tolueno. El solvente de las fracciones reunidas se evaporó en vacío, hasta que el residuo de la evaporación alcanzó peso constante.

Flavonas

En esta sección se describe la preparación de flavonas, la cual fue realizada siguiendo la metodología de Baker-Venkataraman utilizando heteropoliácidos con estructura de Preyssler así como también hidrogenosulfato de potasio.

Preparación de flavonas según la estrategia de Baker-Venkataraman

a) Benzoilación de 2-hidroxiacetofenonas (Figura 3.8)

Benzoato de 2-acetilfenilo

Descripción de la preparación

Se colocaron 10 mmoles (1,36 g) de 2-hidroxiacetofenona en un reactor de vidrio (tubo de reacción) junto con 14 mmoles (1,6 ml) de cloruro de benzoilo y 2,0 ml de piridina recientemente destilada. Se agitó la mezcla a mano, la reacción exotérmica comenzó rápidamente. Se colocó el tubo de reacción en un baño a 50°C durante 30 minutos, y a continuación se volcó la suspensión obtenida, sobre 50 ml de HCl 1M y 25 g de hielo triturado. Se agitó con una varilla de vidrio y luego se filtró con succión. El sólido se lavó sobre el filtro con 2 ml de metanol helado y luego con 2 ml de agua. El sólido se cristalizó a partir de metanol, obteniendo el benzoato de 2-acetilfenilo en un rendimiento de 72%, con p.f. 86-88°C (lit.: p.f. 87-88°C) (Vogel *et al.*, 1978).

Benzoato de 2-acetil-4-metoxifenilo

Descripción de la preparación

Se colocaron 5 mmoles (0,832 g) de 2-hidroxi-5-metoxiacetofenona en un tubo de reacción junto con 7 mmoles (0,8 ml) de cloruro de benzoilo y 1,0 ml de piridina recientemente destilada. Se agitó la mezcla a mano. Se colocó el tubo de reacción en un baño a 50°C durante 30 min, y a continuación se volcó la suspensión obtenida, sobre 25 ml de HCl 1M y 15 g de hielo triturado. Se agitó con varilla de vidrio y luego se filtró con succión. El sólido se lavó sobre el filtro con 1,5 ml de metanol helado y luego con 2 ml de agua. El sólido se cristalizó a partir de metanol, obteniendo el benzoato de 2-acetil-4-metoxifenilo con rendimiento 83%, y p.f. 53-55°C (lit.: p.f. 55-57°C) (Doyle *et al.*, 1948).

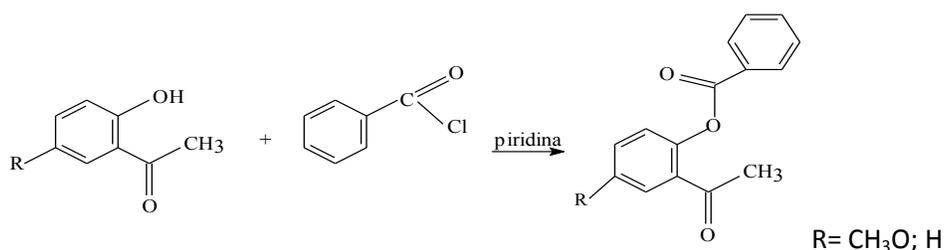


Figura 3. 8: Benzoilación de 2-hidroxiacetofenonas.

b) Reordenamiento de Baker-Venkataraman (Figura 3.9)

2-Hidroxidibenzoílmétano

Descripción de la preparación

Se disolvieron 7 mmoles (1,678 g) de benzoato de 2-acetilfenilo en 6,3 ml de piridina en un tubo de reacción, y la solución se calentó a 50°C. Se le agregó hidróxido de potasio triturado con protección de la humedad ambiente, 0,594 g (10 mmoles). Se agitó la mezcla vivamente, en forma manual, esporádicamente durante 15 min. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se acidificó con 9 ml de ácido acético 10%. La suspensión se filtró por succión y se secó en una estufa de vacío. La recrystalización desde metanol permitió obtener el producto con rendimiento de 81%, p.f. 118-120°C (lit.: p.f. 121°C) (Vogel *et al.*, 1978).

2-Hidroxí-5-metoxidibenzoílmétano.

Descripción de la preparación

Se disolvieron 4 mmoles (1,082 g) de benzoato de 2-acetil-4-metoxifenilo en 3,6 ml de piridina en un tubo de reacción, y la solución se calentó a 50°C. Se le agregó hidróxido de potasio (triturado con protección de la humedad ambiente), 0,345 g (5,71 mmoles). Se agitó la mezcla vivamente, en forma manual, esporádicamente durante 15 min. La mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se acidificó con 5,1 ml de ácido acético 10%. La suspensión se filtró por succión y se secó en una estufa de vacío. La recrystalización desde metanol permitió obtener el producto con rendimiento de 84%, p.f. 82-83°C (lit.: p.f. 81°C) (Doyle *et al.*, 1948).

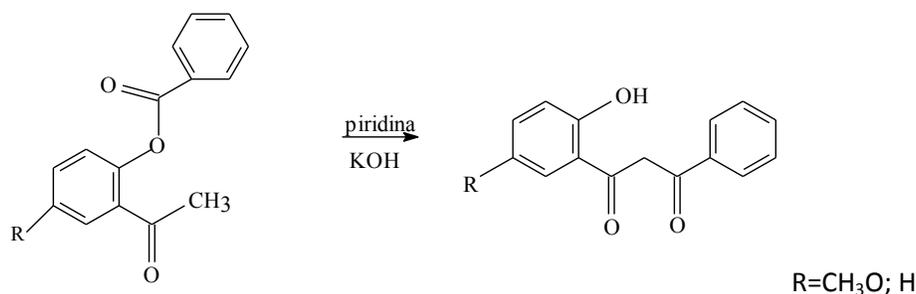


Figura 3.9: Reordenamiento de Baker-Venkataraman.

c1) Ciclación a flavonas utilizando heteropoliácido de Preyssler como catalizador (Figura 3.10)

6-Metoxiflavona (F1)

Ensayos de optimización del tiempo de reacción y la concentración del catalizador (AP)

Se operó sin emplear solvente en la reacción. En un baño a 110°C se colocaron sendos tubos de reacción con 0,25 mmol (68 mg) de 2-hidroxi-5-metoxidibenzoílmétano en cada uno, y catalizador AP, respectivamente: **(A)** 0,5% en mmoles (11 mg), **(B)** 1% (20,3 mg), y **(C)** 2% (40,4 mg). Se extrajeron alícuotas de las mezclas de reacción a 5, 10 y 20 min. Con las mismas se siguió el curso de cada reacción mediante CCD. Las mezclas de reacción se aislaron agregando 2 ml de tolueno y 2 gotas de metanol en cada tubo y calentándolas a ebullición, enseguida se filtraron –por separado– en caliente, con lo que se separó el catalizador, insoluble en tolueno. Cada fase orgánica se lavó con 2 ml de NaOH 1M, se centrifugaron y separaron. Las soluciones en tolueno se lavaron luego con 1 ml de agua, se separaron y secaron con sulfato de sodio anhidro. Luego de filtrarlas, se concentraron en un evaporador rotatorio hasta evaporar el solvente. Los respectivos residuos se secaron en una estufa de vacío.

Descripción de una preparación representativa

Se calentó a 110°C una mezcla de 1,76 mmoles (475 mg) de 2-hidroxi-5-metoxidibenzoílmétano y 0,0176 mmoles (140,8 mg) del catalizador **AP**, sin usar solvente y con agitación magnética. La mezcla fundió, se observó un burbujeo y la formación de un sólido antes de los 5 min. Se calentó en las condiciones mencionadas, durante 20 min, transcurridos los cuales se agregaron a la mezcla de reacción 4 ml de tolueno y 5 gotas de metanol. Se calentó para disolver el producto, se centrifugó en caliente y la solución fue separada utilizando una pipeta Pasteur. El catalizador insoluble se lavó en caliente con dos porciones de 1 ml de tolueno y una gota de metanol, que se reunieron con la solución anterior en un tubo de Craig. Al enfriarse la solución, cristalizó la flavona y los cristales amarillentos se separaron por centrifugación. Se realizó una recrystalización a partir de metanol.

Flavona (F2)

De manera análoga a la descripción precedente, se calentó a 110°C una mezcla de 2,5 mmoles (602 mg) de 2-hidroxidibenzoílmétano y 0,025 mmoles (201 mg) del catalizador **AP**, sin usar solvente y con agitación magnética, durante 20 min. La mezcla de reacción se diluyó con 5,7 ml de

tolueno y 6 gotas de metanol, se disolvió en caliente, centrifugó y separó. Esta solución, reunida con dos lavados del catalizador insoluble, de 1 ml de tolueno cada uno, se dejó enfriar. Los cristales obtenidos se recrystalizaron desde éter de petróleo.

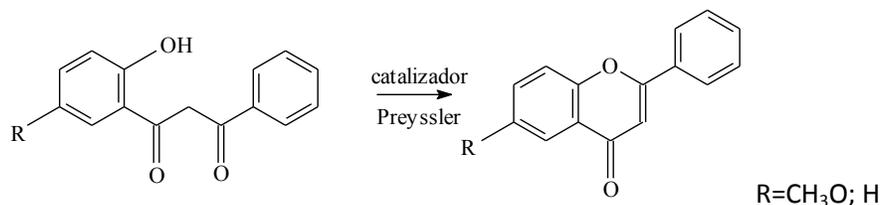


Figura 3.10: Ciclación a flavonas utilizando heteropoliácido de Preyssler como catalizador.

c2) Ciclación a flavonas utilizando hidrogenosulfato de potasio como catalizador (Figura 3.11)

Si bien es conocido el uso de hidrogenosulfato de sodio o de potasio para catalizar variadas reacciones, existe escasa información de su aplicación para la ciclación a flavonas (Sathicq *et al.*, 2014). Los compuestos sintetizados son todos conocidos, por lo cual han sido identificados en general por comparación de sus constantes o espectros con los publicados.

Optimización de las condiciones de reacción

Inicialmente se llevó a cabo la reacción testigo, a partir de 2-hidroxi-dibenzoilmetano sin catálisis.

Influencia de la temperatura

Sendas muestras de 0,5 mmol de 2-hidroxi-dibenzoilmetano se calentaron durante 2 h con 200 mg de hidrogenosulfato de potasio a cinco temperaturas, **25, 60, 80, 100, 120 y 140°C** con agitación durante 2 h.

Influencia del tiempo de reacción

En cada una de estas experiencias 0,5 mmol de 2-hidroxi-dibenzoilmetano se calentó con 200 mg de hidrogenosulfato de potasio a 120°C durante diferentes períodos de tiempo: 30, 60, 90, 120 y 180 minutos.

Efecto de la cantidad de catalizador

En cada una de estas experiencias, 0,5 mmol de 2-hidroxi dibenzoímetano se calentó a 120°C durante 2 h con cantidades variables de catalizador: 50, 100, 150, 200 y 250 mg.

Reutilizabilidad del catalizador

Se realizaron reacciones sucesivas empleando el mismo catalizador, para lo cual entre reacciones se lo lavó con tolueno y se lo secó en vacío a 40°C.

Descripción de una preparación representativa

Una mezcla de 0,5 mmol (120 mg) de 2-hidroxidibenzoímetano se calentó con 200 mg de hidrogenosulfato de potasio a 120°C, con agitación durante 2 h. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo, en tres porciones de 1 ml cada una; el catalizador se separó por filtración, los extractos se reunieron y concentraron en el evaporador rotatorio, a vacío obteniéndose la flavona pura. En general, las flavonas obtenidas se recrystalizaron de metanol.

Preparaciones de flavonas realizadas utilizando hidrogenosulfato de potasio como catalizador

Cabe mencionar que los diferentes dibenzoímetanos utilizados como sustratos, habían sido preparados previamente en el laboratorio.

Flavona (F2)

Se partió de 2-hidroxidibenzoímetano, operando como se describió previamente (ver Descripción de una preparación representativa).

6-Metilflavona (F3)

Se partió de 5-metil-2-hidroxidibenzoímetano, operando como se describió previamente.

7-Metilflavona (F4)

Se partió de 4-metil-2-hidroxidibenzoímetano, operando como se describió previamente.

6-Cloroflavona (F5)

Se partió de 5-cloro-2-hidroxidibenzoílmecano, operando como se describió previamente en la preparación representativa.

7-Cloroflavona (F6)

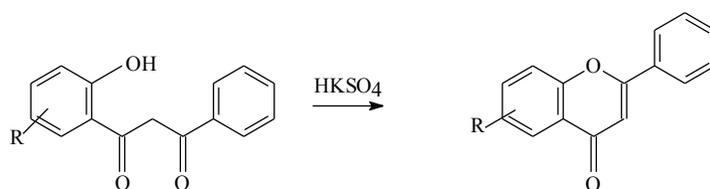
Se partió de 4-cloro-2-hidroxidibenzoílmecano, operando como se describió previamente en la preparación representativa.

6-Bromoflavona (F7)

Se partió de 5-bromo-2-hidroxidibenzoílmecano, operando como se describió previamente en la preparación representativa.

7-Bromoflavona (F8)

Se partió de 4-bromo-2-hidroxidibenzoílmecano, operando como se describió previamente en la preparación representativa.



R en posición 6 = CH₃; Br; Cl; H
R en posición 7 = CH₃; Br; Cl; H

Figura 3.11: Ciclación a flavonas utilizando hidrogenosulfato de potasio como catalizador

A continuación, y a modo de resumen, se presenta la lista de los compuestos preparados:

Tabla 3.1: Estructura de los cinamatos de alquilo preparados.

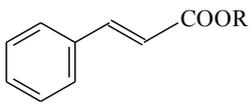
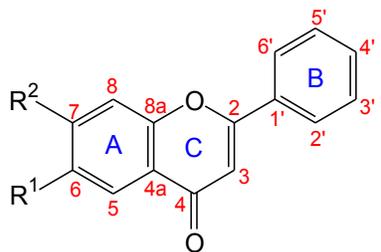
	Cinamato	R
	M	
E		CH ₂ -CH ₃
P		CH ₂ -CH ₂ -CH ₃

Tabla 3.2: Estructura de las flavonas preparadas y numeración de sus átomos.

	Flavona	R¹	R²
	F1		OCH ₃
F2		H	H
F3		CH ₃	H
F4		H	CH ₃
F5		Cl	H
F6		H	Cl
F7		Br	H
F8		H	Br

Capítulo 4

***Preparación de cinamatos
de alquilo y flavonas.***

Resultados.

Caracterización de los catalizadores heteropoliácidos de Preyssler preparados

Espectros FT-IR

Catalizador **AP**: Presenta un espectro FT-IR característico, en el que se observa una banda a 1616 cm^{-1} correspondiente al agua de hidratación, tres bandas a 1163 , 1079 y 1022 cm^{-1} correspondientes a los enlaces P-O (*estiramiento*), dos bandas a 941 y 913 cm^{-1} correspondiente al enlace W–O–W y una banda a 757 cm^{-1} correspondiente al enlace P–O (*deformación*).

Catalizador **APMo**: En relación al espectro FT-IR del ácido de Preyssler modificado con Mo, se observa que algunas bandas se presentan sensiblemente desplazadas respecto a las del ácido **AP**, debido a la presencia del Mo en la estructura del heteropolianión de Preyssler, ocurriendo a 1619 , 1261 , 1091 , 1019 , 958 , 910 y 780 cm^{-1} . Estas bandas se corresponden a las asignadas previamente.

DRX y SEM

El ácido **APMo** y su sal **SPMo** muestran en sus difractogramas de Rayos X (Figura 4.1) los picos característicos de una estructura de Preyssler. En la Figura 4.2 se presenta una micrografía SEM, donde se puede observar la presencia de pequeños bastoncitos debidos a la estructura del ácido **APMo**. Sobre esta morfología se realizó un mapeado de átomos de Mo, que muestra una dispersión al azar de dicho elemento, pudiendo indicar la no cristalinidad del heteropoliácido.

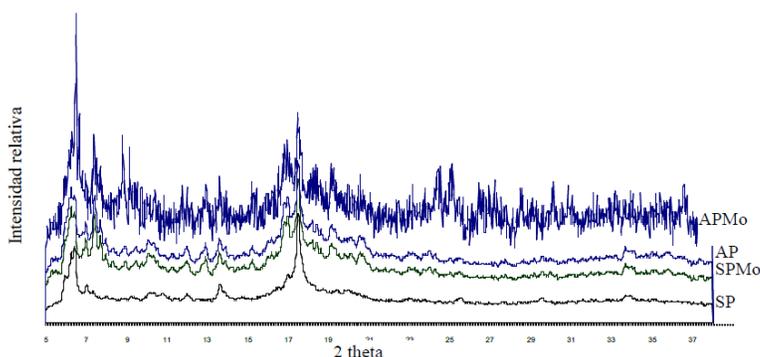


Figura 4.1: Difractograma Rayos X del ácido AP-Mo y su sal comparado con el de AP y su sal.

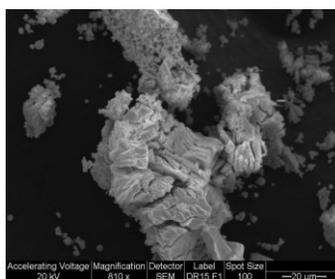


Figura 4.2: Micrografía SEM del ácido APMo

Preparación de cinamatos de alquilo

Comparación de catalizadores y optimización de las condiciones de reacción

En la Tabla 4.1 se detallan los resultados obtenidos:

Tabla 4.1: Preparación de los cinamatos de alquilo

Compuesto sintetizado	Catalizador	T (°C)	t (h)	Rend %
Cinamato de metilo (M)	APMo	64, reflujo	8	21
	APMo	64, reflujo	16	31
	AP	64, reflujo	16	30
Cinamato de etilo (E)	AP	78, reflujo	12	7
	AP	120	4	23
	APMo	78, reflujo	12	10
Cinamato de propilo (P)	AP	97, reflujo	12	77
	APMo	97, reflujo	12	95

La reacción con que se lograron los mejores rendimientos fue la preparación del cinamato de propilo, obteniendo 77% al utilizar como catalizador **AP**, y 95% al utilizar **APMo**. Ambas preparaciones se dieron por finalizadas en base a la evidencia de la CCD luego de 12 horas de reacción.

En la preparación del cinamato de etilo, para el mismo tiempo de reacción, cuando se utilizó catalizador **AP** se obtuvo un rendimiento del 7%; mientras que con **APMo**, el mismo fue de 10%.

Se intentó realizar la misma preparación usando **AP** a mayor temperatura, para lo cual se utilizó una bomba de Parr de acero en cuyo interior se colocó el reactor de vidrio con los reactivos y el catalizador, colocando el conjunto en un baño calefaccionado a 120°C. No se pudo agitar la mezcla en reacción con un imán, ya que la bomba está construida en acero. Tampoco se cerró el reactor interior (ya que se tendría que haber cerrado a presión ambiente, antes de introducirlo en la bomba), por lo que el solvente en gran medida escapó del reactor de vidrio por condensación en el cabezal de acero no sumergido. La situación se notó al abrir la bomba, transcurridas 4 h de reacción, por lo que el ensayo se interrumpió.

En la preparación del cinamato de metilo utilizando **APMo**, transcurridas 16 horas de reacción, no se observaron cambios en el aspecto del cromatograma (CCD), por lo cual se procedió al aislamiento del éster, obteniéndose en un rendimiento de 31%. El ensayo en el cual se utilizó **AP** como catalizador, a igualdad de todas las demás variables, rindió 30%.

Preparación de flavonas

Ciclación a flavonas utilizando heteropoliácido de Preyssler como catalizador

6-Metoxiflavona (F1)

Optimización del tiempo de reacción y la concentración del catalizador (AP)

De acuerdo al seguimiento de las reacciones por CCD, se estableció que a los 20 minutos, las reacciones catalizadas con **AP** al 1% y 2% se habían completado. Por cuidadoso enfriamiento de la solución toluénica hasta -5°C se obtuvieron cristales incoloros de 6-metoxiflavona.

La 6-metoxiflavona preparada con diferentes concentraciones de catalizador tuvieron valores de p.f. que no difirieron en más de 4°C con el valor del p.f. de la 6-metoxiflavona pura (lit.: p.f. 163-164°C) (Morimoto *et al.*, 2003). En consecuencia, se expresan los rendimientos sin realizar una purificación de los sólidos: Utilizando el catalizador a una concentración de 0,5%, el rendimiento fue del 79%; mientras que a una concentración de 1% y 2%, los rendimientos fueron del 94% y 93% respectivamente.

Flavona (F2)

En función de los resultados obtenidos en la preparación de la 6-Metoxiflavona, se utilizó el catalizador AP a una concentración del 1% para preparar la flavona. Luego de 20 min de reacción, por enfriamiento de la solución toluénica, se obtuvieron cristales incoloros de p.f. 96-97°C, con un rendimiento de 92% (lit.: p.f. 98°C) (Vogel et al., 1978).

Ciclación a flavonas utilizando hidrogenosulfato de potasio como catalizador

Optimización de las condiciones de reacción

Al realizar la reacción sin catálisis, solamente se formaron trazas de la flavona objetivo en 2 h de calentamiento a 130°C.

Influencia de la temperatura

Esta serie de reacciones se realizaron utilizando 200 mg de catalizador por el tiempo de 2 horas. No hubo reacción a 25, a 60 ni a 80°C (Tabla 4.2):

Tabla 4.2: Influencia de la temperatura en la preparación de flavona sin sustituir.

Experiencia	Temperatura (°C)	Rendimiento (%) ^a
1	25	-
2	60	-
3	80	5
4	100	80
5	120	98
6	140	67

^a Rendimientos calculados en base al producto aislado.

En la experiencia 6 se detectaron en el análisis por CCD numerosos productos secundarios que no se identificaron. La mejor temperatura de reacción de las evaluadas fue entonces 120°C.

Influencia del tiempo de reacción

Esta serie de reacciones se realizaron a una temperatura de 120°C y utilizando 200 mg de catalizador. De los diferentes tiempos evaluados, se observó que a los 30 min ya se había formado producto (Tabla 4.3):

Tabla 4.3: Influencia del tiempo de reacción en la preparación de flavona sin sustituir.

Experiencia	Tiempo de reacción (min)	Rendimiento (%)^a
7	30	45
8	60	65
9	90	88
10	120	98
11	180	97

^a Rendimientos calculados en base al producto aislado.

Se tomó como el mejor tiempo de reacción, de los evaluados, 120 min (experimento 10) dado que a mayor tiempo el rendimiento prácticamente no varía.

Efecto de la cantidad de catalizador

Esta serie de reacciones se realizaron a una temperatura de 120°C durante dos horas (Tabla 4.4). Se evaluaron diferentes relaciones molares catalizador/sustrato: 0,73 (50 mg de catalizador); 1,46 (100 mg de catalizador); 2,2 (150 mg de catalizador); 2,92 (200 mg de catalizador) y 3,65 (250 mg de catalizador).

Tabla 4.4: Influencia de la cantidad de catalizador en la preparación de flavona sin sustituir.

Experiencia	Relación molar (Catalizador/Sustrato)	Rendimiento (%)^a
12	0,73	15
13	1,46	55
14	2,2	70
15	2,92	98
16	3,65	97

^a Rendimientos calculados en base al producto aislado.

El rendimiento se maximiza al utilizar la relación molar catalizador/sustrato de 2,92 (correspondiente a 200 mg de hidrogenosulfato de potasio, experiencia 15), y para mayor cantidad prácticamente no varía.

Reutilizabilidad del catalizador (Tabla 4.5)

Tabla 4.5: Reutilizabilidad del catalizador hidrogenosulfato de potasio en la reacción de preparación de flavona.

Experiencia	Reacción Nº	Rendimiento (%)^a
17	1	98
18	2	96
19	3	96
20	4	95

^a Rendimientos calculados en base al producto aislado.

Se observa que el catalizador prácticamente no pierde actividad durante las cuatro reacciones sucesivas.

Por tanto, las mejores condiciones de las evaluadas fueron: calentamiento del sustrato a 120°C durante 2 h con una relación molar catalizador/sustrato de 2,92 (200 mg de catalizador). Bajo estas condiciones se prepararon las restantes flavonas.

Flavonas preparadas

Todos los espectros cuyos datos se consignan, coinciden con los publicados en la literatura.

6-Metoxiflavona (F1)

El compuesto se obtuvo en un 94% de rendimiento, con p.f. 162-163°C (metanol) (p.f. lit.: 163-164°C) (Morimoto *et al.*, 2003).

¹H-rmn (400 MHz, CDCl₃): δ 3,84 (3H, s, OCH₃), 6,72 (s, 1H, H-3), 7,22 (dd, 1H, J = 2,9; 9,2 Hz; H-7), 7,42–7,53 (m, 4H, H-3',4',5',8), 7,82–7,89 (m, 2H, H-2',6'), 7,93 (d, 1H, J = 2,9 Hz; H-5).

¹³C-rmn (100 MHz, CDCl₃): δ 98,8 (OCH₃); 104,8 (C-3); 106,8 (C-5); 119,5 (C-8); 123,8 (C-7); 124,6 (C-4a); 126,2 (C-2'); 129,0 (C-3'); 131,5 (C-4'); 131,9 (C-1'); 151,1 (C-8a); 157,0 (C-6); 163,2 (C-2); 178,3 (C-4).

Flavona (F2)

El compuesto se obtuvo en un 98% de rendimiento, con p.f. 97-98°C (metanol) (p.f. lit.: 99°C) (Vogel *et al.*, 1978).

¹H-rmn (400 MHz, CDCl₃): δ 6,80 (s, 1H, H-3), 7,41 (ddd, 1H, J = 1,0; 7,2; 8,2 Hz; H-6), 7,46–7,55 (m, 4H, H-3',4',5',8), 7,68 (ddd, 1H, J = 1,7; 7,2; 8,3 Hz; H-7), 7,91–7,95 (m, 2H, H-2',6'), 8,22 (dd, 1H, J = 1,8; 8,2 Hz; H-5).

¹³C-rmn (100 MHz, CDCl₃): δ 107,2 (C-3); 117,6 (C-8); 123,5 (C-4a); 124,6 (C-6); 125,3 (C-5); 125,8 (C-2'); 128,8 (C-3'); 131,3 (C-4'); 131,6 (C-1'); 133,2 (C-7); 155,6 (C-8a); 162,9 (C-2); 177,6 (C-4).

6-Metilflavona (F3)

Se obtuvo el compuesto deseado en 95% de rendimiento, con p.f. 122-123°C (metanol) (p.f. lit.: 122-123°C (Beilstein, 1918).

^1H -rmn (400 MHz, CDCl_3): δ 2,48 (s, 3H, CH_3); 6,83 (s, 1H, H-3); 7,48-7,56 (m, 5H, H-3',4',5',7,8); 7,94-7,96 (m, 2H, H-2',6'); 8,03 (s, 1H, H-5).

^{13}C -rmn (100 MHz, CDCl_3): δ 20,7 (CH_3); 107,1 (C-3); 117,5 (C-8); 123,3 (C-4a); 124,7 (C-5); 126,0 (C-2'); 128,6 (C-3'); 131,2 (C-4'); 131,6 (C-1'); 134,7 (C-6); 135,0 (C-7); 154,3 (C-8a); 163,0 (C-2); 178,3 (C-4).

7-Metilflavona (F4)

El compuesto deseado se obtuvo en un 96% de rendimiento, con p.f. 121-122°C (metanol) (p.f. lit.: 120°C) (Robertson *et al.*, 1932).

^1H -rmn (400 MHz, CDCl_3): δ 2,47 (s, 3H, CH_3); 6,77 (s, 1H, H-3); 7,22 (d, 1H, J = 2,5; 9.9 Hz; H-6); 7,33 (d, 1H, J = 2,5 Hz; H-8); 7,42-7,57 (m, 3H, H-3',4',5'); 7,93-7,99 (m, 2H, H-2',6'); 8,11 (d, 1H, J = 9.9 Hz; H-5).

^{13}C -rmn (100 MHz, CDCl_3): δ 22,3 (CH_3); 107,6 (C-3); 118,1 (C-8); 122,2 (C-4a); 126,3 (C-2'); 127,0 (C-5); 127,5 (C-6); 129,3 (C-3'); 131,9 (C-4'); 132,3 (C-1'); 145,3 (C-7); 156,5 (C-8a); 163,4 (C-2); 178,4 (C-4).

6-Cloroflavona (F5)

Se obtuvo el compuesto deseado en 90% de rendimiento, con p.f. 184-185°C (metanol) (p.f. lit.: 183-184°C) (Ruhemann, 1921).

^1H -rmn (400 MHz, CDCl_3): δ 6,83 (s, 1H, H-3); 7,50-7,55 (m, 4H, H-3',4',5',8); 7,62 (dd, 1H, J = 2,5; 8,8 Hz; H-7); 7,88-7,92 (m, 2H, H-2',6'); 8,20 (d, 1H, J = 2,6 Hz; H-5).

^{13}C -rmn (100 MHz, CDCl_3): δ 107,3 (C-3); 119,8 (C-8); 125,0 (C-4a); 125,1 (C-5); 126,3 (C-2'); 129,1 (C-3'); 131,2 (C-6); 131,4 (C-4'); 131,7 (C-1'); 133,9 (C-7); 154,2 (C-8a); 163,5 (C-2); 177,2 (C-4).

7-Cloroflavona (F6)

Se obtuvo el compuesto deseado en 89% de rendimiento, con p.f. 156-157°C (metanol) (p.f. lit.: 156-157°C (Chen y Chang, 1958).

^1H -rmn (250 MHz, CDCl_3): δ 6,83 (s, 1H, H-3); 7,42 (dd, 1H, $J = 1,9; 8,4$ Hz; H-6); 7,51–7,56 (m, 3H, H-3',4',5'); 7,62 (d, 1H, $J = 1,9$ Hz; H-8); 7,92–7,94 (m, 2H, H-2',6'); 8,25 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz; H-5).

^{13}C -rmn (62,5 MHz, CDCl_3): δ 106,9 (C-3); 117,9 (C-8); 122,2 (C-4a); 125,8 (C-6); 126,1 (C-2'); 126,6 (C-5); 129,0 (C-3'); 131,2 (C-4'); 131,5 (C-1'); 139,4 (C-7); 155,8 (C-8a); 163,1 (C-2); 177,6 (C-4).

6-Bromoflavona (F7)

Se obtuvo el compuesto deseado en 88% de rendimiento, con p.f. 190-191°C (metanol) (p.f. lit.: 189-190°C) (Chang y Chen, 1961).

^1H -rmn (400 MHz, CDCl_3): δ 6,80 (s, 1H, H-3), 7,50–7,53 (m, 4H, H-3',4',5',8), 7,81 (dd, 1H, $J = 2,5, 8,3$ Hz; H-7), 7,87–7,90 (m, 2H, H-2',6'), 8,33 (d, 1H, $J = 2,5$ Hz; H-5).

^{13}C -rmn (CDCl_3 , 100 MHz): δ 107,4 (C-3), 119,4 (C-6), 119,8 (C-8), 125,1 (C-4a), 126,1 (C-2'), 128,0 (C-5), 129,1 (C-3'), 131,0 (C-4'), 131,8 (C-1'), 136,2 (C-7), 154,5 (C-8a), 163,7 (C-2), 178,1 (C-4).

7-Bromoflavona (F8)

Se obtuvo el compuesto deseado en 86% de rendimiento, con p.f. 165-167°C (metanol) (p.f. lit.: 167-168°C) (Chang y Chen, 1961).

^1H -rmn (400 MHz, CDCl_3): δ 6,83 (s, 1H, H-3), 7,51–7,55 (m, 3H, H-3',4',5'), 7,60 (dd, 1H, $J = 1,5, 8,2$ Hz; H-6), 7,78 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz; H-8), 7,89–7,92 (m, 2H, H-2',6'), 8,16 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz; H-5).

^{13}C -rmn (CDCl_3 , 100 MHz): δ 107,3 (C-3), 121,0 (C-8), 122,2 (C-4a), 125,8 (C-2'), 126,2 (C-5), 128,0 (C-7), 128,4 (C-6), 128,7 (C-3'), 131,2 (C-4'), 131,3 (C-1'), 155,1 (C-8a), 163,2 (C-2), 176,8 (C-4).

Capítulo 5

Evaluación de la actividad biológica de cinamatos de alquilo sobre Tuta absoluta

En el presente capítulo se detallan y discuten los resultados referentes a los ensayos de evaluación de actividad biológica de los cinamatos de etilo y metilo sobre la polilla del tomate. La bioactividad de ambos cinamatos fue evaluada sobre huevos y larvas de segundo (L₂) y cuarto estadio (L₄) de *T. absoluta*. Tal como se mencionó en el capítulo sobre Materiales y Métodos, la vía de aplicación de los diferentes compuestos sobre huevos y L₂ fue por inmersión mientras que para el tratamiento de L₄ se utilizó la aplicación tópica. Las concentraciones evaluadas sobre huevos fueron: 100, 250, 375 y 500 µg/ml., mientras que para el tratamiento de larvas de segundo estadio se evaluaron tres concentraciones: 100, 250 y 500 µg/ml. Por su parte, para la evaluación de la bioactividad de los cinamatos mencionados sobre larvas de cuarto estadio se aplicaron 0,05; 0,125 y 0,25 µg del compuesto correspondiente por larva. Todos los bioensayos se mantuvieron en cámara de cría bajo condiciones controladas: temperatura 25°C ± 2°C, humedad relativa 70% ± 5% y un fotoperíodo de 16:8 (luz: oscuridad).

Materiales y métodos:

Bioensayos sobre huevos

Para la realización de estos bioensayos se utilizaron huevos coetáneos menores a 24 horas de desarrollo. Los huevos fueron obtenidos a partir de plántulas de tomate colocadas en una jaula de 56 x 40 x 30 cm. conteniendo 30 pares de adultos de 24 a 72 horas de edad. Las plántulas se retiraron luego de 24 horas de exposición a los adultos siendo utilizados los huevos para realizar los ensayos ese mismo día (huevos menores a 24 horas de desarrollo). Para cada ensayo se utilizaron 3 hojas de tomate conteniendo de 9 a 12 huevos cada una siendo el número total de 30 huevos por ensayo. En aquellos casos donde el número de huevos por hoja superó el valor mencionado, los huevos utilizados en los bioensayos fueron seleccionados al azar retirando los restantes por medio de un pincel de pelo de marta.

Las hojas conteniendo los huevos fueron tratadas por inmersión en la solución correspondiente durante 15 segundos, secadas bajo campana y luego colocadas, individualmente, dentro de una cápsula plástica cilíndrica de 9 x 1,5 cm con su pecíolo dentro de un Eppendorf® con agua para mantener la turgencia de las mismas.

Los ensayos fueron revisados diariamente bajo el microscopio estereoscópico. En las condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo mencionados, los huevos eclosionan aproximadamente entre el quinto y sexto día postoviposición. Los huevos que al día diez no eclosionaron se consideraron muertos. Aquellos ensayos en los cuales se observó un 100% de mortalidad de huevos, fueron repetidos y los huevos fijados a 24, 48, 72, 96 y 120 horas postratamiento con el fin de realizar preparados para microscopía. Para ello, se utilizó solución de Bouin por 48 horas para la fijación de los huevos los que fueron posteriormente deshidratados en una serie creciente de concentraciones de alcohol etílico grado analítico (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%) y montados entre porta y cubreobjeto utilizando Hoyer como líquido de montaje.

A su vez, solo aquellos tratamientos para los cuales se observó un 100% de mortalidad, fueron repetidos junto con su control utilizando huevos coetáneos de menos de 72 horas de desarrollo a fin de evaluar si el grado de endurecimiento del corion influía en la susceptibilidad de los huevos frente a dichos tratamientos. Estos huevos se obtuvieron como se mencionó previamente, retirando la plántula de tomate luego de 24 horas de exposición a los adultos y utilizando los huevos para la realización de los bioensayos 48 horas después (huevos menores a 72 horas de desarrollo). También en este caso, los huevos que al día 10 no eclosionaron se consideraron muertos. Dichos ensayos se repitieron fijando los huevos a las 24 y 48 horas postratamiento para luego realizar los preparados para microscopía tal como fue descrito precedentemente.

Como parámetros biológicos se midieron la emergencia larval, el tiempo de desarrollo de las larvas hasta alcanzar el estado de pupa y adulto, el peso de las pupas, la fecundidad de hembras provenientes de huevos tratados y la fertilidad, ambas acumuladas luego de 6 días de observación.

Para evaluar los efectos subletales, las larvas que emergieron de los huevos tratados fueron retiradas de sus minas cuidadosamente, 48 horas postemergencia, con ayuda de una aguja de disección y un pincel de pelo de marta. Cada larva fue colocada en una cápsula plástica de dimensiones mencionadas junto a un folíolo de tomate como alimento. Los ensayos fueron revisados periódicamente. Para evaluar la fecundidad y fertilidad se procedió como fue explicitado en el capítulo sobre Materiales y Métodos (pág. 56).

Bioensayos sobre larvas de segundo estadio

Para evaluar la bioactividad de los cinamatos de metilo y etilo sobre L₂ de *T. absoluta*, se realizaron dos ensayos diferentes. En ambos casos, se utilizaron larvas coetáneas provenientes de la cría de laboratorio.

1. **Exposición de larvas de segundo estadio a discos de hoja de tomate tratados con los diferentes compuestos:** Para la realización de este bioensayo, se prepararon discos de 2 cm de diámetro a partir de hojas maduras de tomate. Los discos fueron tratados por inmersión durante 15 segundos en la solución correspondiente y posteriormente fueron secados bajo campana. Cada disco se colocó dentro de una cápsula plástica cilíndrica de 9 x 1,5 cm sobre un papel de filtro humedecido con agua para evitar la pérdida de turgencia del disco. En cada cápsula se colocó una larva de 9 días de edad (postoviposición) con un ayuno de 6 a 8 horas (unidad experimental). El número total de individuos tratados fue 30.
2. **Tratamiento de discos de hoja de tomate con la larva dentro del mesófilo:** Para la realización de este bioensayo, se prepararon discos de 2 cm de diámetro a partir de hojas maduras de tomate. Cada disco fue colocado sobre un cuadrado de papel de filtro humedecido con agua junto con una larva de 10 días de edad (postoviposición) dentro de una cápsula plástica de las dimensiones mencionadas (unidad experimental). Luego de transcurridas 24 horas, se verificó bajo el microscopio estereoscópico que las larvas se encontraran dentro del mesófilo. Las unidades experimentales en las que las larvas se encontraron fuera del mesófilo fueron descartadas. Los discos fueron tratados por inmersión en las soluciones correspondientes a los diferentes tratamientos durante 15 segundos y posteriormente fueron secados bajo campana y colocados nuevamente en las cápsulas plásticas. El número total de individuos tratados fue 30.

En ambos ensayos, los discos fueron escaneados 24 y 48 horas postratamiento y el área consumida fue calculada (en mm²) utilizando el programa ImageJ. El índice de inhibición alimentaria para cada tratamiento se calculó mediante la fórmula:

$$\text{IIA (\%)} = (1 - T/C) \times 100$$

siendo T el consumo de alimento promedio tratado y C el consumo de alimento promedio no tratado (Rossetti *et al.*, 2008).

A las 96 horas postratamiento se agregó, a cada cápsula, un foliolo o una hoja de tomate sin tratar como alimento de modo que prosiga el desarrollo de las diferentes larvas. Diariamente se observaron los ensayos bajo el microscopio estereoscópico a fin de determinar mortalidad. Como efectos subletales se evaluaron el tiempo de desarrollo de las larvas hasta alcanzar el estado de pupa y el de adulto (en días), el peso de las pupas (medido en mg) y la fecundidad y fertilidad acumulada luego de 6 días de observación.

Bioensayos sobre larvas de cuarto estadio

Larvas de 17 días de edad (postoviposición) fueron tratadas mediante aplicación tópica de 0.5 μ l de la solución correspondiente sobre la zona media dorsal abdominal. Previo al tratamiento, las larvas fueron pesadas. La aplicación se realizó usando una microjeringa provista de un dispensador manual Hamilton®. Posteriormente, cada larva fue colocada en una cápsula plástica de 9 x 1.5 cm junto con un foliolo de tomate sin tratar. Los ensayos fueron revisados diariamente bajo el microscopio estereoscópico. Los efectos subletales evaluados fueron el tiempo de desarrollo de las larvas hasta alcanzar el estado de pupa y adulto, el peso de las pupas y la fecundidad y fertilidad acumuladas luego de 6 días de observación tal como fue explicitado en el apartado sobre Materiales y Métodos (pág. 56).

El número total de individuos tratados fue 30. Al igual que los bioensayos anteriores, las larvas utilizadas provinieron de la cría de laboratorio.

Resultados y Discusión:

Bioensayos sobre huevos

El análisis de los resultados con respecto a la emergencia larval, muestran diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Análisis de Kruskal-Wallis $H= 15,755$, $p= 0,04$) (Figura 5.1). Así, tanto el cinamato de etilo como el de metilo a 500 μ g/ml causaron un 100% de mortalidad de los

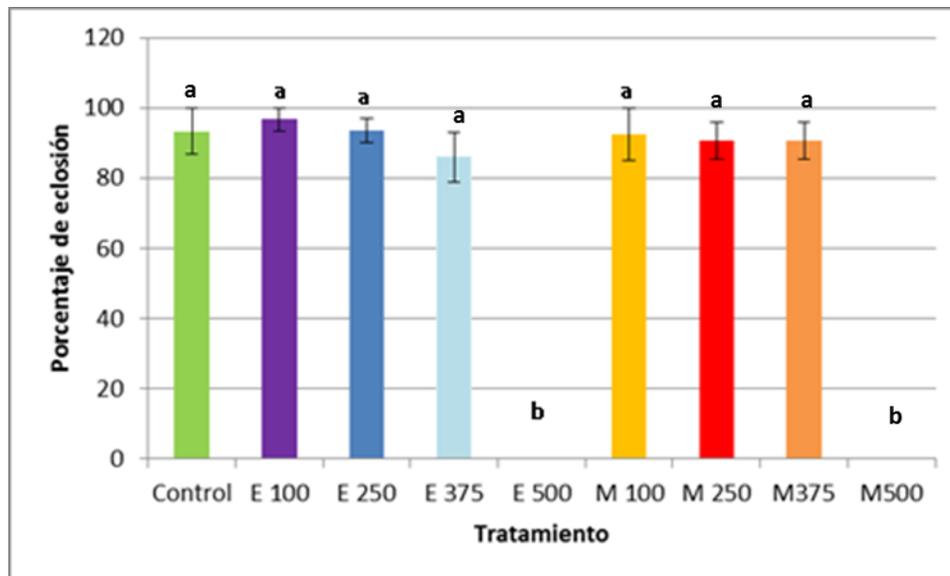


Figura 5.1: Porcentaje de eclosión de huevos de *Tuta absoluta* tratados con menos de 24 horas de desarrollo con cinamato de etilo y de metilo a diferentes concentraciones. E 100: cinamato de etilo 100 µg/ml; E 250: cinamato de etilo 250 µg/ml; E 375: cinamato de etilo 375 µg/ml; E 500: cinamato de etilo 500 µg/ml; M 100: cinamato de metilo 100 µg/ml; M 250: cinamato de metilo 250 µg/ml; M 375: cinamato de metilo 375 µg/ml; M 500: cinamato de metilo 500 µg/ml. Los datos corresponden a las medias (\pm Error estándar). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

huevos tratados con menos de 24 horas de desarrollo. Por tanto, este tratamiento fue repetido con huevos menores de 72 horas de desarrollo observándose también un 100% de mortalidad. En ambos casos, los preparados realizados muestran un detenimiento en el desarrollo embrionario postratamiento. Así, los huevos tratados con ambos cinamatos menores a 24 horas de desarrollo y fijados 48 horas postratamiento, no muestran la formación de esbozos ocelares ni la presencia de piezas bucales que sí se observan en los embriones tratados, para el mismo tiempo, con la solución control (Figura 5.2 a, c y e). A su vez, aquellos huevos tratados con ambos cinamatos menores a 72 horas de desarrollo y fijados 48 horas postratamiento, no exhiben la formación de patas, cápsula cefálica y espiráculos que se encuentran desarrollados en los embriones tratados con la solución control a la misma edad de desarrollo y que fueron fijados también 48 horas postratamiento (embriones de 120 horas de desarrollo) (Figura 5.2 b, d y f).

El corion de los huevos de lepidópteros presenta una composición proteica que, si bien carece de quitina, se encuentra endurecida por puentes disulfuro. Se ha visto además, para ciertos lepidópteros, que por dentro de este corion y sobre el embrión, existe una capa de aceites

Huevos tratados menores a 24 hs. de desarrollo y fijados 48 hs. postratamiento

Huevos tratados menores a 72 hs. de desarrollo y fijados 48 hs. postratamiento

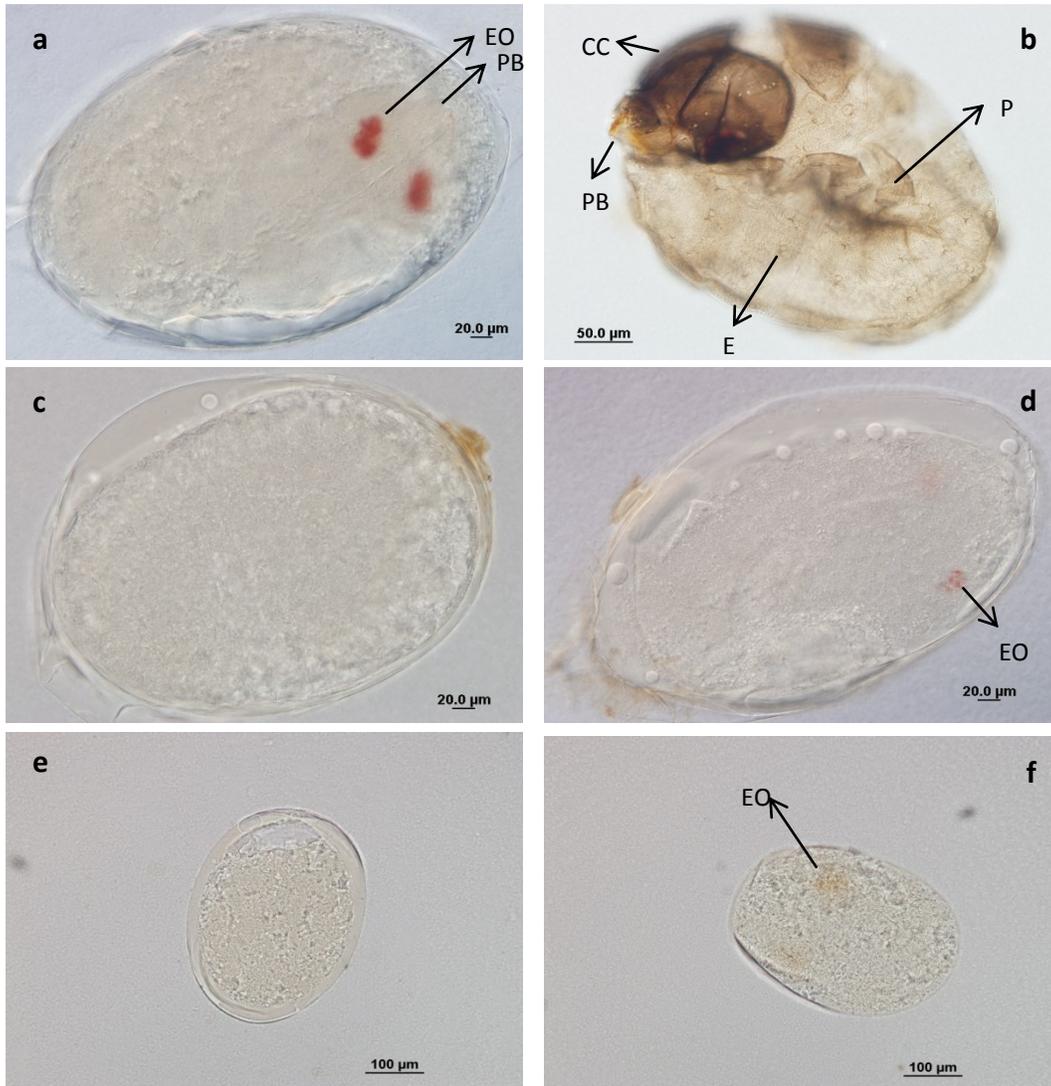


Figura 5.2: Huevos tratados con la solución control (a y b), con cinamato de etilo a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (c y d) y con cinamato de metilo a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (e y f). EO: Esbozos ocelares; PB: Piezas bucales; E: Espiráculos; P: Patas; CC: Cápsula cefálica.

insaturados que es reemplazada antes de la eclosión de la larva (Beament y Lal, 1957). El corion se encuentra atravesado por el micrópilo, conjunto de poros en el polo anterior del huevo que permite el ingreso del esperma, y por los aerópilos, pequeños poros que permiten el intercambio gaseoso del embrión (Telfer, 2009).

Estudios realizados para evaluar el efecto insecticida de diferentes productos naturales sobre huevos de *T. absoluta* no obtuvieron resultados positivos (Thomazini *et al.*, 2000; Trindade *et al.*, 2000). En estos trabajos se propone como posible explicación, que los huevos de *T. absoluta* poseerían esa capa lipídica por debajo del corion que actuaría reteniendo los compuestos e impidiendo que alcancen el embrión.

En cambio, para otros lepidópteros sí se ha observado un efecto ovicida de diferentes compuestos de origen botánico. Así, Torres *et al.* (2006) y da Silva *et al.* (2013) encontraron que diferentes productos naturales tuvieron efecto insecticida sobre huevos de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) y *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) respectivamente. Para explicar estas observaciones, propusieron que los diferentes compuestos habrían penetrado por los aerópilos que atraviesan el corion bloqueando el intercambio gaseoso del embrión.

Si bien los cinamatos de etilo y metilo son liposolubles, el que hayan causado un detenimiento del desarrollo embrionario permite pensar que no fueron retenidos en la capa epiembrionaria lipídica sino que quizás, coincidiendo con lo propuesto por Torres *et al.* y da Silva *et al.*, los compuestos podrían haber ingresado por los aerópilos del corion bloqueando el intercambio gaseoso con la consiguiente muerte del embrión.

Con respecto a la supervivencia de las larvas provenientes de huevos tratados con menos de 24 horas de desarrollo, las cuales fueron individualizadas a las 48 horas postemergencia, no se observaron diferencias significativas para los diferentes tratamientos (Log-Rank, $X^2 = 3,056$; $p = 0,802$; $gl = 6$).

En la Tabla 5.1 se detallan los resultados referentes a la evaluación de los efectos subletales de ambos cinamatos para los bioensayos sobre huevos.

Para los huevos tratados menores a 24 horas postoviposición, se observó que el tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa y el de adulto fue mayor para aquellas larvas que provenían de huevos tratados con cinamato de etilo a 375 $\mu\text{g/ml}$ en un orden de aproximadamente dos días con respecto al control. A su vez, para dicho compuesto y concentración, se observó que las pupas presentaron un menor peso con respecto a las del resto de los tratamientos. Sin embargo, tal como se observa en la Tabla 5.1, este mayor tiempo de desarrollo y menor peso de las pupas no se vio reflejado en cambios en el número de huevos puestos por las hembras ni en la fertilidad de los mismos.

Tabla 5.1: Efectos subletales de los cinamatos de etilo y de metilo a diferentes concentraciones sobre huevos menores a 24 horas de desarrollo de *Tuta absoluta*.

	TDP¹	TDA¹	PP¹	Fecundidad²	Fertilidad²
CONTROL	15,538 (±0,237) a	22,962 (±0,225) a	3,55 (±0,164) b	110 (±11,389) a	97,8 (±6,931) a
E₁₀₀	16,250 (±0,239) ab	23,393 (±0,165) a	3,386 (±0,134) ab	112,4 (±15,788) a	93,8 (±11,128)a
E₂₅₀	15,815 (±0,076) ab	23,111 (±0,111) a	3,563 (±0,145) b	138 (±2,55) a	120,8 (±1,985) a
E₃₇₅	17,250 (±0,09) c	25,208 (±0,120) b	2,821 (±0,086) a	106,8 (±8,169) a	93,6 (±6,99) a
E₅₀₀	*	*	*	*	*
M₁₀₀	16,615 (±0,215) bc	23,692 (±0,213) a	3,431 (±0,094) b	124,4 (±6,911) a	107,4 (±6,306) a
M₂₅₀	16,296 (±0,191) ab	23,444 (±0,209) a	3,411 (±0,089) b	121,4 (±10,318) a	103 (±7,765) a
M₃₇₅	16,037 (±0,155) ab	22,963 (±0,146) a	3,47 (±0,164) b	123 (±8,905) a	102,8 (±7,499) a
M₅₀₀	*	*	*	*	*
p < 0,05	H= 46,423 p<0,0001	H=64,246 p<0,0001	H=21,353 p=0,002	F=1,164 p=0,353 gl=34	H=8,356 p=0,213

TDP: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado de pupa, TDA: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado adulto, PP: Peso de las pupas (mg). E 100: cinamato de etilo 100 µg/ml; E 250: cinamato de etilo 250 µg/ml; E 375: cinamato de etilo 375 µg/ml; E 500: cinamato de etilo 500 µg/ml; M 100: cinamato de metilo 100 µg/ml; M 250: cinamato de metilo 250 µg/ml; M 375: cinamato de metilo 375 µg/ml; M 500: cinamato de metilo 500 µg/ml. Los datos corresponden a las medias (± Error estándar). Las medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn, p < 0,05).

¹ Test de Kruskal-Wallis.

² ANOVA de una vía.

*No se cuenta con estos datos debido al elevado porcentaje de mortalidad.

Al momento de la eclosión, las larvas realizan con sus piezas bucales un agujero en el corion que les permite la salida de la envoltura del huevo. Por tanto, las larvas neonatas podrían haber ingerido los cinamatos retenidos en la superficie rugosa del corion al emerger. Considerando que las larvas fueron individualizadas a las 48 horas postemergencia, la dieta inicial de las larvas neonatas consistió de alimento tratado. Dado que sólo con el cinamato de etilo a 375 µg/ml se observaron efectos subletales notorios, puede plantearse que quizás este compuesto a dicha concentración presente cierto efecto fagodisuasivo causando un menor consumo de alimento por parte de las larvas. Esto se vería reflejado en menores pesos de las pupas y en una elongación de los tiempos de desarrollo. Otros trabajos ya han señalado el efecto fagodisuasivo del cinamato de etilo sobre lepidópteros (Abdelgaleil *et al.*, 2008) y otros insectos (Bratt, 2001).

Este mayor tiempo de desarrollo, principalmente a nivel larval, cobra importancia desde la óptica de las estrategias de control de una plaga: mayores tiempos larvales implican mayores tiempos de exposición de las larvas a sus enemigos naturales.

Bioensayos sobre larvas de segundo estadio

Exposición de larvas de segundo estadio a discos de hoja de tomate tratados con los diferentes compuestos:

Los resultados de este bioensayo se detallan en la Tabla 5.2. Los cinamatos de metilo y etilo no presentaron efecto insecticida a ninguna de las concentraciones evaluadas (Log-rank, $\chi^2= 7.905$, $p=0,245$, $g/6$). Sin embargo, se observó cierta actividad fagodisuasiva dada por un menor consumo de aquellos discos tratados con cinamato de etilo a 250 y 500 µg/ml (IIA= 52.5% y 60.5% a 250 y 500 µg/ml respectivamente a 24 horas postratamiento e IIA= 53.8 % para ambas concentraciones a 48 horas postratamiento) mientras que a 100 µg/ml el consumo fue mayor con respecto al resto de los tratamientos (Figura 5.3).

Estudios de electrofisiología llevados a cabo sobre larvas de lepidópteros muestran que un determinado compuesto puede actuar a bajas concentraciones como un estimulante de la alimentación mientras que a concentraciones mayores se comporta como fagodisuasivo (Blaney y Simmonds, 1988). A su vez, se conoce que el umbral de detección de metabolitos secundarios que estimulan células fagoestimulantes presentes en el aparato bucal de larvas de lepidópteros es

mucho menor que el que estimula a células fagoderrentes (Chapman, 2003). Varios estudios relacionan la actividad antialimentaria con el accionar de las sensilas estilocónicas presentes en las maxilas de larvas de lepidópteros, las cuales son señaladas como las principales responsables de la quimiorrecepción por contacto en estos insectos (Baskar e Ignacimuthu, 2012; Ryan, 2002; Simmonds *et al.*, 1990).

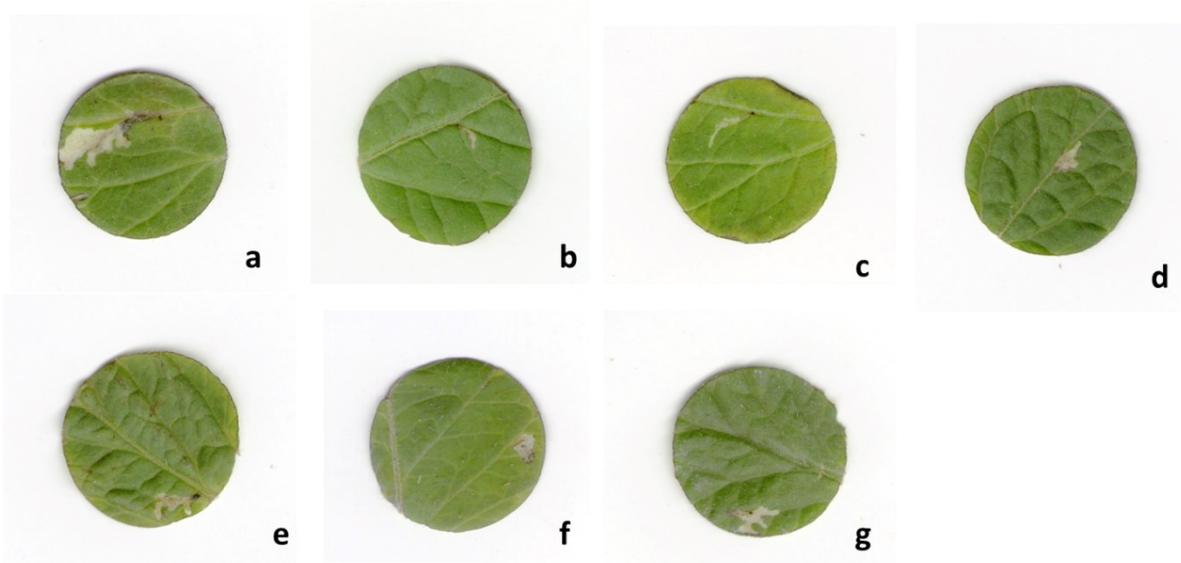


Figura 5.3: Discos de hojas de tomate tratados con la solución control y con diferentes concentraciones de cinamatos de etilo y metilo. Se muestra el consumo a 48 horas postratamiento. a, b y c: Discos tratados con cinamato de etilo a 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente; d. Control; e, f y g: Discos tratados con cinamato de metilo a 100, 250 y 500 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Tabla 5.2: Área foliar consumida y efectos subletales de los cinamatos de etilo y de metilo a diferentes concentraciones sobre larvas de segundo estadio de *Tuta absoluta* expuestas a discos de hojas de tomate tratados.

	ÁREA CONSUMIDA (mm ²)		EFECTOS SUBLETALES				
	24 hs PT ¹	48 hs PT ¹	TDP ¹	TDA ¹	PP ¹	Fec ²	Fert ²
CONTROL	2,044 (±0,243) bc	7,000 (±0,615) b	10,577 (±0,185) a	17,808 (±0,222) a	3,335 (±0,101) a	107,4 (±7,047) a	94 (±6,914) a
E₁₀₀	6,438 (±0,829) d	11,941 (±1,315) b	10,731 (±0,152) a	18,115 (±0,339) a	3,504 (±0,118) a	114 (±9,263) a	101,8 (±8,04) a
E₂₅₀	0,970 (±0,205) ab	3,233 (±0,488) a	10,828 (±0,172) a	17,448 (±0,169) a	3,721 (±0,126) a	145,2 (±6,946) a	122,4 (±3,415) a
E₅₀₀	0,806 (±0,188) a	3,231 (±0,555) a	11,240 (±0,233) a	18,520 (±0,259) a	3,588 (±0,147) a	129,4 (±6,961) a	105,4 (±5,075) a
M₁₀₀	3,302 (±0,403) cd	8,735 (±0,660) b	10,429 (±0,208) a	17,964 (±0,284) a	3,332 (±0,098) a	123,6 (±7,243) a	111,4 (±7,16) a
M₂₅₀	2,186 (±0,382) abc	7,918 (±0,905) b	10,500 (±0,190) a	18,067 (±0,185) a	3,273 (±0,116) a	124,8 (±9,78) a	106,4 (±6,585) a
M₅₀₀	2,864 (±0,463) cd	7,043 (±0,878) b	10,500 (±0,196) a	17,929 (±0,199) a	3,471 (±0,110) a	122,8 (±12,496) a	104,8 (±11,91) a
p < 0,05	H=65,211 p<0,0001	H=62,741 p<0,0001	H=9,961 p=0,126	H=9,965 p=0,126	H=8,990 p=0,174	F= 1,862 p= 0,123 gl= 34	F= 1,387 p= 0,254 gl= 34

PT: postratamiento, TDP: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado de pupa, TDA: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado adulto, PP: Peso de las pupas (mg), Fec: Fecundidad acumulada luego de 6 días, Fert: Fertilidad acumulada luego de 6 días. E 100: cinamato de etilo 100 µg/ml; E 250: cinamato de etilo 250 µg/ml; E 500: cinamato de etilo 500 µg/ml; M 100: cinamato de metilo 100 µg/ml; M 250: cinamato de metilo 250 µg/ml; M 500: cinamato de metilo 500 µg/ml. Los datos corresponden a las medias (± Error estándar). Las medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn, p < 0,05). ¹ Test de Kruskal-Wallis. ² ANOVA de una vía.

En el caso particular del bioensayo realizado, las larvas podrían haber tomado contacto directo con el compuesto al desplazarse por encima de los discos tratados o de modo indirecto, a través de la fase gaseosa dado que ambos cinamatos son volátiles. Para los tratamientos realizados con cinamato de etilo a 250 y 500 µg/ml se observó que, a las 24 horas postratamiento, el 40% de las larvas no se alimentó. En base a esto, no se puede afirmar si el menor consumo observado en discos tratados con cinamato de etilo a dichas concentraciones se debe a la interacción negativa de este compuesto con los quimiorreceptores bucales de las larvas, a un posible efecto repelente de este compuesto o a la acción combinada de ambos factores.

La actividad fagodisuasiva del cinamato de etilo fue observada también sobre *Hylobius abietis* por Bratt *et al.* (2001) y sobre lepidópteros por Abdelgaleil *et al.* (2008). Éstos últimos evaluaron el efecto del cinamato de etilo a diferentes concentraciones sobre el consumo de larvas de tercer estadio de *Spodoptera littoralis*. Sin embargo, los resultados obtenidos por ellos difieren de los presentados en esta tesis dado que obtuvieron un IIA de 72.1 % a 100 µg/ml mientras que a 500 µg/ml el IIA fue de 86.7 % mostrando por tanto, una respuesta dependiente de la concentración. Si bien la forma de exposición y las concentraciones evaluadas fueron similares y, en ambos casos, se trata de lepidópteros, la respuesta a nivel específico puede diferir. Cabe pensar, en este sentido, que las larvas de tercer estadio de *S. littoralis* superan ampliamente en tamaño a las de segundo estadio de *T. absoluta* y que, además, sus hábitos alimenticios son completamente diferentes.

El mayor o menor consumo de alimento tratado con cinamato de etilo, no se vio reflejado en diferencias en la duración del ciclo de vida, peso de las pupas ni sobre la fecundidad y fertilidad; de hecho, no se observaron efectos subletales para ninguno de los tratamientos realizados (Tabla 5.2).

Tratamiento de discos de hoja de tomate conteniendo la larva en su mesófilo:

Los resultados de este bioensayo se detallan en la Tabla 5.3. No se observó efecto insecticida para ninguno de los tratamientos realizados (Log-rank, $X^2=5,332$; $p=0,502$; $gl=6$). Tampoco se observaron diferencias en el consumo a 24 horas postratamiento aunque sí las hubo a 48 horas postratamiento. En la Tabla 5.3 se observa, para dicho tiempo, la amplia variabilidad de los agrupamientos obtenidos no pudiendo establecerse ningún patrón claro que permita pensar que la diferencia en el consumo pueda atribuirse a algún tratamiento en particular.

Tabla 5.3: Área foliar consumida y efectos subletales de los cinamatos de etilo y de metilo a diferentes concentraciones sobre larvas de segundo estadio de *Tuta absoluta* que se encontraban en el mesófilo de discos de hojas de tomate al momento de ser tratados.

	ÁREA CONSUMIDA (mm ²)		EFECTOS SUBLETALES				
	24 hs PT ¹	48 hs PT ¹	TDP ¹	TDA ¹	PP ¹	Fec ²	Fert ²
CONTROL	7,694 (±1,502) a	17,349 (±2,225) abc	8,926 (±0,176) a	16,963 (±0,217) a	3,104 (±0,099) a	114,6 (±5,192) a	98 (±5,459) a
E₁₀₀	5,133 (±0,546) a	11,058 (±1,508) a	9,633 (±0,200) a	17,100 (±0,200) a	3,197 (±0,112) a	110,8 (±7,344) a	100,8 (±7,095) a
E₂₅₀	4,691 (±0,714) a	11,331 (±1,343) ab	9,037 (±0,223) a	16,593 (±0,240) a	3,144 (±0,131) a	103,8 (±4,152) a	94 (±3,45) a
E₅₀₀	8,384 (±1,842) a	18,208 (±1,738) bc	8,846 (±0,173) a	16,308 (±0,234) a	3,442 (±0,138) a	102 (±3,633) a	95 (±2,49) a
M₁₀₀	7,525 (±1,322) a	21,798 (±3,326) bc	9,115 (±0,231) a	16,231 (±0,187) a	3,519 (±0,125) a	118,8 (±4,923) a	109 (±3,847) a
M₂₅₀	6,105 (±0,669) a	24,027 (±1,851) c	9,607 (±0,238) a	17,286 (±0,191) a	3,429 (±0,148) a	112,6 (±4,057) a	101 (±4,416) a
M₅₀₀	5,161 (±0,646) a	16,716 (±1,889) abc	9,200 (±0,321) a	17,000 (±0,256) a	3,252 (±0,128) a	125,2 (±7,921) a	113,2 (±6,793) a
p < 0,05	H=2,837 p=0,829	H=35,607 p<0,0001	H=9,961 p=0,126	H=9,965 p=0,126	H=8,990 p=0,174	F= 2,141 p=0,08 gl=34	F= 1,989 p=0,101 gl=34

PT: postratamiento, TDP: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado de pupa, TDA: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado adulto, PP: Peso de las pupas (mg), Fec: Fecundidad acumulada luego de 6 días, Fert: Fertilidad acumulada luego de 6 días. E 100: cinamato de etilo 100 µg/ml; E 250: cinamato de etilo 250 µg/ml; E 500: cinamato de etilo 500 µg/ml; M 100: cinamato de metilo 100 µg/ml; M 250: cinamato de metilo 250 µg/ml; M 500: cinamato de metilo 500 µg/ml. Los datos corresponden a las medias (± Error estándar). Las medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn, p < 0,05). ¹ Test de Kruskal-Wallis. ² ANOVA de una vía.

A su vez, esa variabilidad en el consumo tampoco se refleja en claros o marcados efectos subletales ya que solo se aprecia una mínima diferencia a nivel del tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estado de adultez (Tabla 5.3).

A diferencia de los ensayos realizados con L₂ que fueron expuestas a discos tratados con cinamato de etilo a 250 y 500 µg/ml en los cuales se observaba cierto efecto fagodisuasivo, en estos bioensayos no se observa el mismo efecto. Interpretar estos resultados implica plantear, en primer término, las posibles vías a través de las cuales las larvas podrían haber entrado en contacto con los compuestos. En este bioensayo, las larvas se encontraban dentro del mesófilo al momento de ser tratadas por lo que hay dos posibles vías de contacto. La primera de ellas implica que la larva saliera de su mina para realizar otra, tomando contacto con el compuesto. La segunda supone pensar que el compuesto pueda alcanzar el mesófilo ya sea de manera translaminar o penetrando por la abertura realizada por la larva al ingresar al mesófilo o por los bordes de los discos y luego difundiendo por el mismo.

Tomando la primera opción, se ha observado un número muy pequeño de discos con más de una mina realizada para los diferentes tratamientos, por lo que esta vía de contacto sería mayormente despreciable. Analizando la segunda opción, la composición química de la cutícula de las hojas del tomate junto con las propiedades químicas de los cinamatos de alquilo utilizados, podrían aportar ciertos elementos para la interpretación de los resultados obtenidos. Tanto el cinamato de etilo como el de metilo son de naturaleza lipofílica, insolubles en agua, mientras que la cutícula de las hojas del tomate es muy rica en ceras epi e intracuticulares constituidas mayoritariamente por ácidos grasos, terpenos y esteroides (Heredia *et al.*, 1998). Esta fase lipídica actúa como una fase de acumulación de compuestos orgánicos hidrofóbicos. Quizás los cinamatos de etilo y metilo puedan haberse retenido en la cutícula no ingresando al mesófilo acuoso de la hoja. Sin embargo, la permeabilidad de un compuesto en la cutícula depende no solo de su solubilidad sino también de su tamaño y movilidad a través de la misma por lo que no podría afirmarse con los datos disponibles si dichos compuestos pueden atravesar la cutícula translaminarmente o si por el contrario, permanecen en la cutícula no alcanzando el mesófilo.

Bioensayos sobre larvas de cuarto estadio

Los resultados de este bioensayo se detallan en la Tabla 5.4. Ninguno de los compuestos evaluados exhibió efecto insecticida, es decir, todas las larvas tratadas con los diferentes

compuestos así como las correspondientes al control, alcanzaron el estado de adultez. El tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa no difirió significativamente entre los diferentes tratamientos como tampoco varió el peso de las pupas. En cambio, se observó que las larvas tratadas con cinamato de etilo a 0,05 y 0,25 µg/larva y con cinamato de metilo a 0,05 µg/larva alcanzaron en menor tiempo el estado de adultez mientras que aquellas tratadas con cinamato de etilo a 0,125 µg/larva lo hicieron en un tiempo mayor (1.226 días más con respecto a los tratamientos mencionados previamente).

Tabla 5.4: Efectos subletales de los cinamatos de etilo y de metilo a diferentes concentraciones sobre larvas de cuarto estadio de *Tuta absoluta*. Tratamiento por contacto (tópico).

	TDP¹	TDA¹	PP²	Fecundidad²	Fertilidad²
CONTROL	3,419 (±0,111) a	11,226 (±0,145) ab	3,448 (±0,130) a	115,4 (±6,787) a	104,2 (±5,616) a
E 0,05 µg/larva	3,367 (±0,089) a	11 (±0,144) a	3,397 (±0,137) a	118,2 (±7,297) a	102,4 (±4,320) a
E 0,125 µg/larva	3,5 (±0,104) a	12 (±0,159) c	3,097 (±0,094) a	121,4 (±6,242) a	107,8 (±4,705) a
E 0,25 µg/larva	3,452 (±0,091) a	10,774 (±0,184) bc	3,51 (±0,094) a	121 (±6,535) a	105,4 (±5,464) a
M 0,05 µg/larva	3,667 (±0,088) a	10,900 (±0,139) a	3,267 (±0,096) a	117 (±7,688) a	104,4 (±7,160) a
M 0,125 µg/larva	3,4 (±0,113) a	11,467 (±0,115) abc	3,087 (±0,087) a	121,8 (±6,981) a	103,6 (±6,022) a
M 0,25 µg/larva	3,533 (±0,124) a	11,733 (±0,135) bc	3,167 (±0,101) a	119 (±8,325) a	101,8 (±6,651) a
p < 0,05	H= 7,37 p=0,288	H=45,159 p<0,0001	F=2,503 p=0,023 gl=211	F=0,114 p=0,994 gl=34	F=0,119 p=0,993 gl=34

TDP: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado de pupa, TDA: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado adulto, PP: Peso de las pupas (mg), Fec: Fecundidad acumulada luego de 6 días, Fert: Fertilidad acumulada luego de 6 días. E: cinamato de etilo M: cinamato de metilo. Los datos corresponden a las medias (± Error estándar). Las medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn, p < 0,05).

¹ Test de Kruskal-Wallis. ² ANOVA de una vía.

De lo expuesto anteriormente y de lo observado en la Tabla 5.4, se desprende que las diferencias observadas en cuanto al tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estado adulto no se corresponden con un compuesto o concentración en particular. Desde el punto de vista de una estrategia de control de plagas, estos resultados no revisten gran significación debido a que, por un lado, la diferencia en días entre los diferentes tratamientos es escasa (aproximadamente 1 día) y por otro, a que esa diferencia no se da a nivel del desarrollo larval sino al tiempo en que dura el estado de pupa. Que se extienda el tiempo de desarrollo larval implica que los organismos plaga estén, en campo, expuestos por un mayor tiempo al ataque de sus enemigos naturales pudiendo ejercerse así un control biológico. Si bien las pupas de *T. absoluta* pueden ser atacadas por ciertos parasitoides y depredadores (Desneux *et al.*, 2010) constituyen un estado menos vulnerable que el larval por encontrarse protegidas.

Abdelgaleil *et al.* (2008) también evaluaron el efecto del cinamato de etilo sobre larvas de tercer estado de *S. littoralis* por aplicación tópica obteniendo un marcado efecto insecticida. Nuevamente, se observa que ambas especies de lepidópteros no responden del mismo modo ante el mismo compuesto quizás debido a diferencias en la susceptibilidad interespecífica o a diferencias en las concentraciones evaluadas.

Capítulo 6

Evaluación de la actividad biológica de flavonas sobre Tuta absoluta

En este capítulo se presentan y discuten los resultados referentes a la bioactividad de las flavonas ensayadas: flavona y 6-metoxiflavona. La bioactividad de las flavonas se evaluó sobre huevos y sobre larvas de segundo (L₂) y cuarto (L₄) estadios de *T. absoluta*. La metodología de aplicación de las diferentes flavonas sobre huevos y L₂ se realizó por inmersión siendo las concentraciones evaluadas 100, 250, y 500 µg/ml para huevos y 100, 250, 400 y 500 µg/ml para L₂. En cambio, se utilizó la aplicación tópica para evaluar la bioactividad de las flavonas sobre L₄; en este caso, se evaluó la aplicación de 0,05; 0,125 y 0,25 µg de cada compuesto por larva. Los bioensayos se realizaron y mantuvieron en condiciones controladas: temperatura 25°C ± 2°C, humedad relativa 70% ± 5% y un fotoperíodo de 16:8 (luz: oscuridad).

Materiales y métodos:

La metodología seguida para evaluar la bioactividad de la flavona y la 6-metoxiflavona sobre huevos y larvas de segundo y cuarto estadio de *T. absoluta* fue la misma que la empleada para evaluar la bioactividad de cinamatos de alquilo (pág. 82).

Sin embargo, cabe mencionar que, a diferencia de lo realizado con aquellos huevos tratados con los diferentes cinamatos de alquilo, los huevos tratados con flavona y 6-metoxiflavona que al día 10 no eclosionaron fueron fijados y preparados para microscopía.

Además, solo en los tratamientos sobre huevos realizados con flavona y por haberse observado un 100% de mortalidad en huevos y larvas neonatas con este compuesto a 250 y 500 µg/ml, se repitieron estos ensayos junto con su control utilizando huevos coetáneos de menos de 72 horas de desarrollo a fin de evaluar si el grado de endurecimiento del corion influía en la susceptibilidad de los huevos frente a dichos tratamientos.

Resultados y Discusión

Bioensayos sobre huevos

Los resultados de este bioensayo se detallan en la Tabla 6.1. Con respecto a la emergencia larval, se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (test de Kruskal-Wallis,

$H= 13,619$; $p= 0,034$) (Figura 6.1). En este sentido, un 73% de los huevos tratados con menos de 24 horas de desarrollo con flavona a 250 $\mu\text{g/ml}$ no eclosionó. A su vez, las larvas neonatas que emergieron se encontraron muertas 24 horas postemergencia. Algo similar se observó para el tratamiento con flavona a 500 $\mu\text{g/ml}$ donde el 77% de los huevos no eclosionó mientras que las larvas que emergieron se encontraron muertas también, 24 horas postemergencia. En los preparados de huevos realizados a los 10 días postratamiento se observan embriones completamente desarrollados, que exhiben piezas bucales, cápsula cefálica formada y presencia de ojos (Figura 6.2).

Por otro lado, de los huevos tratados con flavona a 250 $\mu\text{g/ml}$ con más de 48 y menos de 72 horas de desarrollo, el 86,6% no eclosionó mientras que de aquellos tratados con flavona a 500 $\mu\text{g/ml}$, el 96,6% no eclosionó. Nuevamente, en los preparados de huevos realizados se evidencian embriones completamente desarrollados (Figura 6.3). Las larvas que lograron emerger, se encontraron muertas dentro de las primeras 24 horas postemergencia en ambos tratamientos. Por tanto, la flavona a ambas concentraciones exhibió un fuerte poder insecticida. Sin embargo, a diferencia de lo observado para los cinamatos de alquilo, las flavonas no causaron un detenimiento en el desarrollo embrionario.

Es conocido, para algunas especies de lepidópteros, la existencia de una capa epiembrionaria lipídica por debajo del corion de los huevos. Esta capa se reabsorbe antes de la eclosión de las larvas (Beament y Lal, 1957).

Si bien no fue estudiada la morfología de los huevos de *T. absoluta*, de poseer esta capa, la misma podría haber actuado reteniendo la flavona, muy liposoluble. Al reabsorberse, el compuesto habría tomado contacto con el embrión causando la posterior muerte del mismo. En este caso, la toxicidad de la flavona se habría expresado por contacto con el embrión. Sin embargo, un bajo porcentaje de larvas lograron emerger aunque murieron dentro del primer día postemergencia. Por tanto, la flavona podría haber causado tanto sobre los embriones como sobre las larvas neonatas una intoxicación por contacto.

Tabla 6.1: Efectos subletales de flavona y 6-metoxiflavona a diferentes concentraciones sobre huevos de menos de 24 horas de desarrollo de *Tuta absoluta*.

	TDP¹	TDA¹	PP¹	Fecundidad²	Fertilidad¹
CONTROL	16,577 (±0,289) a	23,962 (±0,218) a	3,538 (±0,147) a	117,4 (±7,167) a	107 (±5,63) a
Flavona₁₀₀	17,560 (±0,289) ab	25,120 (±0,267) b	3,084 (±0,070) a	110,6 (±4,118) a	97 (±1,304) a
Flavona₂₅₀	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
Flavona₅₀₀	-----*	-----*	-----*	-----*	-----*
6-MeOFlavona₁₀₀	17,120 (±0,176) ab	24,920 (±0,208) b	3,304 (±0,104) a	124 (±8,724) a	108,8 (±5,161) a
6-MeOFlavona₂₅₀	17,538 (±0,194) b	25,038 (±0,232) b	3,346 (±0,109) a	112,8 (±7,186) a	101 (±5,244) a
6-MeOFlavona₅₀₀	17,286 (±0,209) ab	24,762 (±0,284) a	3,357 (±0,108) a	109 (±5,060) a	100,6 (±3,572) a
<i>p</i> < 0,05	<i>H</i> = 10,639 <i>p</i> =0,031	<i>H</i> =16,114 <i>p</i> =0,003	<i>H</i> =5,740 <i>p</i> =0,219	<i>F</i> = 0,827 <i>p</i> = 0,523 <i>gl</i> =6, 24	<i>H</i> =3,090 <i>p</i> =0,543

PT: postratamiento, TDP: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado de pupa, TDA: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado adulto, PP: Peso de las pupas (mg), Fec: Fecundidad acumulada luego de 6 días, Fert: Fertilidad acumulada luego de 6 días. 100, 250 y 500 refieren a las diferentes concentraciones evaluadas en µg/ml. Los datos corresponden a las medias (± Error estándar). Las medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn, *p* < 0,05).

* No se cuenta con estos datos debido al elevado porcentaje de mortalidad larval.

¹ Test de Kruskal-Wallis.

² ANOVA de una vía.

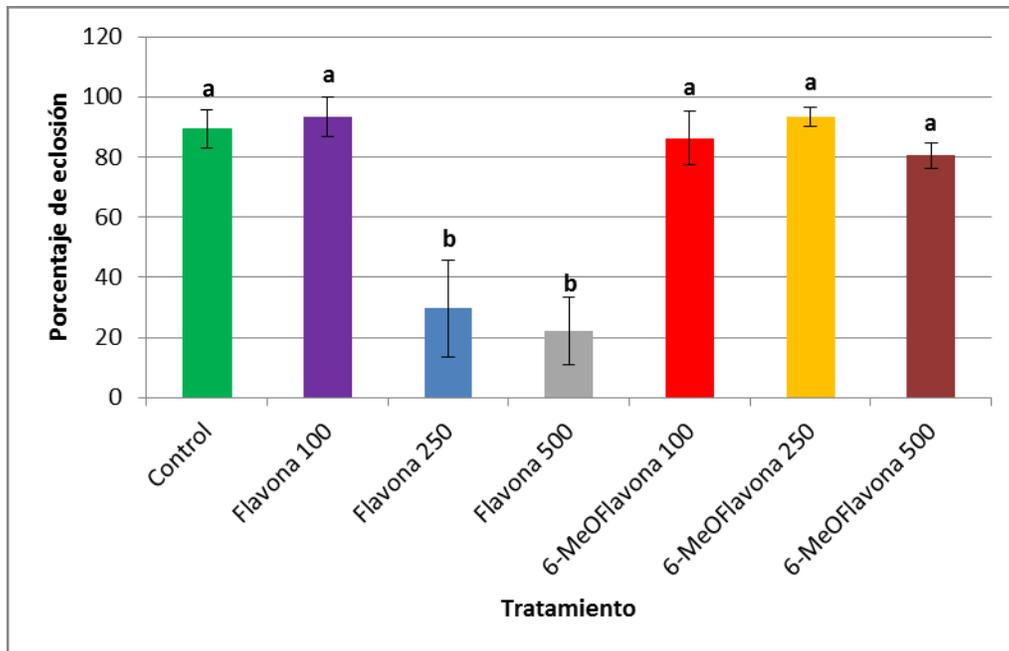


Figura 6.1: Porcentaje de eclosión de huevos de *Tuta absoluta* tratados con menos de 24 horas de desarrollo con flavona y 6-metoxiflavona a diferentes concentraciones. Los datos corresponden a las medias \pm error estándar. 100, 250 y 500 refieren a las diferentes concentraciones evaluadas en $\mu\text{g/ml}$. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.

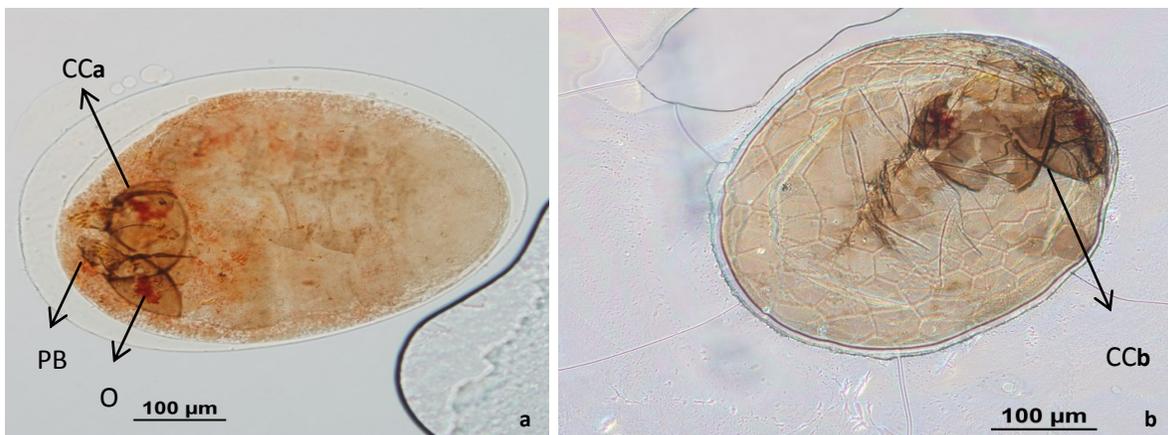


Figura 6.2: Embriones de *Tuta absoluta* completamente desarrollados. Las imágenes corresponden a huevos de menos de 24 horas de desarrollo tratados con flavona a 250 (a) y 500 (b) $\mu\text{g/ml}$ y fijados a los 10 días postratamiento. CC: Cápsula cefálica; PB: Piezas bucales; O: Ojos.

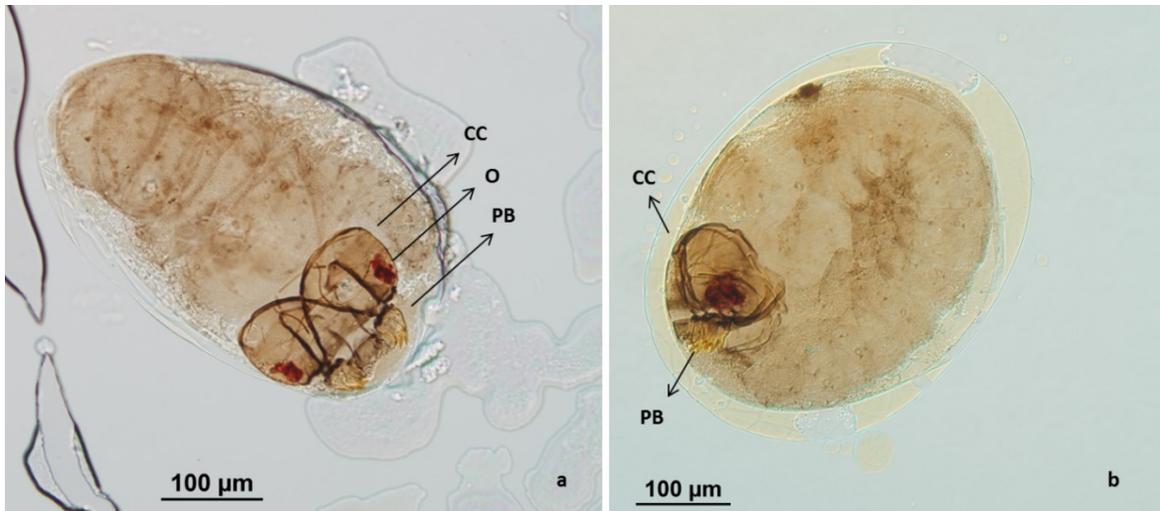


Figura 6.3: Embriones de *Tuta absoluta* completamente desarrollados. Las imágenes corresponden a huevos tratados entre las 48 y 72 horas de desarrollo con flavona a 250 (a) y 500 (b) $\mu\text{g}/\text{ml}$ y fijados a los 10 días postratamiento. CC: Cápsula cefálica; PB: Piezas bucales; O: Ojos.

Con respecto a la supervivencia de las larvas provenientes de huevos tratados con menos de 24 horas de desarrollo, las cuales fueron individualizadas a las 48 horas postemergencia, no se observaron diferencias significativas para los diferentes tratamientos (Log-rank, $\chi^2= 4,043$, $gl= 4$, $p= 0,400$).

Además, en lo referente a los efectos subletales sobre el tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa y el de adulto, si bien el análisis estadístico muestra diferencias entre los distintos tratamientos, éstas son del orden de un día o menos. Con respecto al peso de las pupas y efectos sobre la reproducción, no se encontraron diferencias entre los distintos tratamientos (Tabla 6.1).

Bioensayos sobre larvas de segundo estadio

Exposición de larvas de segundo estadio a discos de hoja de tomate tratados con los diferentes compuestos:

Los resultados de este bioensayo se detallan en la Tabla 6.2. El compuesto 6-metoxiflavona a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ causó un 100% de mortalidad de las larvas de segundo estadio a 24 horas postratamiento. El 70% de las larvas expuestas a discos tratados con este compuesto a dicha concentración se encontraron muertas sobre los discos de tomate o sobre las cápsulas; a su vez, no se observó que

estos discos presentaran el mesófilo comido. El 30% restante de las larvas se encontraron muertas intentando entrar a las minas (un 26%) (Figura 6.4) o en la mina (un 4%). Además, se registró un 33% de mortalidad de larvas expuestas a discos tratados con flavona a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dentro de los tres primeros días postratamiento. Por tanto, ambos compuestos a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ presentaron efecto insecticida difiriendo significativamente del control (Figura 6.5).

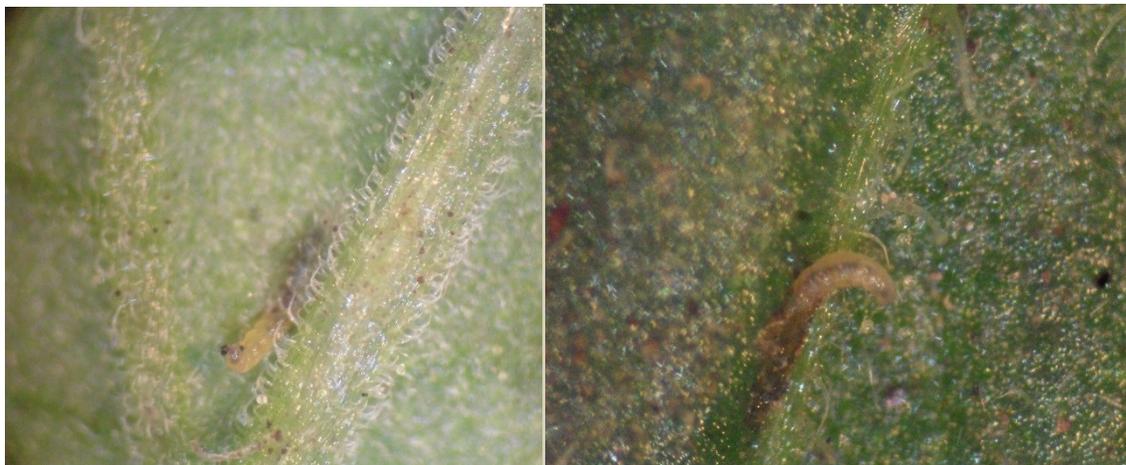


Figura 6.4: Larvas de segundo estadio de *Tuta absoluta* muertas al ingresar al mesófilo de discos de tomate tratados con 6-metoxiflavona a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las imágenes fueron tomadas a 24 horas postratamiento.

El escaso consumo de alimento tratado con 6-metoxiflavona a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 24 horas postratamiento, seguramente se encuentre relacionado a su potente efecto insecticida. Por otro lado, a 48 horas postratamiento, las larvas expuestas a discos tratados con los diferentes compuestos y concentraciones exhiben un consumo variable: si bien con 6-metoxiflavona a 250 y 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y con flavona a 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ el consumo fue menor con respecto al control, para la flavona a 250 y 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ el consumo fue mayor.

Existen numerosos trabajos en los cuales se evalúa el efecto insecticida y fagodisuasivo de diferentes flavonoides, ya sean flavonas, flavonoles o isoflavonas. Dentro de las flavonas, la gran diversidad estructural que presentan dado por el tipo de sustituyente y el grado de sustitución sobre sus anillos, fundamentalmente sobre los anillos A y B, generan una amplia gama de actividades que van desde compuestos fuertemente insecticidas hasta compuestos completamente inactivos. Así, la 6-metilflavona presentó un efecto fagodisuasivo sobre

Spodoptera litura mientras que la 6-hidroxiflavona fue inactiva (Morimoto *et al.*, 2003) y la 5-hidroxi-3,6,7,8-tetrametoxiflavona presentó una fuerte actividad fagodisuasiva frente a *S. litura* mientras que el agregado de un sustituyente metoxi en la posición 4' generó un compuesto muy poco activo (Morimoto *et al.*, 2000). A su vez, se ha observado que la respuesta de un insecto a un determinado flavonoide cambia completamente según el estadio de desarrollo y la concentración evaluada ya que a bajas concentraciones puede ser estimulante de la alimentación y a concentraciones mayores ser fagoinhibidor (Díaz Napal y Palacios, 2015; Simmonds, 2001). La variabilidad de respuesta de los insectos frente a las flavonas también se observó en diferentes especies del mismo orden e incluso del mismo género (Moreira *et al.*, 2004; Simmonds *et al.*, 1990).

Esta amplia variabilidad estructural de las flavonas y las diversas respuestas de los insectos a las mismas y a sus diferentes concentraciones, tanto intraespecie como interespecie, vuelve compleja la discusión de los resultados del presente trabajo a la luz de otras investigaciones sobre la bioactividad de flavonoides.

De todos modos, pueden encontrarse algunos elementos en común que sirven como punto de partida para el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo.

La actividad de la flavona como insecticida e inhibidora del desarrollo larval sobre lepidópteros fue observada por Romanelli *et al.* (2010) sobre *Spodoptera frugiperda* y por Mahoney *et al.* (1989) sobre *Amyelois transitella* en tanto que Morimoto *et al.* (2003) y Medeiros *et al.* (1994) describen para la flavona y la 6-metoxiflavona un efecto antialimentario sobre larvas de *S. litura* y *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) respectivamente.

Tabla 6.2: Área foliar consumida y efectos subletales de flavona y 6-metoxiflavona a diferentes concentraciones sobre larvas de segundo estadio de *Tuta absoluta* expuestas a discos de hojas de tomate tratados.

	ÁREA CONSUMIDA (mm ²)		EFECTOS SUBLETALES				
	24 hs PT ¹	48 hs PT ¹	TDP ¹	TDA ¹	PP ¹	Fec ²	Fert ²
CONTROL	2,29 (±0,327) b	5,817 (±0,58) bc	10,321 (±0,163) a	17,464 (±0,209) a	3,386 (±0,101) a	119,6 (±6,816) a	105,4 (±4,411) a
Flavona 100	1,716 (±0,305) b	5,984 (±0,792) abc	10,846 (±0,233) ab	18,231 (±0,250) ab	3,369 (±0,113) a	120,4 (±10,866) a	104,6 (±7,201) a
Flavona 250	1,851 (±0,243) b	8,112 (±0,627) c	11,083 (±0,119) abc	18,583 (±0,180) abc	3,446 (±0,137) a	120,6 (±6,772) a	111 (±6,671) a
Flavona 400	1,419 (±0,151) b	3,546 (±0,350) ab	11,407 (±0,228) bcd	19,037 (±0,210) bcd	3,333 (±0,147) a	115,2 (±4,810) a	104,8 (±4,576) a
Flavona 500	3,523 (±0,699) b	7,221 (±1,162) abc	12,050 (±0,153) cd	19,300 (±0,206) bcd	3,265 (±0,166) a	117,2 (±8,015) a	105 (±6,716) a
6-MeOFlavona 100	1,575 (±0,165) b	4,707 (±0,423) abc	11,231 (±0,178) abc	18,808 (±0,208) bc	3,258 (±0,123) a	121,4 (±2,943) a	110,4 (±3,28) a
6-MeOFlavona 250	1,443 (±0,199) b	3,231 (±0,236) a	12,207 (±0,195) d	20,310 (±0,244) d	3,148 (±0,117) a	119 (±7,204) a	103,6 (±5,81) a
6-MeOFlavona 400	1,749 (±0,305) b	3,804 (±0,55) ab	11,708 (±0,244) bcd	19,625 (±0,334) cd	3,779 (±0,159) a	119 (±7,583) a	99 (±4,637) a
6-MeOFlavona 500	0,121 (±0,045) a	----- *	----- *	----- *	----- *	----- *	----- *
p < 0,05	H=54,143 p<0,0001	H=43,43 p<0,0001	H=54,735 p<0,0001	H=65,283 p<0,0001	H=12,055 p=0,099	F= 0,078 p=0,999 gl=7, 39	F= 0,469 p=0,850 gl=7,39

PT: postratamiento, TDP: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado de pupa, TDA: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado adulto, PP: Peso de las pupas (mg), Fec: Fecundidad acumulada luego de 6 días, Fert: Fertilidad acumulada luego de 6 días. 100, 250, 400 y 500 refieren a las diferentes concentraciones evaluadas en µg/ml. Los datos corresponden a las medias (± Error estándar). Las medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn, p < 0,05).

* No se cuenta con estos datos debido al elevado porcentaje de mortalidad de las larvas.

¹ Test de Kruskal-Wallis.

² ANOVA de una vía.

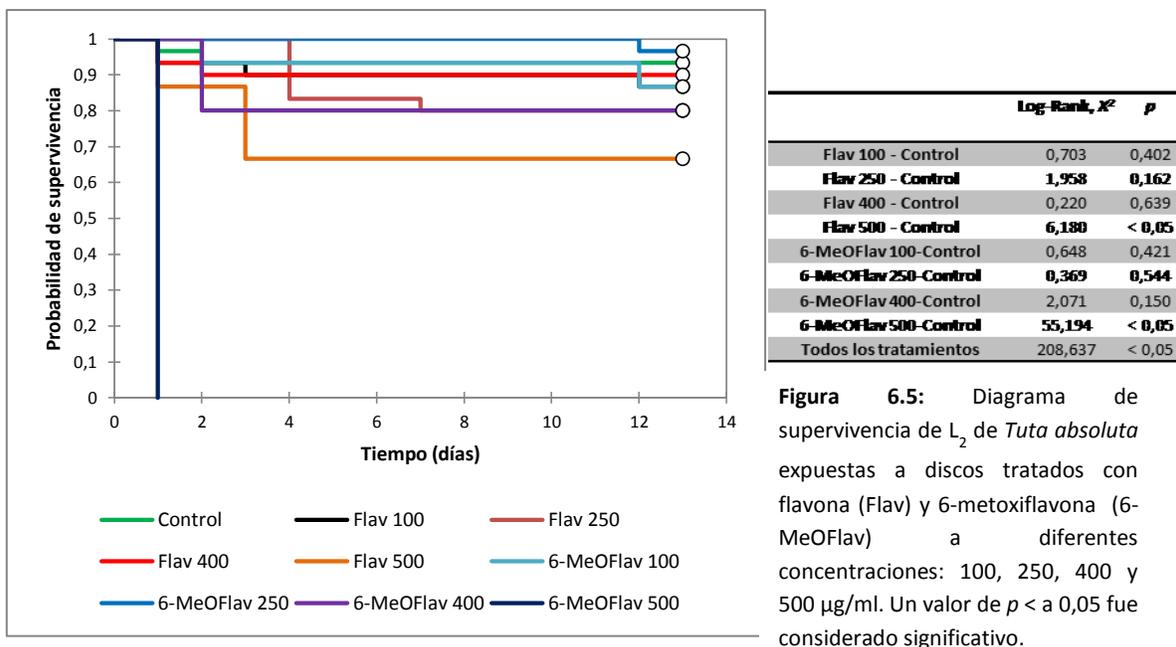


Figura 6.5: Diagrama de supervivencia de L_2 de *Tuta absoluta* expuestas a discos tratados con flavona (Flav) y 6-metoxiflavona (6-MeOFlav) a diferentes concentraciones: 100, 250, 400 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Las larvas de lepidópteros presentan un sistema de detoxificación de xenobióticos que les ha permitido alimentarse de plantas con una amplia variedad de compuestos químicos tóxicos. Obviamente, para aquellas especies de lepidópteros polífagas, la gama de compuestos a las que se encuentran expuestas al alimentarse es mucho mayor que para especies oligófagas. La primera fase en este proceso de detoxificación implica la modificación química del xenobiótico de modo tal que sea menos tóxico para el insecto o que sea más fácil su excreción. Estas modificaciones, que generalmente involucran la hidroxilación de los compuestos, se realizan por la acción de un conjunto de enzimas que pertenecen a una amplia familia de hemoproteínas conocidas como citocromos P450. Los genes que codifican para dichas enzimas tienen su máxima expresión en la zona del digestivo medio por lo cual se considera a este órgano como el principal responsable de la detoxificación en insectos (Schuler 2011; Wang *et al.*, 2015 a, b). En este sentido, estudios realizados sobre larvas de *S. litura* muestran un nivel de transcritos de citocromos P450 mucho mayor en la zona media del sistema digestivo luego de ser alimentadas con dieta artificial que contenía flavona, mientras que el bloqueo de este proceso de transcripción generó un aumento en la susceptibilidad de las larvas a estos compuestos (Wang *et al.*, 2015, a).

Como se mencionó anteriormente, como resultado de la exposición de L_2 de *T. absoluta* a discos de tomate tratados con 6-metoxiflavona y con flavona a 500 $\mu\text{g/ml}$ se observó un efecto

insecticida, dicho efecto fue mucho mayor para la 6-metoxiflavona en comparación con la flavona. Si bien el 66% de las larvas muertas por la 6-metoxiflavona no habían alcanzado el mesófilo, las larvas pudieron haber intentado ingresar al mismo ingiriendo algo de producto. Esto, sumado a las larvas que murieron intentando ingresar al mesófilo y a las que murieron dentro del mismo hace pensar que la principal vía de intoxicación fue por ingestión.

Morimoto *et al.* (2003) analizaron las posibles relaciones entre la estructura de diversas flavonas y su bioactividad concluyendo que los sustituyentes sobre el anillo B disminuyen el efecto fagodisuasivo mientras que los sustituyentes en posición 6 sobre el anillo A lo incrementan. Si bien se observa que las larvas de *T. absoluta* alimentadas con discos de tomate tratados con 6-metoxiflavona a 250 y 400 µg/ml presentaron un consumo menor con respecto al control con un IIA de 45% y 35% respectivamente, esos valores no permiten pensar a la 6-metoxiflavona como un buen fagodisuasivo.

Con respecto a los efectos subletales, las larvas expuestas a discos tratados con 6-metoxiflavona a 250 y 400 µg/ml y con flavona a 400 y 500 µg/ml presentaron los mayores tiempos de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa y adulto. Para el caso de la 6-metoxiflavona y la flavona a 400 µg/ml, se podría pensar en la relación menor consumo de alimento – mayor tiempo de desarrollo, sin embargo esta relación no puede establecerse para los tratamientos con flavona a 500 µg/ml. En este caso, un mayor consumo de alimento parece haber afectado negativamente a las larvas de *T. absoluta* las cuales vieron aumentado su tiempo de desarrollo. En relación al peso de las pupas y los efectos sobre la fecundidad y fertilidad, no se observaron diferencias para ninguno de los tratamientos realizados (Tabla 6.2).

Tratamiento de discos de hoja de tomate con la larva dentro del mesófilo:

Los resultados de este bioensayo se detallan en la Tabla 6.3. Se observó un 100% de mortalidad de larvas que se encontraban dentro del mesófilo de discos de tomate tratados con flavona y 6-metoxiflavona a 500 µg/ml. Esta mortalidad se observó entre las 48 y las 144 horas postratamiento registrándose la mayor mortalidad a las 72 horas postratamiento (Figura 6.6). Para este tiempo, el 100% de las larvas expuestas a la flavona y el 73% de las larvas expuestas a 6-metoxiflavona, ambas a 500 µg/ml, se encontraron muertas fuera de la mina o saliendo de ella

(Figura 6.7). Exceptuando dichos tratamientos, no se observó una mortalidad significativa de larvas para ninguna de las flavonas a 100, 250 y 400 µg/ml con respecto al control (Figura 6.6).

Se sabe que la flavona actúa principalmente inhibiendo la respiración mitocondrial y, además, es un inhibidor específico de enzimas implicadas en procesos de oxidación y reducción. Por el contrario, no se conoce el modo de acción de la 6-metoxiflavona (Wang *et al.*, 2015, a). Para los bioensayos realizados sobre *T. absoluta*, se propone como principal vía de contaminación la ingestión. Para los tratamientos con ambas flavonas a 500 µg/ml, la mayoría de las larvas respondieron saliendo de las minas en las que se encontraban. La posterior muerte de las mismas a dicha concentración hace pensar en la posibilidad de que las larvas no pudieran detoxificarse de ambos compuestos. Además, para estos tratamientos, se observó un menor consumo de alimento obteniéndose un IIA de 85% y de 78% para la flavona y la 6-metoxiflavona respectivamente, a 48 horas postratamiento.

En cambio, se observó que las larvas que se encontraban en el mesófilo de discos tratados con flavona a 100 µg/ml experimentaron, tanto a 24 como a 48 horas postratamiento, un consumo mucho mayor con respecto al control lo que permite plantear que la flavona a dicha concentración genera un efecto estimulante de la alimentación. El efecto fagodisuasivo a concentraciones mayores y estimulante de la alimentación a concentraciones menores fue observado también para otros flavonoides. Así, Blaney y Simmonds (1988) observan este efecto para la rutina al ser evaluada sobre larvas de *Heliothis zea* y, más recientemente, Díaz Napal y Palacios (2015) lo observan del (2S)-5,7-dihydroxiflavona sobre larvas de *S. frugiperda*.

Exceptuando los tratamientos con ambas flavonas a 500 µg/ml, se observó que, para el resto de los tratamientos, el consumo de alimento fue variable. Así, a 48 horas postratamiento se observó que las larvas expuestas a diferentes concentraciones de 6-metoxiflavona habían consumido una cantidad de alimento tratado similar. En cambio, las larvas expuestas a la flavona mostraron un consumo de alimento altamente variable entre las diferentes concentraciones (Tabla 6.3).

Si bien no puede plantearse un patrón entre consumo de alimento tratado y duración del tiempo de desarrollo sí se observa una clara relación entre algunas concentraciones evaluadas de ambas flavonas y un alargamiento en los tiempos de desarrollo. Así, la flavona a 250 y 400 µg/ml y la 6-metoxiflavona a 400 µg/ml causaron mayores tiempos de desarrollo tanto hasta alcanzar el estado de pupa como el de adulto.

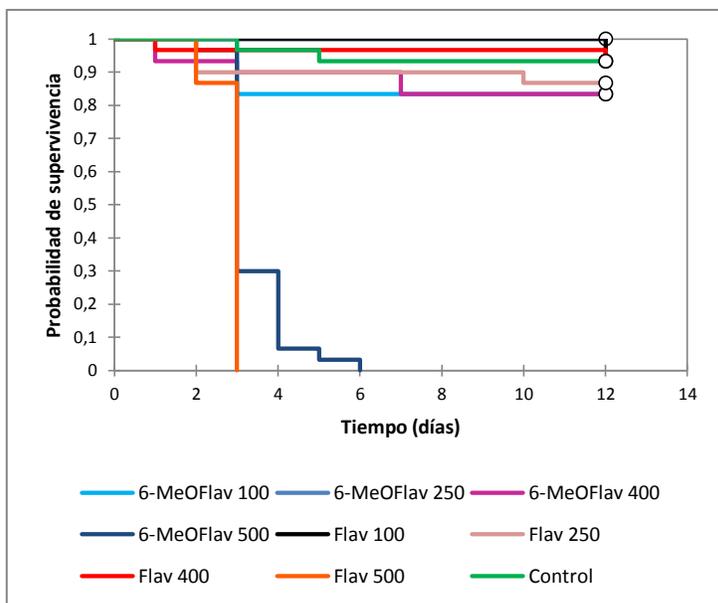
Tabla 6.3: Área foliar consumida y efectos subletales de flavona y 6-metoxiflavona a diferentes concentraciones sobre larvas de segundo estadio de *Tuta absoluta* que se encontraban en el mesófilo de discos de hojas de tomate al momento de ser tratados.

	ÁREA CONSUMIDA (mm ²)		EFECTOS SUBLETALES				
	24 hs PT ¹	48 hs PT ¹	TDP ¹	TDA ¹	PP ¹	Fec ¹	Fert ¹
CONTROL	7,54 (±1,33) bc	23,802 (±1,97) de	8,750 (±0,142) a	15,964 (±0,158) a	3,254 (±0,096) a	114,4 (±9,801) a	100,2 (±6,96) a
Flavona 100	12,334 (±1,688) c	33,82 (±2,401) e	8,750 (±0,197) a	15,821 (±0,236) a	3,482 (±0,142) a	135,8 (±12,595) a	126,8 (±12,241) a
Flavona 250	2,747 (±0,493) a	9,705 (±1,322) abc	10,038 (±0,171) b	17,308 (±0,173) b	3,565 (±0,144) a	120,4 (±5,802) a	107,6 (±4,874) a
Flavona 400	8,427 (±0,86) c	23,098 (±2,553) de	10,107 (±0,214) b	17,786 (±0,238) bc	3,379 (±0,117) a	112 (±6,519) a	99,2 (±4,164) a
Flavona 500	2,500 (±0,552) a	3,498 (±0,676) a	----- *	----- *	----- *	----- *	----- *
6-MeOFlavona 100	3,879 (±0,514) ab	15,449 (±1,753) cd	8,600 (±0,153) a	16,120 (±0,145) a	3,220 (±0,094) a	120,4 (±9,003) a	108,4 (±7,215) a
6-MeOFlavona 250	5,713 (±0,433) bc	11,692 (±1,056) bc	8,600 (±0,113) a	16,233 (±0,177) a	3,397 (±0,110) a	118 (±12,116) a	105,8 (±10,224) a
6-MeOFlavona 400	2,750 (±0,298) a	14,639 (±1,183) cd	10,600 (±0,200) b	19,200 (±0,183) c	3,304 (±0,086) a	118 (±1,378) a	100,6 (±0,927) a
6-MeOFlavona 500	3,207 (±0,762) a	5,279 (±1,032) ab	----- *	----- *	----- *	----- *	----- *
<i>p</i> < 0,05	<i>H</i> =96,166 <i>p</i> <0,0001	<i>H</i> =147,271 <i>p</i> <0,0001	<i>H</i> =86,068 <i>p</i> <0,0001	<i>H</i> =99,887 <i>p</i> <0,0001	<i>H</i> =3,410 <i>p</i> =0,756	<i>H</i> =2,557 <i>p</i> =0,862	<i>H</i> =5,126 <i>p</i> =0,528

PT: postratamiento, TDP: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado de pupa, TDA: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado adulto, PP: Peso de las pupas (mg), Fec: Fecundidad acumulada luego de 6 días, Fert: Fertilidad acumulada luego de 6 días. 100, 250, 400 y 500 refieren a las diferentes concentraciones evaluadas en µg/ml.). Los datos corresponden a las medias (± Error estándar). Las medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn, *p* < 0,05).

* No se cuenta con estos datos debido al elevado porcentaje de mortalidad larval.

¹ Test de Kruskal-Wallis.



	Log-Rank, χ^2	p
Flav 100-Control	0,002	0,966
Flav 250-Control	0,753	0,386
Flav 400-Control	0,000	1,000
Flav 500-Control	53,260	<0,005
6-MeOFlav 100- Control	1,457	0,227
6-MeOFlav 250- Control	2,034	0,154
6-MeOFlav 400- Control	1,432	0,231
6-MeOFlav 500- Control	61,496	<0,005
Todos los tratamientos	232,683	<0,005

Figura 6.6: Diagrama de supervivencia de L_2 de *Tuta absoluta* que se encontraban dentro de discos de tomate tratados con flavona (Flav) y 6-metoxiflavona (6-MeOFlav) a diferentes concentraciones: 100, 250, 400 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.



Figura 6.7: Larvas que se encontraban dentro del mesófilo de discos tratados con 6-metoxiflavona a 500 $\mu\text{g/ml}$. A la izquierda, larva muerta saliendo de la mina, 72 horas postratamiento. Derecha: Larva fuera de la mina 48 horas postratamiento. Nótese la coloración de la larva, indicativa de ausencia de alimento en su tubo digestivo.

La variabilidad en el consumo de alimento tratado así como las variaciones observadas en los tiempos de desarrollo para los diferentes tratamientos, no se vieron reflejadas en el peso de las pupas ni sobre la reproducción (Tabla 6.3).

Bioensayos sobre larvas de cuarto estadio

Los resultados de este bioensayo se detallan en la Tabla 6.4. El análisis de supervivencia realizado para larvas de cuarto estadio indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Log-rank, $\chi^2=74,49$; $gl= 6$; $p<0,0001$).

Tabla 6.4: Efectos subletales de flavona y 6-metoxiflavona a diferentes concentraciones sobre larvas de cuarto estadio de *Tuta absoluta*. Tratamiento por contacto (tópico).

	TDP ¹	TDA ¹	PP ¹	Fecundidad ²	Fertilidad ²
CONTROL	3,667 (±0,121) a	11,433 (±0,149) a	3,550 (±0,148) b	113,2 (±6,414) a	104 (±4,037) a
Flavona 0,05 µg/larva	3,900 (±0,147) ab	11,533 (±0,133) a	3,717 (±0,111) b	114,6 (±6,683) a	106 (±4,301) a
Flavona 0,125 µg/larva	4,233 (±0,114) b	12,567 (±0,190) b	3,653 (±0,143) b	109,6 (±5,921) a	102 (±5,010) a
Flavona 0,25 µg/larva	4,167 (±0,118) ab	12,067 (±0,166) ab	3,547 (±0,113) b	115,4 (±7,104) a	106 (±4,037) a
6-MeOFlavona 0,05 µg/larva	4,034 (±0,116) ab	11,793 (±0,135) ab	3,455 (±0,098) b	109,8 (±6,800) a	101 (±5,244) a
6-MeOFlavona 0,125 µg/larva	4,000 (±0,149) ab	11,897 (±0,152) ab	3,214 (±0,096) ab	117,2 (±6,711) a	103,8 (±3,308) a
6-MeOFlavona 0,25 µg/larva	4,471 (±0,174) b	12,118 (±0,169) ab	2,800 (±0,068) a	108 (±9,211) a	101 (±5,307) a
<i>p</i> < 0,05	<i>H</i> = 17,476 <i>p</i> =0,008	<i>H</i> =30,554 <i>p</i> <0,0001	<i>H</i> =30,422 <i>p</i> <0,0001	<i>F</i> =0,241 <i>p</i> =0,959 <i>gl</i> =6, 33	<i>F</i> =0,225 <i>p</i> =0,965 <i>gl</i> =6, 33

PT: postratamiento, TDP: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado de pupa, TDA: Tiempo de desarrollo (días) hasta alcanzar el estado adulto, PP: Peso de las pupas (mg), Fec: Fecundidad acumulada luego de 6 días, Fert: Fertilidad acumulada luego de 6 días. Los datos corresponden a las medias (± Error estándar). Las medias dentro de cada columna seguidas de letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de comparaciones múltiples por pares de Dunn, $p < 0,05$).

¹ Test de Kruskal-Wallis.

² ANOVA de una vía.

Dicha diferencia puede adjudicarse al tratamiento con 6-metoxiflavona dado que solo en este caso se observó un porcentaje importante de mortalidad larval, del 43,33%, dentro de los 5 días posteriores al tratamiento. Además, se observaron mayores tiempos de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa y menores pesos pupales para el tratamiento con este compuesto a 0,25 µg/larva (Tabla 6.4).

Tiempos de desarrollo mayores con respecto al control y al resto de los tratamientos se observaron también para las larvas tratadas con flavona a 0,125 y 0,25 µg/larva. En lo que concierne a la fecundidad y fertilidad, no se observaron diferencias entre los tratamientos (Tabla 6.4).

Por tanto, en lo referente a este bioensayo, resulta relevante la acción insecticida de la 6-metoxiflavona. Tanto la flavona como la 6-metoxiflavona no han sido evaluadas de manera tóxica sobre lepidópteros aunque sí se han evaluado otros flavonoides. En este sentido, Moreira *et al.* (2004), evaluaron sobre larvas de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Pyralidae), *Dione juno juno* (Lepidoptera: Nymphalidae) y *T. absoluta* los compuestos 5,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona, cumarina y 5,6,7,8,3'-pentametoxy-4',5'-metilendioxi-flavona. Las flavonas mostraron actividad insecticida solo sobre *D. juno juno* mientras que la cumarina causó mortalidad de larvas de las tres especies siendo la menos susceptible *T. absoluta*.

Estos resultados vuelven a poner en relieve no sólo la diversidad de respuestas de los insectos frente a la amplia variabilidad estructural de las flavonas sino también la gran diversidad de respuestas interespecíficas frente a los mismos compuestos.

Capítulo 7

Conclusiones

De acuerdo a los resultados y la discusión de los mismos expuestos en los capítulos precedentes, es posible concluir que:

Los heteropoliácidos con estructura de Preyssler, que se prepararon mediante técnicas que implican etapas sencillas tanto en su preparación como en el aislamiento y la purificación, resultan aplicables para la preparación tanto de ésteres alquílicos sencillos de ácidos cinámicos como de flavonas.

En referencia a la preparación de cinamatos de alquilo, aquella realizada para el cinamato de propilo resultó ser muy buena con cualquiera de los dos catalizadores heteropoliácidos. Esto se debe probablemente a la mayor temperatura a la cual se desarrolló la reacción con respecto a las preparaciones de los otros cinamatos. Para el cinamato de propilo, los mejores rendimientos se obtuvieron utilizando el heteropoliácido que posee molibdeno en su estructura. A su vez, en la preparación del éster etílico se observó que los rendimientos se reducen sustancialmente con ambos catalizadores, manteniéndose un resultado levemente superior en el caso del heteropoliácido con molibdeno. La diferencia entre ambos es atribuible a la presencia de un átomo de molibdeno en la estructura del ácido el cual modifica la simetría al incorporar un átomo de menor radio atómico, hecho que aumenta la acidez del heteropolicompuesto. Para el cinamato de metilo, no se observan diferencias sustanciales en los rendimientos obtenidos con los diferentes catalizadores.

Con respecto a la preparación de flavonas siguiendo la metodología de Baker-Venkataraman, los heteropoliácidos con estructura de Preyssler utilizados para catalizar la última etapa de obtención de las flavonas permitieron obtener muy buenos rendimientos en un tiempo breve y sin involucrar el uso de solventes.

Por otra parte, se optimizaron las condiciones para la reacción de ciclodeshidratación de 2-hidroxidibenzoímetanos para dar flavonas usando como catalizador hidrogenosulfato de potasio. Para ello, se tuvieron en cuenta diferentes variables: temperatura, tiempo de reacción y cantidad de catalizador. Las condiciones óptimas fueron: 120°C, 2 horas de reacción y 200 mg de catalizador para 0,5 mmol de sustrato (2-hidroxidibenzoímetano). La reacción se realizó en ausencia de solvente, el aislamiento fue muy sencillo, los productos se formaron con altos rendimientos sin requerir de una ulterior purificación, y el catalizador pudo ser reutilizado en cuatro reacciones sucesivas sin que pierda actividad. Se concluye entonces que el hidrogenosulfato de potasio es un

buen catalizador para la reacción de formación de flavonas a partir de 2-hidroxidibenzoílmétanos, que el procedimiento es de gran simpleza operativa, y que la reacción es limpia, permitiendo obtener muy buenos rendimientos de las flavonas deseadas resultando ser, por tanto, altamente eficiente. Adicionalmente, el catalizador no involucra metales pesados.

En referencia a la evaluación de la bioactividad, tanto los cinamatos de metilo y de etilo como la flavona mostraron bioactividad sobre huevos menores a 24 horas de desarrollo de *T. absoluta*. Los huevos tratados con ambos cinamatos a 500 µg/ml, mostraron un 100% de mortalidad mientras que aquellos tratados con flavona a 250 y 500 µg/ml exhibieron, a su vez, un elevado porcentaje de mortalidad: 73 y 77% respectivamente. Los preparados realizados de dichos huevos muestran, para los que fueron tratados con ambos cinamatos, un detenimiento en el desarrollo embrionario mientras que, para aquellos tratados con la flavona, no se observa tal efecto. Por tanto, si bien ambos tipos de compuestos presentan un gran poder ovicida, el modo de acción resulta ser completamente diferente. Para los cinamatos se propone, como posible explicación a los resultados observados, un bloqueo del intercambio respiratorio del embrión como consecuencia del ingreso y permanencia de los compuestos en los aerópilos, los cuales atraviesan el corion del huevo (para la discusión ver *Evaluación de la actividad biológica de cinamatos de alquilo sobre Tuta absoluta*). En cambio para la flavona, se plantea una posible acumulación del compuesto en la capa epiembrionaria la cual, al disolverse previamente a la eclosión de las larvas, habría permitido que el compuesto tome contacto con el embrión manifestando su efecto tóxico por contacto. A su vez, las larvas provenientes de huevos tratados con flavona a las concentraciones mencionadas se encontraron muertas dentro de las primeras 24 horas post-eclosión. Dado que tanto para poder emerger del huevo como para ingresar al mesófilo las larvas tuvieron que ingerir algo de corion y de hoja de tomate tratados con el compuesto, se propone una intoxicación tanto por contacto como por ingestión para explicar la mortalidad de las larvas (para la discusión, ver *Evaluación de la actividad biológica de flavonas sobre Tuta absoluta*).

El efecto ovicida de los cinamatos mostró ser dependiente de la concentración dado que solo se observó este efecto a la máxima concentración evaluada. Para la flavona, este efecto se observa para las dos concentraciones más altas utilizadas. En cambio, la 6-metoxiflavona no tuvo efecto insecticida a ninguna de las concentraciones ensayadas sugiriendo que la presencia del grupo metoxilo en la posición 6 sería responsable de la pérdida de bioactividad del compuesto.

Solo se evidenciaron efectos subletales en larvas provenientes de huevos tratados con menos de 24 horas de desarrollo, con cinamato de etilo a 375 µg/ml. Para este tratamiento, se observaron tiempos mayores de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa y el de adulto, en un orden de dos días aproximadamente con respecto al control, y menores pesos de las pupas. Dado que las larvas neonatas tuvieron como primer dieta alimento tratado durante las primeras 48 horas post-eclosión, se propone que, a dicha concentración, el compuesto podría haber presentado un efecto fagodisuasivo causando que las larvas ingieran menos alimento, lo cual podría haber causado los menores pesos de las pupas y mayores tiempos de desarrollo observados.

Con respecto a los tratamientos realizados para evaluar la bioactividad de los cinamatos de metilo y de etilo sobre larvas de segundo estadio se observó que, bajo los diseños experimentales empleados, ninguno de los dos compuestos tuvo efecto insecticida. En cambio, se observó que larvas expuestas a discos de hojas de tomate tratados con cinamato de etilo a 250 y 500 µg/ml presentaron un menor consumo de alimento tratado mientras que aquellas expuestas a discos tratados con cinamato de etilo a 100 µg/ml presentaron un consumo mayor. Este mayor o menor consumo por parte de las larvas de segundo estadio no se vio reflejado en diferencias en los tiempos de desarrollo, peso de las pupas ni sobre los parámetros reproductivos evaluados. Por tanto, se concluye que el cinamato de etilo a 250 y 500 µg/ml exhibió un efecto fagodisuasivo con un Índice de Inhibición Alimentaria (IIA) del 53,8% a las 48 horas postratamiento. Este efecto fagodisuasivo del cinamato de etilo fue observado además por otros investigadores que experimentaron sobre lepidópteros y coleópteros y, tal como se mencionó anteriormente, fue propuesto también en este trabajo de tesis para explicar los mayores tiempos de desarrollo y menores pesos pupales de larvas provenientes de huevos tratados con este compuesto a 375 µg/ml.

En cambio, no se observan efectos significativos sobre el consumo ni sobre el tiempo de desarrollo y parámetros reproductivos, para ninguno de los tratamientos realizados con los cinamatos sobre larvas de segundo estadio que se encontraban dentro del mesófilo de los discos de tomate al momento de ser tratadas, por lo que se concluye que los cinamatos de etilo y de metilo no tienen acción translaminar.

A diferencia de lo observado para los cinamatos, los resultados de los tratamientos realizados para evaluar la bioactividad de flavonas sobre larvas de segundo estadio muestran un importante efecto insecticida. Larvas de segundo estadio que fueron expuestas a discos de tomate tratados

con flavona y 6-metoxiflavona a 500 µg/ml mostraron un 33% y un 100% de mortalidad respectivamente mientras que aquellas larvas que se encontraban dentro del mesófilo de los discos al momento de ser tratadas mostraron un 100% de mortalidad con ambas flavonas a la concentración mencionada, expresando un menor consumo a las 48 horas postratamiento (IIA de 85% para la flavona y 78% para la 6-metoxiflavona) y el mayor porcentaje de mortalidad a las 72 horas postratamiento.

A su vez, para ambos tipos de ensayo, se observaron efectos subletales sobre el tiempo de desarrollo. Así, las larvas de segundo estadio que fueron expuestas a discos tratados con flavona a 400 y 500 µg/ml y con 6-metoxiflavona a 250 y 400 µg/ml mostraron tiempos de desarrollo mayores hasta alcanzar el estado de pupa y el de adulto. El mismo efecto se observó para larvas de segundo estadio que se encontraban dentro del mesófilo de los discos de tomate al momento de ser tratadas con flavona a 250 y 400 µg/ml y con 6-metoxiflavona a 400 µg/ml.

Para ambos tipos de ensayo sobre larvas de segundo estadio se propone que las flavonas expresan su toxicidad por ingestión no logrando las larvas, a la máxima concentración testeada, detoxificarse de los compuestos observándose un 100% de mortalidad, excepto para el tratamiento de exposición de L₂ a discos tratados con flavona a 500 µg/ml. A 400 µg/ml, se observaron mayores tiempos de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa y de adulto para ambos ensayos y para ambas flavonas.

Los bioensayos para los cuales se observó muy baja bioactividad corresponden a los realizados por aplicación tópica sobre el cuarto estadio larval. En este sentido, los cinamatos de etilo y de metilo no mostraron bioactividad significativa alguna, en cambio para el tratamiento con 6-metoxiflavona a 500 µg/ml se observó un 43% de mortalidad mientras que las larvas sobrevivientes mostraron un mayor tiempo de desarrollo hasta alcanzar el estado de pupa y lo hicieron con menores pesos.

En resumen:

- Los catalizadores heteropoliácidos con estructura de Preyssler resultan aplicables a la preparación de flavonas y cinamatos de alquilo de cadena corta. Para estos últimos solo se obtuvieron buenos rendimientos en la reacción de preparación del cinamato de propilo.

- El hidrogenosulfato de potasio es un buen catalizador que permitió obtener altos rendimientos de las flavonas preparadas, en reacciones limpias y de una gran simpleza operativa, pudiendo ser reutilizado en cuatro reacciones sucesivas sin disminuir prácticamente su actividad.
- Las flavonas presentan una variada e importante bioactividad sobre los diferentes estados y estadios de *T. absoluta* evaluados, siendo por tanto mucho más activas que los cinamatos de metilo y de etilo. Dicha bioactividad se ve reflejada en un fuerte poder insecticida a nivel de huevos y de larvas de segundo y cuarto estadios así como en la presencia de efectos fagodisuasivos y modificaciones en los tiempos de desarrollo de larvas de segundo estadio.
- El cinamato de etilo mostró una serie de bioactividades variadas (efecto ovicida, efecto fagodisuasivo y extensión de tiempos de desarrollo) con respecto al cinamato de metilo que solo mostró efecto ovicida. Sin embargo, la bioactividad del cinamato de etilo solo se expresó cuando los organismos contactaron con el compuesto sobre la hoja de tomate no observándose bioactividad cuando se encontraron dentro de ella. Dado que *T. absoluta* presenta un hábito minador, de los cuatro compuestos evaluados en esta tesis, los cinamatos de metilo y de etilo no resultan ser los más atractivos para el control de esta plaga.
- En cambio, las flavonas mostraron una amplia gama de bioactividades sobre huevos y larvas de *T. absoluta* siendo la 6-metoxiflavona la única de los cuatro compuestos evaluados en mostrar acción insecticida sobre larvas de cuarto estadio. Se observó a su vez una alta variabilidad de respuestas de acuerdo al estadio de desarrollo tratado. Así, el grupo metoxilo en posición 6 parece haber disminuido el efecto ovicida que sí presentó la flavona sin sustitución pero incrementado el efecto insecticida sobre larvas de segundo estadio. Por tanto, los diferentes estados de desarrollo de *T. absoluta* no responden de igual forma ante los mismos compuestos.

De acuerdo al conocimiento de quien escribe, este trabajo constituye el primero en encontrar un efecto ovicida de productos naturales sobre huevos de *T. absoluta*. Se considera necesario ampliar el perfil toxicológico de los diferentes compuestos aquí evaluados e incorporar otros, fundamentalmente en lo concerniente a las flavonas, así como estudios adicionales de su dinámica

ambiental y comportamiento en condiciones de semicampo. En tal sentido, se estima factible la continuidad de esta investigación.

Referencias bibliográficas

- Abdelgaleil SAM, Abbassy MA, Belal A-SH and Abdel Rasoul MAA. 2008. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. *Bioresour Technol* 99: 5947-5950.
- Adisakwattana S, Sookkongwaree K, Roengsumran S, Petsom A, Ngamrojnavanich N, Chavasiri W, Deesamer S and Yibchokanun S. 2004. Structure-Activity Relationship of *Trans*-Cinnamic Acid Derivatives on α -Glucosidase Inhibition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 2893-2896.
- Albert LA. 1997. Plaguicidas. En: Introducción a la toxicología ambiental, pp. 359-382. México. Centro panamericano de ecología humana y salud. División de salud y ambiente. OPS y OMS.
- Ali NAM, Rahmani M, Shaari K, Ali AM y Cheng Lian G. 2010. Antimicrobial activity of *Cinnamomum impressicostatum* and *C. pubescens* and bioassay-guided isolation of bioactive (E)-Methyl Cinnamate. *Journal of Biological Sciences* 10(2): 101-106.
- Alizadeh MH, Harmalker SP, Jeannin Y, Martin-Frere J and Pope MT. 1985. A heteropolyanion with fivefold molecular symmetry that contains a nonlabile encapsulated sodium ion. The structure and chemistry of $[\text{NaP}_5\text{W}_{30}\text{O}_{110}]_{14}^-$. *J. Am. Chem. Soc.* 107(9): 2662-2669.
- Allan J and Robinson R. 1924. CCXC.—An accessible derivative of chromonol. *Journal of the Chemical Society, Transactions* 125: 2192-2195.
- Alvord EB and Dietz HF. 1933. Control of insects on plants by chemical means. Recent developments. *Industrial and Engineering Chemistry* 25(6): 629-633.
- Anastas PT and Warner JC. 1998. Green Chemistry: theory and practice. Ed. S. Publications, Oxford University Press, New York, USA.
- Argerich CA. 2011. La importancia del cultivo de tomate en Argentina. Libro de Resúmenes del Taller “La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas”, pp. 4. UNLP e INTA, La Plata, Argentina. 7 y 8 de noviembre.
- Arnó J y Gabarra R. 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). *J Pest Sci* 84: 513–520.
- Asati RK, Singhala M and Saxena M. 2015. Isolation and characterization of antimicrobial flavones glycoside from the heartwood of *Terminalia belerica* Galaxy. *International Interdisciplinary Research Journal* 3(4): 16-19.

- Bajwa WI and Kogan M. 2002. *Compendium of IPM Definitions (CID) - What is IPM and how is it defined in the Worldwide Literature?* IPPC Publication No. 998, Integrated Plant Protection Center (IPPC), Oregon State University, Corvallis, USA.
- Baker W. 1933. Molecular rearrangement of some o-acyloxyacetophenones and the mechanism of the production of 3-acylchromones. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 322: 1381-1389.
- Bathia SP, Wellington GA, Cocchiara J, Lalko J, Letizia CS and Api AM. 2007. Fragrance material review on ethyl cinnamate. *Food and Chemical Toxicology* 45: S90–S94 (a).
- Bathia SP, Wellington GA, Cocchiara J, Lalko J, Letizia CS and Api AM. 2007. Fragrance material review on methyl cinnamate. *Food and Chemical Toxicology* 45: S113–S119 (b).
- Banerjee K and Mandal M. 2015. Oxidative stress triggered by naturally occurring flavone apigenin results in senescence and chemotherapeutic effect in human colorectal cancer cells. *Redox Biology* 5: 153–162.
- Baptista GC de. 2003. Breve historia de los insecticidas. En: Silva Aguayo G y Hepp Gallo R (Eds.), *Bases para el manejo racional de insecticidas*, pp. 19-27. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía / Fundación para la Innovación Agraria, Chillán.
- Barruti S. 2013. *Malcomidos. Cómo la industria alimentaria argentina nos está matando*. Editorial Planeta, Buenos Aires, Argentina. 463 pp.
- Baskar K and Ignacimuthu S. 2012. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory effects of ononitol monohydrate isolated from *Cassia tora* L. against *Helicoverpa armigera* (Hub.) and *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Chemosphere* 88: 384-388.
- Bate-Smith EC. 1968. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. *J. Linnean Soc. Bot.* 60: 325-383.
- Beament JWL and Lal R. 1957. Penetration through the Egg-shell of *Pieris brassicae* (L.). *Bulletin of Entomological Research* 48(1): 109-125.
- Beilstein FK. 1918. *Beilsteins handbuch der organischen chemie*. Springer.
- Bhatia SP, Wellington GA, Cocchiara J, Lalko J, Letizia CS and Api AM. 2007. Fragrance material review on ethyl cinnamate. *Food and Chemical Toxicology* 45: S90–S94.
- Blaney WM and Simmonds MSJ. 1988. Food selection in adults and larvae of three species of Lepidoptera: a behavioural and electrophysiological study. *Entomol Exp Appl* 49: 111-121.

- Bohm BA. 1998. Introduction to Flavonoids. Hardwood academic publishers, Singapur, 1998. ISBN 90-5702-353-9.
- Boland DJ, Brophy JJ and House APN. 1991. Eucalyptus Leaf Oils: use, chemistry, distillation and marketing. ISBN 0-909605-69-6. 252 pp.
- Boué SM and Raina AK. 2003. Effects of plant flavonoids on fecundity, survival and feeding of the Formosan subterranean termite. *Journal of Chemical Ecology*, Vol. 29, No. 1: 2575- 2584.
- Bratt K, Sunnerheim K, Nordenhem H, Nordlander G and Långström B. 2001. Pine weevil (*Hylobius abietis*) antifeedants from lodgepole pine (*Pinus contorta*). *J. Chem. Ecol.* 27: 2253-2262.
- Brunherotto R y Vendramim JD. 2001. Bioatividade de Extratos Aquosos de *Melia azedarach* L. Sobre o Desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro. *Neotropical Entomology* 30(3): 455-459.
- Brunherotto R, Vendramim JD y Goriani MA. 2010. Efeito de Genótipos de Tomateiro e de Extratos Aquosos de Folhas de *Melia azedarach* e de Sementes de *Azadirachta indica* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 39(5):784-791.
- Cagnotti C, Viscarret M, Riquelme M, Botto E, Carabajal L y López S. 2011. Estudios de radiobiología con rayos X en *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae): potencial para la aplicación de la Técnica del Insecto Estéril. Libro de Resúmenes del Taller “La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas”, pp. 8. UNLP e INTA, La Plata, Argentina. 7 y 8 de noviembre.
- Caparros-Megido R, Haubruge E y Verheggen FJ. 2012. First evidence of deuterotokous parthenogenesis in the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Pest Sci* 85: 409-412.
- Caparros-Megido R, Haubruge E y Verheggen FJ. 2013. Pheromone-based management strategies to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). A review. *Biotechnol Agron Soc Environ* 17: 475-482.
- Cappello V y Fortunato N. 2008. Plaguicidas en el territorio bonaerense: información toxicológica, ecotoxicológica y comportamiento ambiental. Dirección Provincial de Recursos Naturales, Programa Gestión Ambiental en Agroecosistemas, OPDS, Buenos Aires.
- Chang CT, Chen FC, Chen TS, Hsu KK, Ueng T and Hung M. 1961. Synthesis of 6-halogenoflavones and related compounds. *J. Chem. Soc.* 3414-3417. DOI: 10.1039/JR9610003414.

- Chapman RF. 2003. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annu Rev Entomol* 48: 455-484.
- Chee CF, Buckle MJC and Rahman NA. 2011. An efficient one-pot synthesis of flavones. *Tetrahedron Letters* 52: 3120–3123.
- Chen FC and Chang CT. 1958. Synthesis of 7-halogenoflavone and related compounds. *J. Chem. Soc.* 1958: 146-150.
- CNA. 2002. Censo Nacional Agropecuario. Sitio URL: http://www.indec.mecon.gov.ar/agropecuario/cna_principal.asp. Consultado en febrero de 2015.
- Coll Aráoz MV, Lizarraga E, Schneider MI, Virla E y Catalán CAN. 2015. Actividad biológica del aceite esencial de *Senecio nutans* y *S. viridis* (Asteraceae) sobre el minador del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Lilloa* 52 (Suplemento). IV Jornadas nacionales de plantas aromáticas nativas y sus aceites esenciales.
- Consoli FL, Parra JRP and Hassad SA. 1998. Side-effects of insecticides used in tomato fields on the egg parasitoid *Trichogramma pretiosum* Riley (Hym., Trichogrammatidae), a natural enemy of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae). *J. Appl. Ent.* 122: 43-47.
- Corrêa A y Sant'Ana J. 2007. Ecología Química de Insetos. En: Corrêa AG y Vieira PC (Orgs.), *Produtos naturais no controle de insetos*, pp. 9-17. EdUfCar: São Carlos.
- Crawford DJ. 1978. Flavonoid chemistry and angiosperm evolution. *Bot. Rev.* 44: 431-456.
- Da Cunha US, Vendramim JD, Rocha WC y Vieira PC. 2005. Potencial de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) Como Fonte de Substâncias com Atividade Inseticida Sobre a Traça-do-Tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 34(4): 667-673.
- Da Cunha US, Vendramim JD, Rocha WC y Vieira PC. 2006. Bioatividade de moléculas isoladas de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 37(6): 709-715.
- Da Silva CV, Schneider LCL and Conte H. 2013. Toxicity and Residual Activity of a Commercial Formulation of Oil from Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), in the Embryonic Development of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae). *J Biofertil Biopestici*. DOI: 10.4172/2155-6202.1000131.
- Das J and Ghosh S. 2011. A new synthesis of flavones and pyranoflavone by intramolecular photochemical Wittig reaction in water. *Tetrahedron Letters* 52: 7189–7194.

- de Oliveira CM, de Andrade Júnior VC, Maluf WR, Neiva IP and Maciel GM. 2012. Resistance of tomato strains to the moth *Tuta absoluta* imparted by allelochemicals and trichome density. *Ciênc Agrotecnol* 36: 45-52.
- Del Pino M. 2002. La agricultura orgánica. En: Sarandón SJ (Ed.) *Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable*, pp. 177-188. Ediciones Científicas Americanas, La Plata, Argentina.
- Desneux N, Luna MG, Guillemaud T and Urbaneja A. 2011. The invasive South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*, continues to spread in Afro-Eurasia and beyond: the new threat to tomato world production. *J Pest Sci* 84: 403-408.
- Desneux N, Wajnberg E, Wyckhuys KAG, Burgio G, Arpaia S, Narváez-Vasquez CA, González-Cabrera J, Ruescas DC, Tabone E, Frandon J, Pizzol J, Poncet C, Cabello T and Urbaneja A. 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *J Pest Sci* 83: 197-215.
- Diaz Napal GN y Palacios SM. 2015. Bioinsecticidal effect of the flavonoids pinocembrin and quercetin against *Spodoptera frugiperda*. *J. Pest Sci.* DOI 10.1007/s10340-014-0641-z.
- Dubey NK, Tiwari TN, Mandin D, Andriamboavonjy H and Chaumont J. 2000. Antifungal properties of *Ocimum gratissimum* essential oil (ethyl cinnamate chemotype). *Fitoterapia* 71: 567-569.
- Dr Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. 2015. url: www.ars-grin.gov/duke/. Página consultada en marzo de 2015.
- Duraipandiyan V, Muthu C, Baskar K, Al-Dhabi NA and Ignacimuthu S. 2015. Evaluation of fractions and 5,7-dihydroxy- 4',6-dimethoxy-flavone from *Clerodendrum phlomidis* L. f. against *Helicoverpa armigera* Hub. *Brazilian archives of Biology and Technology* 58(2): 154-165.
- Elliger CA, Chan BC and Wais Jr AC. Flavonoids as larval growth inhibitors. Structural factors governing toxicity. *Naturwissenschaften* 67: 358-359.
- El-Massry KF, El-Ghorab AH and Farouk A. 2002. Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. *Food Chemistry* 79: 331-336.
- EPPO, 2014. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Sitio URL: <http://www.eppo.int/>. Consultado en diciembre de 2014.
- Eriksson C. 2006. Isolation, synthesis and structure–activity relationships of antifeedants against the pine weevil, *Hylobius abietis*. Doctoral thesis in organic chemistry, KTH, Stockholm, Sweden.

- Escobar AM, Ruiz DM, Autino JC and Romanelli GP. 2015. Single-Step synthesis of 4-phenyl and 3,4-dihydro-4-phenyl coumarins using a recyclable Preyssler heteropolyacid catalyst under solvent-free reaction conditions. *Research on Chemical Intermediates* 41 (12) 10109-10123.
- Feng YS. 2009. Chemical constituents and bioactivity of Malaysian *Kaempferia rotunda*. Ph.D. Thesis, Faculty of Science, Universiti Teknologi, Malaysia.
- Fenjan A-AM. 2010. Conversion of α -haloesters and alkynes into corresponding cinnamates and ketones derivatives respectively by using organotellurium compounds as reagents. *Journal of Al-Nahrain University* 13(4): 45-51.
- Fernández JA, López X, Bo C, Graaf C, Baerends EJ and Poblet JM. 2007. Polyoxometalates with Internal Cavities: Redox Activity, Basicity, and Cation Encapsulation in $[X^{n+}P_5W_{30}O_{110}]^{(15-n)-}$ Preyssler Complexes, with $X = Na^+, Ca^{2+}, Y^{3+}, La^{3+}, Ce^{3+}$, and Th^{4+} . *J. Am. Chem. Soc.* 129(40): 12244-12253.
- Fernández Lozano J. 2012. La producción de hortalizas en Argentina. Secretaría de Comercio Interior. Corporación del Mercado Central de Buenos Aires. Sitio URL: http://www.mercadocentral.gob.ar/zip tecnicas/la_produccion_de_hortalizas_en_argentina.pdf. Consultado en marzo de 2014.
- Fogel MN. 2012. Selectividad de insecticidas utilizados en cultivos hortícolas del Cinturón Hortícola Platense sobre el depredador *Eriopsis connexa* en el marco del Manejo Integrado de Plagas. Tesis Doctoral. FCNyM, Universidad Nacional de La Plata.
- Fogel MN, Schneider MI, Desneux N, González B and Ronco AE. 2013. Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ecotoxicology* 22: 1063-1071.
- Francesena N. 2015. Efectos letales y subletales de insecticidas sobre *Bemisia tabaci* y su principal parasitoide *Eretmocerus mundus* e impacto sobre aspectos comportamentales del mismo. Tesis doctoral, FCNyM, Universidad Nacional de La Plata.
- Ganguly A, Kaur S, Mahata PK, Biswas D, Pramanik BN and Chan TM. 2005. Synthesis and properties of 3-acyl-y-pyrone, a novel class of flavones and chromones. *Tetrahedron Lett.* 46: 4119-4122.
- García M. 2011. Análisis de las transformaciones de la estructura agraria hortícola platense en los últimos 20 años. El rol de los horticultores bolivianos. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

- Gepts P. 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Reviews* 24(2): 1-44.
- Gharib A, Jahangir M, Roshani M, and Scheeren JW. 2010. Effective catalytic synthesis of substituted flavones and chromones using Preyssler and heteropolyacids (HPAs) as catalysts. *Bulgarian Chemical Communications* 42(3): 210-216).
- Gobec S, Sova M, Kristanb S and Rižnerb TL. 2004. Cinnamic acid esters as potent inhibitors of fungal 17b-hydroxysteroid dehydrogenase—a model enzyme of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 14: 3933-3936.
- Gökçe A, Isaacs R and Whalon ME. 2011. Ovicidal, larvicidal and anti-ovipositional activities of *Bifora radians* and other extracts on the grape berry moth *Paralobesia viteana* (Clemens). *J Pest Sci* 84: 487-493.
- Gonçalves-Gervásio RCR y Vendramim JD. 2006. Bioactivity of aqueous neem seeds extract on the *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in three ways of application. *Cienc Agrotec* 31: 28-34.
- Gornall RJ, Bohm BA and Dahlgre R. 1979. The distribution of flavonoids in the angiosperms. *Bot. Notiser.* 132: 1-30.
- Greco NM, Sánchez NE y Pereyra PC. 2002. Principios de manejo de plagas en una agricultura sustentable. En: Sarandón SJ (Ed.) *Agroecología. El camino hacia una agricultura sustentable*, pp. 251-274. Ediciones Científicas Americanas, La Plata, Argentina.
- Guan SB, Wen RM and Yu SX. 2003. Catalytic Synthesis of Cinnamate with Sodium Bisulfate. *Journal of Natural Science-Hunan Normal University* 26(4): 51-53.
- Guedes NMP, Guedes RNC, Ferreira GH and Silva LB. 2009. Flight take-off and walking behavior of insecticide – susceptible and – resistant strains of *Sitophilus zeamais* exposed to deltamethrin. *Bulletin of Entomological Research* 99: 393-400.
- Guerrero A, Malo EA, Coll J and Quero C. 2014. Semiochemical and natural product-based approaches to control *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Gelechiidae). *J Pest Sci* 87: 231-247.
- *Guía de productos fitosanitarios para la República Argentina Edición 2013-2015*. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE), Buenos Aires, Argentina. 1185 pp.

- Gutiérrez G, Reinoso A, Haramboure M, Palacios S, Fogel M, Reboredo G and Schneider MI. 2013. Effectiveness of botanical compounds for controlling *Tuta absoluta* and *Bemisia tabaci*. *65th International Symposium on Crop Protection*. May 21, Ghent, Belgium.
- Guyot B, Bosquette B, Pina M and Graille J. 1997. Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnology letters* 19(6): 529-532.
- Haller HL. 1947. Wartime Development of Insecticides. *Industrial and Engineering Chemistry* 39(4): 467-473.
- Harborne JB and Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- Harmatha J and Nawrot J. 2002. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. *Entomol. Exp. Appl.* 104: 51–60.
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T and Okuda T. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root; their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 36: 2090–2097.
- Heim KE, Tagliaferro AR and Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13(10): 572-584.
- Hemingway RW and Karchesi JJ. 1989. *Chemistry and significance of condensed tannins*. Springer, USA.
- Heravi MM, Bakhtiari K, Taheri S and Oskooie HA. 2005. KHSO_4 : a catalyst for the chemo-selective preparation of 1,1-diacetates from aldehydes under solvent-free conditions. *Green Chem.* 7: 867-869.
- Heredia A, Casado CG, Laguna L, Reina J-J, Serrano JM y Domínguez E. 1998. La cutícula vegetal: estructura y funciones. *Ecología* 12: 293-305.
- Hernández C, Broglia V, Pocovi M, Caruso G y Gilardón E. 2011. Obtención de líneas de premejora resistentes por medio de introgresión de genes de *S. habrochaites*. Libro de Resúmenes del Taller “La polilla del tomate en la Argentina: estado actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas”, pp. 11. UNLP e INTA, La Plata, Argentina. 7 y 8 de noviembre.

- Horn, D. 1988. *Ecological approach to pest management*. Cap. 2. Springer. Netherlands.
- Horowitz AR, Ellsworth PC and Ishaaya I. 2009. Biorational Pest Control – An Overview. En: Ishaaya I and Horowitz AR (Eds.), *Biorational Control of Arthropod Pests. Application and Resistance Management*, pp. 1-20. Springer. New York.
- Hoshino Y and Takeno N. 1987. A facile preparation of flavones using nonaqueous cation-exchange resin. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 60: 1919-1920.
- Huang LF, Yagura T and Chena S. 2008. Sedative Activity of Hexane Extract of *Kaempferia galanga* L. and Its Active Compounds. *J. Ethnopharmacol.* 120: 123-125.
- Huang QS, Zhu YJ, Li HL, Zhuang JX, Zhang CL, Zhou JJ, Li WG and Chen QX. 2009. Inhibitory effects of methyl trans-cinnamate on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(6): 2565-2569.
- Isman MB and Akhtar Y. 2007. Plant Natural Products as a Source for Developing Environmentally Acceptable Insecticides. En: Ishaaya I, Nauen R and Horowitz AR (Eds.), *Insecticides Design Using Advanced Technologies*, pp. 235-248. Springer, Berlin.
- Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot* 19: 603-608.
- Isman MB. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annu Rev Entomol* 51: 45-66.
- Isobe T, Doe M, Morimoto Y, Nagata K and Ohsaki A. 2006. The Anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian Plant, *Hyptis fasciculata*, and the Activity of Methoxyflavones. *Biol. Pharm. Bull.* 29(5): 1039-1041.
- Jakovetić SM, Jugović BZ, Gvozdenović MM, Bezbradica DI, Antov MG, Mijin DZ and Knežević-Jugović ZD. 2013. Synthesis of Aliphatic Esters of Cinnamic Acid as Potential Lipophilic Antioxidants Catalyzed by Lipase B from *Candida antarctica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170(7): 1560-1573.
- Jbilou R, Ennabili A and Sayah F. 2006. Insecticidal activity of four medicinal plant extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Afr J Biotechnol* 5: 936-940.
- Kabalka GW and Mereddy AR. 2005. Microwave-assisted synthesis of functionalized flavones and chromones. *Tetrahedron Letters* 46: 6315–6317.
- Kapoor KK, Ganai BA, Kumar S and Andotra CS. 2006. $\text{KHSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{SiO}_2$ -Catalyzed, One-Pot, Solvent-Free Synthesis of Pyrazolines, Tetrahydrocarbozoles and Indoles using Microwave Irradiation. *Chemical Monthly Synthetic Communications* 36(18): 2727-2735.

- Kasthuri JK, Chandra Sekhar M, Vasu Babu A and Hari Babu B. 2015. Synthesis and characterization of c(8)-methyl flavones. *The Experiment* 31(3): 2029-2032.
- Khanapur M, Pinna NK and Badiger J. 2015. Synthesis and anti-inflammatory in vitro, in silico, and in vivo studies of flavone analogues. *Med Chem Res* 24: 2656–2669.
- Kharat AN, Abedini M, Mohammadpour Amini M, Pendleton P and Badalyan A. 2003. Investigation of the Preysslerphosphotungstateheteropolyanion, [NaP5W30O110]-14, properties with different counter ions. *Transition Metal Chemistry* 28: 339-344.
- Kim NJ, Byun SG, Cho JE, Chung K and Ahn YJ. 2008. Larvicidal activity of *Kaempferia galanga* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. *Pest Manag Sci* 64: 857-862.
- Kozhevnikov IV. 1998. Catalysis by Heteropoly Acids and Multicomponent Polyoxometalates in Liquid-Phase Reactions. *Chem. Rev.* 98(1): 171-198.
- Labbé C, Coll J, Connolly JD, Faini F, Farrugia LJ and Rycroft DS. 2002. Bioactive flavones from *Luma chequen*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 67: 115-123.
- Lee E-J, Kim J-R, Choi D-R and Ahn Y-J. 2008. Toxicity of *Cassia* and *Cinnamon* Oil Compounds and Cinnamaldehyde-Related Compounds to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 101(6): 1960-1966.
- Legrand S, Nordlander G, Nordenhem H, Borg-Karlson A-K and Unelius CR. 2004. Hydroxy-methoxybenzoic methyl esters: synthesis and antifeedant activity on the pine weevil, *Hylobius abietis*. *Z. Naturforsch* 59B: 829–835.
- León J. 1987. *Botánica de los cultivos tropicales*. San José de Costa Rica: Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Lietti MMM, Botto E and Alzogaray RA. 2005. Insecticide resistance in Argentine Populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotrop Entomol* 34(1): 113-119.
- Lindig-Cisneros R, Benrey B and Espinosa-García FJ. 1997. Phytoalexins, resistance traits, and domestication status in *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus lunatus*. *Journal of Chemical Ecology* 23(8): 1997-2011.
- Lobos E. 2011. Uso de las feromonas de *Tuta absoluta* Meyrick, para el monitoreo y la protección del cultivo de tomate. Libro de Resúmenes del Taller “La polilla del tomate en la Argentina: estado

actual del conocimiento y prospectiva para un manejo integrado de plagas”, pp. 14. UNLP e INTA, La Plata, Argentina. 7 y 8 de noviembre.

- Lohani N, Tewari G, Joshi GC, Tewari LM, Chandra J and Kishor K. 2015. Comparative phytochemical analysis of wild and cultivated rhizomes of *Hedychium spicatum* Buch. Ham. of north west Himalaya. *J. Indian Chem. Soc.* 92: 105-109.
- Magiera S and Zaręba M. 2015. Chromatographic Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* L. and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food Anal. Methods* 8: 2665-2674.
- Mahal HS and Venkataraman K. 1934. Synthetical experiments in the chromone group. Part XIV. The action of sodamide on 1-acyloxy-2-acetonaphthones. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*: 387: 1767-1769.
- Mahoney NE, Roitma JN and Chan BC. 1989. Structure-Activity relationship of flavones as growth inhibitors of the navel orangeworm. *Journal of Chemical Ecology* 15(1): 285- 290.
- Makrandi JK and Kumari V. 1989. A Convenient Synthesis of 2-Styrylchromones by Modified Baker-Venkataraman Transformation Using Phase Transfer Catalysis. *Chem. Ind.* 19(11-12): 1919-1922.
- Martens S and Mithöfer A. 2005. Flavones and flavones synthases. *Phytochemistry* 66: 2399-2407.
- Martins CHZ, Freire MGM, Parra JRP and Macedo MLR. 2012. Physiological and biochemical effects of an aqueous extract of *Koeleria paniculata* (Laxm.) seeds on *Anticarsia gemmatalis* (Huebner) (Lepidoptera: Noctuidae). *SOAJ Entomolog Stud* 1: 49-61.
- Massei G and Hartley SE. 2000. Disarmed by domestication? Induced responses to browsing in wild and cultivated olive. *Oecologia* 122: 225–231.
- Mayes MA, Thompson GD, Husband B and Miles MM. 2003. Spinosad Toxicity to Pollinators and Associated. *Risk Rev Environ Contam Toxicol* 179: 37–71.
- Medeiros J, Lima E and Medeiros H. 1994. Relationships between the structure of flavonoides and antifeedant activity against *Mythimna unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arquipélago. Life and Marine Sciences* 12A: 63-66.
- Mitidieri MS y Polack LA. 2005. Producción de tomate diferenciado. Protocolo Preliminar de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. Ediciones INTA. 16 pp.
- Mitidieri MS y Polack LA. 2012. Guía de monitoreo y reconocimiento de plagas, enfermedades y enemigos naturales de tomate y pimiento. Ediciones INTA. 94 pp.

- Molet T and Jackson LD. 2011. *CPHST Pest Datasheet for Tuta absoluta*. USDA-APHIS-PPQ-CPHST.
- Mondolot L, Marlas A, Barbeau D, Gargadennec A, Pujol B and McKey D. 2008. Domestication and defence: Foliar tannins and C/N ratios in cassava and a close wild relative. *Acta Oecologica* 34: 147-154.
- Moreira MD, Picanço MC, Barbosa LCA, Guedes RNC and Silva EM. 2004. Toxicity of leaf extracts of *Ageratum conyzoides* to Lepidoptera pests of horticultural crops. *Biol Agric Hortic* 22: 251-260.
- Moreno SC, Carvalho GA, Picanço MC, Morais EGF and Pereira RM. 2012. Bioactivity of compounds from *Acmella oleracea* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and selectivity to two non-target species. *Pest Manag Sci* 68: 386–393.
- Morimoto M, Kumeda S and Komai K. 2000. Insect antifeedant flavonoides from *Gnaphalium affine* D. Don. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1888-1891.
- Morimoto M, Tanimoto K, Nakano S, Ozaki T, Nakano A and Komai K. 2003. Insect antifeedant activity of flavones and chromones against *Spodoptera litura*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 389-393.
- Mostahar S, Alam S and Islam A. 2005. Cytotoxic and antimicrobial activities of some synthetic flavones. *Indian Journal of Chemistry* 45B: 1478-1486.
- MSN. 2015. Ministerio de Salud de la Nación. Sitio URL: <http://www.msal.gov.ar>. Consultado en junio de 2015.
- Mughal EU, Ayaz M, Hussain Z, Hasan A, Sadiq A, Riaz M, Malik A, Hussain S and Iqbal Choudhary M. 2006. Synthesis and antibacterial activity of substituted flavones, 4-thioflavones and 4-iminoflavones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 4704–4711.
- Mulvihill EE and Huff MW. 2010. Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Canadian Journal of Cardiology* 26(Suppl. A): 17A-21A.
- Na YE, Kim SI, Bang HS, Kim BS y Ahn YJ. 2011. Fumigant toxicity of cassia and cinnamon oils and cinnamaldehyde and structurally related compounds to *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Parasitology* 178(3-4): 324-329.
- Nagarajan R and Perumal PT. 2004. Potassium Hydrogen Sulfate-Catalized Reactions of Indoles: A Mild, Expedient Synthesis of Bis-indolylmethanes. *Chemistry* 33(3): 288-289.
- Noro T, Miyase T, Kuroyanagi M, Ueno A and Fukushima S. 1983. Monoamine oxidase inhibitor from the rhizomes of *Kaempferia galanga* L. *Chem Pharm Bull* 31(8): 2708–2711.

- Ntalli NG and Menkissoglu-Spiroudi U. 2011. Pesticides of Botanical Origin: A Promising Tool in Plant Protection. En: Stoytcheva M (Ed.), *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*. InTech. 808 pp.
- Narasimham B, Belsare D, Pharande D, Mourya V and Dhake A. 2004. Esters, amides and substituted derivatives of cinnamic acid: synthesis, antimicrobial activity and QSAR investigations. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39 (10): 827-834.
- Oskooie HA, Heravi MM, Bakhtiari K and Taheri S. 2007. An Efficient and Facile Synthesis of Quinoxaline Derivatives Catalyzed by KHSO₄ at Room Temperature. *Monatshefte für Chemie* 138(9): 875-877.
- Otero RP, Mansilla JP and Otero CM. 2012. Detección de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) sobre judía en Galicia (NO de la Península Ibérica). *Archivos Entomológicos* 7: 193-196.
- Othman R, Ibrahim H, Mohd MA, Mustafa MR and Awang K. 2006. Bioassay-guided isolation of a vasorelaxant active compound from *Kaempferia galanga* L. *Phytomedicine* 13: 61-66.
- Othman R, Ibrahim H, Mustafa AM, Awang K, Gilani AH and Mustafa MR. 2002. Vasorelaxant effects of ethyl cinnamate isolated from *Kaempferia galanga* on smooth muscles of the rat aorta. *Planta Med.* 68: 652–655.
- Pancharoeni O, Prawat U and Tuntiwachwuttikuli P. 2000. Phytochemistry of the Zingiberaceae. *Studies in Natural Products Chemistry* 23: 797-865.
- Pandji C, Grimm C, Wray V, Witte L and Proksch P. 1993. Insecticidal constituents from four species of the zingiberaceae. *Phytochemistry* 34: 415-419.
- Pastrana JA. 2004. Los lepidópteros argentinos. Sus plantas hospedadoras y otros sustratos alimenticios. 1^{ra} edición. Buenos Aires: Sociedad Entomológica Argentina. 350 pp.
- Patel RB and Doshi AV. 2011. Synthesis and study of a new homologous series of Cis Cinnamate Esters of Mesogens: *n*-Hexyl-*p*-(*p*/*n*-alkoxy cinnamoyloxy) Cinnamates. *Der Pharma Chemica* 3(1): 338-348.
- Pedigo LP. 1989. *Entomology and Pest Management*. Cap. 7. Springer.
- Pereira GVN, Maluf WR, Gonçalves LD, do Nascimento IR, Gomez LAA and Licursi V. 2008. Selection towards high acylsugar levels in tomato genotypes and its relationship with resistance to spider

mite (*Tetranychus evansi*) and to the South American pinworm (*Tuta absoluta*). *Ciênc Agrotecnol* 32: 96-104.

- Pereyra PC and Sánchez NE. 2006. Effect of Two Solanaceous Plants on Developmental and Population Parameters of the Tomato Leaf Miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 35(5): 671-676.
- Pérez Consuegra N. 2004. *Manejo Ecológico de Plagas*. CEDAR: Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural, La Habana, Cuba. 296 pp.
- Pérez ME, Haramboure M, Mirande L, Romanelli GP, Schneider MI and Autino JC. 2013. Biological activity of three alkyl cinnamates on young larvae of *Tuta absoluta*. *Comm Appl Biol Sci* 78: 299-304.
- Pérez-Otero R, Mansilla JP y Martínez-Otero C. 2012. Detección de *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) sobre judía en Galicia (NO de la Península Ibérica). *Arquivos Entomolóxicos* 7: 193-196.
- Peterson CJ, Tsao R, Egger AL and Coats JR. 2000. Insecticidal activity of cyanohydrins and monoterpenoid compounds. *Molecules* 5: 648-654.
- Pineda S, Schneider MI, Smagghe G, Martínez AM, Del Estal P, Viñuela E, Valle J and Budia F. 2007. Lethal and Sublethal effects of methoxyfenozide and Spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 100: 773-780.
- Pinto J, Silva VLM, Silva AMG and Silva AMS. 2015. Synthesis of (*E*)-2-Styrylchromones and Flavones by Base-Catalyzed Cyclodehydration of the Appropriate β -Diketones Using Water as Solvent. *Molecules* 20: 11418-11431.
- Procházková D, Boušová I and Wilhelmová N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82: 513–523.
- Quiroz CE. 1976. Nuevos antecedentes sobre la biología de la polilla del tomate, *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick). *Agricultura Técnica* 36: 82-86.
- Radwan MM, Badawy A, Zayed R, Hassanin H, ElSohly MA and Ahmed SA. 2015. Cytotoxic flavone glycosides from *Solanum elaeagnifolium*. *Med Chem Res* 24: 1326–1330.
- Renwick JAA, Zhang W, Haribal M, Attygalle AB and Lopez KD. 2001. Dual Chemical Barriers Protect a Plant Against Different Larval Stages of an Insect. *Journal of Chemical Ecology* 27(8): 1575-1583.

- Reyes M, Rocha K, Alarcón L, Siegwart M and Sauphanor B. 2012. Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic Biochem Physiol* 102: 45-50.
- Ridditid W, Wong CS, Reanmongkol W and Wongnawa M. 2008. Antinociceptive Activity of the Methanolic Extract of *Kaempferia galangal* Linn. in Experimental Animals. *J. Ethnopharmacol.* 118: 225-230.
- Rimoldi F, Fogel M, Schneider M and Ronco A. 2012. Lethal and sublethal effects of cypermethrin and methoxyfenozide on the larvae of *Rachiplusia nu* (Guenee) (Lepidoptera: Noctuidae). *Invertebrate Development and Reproduction* 56(3): 202-208.
- Rimoldi F, Schneider MI and Ronco AE. 2008. Susceptibility of *Chrysoperla externa* eggs (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. *Environ Entomol* 37: 1252-1257.
- Riquelme Virgala MB, Botto EN y Lafalce C. 2006. Evaluación de algunos insecticidas para el control de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) y su efecto residual sobre el parasitoide *Trichogrammatoidea bactrae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Rev Soc Entomol Argent* 65(3-4): 57-65.
- Roark RC. 1935. Insecticides and Fungicides. *Industrial and Engineering Chemistry* 27(5): 530-532.
- Roark RC. 1939. Agricultural products as insecticides. *Industrial and Engineering Chemistry* 31(2): 168-171.
- Robertson A, Waters RB and Jones ET. 1932. Hydroxy-carbonyl compounds. Part VII. Coumarins and 1:4- benzopyrones derived from *m*-cresol. *J. Chem. Soc.* 1681-1688. DOI: 10.1039/JR9320001681.
- Rodríguez Hernández C, Silva Aguayo G y Vendramim JD. 2003. Insecticidas de origen vegetal. En: Silva Aguayo G and Hepp Gallo R (Eds.), *Bases para el manejo racional de insecticidas*, pp. 89-95. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía / Fundación para la Innovación Agraria, Chillán.
- Romanelli GP, Virla EG, Duchowicz PR, Gaddi AL, Ruíz DM, Bennardi DO, Valle Ortíz E and Autino JC. 2010. Sustainable synthesis of flavonoid derivatives, QSAR study and insecticidal activity against the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 58: 6290-6295.
- Rosell G, Quero C, Coll J and Guerrero A. 2008. Biorational insecticides in pest management. *J. Pestic. Sci.*, 33(2), 103–121.

- Rossetti MR, Defagó MT, Carpinella MC, Palacios SM and Valladares G. 2008. Actividad biológica de extractos de *Melia azedarach* sobre larvas de *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev Soc Entomol Argent* 67: 115-125.
- Ruhemann S. 1921. Über die Chromone und Flavone. *Berichte der deutschen chemischen*. 54(5): 912-924.
- Ruiz DM. 2009. Síntesis sustentable de fenilpropanoides: cinamatos de arilo, 4-fenilcumarinas, dihidroumarinas y dihidroangelinas. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- Ruiz DM, Romanelli GP, Bennardi DO, Baronetti GT, Thomas HJ and Autino JC. 2008. Direct esterification of cinnamic acids with phenols and imidoalcohols: a simple, heteropolyacid-catalyzed procedure. *Arkivoc* (xii) 269-276.
- Ryan MF. 2002. Insect Chemoreception. Cap. 7. Springer.
- Said A, El-fiky NM, Rashed K, Fouche G, Zheng Y-T, Selim KA and Tawila A. 2015. Anticancer, Anti HIV-1 and Antimicrobial Potentials of Methanol Extract and Non Polar Fractions of *Citrus volkameriana* Leaves and Phytochemical Composition. *Research Journal of Medicinal Plant*. DOI: 10.3923/rjmp.2015. 14 pp.
- Salazar E y Araya JE. 1997. Detección de resistencia a insecticidas en la polilla del tomate. *Simiente* 67(8): 22.
- Saleh NAM, El-Negoumy SI and Abou-Zaid MM. 1987. Flavonoids from *Artemisia judaica*, *Artemisia monosperma* and *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry* 26(11): 3059–3064.
- Sánchez L, Pasquale G, Sathicq G, Ruiz D, Ferreira de Souza A y Romanelli G. 2015. Heteropoliácido tipo Preyssler como catalizador en la preparación de dihidropirimidinonas (tionas), dihidropiridinas y piridinas a partir de 3-formilcromonas. *Inv. Jov.* 2 (2) 100-101.
- Santier S and Chamel A. 1992. Penetration of glyphosate and diuron into and through isolated plant cuticles. *Weed Res* 32: 337-347.
- Sarandón SJ. 2014. El agroecosistema: un ecosistema modificado. En: Sarandón SJ y Flores CC (Eds.), *Agroecología: bases teóricas para el diseño y manejo de Agroecosistemas sustentables*, pp. 100-130. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
- Sarda SR, Pathan MY, Paik VV, Pachmase PR, Jadhav WN and Pawar RP. 2006. A facile synthesis of flavones using recyclable ionic liquid under microwave irradiation. *ARKIVOC* 16: 43-48.

- Sashidhara KV, Kumar M and Kumar A. 2012. A novel route to synthesis of flavones from salicylaldehyde and acetophenone derivatives. *Tetrahedron Letters* 53: 2355–2359.
- Sathicq AG, Ruiz DM and Romanelli GP. 2014. Solvent-free flavones synthesis reaction using KHSO₄ as recyclable catalyst. En: Tundo P and Andraos J (Eds.), *Green Syntheses*, pp. 101-110. CRC Press, New York.
- Savino V. 2014. Biología reproductiva del ectoparásitoide *Dineulophus phthorimaeae* De Santis y su interacción con el endoparásitoide *Pseudapanteles dignus* (Muesebeck). Implicancias para el control biológico de la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). Tesis doctoral, FCNyM, UNLP.
- Sawahata T, Shimano S and Suzuki M. 2008. *Tricholoma matsutake* 1-Ocen-3-ol and methyl cinnamate repel mycophagous *Proisotoma minuta* (Collembola: Insecta). *Mycorrhiza* 18: 111–114.
- Schneider MI, Sánchez NE, Pineda S, Hsin C and Ronco A. 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological Approach. *Chemosphere* 76: 1451-1455.
- Schneider MI, Smagghe G, Pineda S and Viñuela E. 2004. Action of insect growth regulator insecticides and spinosad on lifehistory parameters and absorption in third-instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*. *Biological Control* 2004: 189-198.
- Schneider MI, Smagghe G, Pineda S and Viñuela E. 2008. The ecological impact of four IGR insecticides in adults of *Hyposoter didymator* (Hym., Ichneumonidae): pharmacokinetics approach. *Ecotoxicology* 181-188.
- Schuler MA. 2011. P450s in plant–insect interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1814: 36-45.
- Seijas JA, Vázquez-Tato MP and Carballido-Reboredo R. 2005. Solvent-Free Synthesis of Functionalized Flavones under Microwave Irradiation. *J. Org. Chem.* 70(7): 2855-2858.
- SENASA. 2014. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Sitio URL: <http://www.senasa.gov.ar/>. Consultado en mayo de 2014.
- Shalaby NMM, Abd-Alla HI, Ahmed HH and Basoudan N. 2011. Protective effect of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia* against osteoporosis and their phytochemical constituents. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(4): 579-588.

- Sharabya A, Abdel-Rahmanb A and Moawad S. 2009. Biological effects of some natural and chemical compounds on the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zell. (Lepidoptera: Gelechiidae). *Saudi Journal of Biological Sciences* 16: 1–9.
- Sharma CK and Kanwar SS. 2012. Synthesis of methyl cinnamate using immobilized lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498. *Research Journal of Recent Sciences* 1(3): 68-71.
- Sharma D and Makrandi JK. 2009. A green synthesis of 2-phenyl/2-styrylchromones under solvent-free conditions using grinding technique. *Green Chemistry Letters and Reviews* 2(3): 157-159.
- Sharma P. 2011. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. *J. Chem. Pharm. Res.* 3(2): 403-423.
- Shenk M y Kogan M. 2003. Rol de los insecticidas en el manejo integrado de plagas. En: Silva Aguayo G y Hepp Gallo R (Eds.), *Bases para el manejo racional de insecticidas*, pp. 31-49. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía / Fundación para la Innovación Agraria, Chillán.
- Shibir YSG. 2003. Catalytic Synthesis of Methyl Cinnamate with Sodium Bisulfate. *Flavour Fragrance Cosmetics* 2003(4).
- Shukla S, Abbas A and Gupta S. 2015. Apigenin increases maspin expression and suppresses invasiveness in prostate cancer cells Citation Format. *Proceedings of the 106th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research* 75(15 Suppl.): 18-22.
- Silva AG, Rodríguez M JC y Pizarro DD. 2003. Evaluación de insecticidas en laboratorio. En: Silva Aguayo G y Hepp Gallo R (Eds.), *Bases para el manejo racional de insecticidas*, pp. 31-49. Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía / Fundación para la Innovación Agraria, Chillán.
- Silva WM, Berger M, Bass C, Balbino VQ, Amaral MHP, Campos MR y Siqueira HAA. 2015. Status of pyrethroid resistance and mechanisms in Brazilian populations of *Tuta absoluta*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, doi: 10.1016/j.pestbp.2015.01.011.
- Simmonds MSJ, Blaney WM, Delle Monache F and Marini Bettolo GB. 1990. Insect antifeedant activity associated with compounds isolated from species of *Lonchocarpus* and *Tephrosia*. *Journal of Chemical Ecology* 16(2): 365-380.
- Simmonds MSJ. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry* 56: 245-252.

- Simmonds MSJ. 2003. Flavonoid–insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry* 64(1): 21-30.
- Siqueira HAA, Guedes RNC and Picanço MC. 2000. Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae). *J Appl Entomol* 124: 233-238.
- Siqueira HAA, Guedes RNC, Fragoso DB and Magalhaes LC. 2001. Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Int J Pest Manag* 47: 247-251.
- Sosa ME, Guerreiro E, Giordano O y Tonn CE. 2000. Bioactividad de flavonoides sobre larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Rev. Soc. Entomol. Argent.* 59(1-4): 179-184.
- Sparks TC, Dripps JE, Watson GB and Paroonagian D. 2012. Resistance and cross-resistance to the spinosyns: a review and analysis. *Pestic Biochem Physiol* 102: 1-10.
- Stefanović OD, Radojević ID and Čomić LR. 2015. Synthetic cinnamates as potential antimicrobial agents. *Hem. Ind.* 69(1): 37-42.
- Strassera ME, Luna MG, Sarandón SJ y Polack LA. 2009. Análisis de dos alternativas de Manejo de Plagas en tomate bajo cubierta en el Cinturón Hortícola Platense. *Rev. Bras. De Agroecología* 4 (2) 60- 64.
- Sunnerheim K, Nordqvist A, Nordlander G, Borg-Karlson A-K, Unelius CR, Bohman B, Nordenhem H, Hellqvist C and Karlen A. 2007. Quantitative Structure-Activity Relationships of Pine Weevil Antifeedants, a Multivariate Approach. *J Agric Food Chem* 55: 9365–9372.
- Suzuki J, Yasuda I, Murata I, Murata R and Nishitani K. 2002. Studies on Larvicidal Compounds Isolated from the Rhizomes of *Kaempferia galangal* Effective on *Anisakis simplex*. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.* 53: 35-39.
- Telfer WH. 2009. Egg formation in Lepidoptera. *J Insect Sci* 9: 1-21.
- Thomazini APBW, Vendramim JD and Lopes MTR. 2000. Extratos aquosos de *Trichilia pallida* e a traça-do-tomateiro. *Sci. agric.* 57(1): 13-17.
- Tomé HVV, Cordeiro EMG, Rosado JF and Guedes RNC. 2012. Egg exposure to pyriproxyfen in the tomato leaf miner *Tuta absoluta*: ovicidal activity of behavioural-modulated hatching mortality? *Ann Appl Biol* 160: 35-42.

- Tomé HVV, Martins GF, Lima MAP, Campos LAO, Guedes RNC. 2012. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides. *PLoS ONE* 7(6): e38406. doi:10.1371/journal.pone.0038406.
- Torres AL, Boiça Júnior AL, Medeiros CAM and Barros R. 2006. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pyrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia* 65: 447-457.
- Trindade RCP, Marques IMR, Xavier HS y de Oliveira JV. 2000. Extrato metanólico da amêndoa da semente de nim e a mortalidade dos ovos e lagartas da traça-do-tomateiro. *Sci Agric* 57: 407-413.
- Tropea Garzia G, Siscaro G, Biondi B and Zappala L. 2012. *Tuta absoluta*, a South American pest of tomato now in the EPPO region: biology, distribution and damage. *EPPO Bulletin* 42(2): 205-210.
- Tsao R, Lee S, Rice PJ, Jensen C and Coats JR. 1995. Monoterpenoids and Their Synthetic Derivatives as Leads for New Insect-Control Agents. En: Baker DR, Fenyes JG, Basarab GS (Eds.), *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals*, pp. 312-324. American Chemical Society, USA.
- Tzin V and Galili G. 2010. New Insights into the Shikimate and Aromatic Amino Acids Biosynthesis Pathways in Plants. *Molecular Plant* 3(6): 956–972.
- Umar MI, Asmawi MZ, Sadikun A, Atangwho IJ, Yam MF, Altaf R and Ahmed A. 2012. Bioactivity-Guided Isolation of Ethyl-*p*-methoxycinnamate, an Anti-inflammatory Constituent, from *Kaempferia galanga* L. Extracts. *Molecules* 17: 8720-8734.
- Umpiérrez ML, Lagreca ME, Cabrera R, Grille G and Rossini C. 2012. Essential oils from Asteraceae as potential biocontrol tools for tomato pests and diseases. *Phytochem Rev* 11: 339-350.
- Van Soest PJ. 1982. *Nutritional ecology of the ruminant: ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation, and the chemistry of forages and plant fibers*. O & B Books, Corvallis, Oregon.
- Vandenberghe G, Van Damme E and Smagghe G. 2009. Natural products: Plant Lectins as Important Tools in Controlling Pest Insects. En: Ishaaya I and Horowitz AR (Eds.), *Biorational Control of Arthropod Pests. Application and Resistance Management*, pp. 163-188. Springer. New York.
- Vieira PC, Mafesoli J and Biavatti M. 2007. Inseticidas de origem vegetal. En: Corrêa AG y Vieira PC (Orgs.), *Produtos naturais no controle de insetos*, pp. 69-104. EdUfCar: São Carlos.

- Viña A and Murillo E. 2003. Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum* spp.) grown in Colombia. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14(5): 744. doi:10.1590/S0103-50532003000500008.
- Vogel AI, Furniss BS, Hannaford AJ, Rogers V, Smith PWG and Tatchell AR. 1978. *Vogel's textbook of practical organic chemistry, including qualitative organic analysis*. 4^a edición. Longman: New York.
- Wang JX, Gao TG and Knapp S. 2008. Ancient Chinese Literature Reveals Pathways of Eggplant Domestication. *Annals of Botany* 102: 891–897.
- Wang RL, Staehelin C, Xia QQ, Su YJ and Zeng RS. 2015. Identification and Characterization of CYP9A40 from the Tobacco Cutworm Moth (*Spodoptera litura*), a Cytochrome P450 Gene Induced by Plant Allelochemicals and Insecticides. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 22606-22620 (a).
- Wang RL, Xia QQ, Baerson SR, Ren Y, Wang J, Su YJ, Zheng SC and Zeng RS. 2015. A novel cytochrome P450 CYP6AB14 gene in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its potential role in plant allelochemical detoxification. *Journal of Insect Physiology* 75: 54–62 (b).
- Wang Y, Zhang D-H, Zhang J-Y and Chen N, Zhi GY. 2015. High-yield synthesis of bioactive ethyl cinnamate by enzymatic esterification of cinnamic acid. *Food Chemistry* 190: 629–633.
- Wang Z, Kim H-K, Tao W, Wang M and Ahn Y-J. 2011. Contact and Fumigant Toxicity of Cinnamaldehyde and Cinnamic Acid and Related Compounds to *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of Medical Entomology* 48(2): 366-371.
- Wenyi G, Shu L and Hongjun Y. 2013. An overview on synthetic methods of alkyl cinnamates. *Eur. Chem. Bull.* 2(4): 180-182.
- Wheeler TS. 1952. Flavone. *Organic Syntheses* 32: 72-76.
- Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology* 126: 485-493.
- Yadav VG and Chandalia SB. 1999. An efficient method for synthesis of 2-ethyl hexyl-4-methoxy cinnamate: A raw material for cosmetic industry. *Indian Journal of Chemical Technology* 6: 19-23.
- Yang S, Chen L and Sun J. 2003. Catalytic synthesis of butyric esters with TiSiW 12 O 40/TiO 2. *Rare Metals (English Edition)* 22(1): 75-77.

- Yatabe T, Jin X, Yamaguchi K and Mizuno N. 2015. Gold Nanoparticles Supported on a Layered Double Hydroxide as Efficient Catalysts for the One-Pot Synthesis of Flavones. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54: 1-6.
- Zar JH. 2010. *Biostatistical Analysis*. 5^{ta} edición. 944 pp. Pearson. New Jersey.
- Zhang B, Lv C, Li W, Cui Z, Chen D, Cao F, Miao F and Zhou L. 2015. Ethyl Cinnamate Derivatives as Promising High-Efficient Acaricides against *Psoroptes cuniculi*: Synthesis, Bioactivity and Structure–Activity Relationship. *Chem. Pharm. Bull.* 63: 255–262.
- Zhu W, Yang B, Fu H, MA L, Liu T, Chai R, Zheng Z, Zhang Q and Li G. 2015. Flavone inhibits nitric oxide synthase (NOS) activity, nitric oxide production and protein S-nitrosylation in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458(3): 590–595.

Trabajos publicados en revistas periódicas:

M.E. Pérez, M. Haramboure, L. Mirande, G.P. Romanelli, M.I. Schneider and J.C. Autino. 2013. "Biological activity of three alkyl cinnamates on young larvae of *Tuta absoluta*". Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 78(2): 299-304.

Pérez, ME; Ruiz, DM; Schneider MI; Autino, JC y Romanelli, GP. 2013. La química verde como fuente de nuevos compuestos para el control de plagas agrícolas. Revista Ciencia en Desarrollo 4(2): 83-91.

Pérez, ME; Ruiz, DM; Autino J; Sathicq A and Roamanelli GP. 2016. A very simple solvent-free method for the synthesis of 2- arylchromones using KHSO_4 as a recyclable catalyst. Comptes Rendus Chimie. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crci.2016.02.014> (en prensa).