



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGIA

NANOFORMULACIONES DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE  
INSECTOS PLAGA DE PRODUCTOS ALMACENADOS

CRISTHIAN YEGUERMAN

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

(Año 2023)

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 19 de Junio de 2018 y el 5 de Mayo de 2023, bajo la dirección de Dr. Jorge Werdin y Dra. Ana Paula Murray.



J. Werdin



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de .....(.....)

## Dedicatoria

Tu sonrisa y abrazos son el motor de mi felicidad. Te amo hija.

Lela, en tu memoria por tus consejos, apoyo incondicional que me has dado.

Transítamos juntos varios caminos, este sin duda fue uno de los más difíciles.

Siempre fuiste motivadora, tolerante y me brindaste apoyo incondicional. Gracias

Amor.

## Agradecimientos

---

*“Nunca permítas que nadie te haga sentir que no te mereces lo que quíeres” Heath Ledger*

👉 *Al Dr. Jorge Werdin González, por guiarme en los 5 años de desarrollo de la tesis con paciencia, amabilidad, entusiasmo y dedicación. Sus consejos fueron siempre útiles cuando las ideas no fluían para escribir lo que hoy he logrado. Muchas gracias por tus múltiples palabras de aliento.*

👉 *A la Dra. Paula Murray y su equipo por haber realizado la identificación de los componentes de los aceites esenciales y sus respectivas nanopartículas, aportando todo su apoyo y conocimientos para el desarrollo de esta tesis.*

👉 *A mis compañeros del laboratorio, los cuales muchos siguieron caminos diferentes y echo de menos, que hicieron del laboratorio un lugar con excelente clima de trabajo. Por su integridad, honestidad, humildad, generosidad, simpatía y por ser un soporte en la cotidianidad. Especialmente, agradezco a la Dra. Adriana Ferrero, por abrirme las puertas del laboratorio y hacerme sentir parte de su grupo de trabajo, conocer e integrarme a estas personas y vivir el "por, para y de los artrópodos".*

👉 *A la Dra. Valeria Gili por su colaboración en el bioensayo sobre los efectos de las nanoformulaciones en la viabilidad celular.*

👉 *Al Dr. Manlio Massiris y Claudio Delrieux por su colaboración en el uso de los programas de trackeo en los ensayos comportamentales.*

👉 *A la Universidad Nacional del Sur, por formarme como biólogo y darme la oportunidad de continuar mis estudios permitiendo un desarrollo personal y profesional cumpliendo nuevas metas.*

👉 A la CIC, CONICET y al INBIOSUR, por brindarme la beca y el lugar de trabajo para llevar adelante esta investigación.

👉 "Nunca es tarde o demasiado precoz para ser quien tú quieras ser "A mi pareja, quien amo tanto, por ser mi soporte emocional alentándome a salir adelante en los momentos difíciles, por ser parte de mis logros personales, por darme el más grande orgullo de ser papá y por hacerme disfrutar de las pequeñas cosas de la vida.

👉 "Al final lo único que importa... es que estemos aquí" Papá, mamá y hermano lo he logrado! Gracias por brindarme su apoyo para seguir creciendo y por creer en mí.

👉 **El mundo no está en los libros, está ahí afuera:** a los chicos y chicas de 5 a 4 CASADOS ARRIBA, AMONGUEROS, NANU´S, NO SE ADMITEN LAURAS y CIENCIAS por ser como son, al brindándome palabras de aliento haciendo que cada encuentro sea único, sencillo y lleno de abrazos y risas. Gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas".

## **RESUMEN**

La infestación por insectos plaga es una de las causas principales de pérdidas cuantitativas y cualitativas en el área de productos alimenticios almacenados (granos y productos derivados), tanto por sus daños directos como los indirectos. Los gorgojos *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidae) y *Lasioderma serricorne* F. (Coleoptera, Anobiidae) son dos de los principales protagonistas en el ataque de alimentos durante las fases de producción o en las subsiguientes etapas de distribución y almacenamiento. Entre las prácticas comunes para prevenir su infestación, se incluyen el empleo diversos insecticidas sintéticos. Sin embargo, el uso excesivo de estos productos ha provocado el recrudescimiento de la resistencia en insectos plaga, problemas en la salud humana y efectos adversos en el medio ambiente y en organismos no blanco. En este sentido, los bioinsecticidas basados en aceites esenciales (AEs) se muestran como una alternativa segura, de bajo costo y ambientalmente viable. En el presente trabajo se propuso desarrollar nanopartículas poliméricas (NPs) cargadas con AEs y evaluar los efectos letales y subletales en *S. oryzae* y *L. serricorne* y determinar su perfil ecotoxicológicos al investigar sus efectos en organismos no blanco acuáticos (*Artemia salina* L. (Anostraca, Artemiidae), terrestres (*Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae) y *Blaptica dubia* Serville (Blattodea, Blaberidae) y en células de mamíferos del tipo osteoblástico.

En consecuencia, se evaluó la actividad insecticida de los AEs de menta (*Mentha piperita* L. - Lamiaceae), palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats - Poaceae), geranio (*Geranium maculatum* L. - Geraniaceae), lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill. - Lamiaceae), orégano (*Origanum vulgare* L. - Lamiaceae), laurel (*Laurus nobilis* L. - Lauraceae) y árbol de té (*Malaleuca alternifolia* Maiden y Betche - Myrtaceae). En primera instancia, por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se obtuvo la composición química de los AEs, en la cual se observó que en la mayoría de los casos los componentes mayoritarios fueron los monoterpenos (~60%) y sesquiterpenos (~30%), seguidos de hidrocarburos aromáticos, ácidos carboxílicos y derivados (~5-10%). En cuanto a la actividad insecticida por exposición a

superficies tratadas, se observó que en *S. oryzae* los aceites de geranio y palmarosa fueron los más efectivos, mientras que en *L. serricorne*, el AE de palmarosa fue el que generó la mayor actividad. Por exposición a vapores, en *S. oryzae*, el aceite de árbol de té fue el que produjo mayor toxicidad y en *L. serricorne*, el AE de geranio. Además, se estudió el efecto combinado de un insecticida sintético con los AEs, observándose que en *S. oryzae*, la combinación  $\beta$ -cipermetrina y los AEs de geranio, palmarosa, orégano y laurel tuvo mayor efecto tóxico respecto a los compuestos individuales; en *L. serricorne*, la combinación de  $\beta$ -cipermetrina y los AEs de menta, lavanda y orégano fue más efectiva que la aplicación de los compuestos libres.

A través del método de fusión-dispersión se obtuvieron las NPs de PEG-6000 cargadas con AEs con un rango de tamaños entre 191 y 534 nm, siendo las NPs cargadas con aceite de palmarosa, árbol de té, geranio y orégano las más pequeñas. El análisis del índice de polidispersión (IPD) indicó que las NPs de palmarosa, geranio, orégano y laurel fueron monodispersas ( $IPD < 0,25$ ), las NPs de lavanda y árbol de té tuvieron una distribución variable de tamaños ( $0,25 < IPD < 0,4$ ), mientras que las NPs de menta fueron polidispersas ( $IPD > 0,4$ ). Con respecto a la eficiencia de cargado (EC), todas las NPs tuvieron una  $EC > 70\%$ . Las NPs de palmarosa, geranio, orégano, laurel y árbol de té mostraron una EC cercana al 90%, mientras que las NPs de menta y lavanda con valores de EC cercanos al 75%. Un total de 29 componentes fueron identificados por CG-EM en la fase éter de extracción de las NPs poliméricas, reconociéndose monoterpenos ( $\approx 73\%$ ), sesquiterpenos ( $\approx 21\%$ ) e hidrocarburos aromáticos ( $\approx 7\%$ ).

En cuanto a la actividad insecticida de las NPs, por exposición a superficies tratadas, en *S. oryzae*, las NPs cargadas con aceite de orégano fueron las más efectivas, potenciando la toxicidad del aceite 7,51 veces; en *L. serricorne*, las NPs elaboradas con los aceites de orégano y geranio fueron las que promovieron mayor toxicidad, potenciando la bioactividad de los AEs 3,58 y 3,30 veces, respectivamente. Cabe resaltar que las NPs de orégano fueron 2 veces más tóxicas que el insecticida piretroide. En cuanto a la actividad por exposición a vapores, ninguna de las NPs generó toxicidad en *S. oryzae* y *L. serricorne*. Los porcentajes de mortalidad luego de la

exposición a una combinación de  $\beta$ -cipermetrina y las NPs mostró que en *S. oryzae*, la combinación del insecticida con las NPs de palmarosa, geranio, orégano, lavanda y laurel fueron más efectivas que los productos aplicados individualmente; para *L. serricorne*, este efecto fue corroborado con la combinación del insecticida y de las NPs de menta, palmarosa, geranio y orégano.

En cuanto a los efectos subletales, las NPs potenciaron la actividad repelente de los AEs, siendo las formuladas con los aceites de menta, palmarosa (72 h) y orégano (60 h) las más efectivas en *S. oryzae* y *L. serricorne*. Además, se evaluaron los efectos conductuales de los AEs y sus NPs en ambos insectos, por medio del estudio de variables como la distancia total recorrida y velocidad (de 0 a 96 horas post-tratamiento). En *S. oryzae*, los AEs de geranio y árbol de té y sus NPs fueron los más efectivos al modificar las variables hasta las 48 y 72 h post-tratamiento. En *L. serricorne*, los AEs de geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té modificaron las variables durante 24 h, mientras que las NPs de geranio, lavanda, orégano y árbol de té extendieron sus efectos hasta las 48 y 72 h post-tratamiento. Por otro lado, los AEs y sus NPs modificaron los índices nutricionales de ambos insectos luego de 72 h de exposición. Los AEs de geranio y orégano y sus NPs fueron las que produjeron mayores alteraciones al disminuir los índices TCR, TRC y ECAI.

Con el objetivo de obtener valores de referencia sobre la toxicidad de los AEs y sus NPs en ambiente acuáticos, se seleccionó al insecto plaga de interés sanitario *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae) como representante de este tipo de medio. Tales valores fueron utilizados para comparar los efectos de estos productos sobre *A. salina*. En larvas IV de *Cx. p. pipiens* los AEs de orégano y laurel y las NPs de geranio y orégano fueron selectivas para este organismo. Se demostró que los AEs y sus NPs fueron ligeramente tóxicas en *A. salina*, específicamente, los AEs y sus NPs tuvieron valores de CL<sub>50</sub> en un rango entre 11,38 y 77,37 ppm siendo las NPs de árbol de té el tratamiento con mayor efecto tóxico (11,38 ppm). Además, los AEs y sus NPs, demostraron ser prácticamente no tóxicos para larvas de *T. molitor* y ninfas de *B. dubia*, por lo tanto, resultan ser un producto seguro para su aplicación en ambientes terrestres. Con respecto

a los estudios relacionados con las células de mamíferos de tipo osteoblástico, ninguna de las NPs produjo citotoxicidad luego de 24 h de exposición; mientras que a las 48 h solo las NPs de geranio y árbol de té fueron citotóxicas. Cabe destacar que a las 72 h las NPs de geranio revertieron el efecto mencionado mientras que las elaboradas con el aceite de árbol de té lo acentuaron.

## **ABSTRACT**

Infestation by insect pest is one of the main causes of qualitative and quantitative losses in the stored food area (cereals and cereal products), due to both direct and indirect damage. The weevils such as *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidae) and *Lasioderma serricorne* F. (Coleoptera, Anobiidae) are two of the most common species, which infest food during production or in the subsequent stages of distribution and storage. Traditional methods to prevent their infestation include the use of several synthetic insecticides. However, the overuse of these products has led to an increase of pest resistance, human health problems, and harmful effects on the environment and non-target organism. In this sense, bioinsecticides based on essential oils (EOs) are a safe, cost effective and ecofriendly alternative. In the present work, it was proposed to develop polymeric nanoparticles (PNs) loaded with EOs and evaluate their lethal and sublethal effects against *S. oryzae* and *L. serricorne*. Moreover, the ecotoxicological profile of the PNs was evaluated on aquatic (*Artemia salina* (L.)) and terrestrial (*Tenebrio molitor* (L.) and *Blaptica dubia* (Serville)) non-target organisms and mammalian osteoblast cell.

The insecticidal activity of peppermint (*Mentha piperita* L. - Lamiaceae), palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats - Poaceae), geranium (*Geranium maculatum* L. - Geraniaceae), lavender (*Lavandula angustifolia* Mill. - Lamiaceae), oregano (*Origanum vulgare* L. - Lamiaceae), laurel (*Laurus nobilis* L. - Lauraceae) and tea tree (*Malaleuca alternifolia* Maiden and Betche - Myrtaceae) EOs was evaluated. First, gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) was used to determine the chemical composition of the EOs. Generally, the main compounds of these oils were monoterpenes ( $\approx 60\%$ ) and sesquiterpenes ( $\approx 30\%$ ), followed by aromatic hydrocarbons and carboxylic acids and their derivatives ( $\approx 5\text{-}10\%$ ).

In the bioassay by exposure to treated surface, geranium and palmarosa EOs were the most effective on *S. oryzae*, while palmarosa EO had the strongest activity on *L. serricorne*. However, in the assay by vapors exposure, tea tree oil produced the highest toxicity on *S. oryzae* and geranium EO was the most toxic on *L. serricorne*. When the combination effect of  $\beta$ -

cypermethrin and EOs was studied, geranium, palmarosa, oregano or laurel EOs +  $\beta$ -cypermethrin showed higher insecticidal activity than each individual oil on *S. oryzae*. On the other hand, on *L. serricorne* the combination of  $\beta$ -cypermethrin and peppermint, lavender or oregano was more effective than just the oils or the pyrethroid alone.

The PNs of PEG-6000 loaded with EOs were prepared by melt-dispersion method. Their size ranged between 191 and 534 nm. Particularly the PNs of palmarosa, tea tree, geranium and oregano were the smallest. The polydispersity index (PDI) showed that the palmarosa, geranium, oregano and laurel PNs were monodisperse (PDI<0.25), the lavender and tea tree PNs had a variable size distribution (0.25<PDI<0.4), whereas peppermint PNs were polydispersed (PDI>0.4). According to loading efficiency (LE), the PNs presented LE values above 70%. The palmarosa, geranium, oregano, laurel and tea tree PNs had LE  $\approx$ 90%, whereas peppermint and lavender PNs showed LE values of  $\approx$ 75%. A total of 29 compounds were identified by GC-MS in the ether phase of PNs. These compounds were monoterpenes ( $\approx$ 73%), sesquiterpenes ( $\approx$ 21%) and aromatic hydrocarbons ( $\approx$ 7%).

In bioassay by exposure to treated surface, PNs loaded with oregano EO were the most effective and increased 7.51 folds the insecticidal toxicity of the oil on *S. oryzae*; while on *L. serricorne*, oregano and geranium PNs showed the highest toxicity and enhanced the EOs bioactivity 3.58 and 3.30 folds respectively. It is important to emphasize, that oregano PNs was two times more toxic than the  $\beta$ -cypermethrin. In vapor exposure, the PNs haven't shown insecticidal activity on *S. oryzae* and *L. serricorne*. In addition, on *S. oryzae*, the combination of  $\beta$ -cypermethrin and palmarosa, geranium, oregano, lavender or laurel PNs showed highest insecticidal activity than  $\beta$ -cypermethrin or PNs alone. However, on *L. serricorne*, peppermint, palmarosa, geranium or oregano PNs +  $\beta$ -cypermethrin were the most effective combinations.

According to the sublethal effects, PNs enhanced the repellent activity of the EOs, and the most effective were peppermint, palmarosa (72 h) and oregano (60 h) PNs on *S. oryzae* and *L. serricorne*. In addition, the effects of EOs and their PNs on the behavior of both insects were

evaluated by measuring total distance and walking speed variable (0 to 96 h post-treatment). On *S. oryzae*, geranium and tea tree EOs and their PNs were the most effective and modified the variables up to 48 and 72 h post-treatment. On *L. serricornis*, geranium, lavender, oregano, laurel and tea tree EOs modified the variables for 24 h, whereas geranium, lavender, oregano and tea tree PNs extended behavioral effects up to 48 and 72 h post-treatment. On the other hand, the EOs and their PNs modified the nutritional physiology of both insects after 72 h of exposure. Geranium and oregano EOs and their PNs produced the most important change in nutritional physiology by decreasing RCR, RGR and ECI indices.

To obtain reference values for the toxicity of EOs and their PNs in the aquatic environment, *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae) was selected as a model. These values were used to compare the effects of these products on *A. salina*. According to selective index, oregano and laurel EOs and geranium and oregano PNs showed more toxicity in the larvae IV of *Cx. p. pipiens* than *A. salina*. EOs and their PNs were slightly toxic to *A. salina*, specifically, the EOs and their PNs had LC<sub>50</sub> values ranging from 11.38 to 77.37 ppm. Tea tree PNs was the treatment with strongest toxic effect (11.38 ppm). In addition, the EOs and their PNs were practically non-toxic to *T. molitor* larvae and *B. dubia* nymphs, making them safe for use in terrestrial environments. In mammalian osteoblast cells, the PNs showed not cytotoxicity after 24 h of exposure, while after 48 h only geranium and tea tree PNs were cytotoxic. It should be noted that after 72 h, geranium PNs reversed this effect, whereas tea tree PNs enhanced it.

## Índice

<b>1. Utilización de aceites esenciales como base para el desarrollo de bioinsecticidas</b>	<b>1</b>
1.A. Introducción	1
1.A.1. Los artrópodos	1
1.A.2. Insectos en estudio: <i>Sitophilus oryzae</i> y <i>Lasioderma serricorne</i>	3
1.A.2.b. Biología de <i>Sitophilus oryzae</i>	4
1.A.3.d. Biología de <i>Lasioderma serricorne</i>	6
1.A.3. Métodos de control de insectos plaga	9
1.A.4. Métodos no químicos para el control de insectos plaga	11
1.A.4.a. Control biológico	11
1.A.4.b. Control físico	12
1.A.4.b.1. Temperatura y aireación	12
1.A.4.b.2. Radiación	13
1.A.4.b.3. Almacenamiento hermético y atmosféricas modificadas	14
1.A.4.c. Polvos inertes	14
1.A.4.d. Saneamiento. Control cultural	15
1.A.4.e. Monitoreo	15
1.A.5. Aceites esenciales: una alternativa como bioinsecticidas	15
1.A.5.a. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	17
1.A.5.b. Actividad antioxidante de los aceites esenciales	18
1.A.5.c. Actividad antiinflamatoria y anticancerígena de los aceites esenciales	18
1.A.5.d. Actividad insecticida de los aceites esenciales	19
1.A.6. Hipótesis	20
1.A.7. Objetivo general	20
1.A.7.a. Objetivos específicos	20
1.B. Materiales y métodos	21
1.B.1. Materiales	21
1.B.2. Caracterización de los aceites esenciales	21
1.B.3. Insectos	22
1.B.4. Bioensayos	22
1.B.4.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas	22
1.B.4.b. Toxicidad por exposición a vapores	23
1.B.4.c. Efecto combinado insecticida sintético y aceites esenciales	23
1.B.5. Análisis estadístico	24
1.C. Resultados	25

1.C.1. Caracterización de los aceites esenciales	25
1.C.2. Toxicidad por exposición a superficies tratadas	30
1.C.3. Toxicidad por exposición a vapores	32
1.C.4. Efecto combinado insecticida sintético y aceites esenciales	34
1.D. Discusión	36
1.E. Conclusiones	43
<b>2. Nanopartículas poliméricas cargadas con aceites esenciales: una novedosa estrategia para el control de insectos plaga de productos almacenados</b>	<b>44</b>
2.A. Introducción	44
2.A.1. Historia de la nanotecnología	44
2.A.2. Definición y clasificación de las nanopartículas (NPs)	45
2.A.3. Aplicaciones de los nanomateriales en la agricultura	46
2.A.4. Nanopartículas poliméricas: definición y morfología	48
2.A.5. Métodos de síntesis de las NPs	50
2.A.6. Hipótesis	55
2.A.7.a. Objetivo general	55
2.A.7.b. Objetivos específicos	55
2.B. Materiales y métodos	56
2.B.1. Preparación de las NPs poliméricas de PEG-6000 cargadas con AEs	56
2.B.2. Caracterización fisicoquímica de las NPs poliméricas cargadas con AEs	56
2.B.2.a. Tamaño e índice de polidispersión de las NPs poliméricas	56
2.B.2.b. Eficiencia de cargado de las NPs poliméricas	57
2.B.2.c. Composición química de los AEs postformulación	57
2.B.3. Bioensayos	58
2.B.3.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas	58
2.B.3.b. Toxicidad por exposición a vapores	58
2.B.3. Efecto combinado insecticida sintético y las NPs poliméricas	59
2.B.4. Análisis estadístico	59
2.C. Resultados	61
2.C.1. Caracterización fisicoquímica de las NPs poliméricas	61
2.C.2. Composición química de las NPs poliméricas	64
2.C.3. Toxicidad por exposición a superficies tratadas	70
2.C.4. Toxicidad por exposición a vapores	71
2.C.5. Efecto combinado insecticida sintético y las NPs poliméricas	73
2.D. Discusión	75
2.E. Conclusiones	81

<b>3. Efectos subletales de los aceites esenciales y sus nanopartículas poliméricas</b>	<b>83</b>
3.A. Introducción	83
3.A.1. Efectos subletales	83
3.A.2.a. Modificación de la actividad locomotora	84
3.A.2.b. Actividad repelente	85
3.A.2.c. Alteraciones en la fisiología nutricional	85
3.A.2.d. Cambios en procesos reproductivos	86
3.A.2.e. Alteraciones en células del sistema inmune	87
3.A.3. Hipótesis	88
3.A.3.a. Objetivo general	88
3.A.3.b. Objetivos específicos	88
3.B. Materiales y métodos	89
3.B.1. Repelencia y respuestas conductuales	89
3.B.2. Efectos en la fisiología nutricional	90
3.B.3. Análisis estadístico	92
3.C. Resultados	93
3.C.1. Repelencia y respuestas conductuales	93
3.C.2. Efectos en la fisiología nutricional	117
3.D. Discusión	129
3.E. Conclusiones	138
<b>4. Evaluación de los efectos ecotoxicológicos de los aceites esenciales y sus nanopartículas poliméricas</b>	<b>139</b>
4.A. Introducción	139
4.A.1. Organismos no blanco terrestres	141
4.A.2. Organismos no blanco acuáticos	142
4.A.3. Modelos en estudio	143
4.A.3.b. Biología de <i>Culex pipiens pipiens</i>	144
4.A.3.d. Biología de <i>Artemia salina</i>	146
4.A.3.f. Biología de <i>Tenebrio molitor</i>	148
4.A.3.h. Biología de <i>Blaptica dubia</i>	150
4.A.4. Hipótesis	152
4.A.5.a. Objetivo general	152
4.A.6.b. Objetivos específicos	152
4.B. Materiales y métodos	153
4.B.1. Cría de <i>Cx. p. pipiens</i> y <i>A. salina</i>	153
4.B.2. Cría de <i>T. molitor</i> y <i>B. dubia</i>	153
4.B.3.a. Bioensayos en <i>Cx. p. pipiens</i>	153

4.B.3.b. Bioensayos ecotoxicológicos en <i>A. salina</i>	154
4.B.3.c. Bioensayos ecotoxicológicos en <i>T. molitor</i> y <i>B. dubia</i>	155
4.B.3.d. Bioensayo de viabilidad celular	156
4.B.4. Análisis estadístico	157
4.C. Resultados	158
4.C.1. Bioensayos de los AEs y sus NPs en <i>Cx. p. pipiens</i>	158
4.C.2. Bioensayos ecotoxicológicos de los AEs y sus NPs en <i>A. salina</i>	160
4.C.3. Bioensayos ecotoxicológicos de los AEs y sus NPs en <i>T. molitor</i> y <i>B. dubia</i>	161
4.C.4. Bioensayo de viabilidad celular	163
4.D. Discusión	165
4.E. Conclusiones	170
<b>5. Consideraciones finales</b>	<b>171</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>175</b>
<b>7. Trabajos derivados de la tesis</b>	<b>238</b>

## Índice de Láminas y Tablas

<b>1. Utilización de aceites esenciales como base para el desarrollo de bioinsecticidas</b>	<b>1</b>
Lámina 1.1. Relaciones porcentuales de la riqueza específica entre los miembros del phylum Arthropoda	1
Lámina 1.2. Características morfológicas de <i>Sitophilus oryzae</i>	5
Lámina 1.3. Características morfológicas de <i>Lasioderma serricorne</i>	8
Lámina 1.4. Ejemplos de monoterpenos (A), sesquiterpenos (B) y fenilpropanoides (C).	17
Lámina 1.5. Porcentaje de mortalidad del efecto combinado de insecticida sintético y AEs a valores de CL <sub>50</sub> en <i>S. oryzae</i> y <i>L. serricorne</i> . Se grafica la media y su desvió estándar N: 4 réplicas.	34
Tabla 1.1. Composición química de los AEs y contenido porcentual de cada componente.	26
Tabla 1.2. Toxicidad por superficies tratadas de los AEs en <i>S. oryzae</i> y <i>L. serricorne</i> .	31
Tabla 1.3. Toxicidad por exposición a vapores de los AEs en <i>S. oryzae</i> y <i>L. serricorne</i> .	33
<b>2. Nanopartículas poliméricas cargadas con aceites esenciales: una novedosa estrategia para el control de insectos plaga de productos almacenados</b>	<b>44</b>
Lámina 2.1. Tipos de nanopartículas.	46
Lámina 2.2. Usos de las NPs en la agricultura.	47

Lámina 2.3. Morfología de las nanocápsulas y nanoesferas.	50
Lámina 2.4. Gráfica de distribución de tamaños por intensidad a 7 días postformulación.	62
Lámina 2.5. Porcentaje de mortalidad del efecto combinado de insecticida sintético y NPs poliméricas a valores de CL <sub>50</sub> en <i>S. oryzae</i> y <i>L. serricornis</i> . Se grafica la media y su desvío estándar N: 4 réplicas.	74
Tabla 2.1. Ejemplos de NPs poliméricas cargadas con AEs utilizando las técnicas de nanoprecipitación, gelificación iónica y fusión-dispersión.	54
Tabla 2.2. Tamaño promedio ( $\pm$ ES), índice de polidispersión (IPD, valor medio $\pm$ ES) y eficiencia de cargado (EC, $\pm$ ES) de las NPs poliméricas a los 7 días postformulación.	61
Tabla 2.3. Composición química de los AEs pre y postformulado.	65
Tabla 2.4. Toxicidad por superficies tratadas de las NPs poliméricas en <i>S. oryzae</i> y <i>L. serricornis</i> .	72
<b>3. Efectos subletales de los aceites esenciales y sus nanopartículas poliméricas</b>	<b>83</b>
Lámina 3.1. Efectos subletales de insecticidas.	84
Lámina.3.2. (A) Recorrido representativo en un bioensayo sin elección luego de 4 minutos. (B) Recorrido representativo en un bioensayo de elección luego de 4 minutos (IR >0,1).	90
Lámina 3.3. Índice de repelencia de los AEs de menta (A), palmarosa (B), geranio (C), lavanda (D), orégano (E), laurel (F) y árbol de té (G) y sus NPs en <i>S. oryzae</i> .	94
Lámina 3.4. Índice de repelencia de los AEs de menta (A), palmarosa (B), geranio (C), lavanda (D), orégano (E), laurel (F) y árbol de té (G) y sus NPs en <i>L. serricornis</i> .	98
Lámina 3.5.A. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>S. oryzae</i> . <b>Tiempo: 0 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	104
Lámina 3.5.B. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>S. oryzae</i> . <b>Tiempo: 12 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	105
Lámina 3.5.C. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>S. oryzae</i> . <b>Tiempo: 24 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	106
Lámina 3.5.D. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>S. oryzae</i> . <b>Tiempo: 36 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	107
Lámina 3.5.E. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>S. oryzae</i> . <b>Tiempo: 48 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	108
Lámina 3.5.F. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>S. oryzae</i> . <b>Tiempo: 60 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	109
Lámina 3.6.A. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>L. serricornis</i> . <b>Tiempo: 0 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	112
Lámina 3.6.B. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>L. serricornis</i> . <b>Tiempo: 12 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	113
Lámina 3.6.C. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>L. serricornis</i> . <b>Tiempo: 24 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	114
Lámina 3.6.D. Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL <sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de <i>L. serricornis</i> . <b>Tiempo: 36 h.</b> Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).	115

Tabla 3.1. Resume de los efectos de los AEs y sus NPs sobre las variable conductuales (distancia total y velocidad) en <i>S. oryzae</i> . - : sin diferencias significativas respecto a control, ↓ o ↑ : diferencias significativas respecto al control, ↓ o ↑ : diferencias significativas entre aceite libre y sus NPs.	110
Tabla 3.2. Resume de los efectos de los AEs y sus NPs sobre las variable conductuales (distancia total y velocidad) en <i>L. serricorne</i> . - : sin diferencias significativas respecto a control, ↓ o ↑ : diferencias significativas respecto al control, ↓ o ↑ : diferencias significativas entre aceite libre y sus NPs.	116
Tabla 3.3. Índices nutricionales y efecto fagodisuaviso de los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs en adultos de <i>S. oryzae</i> (AE libre agudo: tiempo de evaporación 15 min; AE libre residual: tiempo de evaporación 18 h; NP: tiempo de evaporación 18 h).	120
Tabla 3.4. Índices nutricionales y efecto fagodisuaviso de los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs en larvas de <i>L. serricorne</i> (AE libre agudo: tiempo de evaporación 15 min; AE libre residual: tiempo de evaporación 18 h; NP: tiempo de evaporación 18 h).	126
<b>4. Evaluación de los efectos ecotoxicológicos de los aceites esenciales y sus nanopartículas poliméricas</b>	<b>139</b>
Lámina 4.1. Perspectivas en el desarrollo de nanoinsecticidas.	140
Lámina 4.2. Organismos no blanco para la evaluación medioambiental de los nanoinsecticidas.	141
Lámina 4.3. Características morfológicas de <i>Cx. p. pipiens</i> .	145
Lámina 4.4. Características morfológicas de <i>A. salina</i> .	147
Lámina 4.5. Características morfológicas de <i>T. molitor</i> .	149
Lámina 4.6. Características morfológicas de <i>B. dubia</i> .	151
Lámina 4.7.A. Efectos de las NPs en la viabilidad celular a las 24 h de exposición.	163
Lámina 4.7.B. Efectos de las NPs en la viabilidad celular a las 48 h de exposición.	164
Lámina 4.7.C. Efectos de las NPs en la viabilidad celular a las 72 h de exposición.	164
Tabla 4.1. Valores de referencia de toxicidad en organismos no blanco acuáticos (Kamrin,1997).	155
Tabla 4.2. Actividad larvica de los AEs y sus NPs en <i>Cx. p. pipiens</i> .	159
Tabla 4.3. Actividad larvica de los AEs y sus NPs en <i>A. salina</i> .	162

---

## 1. UTILIZACION DE ACEITES ESENCIALES COMO BASE PARA EL DESARROLLO DE BIOINSECTICIDAS

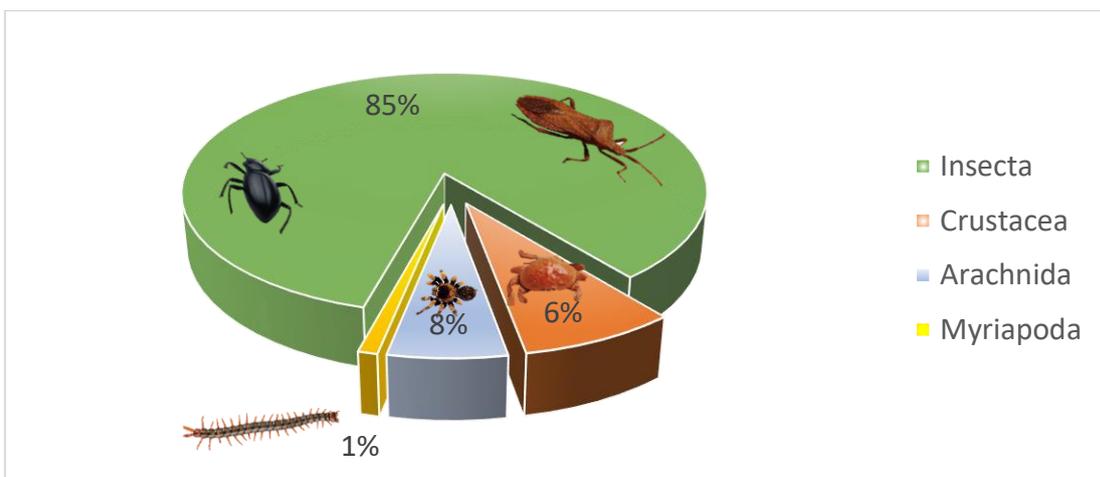
---

### 1.A. Introducción

#### 1.A.1. Los artrópodos

El phylum Arthropoda constituye más del 80% de todas las especies de animales descritas en la Tierra, siendo el grupo más extenso de todos los phyla (Jezkova y Wiens, 2017). Está representado en los siete continentes y en todos los niveles de las redes tróficas, y sus integrantes actúan como animales herbívoros, detritívoros, parásitos, depredadores, polinizadores y dispersores de semillas (Foster et al., 2021; Kariyanna et al., 2017). Los registros del número de especies de artrópodos superan el millón, aunque hay estimaciones que proyectan un total entre dos a seis millones (Caley et al., 2014; Pinkus Rendón, 2010). Con un número aproximado de 941.000 especies, los insectos representan alrededor del 80% de los artrópodos, constituyéndose como el grupo de organismos con mayor diversidad del planeta (Lámina 1.1) (Stork, 2018).

**Lámina 1.1** Relaciones porcentuales de la riqueza específica entre los miembros del phylum Arthropoda.



Tomado y modificado de Brusca y Brusca (1990), Francke (2014), y Zhang (2011).

Dada esta enorme diversidad es fácil suponer las múltiples interacciones tanto benéficas como perjudiciales que los insectos han desarrollado con la especie humana. Así surge el concepto de insectos plaga, el cual se refiere a aquellos que interfieren de forma perjudicial y con carácter grave, en el normal desarrollo de la actividad humana, reduciendo la disponibilidad, calidad o valor de un recurso (Athanassiou et al., 2018; Vivas-Carmona, 2017). Dentro de estos, hay que destacar a los insectos vectores de enfermedades (protozoos, bacterias, virus) que afectan tanto a humanos como a animales domésticos, y a los insectos plaga de importancia económica que, dadas sus características bioecológicas, pueden atacar cultivos, granos, semillas, entre otros recursos, generando importantes pérdidas en la producción (Attaulah et al., 2020; Hamel et al., 2020; Wakil et al., 2021).

El aumento constante que la población humana ha registrado en las últimas décadas exige asegurar mayor cantidad de alimentos para cubrir las necesidades nutricionales, por lo que minimizar las pérdidas de granos y cultivos se ha transformado en un objetivo primario de las políticas públicas (Hamel et al., 2020; Hangstrum et al., 2012). Es sabido que los insectos destruyen aproximadamente entre el 18 y el 26% de la producción anual de cultivos mundiales y a nivel post-cosecha, generan pérdidas entre un 25 y 30%, con un valor estimado superior a los 470 mil millones de dólares (Culliney, 2014; Jampilek y Kralova, 2022). La mayoría de las especies responsables de esos daños se encuentran dentro de los órdenes Coleóptera y Lepidóptera (Maedeh et al., 2011). A nivel mundial se citan unas 600 especies de coleópteros relacionadas con los productos almacenados, comprendidas en 30 familias (Rosa et al., 2020). De acuerdo con la posibilidad de atacar al grano entero o partido, los insectos pueden clasificarse en los de infestación primaria o secundaria. Los insectos plaga de infestación primaria suelen tener una gama limitada de preferencias alimentarias, como cereales y legumbres, atacando el grano entero para alimentarse del embrión y el endosperma. Su ciclo de vida implica la puesta de huevos en la capa externa o en el interior del grano, y dentro del mismo se completa el desarrollo hasta la etapa de insecto adulto (Athanassiou et al., 2011; Mullen et

al., 2012). En este grupo se pueden citar los coleópteros *Sitophilus oryzae* (L.), *S. zeamais* (Motschulsky), *S. granarius* (L.), *Rhyzopertha dominica* (F.), *Prostephanus truncatus* (Horn), *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Callosobruchus maculatus* (F.), *Callosobruchus chinensis* (L.), *Callosobruchus analis* (F.), *Callosobruchus phaseoli* (Gyllenhal) y *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Nayak et al., 2018). Por otra parte, los insectos plaga de infestación secundaria se alimentan tanto de subproductos (harina, salvado, entre otros) como de granos dañados por los insectos plaga de infestación primaria o durante la cosecha, manipulación y transporte (Khater, 2012). Los huevos de estos insectos son depositados de manera dispersa en la fuente de alimento o cerca de ella y todo el ciclo de vida tiene lugar fuera del grano. Como representantes de coleópteros plaga de infestación secundaria se pueden mencionar a *Lasioderma serricorne* (Fabricius), *Tribolium castaneum* (Herbst), *T. confusum* (du Val), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens), *C. pusillus* (Schönherr), *C. pussilloides* (Steel y Howe), *Trogoderma granarium* (Everts) y *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Boyer et al., 2012; Nayak et al., 2018). Tanto los insectos plaga de infestación primaria como secundaria causan daños directos e indirectos. Los daños directos están en relación con sus hábitos alimentarios sobre los granos y/o subproductos, resultando en importantes pérdidas cualitativas y cuantitativas. Por ejemplo, en las semillas, los daños directos incluyen la reducción del poder germinativo y vigor. Los daños indirectos se refieren a las pérdidas producidas por la contaminación del alimento con cadáveres, exuvias, pellets fecales, seda y otros residuos, que disminuyen la calidad del mismo (Athanassiou y Arthur, 2018; Izadi et al., 2019). Para el desarrollo de la mayoría de los ensayos de la presente tesis doctoral se utilizaron las especies *Sitophilus oryzae* y *Lasioderma serricorne*.

### **1.A.2. Insectos en estudio: *Sitophilus oryzae* y *Lasioderma serricorne***

#### **1.A.2.a. Clasificación**

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Coleoptera

**Familia:** Curculionidae

**Género:** *Sitophilus*

**Especie:** *Sitophilus oryzae* (Linné, 1763).

#### **1.A.2.b. Biología de *Sitophilus oryzae***

*S. oryzae*, conocido como el gorgojo del arroz, es una plaga de infestación primaria que ataca granos de arroz, trigo, maíz, sorgo, centeno, cebada, avena, entre otros cereales y sus subproductos (Devi et al., 2017; Jampilek y Kralova, 2022). Los climas tropicales y subtropicales son los adecuados para su desarrollo, siendo las bajas temperaturas y humedad su única limitante a su distribución. *S. oryzae* es un insecto holometábolo; la hembra puede oviponer entre 200 y 300 huevos durante toda su vida de forma individual en pequeñas hendiduras del grano (Mansoor et al., 2018). El periodo larval, con una duración entre 18 y 22 días, es la fase con mayor sensibilidad a los cambios de temperatura y humedad (Stadler, 1988). La fase de pupa se desarrolla dentro del grano y posee una duración entre 5 a 10 días a 25 °C y 70% de humedad relativa (HR); este periodo se prolonga si la temperatura ambiente es menor. Transcurrido el estado de pupa, el adulto emerge rompiendo la cubierta del grano. El ciclo de vida de *S. oryzae* desde la eclosión del huevo hasta la muerte del adulto, requiere entre 30 y 45 días, según las condiciones de temperatura y HR (Swamy et al., 2014).

### Lámina 1.2: Características morfológicas de *S. oryzae*

**Adultos:** Miden 2,5 - 3,5 mm de longitud y son de color marrón oscuro, casi negro. El protórax está densamente cubierto de depresiones circulares y los élitros presentan cuatro manchas de color amarillento. Presentan antenas acodadas terminadas en masa. La cabeza se proyecta en un rostro curvado (Devi et al., 2017).



Adulto de *S. oryzae*

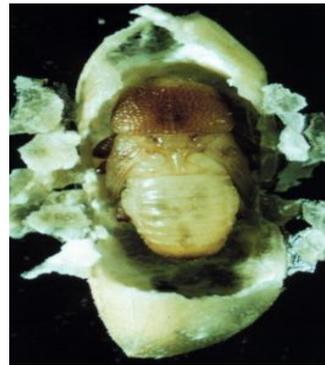
**Huevos:** Ovalados de color marfil, con un extremo redondeado y otro aguzado. Los huevos son colocados en forma individual en un hueco roído por la hembra en la semilla, que es obturado finalmente mediante una secreción mucilaginosa (Mohandass, 2007; Stadler, 1988).

**Larvas:** Ápodas, cortas y robustas, de cuerpo blanco y cabeza marrón. Las larvas son marcadamente convexas dorsalmente y planas en su parte ventral, su segmentación no es precisa. Presenta cuatro estadios larvales que se desarrollan dentro del grano y que se diferencian a través de las medidas de la cápsula cefálica (Mansoor et al., 2018).



Larva de *S. oryzae*

**Pupas:** Son de tipo libre. Se desarrollan dentro del grano en una cavidad tapizada con una mezcla de secreciones y material de desecho (Rees, 2004).



Pupa de *S. oryzae*.

### 1. A.2.c. Clasificación

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Coleoptera

**Familia:** Anobiidae

**Género:** *Lasioderma*

**Especie:** *Lasioderma serricorne* (Fabricius, 1792).

### 1. A.2.d. Biología de *Lasioderma serricorne*

*L. serricorne*, conocida como la carcoma del tabaco, es una plaga de infestación secundaria de importancia económica en varios países del mundo por su poder destructivo del tabaco procesado y sin procesar y de otros materiales de origen vegetal y animal (Edde, 2019). Los climas tropicales y subtropicales son los adecuados para su desarrollo, siendo las bajas temperaturas, la humedad y la disponibilidad y calidad de los alimentos las condiciones limitantes en su distribución (Ashwort, 1993; Naveena et al., 2019). *L. serricorne* es un insecto holometábolo; las hembras oviponen entre 35 - 40 huevos con un periodo de incubación de 5 a 10 días (a 28 - 32 ° C y 72,5 - 80,5% de HR). En el periodo larval, que dura de 35 a 45 días, ataca diversos productos almacenados. La pupa se desarrolla dentro de una estructura protectora formada por alimentos y materiales de desecho y cementados por secreciones del intestino medio de la larva. Esta etapa se extiende entre 5 y 10 días; sin embargo, en climas fríos puede prolongarse hasta 25 días (Edde, 2019). La longevidad de los adultos es de 14 a 50 días dependiendo de factores ambientales y disponibilidad de alimento (Allotey y Unanaowo, 1993). Según Yu (2008) los adultos no apareados viven entre 29 y 35 días mientras que los adultos que

copularon, entre 17 y 23 días. El ciclo de vida de *L. serricorne*, desde la eclosión del huevo hasta la muerte del adulto, requiere 40 a 80 días, según las condiciones ambientales (Edde, 2019).

### Lámina 1.3: Características morfológicas de *L. serricorne*

**Adultos.** Tienen una longitud comprendida entre 2 y 3,4 mm y una coloración marrón oscura. La cabeza, en vista dorsal, no se distingue ya que se encuentra curvada y cubierta por el pronoto. Presenta antenas aserradas y vellosidades en los élitros (Howe, 1957)



Adulto de *L. serricorne*

**Huevos.** Son de color blanco nacarado con numerosas espinas en un extremo. Poseen una longitud de entre 0,4 y 0,5 mm, y miden 0,2 mm de ancho. Los huevos tienen una cáscara cerosa que los protege de la desecación (Ashwort, 1993).

**Larvas.** Son oligópodas, con el cuerpo de color blanco cremoso o grisáceo y están cubiertas densamente con pelos finos. Suelen tener una forma de C. (Howe, 1957).



Larva de *L. serricorne*

**Pupas:** Se desarrollan dentro de una celda formada por alimentos y material de desecho. La longitud y ancho promedio es de 3,5 mm y 1,7 mm, respectivamente (Ashwort, 1993).



Pupa de *L. serricorne*.

### **1. A.3.Métodos de control de insectos plaga**

Los registros sobre las primeras técnicas de control de insectos plaga datan del 4500 antes de la era común (a.e.c), cuando sumerios, romanos, griegos y egipcios quemaban azufre o utilizaban compuestos azufrados para combatir insectos vectores e insectos plaga de cultivos (Maslá y Moltoni, 2012). Hacia el año 450 a.e.c, los romanos agregaron como métodos de control el uso de fumigantes a base de aerosoles de aceites, de ungüentos, de cenizas y de betún de azufre (Singh, 2007). En el siglo IV los chinos fueron los pioneros en el control biológico de insectos plaga, estableciendo colonias de hormigas depredadoras en sus huertas para controlar orugas y escarabajos (Stent, 2006). En los siglos XVI y XVII, en Europa, se comenzó a discutir la importancia del uso de insectos entomófagos, concretamente crisopas y mariquitas, para mantener a los invernaderos libre de pulgones (Symondson et al., 2002; White, 2019). Entre los siglos XVII y XVIII, la introducción del microscopio y los avances científicos de la época como la refutación de la teoría de la generación espontánea realizada por Francesco Redi y el desarrollo del sistema de nomenclatura binomial de Linneo, generaron información más precisa sobre los insectos. A partir de esos avances, los métodos de control empezaron a desarrollarse sobre la base de aspectos biológicos de estos organismos. A finales de ese periodo, se redescubrieron o reintrodujeron los insecticidas botánicos como el piretro, el derris y la infusión de hojas de tabaco (Flint y van den Bosch, 1981).

Hacia fines del siglo XIX, existían pocos insecticidas eficientes, por lo que las medidas de control eran principalmente de carácter cultural (mejoramiento de las condiciones de almacenamiento de alimentos, rotación de cultivos, labranza del suelo, recolección manual de insectos plaga, entre otros). A mediados del siglo XX, y con el auge de los insecticidas sintéticos neurotóxicos como organoclorados y organofosforados, el dicloro difenil tricloroetano (DDT) (organoclorado) se utilizó para combatir la epidemia europea de tifus y para el control de larvas de mosquitos vectores de la malaria. Pese a su alta eficiencia, las propiedades lipofílicas de los insecticidas organoclorados ocasionaron bioacumulación y biomagnificación a través de las redes tróficas

(Ansari et al., 2014; Himeidan et al., 2012). Por otra parte, los organofosforados resultaron ser insecticidas con menor estabilidad en el ambiente que los organoclorados, pero con elevada toxicidad en humanos y en organismos no blanco. En las décadas del 70 y el 80 surgieron en el mercado los piretroides, insecticidas sintéticos similares al piretro, con buenos resultados en el control de insectos plaga, pero con dificultades en su aplicación a campo dada su fotolabilidad. Por lo tanto, se introdujeron pequeños cambios estructurales en sus moléculas con el fin de obtener piretroides con mayor toxicidad hacia los organismos blancos, mayor estabilidad y con menos efectos deletéreos para los mamíferos. Dentro de esta familia, la deltametrina y la  $\beta$ -cipermetrina demostraron ser muy eficientes en el control de diversos insectos plaga (Aldridge, 1990; Sternesen, 2004).

A pesar de que los insecticidas sintéticos mejoran la producción de los cultivos y reducen las poblaciones de insectos plaga a niveles aceptables, su manejo inadecuado y sobreuso condujo el surgimiento de poblaciones de insectos plaga resistentes y efectos adversos en organismos no blanco y la biota edáfica con consecuencias en la red alimentaria, el reciclaje de la materia orgánica y el mantenimiento de la estructura del suelo (Khoobdel et al., 2017; Osanloo et al., 2019). Además de los riesgos potenciales para el medio ambiente, la exposición directa e indirecta a los insecticidas causa efectos adversos a corto y largo plazo en la salud humana (Rani et al., 2021; Sabarwal et al., 2018). En línea con lo anterior, se desarrollaron poblaciones de insectos resistentes a los insecticidas más comunes, recrudesciendo las enfermedades y el impacto económico. Varios autores informaron sobre la resistencia a productos como DDT, deltametrina, malatión, metil-pirimifos y fenitrotión, en *S. oryzae*, *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.), *Aedes albopictus* (Skuse), *R. dominica*, *S. zeamais* y *T. castaneum* (Asiamah et al., 2020; Stejskal et al., 2021).

En la década del 50, se formularon nuevas ideas para el manejo de las poblaciones de insectos plaga y se desarrollaron estrategias alternativas para reemplazar o complementar el uso de insecticidas convencionales, surgiendo así la idea del Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Boyer

et al., 2012). El MIP es un proceso basado en decisiones y gestiones que involucra el uso coordinado y racional de múltiples tácticas para optimizar el control de diversos organismos plaga (insectos, patógenos, malezas y vertebrados) con el fin de reducir el uso de plaguicidas químicos y evitar el surgimiento de resistencia (Dara, 2019; Philips y Throne, 2010). Esto implica el manejo y vigilancia periódica de múltiples insectos plaga como así también de sus enemigos naturales (Athanassiou y Arthur, 2018). Los componentes fundamentales del MIP son:

- Recolección de datos. El muestreo es el paso esencial en el MIP ya que permite estimar la densidad poblacional de los insectos plaga.
- Evaluación de riesgos. En búsqueda de un nivel de equilibrio, se evalúan los riesgos económicos que conllevan la pérdida de los recursos y los costos debido al control de los insectos plaga.
- Selección de opciones de manejo. Se discuten diversas opciones de control con el fin de reducir las poblaciones de insectos plaga a niveles que no causen pérdidas económicas atendiendo a la biología y ecología de estos y a los recursos disponibles.
- Prevención y monitoreo. Se establecen acciones de vigilancia entomológica que permitan evaluar la evolución de las poblaciones de insectos plaga y la efectividad de la táctica de manejo.
- Comunicación y educación. Se difunde información a toda la comunidad sobre la identificación de insectos plaga y su control preventivo valiéndose de distintas estrategias de comunicación.

#### **1. A.4. Métodos no químicos para el control de insectos plaga**

##### **1. A.4.a. Control biológico**

Existe un gran abanico de enemigos naturales de los insectos plaga como los hongos entomopatógenos, los insectos depredadores y los parasitoides que actúan como controladores biológicos. Los hongos entomopatógenos de los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Rhizopus* y *Fusarium* tienen un gran potencial como agentes controladores de *S. oryzae*, *L. serricorne*, *S. zeamais*, *R. dominica*, *T. castaneum*, y *T. confusum*, ejerciendo su

actividad a través de múltiples mecanismos de acción y evitando que los insectos desarrollen resistencia (Barra et al., 2013; Motta-Delgado et al., 2011; Padin et al., 1995; Saeed et al., 2017). Del mismo modo, las chinches del género *Xylocoris*, entre ellas *X. flavipes* (Reuter), han sido consideradas efectivos controladores de insectos plaga de productos almacenados ya que actúan sobre huevos y etapas tempranas de desarrollo de *L. serricorne*, *T. confusum*, *T. castaneum*, *S. zeamais*, *S. granarius* y *Plodia interpunctella* (Hubner) (Scholler et al., 2018; Suma et al., 2014). Igualmente, se comprobó que los parasitoides del orden Hymenoptera como *Anisopteromalus calandrae* (Howard), *Theocolax elegans* (Westwood), *Lariophagus distinguendus* (Forster) atacan estadios larvales tardíos y pupas tempranas de gorgojos como *S. oryzae*, *L. serricorne*, *S. granarius*, *S. zeamais*, *R. dominica*, *T. confusum*, *A. obtectus* y *C. maculatus* (Adarkwah et al., 2014). No obstante, el uso comercial de hongos entomopatógenos y enemigos naturales en el control de gorgojos no es masivo, producto de la escasa cantidad de ensayos experimentales y divulgación pública, de la limitada cantidad de proveedores comerciales y de las fuertes regulaciones que poseen un bajo nivel de tolerancia de restos de insectos en los alimentos (Athanassiou y Arthur, 2018; Boyer et al., 2012).

#### **1. A.4.b. Control físico**

Dentro de esta categoría es posible incluir diversas técnicas de manejo como temperatura y aireación, radiaciones ionizantes y no ionizantes, almacenamiento hermético y atmósferas modificadas, y sonido y percusión.

##### **1. A.4.b.1. Temperatura y aireación**

El control de insectos plaga a través de variaciones de temperatura es una herramienta comúnmente utilizada dentro de los métodos físicos. La tasa máxima de crecimiento y reproducción en la mayoría de los insectos ocurre entre los 25 y 33 °C, reduciéndose su tasa de desarrollo, alimentación, fecundidad y supervivencia por debajo de los 13 °C y por encima de los 35 °C (Mason y McDonough, 2012). Para generar las variaciones de la temperatura puede

aprovecharse las condiciones ambientales del medio (aireación ambiental) o bien utilizar sistemas aireaciones artificiales (aireación fría o caliente). En la aireación fría, con mejores resultados que la aireación ambiental, se insufla aire refrigerado a través de una masa de granos, con el objetivo de reducir la temperatura y evitar el desarrollo de los insectos (Daglish et al., 2018). Esta tecnología es efectiva para evitar la proliferación de insectos como *S. oryzae*, *R. dominica*, *S. zeamais* y *P. interpunctella* (Arthur et al., 2003; Athanassiou et al., 2018; Yang et al., 2017). Por otro lado, el tratamiento con altas temperaturas provoca la muerte de los insectos por deshidratación y desestabilización de membranas celulares y enzimas. Los tratamientos térmicos con calentadores de aire forzado demostraron ser efectivos para el control de *S. oryzae*, *T. castaneum* y *Stegobium paniceum* (L.) (Abdel-Hady et al., 2021; Jian et al., 2013). Aunque los métodos de aireación son seguros, de bajos impactos ambientales y eficaces para cualquier etapa del ciclo de vida de los insectos, estos presentan algunas desventajas. La implementación de la aireación ambiental está ligada básicamente a las condiciones geográficas y climáticas donde dicho tratamiento sea llevado a cabo, mientras que en la aireación artificial a principal limitante se encuentra asociada a los altos costos de los equipamientos. (Subramanyam y Hagstrum, 2012).

#### **1. A.4.b.2. Radiación**

La radiación de productos almacenados es legal en la mayoría de los países y se puede utilizar en forma ionizante (rayos gamma) y no ionizante (radiofrecuencias, microondas o radiación infrarrojos). En los productos irradiados en dosis alta se produce la muerte de los insectos, mientras que la radiación en dosis bajas, retrasa el desarrollo de los estadios inmaduros y provoca esterilidad en los adultos. Varios trabajos informaron que, en productos tratados con radiaciones ionizantes y no ionizantes, se observó altos niveles de mortalidad en *S. oryzae*, *L. serricornis*, *S. zeamais*, *S. granarius*, *T. confusum*, *T. castaneum*, *O. surinamensis* y *R. dominica* (Dittgen et al., 2021; Kongratarpon et al., 2003; Subramanyam y Hagstrum, 2012). Sin embargo, los altos costos que esta tecnología requiere limitan su aplicación a gran escala.

### **1. A.4.b.3. Almacenamiento hermético y atmósfera modificada**

La manipulación de la concentración de gases atmosféricos en ambientes herméticos donde se almacenan granos es un sustituto biorracional a las fumigaciones químicas para el control de insectos plaga (Ingabire et al., 2013). En los recintos herméticos, a través del flujo continuo de gases como el nitrógeno y ozono, se disminuye la concentración de oxígeno causando hipoxia y una rápida mortalidad en los insectos plaga (Cao et al., 2019). Diversos estudios determinaron que niveles de oxígeno por debajo del 1% en cámaras herméticas fueron efectivos en el control de *S. oryzae*, *L. serricornis*, *S. granarius*, *S. zeamais*, *T. castaneum*, *Calandra granaria* (L.), *P. interpunctella* y *Ephestia cautella* (Walker) (Cao et al., 2019; Carvalho et al., 2012; Kumar et al., 2020; Na et al., 2006; Rozado et al., 2008). El almacenamiento hermético junto con el método de atmósfera modificada, son técnicas seguras que no dejan residuos tóxicos ni afectan las propiedades organolépticas de los alimentos. Sin embargo, el empleo de estas metodologías presenta varios desafíos logísticos, como la hermeticidad del recinto y la dificultad en el fraccionamiento del volumen de granos almacenados (Riudavates et al., 2006).

### **1. A.4.c. Polvos inertes**

La tierra de diatomeas y zeolitas, son utilizados como insecticidas naturales por su efecto abrasivo sobre los lípidos cuticulares (Andric et al., 2012; Athanassiou y Arthur, 2018). Las primeras son remanentes de paredes celulares de algas unicelulares fosilizadas mientras que las segundas, aluminosilicatos cristalinos hidratados (Eroglu et al., 2017; Kavallieratos et al., 2010; Rumbos et al., 2016). Ambos productos están formados por cristales de bordes irregulares que rasgan el tegumento de los insectos causando su muerte por deshidratación. Varios trabajos demostraron su efectividad en una amplia gama de insectos plaga, como *S. oryzae*, *S. zeamais*, *R. dominica*, *T. confusum*, *T. castaneum* y *O. surinamensis* (Athanassiou y Arthur, 2018; Liska et al., 2015; Shah y Khan, 2014; Ziaee et al., 2019). En comparación con los insecticidas sintéticos, los polvos inertes presentan la desventaja de ser de acción lenta y afectar la fluidez de los granos

lo que puede provocar bloqueos u obstrucciones en el sistema de almacenaje (Athanassiou et al., 2011; Ravali et al., 2020).

#### **1. A.4.d. Saneamiento. Control cultural**

La limpieza de las instalaciones de acopio de productos almacenados es clave para el manejo preventivo de los insectos plaga (Athanassiou y Arthur, 2018). Con esta táctica, se minimiza la presencia de insectos y sus efectos indeseables, por ejemplo daños directos sobre el grano y aumento de costos por tratamientos con insecticidas (Murali et al., 2013). La limpieza de las instalaciones debe realizarse antes de la cosecha y mantenerse durante el resto del ciclo operativo (Phillips y Throne, 2010). De forma complementaria a las operaciones de limpieza, se utilizan tratamientos físicos (altas temperaturas y aireación) y químicos (insecticidas) para la desinfección del ambiente (Subramanyam y Hagstrum, 2012).

#### **1. A.4.e. Monitoreo**

El uso de trampas adhesivas impregnadas con feromonas sintéticas es una de las estrategias comunes para la vigilancia entomológica (Hagstrum y Flinn, 2014). Athanassiou y Arthur, (2018) y Trematerra, (2012), consideran que esta herramienta, además de servir como técnica de monitoreo, puede actuar como medida de control para poblaciones de *L. serricorne*, *P. interpunctella*, *R. dominica* y *T. granarium* cuando el número de trampas dispuestas permite capturar un número crítico de adultos. Las trampas de sonda es otro de los sistemas de monitoreo utilizado comúnmente para capturar insectos que se desplazan a través de la masa de granos (Cardoso y Balcarce, 2013; Morrison et al., 2019). Dada la necesidad de un servicio especializado para la colocación de las trampas y la interpretación de los datos de captura, la adopción de esta metodología por parte de las industrias se ha visto limitada.

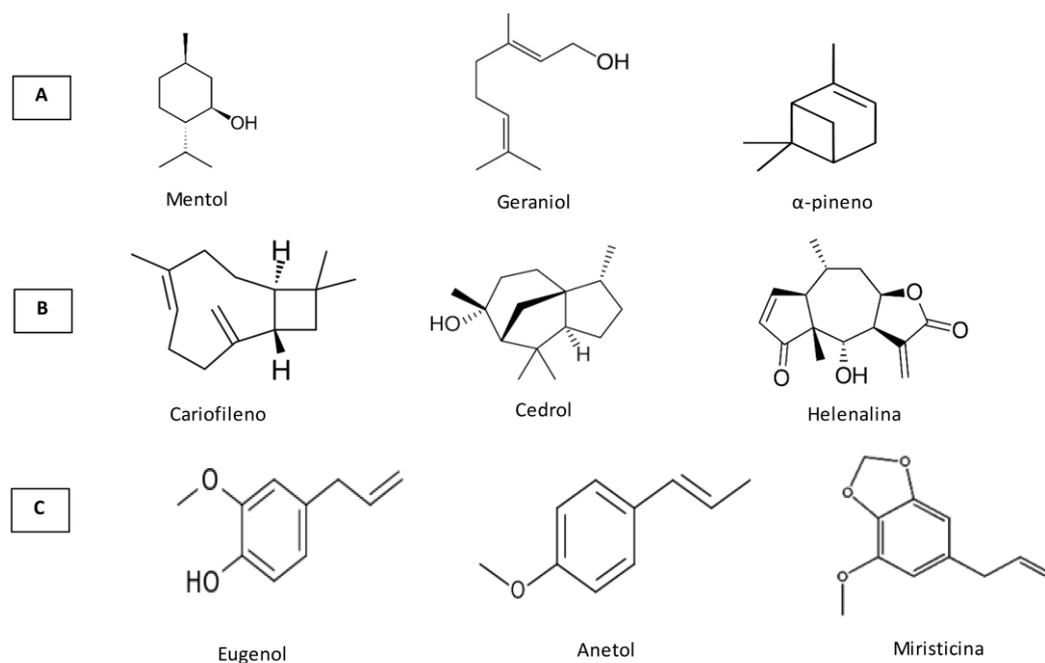
#### **1. A.5. Aceites esenciales: Una alternativa como bioinsecticidas**

Con el fin de maximizar rendimiento de los cultivos y asegurar la producción de alimentos, tanto los sistemas agrícolas como los de almacenamiento se han vuelto dependientes del uso de

insecticidas sintéticos (Athanassiou et al., 2018). Dados los efectos adversos de estos productos y con el objetivo de buscar alternativas de control amigables con el medio ambiente, en las últimas décadas se han investigado exhaustivamente los productos naturales de origen botánico y su potencial aplicación como bioinsecticidas (Akhtar et al., 2008). En este sentido, los aceites esenciales (AEs) surgen como alternativas naturales frente a los insecticidas sintéticos debido a su baja persistencia ambiental, sus diversos modos de acción y baja toxicidad en vertebrados (Ebadollahi et al., 2020).

Los AEs son producidos por el metabolismo secundario de alrededor de 17.000 especies de plantas pertenecientes a las familias Anacardiaceae, Apiaceae, Araceae, Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Cupressaceae, Geraniaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Poaceae, Rutaceae, Umbelliferae, Zingiberaceae, entre otras. Son mezclas complejas de terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), fenilpropanoides y lactonas, entre otros (Lámina 1.4) (Barbosa et al., 2020). Los AEs cumplen un rol importante en la defensa de las plantas contra el ataque de insectos, hongos, bacterias y virus, además de funcionar como aleloquímicos atractantes para insectos polinizadores (Filomeno et al., 2020; Regnault-Roger et al., 2012). En la actualidad, el uso de AEs se ha incrementado notoriamente debido a la fuerte demanda de ingredientes naturales en sectores como las industrias de alimentos, cosméticos y perfumería (Isman, 2020). Numerosos estudios han destacado que los AEs tienen actividades antifúngicas, antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias, citotóxicas e insecticidas, demostrando el efecto sinérgico de sus componentes (Barbosa et al., 2016; Rizzo et al., 2020).

**Lámina 1.4.** Ejemplos de monoterpenos (A), sesquiterpenos (B) y fenilpropanoides (C).



#### 1. A.5.a. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

La gran cantidad de metabolitos presentes en los AEs ha impulsado el estudio de su actividad biológica en diferentes cepas silvestres y resistentes de bacterias y hongos (Jampilek y Kralova, 2019; Worrall et al., 2018). El carácter hidrofóbico de los AEs determina su capacidad de alterar la pared celular lipídica, destruir membranas plasmáticas y desnaturalizar proteínas (Reyes-Jurado et al., 2015). Cepas de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Helicobacter*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Klepsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Enterobacter* y *Candida* son generalmente usadas para evaluar los efectos antimicrobianos de los AEs (Malik, 2019; Reyes-Jurado et al., 2020; Syafiq et al., 2020). En la bibliografía se pueden encontrar varios antecedentes sobre la actividad bactericida y fungicida de los AEs de *Pistacia vera* (L.), *Myrcia ovata* (Cambessedes), *Thymus bovei* (Benth), *Minthostachys verticillata* (Griseb), *Allium roseum* (L.), *Petroselinum crispum* (Mill.), *Satureja bachtiarica* (Bunge), *Ocimum suave* (Wild.), *Jatropha gossypifolia* (L.), *Juniperus rigida* (S.) y *Xanthium strumarium* (L.), entre otros. Comúnmente, componentes de los AEs como eugenol, timol, mentol, carvacrol,  $\alpha$ -terpineol y limoneno son los responsables de las

actividades antimicrobianas (Akthar et al., 2014; Malik, 2019; Reyes-Jurado et al., 2020; Vergis et al., 2015).

#### **1. A.5.b. Actividad antioxidante de los aceites esenciales**

La oxidación y el deterioro de los alimentos provocados por microorganismos constituyen uno de los grandes problemas a los que se enfrenta la industria alimentaria y sus consumidores (Pateiro et al., 2018). La oxidación de lípidos, proteínas y pigmentos son fenómenos comunes en condiciones de almacenamiento, generándose compuestos volátiles indeseables, como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes (Malik, 2019). Debido a sus propiedades redox, los AEs se convirtieron en excelentes aditivos naturales que suprimen el deterioro de los alimentos a través de la neutralización de radicales libres y la descomposición de peróxidos (Chua et al., 2019). En este sentido, los AEs de tomillo, canela, menta, albahaca, clavo, orégano, romero y salvia demostraron sus capacidad antioxidante debido a la presencia de componentes activos tales como carvacrol, timol, linalol, geranial, 1,8-cineol, eugenol, isomentona, mentona, citronelal,  $\alpha$ -terpinoleno y  $\alpha$ -terpineno (Bhavaniramy et al., 2019; Diniz do Nascimento et al., 2020).

#### **1. A.5.c. Actividad antiinflamatoria y anticancerígena de los aceites esenciales**

En la fase crónica de la inflamación se produce una sobreexpresión de genes y proteínas produciendo una mayor liberación y acumulación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Debido al estrés oxidativo, una mayor tasa de mutación ocurre en las células, activándose vías de señalización que favorecen el desarrollo de tumores mediante la regulación de la angiogénesis celular y la metástasis (Bhalla et al., 2013). En este marco, los AEs y sus componentes son de gran interés por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes que reducen la proliferación tumoral mediante efectos apoptóticos (Blowman et al., 2018; Nath et al., 2019). Por ejemplo, el 1,8-cineol, actúo como inhibidor de los leucotrienos y las prostaglandinas (Santos et al., 2004). Además, los AEs de *Trachydium roylei* (Lindt), *Artemisia argyi* (Levl.) y *Chamaecyparis obtusa* (Siebold) inhibieron la secreción de citocinas

proinflamatorias (Valdivieso-Ugarte et al., 2019). Por otro lado, los AEs de *Myrica gale* (L.) y *Pituranthos tortuosus* (Desf.) mostraron una actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer de pulmón y células cancerosas del melanoma B16F10 (Krifa et al., 2015; Silvestre et al., 2005). Asimismo, el aceite esencial de *A. roseum* inhibió la proliferación de líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano (Touihri et al., 2015).

#### **1. A.5.d. Actividad insecticida de los aceites esenciales**

Dado que los AEs pueden interferir con las funciones metabólicas y fisiológicas de los insectos actuando sobre diversos sitios de acción, distintos grupos de investigación se han abocado al estudio de la potencial actividad insecticida de estos productos (Ikbal y Pavela, 2019; Mossa, 2016). En términos generales, se ha determinado que los AEs y sus componentes pueden ejercer actividades neurotóxicas en los insectos, a través de diferentes vías como la modulación alostérica positiva de los receptores GABA, el bloqueo de los receptores de octopamina o la inhibición de acetilcolinesterasa (Jankowska et al., 2018; Plata-Rueda et al., 2020). Sin embargo, hasta la fecha, son escasos los insecticidas en el mercado elaborados con AEs como principios activos debido a diversas limitantes (Isman y Grieneisen, 2014). En primer lugar, el carácter lipofílico de los aceites determina que sean necesarios altos volúmenes de disolventes y emulsionantes para facilitar su aplicación y distribución a campo (Campolo et al., 2020). En segundo lugar, los efectos fitotóxicos de ciertos AEs dificultan su aplicación directa sobre cultivos (Karalija et al., 2020). Por último, pese a que la volatilidad y la biodegradabilidad de los componentes de los AEs ha sido considerada características positivas desde un punto de vista ambiental, reducen su eficacia a campo para el control de insectos plaga (Chaudhari et al., 2021). Por esta razón, en los últimos años, creció el interés en el diseño de formulaciones en base a AEs, especialmente nanoformulaciones, que mejoren la eficiencia y persistencia de estos productos.

### 1. A.6. Hipótesis

En referencia a los antecedentes expuestos, se plantean las siguientes hipótesis:

- ❖ Los AEs de *Mentha piperita* (L.) (Lamiales, Lamiaceae) (menta), *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats (Poales, Poaceae) (palmarosa), *Geranium maculatum* (L.) (Geraniales, Geraniaceae) (geranio), *Lavandula angustifolia* (Mill.) (Lamiales, Lamiaceae) (lavanda), *Origanum vulgare* (L.) (Lamiales, Lamiaceae) (orégano), *Laurus nobilis* (L.) (Laurales, Lauraceae) (laurel) y *Malaleuca alternifolia* (Maiden y Betche) (Myrtales, Myrtaceae) (árbol de té) poseen efectos letales por exposición a superficies tratadas y a vapores en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Las AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té modifican la susceptibilidad de *S. oryzae* y *L. serricorne* al insecticida piretroide  $\beta$ -cipermetrina por exposición a superficies tratadas.

#### 1. A.7.a. Objetivo general

El objetivo general planteado para este capítulo es evaluar los efectos letales de los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té, en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.

#### 1. A.7.b. Objetivos específicos

- ❖ Determinar la composición química de los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té que se utilizarán en los bioensayos de actividad letal.
- ❖ Evaluar el efecto letal por exposición a superficies tratadas y a vapores de los AEs en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Evaluar el efecto tóxico combinado del insecticida sintético  $\beta$ -cipermetrina y los AEs en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne* por exposición a superficies tratadas.

## **1. B. Materiales y métodos**

### **1. B.1. Materiales**

Se utilizaron los AEs de menta (*Mentha piperita* L. - Lamiaceae), palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats - Poaceae), geranio (*Geranium maculatum* L. - Geraniaceae), lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill. - Lamiaceae), orégano (*Origanum vulgare* L. - Lamiaceae), laurel (*Laurus nobilis* L. - Lauraceae) y árbol de té (*Malaleuca alternifolia* Maiden y Betche- Myrtaceae) producidos por Swiss-Just (manufacturados bajo supervisión y control de Ulrich Justrich AG, Walzenhausen, Suiza) y Aromáticas Alto valle (Mendoza, Argentina). Como solvente se utilizó acetona de grado analítico (Dorwill, Argentina) para los ensayos de actividad con insectos y éter etílico para los análisis cromatográficos. El insecticida piretroide  $\beta$ -cipermetrina se obtuvo de Sigma-Aldrich.

### **1. B.2. Caracterización de los aceites esenciales**

La composición química de cada AE se determinó mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Agilent 7890B; Agilent 5977A). La columna capilar utilizada fue HP-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm de diámetro interior  $\times$  0,25  $\mu$ m de espesor de película). Se utilizó helio como gas *carrier* (1,0 ml min<sup>-1</sup>). La temperatura del horno se mantuvo en 50 °C durante los 3 minutos iniciales; luego se programó a 5 °C min<sup>-1</sup> hasta 200 °C manteniendo esta temperatura durante 1 minuto. A continuación, se aumentó nuevamente a 50°C min<sup>-1</sup> hasta 280 °C. La temperatura del bloque de inyección fue de 250 °C. Las muestras se prepararon en una solución al 1% en éter etílico. Las alícuotas inyectadas fueron de 1  $\mu$ L, en modo split 1:20. Los espectros de masa se registraron en la modalidad de impacto electrónico a 70 eV, en un rango de masas de m/z 35 – 500 uma. Se utilizó una serie de n-alcanos (C8-C40) para determinar los índices de retención (IR) de los componentes a partir de los tiempos de retención observados en el análisis CG-EM. La identificación posterior se realizó mediante comparación de los espectros de masa almacenados en biblioteca NIST 2.0 (Standard Reference Data, Gaithersburg, MD, 2012). Los

porcentajes relativos de los componentes individuales de cada AE se obtuvieron promediando las áreas de cada pico de un análisis GC-FID (Shimadzu G14B) que se realizó mediante una columna DB-5 (30 m x 0,25 mm, espesor de película de 0,25  $\mu\text{m}$ ) y utilizando las mismas condiciones analíticas que para el análisis de CG-EM. La identificación de los componentes individuales se confirmó por comparación (co-inyección) con muestras auténticas, en caso de estar disponibles.

### **1. B.3. Insectos**

Las colonias de *S. oryzae* y *L. serricorne* (sin previa exposición a insecticida) se mantuvieron en el laboratorio de Zoología de Invertebrados II, UNS. Las crías se desarrollaron en frascos de vidrio (6 cm diámetro x 14 cm alto) cubiertos por una tela de voile para permitir la ventilación. En el caso de *S. oryzae*, cada recipiente contenía granos enteros de trigo mientras que en *L. serricorne*, se utilizó una mezcla de harina de trigo, leche en polvo y levadura en polvo (3:1:1 p/p). Ambas colonias se conservaron en una cámara de crecimiento a  $29 \pm 2$  °C, 50-70% de HR y en oscuridad. Para todos los bioensayos se utilizaron insectos adultos de 3-7 días de edad.

### **1. B.4. Bioensayos**

Con el objetivo de determinar la toxicidad de los AEs, se realizaron dos tipos de ensayos preliminares evaluando dos vías de exposición: a superficies tratadas y a vapores.

#### **1. B.4.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas**

En este bioensayo, se trataron papeles de filtro rectangulares (28,5  $\text{cm}^2$ ) con 0,5 ml de las soluciones de los AEs en acetona. Se determinó un rango de concentraciones que fue desde 50 a 800  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Luego de la evaporación del solvente, aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente, los papeles de filtro se introdujeron en un frasco de vidrio (2 cm de diámetro x 9 cm de alto) quedando adosado a la base y pared del recipiente. En el control positivo, los papeles de filtro se trataron con soluciones de  $\beta$ -cipermetrina en acetona, en un rango de 2,5 a 400  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , mientras que en el control negativo, el papel se trató solo con

acetona. Posteriormente, se agregaron diez adultos de *S. oryzae* o *L. serricornis* y el frasco se cubrió con una tela de voile. Se realizaron cuatro réplicas independientes. Todos los experimentos se mantuvieron a  $29 \pm 2$  ° C y 50 - 70% de HR y en oscuridad. Luego de 72 h, se registró la mortalidad. Con estos datos se determinaron los valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> (concentraciones necesarias para matar al 50 y 90% de la población, respectivamente). Los adultos se consideraron muertos cuando no se observaron movimientos abdominales ni de apéndices (patas, alas y antenas).

#### **1. B.4.b. Toxicidad por exposición a vapores**

En este bioensayo se evaluó la toxicidad de los AEs en *S. oryzae* y *L. serricornis* mediante una cámara fumigante. Los AEs se aplicaron directamente sobre papeles de filtro (4 cm<sup>2</sup>) adheridos a las caras inferiores de una base de caja de Petri (8,5 de diámetro x 2 cm de alto). Las concentraciones de los AEs variaron de 6,42 a 257 mg. L aire<sup>-1</sup>. En el control positivo, los papeles de filtro se trataron con una solución del insecticida sintético en acetona alcanzando las mismas concentraciones finales, mientras que, en el control negativo, únicamente con acetona. La placa de Petri se cubrió con tela de voile y una tapa con un orificio central, para permitir la circulación de aire. Sobre este tejido se liberaron quince adultos cubiertos por un envase de 350 ml. El conjunto fue herméticamente sellado con cinta adhesiva. Cada tratamiento y los controles se replicaron de forma independiente cuatro veces. Todos los bioensayos se mantuvieron a  $29 \pm 2$  ° C y 50 - 70% de HR y en oscuridad. La mortalidad se determinó luego de 72 h. Con estos datos se determinaron los valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>. La mortalidad se registró siguiendo la metodología ya descrita en el ítem 1.B.4.a.

#### **1. B.4.c. Efecto combinado insecticida sintético y aceites esenciales**

De la misma manera que en el ítem 1.B.4.a, se trataron papeles de filtro (28,5 cm<sup>2</sup>) con 0,5 ml de soluciones de insecticida sintético en acetona a valores CL<sub>50</sub> determinados en el punto 1.B.4.a. Luego de la evaporación del solvente, estos papeles se rociaron con soluciones de los

AEs en acetona a valores de  $CL_{50}$  estimados en 1.B.4.a. Se realizaron tres controles: en el primero, los papeles de filtro se trataron únicamente con acetona; en el segundo y en el tercero, con soluciones de  $\beta$ -cipermetrina o de los AEs, a sus respectivos valores de  $CL_{50}$ . Luego de la evaporación del solvente, los papeles de filtro se introdujeron en un frasco de vidrio (2 cm de diámetro x 9 cm de alto) y se agregaron diez adultos de *S. oryzae* o *L. serricornis* que se cubrieron con tela de voile. Se realizaron cuatro réplicas independientes. Todos los experimentos se mantuvieron a  $29 \pm 2$  ° C y 50 - 70% de HR y en oscuridad. Luego de 72 h, se registró el porcentaje de mortalidad. La mortalidad se registró siguiendo la misma metodología que en el ítem 1.B.4.a.

### **1. B.5. Análisis estadístico**

Los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  se calcularon con sus respectivos intervalos de confianza del 95% empleando el software estadístico SPSS 25.0. Estos valores se consideraron significativamente distintos si no se superponían los intervalos de confianza. Los datos obtenidos del efecto combinado de insecticida sintético y los AEs fueron analizados mediante ANOVA y DMS.

## 1. C. Resultados

### 1. C.1. Caracterización de los aceites esenciales

Los componentes identificados en los AEs y sus porcentajes relativos se muestran en la Tabla 1.1.

Un total de 94 compuestos fueron identificados por CG-EM como componentes de los distintos AEs. En el análisis de la composición química de los aceites se observó que los monoterpenos y sesquiterpenos fueron los constituyentes mayoritarios seguidos de una proporción minoritaria de hidrocarburos aromáticos y ésteres. El análisis químico reveló que en el aceite de **menta**, los componentes mayoritarios fueron isomentol (>20%), isomentona y neomentol (>10%), mientras que en el aceite de **palmarosa**, se detectó mayormente la presencia de geraniol (>40%), geranial (>20%) y acetato de geranilo (>10%). En el aceite de **geranio** se identificaron  $\beta$ -citronelol (>37%) y geranial (>10%) como los componentes principales, mientras que, en el aceite de **lavanda**, los componentes principales resultaron ser acetato de linalilo y linalool (>28%). En el aceite de **orégano**, los compuestos con mayor representación fueron carvacrol (>14%), cis  $\beta$ -terpineol (>11%) y terpinen-4-ol (>10%), mientras que en el aceite de **laurel** se determinó la presencia de 1,8-cineol (>26%) y acetato de terpenilo (>17%) como compuestos mayoritarios. Por último, el aceite de **árbol de té** presentó terpinen-4-ol (>37%) y  $\gamma$ -terpineno (>12%) como componentes principales.

**Tabla 1.1.** Composición química de los AEs y contenido porcentual de cada componente.

Componentes	IR exp <sup>a</sup>	IR lit <sup>b</sup>	Orégano	Árbol de té	Geranio	Menta	Lavanda	Palmarosa	Laurel	Método Identif. <sup>d</sup>
$\alpha$ -tuyona <sup>bc</sup>	924	925	0,75						0,62	Ri, MS
$\alpha$ -pineno <sup>bc</sup>	940	939	0,77	2,5		0,27	1,57		4,66	Ri, MS, S
canfeno <sup>bc</sup>	953	953	0,47						0,67	Ri, MS
sabineno <sup>bc</sup>	973	974							8,12	Ri, MS
$\beta$ -pineno <sup>bc</sup>	980	980	3,11			0,52	0,68		2,96	Ri, MS
$\beta$ -mirceno <sup>ac</sup>	989	990	1,28				0,87		0,92	Ri, MS, S
$\alpha$ -felandreno <sup>mc</sup>	1007	1006	0,37							Ri, MS
3-careno <sup>bc</sup>	1010	1011					0,87			Ri, MS
$\alpha$ -terpineno <sup>mc</sup>	1014	1015	4	4,64						Ri, MS
$\delta$ -3-careno <sup>bc</sup>	1020	1019		0,66						Ri, MS
<i>o</i> -cimeno <sup>ha</sup>	1022	1021	3,56	4,12			0,95			Ri, MS
D-limoneno <sup>mc</sup>	1029	1030	2,94							Ri, MS, S
1,8 – cineol <sup>bc</sup>	1032	1033		4,31		4,58	2,01		26,67	Ri, MS, S
cis- $\beta$ -ocimeno <sup>ac</sup>	1045	1046						0,75		Ri, MS
trans- $\beta$ -ocimeno <sup>ac</sup>	1049	1050	1,05				0,85			Ri, MS
$\gamma$ -terpineno <sup>mc</sup>	1056	1057	5,76	12,6					0,84	Ri, MS
hidrato de trans-sabineno <sup>bc</sup>	1070	1070	2,69							Ri, MS
terpinoleno <sup>mc</sup>	1087	1088	1,92	5,88						Ri, MS
$\beta$ -linalool <sup>ac</sup>	1099	1098			1,58		28,83	3,49	7,22	Ri, MS, S
cis óxido de rosa <sup>mc</sup>	1110	1111			2,32					Ri, MS
$\beta$ -tujona <sup>bc</sup>	1112	1112					0,45			Ri, MS
cis- <i>p</i> -ment-2-en-1-ol <sup>mc</sup>	1122	1123			0,79					Ri, MS
isopinocarveol <sup>bc</sup>	1140	1139		0,68						Ri, MS
camfor <sup>bc</sup>	1144	1143					1,09			Ri, MS, S
cis- $\beta$ -terpineol <sup>mc</sup>	1145	1144	11,04							Ri, MS
trans-verbenol <sup>bc</sup>	1146	1146	0,53							Ri, MS

óxido de trans-limoneno <sup>bc</sup>	1150	1149	1,26					Ri, MS
mentona <sup>mc</sup>	1153	1154		1,34	21,24			Ri, MS
isoborneol <sup>bc</sup>	1154	1155	0,82					Ri, MS
isomentona <sup>mc</sup>	1165	1164		5,91	4,95			Ri, MS
borneol <sup>bc</sup>	1170	1165	2,07			3,27		Ri, MS,S
neomentol <sup>mc</sup>	1171	1170			4,88			Ri, MS
óxido de trans-linalool <sup>mc</sup>	1172	1171				1,21		Ri, MS
mentol <sup>mc</sup>	1173	1172			50,06			Ri, MS, S
terpinen-4-ol <sup>mc</sup>	1180	1182	10,98	37,52		5,87	2,40	Ri, MS, S
isomentol <sup>mc</sup>	1182	1182			0,92			Ri, MS
α-terpineol <sup>mc</sup>	1190	1191	2,59	7,52		1,88	3,15	Ri, MS, S
trans-piperitol <sup>mc</sup>	1195	1196	1,63					Ri, MS
γ-terpineol <sup>mc</sup>	1200	1201		2,69				Ri, MS
timol metil eter <sup>ha</sup>	1128	1228	0,48					Ri, MS
citronelol <sup>ac</sup>	1232	1233		37,97				Ri, MS
citral <sup>ac</sup>	1239	1240				1,16		Ri, MS
isotimol metil eter <sup>ha</sup>	1244	1244	2,33					Ri, MS
carvona <sup>mc</sup>	1250	1250		0,51				Ri, MS
acetato de linalilo <sup>ac</sup>	1256	1257	1,47			28,47	0,68	Ri, MS
geraniol <sup>ac</sup>	1261	1262	1,08		6,39		40,89	Ri, MS
geranial <sup>ac</sup>	1268	1268			13,16		23,77	Ri, MS
acetato de bornilo <sup>bc</sup>	1285	1285					0,68	Ri, MS
acetato de lavandulilo <sup>ac</sup>	1290	1289				3,38		Ri, MS
acetato de mentilo <sup>mc</sup>	1295	1294				6,87		Ri, MS
carvacrol <sup>ha</sup>	1300	1300	14,23					Ri, MS, S
acetato de isomentilo <sup>mc</sup>	1304	1303				0,14		Ri, MS
formiato de geranilo <sup>ac</sup>	1305	1305			1,88		0,71	Ri, MS

óxido de aromadendreno <sup>spq</sup>	1332	1333						1,65	Ri, MS	
acetato de terpenilo <sup>mc</sup>	1350	1352						17,14	Ri, MS	
eugenol <sup>ha</sup>	1355	1356						0,63	Ri, MS, S	
acetato de nerilo <sup>ac</sup>	1364	1365				2,34			Ri, MS	
acetato de geranilo <sup>ac</sup>	1385	1383	0,21		0,61		12,44		Ri, MS	
$\beta$ -bourboneo <sup>spt</sup>	1387	1388			1,62				Ri, MS	
$\beta$ -elemeno <sup>spm</sup>	1388	1389			0,85			0,85	Ri, MS	
metil eugenol <sup>ha</sup>	1400	1401						6,26	Ri, MS	
$\alpha$ -gurjuneno <sup>spt</sup>	1410	1409		2,86					Ri, MS	
trans-cariofileno <sup>spb</sup>	1425	1426	5,19		2,37	4,17	6,42	1,91	2,08	Ri, MS, S
$\alpha$ -guaieno <sup>spb</sup>	1440	1439			0,68					Ri, MS
propionato de geranilo <sup>ac</sup>	1450	1452			8,44					Ri, MS
$\alpha$ -cariofileno <sup>spb</sup>	1452	1454	0,3		1,69		0,36			Ri, MS
ácido undecanoico <sup>ag</sup>	1456	1458			1,31					Ri, MS
<i>E</i> - $\beta$ -farneseno <sup>spa</sup>	1458	1458					1,88			Ri, MS
allooromadendreno <sup>spt</sup>	1465	1465		0,46	0,61					Ri, MS
$\beta$ -cadineno <sup>spb</sup>	1470	1472			0,53					Ri, MS
germacreno D <sup>spm</sup>	1480	1479	1,95		2,28	1,40	0,28			Ri, MS
$\beta$ -selineno <sup>spb</sup>	1483	1482						0,54		Ri, MS
$\gamma$ -gurjuneno <sup>spb</sup>	1485	1484						0,36		Ri, MS
valenceno <sup>spb</sup>	1491	1491						1,29		Ri, MS
viridifloreno <sup>spt</sup>	1493	1493	2,18		1,46					Ri, MS
$\alpha$ -muuroleno <sup>spb</sup>	1500	1499						1,15		Ri, MS
$\gamma$ -cadineno <sup>spb</sup>	1512	1512	1,5					0,34		Ri, MS
$\delta$ -cadineno <sup>spb</sup>	1520	1520			1,99			0,77		Ri, MS
butirato de citronelilo <sup>ac</sup>	1537	1536			1,82					Ri, MS
espatulenol <sup>spt</sup>	1580	1579	0,75							Ri, MS, S
óxido de cariofileno <sup>spb</sup>	1581	1581	0,8		0,81		0,40	0,46	1,16	Ri, MS

óxido de isoaromadendreno <sup>spt</sup>	1585	1584					0,49	Ri, MS	
globulol <sup>spt</sup>	1588	1587	2,18					Ri, MS, S	
viridiflorol <sup>spt</sup>	1590	1590	0,52					Ri, MS	
cubenol <sup>spb</sup>	1619	1621					0,55	Ri, MS	
óxido de alloaromadendreno <sup>spq</sup>	1643	1646					0,95	Ri, MS	
tiglato de geranilo <sup>ac</sup>	1697	1700		1,60				Ri, MS	
β-bisabolol <sup>spm</sup>	1660	1665					1,04	Ri, MS	
(Z, Z)-farnesol <sup>spa</sup>	1705	1709				1,20		Ri, MS	
(E, E)-farnesol <sup>spa</sup>	1720	1722				1,49		Ri, MS	
palmitato de metilo <sup>ag</sup>	1923	1927	1,26	1,61		1,23	2,22	Ri, MS, S	
linoleato de metilo <sup>ag</sup>	2087	2092	0,75	0,99		0,17	0,52	Ri, MS, S	
oleato de metilo <sup>ag</sup>	2099	2103	5,64	7,75		4,70	8,78	3,21	Ri, MS, S
estearato de metilo <sup>ag</sup>	2120	2128	0,31				0,22	Ri, MS, S	

<sup>a</sup> IR exp., índice de retención determinado en una columna HP-5MS utilizando la serie homologa de n-alcanos, <sup>b</sup> IR lit., índice de retención tomado de Adams (2017), <sup>c</sup> Determinado por integración CG FID, <sup>d</sup> IR = índice de retención idéntico a la bibliografía, MS = identificación basada en la comparación de los espectros de masas, S = tiempo de retención idéntico al compuesto auténtico. Para cada componente se indica entre paréntesis si este corresponde a un monoterpeneo con estructura acíclica (ac), monocíclica (mc), bicíclica (bc), sesquiterpenos con estructura acíclica (spa), monocíclica (spm), bicíclica (spb), tricíclica (spt) y tetracíclica (spq), hidrocarburos aromáticos (ha) y ésteres de ácidos grasos (ag).

### 1. C.2. Toxicidad por exposición a superficies tratadas

En los controles negativos, en ambos insectos, no se registró mortalidad luego de 72 h. Para el caso del control positivo ( $\beta$ -cipermetrina), los valores de  $CL_{50}$  estimados fueron  $15,41 \mu\text{g cm}^{-2}$  en *S. oryzae*, y  $169,71 \mu\text{g cm}^{-2}$  para *L. serricorne*. Consecuentemente, *S. oryzae* fue aproximadamente 11 veces más susceptible que *L. serricorne*.

En el caso de *S. oryzae*, para los aceites se estimaron valores de  $CL_{50}$  en un rango entre 202,98 y  $342,79 \mu\text{g cm}^{-2}$ . El aceite de geranio fue el más efectivo, aunque no se encontraron diferencias significativas entre este aceite y el de palmarosa ( $P>0,05$ ). Con los AEs de menta, lavanda, orégano y árbol de té se obtuvieron valores de  $CL_{50}$  en el rango de 262,39 a  $293,84 \mu\text{g cm}^{-2}$ , no encontrándose diferencias significativas entre ellos ( $P>0,05$ ). El AE de laurel fue el menos efectivo de todos los aceites probados, aunque no se encontraron diferencias significativas con los aceites antes mencionados ( $P>0,05$ ), salvo con el AE de menta ( $P<0,05$ ) (Tabla 1.2). Cabe destacar que, en este insecto, el insecticida sintético fue 13,17 veces más tóxico que el AE de geranio.

En el caso de *L. serricorne*, el rango de valores de  $CL_{50}$  de los aceites fue de 241,63 a  $566,49 \mu\text{g cm}^{-2}$ . El AE de palmarosa generó la mayor actividad insecticida, encontrándose diferencias significativas con el resto de los AEs ( $P<0,05$ ). Con Los AEs de orégano, geranio y menta se hallaron valores de  $CL_{50}$  en el rango de 302,51 a  $343,24 \mu\text{g cm}^{-2}$ , no encontrándose diferencias significativas entre ellos ( $P>0,05$ ). Los aceites de lavanda, árbol de té y laurel fueron los que produjeron menor efecto insecticida, siendo sus valores de  $CL_{50}$  significativamente mayores que los demás aceites ( $P<0,05$ ). El AE de laurel fue el menos efectivo de todos los aceites probados ( $P<0,05$ ) (Tabla 1.2). En este insecto, no se encontraron diferencias significativas entre el efecto tóxico producido por insecticida sintético y el AE más efectivo (palmarosa).

**Tabla 1.2.** Toxicidad por superficies tratadas de los AEs en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.

Especies	AEs	CL <sub>50</sub> (µg cm <sup>-2</sup> ) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub> <sup>b</sup>	CL <sub>90</sub> (µg cm <sup>-2</sup> ) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub> <sup>b</sup>	χ <sup>2</sup> (gl=4) <sup>c</sup>	P <sup>d</sup>
<i>Sitophilus oryzae</i>	Menta	262,39 <b>c</b>	233,77 – 289,26	425,19 <b>c</b>	389,00 – 476,48	4,097	0,393
	Palmarosa	235,48 <b>bc</b>	213,81 – 257,10	340,54 <b>b</b>	312,43 -381,92	1,980	0,739
	Geranio	202,98 <b>b</b>	170,65 – 230,77	364,55 <b>bc</b>	328,47 – 417,84	1,241	0,871
	Orégano	293,84 <b>cd</b>	276,66 – 321,24	527,80 <b>cd</b>	442,70 – 712,87	7,235	0,124
	Árbol de té	287,63 <b>cd</b>	251,23 – 321,06	517,84 <b>cd</b>	468,98 – 589,63	4,021	0,403
	Laurel	342,79 <b>d</b>	300,75 – 384,44	640,57 <b>d</b>	570,28 – 752,20	1,222	0,874
	Lavanda	286,79 <b>cd</b>	259,22 – 337,26	669,32 <b>d</b>	578,05 – 832,66	1,706	0,790
	β-cipermetrina	15,41 <b>a</b>	12,34 – 18,81	35,37 <b>a</b>	29,93 – 44,28	6,478	0,166
<i>Lasioderma serricorne</i>	Menta	343,24 <b>b</b>	301,28 – 384,83	640,85 <b>b</b>	570,68 – 752,26	1,670	0,796
	Palmarosa	241,63 <b>ab</b>	204,77 – 271,93	452,16 <b>a</b>	409,16 - 514,26	3,453	0,485
	Geranio	330,88 <b>b</b>	281,02 – 377,77	678,11 <b>b</b>	593,77 – 821,70	3,311	0,507
	Orégano	302,51 <b>b</b>	272,45 – 331,41	488,09 <b>a</b>	447,88 – 544,55	4,325	0,364
	Árbol de té	447,75 <b>c</b>	410,63 – 492,14	703,60 <b>b</b>	633,63 – 813,54	3,086	0,544
	Laurel	566,49 <b>d</b>	522,12 – 633,18	806,04 <b>b</b>	717,74 – 963,14	1,381	0,848
	Lavanda	443,15 <b>c</b>	404,28 – 489,61	716,86 <b>b</b>	641,92 – 836,57	0,361	0,986
	β-cipermetrina	169,71 <b>a</b>	136,59 – 205,43	390,64 <b>a</b>	334,42 – 478,01	5,376	0,251

<sup>a</sup> Los valores de CL<sub>50</sub> seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna presentan diferencias significativas (NSIC, P<0,05). <sup>b</sup>IC: intervalos de confianza al 95%.

### 1. C.3. Toxicidad por exposición a vapores

En *S. oryzae* y *L. serricornis*, en los controles negativos, no se registró mortalidad luego de 72 h. Cabe mencionar que al final del bioensayo, tampoco se observó mortalidad en ambas especies expuestas al insecticida sintético (control positivo).

En el ensayo con *S. oryzae*, los AEs de geranio, laurel y árbol de té produjeron valores de  $CL_{50}$  en un rango entre 24,75 a 109,75 mg. L aire<sup>-1</sup> (Tabla 1.3). Para el caso de los aceites de palmarosa, orégano, menta y lavanda no se observó mortalidad incluso a máxima dosis (257 mg. L aire<sup>-1</sup>), por la cual los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  no fueron calculados. El aceite de árbol de té fue el más efectivo, siendo su valor de  $CL_{50}$  significativamente menor que los de los aceites de laurel y geranio ( $P < 0,05$ ). Para estos últimos, no se encontraron diferencias significativas entre sus valores de  $CL_{50}$  ( $P > 0,05$ ).

En el caso de *L. serricornis*, los AEs tuvieron valores de  $CL_{50}$  en un rango entre 66,82 a 160,48 mg. L aire<sup>-1</sup> (Tabla 1.3). La mayor actividad insecticida se observó para el aceite de geranio, sin embargo, no se hallaron diferencias significativas con los AEs de orégano, menta, árbol de té y laurel ( $P > 0,05$ ). Los aceites de palmarosa y lavanda fueron los menos efectivos con valores de  $CL_{50}$  más elevados ( $P < 0,05$ ).

**Tabla 1.3.** Toxicidad por exposición a vapores de los AEs en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.

Especies	AEs	CL <sub>50</sub> (mg L Aire <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub> <sup>b</sup>	CL <sub>90</sub> (mg L Aire <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub> <sup>b</sup>	X <sup>2</sup> (gl=4)	p
<i>Sitophilus oryzae</i>	Geranio	109,75 <b>b</b>	98,71 – 125,18	185,79 <b>b</b>	162,58 – 222,60	5,438	0,245
	Árbol de té	24,75 <b>a</b>	20,00 – 29,89	58,94 <b>a</b>	50,28 – 72,84	0,073	0,999
	Laurel	91,41 <b>b</b>	71,84 – 122,02	160,82 <b>b</b>	128,24 – 230,82	7,983	0,092
<i>Lasioderma serricorne</i>	Menta	70,21 <b>a</b>	61,41 – 80,59	134,65 <b>a</b>	118,70 – 157,48	6,413	0,170
	Palmarosa	148,81 <b>b</b>	130,94 – 170,84	282,82 <b>b</b>	248,94 - 331,07	6,515	0,164
	Geranio	66,82 <b>a</b>	57,00 – 78,41	144,69 <b>a</b>	125,49 – 173,31	5,629	0,229
	Orégano	85,58 <b>a</b>	74,76 – 98,94	164,23 <b>a</b>	143,67 – 194,29	5,951	0,203
	Árbol de té	81,86 <b>a</b>	73,65 – 91,50	132,73 <b>a</b>	119,46 – 150,96	3,322	0,505
	Laurel	78,61 <b>a</b>	61,75 – 102,93	141,25 <b>a</b>	113,81 – 196,81	7,514	0,111
	Lavanda	160,48 <b>b</b>	136,46 – 193,00	350,66 <b>b</b>	296,71 – 436,72	6,395	0,172

<sup>a</sup> Los valores de CL<sub>50</sub> seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna presentan diferencias significativas (NSIC, P<0,05). <sup>b</sup>Los intervalos de confianza del 95% se muestran entre paréntesis.

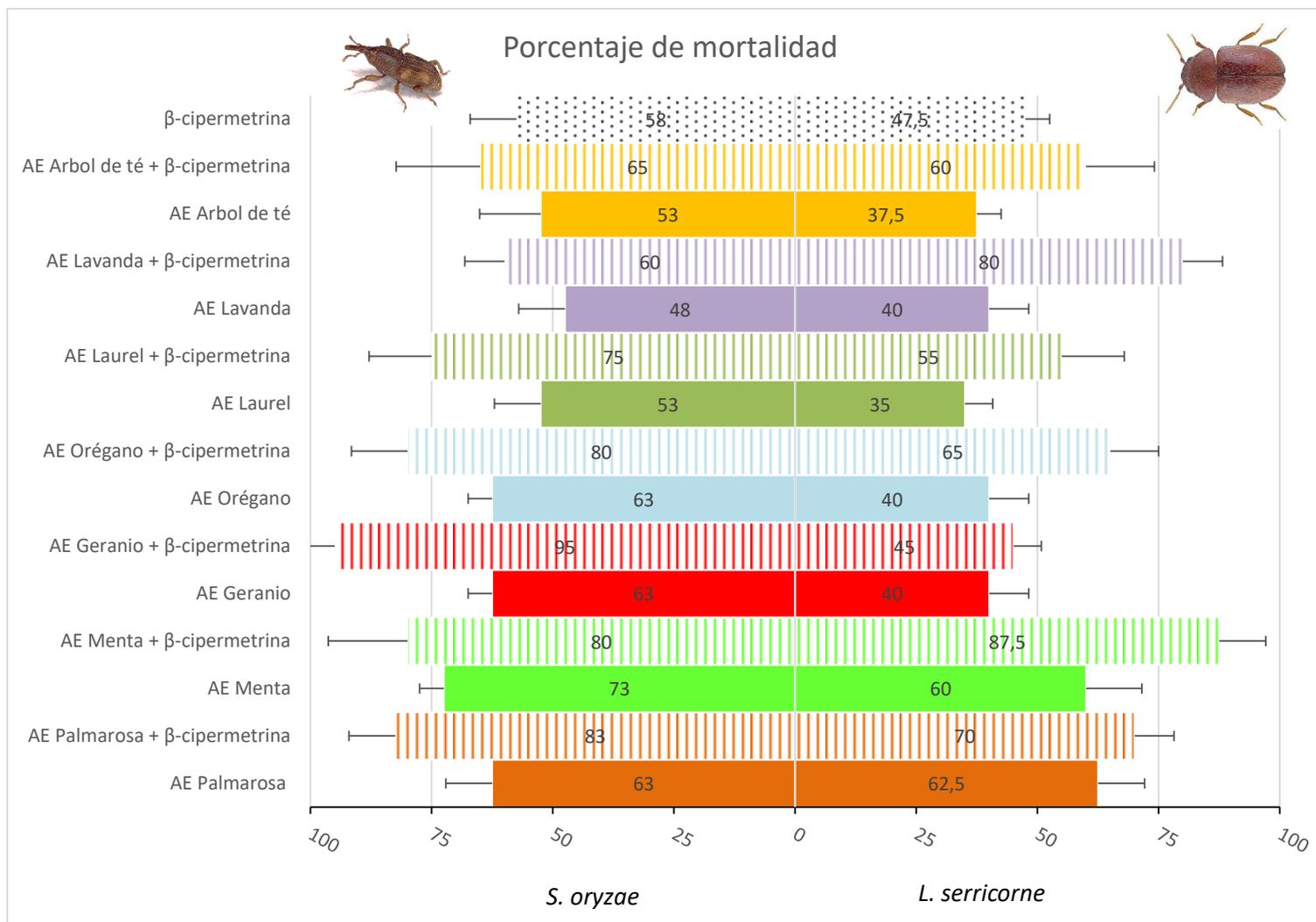
#### 1. C.4. Efecto combinado insecticida sintético y aceites esenciales

Los resultados sobre la mortalidad en *S. oryzae* y *L. serricorne* después de la exposición a una combinación del insecticida  $\beta$ -cipermetrina y los AEs a concentraciones de  $CL_{50}$  durante 72 horas se muestran en la lámina 1.5. En el caso de los controles negativos, no se registró mortalidad para ambos insectos al final del bioensayo. Los porcentajes de mortalidad producidos por el insecticida sintético fueron de 57,5 y 47,5% en *S. oryzae* y *L. serricorne*, respectivamente.

En *S. oryzae*, el porcentaje de mortalidad determinado por la combinación del insecticida sintético y los AEs de geranio, palmarosa, orégano y laurel fue significativamente mayor al efecto tóxico de los aceites individuales ( $P < 0,05$ ). Para la combinación insecticida sintético y los AEs de árbol de té, lavanda y menta, no se hallaron diferencias significativas con los aceites libres ( $P > 0,05$ ).

En *L. serricorne*, la combinación de insecticida sintético y los AEs de lavanda, orégano y menta incrementó significativamente el porcentaje de mortalidad en comparación con los aceites individuales ( $P < 0,05$ ). En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre la toxicidad producida por la combinación insecticida sintético y los AEs de árbol de té, laurel, geranio o palmarosa y la generada por los aceites libres ( $P > 0,05$ ).

**Lámina 1.5.** Porcentaje de mortalidad del efecto combinado de insecticida sintético y AEs a valores de  $CL_{50}$  en *S. oryzae* y *L. serricorne*. Se grafica la media y su desvió estándar N: 4 réplicas.



## 1. D. Discusión

El análisis químico reveló que los AEs en estudio son mayoritariamente mezclas de monoterpenos acíclicos, monocíclicos y bicíclicos. En menor representación se encuentran los sesquiterpenos bicíclicos, seguido de los hidrocarburos aromáticos y ésteres de ácidos grasos. La determinación de los perfiles químicos de los AEs es de vital importancia a la hora de evaluar su efecto biológico (en este caso su potencial actividad insecticida) dado que es común que un mismo aceite varíe su composición tanto cuantitativa como cualitativamente frente a distintas condiciones de cultivo o extracción (Athanassiou et al., 2013). Entre estas se citan, el genotipo de la planta, el órgano utilizado para la extracción, las condiciones climáticas y del suelo, los niveles de nutrición y los métodos de cosecha, secado y extracción (Baptista-Silva et al., 2020; Guettal et al., 2021).

Es importante mencionar que los AEs de especímenes del género *Mentha* suelen poseer altos porcentajes de monoterpenos cíclicos y agruparse en: a) ricos en mentol, b) ricos en carvona y c) ricos en pulegona/piperitona (Kumar et al., 2011). El aceite de menta utilizado en este trabajo se corresponde con el primer grupo, dado que se determinó una proporción de mentol superior al 50%. Varios autores han reportado para el AE de *M. piperita* una composición de isómeros de mentol similar a la hallada en el presente trabajo (Bassolé et al., 2010, Beigi et al., 2018; Husain et al., 2015).

En el caso del aceite de palmarosa utilizado en este trabajo, los compuestos mayoritarios corresponden a monoterpenos acíclicos, con geraniol representando un 40%, junto con geranial y acetato de geranilo en 23,77 y 12,44%, respectivamente. Cabe destacar que son varios los trabajos que mencionan al geraniol como el compuesto con mayor representación en el AE de esta gramínea, con porcentajes mayores al 80% en algunos casos (Rajeswara et al., 2009; Randriamiharisoa y Gaydou, 1987; Rao et al., 2005).

Al igual que el aceite de palmarosa, en el AE de geranio se observó que los monoterpenos acíclicos superan el 70% siendo  $\beta$ -citronelol (37,97%) y geranial (13,16%) los de mayor presencia.

Según et al Filippova et al. (2020),  $\beta$ -citronelol y geranial junto con geraniol y neral son los principales compuestos encontrados en este aceite. En concordancia con nuestro estudio, Gallardo et al. (2012) informaron una composición similar para el aceite de geranio con  $\beta$ -citronelol, geraniol, linalool, mentona y formiato de citronelilo como compuestos mayoritarios. Por otra parte, y teniendo en cuenta la clasificación de quimiotipos del género *Lavanda* propuesta por Aprotosaie et al. (2017), el AE de lavanda utilizado en este trabajo se corresponde al quimiotipo rico en monoterpenos acíclicos como acetato de linalilo y linalool. Varios autores indicaron la presencia de estos dos compuestos como componentes mayoritarios, con proporciones similares a las determinadas en este estudio (Abou Baker et al., 2021; Djenane et al., 2012; Umezu et al., 2006).

En lo que respecta al aceite de orégano, atendiendo a las variaciones de los perfiles químicos de los aceites, se conocen dos quimiotipos teniendo en cuenta el tipo de hidrocarburos aromáticos: aquellos ricos en timol o en carvacrol (Baricevic y Bartol, 2002; Leyva-López et al., 2017). De acuerdo al perfil químico, el AE de este trabajo se corresponde al segundo grupo teniendo el carvacrol una representación del 14,23% y no detectándose timol. Además, en este aceite se detectó abundante presencia de monoterpenos monocíclicos como terpineol y *cis*- $\beta$ -terpneol.

Para el aceite de laurel, el análisis químico reveló que los componentes mayoritarios son monoterpenos monocíclicos (1,8-cineol y acetato de terpenilo) que alcanzan el 43,81%. Es sabido que los aceites de *L. nobilis* son ricos en 1,8-cineol, más del 30%, seguido de otros componentes como  $\alpha$ -acetato de terpenilo, linalool,  $\alpha$ -terpinol, y timol (Guedri et al., 2020). Cabe señalar que varios estudios informan para este aceite una composición química similar a la hallada en la presente tesis (Bouzouita et al., 2001; Snuossi et al., 2016; Stefanova et al., 2020; Tomar et al., 2020).

Por último, en el aceite de árbol de té, es posible identificar distintos quimiotipos atendiendo a las variaciones de los monoterpenos monocíclicos: ricos en terpinoleno, en terpinen-4-ol o en

1,8-cineol (Yadav et al., 2017). En nuestro estudio, este AE se corresponde al segundo grupo registrándose terpinen 4-ol ( $\approx 38\%$ ) y  $\gamma$ -terpineno ( $\approx 12\%$ ) como componentes mayoritarios que sumados a otros monoterpenos monocíclicos alcanzan el 75%. Varios autores, estudiando AE de árbol de té del quimiotipo terpinen-4-ol, han reportado perfiles químicos similares al utilizado en este estudio (Bishop, 1995; Caldefie-Chezet et al., 2006; Cox et al., 2001; Hart et al., 2000).

El insecticida  $\beta$ -cipermetrina es un piretroide cuyo uso aumentó significativamente en los últimos años (Narayanan et al., 2020). Nuestros resultados mostraron que *S. oryzae* fue 11 veces más susceptible que *L. serricorne* a este insecticida, cuando se lo utilizó en el bioensayo por exposición a superficies tratadas mientras que, por exposición a vapores no generó toxicidad en ninguna especie. Estos datos son coherentes con trabajos anteriores que demostraron que los individuos de género *Sitophilus* suelen ser más susceptibles a diferentes productos insecticidas que otros coleópteros plaga de alimentos almacenados (Esmaili et al., 2013; Sahaf et al., 2008; Urrutia et al., 2020). Las diferencias en la susceptibilidad entre *S. oryzae* y *L. serricorne* observadas en este trabajo, podrían explicarse por factores biológicos, como las variaciones interespecíficas en el metabolismo de detoxificación. En este sentido, *L. serricorne* podría metabolizar los productos insecticidas en mayor rapidez, lo que permitiría resistir dosis más altas de estos productos. Además, la susceptibilidad de cada especie puede estar relacionada con su composición genética, lo que podría explicar porque las poblaciones de *S. oryzae* son más susceptibles a los insecticidas (Müller, 2018; Uhl et al., 2016). La falta de actividad fumigante de este insecticida piretroide en ambas especies podría deberse a su baja volatilidad en relación directa a la baja presión de vapor que presenta ( $1,3 \times 10^{-9}$  mmHg a 20 °C).

En el presente trabajo, la actividad insecticida de los AEs varió de acuerdo con la vía de exposición. Es sabido, que tanto la forma de exposición como la composición química de un AE influyen en los efectos tóxicos que estos productos generan (Mossa, 2016; Piri et al., 2020; Yang et al., 2021). Es decir, la toxicidad de los AEs depende tanto de sus propiedades fisicoquímicas

como del resultado de las diferentes fases toxicocinéticas y toxicodinámicas (penetración, distribución, metabolismo e interacción con el sitio de acción) (Sfara et al., 2009).

Por exposición a superficies tratadas en *S. oryzae*, los AEs tuvieron valores de  $CL_{50}$  el rango de 225 a 342  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , mientras que en *L. serricorne*, de 241 a 566  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Tal lo observado para el insecticida sintético, *L. serricorne* fue más tolerante al efecto por exposición a superficies tratadas de los AEs. En estos bioensayos además se observó que los AEs de geranio y palmarosa produjeron mayor actividad insecticida en *S. oryzae*, mientras que el AE de palmarosa fue el más efectivo en *L. serricorne*. Los constituyentes mayoritarios de estos dos aceites son monoterpenos acíclicos como citronelol, geraniol, geranial, y acetato de geranilo que sumados a otros compuestos de esta clase superan el 70%. Varios antecedentes describen la alta eficacia del geraniol y citronelol por exposición a superficies tratadas en insectos plaga de productos almacenados, reportando además que los monoterpenos acíclicos poseen mayor toxicidad que lo cíclicos (Abdelgaleil et al., 2009; Adel et al., 2018; Cao et al., 2018; He et al., 2021; Oyedeji et al., 2020). Pese a que el aceite de lavanda también es rico en monoterpenos acíclicos, trabajos previos del grupo, demostraron que este aceite es menos efectivo de que los AEs de *P. interpunctella* y *Blatella germanica* (L.) (Jesser et al., 2017; Yeguerman et al., 2020). En este sentido, varios autores demostraron la menor toxicidad del linalool frente a los monoterpenos geraniol y citronelol en *Musca domestica* (L.), *Pediculus humanus capitis* (De Geer), *Culex pipiens pipiens* (L.), *R. dominica* (Abouelatta et al., 2020; Gallardo et al., 2012; Gallardo y Picollo, 2015; Lee et al., 1997; Tabari et al., 2017).

Por otra parte, en *L. serricorne*, por esta vía de exposición, el efecto tóxico del aceite de palmarosa fue similar al promovido por el insecticida sintético. Aunque este hallazgo es inusual, concuerda con algunas investigaciones en insectos plaga de productos almacenados donde la efectividad de un AE es de la misma magnitud que un insecticida sintético. Así, el aceite de *Eucalyptus resinifera* (SM.) tuvo la misma eficacia que el insecticida organofosforado metil pirimifos en *R. dominica* (Filomeno et al., 2020). Para el caso de *S. oryzae*, se ha demostrado

que, por exposición a superficies tratadas, el AE de *Ocimum basilicum* (L.) (Al-harbi et al. 2021) y los AEs de *Melaleuca raphiophylla* (Schauer), *Mentha arvensis* (L.) y *T. minuta* tuvieron un efecto tóxico similar o mayor que los insecticidas sintéticos malatión y metil pirimifos, respectivamente (Zimmermann et al., 2021, 2022). No se encontraron evidencias bibliográficas que demuestren una situación similar para *L. serricornis*.

A diferencia de lo observado en los bioensayos por exposición a superficies tratadas, en los referentes a exposición a vapores, *S. oryzae* fue en general más tolerante a la actividad fumigante de los AEs que *L. serricornis*. De esta manera, los aceites de menta, palmarosa, lavanda y orégano a la máxima dosis no produjeron actividad insecticida en *S. oryzae*. Varios estudios demuestran que *L. serricornis* es más susceptible al efecto de los vapores de los AEs que otros insectos plaga de granos almacenados (Aslan et al., 2005; Bachrouc et al., 2010; Ebadollahi et al., 2010; Liang et al., 2021; Salem et al., 2017; Sriti Eljazi et al., 2017; Wu et al., 2015).

Es sabido que el efecto tóxico de las sustancias volátiles está fuertemente asociado a su presión de vapor (Hikal et al., 2017). Una vez en fase gaseosa, entran en el cuerpo de los insectos a través de sus espiráculos como parte de su proceso respiratorio y son transportadas a diferentes tejidos a través de la red de tráqueas y traqueolas, llegando así a su lugar de acción (Hikal et al., 2017; Sfara et al., 2009). Pese a que la presión de vapor de los compuestos suele estar asociada a la toxicidad fumigante de los mismos, no se hallaron para los compuestos mayoritarios de todos los aceites en estudio diferencias en el orden de magnitud de esta variable que pudiera justificar la mayor toxicidad de alguno de ellos (Registro Pubchem, 2022). En este trabajo se demostró que el aceite de árbol de té fue el que produjo mayor efecto tóxico por exposición a vapores en *S. oryzae*, mientras que en *L. serricornis*, los AEs de geranio y árbol de té fueron los de mayor actividad fumigante.

La eficacia insecticida del AE de árbol de té por exposición a vapores fue demostrada en insectos como *S. oryzae*, *Ceratitis capitata* (Wiedemann), *T. castaneum*, *T. confusum* y *C. maculatus*

(Benelli et al., 2013; El-Salam y Ahmed, 2010; Lee et al., 2002; Liao et al., 2018). Además, estudios recientes demostraron que este aceite inhibe las enzimas acetilcolinesterasa (AChE) y glutatión S transferasa (GST) en *S. zeamais* y la enzima NAD<sup>+</sup>/NADH deshidrogenasa afectando la cadena de transporte de electrones mitocondrial en *T. confusum* (Liao et al., 2018). Se ha comprobado también que los compuestos mayoritarios de este aceite, terpinen-4-ol y  $\gamma$ -terpineno fueron altamente tóxicos por exposición a vapores en diversos insectos plaga (Wang et al., 2019a; Zhang et al., 2019).

Con respecto al aceite de geranio, varios trabajos de nuestro grupo de investigación confirmaron la actividad insecticida fumigante en insectos plaga como, *P. interpunctella*, *B. germánica*, *T. castaneum* y *R. dominica* (Jesser et al., 2017; Werdin González et al., 2014, 2015). A su vez, se ha demostrado que los compuestos mayoritarios de este aceite, citronelol y geranial, fueron altamente tóxicos por exposición a vapores en insectos plaga de importancia económica y sanitaria (Abdelgaleil et al., 2021; Singh et al., 2021).

A modo de cierre, y teniendo en cuenta lo analizado hasta el momento, se infiere que los aceites de geranio, palmarosa y árbol de té fueron los más efectivos en control de *S. oryzae* y *L. serricornis* por exposición a superficies tratadas o a vapores.

Hoy en día, no se termina de comprender por completo el mecanismo de toxicidad definitivo de los AEs y sus componentes (Spochacz et al., 2018). Aunque la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) es el mecanismo de acción más investigado, la modulación alostérica positiva del GABA y la competencia con la octopamina en la unión a su receptor, son otros de los mecanismos propuestos (López y Pascual-Villalobos, 2015; Wang et al., 2019). Por lo tanto, comprender el espectro de acción de los AEs sobre los insectos es crucial para el desarrollo de nuevos insecticidas basados en AEs (Said-Al Ahl et al., 2017). Además, se ha propuesto que, dadas las propiedades fisicoquímicas de los AEs y sus monoterpenos, la aplicación conjunta de AE e insecticidas sintéticos facilitaría la penetración de estos últimos a través de la cutícula

aumentado su eficacia; de esta manera, la cantidad de insecticida sintético a aplicar para el control disminuiría significativamente (Tak e Isman, 2015). Cabe aclarar que, si el AE y el insecticida sintético ejercen sus efectos tóxicos a través de diferentes rutas de acción, la interacción de los compuestos podría ser aún más efectiva en los términos antes expuestos (Hernandez et al., 2013; Hernandez y Lacasaña, 2017). Es sabido que el insecticida piretroide  $\beta$ -cipermetrina actúa sobre los canales de sodio dependientes de voltaje, impidiendo su cierre; por otra parte, hay evidencias en la actualidad de que los monoterpenos isomentol, terpinen-4-ol, linalool, geraniol,  $\beta$ -citronelol y 1,8-cineol (compuestos mayoritarios de los AEs en estudio) inhiben la actividad de la AChE concentración dependiente (Iqbal et al., 2021; Jankowska et al., 2019; Kahkeshani et al., 2018; Mills et al., 2004; Pavlić et al., 2021; Praveena y Sanjayan, 2011). En este trabajo, se demostró que la aplicación conjunta de ciertos AEs con  $\beta$ -cipermetrina, a concentraciones equivalentes a los valores de  $CL_{50}$ , produce mayor efecto tóxico por exposición a superficies tratadas que la aplicación de los aceites en forma independiente. Para el caso de *S. oryzae*, este efecto se observó con la aplicación conjunta del insecticida piretroide con los AEs de geranio, palmarosa, orégano o laurel, mientras que en *L. serricornis*, con los AEs de lavanda, orégano o menta. Otros trabajos confirmaron el aumento de la susceptibilidad de insectos plaga de importancia económica frente a la combinación de AEs e insecticidas sintéticos. Por ejemplo, Feroz (2020) y Silva et al. (2017) demostraron excelentes efectos sinérgicos de la actividad insecticida del piretroide deltametrina en combinación con los AEs de *Cymbopogon citratus* (DC), *Cinnamomum camphora* (Sieb) y *O. basilicum* en *T. granarium* y *S. frugiperda*. Además, los AEs de *Citrus sinensis* (L.) y *Pimenta racemosa* (Mill.) potenciaron la actividad tóxica del organofosforado clorpirifos en *S. zeamais* (Brito et al., 2021). En otro trabajo, se ha reportado que el AE de ajo mostró un efecto sinérgico de la actividad insecticida de clorpirifos y cipermetrina en *S. littoralis* (Ismail et al., 2021).

## 1. E. Conclusiones

De los resultados obtenidos en esta primera parte se puede concluir:

- ❖ Por exposición a superficies tratadas, *S. oryzae* fue más susceptible al efecto de los AEs y  $\beta$ -cipermetrina que *L. serricorne*. Por esta vía, en *S. oryzae*, los AEs de geranio y palmarosa fueron los más efectivos, mientras que en *L. serricorne*, el más efectivo fue el aceite de palmarosa. Además, para este último insecto, se comprobó que la magnitud del efecto tóxico del aceite de palmarosa fue similar al producido por la  $\beta$ -cipermetrina.
- ❖ Por exposición a vapores, en *S. oryzae*, el AE de árbol de té fue el más efectivo, mientras que en *L. serricorne*, este aceite y el AE de geranio fueron los que demostraron mayor efecto fumigante.
- ❖ En *S. oryzae*, la aplicación conjunta de  $\beta$ -cipermetrina y los AEs de geranio, palmarosa, orégano o laurel fue más efectiva respecto a la aplicación de los mismos en forma independiente. Este efecto también se observó en *L. serricorne*, con la combinación de los AEs de lavanda, orégano y menta.

A fin de potenciar los efectos biológicos de los AEs en *S. oryzae* y *L. serricorne*, se decidió elaborar con nanopartículas poliméricas cargadas con AEs, y evaluar sus efectos letales y subletales en ambos insectos plaga.

---

## 2. NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CARGADAS CON ACEITES ESENCIALES: UNA NOVEDOSA ESTRATEGIA PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA DE PRODUCTOS ALMACENADOS

---

### 2. A. Introducción

#### 2. A.1. Historia de la nanotecnología

El uso de objetos de tamaño nanométrico data de miles de años a.e.c (Sharon, 2019). En el Antiguo Egipto era costumbre colorear los cabellos de negro con una mezcla de pasta de cal, óxido de plomo y una cantidad de agua, que llevaba a la formación de nanopartículas (NPs) de galenita (Tolochko, 2009). En la Edad Media y el Renacimiento, los vitrales multicolores de las iglesias y catedrales contenían aditivos de oro y plata, en los cuales, décadas más tarde, se descubrió la presencia de partículas nanométricas de estos metales. Igualmente, en 2006 se descubrieron NPs de carbono en espadas damasquinadas del siglo XVII, responsables estas de su elasticidad y resistencia. En 1847, Michael Faraday, fue el primero en proporcionar una descripción científica de las propiedades ópticas de las NPs metálicas. Tiempo más tarde, en 1914, Richard Zsigmondy, fue el primero en acuñar el término "nanopartícula", luego de visualizar partículas de 1/1 000 000 mm por ultramicroscopía de campo.

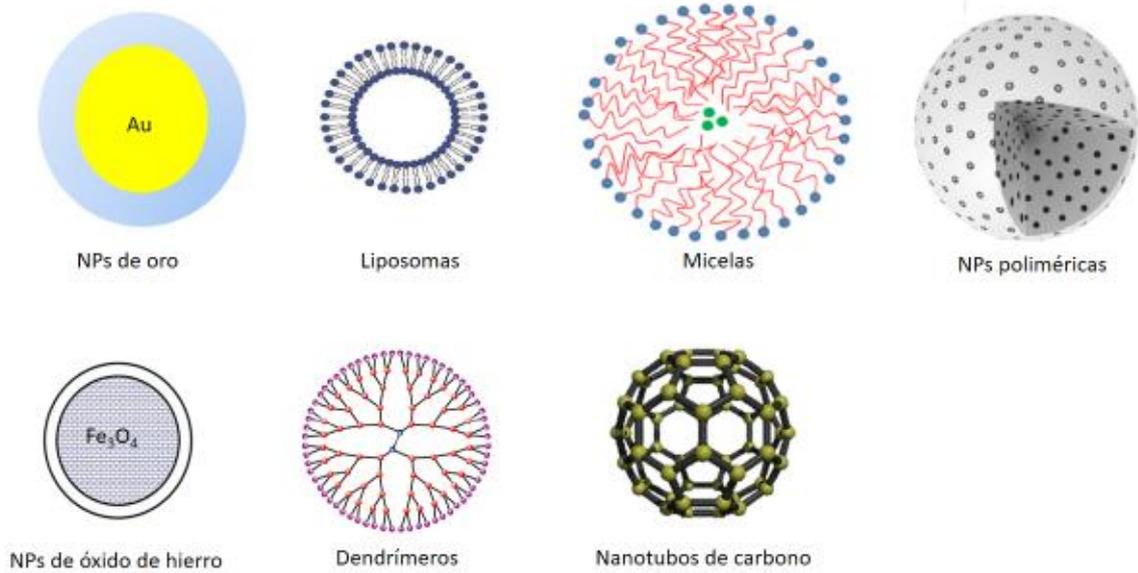
A partir de la revolución científica y tecnológica de principios del siglo XX, surgieron las condiciones necesarias para sentar las bases para el desarrollo de la nanotecnología, en los términos que actualmente la conocemos (Tolochko, 2009). La nanotecnología moderna es una ciencia interdisciplinaria con múltiples aplicaciones, por ejemplo en materiales, medicina, industria farmacéutica, tecnología de las comunicaciones, remediación ambiental y agricultura (Hulla et al., 2015). Por ejemplo, en el año 2003 la firma Mercedes-Benz introdujo una pintura transparente a base de NPs metálicas que aumentan la resistencia al rayado y realza el brillo de sus automóviles (Jeevanandam et al., 2018). Entre las aplicaciones en medicina, se puede citar el surgimiento en 2005 del abraxane, un material nanoformulado a base de suero humano

portador de paclitaxel, para el tratamiento del cáncer (Krukemeyer et al., 2015). Por último, con la pandemia de COVID-19, el sector científico y tecnológico de nuestro país desarrollo barbijos de tela impregnados con NPs de plata y cobre, que le otorgan un gran porcentaje de efectividad para eliminar virus y bacterias (CONICET, 2021, <https://www.conicet.gov.ar/un-nuevo-barbijo-atom-protect-n95-plus-para-prevenir-el-covid/>).

## **2. A.2 Definición y clasificación de las nanopartículas (NPs)**

En el proceso de nanoencapsulación, los compuestos activos se incorporan dentro de una sustancia portadora (o encapsulante) formando un sistema nanoescalar (de 1-1000 nm) que modifica las propiedades fisicoquímicas y la bioactividad de los compuestos activos (George et al., 2019). Es importante destacar que las NPs tienen propiedades diferentes a las partículas en escala macro con la misma composición química (Pina-Barrera et al., 2019). Las NPs pueden presentar una gran diversidad de formas: esféricas, cilíndricas, cónicas, tubulares, huecas, planas o irregulares. Respecto a su estructura, las hay cristalinas o amorfas con superficies regulares o irregulares (Crucho y Barros, 2017). Según su naturaleza química, las NPs pueden clasificarse en inorgánicas y orgánicas. Las NPs inorgánicas incluyen nanomateriales a base de metales y óxidos metálicos, como el aluminio (Al), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), oro (Au), hierro (Fe), plomo (Pb), plata (Ag) y zinc (Zn), entre los metales más comúnmente utilizados (Lámina 2.1). Por otro lado, las NPs orgánicas incluyen los materiales derivados del carbono (nanotubos, por ejemplo), dendrímeros, micelas, liposomas, vesículas y las NPs elaboradas con polímeros (Lámina 2.1) (Ealia y Saravanakumar, 2017; Liebana Ortega, 2020; Venditti, 2019).

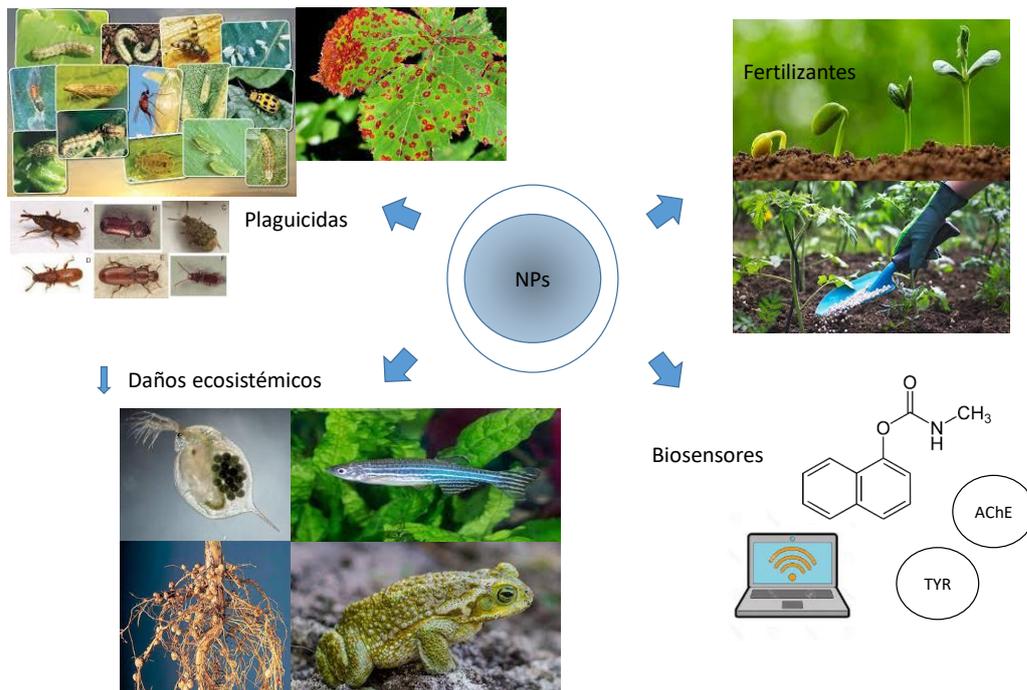
**Lámina 2.1.** Tipos de nanopartículas.



### **2. A.3 Aplicaciones de los nanomateriales en la agricultura**

Recientemente en la actividad agrícola, la nanotecnología recibió mucha atención dado el desarrollo de nanosistemas que posibilitan el eficiente uso y detección de agroquímicos y nutrientes (Chhipa, 2017; Panpatte y Jhala, 2019). En este sentido, surgen los nanobiosensores, los nanofertilizantes y los nanoplaguicidas que implican la formulación a escala nanométrica de compuestos activos, para lograr un mayor desempeño en comparación con las formulaciones tradicionales (Kah et al., 2018). Una de las características sobresalientes de estos nanosistemas está en relación con la liberación controlada de los compuestos activos y/o su entrega específica y dirigida en los sitios de acción. De esta manera, las NPs aparecen como una estrategia novedosa que permite aumentar o mantener la eficacia de los compuestos activos a bajas tasas de aplicación, al mismo tiempo que minimizan los impactos negativos en los ecosistemas y sobre la salud humana (Lámina 2.2) (Benelli, 2018).

**Lámina 2.2.** Usos de las nanopartículas en la agricultura.



Los biosensores cargados en las NPs detectan la presencia de fertilizantes y pesticidas y brindan información sobre su manipulación y sobre los riesgos ambientales que pueden ocasionar (Usman et al., 2020). Estos nanobiosensores garantizan un diagnóstico rápido del estado de los suelos y cultivos (Manna y Bandyopadhyay, 2019). En este sentido, NPs de quitosano, oro, plata y cobalto fueron los candidatos ideales para transportar biosensores debido a su baja toxicidad, biocompatibilidad y propiedades ópticas únicas (Patel et al., 2019). En el sector de la nutrición vegetal, los nanofertilizantes tienen el objetivo de aumentar la eficiencia de los compuestos activos y limitar sus pérdidas (Kah et al., 2018). Varios estudios reportaron que fertilizantes cargados en NPs de óxido de metales y NPs poliméricas generaron una mayor producción agrícola al compararlos con los fertilizantes libres (Abdel Aziz et al., 2016; Haleem, 2020).

En los últimos años, con el objetivo de disminuir la contaminación ambiental y potenciar los efectos toxicológicos en organismos plaga, los pesticidas sintéticos y naturales (insecticidas, fungicidas y herbicidas) fueron empleados en la elaboración de NPs (Ghorbanpour et al., 2020; Spochacz et al., 2018). Para afrontar este desafío, diversas líneas de investigación centraron su

actividad en el desarrollo de herramientas de control novedosas y con bajo impacto ambiental (Athanassiou et al., 2018; Worrall et al., 2018). A modo de ejemplo, es posible citar el desarrollo de nanoformulaciones de  $\beta$ -ciflutrina que potenciaron el bloqueo de la transmisión neuromuscular y la despolarización espontánea en *C. maculatus* respecto al piretroide libre (Loha et al., 2012). Asimismo, NPs de metabolitos fúngicos de *Nomuraea rileyi* (Kepler, Renher y Humber) (Hypocreales: Clavicipitaceae) tuvieron efectos letales en *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) (Chandra et al., 2013). Por otra parte, NPs portadoras de herbicidas demostraron un manejo eficiente de distintas malezas; por ejemplo, NPs cargadas con atrazina y paraquat tuvieron mayor citotoxicidad respecto a las formulaciones libres en *Raphanus raphanistrum* (L.) (Brasicales: Brassicaceae), *Eichhornia crassipes* (Mart) y *Brassica sp.* (Grillo et al., 2014, 2015; Namasivayam et al., 2014; Rashidipour et al., 2019). Por otro lado, NPs cargadas con fungicidas como azometina, carbendazima y tebuconazol potenciaron la inhibición del crecimiento en hongos patógenos al intervenir en procesos celulares como la respiración, la transducción de señales y la síntesis de proteínas (Bhargava et al., 2018; Campos et al., 2015).

#### **2. A.4 Nanopartículas poliméricas: definición y morfología**

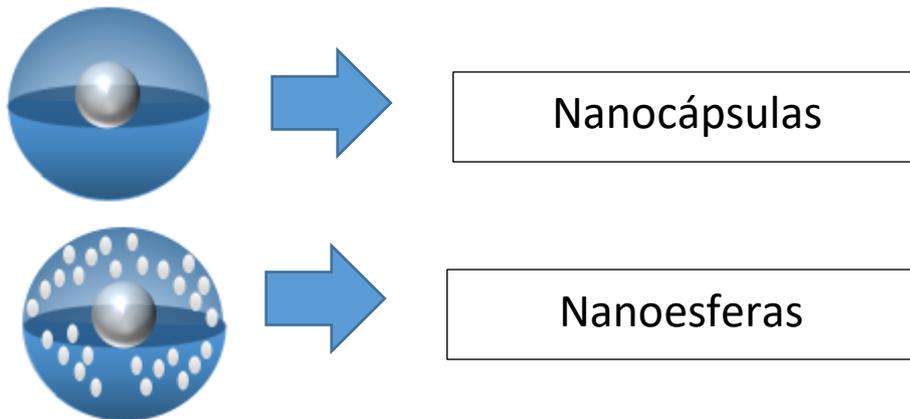
La mayoría de los AEs son fotolábiles, termolábiles, oxidables e hidrolizables, es decir, se ven afectados por factores ambientales como luz, calor, oxígeno y humedad. Esta inestabilidad química de los AEs, sumada a su baja solubilidad en agua, provocan la rápida evaporación y degradación de sus constituyentes, limitando el uso de estos productos como bioinsecticidas en forma masiva (Mossa, 2016; Vishwakarma et al., 2016). Ante estos inconvenientes al momento de la aplicación, varias investigaciones se centraron en el desarrollo de nanomateriales portadores que permitan proteger a los AEs de factores ambientales al mismo tiempo que disminuir su volatilidad, aumentar su solubilidad y estabilidad térmica, ampliar los mecanismos de absorción celular, disminuir las dosis mínimas efectivas y potenciar su bioactividad (Benelli, 2018; Bilia et al., 2014). Es posible distinguir tres grandes grupos de nanosistemas asociados a

AEs: los nanoportadores lipídicos, los complejos moleculares y las nanopartículas poliméricas (NPs poliméricas).

Los nanoportadores lipídicos son sistemas coloidales de tamaño nanométrico (150 a 500 nm) que aumentan la eficiencia, solubilidad, estabilidad y generan una liberación controlada y dirigida de los AEs. Estos sistemas incluyen a liposomas, nanopartículas sólidas lipídicas, cápsulas lipídicas nanoestructuradas y nano-microemulsiones (Maurya et al., 2021; Sharma et al., 2022). A su vez, los complejos moleculares, por ejemplo las ciclodextrinas, son macromoléculas formadas por una cavidad central hidrofóbica rodeada por una capa hidrofílica con un rango de tamaño promedio de 100 a 500 nm, que mejoran las propiedades biológicas y farmacológicas de los AEs (Adeoye y Cabral-Márquez, 2017; Arana-Sánchez et al., 2010).

Las **NPs poliméricas**, objeto de estudio del presente trabajo, son partículas sólidas con un tamaño entre 10 y 1000 nm que representan una excelente estrategia para mejorar la biodisponibilidad de los AEs preservando su bioactividad durante el procesamiento y almacenamiento (Butnariu y Butu, 2019; Pandit et al., 2016). Dependiendo del tipo de polímero utilizado y de los métodos de síntesis, se obtienen diferentes diseños de NPs poliméricas, clasificándose estas según su morfología como nanocápsulas o nanoesferas (Ghorbanpour et al., 2020; Lammari et al., 2020) (Lámina 2.3). Las primeras están compuestas por dos compartimentos bien diferenciados, con un núcleo interno formado por los AEs y rodeados por una cubierta protectora polimérica (sistema vesicular). Las nanoesferas, en cambio, son sistemas matriciales en los que los AEs están distribuidos heterogéneamente tanto en el interior de la nanopartícula como en su superficie (Allouche, 2013; Merino et al., 2018).

**Lámina 2.3.** Morfología de las nanocápsulas y nanoesferas.



Las NPs poliméricas pueden diferir en propiedades tales como composición, tamaño, forma, cristalinidad o estado de dispersión (Sur et al., 2019). Estos parámetros afectan variables toxicocinéticas y toxicodinámicas de los AEs tales como penetrabilidad, absorción, biodisponibilidad y afinidad (Calzoni et al., 2019).

Es sabido que la tasa de liberación de los AEs a través de las NPs poliméricas está en relación con las fuerzas moleculares que se establecen entre los AEs y el polímero, la tasa de difusión de los AEs a través de la cubierta polimérica, el tamaño de las NPs y su eficiencia de cargado, y la erosión superficial de la cubierta polimérica por efecto de factores ambientales (Calzoni et al., 2019; Frank y Matzger, 2018).

## **2. A.5 Métodos de síntesis de las NPs**

En la actualidad, se conocen varios estudios que demostraron que los polímeros naturales (quitosano, almidón, celulosa, goma guar, carragenanos, pululanos y alginatos) y los polímeros sintéticos (alcohol polivinílico (PVA), el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico glicólico (PLGA) y el polietilenglicol (PEG)) son nanoportadores ideales para los AEs. Estos polímeros son biodegradables y biocompatibles (exhiben bajos niveles de inmunogenicidad y toxicidad), tienden a formar NPs poliméricas estables y con un patrón de liberación lenta y controlada (Bilia et al., 2018; Shahzad y Manzoor, 2021). Aunque en la

literatura se describen varios métodos de preparación de NPs poliméricas cargadas con AEs, las técnicas más utilizadas son nanoprecipitación, gelificación iónica y fusión-dispersión (Calzoni et al., 2019; de Matos et al., 2019).

La nanoprecipitación es una técnica en la que inicialmente el AE, el polímero y los agentes tensioactivos se disuelven y mezclan en un solvente orgánico miscible en agua (acetona, metanol, etanol y otros) bajo agitación magnética. Luego, esta mezcla se añade por goteo a una solución acuosa, provocando el desplazamiento del solvente hacia la fase acuosa y la deposición interfacial del polímero sobre el aceite. La evaporación del solvente orgánico ocurre a temperatura ambiente o con un rotavapor, permitiendo obtener una suspensión de NPs (Rivas et al., 2017). Además, la ultracentrifugación y la liofilización son dos métodos que suelen emplearse en el siguiente paso para la eliminación de la solución acuosa remanente (Naskar et al., 2018; Markwalter et al., 2020). Algunos ejemplos del uso de la técnica de nanoprecipitación para elaborar NPs poliméricas cargadas con AEs se citan en la tabla 2.1.

En el caso de la elaboración de NPs poliméricas por gelificación iónica, el polímero (generalmente quitosano) se disuelve en una solución ácida acuosa y bajo ultrahomogenización se adicionan los AEs. Luego se agrega por goteo una solución alcalina aniónica (por ejemplo, tripolifosfato (TPP) a pH 8-9) bajo agitación magnética que provoca la inversión de las cargas del polímero promoviendo su precipitación en torno a los AEs (George et al., 2019; Naskar et al., 2018; Shakiba et al., 2020). La tabla 2.1 resume algunos trabajos que utilizan esta técnica para la síntesis de NPs poliméricas cargadas con AEs.

Nuestro grupo de trabajo en los últimos años se especializó en la formulación de NPs poliméricas utilizando el PEG 6000 como polímero nanotransportador a través de la técnica fusión-dispersión. El PEG es un polímero anfílico de óxido de etileno que, según su peso molecular, puede encontrarse en estado líquido (PEG 200-600), semisólido (PEG 1500), sólido semicristalino (PEG 3000-20000) o sólido resinoso (peso molecular > 20.000). Debido a su amplia

gama de solubilidad, biocompatibilidad y facilidad de excreción en los organismos vivos, el PEG fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en EEUU y es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica (D'souza y Shegokar, 2016). El PEG 6000 es un sólido blanco de aspecto parafínico con estructura general  $H(OCH_2CH_2)_nOH$ , de amplio rango de solubilidad y con punto de fusión entre 52 y 65 °C. En los últimos años este polímero recibió especial atención para la elaboración de NPs debido su ausencia de antigenicidad y mutagenicidad en células germinales de mamíferos, y su baja toxicidad probada en *Rattus norvegicus albinus* (Rodentia: Muridae) ( $DL_{50}$  vía oral: 20.000 mg/kg), y en *Poecilia reticulata* (Peters) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) y *Daphnia magna* (Straus) (Cladocera: Daphniidae) ( $CL_{50}$ : 100 mg/l) (Holtze et al., 2008, Kumar y Sharma, 2021).

En la técnica de fusión-dispersión, el PEG 6000 se funde a 65° C, se dispersa el AE y se homogeniza la mezcla a 15.000 rpm. El enfriamiento de la mezcla (de 25 a -4 ° C) inicia de forma espontánea el proceso de nucleación de las moléculas de PEG en torno al AE para formar partículas amorfas o cristalinas. La técnica finaliza con la molienda del sólido bajo refrigeración y su tamizado (Werdin González et al., 2014). En tabla 2.1 se describen sucintamente trabajos relacionados a la elaboración de NPs poliméricas cargadas con AEs utilizando la técnica de fusión-dispersión.

Del análisis de la tabla 2.1. es posible observar que la técnica de nanoprecipitación tiende a generar NPs con tamaños menores a los 300 nm, alta eficiencia de cargado (mayor al 90%) y distribución homogénea de tamaños (índice de polidispersión (IPD) <0,25). Por su parte, la gelificación iónica produce NPs polimérica con tamaños y eficiencia de cargado variables y distribuciones de tamaño más heterogéneas que la técnica anterior. Para el caso del método de fusión-dispersión las NPs poliméricas presentan tamaños ente 180 y 400 nm, eficiencias de cargado entre 72 y 96% y distribución de tamaño variable. Cabe mencionar que tanto la nanoprecipitación como la gelificación iónica implican metodologías complejas para la elaboración de NPs poliméricas con la utilización compuestos químicos tóxicos. En

contrapartida, la técnica de fusión-dispersión para la encapsulación de AEs tiene la ventaja de ser un método simple y rápido para la síntesis de estas NPs, con alta reproducibilidad y, dado que no se utilizan solventes, con bajo impacto sobre el ambiente.

**Tabla 2.1.** Ejemplos de NPs poliméricas cargadas con AEs utilizando las técnicas de nanoprecipitación, gelificación iónica y fusión-dispersión.

Técnica de obtención	Polímeros	AEs	EC (%)	Tamaño (nm)	IPD	Referencia
Nanoprecipitación	Policaprolactona (PCL)	<i>Rosmarinus officinalis</i> (L.)	99	220	0,25	Ephrem et al., 2014
	PCL	<i>O. vulgare</i> y <i>Thymus capitatus</i> (L.)	91 y 96	178 y 163	<0,10	Granata et al., 2018
	PCL	<i>Zanthoxylum riedelianum</i> (Engl.)	98,8	106,7	0,20	Pereira et al., 2018
	PCL	<i>C. martinii</i>	99,5	282,1	0,14	Jummes et al., 2020
Gelificación iónica	quitosano	<i>Achillea millefolium</i>	84,9	165	-	Ahmadi et al., 2017
	quitosano	<i>G. maculatum</i> y <i>C. bergamia</i>	22 y 38	535 y 439	0,38 y 0,36	Werdir González et al., 2017
	quitosano	<i>Satureja hortensis</i> (L.)	96,2	153	0,22	Ahmadi et al., 2018
	quitosano	<i>Schinus molle</i> (L.)	26,6	516,9	0,74	López-Meneses et al., 2018
	quitosano	<i>Eugenia caryophyllata</i> (Thunberg)	45,8	268,4	-	Hasheminejad et al., 2019
	quitosano	<i>M. piperita</i>	70,6	563,3	-	Rajkumar et al., 2020
Fusión-dispersión	PEG	<i>C. bergamia</i> y <i>G. maculatum</i>	78 y 83	184 y 234	0,28 y 0,25	Werdir et al., 2014
	PEG	<i>Citrus lemon</i> (L.), <i>Citrus reticulata</i> (L.) y <i>C. sinensis</i>	96, 92 y 88	240, 212 y 216	0,34, 0,26 y 0,23	Campolo et al., 2017
	PEG	<i>Syzigium aromaticum</i> (L.)	78	257	0,35	Ikawati et al., 2020
	PEG	<i>M. piperita</i> y <i>C. martinii</i>	72,3 y 89,7	380 y 191	0,61 y 0,16	Yeguerman et al., 2020
	PEG	<i>S. aromaticum</i>	87,9	237,4	0,26	Ibrahim, 2022

## 2. A.6. Hipótesis

En referencia a los antecedentes expuestos, se plantean las siguientes hipótesis:

- ❖ Las NPs poliméricas cargadas con AEs por el método de fusión-dispersión poseen efectos letales en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne* por exposición a superficies tratadas y a vapores.
- ❖ Las NPs poliméricas modifican la susceptibilidad de adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne* al insecticida sintético  $\beta$ -cipermetrina, en los ensayos de exposición a superficies tratadas.

### 2. A.7.a. Objetivo general

El objetivo general planteado para este capítulo es elaborar NPs poliméricas cargadas con AEs por el método de fusión-dispersión y evaluar sus efectos letales en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.

### 2. A.7.b. Objetivos específicos

- ❖ Obtener NPs de PEG-6000 cargadas con los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té, por el método de fusión dispersión.
- ❖ Caracterizar fisicoquímicamente las NPs poliméricas elaboradas.
- ❖ Evaluar la actividad insecticida por exposición a superficies tratadas de las NPs poliméricas en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Evaluar la actividad insecticida por exposición a vapores de los AEs encapsulados en las NPs en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Evaluar el efecto tóxico combinado del insecticida sintético  $\beta$ -cipermetrina y las NPs poliméricas en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne* por exposición a superficies tratadas.

## **2. B. Materiales y métodos**

### **2. B.1. Preparación de las NPs poliméricas de PEG-6000 cargadas con AEs**

Para la obtención de NPs poliméricas se utilizaron los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té. Las NPs se elaboraron usando el método de fusión-dispersión de acuerdo con lo establecido por Werdin González et al. (2014). En la presente tesis se utilizó la relación AEs: PEG 6000 1:10 dado que se ha probado que a esta proporción se establece la mejor relación entre las variables tamaño de partículas, polidispersión y eficiencia de cargado (Yang et al., 2009; Werdin González et al., 2014). Para obtener las NPs, se fundieron 10 g de PEG 6000 a 65 °C en un agitador magnético con placa calefactora y luego se añadió 1 g de cada AE. La mezcla se agitó utilizando un homogeneizador Scilogex (D-500) durante 5 min a 15.000 rpm. Transcurrido este tiempo, la mezcla se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente y una vez que la misma comenzó a solidificar, se enfrió a -4 °C por 45 min con el objetivo de obtener NPs de forma espontánea. Finalmente, la mezcla se molió en un mortero refrigerado a 0 °C y luego se tamizó a través de una malla fina de metal de 230 mesh. Las NPs poliméricas se almacenaron en bolsas herméticas de polietileno y se colocaron en desecadores con cloruro de calcio a  $27 \pm 2$  °C. Todos los experimentos se realizaron con NPs poliméricas con al menos 7 días de almacenamiento. Este tiempo se seleccionó en función de la experiencia previa del grupo de investigación, ya que se probó que, luego de una semana de almacenamiento, las variables fisicoquímicas de las NPs se estabilizan (Werdin González et al., 2014; Yeguerman et al., 2020).

### **2. B.2. Caracterización fisicoquímica de las NPs poliméricas cargadas con AEs**

#### **2. B.2.a Tamaño e índice de polidispersión de las NPs poliméricas**

Para la determinación de estas variables, se tomaron 0,6 g de NPs y se suspendieron en 10 ml de agua destilada durante 30 min. Luego, la dispersión se filtró 2 veces utilizando papel de filtro Wathman N° 1 y se dejó reposar el sistema durante 2 horas. El tamaño medio y el índice de

polidispersión (IPD) se calculó por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando el equipo Zetasizer nano instrument ZEN 3690 (Malvern, Reino Unido). Para cada NPs se realizaron tres réplicas y las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C. El IPD es un indicador de la homo/heterogeneidad de la distribución de tamaños de las partículas. Cuando los valores de IPD son menores a 0,25 se considera que la muestra es monodispersa, mientras que valores IPD por encima de 0,4 indican que la muestra es polidispersa. Para valores de IPD entre 0,25 y 0,4, se considera que la muestra tiene una distribución variable de tamaños (Soliman et al., 2021).

### **2. B.2.b Eficiencia de cargado de las NPs poliméricas**

La eficiencia de cargado (EC) se define como la masa de principio activo encapsulado con relación a su masa inicial pre-formulación (Nagavarma et al., 2012). La EC se determinó espectrofotométricamente siguiendo un método previamente optimizado: 0,1 g de cada una de las NPs poliméricas de los distintos AEs se disolvieron en 2 ml de alcohol absoluto: H<sub>2</sub>O (75:25) Werdin-González et al. (2014). La mezcla se centrifugó a 9000 rpm por 10 min. El sobrenadante se recolectó y se analizó por espectroscopia ultravioleta-visible mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV- 1203 con Kinetics-2-Program Pack P/N 206- 62029-10 (Shimadzu Corp., Kioto, Japón) a una longitud de onda de 290 nm. Se analizaron tres réplicas y la cantidad de AEs en cada una de ellas se determinó mediante una curva de calibrado previamente construida con los valores de absorbancia a distintas concentraciones de AEs libre en etanol. La eficiencia de cargado se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de cargado (EC\%)} = \frac{\text{Peso de los AEs en la muestra}}{\text{Peso inicial de los AEs}} \times 100$$

### **2. B.2.c Composición química de los AEs postformulación**

Para la extracción de los AEs de las NPs poliméricas, 0,5 g de cada muestra se disolvieron en 5 ml de agua destilada que se calentó a 65 °C durante 30 min bajo agitación magnética. Cuando el PEG 6000 se fundió, se agregaron 4 ml de éter de petróleo y la muestra se mantuvo en agitación durante dos horas. Transcurrido este tiempo se procedió a tomar una muestra de los AEs

extraídos con la fase éter. Con el fin de determinar la presencia de AEs remanentes asociados con las NPs, se realizó una segunda extracción con n-butanol (mayor polaridad). A continuación, se analizaron las fases de éter, n-butanol y acuosa mediante CG-EM tal lo descrito en 1.B.2.

## **2. B.3. Bioensayos**

### **2. B.3.a. Ensayo de toxicidad por exposición a superficies tratadas**

Para comparar el efecto de las NPs en relación con los AE libres, se utilizaron concentraciones equivalentes de principio activo (de 5 a 800  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) corregidas por la EC. Las NPs poliméricas se aplicaron de forma directa sobre papeles de filtro (28,5  $\text{cm}^2$ ) que se introdujeron en frascos de vidrio (2 cm de diámetro x 9 cm de alto). Para el control positivo, los papeles de filtro se trataron con soluciones en acetona de insecticida sintético en un rango de 2,5 a 400  $\mu\text{g cm}^{-2}$ , mientras que para el control negativo, con PEG 6000 procesado como 2.B.1 (sin adición de AE) a las mismas concentraciones que las NPs. Luego, se agregaron diez adultos de *S. oryzae* o *L. serricorne* que se cubrieron con una tela de voile. Se realizaron cuatro réplicas independientes. Todos los experimentos se mantuvieron a  $29 \pm 2^\circ \text{C}$  y 50 - 70% de HR y en oscuridad. Luego de 72 h, se registró la mortalidad. Con estos datos se determinaron los valores de  $\text{CL}_{50}$  y  $\text{CL}_{90}$ . Los adultos se consideraron muertos cuando no se observaron movimientos abdominales ni de apéndices (patas, alas y antenas).

### **2. B.3.b Toxicidad por exposición a vapores**

En este bioensayo se evaluó la toxicidad de las NPs poliméricas en *S. oryzae* y *L. serricorne* mediante una cámara fumigante a concentraciones equivalentes a los AEs libres (2,56 a 128,5 mg AE. L Aire<sup>-1</sup>). Las NPs se aplicaron sobre papeles de filtro (4  $\text{cm}^2$ ) adheridos a las caras inferiores de una base de caja de Petri (8,5 de diámetro x 2 cm de alto). Debido a que en el capítulo 1, la  $\beta$ -cipermetrina no presentó actividad fumigante, no se procedió a realizar el control positivo. En el control negativo, los papeles se trataron con PEG 6000 procesado como 2.B.1 (sin adición de AE) a las mismas concentraciones que las NPs. La placa de Petri se cubrió

con tela de voile y una tapa con un orificio central, para permitir la circulación de aire. Sobre este tejido se liberaron quince adultos cubiertos por un envase de 350 ml. El conjunto fue herméticamente sellado con cinta adhesiva. Cada tratamiento y controles se replicaron de forma independiente cuatro veces. Todos los bioensayos se mantuvieron a  $29 \pm 2$  ° C y 50 - 70% de HR y en oscuridad. La mortalidad se determinó luego de 72 h.

### **2. B.3.c. Efecto combinado insecticida sintético y las NPs poliméricas**

Atendiendo a los resultados obtenidos en 2.B.3.a, papeles de filtro (28,5 cm<sup>2</sup>) se trataron con 0,5 ml de soluciones en acetona de insecticida sintético a concentraciones equivalentes de CL<sub>50</sub>. Luego de la evaporación del solvente, las NPs poliméricas se aplicaron a estos papeles a concentraciones equivalentes de CL<sub>50</sub> o máxima concentración (en caso de no observarse efecto tóxico). Los papeles de filtro se introdujeron en un frasco de vidrio (2 cm de diámetro x 9 cm de alto) y se agregaron diez adultos de *S. oryzae* o *L. serricornis* que se cubrieron con una tela de voile. Se realizaron cuatro réplicas independientes. Se realizaron tres controles: en el primero, los papeles de filtro se trataron con PEG 6000 procesado como 2.B.1 (sin adición de AE); en el segundo, con soluciones de insecticida sintético en acetona a concentraciones equivalentes de CL<sub>50</sub>; y en el tercero con las NPs poliméricas a concentraciones equivalentes de CL<sub>50</sub> o máxima concentración. Todos los experimentos se mantuvieron a  $29 \pm 2$  ° C y 50 - 70% y oscuridad. Luego de 72 h, se registró el porcentaje de mortalidad.

### **2. B.4. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de las medidas de tamaño y EC de las NPs poliméricas fueron analizados mediante ANOVA y DMS. Los datos de mortalidad de los ensayos por exposición a superficies tratadas y por exposición a vapores, se procesaron mediante análisis probit utilizando el software estadístico SPSS 25.0 para obtener los valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> y sus respectivos intervalos de confianza del 95%. Los valores de CL<sub>50</sub> se consideraron significativamente diferentes si sus

intervalos de confianza del 95% no se superponían. Los datos obtenidos del efecto combinado de insecticida sintético y las NPs poliméricas fueron analizados mediante ANOVA y DMS.

## 2. C. Resultados

### 2. C.1. Caracterización de las NPs poliméricas

Los datos de la caracterización fisicoquímica de las NPs se muestran en la tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Tamaño promedio ( $\pm$  ES), índice de polidispersión (IPD, valor medio  $\pm$  ES) y eficiencia de cargado (EC,  $\pm$  ES) de las NPs poliméricas a los 7 días postformulación.

NPs	Tamaño (nm) <sup>a</sup>	IPD	EC <sup>a</sup>
Menta	381 $\pm$ 29 <b>c</b>	0,541 $\pm$ 0,013	72,2 $\pm$ 1,6 <b>a</b>
Palmarosa	191 $\pm$ 5 <b>a</b>	0,232 $\pm$ 0,015	89,7 $\pm$ 2,5 <b>b</b>
Geranio	284 $\pm$ 35 <b>b</b>	0,209 $\pm$ 0,022	90,5 $\pm$ 2,3 <b>b</b>
Lavanda	534 $\pm$ 39 <b>d</b>	0,380 $\pm$ 0,070	70,2 $\pm$ 2,4 <b>a</b>
Orégano	295 $\pm$ 34 <b>b</b>	0,210 $\pm$ 0,025	91 $\pm$ 1,8 <b>b</b>
Laurel	429 $\pm$ 61 <b>c</b>	0,250 $\pm$ 0,026	88 $\pm$ 2,6 <b>b</b>
Árbol de té	279 $\pm$ 32 <b>b</b>	0,330 $\pm$ 0,07	89 $\pm$ 1,2 <b>b</b>

<sup>a</sup> Los valores tamaño y EC seguidos de diferentes letras dentro de la misma columna muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) ( $N=3$ ).

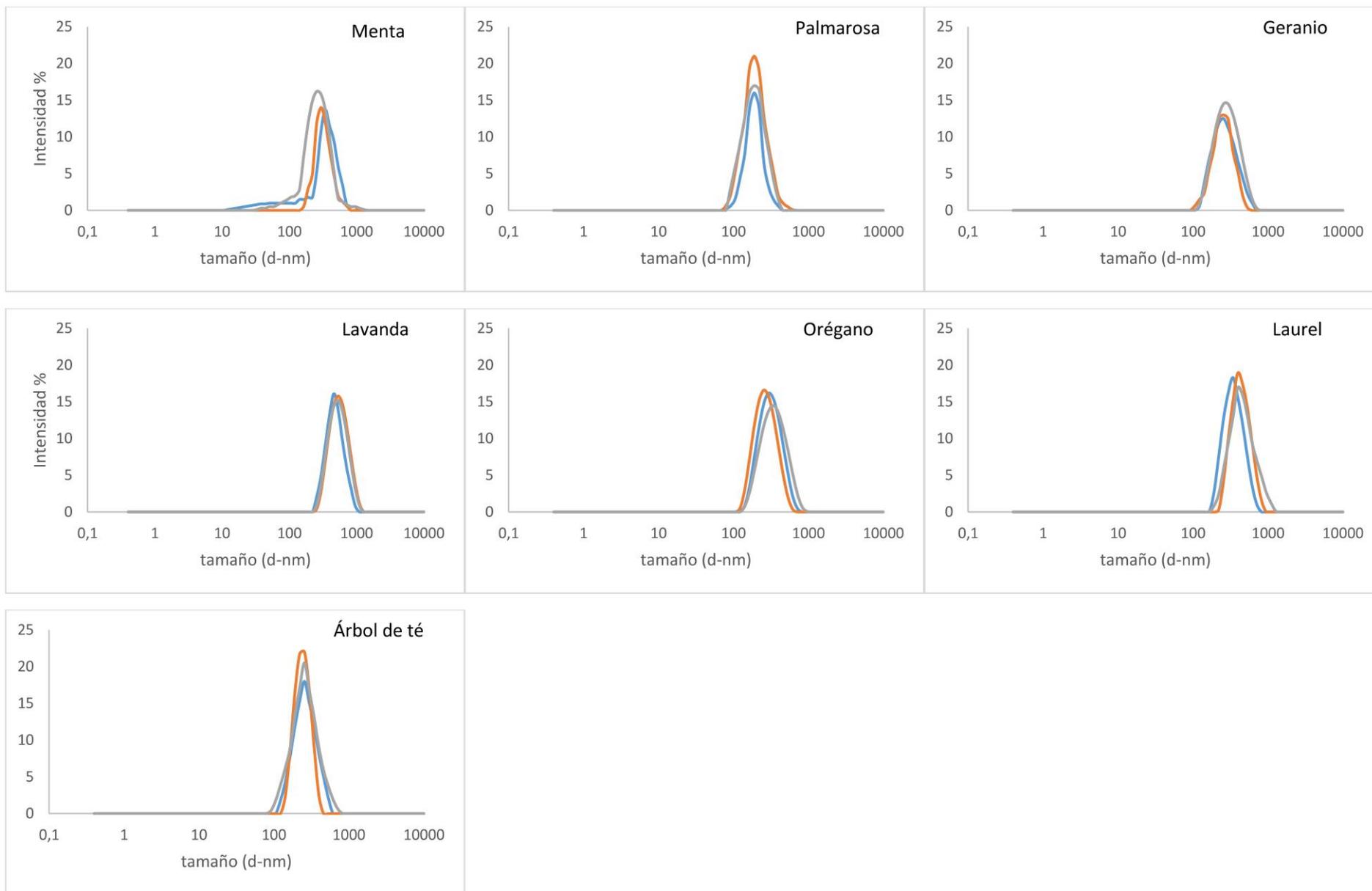
Las NPs tuvieron un tamaño medio que fue desde 191 a 534 nm. Las NPs de palmarosa fueron las más pequeñas, encontrándose diferencias significativas con el resto de las NPs ( $P < 0,05$ ). En orden creciente, aunque no observándose diferencias significativas entre ellas, se encuentran las NPs cargadas con aceites de árbol de té, geranio, y orégano con tamaños entre 279 y 295 nm ( $P > 0,05$ ). Para el caso de las NPs de menta y laurel sus tamaños medios fueron de 381 y 429 nm; cabe mencionar que ambas presentaron diferencias significativas con las NPs antes mencionadas ( $P < 0,05$ ), pero no entre ellas ( $P > 0,05$ ). Por último, las NPs de lavanda fueron las de mayor tamaño medio (534 nm) encontrándose diferencias significativas con todas las anteriores ( $P < 0,05$ ).

La técnica DLS permite determinar la distribución del tamaño de partículas, propiedad fundamental para caracterizar sistemas de partículas en suspensión hasta rangos nanométricos. El análisis del IPD indica que las muestras de las NPs de palmarosa, geranio, orégano y laurel

fueron monodispersas, con valores de  $IPD < 0,25$  (Lámina 2.4). Las NPs de lavanda y árbol de té, con valores de IPD de 0,330 y 0,380, tuvieron una distribución variable de tamaños. Por su parte, las NPs de menta mostraron valores de  $IPD > 0,4$ , lo que indica que estas muestras fueron polidispersas.

Con respecto a la EC, todas las NPs tuvieron una  $EC > 70\%$ . Las NPs de palmarosa, geranio, orégano, laurel y árbol de té mostraron una EC cercana al 90%, sin observarse diferencias significativas entre ellas ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, la EC de las NPs de menta y lavanda fueron significativamente menores en comparación con las anteriores ( $P < 0,05$ ), con valores de EC cercanos al 75% y sin encontrarse diferencias significativas entre ellas ( $P > 0,05$ ).

**Lámina 2.4.** Gráfica de distribución de tamaños por intensidad a 7 días postformulación (N=3, cada línea representa una muestra).



## 2.C.2. Composición química de los AEs postformulación

Un total de 29 componentes fueron identificados por CG-EM en la fase de éter de petróleo luego de la extracción de las NPs poliméricas a los 7 días postformulación. Además, no se hallaron remanes de los componentes de los AEs en la fase n-butanol ni en la acuosa. En las NPs poliméricas se observó que los monoterpenos fueron los compuestos mayoritarios (72,43%), seguido por los sesquiterpenos (20,68%) e hidrocarburos aromáticos (6,89%) (Tabla 2.3). En la NPs de menta, el monoterpeno mentol permaneció como el componente principal; aumentando su proporción a un 53,03%. Además, en comparación con el aceite esencial original, se observó un ligero aumento de acetato de mentililo (7,66%), neomentol (6,54%) e isomentol (6,62%), y una leve reducción en los contenidos de mentona (16,49%) e isomentona (3,51%). Los monoterpenos  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno no se detectaron en la etapa postformulación. En la NPs de palmarosa se mantuvo geraniol como componente mayoritario (87,71%), únicamente acompañado por acetato de geranilo (12,29%). Cabe destacar que el compuesto geranial no se registró en la postformulación, siendo uno de los componentes mayoritarios en el AE de partida (23,77%). En la NPs de geranio, al igual que en el AE original,  $\beta$ -citronelol, geranial y propionato de geranilo se mantuvieron como los compuestos con mayor representación, alcanzando proporciones de 83,48, 10,18 y 6,33%, respectivamente. Los componentes que en la preformulación representaban menos del 8% no se detectaron en la muestra postformulación. Asimismo, en las NPs poliméricas de lavanda como en AE su pre-formulado, los constituyentes  $\beta$ -linalool y acetato linalilo se mantuvieron como los compuestos con mayor representación con proporciones de 37,50 y 40,73%. El resto de los componentes identificados en la postformulación se mantuvieron en proporciones similares respecto a la composición del AE original. En las NPs poliméricas de orégano, al igual que en el aceite libre, los compuestos con mayor preponderancia fueron carvacrol (36,32%), cis- $\beta$ -terpineol (17,13%) y terpinen-4-ol (16,89%), mientras que el resto de los componentes identificados se hallaron en proporciones similares a las del aceite original. En las NPs poliméricas de laurel, los compuestos acetato de

terpenilo y 1,8-cineol, al igual que en el AE, se mantuvieron como los componentes mayoritarios (83,04 y 16,96%). Además, los componentes con una representación menor al 17% en el aceite libre, no se identificaron en la extracción postformulación. De la misma manera que en el aceite libre, en las NPs de árbol de té, el componente terpinen-4-ol permaneció como el compuesto principal con una proporción de 84,09%, seguido de  $\alpha$ -terpineol (12,14%) y globulol (3,77%).

**Tabla 2.3.** Composición química de los AEs preformulación y recuperado de la postformulación.

Tratamiento	Componentes	Preformulación (%)	Postformulación (%)
Menta	acetato de isomentilo	0,14	0,71
	$\alpha$ -pineno	0,27	-
	$\beta$ -pineno	0,52	-
	isomentol	0,92	6,62
	germacreno d	1,40	1,38
	trans-cariofileno	4,17	3,15
	1,8-cineol	4,58	0,89
	neomentol	4,88	6,54
	isomentona	4,95	3,51
	acetato de mentolilo	6,87	7,66
	mentona	21,24	16,49
	mentol	50,06	53,06
Palmarosa	estearato de metilo	0,22	-
	óxido de cariofileno	0,46	-
	linoleato de metilo	0,52	-
	formiato de geranilo	0,71	-
	cis- $\beta$ -ocimeno	0,75	-
	citral	1,16	-
	(z, z)-farnesol	1,2	-
	(e, e)-farnesol	1,49	-
	trans-cariofileno	1,91	-
	palmitato de metilo	2,22	-
	$\beta$ -linalool	3,49	-
	oleato de metilo	8,78	-
acetato de geranilo	12,44	12,29	

	geranial	23,77	-
	geraniol	40,89	87,71
Geranio	óxido de rosa	2,32	-
	$\beta$ -cadineno	0,53	-
	alloaromadendreno	0,61	-
	acetato de geranilo	0,61	-
	$\alpha$ -guaieno	0,68	-
	cis- <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	0,79	-
	$\beta$ -elemeno	0,85	-
	ácido undecanoico	1,31	-
	mentona	1,34	-
	$\beta$ -linalool	1,58	-
	$\beta$ -bourboneno	1,62	-
	$\alpha$ -cariofileno	1,69	-
	formiato de geranilo	1,88	-
	germacreno d	2,28	-
	trans-cariofileno	2,37	-
	isomentona	5,91	-
	geraniol	6,39	-
	propionato de geranilo	8,44	6,33
	geranial	13,16	10,18
	citronelol	37,97	83,48
Lavanda	$\alpha$ – pineno	1,57	-
	linoleato de metilo	0,17	-
	$\beta$ -pineno	0,28	-
	$\alpha$ -cariofileno	0,36	-
	óxido de cariofileno	0,4	-
	$\beta$ -tujona	0,45	-
	$\beta$ -pineno	0,68	-
	trans- $\beta$ -ocimeno	0,85	-
	$\beta$ -mirceno	0,87	-
	3-careno	0,87	-
	<i>o</i> -cimeno	0,95	-
	camfor	1,09	-
	óxido de trans-linalool	1,21	-

	palmitato de metilo	1,23	-
	e- $\beta$ -farneseno	1,88	-
	$\alpha$ -terpineol	1,88	-
	1,8-cineol	2,01	-
	acetato de nerilo	2,34	2,66
	borneol	3,27	4,54
	acetato de lavandulilo	3,38	4,47
	oleato de metilo	4,7	-
	terpinen-4-ol	5,87	5,28
	trans-cariofileno	6,42	4,86
	acetato de linalilo	28,47	40,73
	$\beta$ -linalool	28,83	37,50
	acetato de geranilo	0,21	-
	$\alpha$ -cariofileno	0,3	-
	estearato de metilo	0,31	-
	$\alpha$ -felandreno	0,37	-
	camfeno	0,47	-
	timol metil eter	0,48	-
	trans-verbenol	0,53	-
	$\alpha$ -tujona	0,75	-
	espatulenol	0,75	1,18
	linoleato de metilo	0,75	-
	$\alpha$ -pineno	0,77	-
Orégano	óxido de cariofileno	0,8	2,06
	isoborneol	0,82	-
	trans- $\beta$ -ocimeno	1,05	-
	geraniol	1,08	-
	óxido de trans-limoneno	1,26	-
	palmitato de metilo	1,26	-
	$\beta$ -mirceno	1,28	-
	acetato de linalilo	1,47	2,7
	$\gamma$ -cadineno	1,5	-
	trans-piperitol	1,63	-
	terpinoleno	1,92	-
	germacreno d	1,95	2,46

	borneol	2,07	3,95
	viridifloreno	2,18	3,13
	isotimol metil eter	2,33	-
	$\alpha$ -terpineol	2,59	5,58
	hidrato de trans-sabinene	2,69	-
	d-limoneno	2,94	-
	$\beta$ -pineno	3,11	-
	<i>o</i> -cimeno	3,56	-
	$\alpha$ -terpineno	4	-
	trans-cariofileno	5,19	5,47
	oleato de metilo	5,64	-
	$\gamma$ -terpineno	5,76	3,12
	terpinen-4-ol	10,98	16,89
	cis- $\beta$ -terpineol	11,04	17,13
	carvacrol	14,23	36,32
	$\gamma$ -cadineno	0,34	-
	$\gamma$ -gurjuneno	0,36	-
	óxido de isoaromadendreno	0,49	-
	$\beta$ -selineno	0,54	-
	cubenol	0,55	-
	$\alpha$ -tujona	0,62	-
	eugenol	0,63	-
	camfeno	0,67	-
	acetato de bornilo	0,68	-
	acetato de linalilo	0,68	-
Laurel	$\delta$ -cadineno	0,77	-
	$\gamma$ -terpineno	0,84	-
	$\beta$ -elemeno	0,85	-
	$\beta$ -mirceno	0,92	-
	óxido de alloaromadendreno	0,95	-
	$\beta$ -bisabolol	1,04	-
	$\alpha$ -muuroleno	1,15	-
	óxido de cariofileno	1,16	-
	valenceno	1,29	-
	óxido de aromadendreno	1,65	-

	trans-cariofileno	2,08	-
	terpinen-4-ol	2,4	-
	$\beta$ -pineno	2,96	-
	$\alpha$ -terpineol	3,15	-
	oleato de metilo	3,21	-
	$\alpha$ -pineno	4,66	-
	metil eugenol	6,26	-
	$\beta$ -linalool	7,22	-
	sabineno	8,12	-
	acetato de terpenilo	17,14	83,04
	1,8-cineol	26,67	16,96
	$\alpha$ -pineno	2,5	-
	alloaromadendreno	0,46	-
	carvona	0,51	-
	viridiflorol	0,52	-
	$\delta$ -3-careno	0,66	-
	isopinocarveol	0,68	-
	linoleato de metilo	0,99	-
	palmitato de metilo	1,61	-
	globulol	2,18	3,77
Árbol de té	$\mu$ -terpineol	2,69	-
	$\alpha$ -gurjuneno	2,86	-
	<i>o</i> -cimeno	4,12	-
	1,8-cineol	4,31	-
	$\alpha$ -terpineno	4,64	-
	terpinoleno	5,88	-
	$\alpha$ -terpineol	7,52	12,14
	oleato de metilo	7,75	-
	$\gamma$ -terpineno	12,6	-
	terpinen-4-ol	37,52	84,09

### 2. C.3. Toxicidad por exposición a superficies tratadas

En los controles negativos, en ambos insectos, no se registró mortalidad luego de 72 h.

En *S. oryzae*, las NPs de laurel y lavanda fueron las menos efectivas debido a que a la máxima concentración produjeron porcentajes de mortalidad menores al 20%, por lo que los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  no pudieron ser calculados. Para el resto de las NPs, los valores de  $CL_{50}$  variaron en un rango entre 39,52 y 152,71  $\mu\text{g cm}^{-2}$ . Las NPs de orégano fueron las más efectivas encontrándose diferencias significativas con el resto de las NPs ( $P < 0,05$ ) (Tabla 2.4). Para las NPs de menta, palmarosa, geranio y árbol de té no se encontraron diferencias significativas entre sus valores de  $CL_{50}$  ( $P > 0,05$ ). Cabe destacar que la toxicidad promovida por el insecticida sintético fue mayor que la de las NPs.

Teniendo en cuenta los valores de toxicidad de los distintos AEs por exposición a superficies tratadas para *S. oryzae* (Tabla 1.2), se concluye que la formulación del aceite de orégano por medio de NPs fue la más efectiva debido a que aumentó la toxicidad del aceite 7,43 veces ( $P < 0,05$ ). Las NPs cargadas con aceites de árbol de té y de menta incrementaron la toxicidad del AE 2,27 y 2,01 veces, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Por último, las NPs de palmarosa aumentaron la toxicidad del aceite 1,82 veces ( $P < 0,05$ ). Por otro lado, la mortalidad promovida por las NPs cargadas con aceite de geranio no difirió significativamente del AE libre ( $P > 0,05$ ).

En adultos de *L. serricone*, el rango de valores de  $CL_{50}$  de las NPs poliméricas fue 84,48 a 312,74  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (Tabla 2.4). Las NPs de orégano presentaron los valores de  $CL_{50}$  más bajos, no encontrándose diferencias significativas con las NPs de geranio ( $P > 0,05$ ) pero sí con el resto de las nanopartículas ( $P < 0,05$ ). Con un rango de valores de  $CL_{50}$  entre 100,26 y 191,83  $\mu\text{g cm}^{-2}$  se encuentran las NPs cargadas con los AEs de geranio, palmarosa, laurel, menta y árbol de té, sin encontrarse diferencias significativas entre ellas ( $P > 0,05$ ). Las NPs de lavanda fueron las menos efectivas con un valor de  $CL_{50}$  de 312,74  $\mu\text{g cm}^{-2}$  encontrándose diferencias significativas con las NPs previamente mencionadas ( $P < 0,05$ ). Un dato que cabe resaltar es que las NPs de orégano

fueron 2 veces más tóxicas que el insecticida sintético ( $P < 0,05$ ) y que la toxicidad generada por las NPs de menta, palmarosa, geranio, laurel y árbol de té no difirió significativamente con la del piretroide ( $P > 0,05$ ).

Al comparar los valores de  $CL_{50}$  de los AEs libres por exposición a superficies tratadas en *L. serricorne* (Tabla 1.2) con los obtenidos en las NPs, se concluye que todas las formulaciones incrementaron significativamente la toxicidad ( $P < 0,05$ ). Específicamente, las NPs de laurel y orégano y geranio incrementaron la toxicidad del aceite 3,76, 3,58 y 3,30 veces, respectivamente; las NPs de árbol de té y menta 2,33 y 2,11 veces y por último las NPs de palmarosa y 1,41 veces.

#### **2. C.4. Toxicidad por exposición a vapores**

En el rango de concentraciones estudiadas, los AEs cargados en las NPs poliméricas no generaron actividad insecticida en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*. En los controles negativos, en ambos insectos, no se registró mortalidad luego de 72 h.

**Tabla 2.4.** Toxicidad por superficies tratadas de las NPs poliméricas en *S. oryzae* y *L. serricorne*.

Especies	Tratamientos	CL <sub>50</sub> (µg AE cm <sup>-2</sup> ) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub>	CL <sub>90</sub> (µg AE cm <sup>-2</sup> ) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub>	X <sup>2</sup> (gl=4)	p- Level
<i>S. oryzae</i>	NPs de Menta	130,50 <b>c</b>	50,86 - 189,50	327,61 <b>d</b>	253,07 - 522,55	8,540	0,074
	NPs de Palmarosa	128,82 <b>c</b>	113,34 - 146,70	209,37 <b>c</b>	185,64 - 244,59	1,098	0,895
	NPs de Geranio	152,71 <b>c</b>	131,29 - 175,40	289,03 <b>d</b>	256,19 - 336,22	4,431	0,351
	NPs de Orégano	39,52 <b>b</b>	28,47 - 50,26	114,95 <b>b</b>	96,77 - 144,33	5,352	0,253
	NPs de Árbol de té	126,50 <b>c</b>	93,75 - 185,50	232,82 <b>cd</b>	177,06 - 375,05	7,796	0,099
	NPs de Laurel	-	-	-	-	-	-
	NPs de Lavanda	-	-	-	-	-	-
	β-cipermetrina	15,41 <b>a</b>	12,34 - 18,81	35,37 <b>a</b>	29,93 - 44,28	6,478	0,166
<i>L. serricorne</i>	NPs de Menta	162,04 <b>b</b>	133,73 - 196,37	348,86 <b>b</b>	294,79 - 438,24	4,190	0,381
	NPs de Palmarosa	141,08 <b>b</b>	116,65 - 170,68	321,82 <b>b</b>	271,26 - 406,89	3,964	0,411
	NPs de Geranio	100,26 <b>ab</b>	58,76 - 131,63	289,46 <b>b</b>	249,93 - 351,53	1,936	0,748
	NPs de Orégano	84,48 <b>a</b>	57,74 - 105,51	194,42 <b>a</b>	166,21 - 243,05	2,224	0,695
	NPs de Árbol de té	191,83 <b>b</b>	161,23 - 220,60	382,73 <b>b</b>	341,50 - 442,29	1,799	0,773
	NPs de Laurel	150,60 <b>b</b>	124,61 - 174,96	295,77 <b>b</b>	261,98 - 345,73	2,448	0,654
	NPs de Lavanda	312,74 <b>c</b>	277,13 - 353,30	567,47 <b>c</b>	501,69 - 669,82	4,103	0,392
	β-cipermetrina	169,71 <b>b</b>	136,59 - 205,43	390,64 <b>b</b>	334,42 - 478,01	5,376	0,251

Los valores de CL<sub>50</sub> que muestran letras diferentes presentan diferencias significativas (NSCI, P <0,05). IC<sub>95</sub> = intervalo de confianza del 95%, gl = grados de libertad; ns = no significativo (P>0,05). La actividad de las NPs se considera significativamente diferente cuando el IC del 95% no se superpone.

\* Valor de chi-cuadrado, no significativo (ns) a nivel P>0,05.

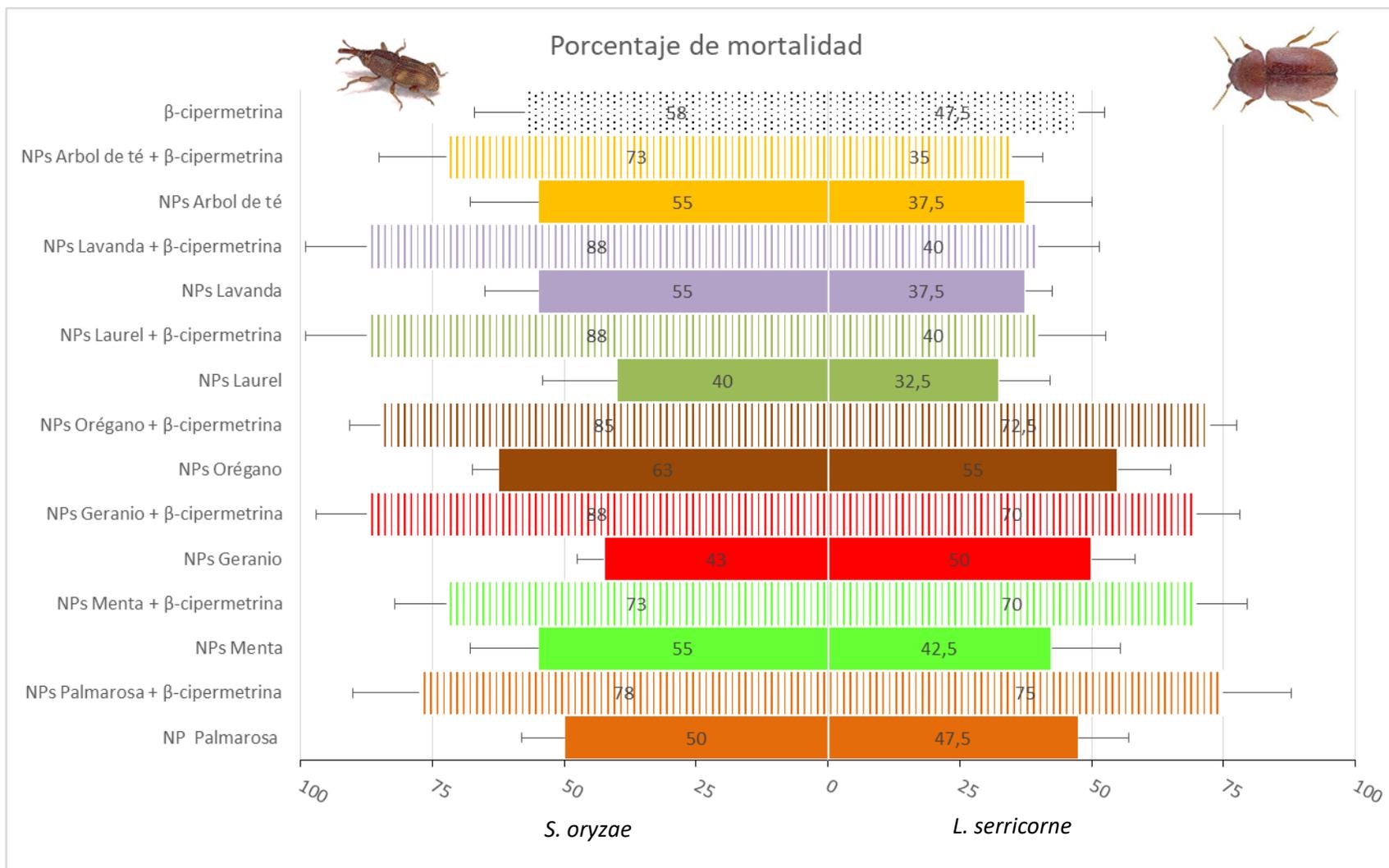
## 2. C.5. Efecto combinado insecticida sintético y las NPs poliméricas

Los resultados de mortalidad de *S. oryzae* y *L. serricornis* luego de la exposición a una combinación de insecticida sintético y las NPs poliméricas a concentraciones de  $CL_{50}$  durante 72 horas se muestran en la Lámina 2.5. En el caso del control negativo (PEG 6000), no se registró mortalidad en ambos insectos al final del bioensayo. Para el caso del insecticida  $\beta$ -cipermetrina, se tomaron como referencia los valores  $CL_{50}$  obtenidos en la Tabla 1.2.

En *S. oryzae* el porcentaje de mortalidad de la combinación de insecticida sintético y las NPs de palmarosa, geranio, orégano, lavanda y laurel fue significativamente mayor al efecto tóxico de los productos aplicados individualmente ( $P < 0,05$ ). Para la combinación insecticida sintético y las NPs de menta y árbol de té, no se hallaron diferencias significativas con los productos individuales ( $P > 0,05$ ). Teniendo en cuenta los valores de efecto combinado del piretroide y los AEs por exposición a superficies tratadas para *S. oryzae* (Lámina 1.6), se concluye que la combinación piretroide y NPs no tuvo diferencias significativas respecto a las previamente mencionadas ( $P > 0,05$ ).

En *L. serricornis*, la combinación de insecticida sintético y las NPs de menta, palmarosa, orégano y geranio incrementó significativamente el porcentaje de mortalidad en comparación con los productos individuales ( $P < 0,05$ ). No se encontraron diferencias significativas en la toxicidad producida por la combinación insecticida sintético y las NPs de lavanda, laurel y árbol de té respecto a los compuestos individuales ( $P > 0,05$ ). Al comparar con los valores de toxicidad del efecto combinado de los AEs y piretroide sintético (Lámina 1.6), se concluyó que la aplicación conjunta de las NPs de lavanda y piretroide disminuyó el efecto tóxico ( $P < 0,05$ ), mientras que dicho efecto no difirió entre los tratamientos para el resto de las NPs ( $P > 0,05$ ).

**Lámina 2.5.** Porcentaje de mortalidad del efecto combinado de insecticida sintético y NPs poliméricas a valores de CL<sub>50</sub> en *S. oryzae* y *L. serricorne*. Se grafica la media y su desvío estándar N: 4 réplicas.



## 2. D. Discusión

La incorporación de los AEs en sistemas nanoescalares es una práctica que no solo mejora su bioactividad, solubilidad y estabilidad, sino que también permite una liberación controlada de los mismos en el sitio de acción (Kumar et al., 2020; Ribeiro-Santos et al., 2017). En la actualidad, la optimización de los métodos de síntesis de NPs poliméricas se basan en la obtención de partículas con tamaños deseados, baja polidispersidad y alta eficiencia de cargado. Estas propiedades están determinadas por factores claves, como el tipo de polímero y la metodología de síntesis empleada. Los polímeros de PEG utilizados para la formulación de AEs por medio de NPs, cumplen el rol de nanoportadores en las industrias alimentaria, médica, agrícola, cosmética y farmacéutica (Niza et al., 2020). En el presente estudio, a través de las síntesis de NPs por medio del método fusión-dispersión, el PEG 6000 resultó ser un nanoportador efectivo para los AEs, obteniéndose NPs poliméricas con tamaños medio de partículas <550 nm, con EC entre 70 y 90% y valores de IPD variables según el tipo de NP. La selección del PEG 6000 como matriz para la formación de las NPs se debe a que los polímeros con alto peso molecular (PM), incrementan su grado de cristalinidad (al compararlos con los de menor PM), aumentando la intensidad de las fuerzas intermoleculares entre el polímero y los materiales encapsulados (Nasir et al., 2015; Nuruzzaman et al., 2016). En este aspecto, algunos estudios utilizaron PEG de PM crecientes (300, 600, 900, 1500, 1800 y 2000) como copolímeros para la síntesis de NPs cargadas con insecticidas sintéticos o bioinsecticidas y demostraron que, al incrementar su PM, las nanoformulaciones retenían mayor tiempo los principios activos (Adak et al., 2012; Kumar et al., 2010; Loha et al., 2012; Shakil et al., 2010).

La técnica fusión-dispersión es una de las más utilizadas por su rapidez, bajo costo y reproducibilidad (Khan et al., 2017; Sur et al., 2019; Yang et al., 2009). Además, permite obtener NPs con tamaños >100 nm, y alta EC de los AEs (Vishwakarma et al., 2016). En nuestro estudio, se observó una relación entre la EC y el IPD. De esta forma, se comprobó que las NPs poliméricas monodispersas (IPD<0,4) presentaban mayor EC (NPs de palmarosa, geranio, orégano y laurel

con  $EC \approx 90\%$ ) mientras que las NPs poliméricas con distribución variable de tamaño ( $0,25 < IPD < 0,4$ ) o polidispersas ( $IPD > 0,4$ ) tuvieron una EC entre el 70 y 84%. Estudios previos del grupo de investigación demostraron que la EC en las NPs poliméricas de PEG 6000 cargadas con AEs cambiaba con el tiempo de postformulación, variación que podría estar en relación con el IPD. Así, las NPs de menta (polidispersas) a los 3 días de postformulación presentaron una EC cercana al 93%, mientras que a los 7 días, la EC disminuía a un 72%. Sin embargo, las NPs de palmarosa (monodispersas) mantuvieron una alta EC a los 3 y 7 días postformulación (Yeguerman et al., 2020). Las NPs poliméricas con altos valores de IPD reflejan una distribución heterogénea de tamaños de partícula, en general acompañado por formas irregulares, que podría resultar en una disminución de la tasa de encapsulación del aceite o bien una mayor liberación de los componentes durante el tiempo de postformulación. En contrapartida, NPs con bajos niveles de IPD tienden a tener una distribución homogénea de tamaños con formas regulares que conllevan a una menor pérdida de componentes durante la etapa de postformulación. Antecedentes previos reportaron resultados similares al obtener NPs poliméricas de PEG monodispersas y con altas EC. Por ejemplo, las NPs formuladas con los AEs de *C. sinensis* y *S. aromaticum* tuvieron tamaños cercanos a 200 nm,  $IPD < 0,25$  y EC cercana al 80% (Campolo et al., 2017; Ikawati et al., 2021). En comparación con lo observado en estudios previos referidos a las técnicas de gelificación iónica y nanoprecipitación, se comprobó que con el método de fusión-dispersión se obtiene NPs de tamaños variables con elevadas EC. Por ejemplo, a través de la técnica de nanoprecipitación se sintetizaron NPs utilizando el polímero EUDRAGIT RS100 y los AEs de *R. officinalis* y *Lavandula dentata* (L.), obteniendo NPs de  $\approx 200$  nm, monodispersas con EC de 59 y 41%, respectivamente (Silva-Flores et al., 2019). Con esta misma técnica, se elaboraron NPs poliméricas de PLGA cargadas con cinamato de geranilo y de PCL elaboradas con farnesol que presentaron tamaños mayores a 175 nm,  $IPD > 0,4$  y una EC de 71 y 22,5%, respectivamente (Yanice-Gursu et al., 2020; Zanetti et al., 2018). Por otro lado, por medio de la técnica de gelificación iónica, se prepararon NPs poliméricas de PCL cargadas con el

AE de *Eugenia caryophyllata* (L.) con tamaño promedio de partícula de 223 nm, IPD<0,4 y una EC de 81,4% (Hadidi et al., 2020). Además, utilizando la misma metodología, se sintetizaron NPs poliméricas de quitosano de los AEs de *G. maculatum* o *Urtica dioica* (L.) que tuvieron tamaños mayores a los 250 nm, 0,25<IPD<0,4 y EC de 38 y 68%, respectivamente (Bagheri et al., 2021; Werdin et al., 2017).

Es sabido que la incorporación de los AEs en una matriz polimérica mejora su estabilidad fisicoquímica. En nuestro estudio, en las NPs, los compuestos principales (monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos aromáticos) se mantuvieron en similares proporciones en relación a los AEs libres. En el caso de los compuestos minoritarios en los AEs, los mismos probablemente se volatilizaron o no fueron detectados (niveles por debajo del límite de detección) en la postformulación. Además, se comprobó que a medida que fue aumentando la polaridad del solvente durante la extracción de los aceites, no se hallaron remanes de los componentes de los AEs en la fase n-butanol ni en la acuosa, lo que podría indicar que las pérdidas no se deberían a que los componentes quedan atrapados en las NPs y no se liberan.

En el presente trabajo se observó que por exposición a superficies tratadas las NPs de orégano fueron las más tóxicas para *S. oryzae* y *L. serricorne*, siendo el primero aproximadamente 2 veces más susceptible. Como se observó en el capítulo 1, *L. serricorne* tiende a ser más tolerante a los productos insecticidas. Además, en *S. oryzae*, al igual que los AEs libres, las NPs fueron menos efectivas que el insecticida sintético. Salvo las NPs de laurel y lavanda (que no generaron toxicidad) se comprobó también para este insecto que las NPs elaboradas con los AEs de palmarosa y geranio (aceites que en su forma libre fueron los más tóxicos) junto con las NPs de menta, orégano y árbol de té fueron eficaces. En contraposición, en *L. serricorne*, se determinó que las NPs de orégano fueron 2 veces más tóxicas que la  $\beta$ -cipermetrina mientras que las NPs de palmarosa (aceite que en forma libre tuvo similar bioactividad que el piretroide) y las elaboradas con los AEs menta, geranio, laurel y árbol de té provocaron efectos tóxicos de magnitud similar al insecticida sintético. En el campo de la nanotecnología, específicamente en

el área de polímeros, este resultado es novedoso. Pocos trabajos previos han comparado la efectividad de nanoformulaciones de AEs e insecticidas sintéticos en insectos plaga de productos almacenados. Por ejemplo, las nanoemulsiones de *Carlina acaulis* (L.), *M. piperita* y *C. martinii* tuvieron menor actividad que el insecticida comercial Spinosad (Laser®, Dow) y la  $\beta$ -cipermetrina en *Lobesia botrana* (Den. Y Schiff.) y *P. interpunctella* (Benelli et al., 2020; Jesser et al., 2020a).

Los efectos tóxicos promovidos por las NPs tanto en *S. oryzae* como en *L. serricornis* podrían estar en relación con el aumento de la proporción de los componentes mayoritarios durante la encapsulación y al mantenimiento de ciertos compuestos minoritarios que podrían tener un efecto sinérgico. Posiblemente, la falta de bioactividad de las NPs elaboradas con los AEs de lavanda y laurel en *S. oryzae* se deba a las modificaciones en el perfil de los AEs postformulado, que cabe mencionar, fueron aceites que en su forma libre se encontraron entre los menos efectivos para este insecto plaga.

En este bioensayo también se determinó que en *S. oryzae*, las NPs de menta, palmarosa, geranio, orégano y árbol de té aumentaron significativamente la actividad insecticida de los AEs entre 1,82 y 7,43 veces, siendo las NPs de orégano las que determinaron el mayor incremento. En *L. serricornis*, todas las NPs aumentaron significativamente la actividad insecticida de los AEs entre 1,41 y 3,76 veces. Para este insecto, las NPs que mayor incremento generaron fueron las elaboradas con los AEs de laurel y orégano. El éxito de las NPs poliméricas por exposición a superficies tratadas podría deberse a que las partículas nanoescalares permiten una eficaz penetración de los compuestos activos en los tejidos de los insectos a través de una mayor eficiencia en la interacción con la membrana celular, causando mortalidad en dosis óptimas (Heydari et al., 2020; Prakash et al., 2018). Además, se ha comprobado que la incorporación de PEG permite prolongar el tiempo de permanencia de las NPs en circulación, mejorando la solubilidad, la estabilidad cinética, la administración sostenida y selectiva evitando el reconocimiento de los sistemas de defensa de los insectos (Samkange et al., 2019). Investigaciones previas del grupo de trabajo informaron que las NPs poliméricas potenciaron los

efectos tóxicos de los AEs en insectos plaga, por ejemplo, las NPs de menta, palmarosa, bergamota y geranio incrementaron la actividad de los aceites en *B. germanica* entre 8 y 16 veces, mientras que las correspondientes a los aceites de bergamota y geranio, 4 y 8 veces en *R. dominica* (Werdin González et al., 2014, 2015; Yeguerman et al., 2020). Además, en la bibliografía, trabajos previos informaron resultados similares, por ejemplo, las NPs de menta y *A. sativum* aumentaron significativamente la actividad insecticida de los AEs en *M. domestica* y *T. castaneum* (Kumar et al., 2011; Yang et al., 2009). Además, NPs cargadas con el aceite esencial de *L. sidoides* y timol potenciaron la actividad insecticida de los AEs entre 1,79 y 1,50 veces en *S. zeamais* (Oliveira et al., 2017). Los fenómenos potenciadores de las NPs podrían deberse al aumento de la concentración de los constituyentes principales de los AEs y a la mejora de la tasa de penetración de los compuestos bioactivos a través del exoesqueleto (Benelli et al., 2017; Lucía y Guzmán, 2021). Según Shahzad y Manzoor (2021), el contacto directo de las NPs con la cutícula es una de las principales rutas de absorción de las NPs en los insectos plaga de productos almacenados produciéndose modificaciones en la capa cerosa de la cutícula. Cabe mencionar que no es posible correlacionar de forma directa las variables fisicoquímicas de las NPs (tamaño de partícula, polidispersidad y EC) con los efectos potenciadores de la actividad insecticida que estas promovieron dadas las variaciones observadas entre los insectos en estudio. A modo de ejemplo, las NPs de orégano que en *S. oryzae* y *L. serricornne* figuran como las más efectivas fueron monodispersa, con EC cercanas al 90% y tamaños de 295 nm pero las NPs de menta que fueron polidispersas, con EC cercanas al 70% y tamaños significativamente mayores que las de orégano, potenciaron la bioactividad del aceite alrededor de 2 veces.

En el bioensayo por exposición a vapores, ninguna de las NPs poliméricas mostraron actividad insecticida en adultos de *S. oryzae* y *L. serricornne*. Esto podría deberse a que al formar un sistema de liberación controlada mediante la incorporación de los AEs en una matriz de PEG 6000, la tasa de liberación de los componentes bioactivos podría verse limitada, disminuyendo el efecto tóxico por esta vía de exposición. Cabe destacar que por esta ruta de exposición, estudios

previos de nuestro grupo, observaron resultados similares en *T. castaneum* y *R. dominica* (Werdin et al., 2014). Sin embargo, recientemente se informó que las NPs poliméricas de menta, palmarosa y geranio generaron actividad por exposición a vapores en adultos *P. interpunctella*, viéndose afectado este efecto por la temperatura de almacenamiento (17, 24 y 31°C) en las NPs menta y palmarosa (Jesser et al., 2020b).

Teniendo en cuenta el alto costo de aplicación de AEs y sus limitaciones, el uso integrado de NPs cargadas con AEs en combinación con insecticidas sintéticos podría ser una opción más factible para reducir las dosis de compuestos contaminantes y la presión de selección sobre poblaciones de insectos plaga. En este trabajo, se demostró que la aplicación conjunta de  $\beta$ -cipermetrina con ciertas NPs cargadas con AEs, produjeron mayor efecto tóxico por contacto (exposición a superficies tratadas) que la aplicación de los productos individuales. Para el caso de *S. oryzae*, este efecto se observó con la aplicación conjunta de insecticida piretroide con las NPs cargadas de los AEs de palmarosa, geranio, lavanda orégano y laurel, mientras que en *L. serricornis*, con las NPs de menta, palmarosa, geranio y orégano. El único reporte previo que habría confirmado el aumento de la susceptibilidad de insectos plaga de productos almacenados frente a la combinación de NPs e insecticidas sintéticos se remite a Bayramzadeh et al. (2019), en la que combinaciones de valores de  $CL_{25}$  de NPs cargadas con el aceite esencial de *C. cyminum* y fosfina fueron más efectivas que los compuestos libres en el control de *T. castaneum*, *S. granarius* y *O. surinamensis*.

Pese a que no se observaron diferencias significativas entre el efecto de la aplicación conjunta de insecticida piretroide con AE o con NPs, la aplicación de estas últimas ofrecería como ventaja la protección de los AEs a la par de prolongar su bioactividad en el campo, reduciendo el requerimiento de aplicaciones adicionales futuras.

## 2. E. Conclusiones

- ❖ La técnica de fusión-dispersión demostró ser un método simple para obtener NPs poliméricas de tamaños variables (191 y 534 nm) y EC por encima del 70%. Además, se observó que las NPs monodispersas (palmarosa, geranio, orégano y laurel) fueron las que mayor EC presentaron ( $\approx 90\%$ ), mientras que aquellas NPs polidispersas o con IPD variable (menta, lavanda y árbol de té), tuvieron EC entre 70 y 84%.
- ❖ Al analizar la composición química de los AEs pre y postformulado, se observó que los compuestos mayoritarios tienden a permanecer en las NPs, mientras que los minoritarios no se detectaron.
- ❖ En cuanto a los bioensayos por exposición a superficies tratadas, se observó que en *L. serricorne*, la toxicidad generada por las NPs de orégano fue mayor que la de  $\beta$ -cipermetrina, mientras que la de las NPs de menta, palmarosa, geranio, laurel y árbol de té fue de igual magnitud respecto al insecticida piretroide. Sin embargo, en *S. oryzae* la toxicidad promovida por el insecticida sintético fue mayor que la de las NPs.
- ❖ Por esta vía de exposición, en *S. oryzae*, las NPs de menta, palmarosa, geranio, orégano y árbol de té fueron más efectivas que los AEs, siendo las elaboradas con el aceite de orégano las que potenciaron en mayor magnitud la bioactividad del aceite ( $\approx 7,5$  veces). Cabe mencionar que las NPs de laurel y lavanda no generaron efectos tóxicos en este insecto y que la mortalidad promovida por las NPs cargadas con el aceite de geranio no difirió del AE libre. En *L. serricorne*, todas las NPs potenciaron la actividad insecticida de los aceites, siendo las elaboradas con laurel y orégano, las que mayor incremento produjeron ( $\approx 3,5$  veces).
- ❖ Ninguna de las NPs poliméricas presentaron actividad insecticida por exposición a vapores en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Al estudiar la aplicación conjunta de  $\beta$ -cipermetrina con las NPs, se observó que en *S.*

*oryzae*, la combinación de piretroide y las NPs de palmarosa, geranio, orégano, lavanda y laurel tuvo mayor efecto tóxico que los productos aplicados individualmente, mientras que en *L. serricornis*, la combinación de  $\beta$ -cipermetrina y las NPs de palmarosa, geranio, orégano y menta. Para este bioensayo en ambos insectos, en general no se observaron diferencias significativas respecto a las combinaciones de AEs y piretroide.

---

### 3. EFECTOS SUBLETALES DE LOS ACEITES ESENCIALES Y SUS NANOPARTICULAS POLIMERICAS

---

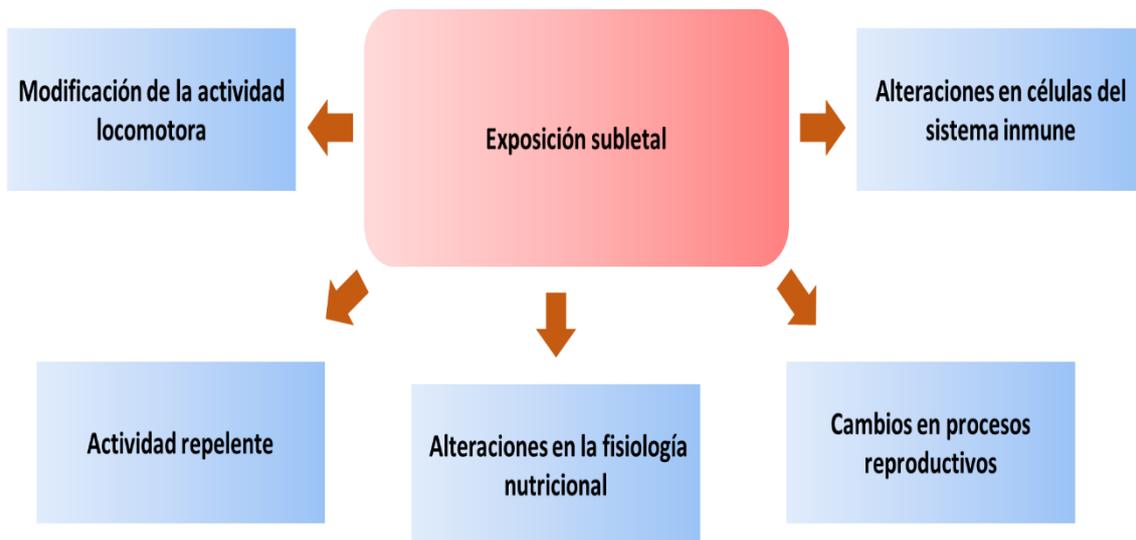
#### 3. A. Introducción

##### 3. A.1. Efectos subletales

Los productos insecticidas de distintos orígenes generan tanto efectos letales como subletales en los insectos plaga. Los efectos subletales se definen como los efectos biológicos, fisiológicos, demográficos o conductuales en individuos o poblaciones expuestos a concentraciones o dosis subletales de un tóxico. También pueden considerarse en esta categoría aquellas exposiciones cuya duración no genera un efecto letal promovido por la sustancia en análisis (). En consecuencia, exposiciones a bajas dosis o de corta duración de estos productos pueden inducir efectos adversos en la fisiología de los insectos tales como nutricionales, repelencia y modificación de variables comportamentales, reducción de la fertilidad y fecundidad, entre otros (Lámina 3.1) (Bantz et al., 2018; de França et al., 2017).

Es sabido que, en las últimas dos décadas, los AEs se han convertido en una nueva tendencia para el control de plagas en la agricultura moderna. Se ha demostrado que los AEs y sus compuestos mayoritarios poseen tanto efectos letales en los insectos plaga, como subletales. Por lo tanto, comprender los impactos fisiológicos de esos productos es un paso importante para establecer una evaluación integral de su actividad biológica y planificar estrategias de acción en los programas de manejo integrado de plagas (Müller, 2018; Ni et al., 2021).

**Lámina 3.1.** Efectos subletales de insecticidas.



### 3. A.2.a. Modificación de la actividad locomotora

El conocimiento de la respuesta conductual de los insectos es esencial para establecer planes de muestreo, monitoreo, control y aplicación de insecticidas. Es sabido, que los insecticidas estimulan o deprimen el comportamiento locomotor de los insectos interfiriendo con las conductas de reproducción, dispersión, migración y alimentación. Por lo tanto, el análisis de variables como la distancia total, velocidad, dirección y patrones de dispersión favorecen el desarrollo de modelos para predecir las respuestas de los insectos frente a distintos insecticidas, entre ellos los AEs (Nayak et al., 2020). Como se mencionó anteriormente, los AEs poseen diversos sitios acción dentro del sistema nervioso de los insectos, por lo tanto, es de esperar que los mismos puedan influir en el comportamiento de los insectos a dosis que no producen mortalidad. En este sentido, varios autores han demostrado una reducción de la tasa metabólica y movilidad de insectos plaga de productos almacenado como *T. castaneum*, *R. dominica* y *S. zeamais* cuando se exponen a diferentes AEs (Anukiruthika et al., 2021; Kitherian, 2017).

### **3. A.2.b. Actividad Repelente**

Los productos repelentes son sustancias que provocan un alejamiento del insecto del sitio de aplicación promoviendo el desvío de su trayectoria. Los repelentes de origen natural, como los AEs, son posibles alternativas seguras por su baja toxicidad ambiental, biodegradabilidad y fácil extracción. En los últimos años, la gran demanda de repelentes seguros y no contaminantes causaron un gran crecimiento y desarrollo de productos repelentes a base de AEs. Varios autores han demostrado la actividad repelente de los AEs y sus constituyentes mayoritarios en insectos plaga de productos almacenados como *S. oryzae*, *S. zeamais*, *C. maculatus*, *T. castaneum* y *R. dominica* (Abouelatta et al., 2020; Hategekimana et al., 2020; Tavares et al., 2018).

### **3. A.2.c. Alteraciones en la fisiología nutricional**

La nutrición es un concepto multidimensional, siendo el resultado integrado del comportamiento (búsqueda de alimento) y los procesos fisiológicos (digestión, absorción y distribución) (Lee et al., 2022). Bajo esta premisa, se destaca que los insectos deben localizar, seleccionar y finalmente ingerir alimentos que sean capaces de ser asimilados y convertidos en las sustancias energéticas y estructurales requeridas para su actividad y desarrollo. Al mismo tiempo, la continuidad del proceso de alimentación del insecto está determinada por los estímulos químicos captados por las quimiosensilas (presentes en la cavidad bucal, palpos o antenas) capaces de detectar sustancias incitadoras de la alimentación (fagoestimulantes) o inhibitoras (fagodisuasivas) (El-Ghany, 2019). El estudio y comprensión de los efectos de los insecticidas en la fisiología nutricional permiten explicar los cambios en el crecimiento, anatomía y composición química de los insectos, siendo información clave para su manejo.

Los bioinsecticidas con propiedades fagodisuasivas son aquellas sustancias que mediante una acción directa reducen el consumo de una materia prima. Se ha postulado también, que esta actividad, aumenta el riesgo de depredación de los insectos por enemigos naturales al aumentar la búsqueda de nuevas fuentes de alimentos (Jiang et al., 2020; Melanie et al., 2022; Toan et al.,

2021). En general, los AEs al ser ingeridos estimulan las terminales nerviosas gustativas produciendo la modificación del comportamiento de los insectos (Simmonds, 2006). Se ha determinado también que los AEs pueden generar efectos post-ingesta, modificando las etapas de digestión, absorción o bien la conversión de los nutrientes en biomasa animal. La estimación de estos parámetros por medio de índices nutricionales como la tasa de crecimiento relativo (TCR), la tasa de consumo relativo (TRC), eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECAI) son un aspecto cuantitativo fundamental en el análisis de los efectos subletales de los bioinsecticidas sobre la fisiología nutricional de los insectos plaga. Varios autores han informado sobre la actividad fagodisuasiva de los AEs y sus compuestos bioactivos contra diferentes insectos plaga de productos almacenados, siendo *S. oryzae*, *T. castaneum* y *R. dominica* los principales protagonistas (Kanda et al., 2017; Rajkumar et al., 2019).

#### **3. A.2.d. Cambios en procesos reproductivos**

En los organismos que se reproducen sexualmente, la cópula posee un sentido evolutivo en la cual los genes se transmiten a las próximas generaciones. En los insectos, tanto mecanismos nerviosos como hormonales están involucrados en el control de los procesos reproductivos (Anton y Gadenne, 1999; Engelmann, 2013). Los estudios de comportamiento reproductivo y de factores que afectan a la fecundidad y fertilidad de los insectos plaga de productos almacenados son una de las claves para su exitoso manejo. En este sentido, varios autores demostraron que, a dosis subletales, los AEs de *Piper corcovadensis* (Miq.), *Boswellia carterii* (Flueck.) *Zanthoxylum bungeanum* (Maxim.), *M. piperita*, *Pinus roxburghii* (Sarg.), redujeron el número de puesta de huevos y el porcentaje de eclosión en insectos plaga de productos almacenados como *S. oryzae*, *L. serricorne*, *T. castaneum*, *R. dominica*, *C. chinensis*, *C. maculatus* y *S. zeamais* (de Lira Pimentel et al., 2022; Kiran et al., 2017; Liang et al., 2022; Mackled et al., 2019).

### 3. A.2.e. Alteraciones en células del sistema inmune

La inmunidad innata es la respuesta inmediata y única de los invertebrados en la protección contra sustancias extrañas. En los insectos, la misma involucra respuestas tanto humorales como celulares que están mediadas a través de ciertos receptores de reconocimiento y la activación de varias vías de señalización. En la primera, el cuerpo graso y los hemocitos participan en la producción y secreción de agentes antimicrobianos, síntesis de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y en la activación de cascadas enzimáticas que regulan la coagulación y melanización de la hemolinfa. Por otro lado, en la respuesta celular, solo los hemocitos participan en procesos como fagocitosis, nodulación y encapsulación (Cytrynska et al., 2016; Tsakas y Marmaras, 2010). En la bibliografía, pocos trabajos demostraron que los AEs podrían tener efectos significativos en los hemocitos. Por ejemplo, los AEs de *Ricinus comunis* (L.) y *Eucalyptus globulus* (Labill) disminuyeron significativamente el número hemocitos de *S. litura* (Ali y Ibrahim, 2018). Además, el AE de *Acorus calamus* (L.) modificó la morfología de los hemocitos de *S. littoralis* (Sharma et al., 2008). Por último, los AEs de *C. citratus* y *C. camphora* promovieron la disminución de la viabilidad y proliferación de los hemocitos de *T. granarium* (Feroz, 2020).

### **3. A.3. Hipótesis**

En referencia a los antecedentes expuestos, se plantean las siguientes hipótesis:

- ❖ Los AEs y sus NPs de PEG 6000 poseen efectos repelentes en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Los AEs y sus NPs de PEG 6000 modifican variables conductuales en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Los AEs y sus NPs de PEG 6000 poseen efectos en la fisiología nutricional en adultos de *S. oryzae* y larvas de *L. serricorne*.
- ❖ Las NPs de PEG 6000 cargadas con AEs potencian los efectos subletales antes mencionados de los AEs en *S. oryzae* y *L. serricorne*.

#### **3. A.3.a. Objetivo general**

El objetivo general planteado para este capítulo es evaluar los efectos subletales de las NPs de PEG 6000 cargadas con AEs en *S. oryzae* y *L. serricorne*.

#### **3. A.3.b. Objetivos específicos**

- ❖ Evaluar los efectos repelentes de los AEs y sus NPs en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Evaluar los efectos conductuales de los AEs y sus NPs en adultos de *S. oryzae* y *L. serricorne*.
- ❖ Evaluar los efectos en la fisiología nutricional de los AEs y sus NPs en adultos de *S. oryzae* y larvas de *L. serricorne*.

### 3. B. Materiales y métodos

#### 3. B.1. Repelencia y respuestas conductuales

Para evaluar los efectos repelentes/attractantes de los AEs menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus correspondientes NPs en adultos de *S. oryzae* o de *L. serricornis*, se trataron mitades de papeles de filtro (14 cm de diámetro) con 0,5 ml de soluciones de AEs en acetona o con sus NPs aplicadas en forma directa; la otra mitad permaneció sin tratar (bioensayo de elección). Para evaluar las respuestas conductuales, se trataron discos de papel filtro (14 cm de diámetro) en forma completa con 1 ml de AEs diluidos en acetona o con sus NPs en forma directa (bioensayo sin elección). En ambos bioensayos, la arena experimental se delimitó con un anillo de vidrio para evitar el escape de los insectos. Para cada especie de gorgojo, los efectos de los AEs y sus NPs se evaluaron a valores de  $CL_{50}$  (calculada a 72 h de exposición) o concentración máxima (en caso de no obtenerse  $CL_{50}$ ); todos estos valores fueron reportados en los capítulos 1 y 2. En ambas metodologías, se liberaron dos insectos adultos, se registró el movimiento de cada uno con una cámara de 13 megapíxeles durante 4 min y se analizaron los videos con dos programas de detección (redes neuronales y detección por color) y el programa Kalman Filter para el recorrido (tracking) diseñados por el Laboratorio de Ciencias de las Imágenes a cargo del Dr. Claudio Delrieux, Departamento de Ciencias e Ingeniería de Computación, Universidad Nacional del Sur. Las variables analizadas por este sistema de seguimiento fueron: tiempo (s), distancia total (cm), velocidad ( $cm\ s^{-1}$ ). Los controles negativos se trataron con acetona o con PEG 6000. Se evaluaron diez réplicas independientes para cada uno de los AEs y controles.

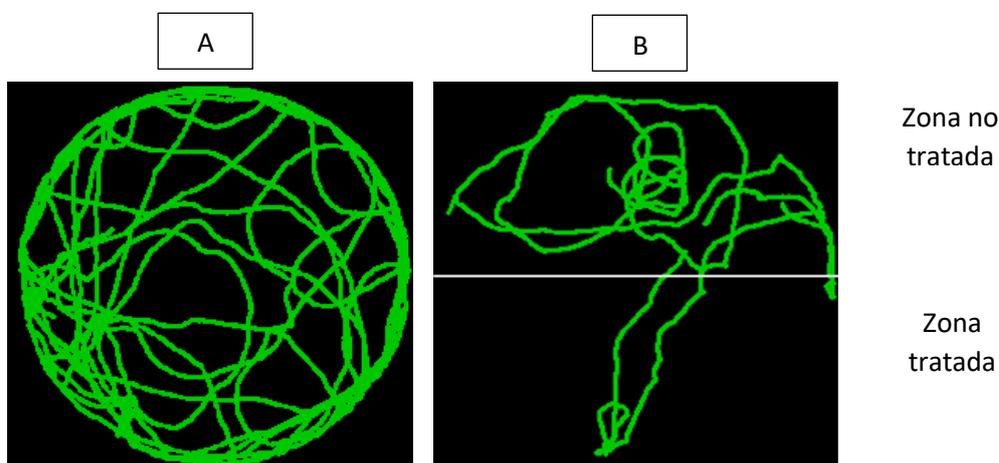
Para evaluar los efectos repelentes de los compuestos se utilizó únicamente la variable tiempo y con ella se calculó un índice de repelencia (IR) de la siguiente manera:  $IR = (NT - T) / (T + NT)$ , donde T y NT son el tiempo que el insecto transcurre en la zona tratada y zona no tratada, respectivamente. Valores superiores a 0,1 indican que el producto genera repelencia; los valores

inferiores a -0,1, atracción y para aquellos comprendidos entre -0,1 y 0,1 se considera que el producto no genera efecto sobre el insecto (zona neutral) (Yeguerman et al., 2020).

Para evaluar las respuestas conductuales, se analizaron las variables distancia total, que estima el recorrido de cada insecto en la arena experimental durante 4 minutos, y la velocidad, que estima la velocidad media de cada insecto durante el bioensayo.

Además, con el objetivo de analizar las variaciones tanto en el efecto repelente como en las respuestas conductuales a lo largo del tiempo, se realizaron sesiones de filmación consecutivas utilizando los mismos papeles de filtro tratados con los AEs o con las NPs a distintos intervalos (tiempo inicial (0), 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 h). En la Lámina 3.2. se muestra en forma representativa el recorrido de 2 insectos (tracking) en un bioensayo sin elección (A) y uno con elección (B).

**Lámina 3.2.** (A) Recorrido representativo en un bioensayo sin elección luego de 4 minutos. (B) Recorrido representativo en un bioensayo de elección luego de 4 minutos ( $IR > 0,1$ ).



### 3. B.2. Efectos en la fisiología nutricional

En este bioensayo se utilizaron adultos de *S. oryzae* y larvas de *L. serricorne*. La decisión de utilizar larvas de *L. serricorne* en vez de adultos se basó en un estudio preliminar en el que se observó que los adultos, durante un periodo de 72 h, podían no alimentarse de los discos de harina, o lo hacían de forma escasa.

Para evaluar los efectos en la fisiología nutricional, se elaboraron dos tipos de discos: unos solamente con harina y otros con harina a los que se le incorporó las NPs. Para los primeros, alícuotas de 0,2 ml de una mezcla de harina de trigo en agua destilada (12 g/10 ml) se colocaron en placas de vidrio que se dejaron secar en una cámara a  $29 \pm 2$  ° C y 50 - 70% de HR y en oscuridad durante 18 horas. Estos discos se utilizaron para evaluar el efecto de los AEs libres (a dosis de 1 y 4 mg AEs/disco). Para el segundo tipo de disco, se mezclaron las NPs (a dosis equivalentes) con harina (12 g) y agua destilada (10 ml) y se tomaron alícuotas de 0,2 ml de la mezcla que se dejaron secar en idénticas condiciones ambientales y temporales.

En el caso de los AEs libres, se realizaron dos bioensayos: en el primero (denominado agudo), los discos se topicaron con 10 µl de soluciones de los AEs (1 y 4 mg/disco) en acetona y, luego de la evaporación del solvente, se administraron a los insectos. En el segundo bioensayo (denominado residual), los discos tratados se dejaron evaporar durante 18 h, equivalente al tiempo de secado de los discos elaborados con las NPs. Los controles negativos se realizaron tratando los discos de harina únicamente con acetona (control harina) o incorporando a la mezcla de harina y agua, PEG 6000. En cada réplica, dos discos se pesaron y se colocaron en recipientes separados a los que se les agregaron quince adultos de *S. oryzae* o larvas de *L. serricorne* previamente pesados, con 24 h de ayuno. El bioensayo finalizó a las 72 h, registrándose el peso de los discos y de los insectos vivos. Se realizaron 4 réplicas de cada ensayo.

Con los datos obtenidos se calcularon los índices nutricionales:

$$\text{Tasa de Crecimiento Relativa (TCR)} = (A-B) / (B)$$

Donde A= peso de los insectos vivos a las 24 h; B= peso inicial de los insectos/número total de insectos.

$$\text{Tasa Relativa de Consumo (TRC)} = D/(B)$$

Donde D= biomasa ingerida (mg)/número de insectos vivos a las 24 h.

$$\text{Eficiencia de Conversión del Alimento Ingerido (ECAI\%)} = (\text{TCR} / \text{TRC}) \times 100$$

Este índice indica cantidad de alimento utilizado para el crecimiento en peso del insecto.

Para obtener el Índice Fagodisuasivo (IF) se consideró:

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

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

Valores de IF entre -15 y 15: efecto neutro,  $-15 > \text{IF} > -45$ : efecto ligeramente fagodisuasivo,  $-45 > \text{IF} > -75$ : efecto moderadamente fagodisuasivo,  $\text{IF} < -75$ : altamente fagodisuasivo,  $15 < \text{IF} < 45$ : ligeramente fagoestimulante,  $45 < \text{FDI} < 75$ : moderadamente fagoestimulante;  $\text{IF} > 75$ : altamente fagoestimulante.

### **3. B.3. Análisis estadístico**

Las variables conductuales y los índices nutricionales (TCR, TRC y ECAI) se analizaron mediante ANOVA y DMS, ambos con un nivel de significancia del 5%.

### 3. C. Resultados

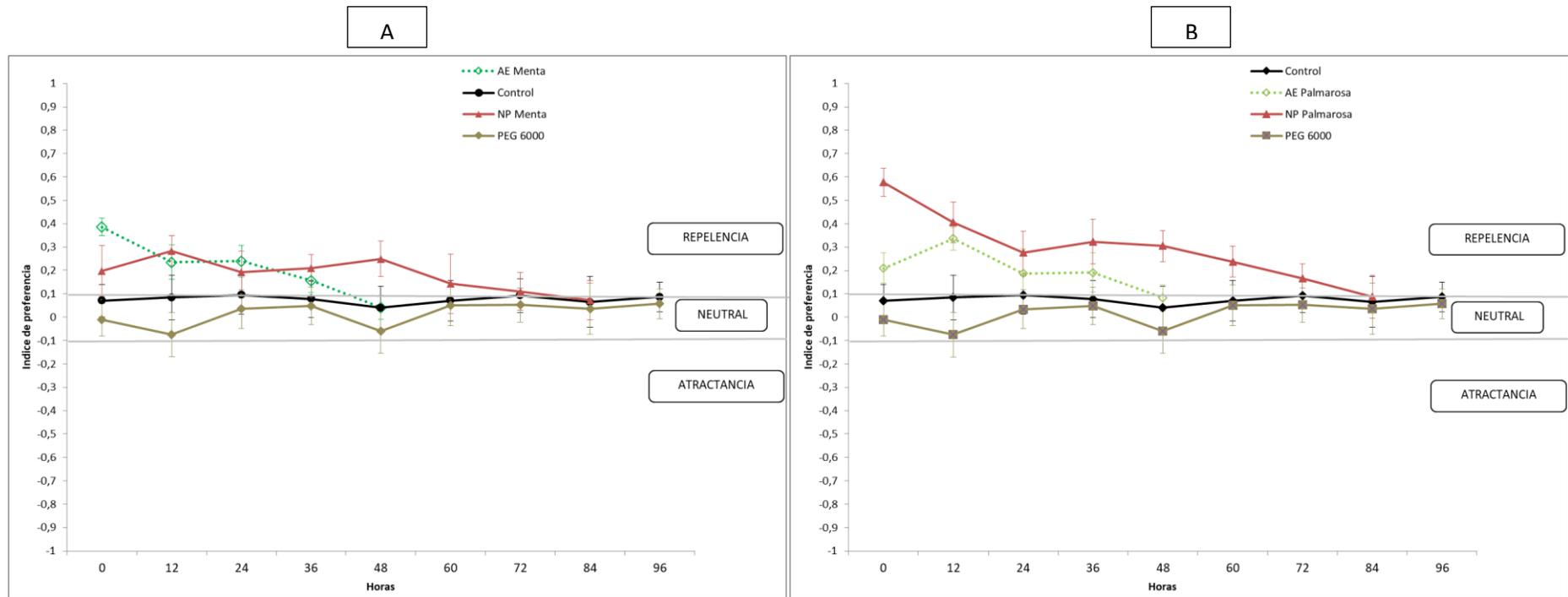
#### 3. C.1. Repelencia y respuestas conductuales

Los bioensayos de elección mostraron que todos los AEs y sus NPs generaron efectos repelentes en *S. oryzae* y *L. serricornis* dependientes del tiempo; además, se observó que las NPs extendieron el efecto mencionado.

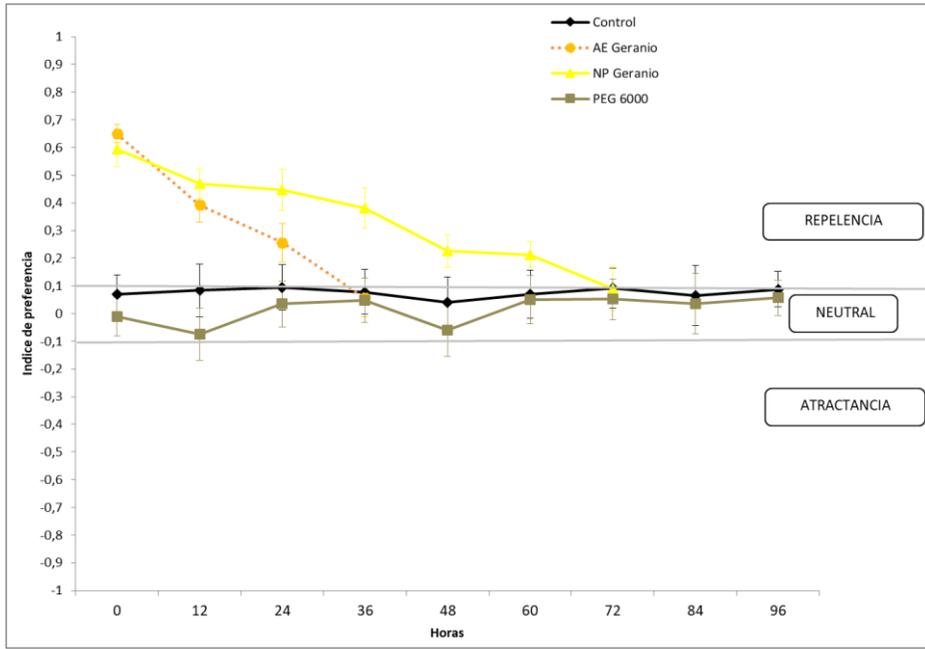
En adultos de *S. oryzae* los AEs de lavanda y laurel fueron repelentes durante las primeras 12 h mientras que sus NPs extendieron el efecto hasta las 24 y 48 h, respectivamente (Lámina 3.3. D y F). Los AEs de geranio y árbol de té mostraron repelencia por 24 h, mientras que sus NPs potenciaron dicho efecto por 48 y 60 h (Lámina 3.3. C y G). Por último, se observó que los AEs de menta, palmarosa y orégano tuvieron efecto más prolongado (por 36 h) mientras que sus NPs extendieron la repelencia por 60 h (orégano) y 72 h (menta y palmarosa) (Lámina 3.3. A, B y E).

En *L. serricornis*, el AE de lavanda fue repelente por 12 h, mientras que sus NPs por 36 h (Lámina 3.4. D). Los AEs de geranio y laurel produjeron repelencia por 24 h mientras que sus NPs, por 48 h (Lámina 3.4. C y F). En el caso del AE de árbol de té se observó efecto repelente por 24 h mientras que sus NPs extendieron el efecto hasta las 60 h (Lámina 3.4. G). Finalmente, los AEs de menta, palmarosa y orégano tuvieron efecto repelente por 36 h mientras que sus NPs prolongaron el efecto hasta las 60 h (orégano) y 72 h (menta y palmarosa) (Lámina 3.4. A, B y E).

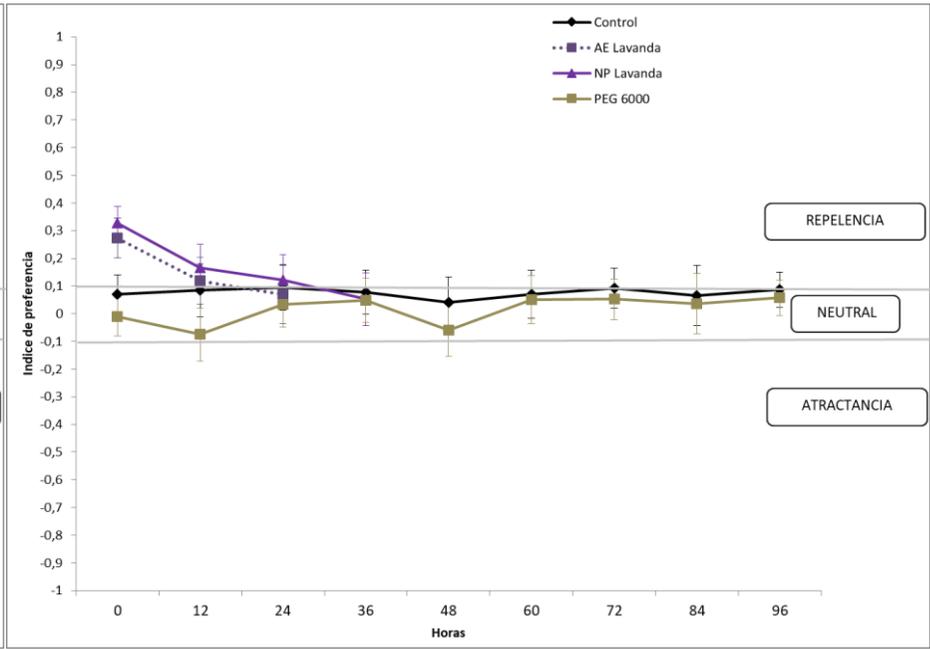
**Lámina 3.3.** Índice de repelencia de los AEs de menta (A), palmarosa (B), geranio (C), lavanda (D), orégano (E), laurel (F) y árbol de té (G) y sus NPs en adultos de *S. oryzae*.



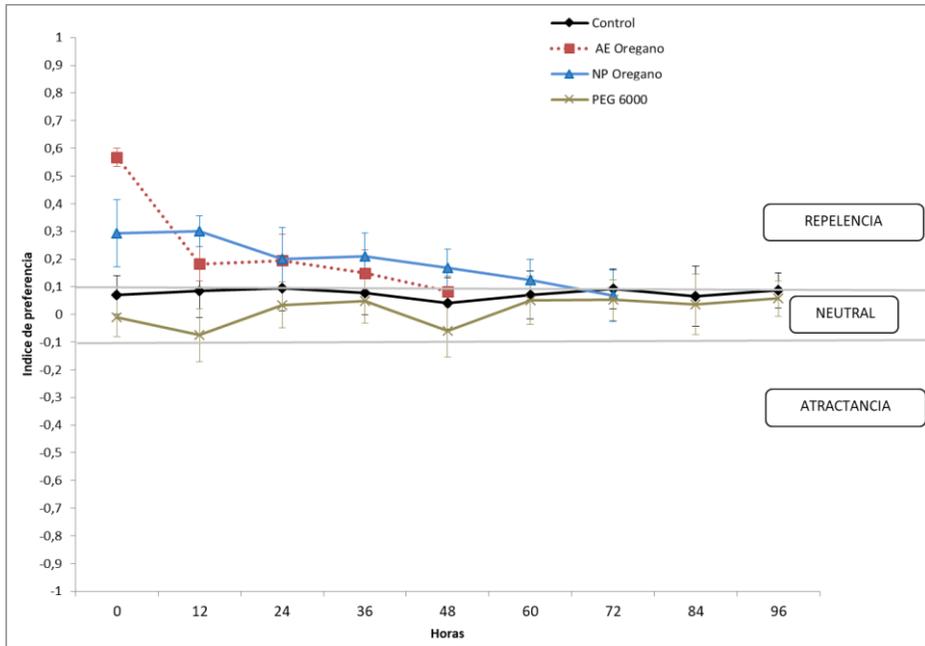
C



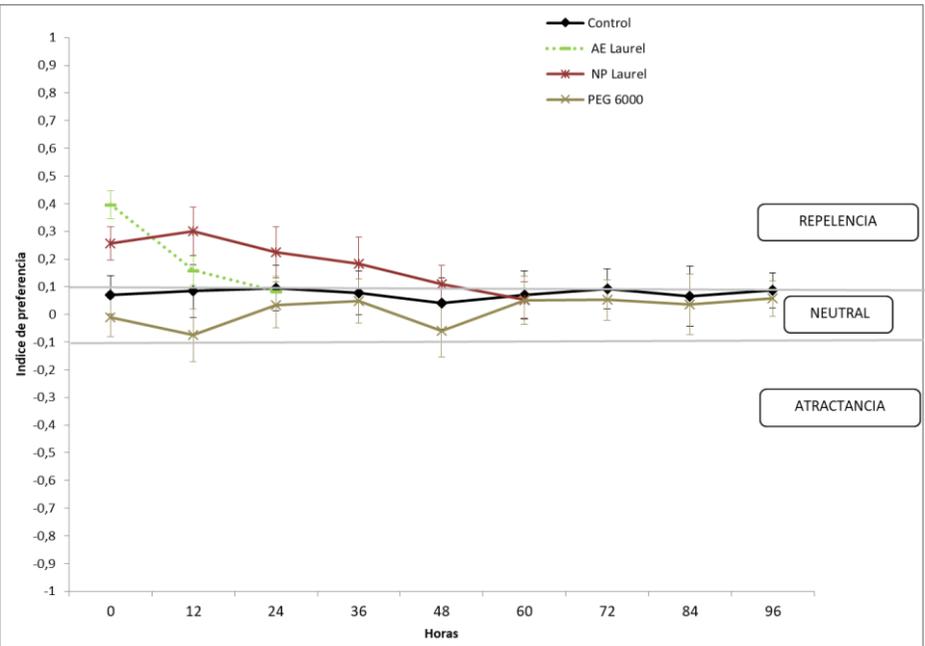
D



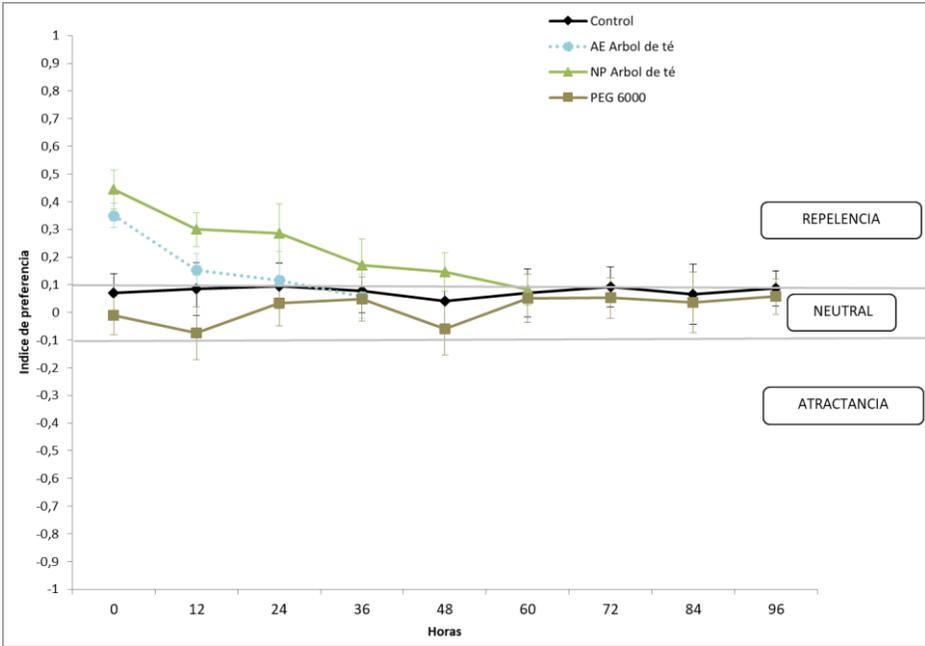
E



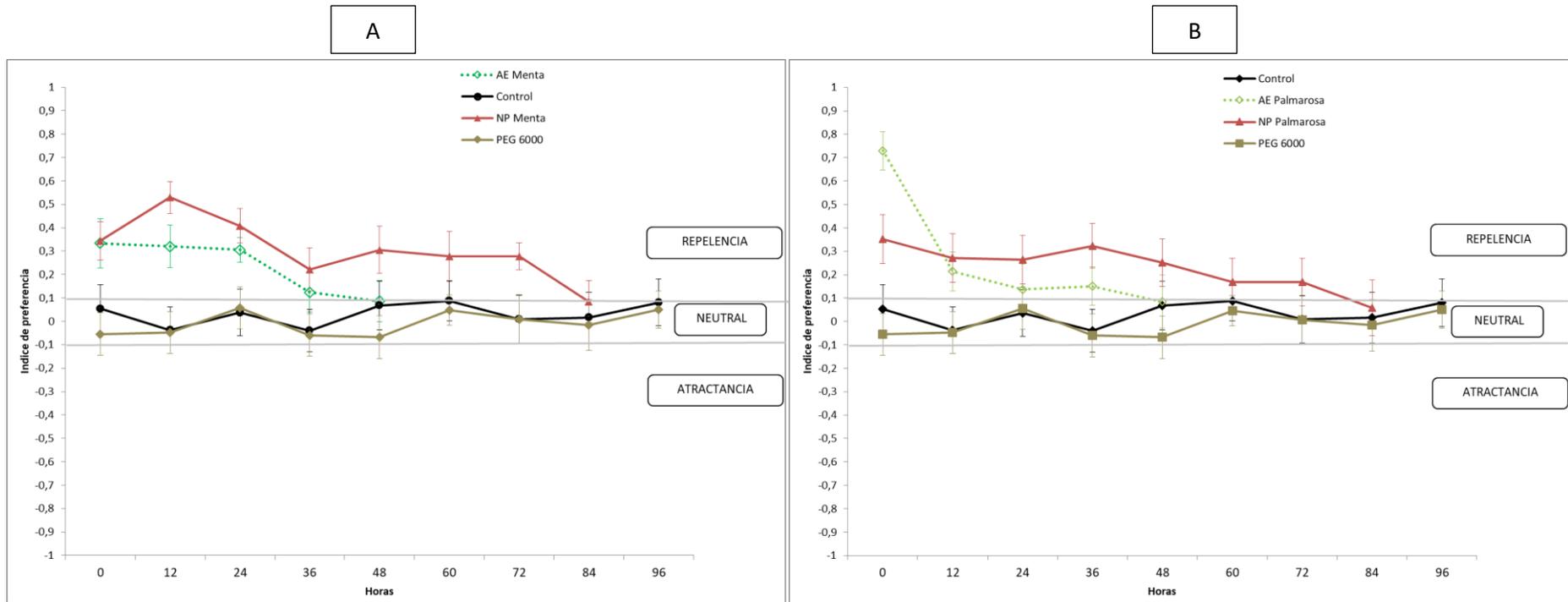
F



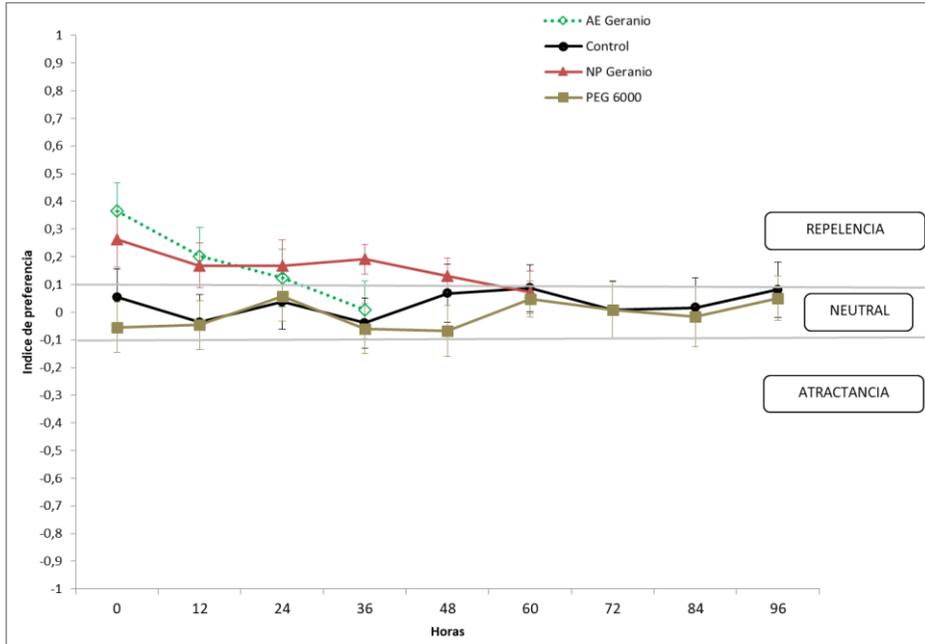
G



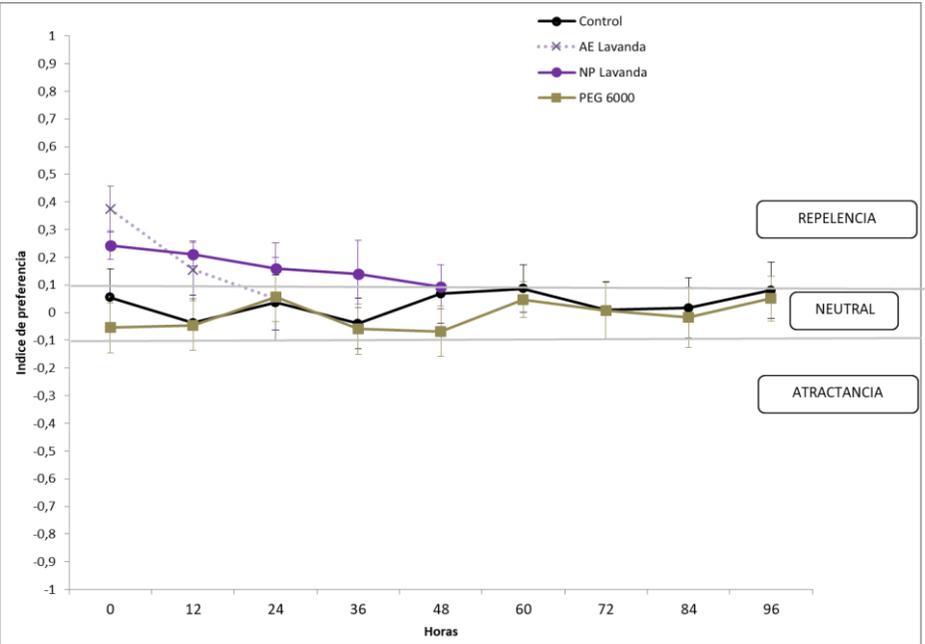
**Lámina 3.4.** Índice de repelencia de los AEs de menta (A), palmarosa (B), geranio (C), lavanda (D), orégano (E), laurel (F) y árbol de té (G) y sus NPs en adultos de *L. serricorne*.



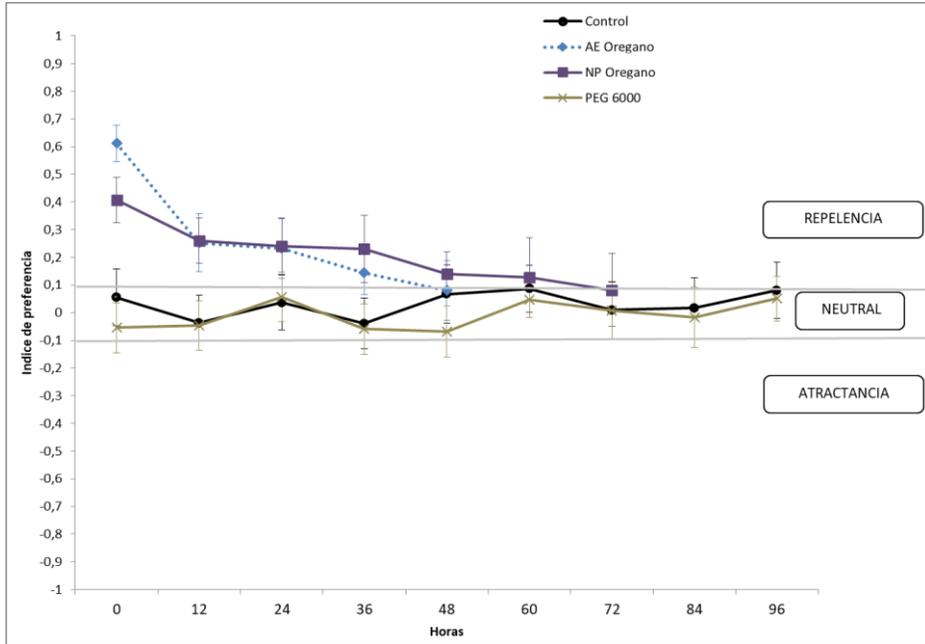
C



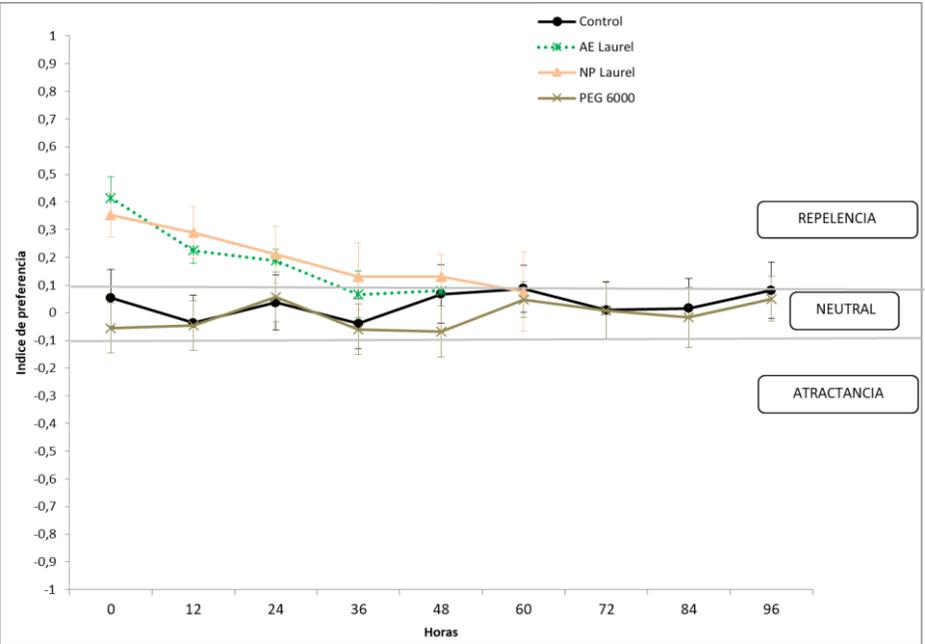
D



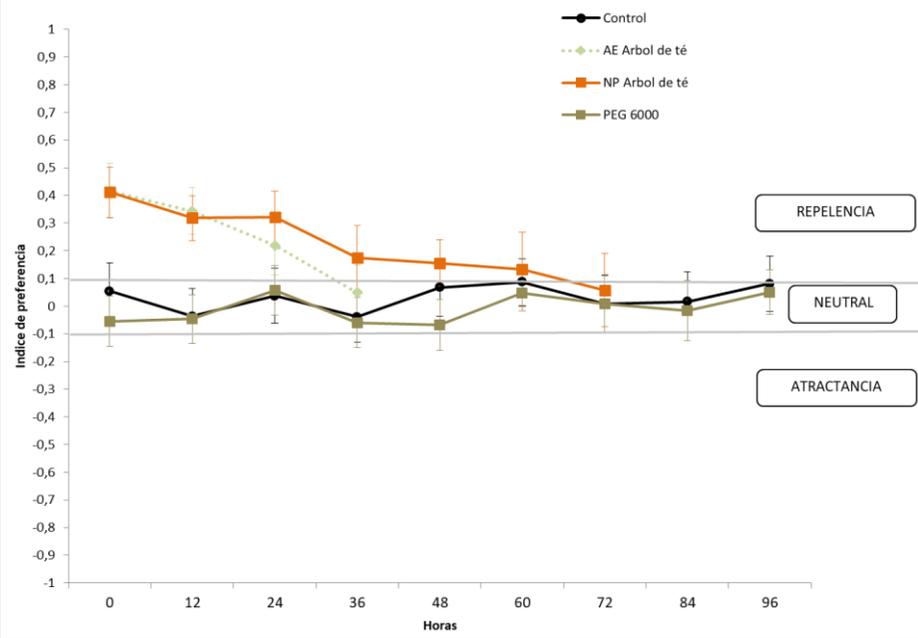
E



F



G



Teniendo en cuenta las respuestas conductuales, en *S. oryzae*, a partir de las 12 y hasta las 96 h, no se encontraron diferencias significativas en la distancia total y la velocidad entre el control de PEG 6000, el control de acetona y los AEs de menta y palmarosa y sus NPs ( $P>0,05$ ).

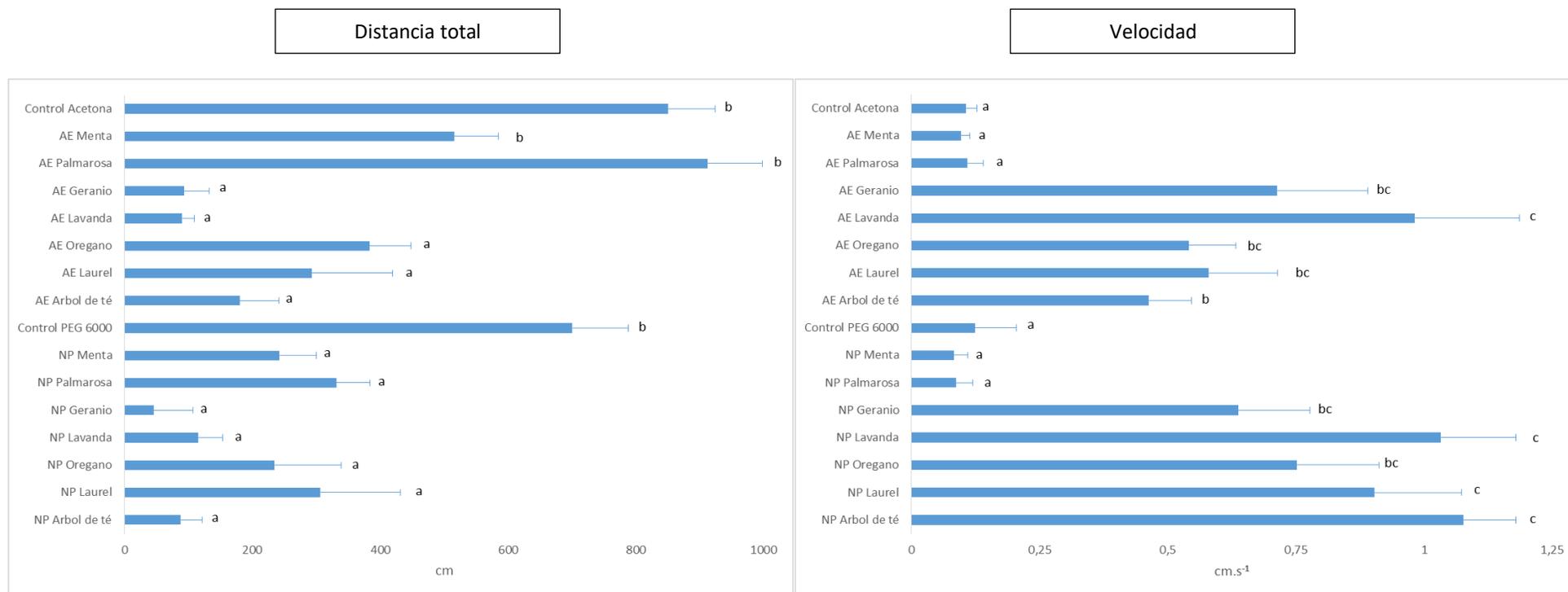
Considerando la distancia total, al tiempo inicial (0 h), se observó que los AEs (salvo los de menta y palmarosa) y todas las NPs redujeron significativamente esta variable respecto a los controles ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.5.A). De forma similar, en la siguiente sesión de filmación (12 h), los AEs de geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs mantuvieron este efecto sobre esta variable ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.5.B). Asimismo, a las 24 y 36 h, estos tratamientos (a excepción de las NPs de laurel) disminuyeron distancia total ( $P<0,05$ ). Es importante destacar que a las 24 h, la magnitud en la reducción de esta variable por parte de las NPs de orégano fue mayor que el del aceite libre ( $P<0,05$ ) (Láminas 3.5.C y 3.5.D). A las 48 h, únicamente los AEs de geranio y árbol de té disminuyeron significativamente la distancia total ( $P<0,05$ ), mientras que a las 60 y 72 h solo las nanoformulaciones de estos aceites sostuvieron el efecto ( $P<0,05$ ) (Láminas 3.5.E y 3.5.F).

En relación a la velocidad, al tiempo inicial (0 h), los AEs de geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs aumentaron significativamente esta variable respecto a los controles ( $P<0,05$ ). Además, el aumento promovido por las NPs de árbol de té fue de mayor magnitud en comparación que el aceite libre ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.5.A). En la siguiente sesión de filmación (12 h), los tratamientos anteriores (a excepción del AE de laurel), mantuvieron este aumento sobre la velocidad ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.5.B). De igual manera, a las 24 y 36 h, los AEs de geranio, lavanda y árbol de té y sus NPs junto con las formuladas con los aceites de orégano y laurel aumentaron la velocidad en relación a los controles ( $P<0,05$ ). A estos tiempos el efecto promovido por las NPs orégano, laurel y geranio (excepto a las 36 h) sobre la velocidad fue significativamente mayor que el de los AEs libres ( $P<0,05$ ) (Láminas 3.5.C y 3.5.D). A las 48 h, los AEs de geranio y árbol de té y sus NPs junto con las elaboradas con lavanda, orégano y laurel aumentaron significativamente la variable en comparación con los controles ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.5.E);

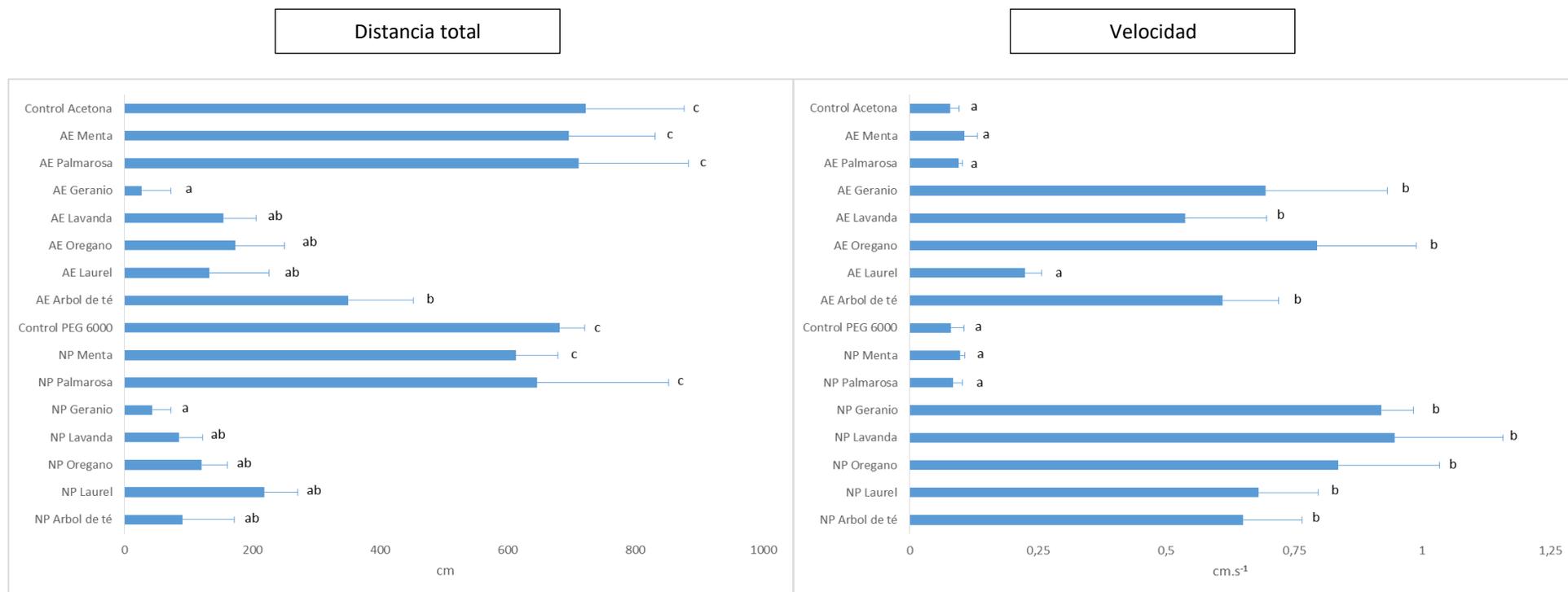
mientras que a las 60 y 72 h, únicamente las NPs de geranio, orégano y árbol de té mantuvieron el efecto referido ( $P < 0,05$ ) (Lámina 3.5.F).

Cabe resaltar que para los tiempos de 84 y 96 h, no se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos, para las variables distancia total y velocidad ( $P > 0,05$ ).

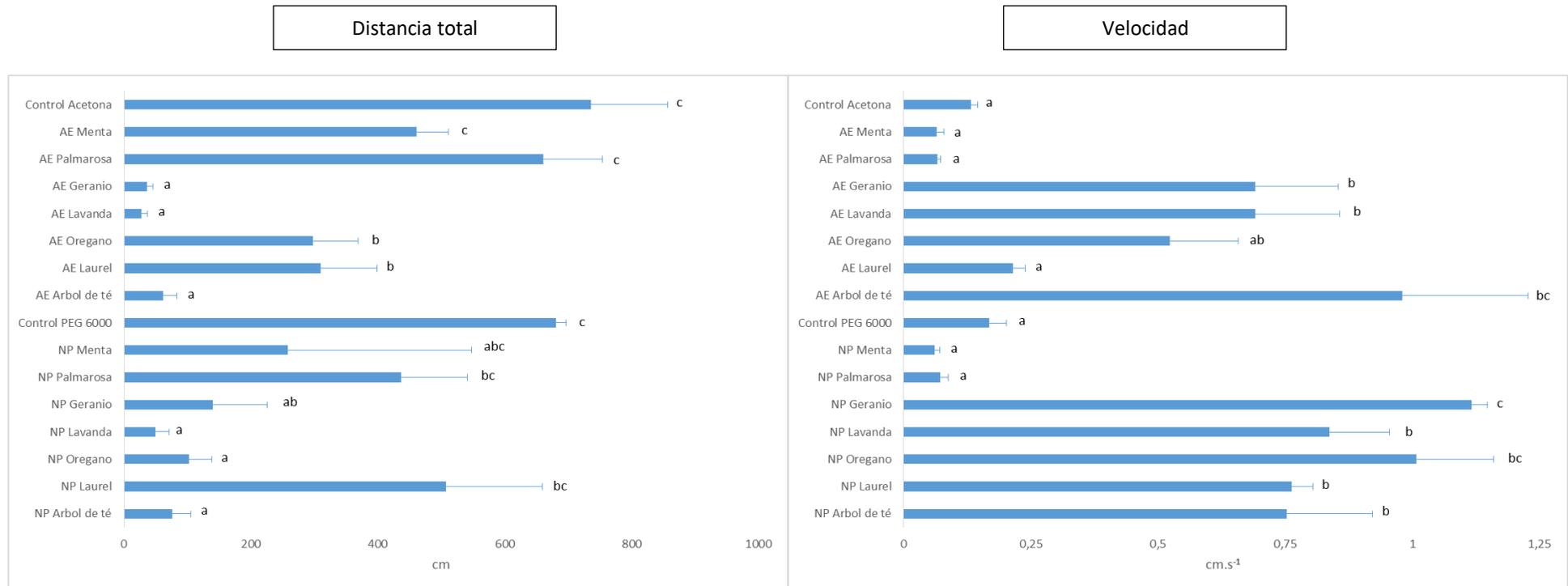
**Lámina 3.5.A.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL<sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de *S. oryzae*. **Tiempo: 0 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).



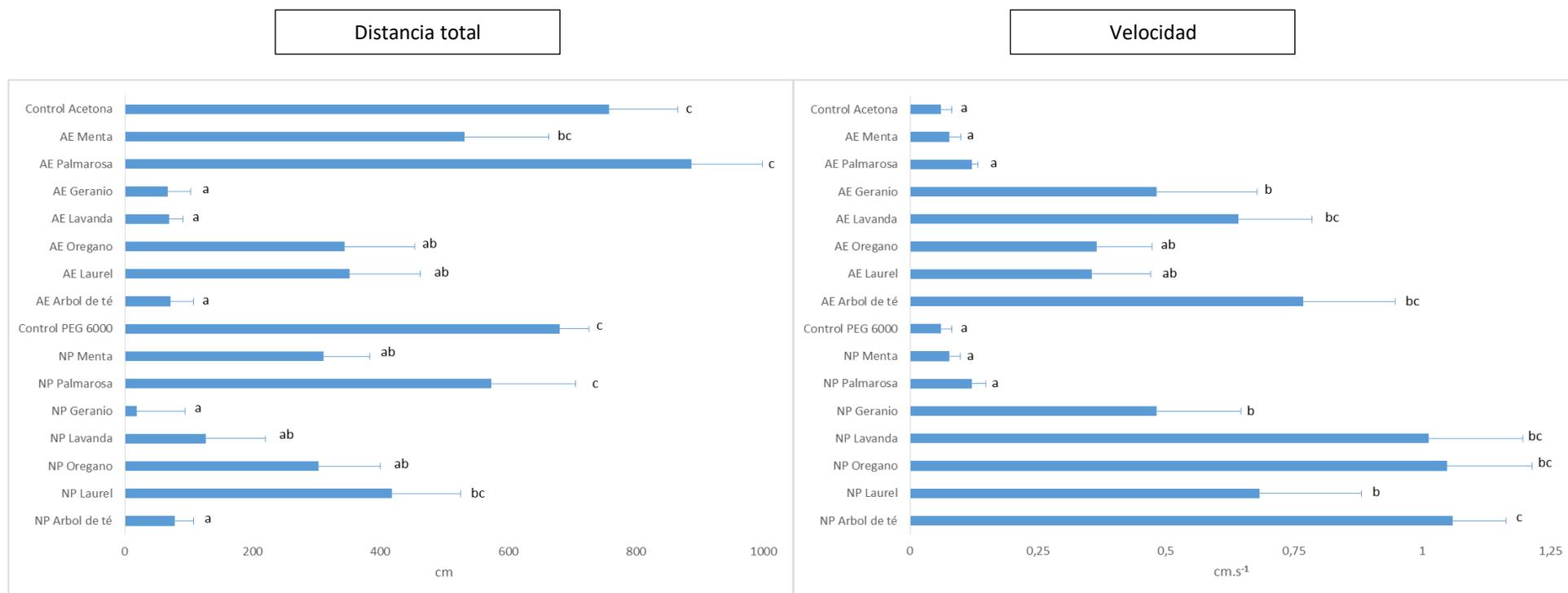
**Lámina 3.5.B.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL<sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de *S. oryzae*. **Tiempo: 12 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).



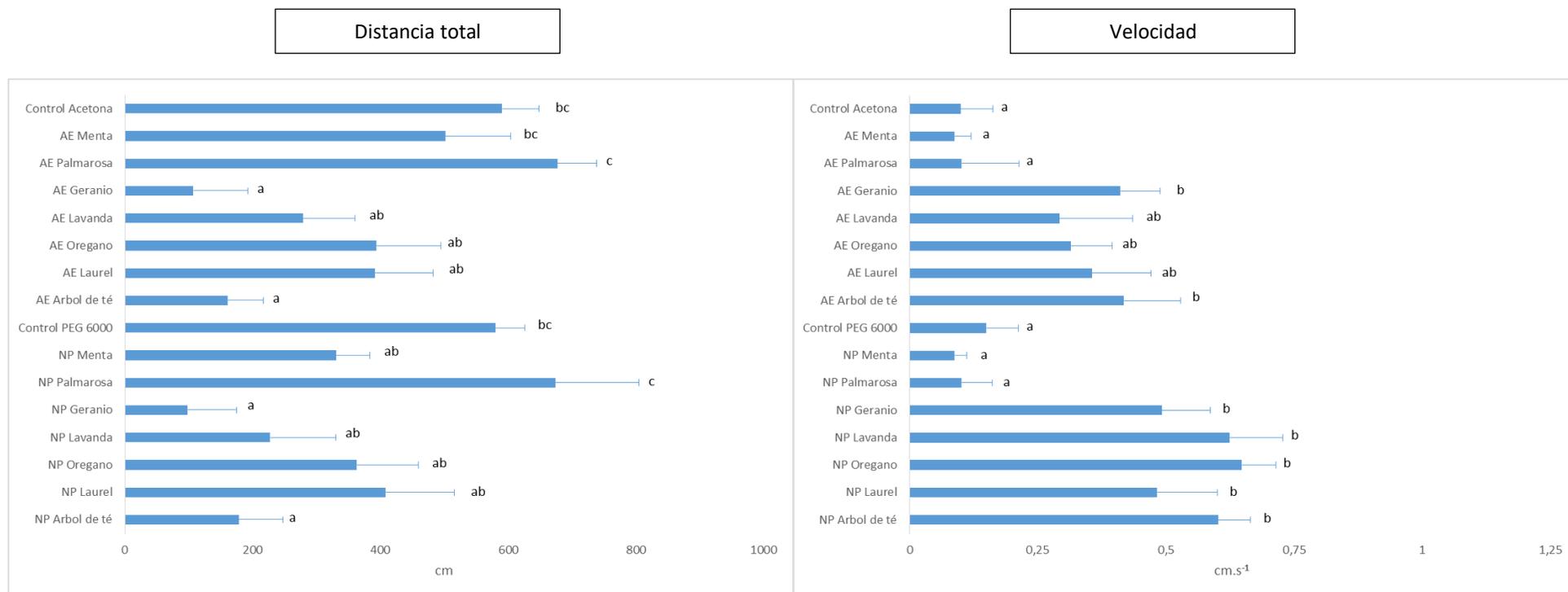
**Lámina 3.5.C.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de  $CL_{50}$  sobre las variables comportamentales de *S. oryzae*. **Tiempo: 24 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS,  $P < 0,05$ ).



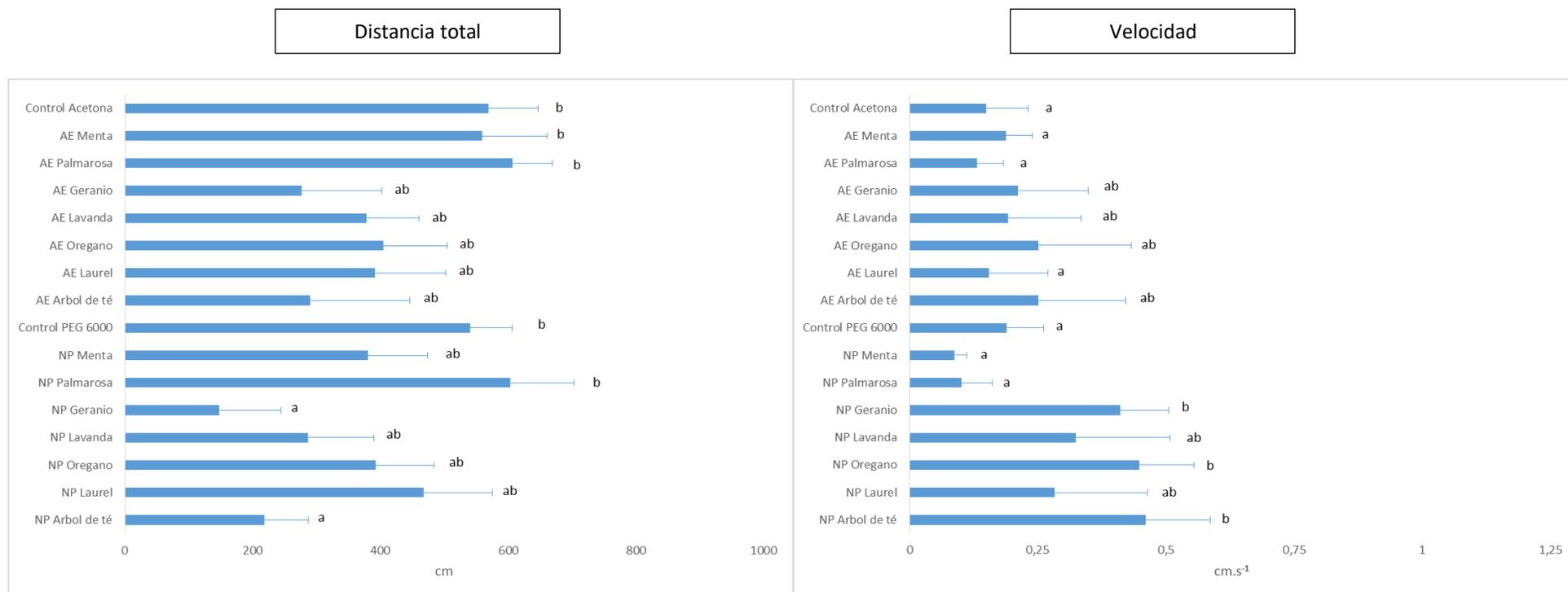
**Lámina 3.5.D.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de  $CL_{50}$  sobre las variables comportamentales de *S. oryzae*. **Tiempo: 36 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS,  $P < 0,05$ ).



**Lámina 3.5.E.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de  $CL_{50}$  sobre las variables comportamentales de *S. oryzae*. **Tiempo: 48 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS,  $P < 0,05$ ).



**Lámina 3.5.F.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de  $CL_{50}$  sobre las variables comportamentales de *S. oryzae*. **Tiempo: 60 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS,  $P < 0,05$ ).



La Tabla 3.1 resume los efectos de los AEs y sus NPs sobre las variables conductuales (distancia total y velocidad) en *S. oryzae*.

**Tabla 3.1.** Resume de los efectos de los AEs y sus NPs sobre las variables conductuales (distancia total y velocidad) en *S. oryzae*. - : sin diferencias significativas respecto a control, ↓ o ↑ : diferencias significativas respecto al control, ↓ o ↑ : diferencias significativas entre aceite libre y sus NPs.

Distancia total														
Tiempo (h)	Menta		Palmarosa		Geranio		Lavanda		Orégano		Laurel		Árbol de té	
	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP
0	-	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
12	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
24	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓
36	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	↓	↓
48	-	-	-	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	↓	↓
60	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓
72	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	↓
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

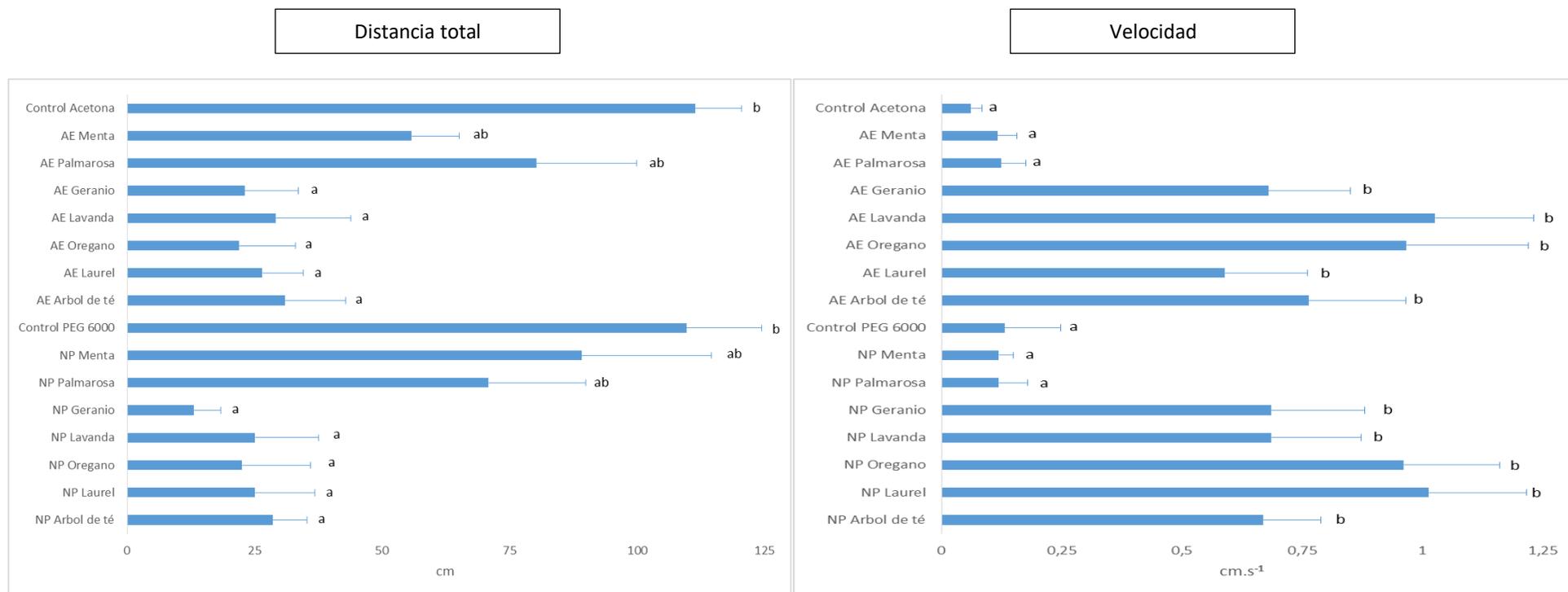
Velocidad														
Tiempo (h)	Menta		Palmarosa		Geranio		Lavanda		Orégano		Laurel		Árbol de té	
	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP
0	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
12	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑
24	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	↑	-	↑	↑	↑
36	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	↑	-	↑	↑	↑
48	-	-	-	-	↑	↑	-	↑	-	↑	-	↑	↑	↑
60	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	↑	-	-	-	↑
72	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	↑	-	-	-	↑
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

En *L. serricornis*, a lo largo del bioensayo, no se encontraron diferencias significativas en la distancia total y la velocidad entre el control de PEG 6000, control de acetona y los AEs de menta y palmarosa y sus NPs ( $P>0,05$ ). Para la distancia total, al tiempo inicial (0 h) y 12 h, los AEs de geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs disminuyeron significativamente esta variable respecto a los controles ( $P<0,05$ ) (Láminas 3.6.A y 3.6.B). A las 24 h, este efecto fue corroborado para los AEs geranio, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.6.C). Desde las 36 h hasta las 72 h, únicamente por las NPs de geranio produjeron una reducción en esta variable ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.6.D).

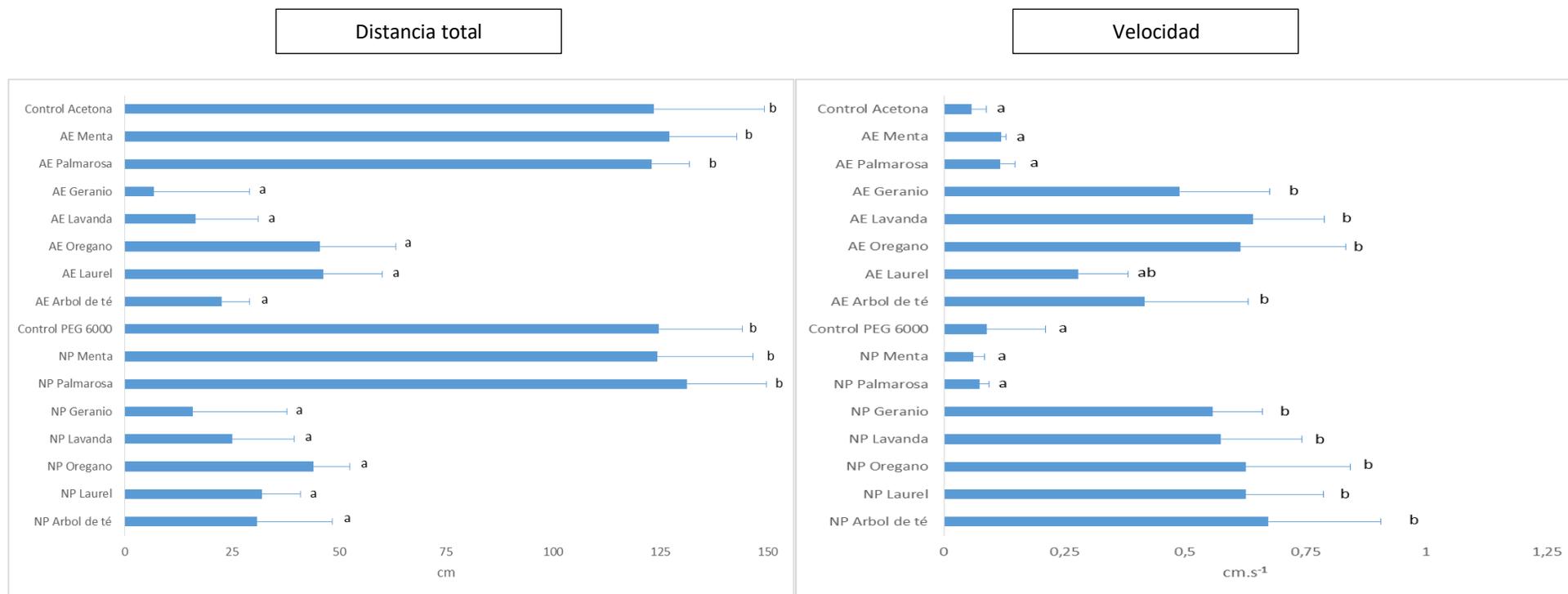
Para la velocidad, al tiempo inicial (0 h), se observó que los AEs de geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs aumentaron significativamente esta variable en comparación con los controles ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.6.A). A las 12 y 24 h, estos tratamientos (con excepción de los aceites de orégano y laurel) mantuvieron el efecto mencionado ( $P<0,05$ ) (Láminas 3.6.B y 3.6.C). A las 36 h, únicamente las NPs de lavanda, orégano y árbol de té aumentaron significativamente la velocidad ( $P<0,05$ ) (Lámina 3.6.D), mientras que a las 48 h, solo las NPs de orégano incrementaron esta variable ( $P<0,05$ ).

Cabe destacar que a partir de las 60 y 84 h no se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos para ambas variables ( $P>0,05$ ).

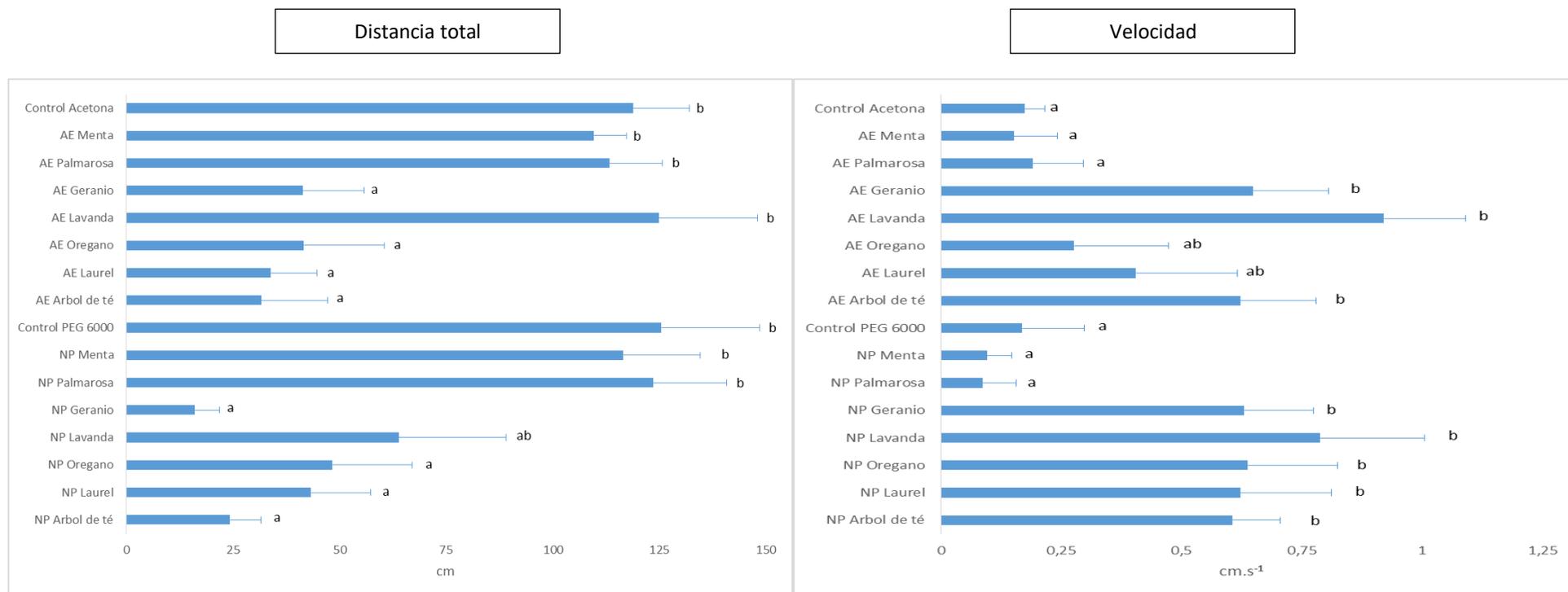
**Lámina 3.6.A.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL<sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de *L. serricorne*. **Tiempo: 0 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).



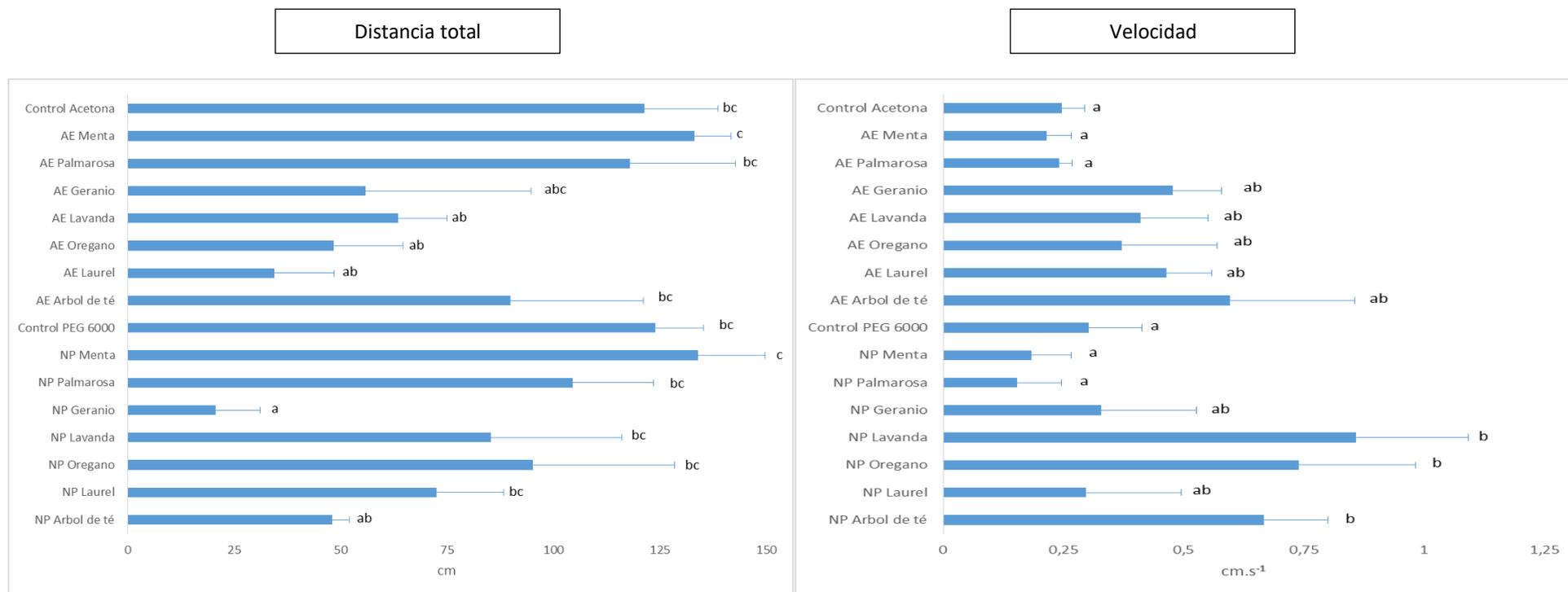
**Lámina 3.6.B.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL<sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de *L. serricorne*. **Tiempo: 12 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).



**Lámina 3.6.C.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de CL<sub>50</sub> sobre las variables comportamentales de *L. serricorne*. **Tiempo: 24 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).



**Lámina 3.6.D.** Efecto de los AEs y sus NPs a valores de  $CL_{50}$  sobre las variables comportamentales de *L. serricorne*. **Tiempo: 36 h.** Distintas letras indican diferencias significativas (DMS,  $P < 0,05$ ).



La Tabla 3.2 resume los efectos de los AEs y sus NPs sobre las variables conductuales (distancia total y velocidad) en *L. serricorne*.

**Tabla 3.2.** Resume de los efectos de los AEs y sus NPs sobre las variables conductuales (distancia total y velocidad) en *L. serricorne*. - : sin diferencias significativas respecto a control, ↓ o ↓↓: diferencias significativas respecto al control, ↓ o ↓↓: diferencias significativas entre aceite libre y sus NPs.

Distancia total														
Tiempo (h)	Menta		Palmarosa		Geranio		Lavanda		Orégano		Laurel		Árbol de té	
	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP
0	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
12	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
24	-	-	-	-	↓	↓	-	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓
36	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Velocidad														
Tiempo (h)	Menta		Palmarosa		Geranio		Lavanda		Orégano		Laurel		Árbol de té	
	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP	AE	NP
0	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
12	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑	↑
24	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	↑	-	↑	↑	↑
36	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	-	-	↑
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.C.2. Efectos en la fisiología nutricional

Las Tablas 3.3 y 3.4 muestran los efectos de los AEs y sus NPs en la fisiología nutricional de adultos de *S. oryzae* y larvas de *L. serricorne*. En ninguno de los dos insectos se observó mortalidad luego de 72 h de exposición para cualquiera de los bioensayos.

En adultos de *S. oryzae*, a la dosis de 1 mg/disco, el control PEG solo disminuyó significativamente la tasa relativa de consumo (TRC) respecto al control harina ( $P < 0,05$ ). Respecto a este último control, en los bioensayos agudos (tiempo de evaporación 15 minutos) se observó que los AEs de palmarosa, orégano y árbol de té disminuyeron significativamente los valores de la tasa de crecimiento relativa (TCR) y la eficiencia de conversión del alimento ingerido (ECAI) ( $P < 0,05$ ). Además, en este bioensayo, los AEs de geranio y laurel redujeron significativamente los valores de TCR mientras que el AE de lavanda, los aumentaron ( $P < 0,05$ ). En cuanto al índice TRC, los AEs de palmarosa, geranio y árbol de té disminuyeron significativamente sus valores, mientras que los AEs de lavanda y laurel, los aumentaron ( $P < 0,05$ ).

A dosis de 1 mg/disco, las NPs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, laurel y árbol de té disminuyeron significativamente los valores de TCR y ECAI respecto al control PEG ( $P < 0,05$ ). En relación al índice TRC, las NPs de geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té aumentaron significativamente sus valores ( $P < 0,05$ ). Respecto al bioensayo residual (tiempo de evaporación 18 h), los AEs de menta, palmarosa, orégano y laurel aumentaron significativamente todos los índices nutricionales ( $P < 0,05$ ). En este bioensayo se registró además que el AE de geranio incrementó los valores de TCR y ECAI, el de lavanda, los valores de TRC, y el AE de árbol de té, los correspondientes a los índices de TCR y TRC ( $P < 0,05$ ).

Cabe resaltar que a esta dosis, en general, las NPs tuvieron un efecto de mayor magnitud en las variables TCR y ECAI al compararlas con los AEs, en los bioensayos agudos y residuales.

Teniendo en cuenta los valores de IF, a 1 mg/disco, todas las NPs tuvieron efectos fagoestimulantes, las NPs de menta indujeron efectos ligeros mientras que el resto, altamente fagoestimulantes. En cuanto a los bioensayos agudos, los AEs de lavanda y laurel fueron ligeramente fagoestimulantes mientras que los AEs de palmarosa y orégano, ligeramente fagodisuasivos. Además, los AEs de geranio y árbol de té produjeron efectos moderadamente fagodisuasivos. Por último, en los bioensayos residuales, a excepción del AE de geranio que fue ligeramente fagodisuasivo, todos fueron fagoestimulantes, concretamente, el AE de menta fue altamente fagoestimulante mientras que el resto de los aceites tuvieron efectos moderados (Tabla 3.3).

En *S. oryzae*, a la dosis de 4 mg/disco, el control de PEG disminuyó significativamente los índices nutricionales respecto al control harina ( $P < 0,05$ ). En el caso del bioensayo agudo y en comparación con el control harina, los AEs de palmarosa, geranio, lavanda, orégano y laurel disminuyeron significativamente las variables TCR y TRC ( $P < 0,05$ ); para los dos primeros aceites, el índice ECAI no fue calculado dado que en varias réplicas los insectos no ingirieron alimento durante el experimento. Además, los AEs de menta y árbol de té redujeron las variables TCR y ECAI, mientras que el AE de orégano aumentó significativamente el valor de ECAI ( $P < 0,05$ ).

Asimismo, a 4 mg/disco, las NPs de menta, palmarosa, geranio, lavanda y orégano disminuyeron significativamente todos los índices en comparación con el control de PEG ( $P < 0,05$ ). En el caso de las NPs de árbol de té, se observó que disminuyeron significativamente los índices TCR y ECAI, y aumentaron los valores de TRC ( $P < 0,05$ ). En cuanto a los bioensayos residuales, los AEs de menta, palmarosa y orégano aumentaron significativamente los índices TCR, TRC y ECAI ( $P < 0,05$ ). Además, los AEs de lavanda y laurel aumentaron significativamente las variables TCR y TRC, mientras que disminuyeron la ECAI ( $P < 0,05$ ). El AE de orégano aumentó significativamente los índices TCR y ECAI ( $P < 0,05$ ). Por último, el AE de árbol de té aumentó significativamente el valor de TRC y disminuyó los de ECAI ( $P < 0,05$ ).

Es importante resaltar que, en general, las NPs tuvieron un mayor efecto en los tres índices nutricionales que los AEs en sus bioensayos agudos y residuales.

Teniendo en cuenta los valores de IF, a 4 mg/disco, las NPs de menta, palmarosa, geranio, lavanda y orégano fueron fagodisuasivas. Específicamente, las NPs de menta, palmarosa y geranio fueron moderadamente fagodisuasivas, las NPs de lavanda y laurel ligeramente fagodisuasivos, mientras que las NPs orégano altamente fagodisuasivas. En cuanto al bioensayo agudo, el AE de orégano tuvo efectos altamente fagodisuasivos, mientras que los AEs de lavanda y laurel, fagodisuasivos moderados. Por último, en los bioensayos residuales, los AEs de palmarosa y geranio tuvieron efectos moderadamente fagodisuasivos, mientras que el AE de orégano fue altamente fagodisuasivo. En el caso de los AEs de lavanda, laurel y árbol de té indujeron efectos ligeramente fagoestimulantes (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Índices nutricionales y efecto fagodisuaviso de los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs en adultos de *S. oryzae* (AE libre agudo: tiempo de evaporación 15 min; AE libre residual: tiempo de evaporación 18 h; NPs: tiempo de evaporación 18 h).

Dosis	Tratamiento	TCR <sup>a</sup>		TRC <sup>b</sup>		ECAI <sup>c</sup> %		IF <sup>d</sup>	
1 mg/disco	Control harina	0,026	ef	0,660	de	-0,028	hi		
	Control PEG	0,001	e	0,259	a	5,208	i		
	AE Menta agudo	0,052	f	0,696	e	7,222	i	10,345	N
	AE Palmarosa agudo	-0,141	c	0,419	c	-39,935	de	-31,034	L-FD
	AE Geranio agudo	-0,060	d	0,297	ab	-12,506	gh	-62,069	M-FD
	AE Lavanda agudo	0,079	g	0,943	h	8,513	i	43,103	L-FE
	AE Orégano agudo	-0,080	d	0,502	cd	-131,696	a	-29,310	L-FD
	AE Laurel agudo	-0,060	d	0,860	fg	-6,944	h	24,138	L-FE
	AE Árbol de te agudo	-0,091	d	0,351	c	-32,5	f	-46,552	M-FD
	AE Menta residual	0,164	j	1,186	j	13,892	j	75,862	A-FE
	AE Palmarosa residual	0,162	j	1,205	j	13,762	j	67,241	M-FE
	AE Geranio residual	0,114	h	0,590	d	14,364	j	-15,517	L-FD
	AE Lavanda residual	0,070	f	0,891	g	7,472	i	56,897	M-FE
	AE Orégano residual	0,218	k	1,041	i	21,675	k	55,172	M-FE
	AE Laurel residual	0,138	i	0,965	h	14,247	j	44,828	M-FE
	AE Árbol de te residual	0,105	h	1,053	i	10,016	i	72,414	M-FE
	NPs Menta	-0,254	b	0,299	ab	-103,138	b	28,571	L-FE

	NPs Palmarosa	-0,148	c	0,389	bd	-40,476	d	85,714	A-FE
	NPs Geranio	-0,162	c	0,480	cd	-48,269	c	114,286	A-FE
	NPs Lavanda	-0,307	a	0,804	f	-38,716	e	223,810	A-FE
	NPs Orégano	-0,007	e	0,487	cd	-1,407	hi	128,571	A-FE
	NPs Laurel	-0,297	a	0,807	f	-39,256	e	224,480	A-FE
	NPs Árbol de té	-0,094	d	0,873	fg	-13,153	g	285,714	A-FE
4 mg/disco	Control harina	0,080	g	0,762	h	18,719	k		
	Control PEG	0,002	f	0,259	f	5,208	h		
	AE Menta agudo	0,015	f	0,757	h	1,183	g	-10,667	N
	AE Palmarosa agudo	-0,307	a	0,011	b	-		-98,667	A-FD
	AE Geranio agudo	-0,240	c	0,019	b	-		-97,333	A-FD
	AE Lavanda agudo	0,023	f	0,248	f	10,169	hijk	-48,333	M-FD
	AE Orégano agudo	-0,219	c	-0,147	a	98,750	l	-117,333	A-FD
	AE Laurel agudo	0,024	f	0,253	f	12,500	hijk	-69,333	M-FD
	AE Árbol de te agudo	-0,027	e	0,768	h	-4,167	e	6,667	N
	AE Menta residual	0,251	i	0,899	i	28,102	l	5,333	N
	AE Palmarosa residual	-0,130	d	0,365	g	-17,68	e	-54,667	M-FD
	AE Geranio residual	-0,014	ef	0,415	g	-5	f	-53,333	M-FD
	AE Lavanda residual	0,096	h	0,957	i	10,100	j	20,000	L-FE
	AE Orégano residual	-0,001	ef	0,205	d	6,250	h	-76,000	A-FD
	AE Laurel residual	-0,001	h	0,205	k	9,464	i	29,333	L-FE

AE Árbol de te residual	0,104	gh	1,111	j	8,700	hi	24,000	L-FE
NPs Menta	-0,267	b	0,123	d	-197,619	a	-67,647	M-FD
NPs Palmarosa	-0,270	b	0,152	d	-195,833	a	-58,824	M-FD
NPs Geranio	-0,118	d	0,158	d	-77,500	c	-55,882	M-FD
NPs Lavanda	-0,234	c	0,207	e	-116,429	b	-41,176	L-FD
NPs Orégano	-0,128	d	0,055	c	-133,333	b	-85,294	A-FD
NPs Laurel	-0,229	c	0,202	e	-110,504	b	-39,287	L-FD
NPs Árbol de té	-0,215	c	0,387	g	-60,000	d	11,765	N

<sup>a</sup> TCR: tasa de crecimiento relativo; <sup>b</sup> TRC: tasa relativa de consumo; <sup>c</sup> ECAI: eficiencia de conversión del alimento ingerido; <sup>d</sup> IF: índice fagodisuasivo (N: neutral, L-FD: ligeramente fagodisuasivo, M-FD: moderadamente fagodisuasivo, A-FD: altamente fagodisuasivo, L-FE: ligeramente fagoestimulante, M-FE: moderadamente fagoestimulante, A-FE: altamente fagoestimulante). Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).

En larvas de *L. serricorne*, a las dosis de 1 mg/disco, el control PEG aumentó significativamente la variable TRC y disminuyó la ECAI respecto al control harina ( $P<0,05$ ). Respecto a este último, en los bioensayos agudos, los AEs de lavanda y árbol de té aumentaron significativamente los valores de TRC, mientras que el AE de laurel, incrementó los valores de ECAI ( $P<0,05$ ). Los AEs de menta y palmarosa aumentaron significativamente el índice TRC y disminuyeron el índice ECAI ( $P<0,05$ ). Además, el AE de palmarosa disminuyó significativamente el valor de TCR ( $P<0,05$ ). Por último, los AEs de geranio y orégano disminuyeron significativamente los índices TCR y TRC, a la vez a que el AE de orégano también disminuyó el valor de ECAI ( $P<0,05$ ). En el caso del aceite de geranio, el índice ECAI no fue calculado dado que la ingesta de alimento en varias réplicas fue nula.

En comparación con el control de PEG, las NPs de menta, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té disminuyeron significativamente los tres índices nutricionales ( $P<0,05$ ). En el caso de las NPs de palmarosa, se observó una disminución significativa de los índices TRC y ECAI ( $P<0,05$ ). En cuanto a los bioensayos residuales, los AEs de menta, palmarosa, lavanda, laurel y árbol de té aumentaron significativamente los índices TCR y TRC. Además, los primeros cuatro aceites incrementaron la ECAI ( $P<0,05$ ), mientras que los AEs de orégano disminuyó las variables ( $P<0,05$ ). A su vez, el AE de geranio redujo significativamente las variables TRC y ECAI ( $P<0,05$ ). En términos generales, las NPs promovieron un mayor efecto que los AEs (bioensayo agudo y residual) al disminuir los tres índices nutricionales.

Teniendo en cuenta los valores de IF, a 1 mg/disco, las NPs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano y árbol de té fueron fagodisuasivas. Específicamente, las NPs de árbol de té fueron altamente fagodisuasivas mientras que las NP de palmarosa, geranio y orégano moderadamente fagodisuasivas. Además, las NPs de menta y lavanda tuvieron efectos ligeramente fagodisuasivos. En el caso de los bioensayos con AEs agudos, el AE de orégano fue el único fagodisuasivos, concretamente con efectos moderados. Los AEs de menta, lavanda, laurel y árbol de té fueron fagoestimulantes. En particular, los AEs de menta y lavanda fueron

altamente fagoestimulantes, mientras que los AEs de laurel y árbol de té ligero y moderadamente fagoestimulantes. En los bioensayos de AEs residuales, los AEs de menta, palmarosa, geranio y lavanda fueron altamente fagoestimulantes mientras que los AEs de laurel y árbol de té, moderadamente fagoestimulantes. Por último, el AE de orégano tuvo efectos ligeramente fagodisuasivos (Tabla 3.4).

A la dosis de 4 mg/disco, el control PEG disminuyó significativamente la variable TRC y aumentó el índice ECAI respecto al control harina ( $P < 0,05$ ). En el caso de los bioensayos agudos, los aceites de menta, palmarosa, lavanda y árbol de té aumentaron significativamente los valores de TCR y ECAI, mientras que disminuyeron TRC ( $P < 0,05$ ). El AE orégano disminuyó significativamente los tres índices nutricionales, mientras que el AE de geranio solo disminuyó TCR y TRC ( $P < 0,05$ ). Al igual que a la dosis anterior, para el AE de geranio el índice ECAI no pudo ser calculado. Por último, el AE de laurel aumentó significativamente el valor de TCR y disminuyó el de TRC ( $P < 0,05$ ).

En comparación con el control de PEG, las NPs de menta, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té disminuyeron significativamente los tres índices nutricionales ( $P < 0,05$ ). Para las NPs de palmarosa se observó únicamente una disminución significativa de TRC ( $P < 0,05$ ). En cuanto a los bioensayos residuales, los AEs de menta, geranio, lavanda y laurel aumentaron significativamente los índices TCR y ECAI mientras que disminuyeron TRC ( $P < 0,05$ ). El AE de palmarosa aumentó significativamente los tres índices nutricionales, mientras que el AE de orégano, los disminuyó ( $P < 0,05$ ). El AE de árbol de té aumentó significativamente el valor de TCR y redujo el de TRC y ECAI ( $P < 0,05$ ).

Al igual que lo observado en la dosis de 1 mg/disco, la magnitud del efecto de las NPs sobre los tres índices nutricionales fue mayor que la promovida por los AEs libres (bioensayos agudo y residual).

Teniendo en cuenta los valores de IF, todas las NPs fueron fagodisuasivas, concretamente las NPs de menta fueron ligeramente fagodiasuasivas mientras que las NPs de geranio y orégano resultaron altamente fagodisuadivas. El resto de NPs tuvieron efectos moderadamente fagodisuasivos. En cuanto los bioensayos agudos, el AE de lavanda tuvo efecto ligeramente fagodisuasivo, los AEs de palmarosa, orégano, laurel y árbol de té, fueron moderadamente fagodisuasivos, y el AE de geranio, generó actividad altamente fagodisuasiva. Para los bioensayos residuales se observó que, el AE de palmarosa fue ligeramente fagoestimulante, mientras que los aceites de lavanda y laurel, tuvieron efectos ligeramente fagodisuasivos. Por otra parte, los AEs de orégano y árbol de té fueron moderadamente fagodisuasivos mientras que el AE de geranio, altamente fagodisuasivo (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Índices nutricionales y efecto fagodisuaviso de los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs en larvas de *L. serricorne* (AE libre agudo: tiempo de evaporación 15 min; AE libre residual: tiempo de evaporación 18 h; NP: tiempo de evaporación 18 h).

Dosis	Tratamiento	TCR <sup>a</sup>		TRC <sup>b</sup>		ECAI <sup>c</sup> %		IF <sup>d</sup>	
1 mg/disco	Control harina	0,057	h	0,189	g	33,333	h		
	Control PEG	0,035	h	0,273	h	13,393	f		
	AE Menta agudo	0,063	h	0,289	hi	20,754	g	141,176	A-FE
	AE Palmarosa agudo	-0,121	e	0,128	e	-147,500	c	-5,881	N
	AE Geranio agudo	-0,144	e	0,027	a	-		-87,500	A-FD
	AE Lavanda agudo	0,110	h	0,297	i	35,893	hi	94,118	A-FE
	AE Orégano agudo	-0,290	b	0,125	de	-250,000	b	-64,706	M-FD
	AE Laurel agudo	0,127	h	0,240	gh	42,639	i	17,647	L-FE
	AE Árbol de té agudo	0,124	h	0,266	h	43,452	hij	58,824	M-FE
	AE Menta residual	0,227	i	0,563	j	40,278	i	264,706	A-FE
	AE Palmarosa residual	0,365	j	0,647	k	53,914	j	217,647	A-FE
	AE Geranio residual	0,002	gh	0,081	c	-8,333	e	-87,037	A-FD
	AE Lavanda residual	0,220	i	0,559	j	38,372	i	249,807	A-FE
	AE Orégano residual	-0,045	g	0,066	c	-127,083	cd	-41,176	L-FD
	AE Laurel residual	0,201	i	0,270	h	30,252	h	45,516	M-FE
	AE Árbol de té residual	0,210	i	0,275	h	-277,083	b	48,432	M-FE
	NPs Menta	-0,181	c	0,127	ef	-194,792	b	-19,167	L-FD

	NPs Palmarosa	0,052	h	0,088	d	62,500	j	-58,883	M-FD
	NPs Geranio	-0,029	g	0,127	e	-25,000	e	-62,500	M-FD
	NPs Lavanda	-0,352	a	0,160	f	-222,917	b	-41,667	L-FD
	NPs Orégano	-0,159	de	0,081	cd	-420,833	a	-50,000	M-FD
	NPs Laurel	-0,102	ef	0,172	fg	-104,196	cd	-8,333	N
	NPs Árbol de té	-0,246	c	0,084	cd	-500,000	a	-66,667	M-FD
4 mg/disco	Control harina	0,024	g	0,663	k	3,590	f		
	Control PEG	0,035	gh	0,273	g	13,393	g		
	AE Menta agudo	0,143	ij	0,444	i	31,657	gh	-1,818	N
	AE Palmarosa agudo	0,132	i	0,265	g	39,167	hi	-74,545	M-FD
	AE Geranio agudo	-0,273	a	0,035	b	-		-78,571	A-FD
	AE Lavanda agudo	0,197	j	0,369	h	50,016	i	-20,000	L-FD
	AE Orégano agudo	-0,005	f	0,324	gh	-7,440	e	-67,273	M-FD
	AE Laurel agudo	0,065	hi	0,330	h	14,167	fg	-47,273	M-FD
	AE Árbol de té agudo	0,108	i	0,305	gh	33,333	h	-45,455	M-FD
	AE Menta residual	0,251	k	0,557	j	38,644	hi	10,909	N
	AE Palmarosa residual	0,472	l	0,866	l	47,379	i	23,636	L-FE
	AE Geranio residual	0,049	h	0,045	c	75,008	j	-94,545	A-FD
	AE Lavanda residual	0,184	j	0,331	gh	46,633	i	-22,545	L-FD
	AE Orégano residual	-0,139	d	0,118	e	-117,500	c	-69,091	M-FD
	AE Laurel residual	0,205	j	0,322	gh	44,434	i	-26,364	L-FD

AE Árbol de té residual	-0,080	e	0,156	f	-62,500	d	-72,727	M-FD
NPs Menta	-0,187	c	0,130	ef	-195,833	b	-16,667	L-FD
NPs Palmarosa	0,031	gh	0,121	e	22,500	gh	-50,000	M-FD
NPs Geranio	-0,082	e	0,071	d	-260,000	a	-75,333	A-FD
NPs Lavanda	-0,144	d	0,092	d	-178,750	b	-53,333	M-FD
NPs Orégano	-0,132	d	0,044	bc	-275,000	a	-83,333	A-FD
NPs Laurel	-0,209	b	0,074	d	-327,083	a	-60,000	M-FD
NPs Árbol de té	0,101	e	0,141	ef	-76,667	d	-50,000	M-FD

<sup>a</sup> TCR: tasa de crecimiento relativo; <sup>b</sup> TRC: tasa relativa de consumo; <sup>c</sup> ECAI: eficiencia de conversión del alimento ingerido; <sup>d</sup> IF: índice Fagodisuasivo fagodisuasivo (N: neutral, L-FD: ligeramente fagodisuasivo, M-FD: moderadamente fagodisuasivo, A-FD: altamente fagodisuasivo, L-FE: ligeramente fagoestimulante, M-FE: moderadamente fagoestimulante, A-FE: altamente fagoestimulante). Distintas letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (DMS, P<0,05).

### 3. D. Discusión

En líneas generales, a pesar de que la actividad de los insecticidas se evalúa a través de su toxicidad aguda, los efectos de los mismos a concentraciones subletales o letales pero en cortos intervalos de tiempo no pueden desestimarse por la implicancia biológica que estos tienen sobre los insectos plaga. Consecuentemente, en el presente capítulo se estudiaron los efectos subletales de los AEs y sus NPs en *S. oryzae* y *L. serricornis* analizando su actividad repelente, las variaciones conductuales y sus efectos en la fisiología nutricional.

Los resultados obtenidos demostraron que los AEs produjeron efectos repelentes entre las 12 y 36 h en adultos de *S. oryzae* y *L. serricornis*. La duración de la actividad varió según el tipo de aceite. De esta forma, y en términos generales, los AEs de lavanda y laurel fueron los que indujeron repelencia por menos tiempo, seguido de los aceites de geranio y árbol de té. Los efectos de mayor duración se observaron con los AEs de orégano, palmarosa y menta. Estudios previos ya habían demostrado que algunos de estos aceites generaron repelencia en *S. oryzae*, aunque la duración de dicho efecto fue variable. Por ejemplo, el AE de geranio fue repelente por 24 h mientras que los AEs de menta y árbol de té, mostraron repelencia por 28 h (Abdel-Fattah y Boraie, 2017; Al-Harbi et al., 2021; Seada et al., 2016). Para los aceites de orégano y lavanda, se observó actividad repelente en *S. oryzae* por 48 h (Al-Harbi et al., 2021; La Pergola et al., 2017). En *L. serricornis*, los datos encontrados en la literatura sobre la duración de efecto repelente de los AEs son escasos. Por ejemplo, se había reportado que el aceite de menta fue repelente entre las 4 y 24 h de exposición (Pang et al., 2020; Salem et al., 2017), mientras que el AE de laurel, entre las 2 y 4 h post-exposición (Wang et al., 2019b). Por otro lado, varios autores demostraron una extensa actividad repelente de los AEs, hasta las 48 y 72 h inclusive, en diversos insectos plaga de productos almacenados tales como *A. obtectus*, *Alphitobius diaperinus* (Panzer), *B. tabaci* y *T. confusum* (Cagáñ et al., 2022; Huseein et al., 2017; Palermo et al., 2021; Wang et al., 2014).

Como se ha mencionado, la baja estabilidad de los AEs es una limitante en términos de protección a largo plazo. En la actualidad, para resolver este problema, la nanoencapsulación de los aceites son estrategias con un gran potencial en el sector agroalimentario. Es importante señalar que, en nuestro estudio, las NPs de PEG 6000 extendieron la actividad repelente de los AEs en ambas especies. Específicamente, las NPs de lavanda y laurel extendieron sus efectos entre 24 y 48 h; las NPs de geranio y árbol de té entre las 48 y 60 h, y las de orégano, palmarosa y menta entre las 60 y 72 h. En otros estudios previos del grupo de trabajo se obtuvieron resultados similares trabajando con este tipo de nanopartículas. Por ejemplo, se observó que los AEs de bergamota y geranio producían efecto repelente durante 6 h en adultos de *B. germánica* mientras que sus NPs extendían el efecto hasta las 72 y 144 h (Werdin González et al., 2016). Igualmente, se reportó que los AEs de menta y palmarosa eran repelentes para el mismo insecto durante las primeras 12 h y 36 h y que sus NPs prolongaban los efectos hasta las 36 y 72 h, respectivamente (Yeguerman et al., 2020). Probablemente, las NPs evitan la evaporación rápida de los AEs, potenciando sus efectos repelentes. Además, el alto peso molecular del PEG utilizado en este trabajo podría explicar los resultados hallados. Según Rai et al. (2019), al aumentar el peso molecular del PEG para encapsular compuestos bioactivos, se reduce su tasa de difusión, permitiendo una liberación controlada de los mismos.

En general, existe abundante información sobre la actividad repelente de los AEs; sin embargo, son pocos los estudios que abordan el análisis de los efectos de estos productos en los patrones de conducta, y mucho menos, los referidos a sus nanoformulaciones.

En el presente trabajo se observó que, de forma general, los AEs de geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs alteraron los patrones de movilidad de adultos de *S. oryzae* y *L. serricornis* disminuyendo la variable distancia total y aumentando la velocidad. Al analizar el efecto de los aceites esenciales en las respuestas conductuales a lo largo del tiempo en *S. oryzae*, se observó que los aceites de geranio, árbol de té y lavanda fueron los que tuvieron mayor incidencia sobre las variables comportamentales. Los dos primeros primeros, disminuyeron la

distancia total y aumentaron la velocidad por 48 y 36 h, respectivamente, mientras que el AE de lavanda, por 36 h. En *L. serricorne*, la modificación de las variables conductuales fue marcadamente menor que para *S. oryzae*, registrándose alteraciones durante las primeras 24 h. Concretamente, los AEs de geranio, orégano y laurel disminuyeron la distancia total mientras que los de geranio, lavanda y árbol de té, aumentaron la velocidad. La variedad de respuestas conductuales observadas entre las especies, respecto al tipo de tratamiento como la duración del efecto, podrían deberse a las diferencias interespecíficas en la detección, integración y respuesta frente a estos estímulos químicos.

Las alteraciones en las variables conductuales, específicamente en la distancia total y velocidad podrían ser resultado de la acción neurotóxica de los AEs, que estimulan o reducen la movilidad de los insectos luego de que estos son detectados (Bulgarini et al., 2021, de Andrade Brito et al., 2021; Vélez et al., 2019). Concretamente, según Plata-Rueda et al. (2022), las alteraciones en la actividad locomotora promovida por los aceites son resultado de su efecto de bloqueo de transmisión neuronal. Por lo tanto, los AEs pueden causar hiperactividad seguido de un estado de aletargamiento que podría traducirse en una disminución de la distancia recorrida por el insecto y un aumento en su velocidad. Además, los AEs podrían alterar la percepción espacial de estos organismos afectando los patrones comportamentales (Brügger et al., 2019; Plata-Rueda et al., 2020; Renoz et al., 2022). Varios estudios han demostrado el potencial de los AEs para alterar las respuestas conductuales de insectos plaga; por ejemplo, el AE de palmarosa y sus componentes mayoritarios disminuyeron la distancia total en *S. granarius*, *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) y *Podisus nigrispinus* (Say) (Brügger et al., 2019, 2021; Plata-Rueda et al., 2020 a, b). Por otra parte, en *S. zeamais*, se ha observado que los aceites de *S. aromaticum*, *C. zeylanicum*, *Clinopodium nubigenum* (Kunth), *O. basilicum* y *P. hispidinervum* redujeron la distancia total y la velocidad (Correa et al., 2015; de Araújo et al., 2017; Haddi et al., 2015; Romani et al., 2019). Otros autores, mostraron que los AEs de *Myrcia lundiana* (Kiaersk) y *Eplingiella fruticosa* (Salzm.) disminuyeron significativamente distancia total y la velocidad en la

hormiga *Acromyrmex balzani* (Emery) (Melo et al., 2021; Silva et al., 2019b). Asimismo, el AE de *Siparuna guianensis* (Aubl.) disminuyó la distancia total en *Spodoptera frugiperda* (Smith) y *A. gemmatalis* (Lourenço et al., 2018).

En el caso de las NPs, para *S. oryzae* se observó que las elaboradas con los AEs geranio, árbol de té y orégano fueron las que indujeron alteraciones comportamentales por más tiempo, extendiendo la bioactividad del aceite por 72 h; las NPs de geranio y árbol de té disminuyeron la distancia total, mientras que estas y las formuladas con el AE de orégano, aumentaron la velocidad. Para el caso de *L. serricornis* se observó que las NPs de geranio y orégano fueron las más efectivas prolongando el efecto de los aceites por 72 y 48 h, respectivamente. Las primeras alteraron la distancia total y las segundas, la velocidad. Estos datos están en concordancia con observaciones previas del presente trabajo que demuestran que la nanoformulación de los AEs puede extender la bioactividad de los mismos.

Un estudio reciente informó que los AEs de menta y palmarosa y sus NPs disminuyeron las variables tiempo en movimiento, tiempo inmóvil y parada de marcha en *B. germanica* (Yeguerman et al., 2020). Además, Rocha et al. (2018) describieron los efectos conductuales del aceite de *P. cablin* y su nanoformulación en hormigas cortadoras *Atta opaciceps* (Borgmeier) y *A. sexdens* (L.) reduciendo la distancia total y velocidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las NPs además de prolongar la actividad repelente de los AEs extienden los efectos conductuales, interfiriendo en la movilidad de los insectos. Por lo tanto, el presente trabajo proporciona una perspectiva actual del potencial de las NPs como estrategia de gestión novedosa en el manejo de plagas y su factibilidad de uso en lugares de almacenamiento y distribución de alimentos con el objetivo de eliminar áreas de refugio y disuadir a los insectos plaga.

A pesar de que las dosis subletales de insecticidas pueden causar la dispersión o alterar el desplazamiento de los insectos plaga de productos almacenados, también los AEs y sus

componentes mayoritarios pueden generar daños en la fisiología nutricional (Plata-Rueda et al., 2022; Rajkumar et al., 2019; Rizzo et al., 2020).

Los estudios sobre los efectos en la fisiología nutricional de los insectos plaga de productos almacenados permiten orientar la búsqueda de nuevas sustancias para el manejo de estos. De esta manera, las variables analizadas pueden ser utilizadas para verificar la influencia tanto de la calidad del alimento ingerido como los efectos en el metabolismo de un nuevo producto de control (Seifi et al, 2016; Rajkumar et al., 2019).

En el caso del índice TCR, este brinda información sobre la ganancia promedio de biomasa del insecto al final del bioensayo, en relación con su peso inicial. El índice TRC representa la cantidad promedio de alimento ingerido durante el ensayo mientras que ECAI, el porcentaje de alimento ingerido que es transformado en nueva biomasa.

En el presente estudio se demostró los AEs y sus NPs alteraron la fisiología nutricional de adultos de *S. oryzae* y larvas de *L. serricorne*. En *S. oryzae*, a 1 mg/disco, el bioensayo agudo de los AEs de palmarosa, geranio, orégano y árbol de té tuvieron efectos fagodisuasivos; estos aceites limitaron el crecimiento de los insectos (disminución de la variable TCR) que podría estar en relación tanto a una menor ingesta de alimento (disminución de índice TRC, salvo el AE de orégano) como a un efecto tóxico postingesta generando una reducción en la bioconversión del alimento en biomasa de animal (disminución del valor de ECAI, a excepción el AE de geranio).

En línea con lo planteado, otros autores indican que la reducción de los índices nutricionales denota ausencia de producción de nueva biomasa, resultando en un consumo por debajo del nivel mínimo necesario para la supervivencia y haciendo susceptible a los insectos a enfermedades y enemigos naturales (Lima et al., 2020, Nawrot y Harmatha, 2012; Parra et al., 2012). Por otra parte, a esta dosis (1mg/disco), los aceites de lavanda y laurel fueron ligeramente fagoestimulantes; en el caso del primero, los tres índices aumentaron respecto al control,

mientras que para el AE de laurel se observó una disminución del valor de TCR que podría estar en relación con la caída del valor de ECAI (aunque no significativa).

A dosis de 4 mg/disco, los AEs de palmarosa, geranio, lavanda, orégano y laurel tuvieron efectos fagodisuasivos y disminuyeron tanto la tasa de crecimiento como la de consumo. El aceite de árbol de té, a esta dosis, redujo el índice TCR aunque por su valor de IF, puede considerarse neutro.

A ambas dosis, el AE de menta mostró efecto casi nulo en la fisiología nutricional de *S. oryzae*.

En larvas de *L. serricornis*, a la dosis de 1 y 4 mg/disco, los AEs de geranio y orégano tuvieron efecto fagodisuasivo y redujeron las tasas de crecimiento y consumo; para el primer aceite, el efecto disuasivo fue de tal magnitud que en varias réplicas del ensayo no hubo consumo de alimento (ECAI no calculado), mientras que en el AE de orégano se observó toxicidad postingesta (disminución de valor de ECAI). A la menor dosis, los aceites de menta, lavanda, laurel y árbol de té tuvieron efectos fagoestimulantes sin observarse, en general, modificaciones en los índices nutricionales; el aceite de palmarosa no modificó el IF aunque disminuyó los tres índices. A la mayor dosis, a excepción del AE de menta, los aceites antes mencionados fueron fagodisuasivos aunque generaron un aumento en los índices TCR y ECAI. Con relación al IF, el aceite menta tuvo efecto neutro y aumentó el valor de TCR.

Del análisis de estos datos se desprende que para ambos insectos plaga, los AEs de geranio y orégano fueron fagodisuasivos y afectaron negativamente el crecimiento de estos organismos. Existen antecedentes en la bibliografía sobre los efectos de los aceites esenciales sobre la fisiología nutricional de insectos plagas de productos almacenados. Por ejemplo, los AEs de *Ferula assa foetida* (L.), *Pelargonium hortorum* (L.), *Juglans regia* (F.) y *L. angustifolia* disminuyeron los índices TCR, TRC y ECAI índices en *S. granarius* y *R. dominica* (Bahrami et al., 2016; Germinara et al., 2017). Heydarzade et al. (2019) reportaron que los AEs de *Mentha spicata* (L.) y *Mentha pulegium* (L.) disminuyen las variables TCR y TRC teniendo un efecto

fagodisuasivo en *T. castaneum*. Además, los AEs *M. piperita*, *C. citratus* y *C. zeylanicum* produjeron un 100% de efectos fagodisuasivos en *S. oryzae* y *T. castaneum* (Plata-Rueda et al., 2020a; Rajkumar et al., 2019).

Al estudiar el efecto de las NPs sobre la fisiología nutricional, se observó que en *S. oryzae*, a 1 mg/disco, todas ellas generaron efectos fagoestimulantes y, a excepción de las NPs elaboradas con aceite de orégano, produjeron una disminución en la tasa de crecimiento debido, probablemente, al efecto deletéreo sobre la síntesis de nueva biomasa (disminución del valor de ECAI). Cabe mencionar que la magnitud de la disminución sobre TCR promovida por las NPs fue igual o mayor que la generada por los aceites en su bioensayo agudo. Además, se comprobó que, en el bioensayo residual, los aceites fueron fagoestimulantes (salvo el AE de geranio que mantuvo su efecto fagodisuasivo) y aumentaron el índice TCR (excepto el AE de lavanda) y ECAI (a excepción de los aceites de lavanda y árbol de té). Las variaciones en las respuestas biológicas observadas respecto al bioensayo agudo podrían deberse a la pérdida de ciertos componentes de los AEs durante la etapa de evaporación (18 h). En términos generales, se puede concluir que el efecto fagoestimulantes de las NPs podría deberse a la evaporación de algunos constituyentes de los AE durante la elaboración de los discos y su efecto negativo sobre la tasa de crecimiento, a las alteraciones fisiológicas que la nanoformulación provocaría en *S. oryzae* al potenciar la bioactividad del aceite.

A 4 mg/disco, las NPs tuvieron efectos fagodisuasivos (a excepción de las elaboradas con el aceite de árbol de té), generando una fuerte caída de la tasa de crecimiento, consumo (a excepción de las NPs de árbol de té) y ECAI, siendo la magnitud del efecto en varios casos mayor que el generado por los aceites libres en el bioensayo agudo. Además, los bioensayos residuales tuvieron resultados variables tanto sobre el IF (los AEs de palmarosa, geranio y orégano fueron fagodisuasivos, los de lavanda, laurel y árbol de té, fagoestimulantes y el AE de menta mostró efecto nulo) como sobre los índices nutricionales. En líneas generales, se concluye que la

nanofórmula de los AEs podría mantener o potenciar los efectos de los aceites sobre la fisiología nutricional de este insecto.

En larvas de *L. serricorne*, a ambas dosis, en general, las NPs produjeron efectos fagodisuasivos (excepto NPs laurel a 1mg/disco) y generaron una fuerte caída de la tasa de crecimiento, consumo y síntesis de nueva biomasa (excepto las NPs de palmarosa a 1 y 4 mg/disco). Al comparar los efectos de las NPs con el bioensayo agudo de los aceites libres, se observó que las primeras produjeron una reducción del índice TCR similar o mayor (salvo las NPs de palmarosa, geranio y orégano a 1 mg/disco y las NPs de geranio a 4 mg/disco) lo que indicaría que la nanofórmula potencia o mantiene los efectos de los AEs sobre la fisiología nutricional de este insecto. En relación a esta última observación, se comprobó que, a 1 mg/disco, los AEs en el bioensayo residual tuvieron efectos fagoestimulantes y aumentaron el índice TCR (a excepción de los AEs de geranio y orégano) mientras que a 4 mg/disco, fueron fagodisuasivos (salvo los AEs de menta y palmarosa) y disminuyeron el índice TCR (a excepción de los aceites de menta, palmarosa y geranio); cabe aclarar que, a esta última dosis, el efecto sobre este índice fue de menor o igual magnitud que el bioensayo agudo. Lo mismo que para *S. oryzae*, se postula que la pérdida de constituyentes de los AEs durante la etapa de evaporación sería la responsable de las variaciones en la respuesta observadas en los bioensayos residuales y la nanofórmula de estos productos en una matriz polimérica reduciría la volatilización de estos y mejoraría la performance e interacción de los AEs con los tejidos biológicos.

Cabe concluir que los efectos promovidos por las NPs en la fisiología nutricional son variables según las especies, aunque a dosis elevadas estas tienden a producir efectos fagodisuasivos y a alterar la tasa de crecimiento del insecto. Se ha postulado que por su tamaño nanométrico, mayor solubilidad y capacidad de agregación, las NPs posibilitan una eficaz interacción de los AEs con los tejidos biológicos dañando los sistemas enzimáticos, microbiota intestinal y modificando la absorción de nutrientes lo que potencia las alteraciones fisiológicas que estos

productos naturales generan en los insectos plaga (Anjali et al., 2010; Bharani y Namasivayam 2017).

En relación con estas observaciones, estudios previos del grupo de trabajo demostraron la eficacia de las nanoformulaciones sobre la fisiología nutricional de los insectos. Por ejemplo, a 1 y 2 mg/disco, las NPs geranio y bergamota potenciaron los efectos nutricionales de los AEs al reducir significativamente los índices TCR, TRC y ECAI en *T. castaneum*, *R. dominica* y *B. germanica* (Werdin González et al., 2014, 2016). Además, se informó que las NPs de menta y palmarosa alteraron la fisiología nutricional de *B. germanica*. En particular, a 4 mg/disco, las NPs de menta y palmarosa tuvieron efectos fagodisuasivos al disminuir los índices nutricionales (Yeguerman et al., 2020). Por último, Kumar et al. (2011) reportaron el incremento del efecto subletal de las NPs de menta aplicadas en la dieta en *M. domestica*, en comparación con el AE libre.

### 3. E. Conclusiones

- ❖ En cuanto al bioensayo de repelencia en *S. oryzae* y *L. serricorne*, se observó que los AEs de menta, palmarosa y orégano demostraron una mayor actividad repelente al prolongar el efecto hasta las 36 h. Además, sus NPs aumentaron aún más este efecto, alcanzando un tiempo de repelencia hasta las 60 h (orégano) y 72 h (menta y palmarosa).
- ❖ Los AEs de geranio y árbol de té y sus NPs fueron los más efectivos al modificar las respuestas conductuales en *S. oryzae*, al disminuir la distancia total por 48 y 72 h y aumentar la velocidad por 36 y 72 h, respectivamente. Por otro lado, en *L. serricorne*, los AEs de geranio, orégano y laurel fueron los más efectivos al reducir la distancia total por 24 h, mientras que únicamente las NPs de geranio extendieron el efecto hasta las 72 h. Asimismo, los AEs de geranio, lavanda y árbol de té fueron los más efectivos en aumentar la velocidad por 24 h, mientras que las NPs de lavanda, árbol de té y orégano fueron las que potenciaron este efecto hasta las 36 h (lavanda y árbol de té) y 48 h (orégano).
- ❖ Al analizar los efectos en la fisiología nutricional, los AEs de geranio y orégano y sus NPs fueron las que produjeron mayores alteraciones (disminución de TCR, TRC y ECAI) en adultos de *S. oryzae* y larvas de *L. serricorne*. Además, se observó que las NPs administradas a dosis elevadas tienden a ser fagodisuasivas y a alterar la tasa de crecimiento de los insectos.

---

#### 4. EVALUACION DE LOS EFECTOS ECOTOXICOLÓGICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES Y SUS NANPARTICULAS POLIMERICAS

---

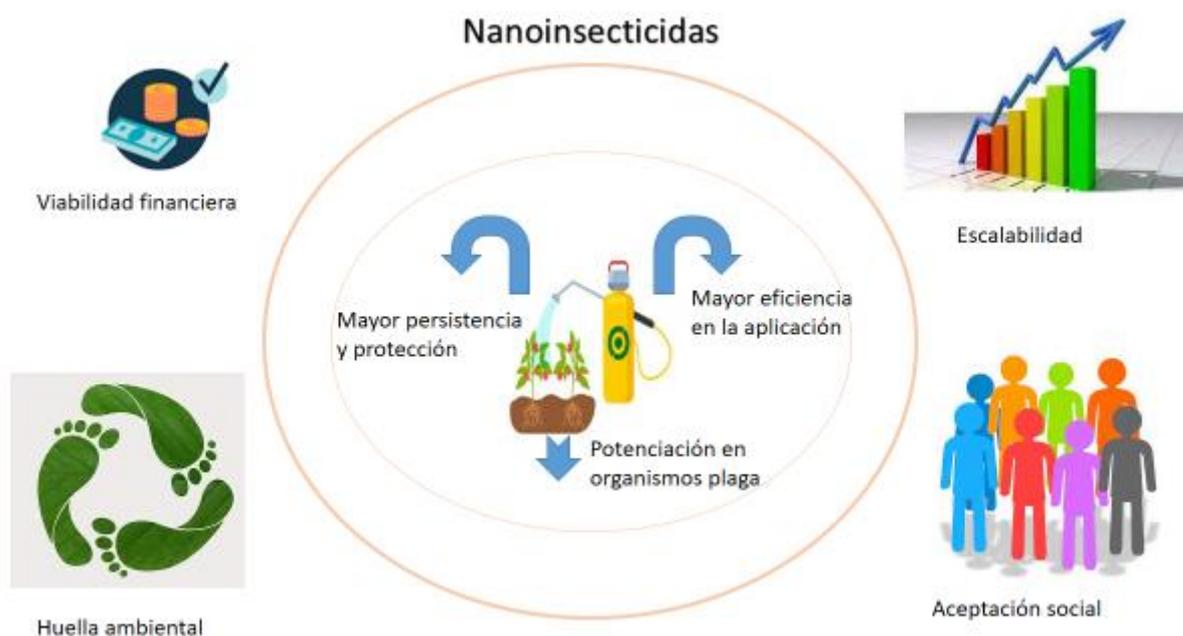
##### 4. A. Introducción

La obsolescencia de las tecnologías existentes y el traslado de capitales hacia nuevas líneas de investigación, promovió el desarrollo de la nanotecnología en todo el mundo. La nanotecnología ofrece numerosos beneficios a distintas áreas como la farmacéutica, medicina, energía, defensa y alimentaria, en la producción de nanomateriales seguros para la comunidad y con menores repercusiones medioambientales, sanitarias y sociales (Ferreira y Filipe, 2018; Hughes y Asmatulu, 2021). En las últimas dos décadas, la gran demanda de esta tecnología ha promovido una mayor exposición de la población y los ecosistemas a los nanomateriales surgiendo un gran interés en los efectos de los mismos en los seres humanos y el medio ambiente (Abdollahdokht et al., 2022; Avila et al., 2018). A partir de la preocupación por los impactos ecotoxicológicos de los materiales a nanoescala, surge la nanoecotoxicología como un área de investigación innovadora en el campo de la toxicología. Esta disciplina evalúa los efectos tóxicos de nanomateriales libres o portadores de compuestos naturales y sintéticos en los organismos vivos y ecosistemas en un contexto integral con el fin de prevenir efectos nocivos y explicar el grado de amenaza medioambiental (Adisa et al., 2019; Panpatte y Jhala, 2019). Este nivel de análisis es un paso fundamental en el desarrollo justificable de la nanotecnología con una amplia aceptación social (Singh et al., 2019; Zielinska et al., 2020).

Los nanoinsecticidas son eficientes herramientas de control de insectos plaga, aunque pueden causar bioacumulación y escorrentía en el medio ambiente provocando toxicidad residual contra los organismos no blanco (Omara et al., 2019; Prasad et al., 2017). Además, los riesgos asociados a su aplicación son complejos e inciertos porque no está del todo claro cómo se degradan en el suelo y el medio ambiente (Kah et al., 2016). Por lo tanto, es esencial comprender la situación actual de varios nanoinsecticidas y sus perspectivas futuras frente al desarrollo de

nuevas formulaciones ecológicas (Lámina 4.1). Al igual que los insecticidas convencionales, la evaluación del riesgo ambiental de los nanoinsecticidas requiere información sobre las características fisicoquímicas del ingrediente y su formulación, la concentración medida o estimada en el medio ambiente, el comportamiento y el destino en los diferentes compartimentos ambientales y la ecotoxicidad en las especies no blanco. Esta información resulta esencial para respaldar la toma de decisiones en materia de evaluación y mitigación de riesgos y para establecer normas medioambientales para un uso seguro y sostenible.

**Lámina 4.1.** Perspectivas en el desarrollo de nanoinsecticidas.



Teniendo en cuenta las diversas propiedades fisicoquímicas de los nanoinsecticidas y los factores abióticos que influyen en su ecotoxicidad, los efectos tóxicos de los mismos dependen de su estabilidad, tipo de organismo y tiempo de exposición (Ivask et al., 2014; Monikh et al., 2019). Al igual que los insecticidas convencionales, los nanoinsecticidas entran al medio ambiente (aire, suelo y agua) a través de emisiones intencionales o accidentales durante su uso. En la actualidad, aunque la unión europea no ha desarrollado ninguna prueba específica para evaluar los posibles efectos nocivos de los nanoinsecticidas; debe tenerse en cuenta tanto la

composición como la morfología de las nanopartículas para producir resultados comparables entre insecticidas comerciales y los nanoformulados (Grillo et al., 2020; Kah et al., 2018). Por lo tanto, el uso de organismos no blanco como indicadores de toxicidad, es necesarios para optimizar los métodos de aplicación de nanopartículas (Ávila et al., 2018; Grillo et al., 2020; Hajji-Hedfi y Chhipa, 2021). En este sentido, Kookana et al. (2014) proponen la utilización de organismos no blanco acuáticos y terrestres para la evaluación medioambiental de los nano insecticidas (Lámina 4.2).

**Lámina 4.2.** Organismos no blanco para la evaluación medioambiental de los nano insecticidas.



#### **4. A.1. Organismos no blanco terrestres**

Para evaluar adecuadamente la seguridad en el manejo de nanopartículas, es necesario desarrollar y adaptar métodos que utilicen modelos animales complementarios. Aunque la mayoría de los estudios toxicológicos se ha realizado *in vitro* con células, todavía no existen metodologías específicas estandarizadas para estudiar la toxicidad de los nano insecticidas en ecosistemas terrestres (Verma et al., 2021). Sin embargo, es común el uso de microorganismos, plantas cultivadas, nematodos, artrópodos y ratones como modelos para la evaluación de la

toxicidad de las nanopartículas, debido a que estos organismos presentan un corto ciclo de vida, fácil manejo, gran tamaño de la progenie y bajo costo de experimentación (Ávila et al., 2018; Mishra et al., 2019). Por ejemplo, Jacques et al. (2017) informaron que NPs de atrazina y paraquat tuvieron mayor toxicidad que los compuestos libres en *Caenorhabditis elegans* (Maupas). Asimismo, NPs del herbicida imazapir y atrazina disminuyeron significativamente la capacidad metabólica de las comunidades bacterianas de la rizosfera en comparación con los compuestos libres (Maruyama et al., 2016; Zhai et al., 2020). En cambio, se reportaron que las NPs de atrazina tuvieron baja toxicidad respecto a la atrazina libre en el anélido *Enchytraeus crypticus* (Henle), mientras que no afectaron a la germinación en cultivos de maíz (Gomes et al., 2019; de Oliveira et al., 2015). De la misma manera, NPs de extractos de piretro mostraron una menor toxicidad que el extracto libre en *A. mellifera* (Oliveira et al., 2019). Además, Kumar et al., 2013 demostraron que NPs de permetrina no tuvieron efecto en la germinación de las semillas y la longitud de las raíces en *Lycopersicon esculentum* (Mill.), *Cucumis sativus* (L.) y *Zea mays* (L.).

#### **4. A.2. Organismos no blanco acuáticos**

El agua potable es el recurso principal para la supervivencia y desarrollo de los seres humanos, sin embargo, es uno de los entornos más susceptibles a la contaminación (Delay y Frimmel, 2012; Schultz et al., 2014). Estos ambientes no solo asimilan y ciclan los nutrientes y el carbono, sino que también mantienen la biodiversidad, sostienen la producción de biomasa primaria y secundaria, así como proporcionan hábitat y recursos alimenticios para las redes alimentarias acuáticas y terrestres (Carstens et al., 2012). Los productos de desechos, como los medicamentos, cosméticos, residuos industriales y los pesticidas derivados de la actividad antropogénica tienen numerosas repercusiones ecológicas (Farre et al., 2009; Simonet y Valcarcel, 2009; Wiesner y Bottero, 2017). Por lo tanto, la evaluación de los efectos tóxicos de las nanopartículas en organismos no blanco modelo es esencial para obtener numerosos resultados representativos. En la actualidad, en las pruebas de toxicidad se emplean organismos

no blanco como microalgas, moluscos, crustáceos, larvas de peces y ranas debido a su pequeño tamaño, rápido desarrollo, alta fecundidad y porque representan la base de la cadena alimentaria (Biswas y Sarkar, 2019; Grillo et al., 2021). En trabajos previos de esa índole, se determinó por ejemplo que las NPs de almidón y quitosano promovieron la floculación de las microalgas *Chlorella vulgaris* (Beijerinck) y *Microcystis aeruginosa* (Kutzing) (Lichtfouse et al., 2019; Tork et al., 2017). También, se reportó que, las NPs de triazina inhibieron el crecimiento de las microalgas *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) en mayor proporción que la triazina libre (Clemente et al., 2013). Por otro lado, NPs de betametasona, triazina y  $\alpha$ -terpineol tuvieron mayores efectos letales sobre los crustáceos *Daphnia similis* (Muller) y *Artemia salina* (L.) respecto a los compuestos libres (Batista et al., 2019; Clemente et al., 2013; Silva et al., 2015). En el caso de vertebrados, NPs de polianilina mostraron elevados efectos teratogénicos en larvas del sapo argentino *Rhinella arenarum* (Hensel) (Ibarra et al., 2015); en cambio, NPs de extractos de *Ulva ohnoi* (Hiraoka y Shimada) estimularon el sistema inmunitario del lenguado *Solea senegalensis* (Kaup) (Fernández-Díaz et al., 2017).

#### **4. A.3. Modelos en estudio**

Para generar un perfil ecotoxicológico íntegro de los AEs y sus NPs se procedió a evaluar su toxicidad sobre distintos modelos. Con el objetivo de obtener valores de referencia sobre la toxicidad de los productos en insectos plaga de ambientes acuáticos, se utilizó como modelo a las larvas de *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera, Culicidae). Tales valores fueron utilizados para comparar los efectos de los AEs y sus NPs sobre en *Artemia salina* L. (Anostraca, Artemiidae), organismo no blanco modelo de este tipo de ambiente. Además, se exploraron los efectos tóxicos de los AEs y sus NPs en organismo no blanco terrestres tales como *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae) y *Blaptica dubia* S. (Blattodea, Blaberidae). Por último y a modo de completar los estudios toxicológicos se evaluaron los efectos de las nanopartículas poliméricas en células de fenotipo osteoblástico como modelo celular de mamíferos.

#### 4. A.3.a. *Culex pipiens pipiens* - Clasificación

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Diptera

**Familia:** Culicidae

**Género:** *Culex*

**Especie:** *Culex pipiens pipiens* (Linné, 1758).

#### 4. A.3.b. Biología de *Culex pipiens pipiens*

*Cx. p. pipiens* es una especie de mosquito cosmopolita de interés sanitario y veterinario, vector de enfermedades como la fiebre del virus occidental y la encefalitis japonesa. Los mosquitos pasan por cuatro estados durante su ciclo de vida: huevo - larva - pupa - adulto. Los estados inmaduros son acuáticos, en tanto que los adultos son de vida terrestre (Reiskind, 2005). La hembra pone los huevos sobre la superficie del agua de manera agrupada formando navículas (grupos de entre 50 a 200 huevos). Los lugares en los que se almacena agua como piletas, charcos y estanques. La eclosión de los huevos ocurre a 20 - 30 ° C en un intervalo de 24 - 36 horas. La duración del estadio larval está muy influenciada por la temperatura, llegando a durar de 5 a 7 días en verano y mucho más a temperaturas bajas. En general, la duración del estado pupal es de alrededor de 2 días en condiciones favorables, siendo la pupa del macho de menor tamaño que la de la hembra (Ashry et al., 2018). En lo adultos, los machos se alimentan de jugos vegetales y viven alrededor de 15 días mientras que las hembras son hematófagas y viven entre 3 a 4 semanas en condiciones ambientales favorables (Salomón, 2005).

### Lámina 4.3: Características morfológicas de *Cx. p. pipiens*

**Adultos:** Miden entre 4 y 10 mm de longitud y son de color marrón claro. En cada segmento del abdomen posee una línea más clara de color beige. Los machos presentan antenas plumosas y aparato bucal rudimentario, mientras que las hembras poseen antenas filiformes y un aparato bucal adaptado para perforar y succionar (Harbach y White, 1985).



Adulto de *Cx. p. pipiens*

**Huevos:** Ovalados de color marrón, miden entre 0,6 y 0,8 mm. Los huevos son colocados en masa (navículas) sobre la superficie del agua (Harbach, 2012).

**Larvas:** Acuáticas, móviles y de color marrón claro. Son eucéfalas con cepillos bucales y antenas bien desarrolladas. 8vo segmento de abdomen modificado en un sifón. Presenta cuatro estadios larvales que

se diferencian a través de su tamaño y las medidas de la cápsula cefálica (Harbach, 2012).



Larva de *Cx. p. pipiens*

**Pupas:** Acuáticas de movimientos activos, de color marrón claro. Cefalotórax globoso con un par de trompetas respiratorias. Abdomen con pelos que facilitan flotación y un par de paletas nadadoras en su extremo (Harbach, 2012).



Pupa de *Cx. p. pipiens*.

#### 4. A.3.c. *Artemia salina* - Clasificación

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Crustacea

**Clase:** Branchiopoda

**Orden:** Anostraca

**Familia:** Artemiidae

**Género:** *Artemia*

**Especie:** *Artemia salina* (Linné, 1758).

#### 4. A.3.d. Biología de *Artemia salina*

*A. salina* es una especie cosmopolita que se encuentra distribuida en lagos salinos naturales o artificiales. Como mecanismo adaptativo a los cambios ambientales, estos crustáceos pueden entrar en anabiosis durante el estado de huevo (Muñoz y Pacios, 2010). Se originan así, de forma característica, estructuras de resistencia denominadas quistes que pueden permanecer metabólicamente inactivos durante largos períodos. El ciclo de vida comienza con la hidratación de los quistes, en la que toman forma esférica y el embrión recobra su metabolismo; y luego de 48 h horas se completa su desarrollo y emerge la larva nauplio (primer estado larvario) (Marouane, 2017). Esta suele permanecer en este estadio unas 30 h, pasando posteriormente a la forma de metanauplio. *A. salina* suele atravesar por unas 15 mudas hasta alcanzar la adultez, proceso que lleva alrededor de 2 semanas en total. Los adultos se alimentan tanto de materia orgánica particulada como de microalgas y bacterias (Cavion et al., 2020; Shaaala et al., 2017).

#### Lámina 4.4: Características morfológicas de *A. salina*

**Adultos:** Los adultos miden entre 7 y 18 mm con una coloración marronosa colorada. Cuerpo delgado y alargado cubierto por caparazón blando. Las segundas antenas de los machos están más desarrolladas que las hembras presentando forma de tenaza. Las hembras presentan un ovisaco en la porción en los primeros segmentos del abdomen (Anderson, 1967).



Adulto de *A. salina*

**Huevos:** De color marrón anaranjado. Poseen una longitud entre 0,4 y 0,5 mm y 0,2 mm de ancho. Los huevos poseen glándulas que en condiciones adversas secretan una película que envuelve al huevo, convirtiéndolo en un quiste (huevo cístico) donde el embrión entra en criptobiosis (Anderson, 1967).

**Nauplio:** Cuerpo no segmentado, de color blanco anaranjado y con una longitud menor a 500 micras. Estadio con una duración de aproximadamente 30 horas. Además, en la cabeza, entre las anténulas, tienen un único ocelo de color rojo (Anderson, 1967).



Nauplio de *A. salina*

**Metanauplio:** Presentan toracópodos que permiten su desplazamiento. De mayor tamaño que la nauplio (de 140 a 400 micras) (Anderson, 1967).



Metanauplio de *A. salina*.

**Pre-adulto:** comienzan a aparecer caracteres que permiten diferenciar machos y hembras (Anderson, 1967).

#### 4. A.3.e. *Tenebrio molitor* - Clasificación

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Coleoptera

**Familia:** Tenebrionidae

**Género:** *Tenebrio*

**Especie:** *Tenebrio molitor* (Linné, 1758).

#### 4. A.3.f. Biología de *Tenebrio molitor*

Las hembras de *T. molitor* (gusano amarillo de las harinas o escarabajo negro) suelen depositar entre 250 y 1000 huevos de manera aislada o en racimo en los alimentos. Luego de un periodo de incubación entre 4 y 18 días, larvas blancas emergen, adquiriendo un color amarillento a medida que crecen (Deruytter et al., 2019). El periodo larval, tiene una duración de tres meses mientras que el posterior periodo pupal dura veinte días aproximadamente. El escarabajo adulto vive de 2 a 3 meses, y a los diez días de su emergencia adquiere la madurez sexual. Su ciclo biológico puede durar entre 4 y 5 meses en vida silvestre, mientras que en condiciones de laboratorio con parámetros adecuados de temperatura, humedad e iluminación puede reducirse a 2,5 meses. La temperatura óptima para su desarrollo es entre 25 y 27 °C (Arana Escalante et al., 2018; Deruytter et al., 2021).

#### **Lámina 4.5: Características morfológicas de *T. molitor***

**Adultos:** Miden entre 15 y 20 mm de longitud. Luego del estado de pupa, los escarabajos son blanquecinos, adquiriendo posteriormente el color mate característico. Las patas y antenas son rojizas y los élitros son estriados. Posee antenas aserradas filiformes y alas funcionales, aunque no vuela (Tracey, 1958).



Adulto de *T. molitor*

**Huevos:** Alargados, arriñonados y de color blanquecino. Las hembras colocan los huevos de manera aislada o en racimo. Poseen una longitud de 1,4 mm y 0,6 mm de ancho (Tracey, 1958).

**Larvas:** Inicialmente de color blanco, van adquiriendo un color amarillo anaranjado a medida que crecen. Cabeza pequeña de

color marrón oscuro. Suelen medir entre 25 y 35 mm. Periodo con una duración de tres meses (Tracey, 1958).



Larva de *T. molitor*

**Pupas:** De color blanquecino, con el tiempo se tornan de un color café amarillento. De forma triangular, curvada e inmóvil (Tracey, 1958).



Pupas de *T. molitor*.

#### 4. A.3.g. *Blaptica dubia* - Clasificación

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Blattodea

**Familia:** Blaberidae

**Género:** *Blaptica*

**Especie:** *Blaptica dubia* (Serville, 1839).

#### 4. A.3.h. Biología de *Blaptica dubia*

*B. dubia* conocida como la cucaracha argentina, es una cucaracha silvestre de tamaño mediano (entre 4,0 y 4,5 cm) que se encuentra en América Central y del Sur. Los adultos son de color marrón oscuro a negro con un patrón de rayas de color naranja (Adedara et al., 2022). La coloración difiere ligeramente con el medio ambiente y la dieta de una colonia a otra. Los adultos son sexualmente dimórficos, los machos adultos tienen alas completas que cubren su cuerpo, mientras que las hembras solo tienen pequeños esbozos alares. *B. dubia* es una especie de cucaracha ovovivípara que da a luz entre 20 a 40 ninfas vivas en condiciones favorables (patrón de reproducción típico de la familia Blaberidae). *B. dubia* es utilizada como fuente de alimento para muchos reptiles y anfibios debido a que contiene un mayor porcentaje de proteínas que otros insectos (Djernaes et al., 2020).

#### **Lámina 4.6: Características morfológicas de *B. dubia***

**Adultos:** Miden alrededor de 45 mm de longitud y son de color negro con ligeras manchas anaranjadas. Adultos sexualmente dimórficos, machos presentan alas completas mientras que la hembra presenta esbozos alares. Además, el último segmento abdominal en machos presenta una hendidura, mientras que en las hembras la placa permanece sin subdivisiones. Debido a que carecen de arolio desarrollado entre sus uñas, no pueden escalar superficies lisas (Wu et al., 2013).



Adultos de *B. dubia*

**Ninfas:** El periodo consta de siete estadios. Miden alrededor de 5 mm al nacer y son de color blanco. A medida que pasa el tiempo adquieren un color grisáceo. Al igual que los adultos, las ninfas carecen de arolio. En *B. dubia*, el ancho de la cápsula de la cabeza,

el ancho del pronotal y la longitud del cuerpo son los caracteres más convenientes para medir en todos los estadios ninfales. La longitud pronotal está en el rango de 2,41 a 9,37 mm; el ancho pronotal está entre 4,18 y 15,17 mm y el rango de ancho de la cabeza es de 1,79 a 5,04 mm para el primer y séptimo estadio, respectivamente (Mariod et al., 2017).



Ninfas de *B. dubia*

#### 4. A.4. Hipótesis

En referencia a los antecedentes expuestos, se plantean las siguientes hipótesis:

- ❖ Los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs poseen efectos letales en larvas de *Cx. p. pipiens*.
- ❖ Los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs no poseen efectos letales en metanauplios de *A. salina* (organismo modelo acuático) y en larvas de *T. molitor* y ninfas I de *B. dubia* (organismos modelo terrestres)
- ❖ Los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs no reducen la viabilidad en células de fenotipo osteoblástico.

#### 4. A.5.a. Objetivo general

El objetivo general planteado para este capítulo es evaluar los efectos toxicológicos de los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té y sus NPs en *Cx. p. pipiens* y en los organismos no blanco *A. salina*, *T. molitor*, *B. dubia*. Además, se propuso estudiar el efecto de estos productos sobre células de fenotipo osteoblástico.

#### 4. A.6.b. Objetivos específicos

- ❖ Estudiar el efecto tóxico de los AEs y sus NPs en *Cx. p. pipiens* y en el organismo no blanco acuático *A. salina*.
- ❖ Estudiar el efecto tóxico de los AEs y sus NPs en organismos no blanco terrestres *T. molitor* y *B. dubia*.
- ❖ Evaluar los efectos de las NPs en la viabilidad de las células de fenotipo osteoblástico.

#### **4. B. Materiales y métodos**

##### **4. B.1. Cría de *Cx. p. pipiens* y *A. salina***

Con el objetivo de obtener valores de referencia para evaluar los efectos de los AEs y sus NPs en el organismo no blanco acuático *A. salina*, se realizaron ensayos de toxicidad en larvas de *Cx. p. pipiens*. Las larvas de mosquito se recogieron de una zona con agua estancada y se acondicionaron durante 48 horas en una sala de cría a una temperatura de  $29 \pm 2$  °C en el Laboratorio de Zoología de Invertebrados II- UNS.

Para obtener metanauplios de 72 horas de *A. salina*, los quistes se colocaron en agua destilada durante 24 horas para hidratarlos. Luego, se colocaron en un recipiente de plástico con agua de mar artificial (33 g de sal marina/1 litro de agua destilada) con iluminación artificial, bajo aireación y a  $29 \pm 2$  °C. Luego de la eclosión, las larvas se mantuvieron en estas condiciones durante 48 horas hasta su utilización en los bioensayos.

##### **4. B.2. Cría de *T. molitor* y *B. dubia***

Las colonias de *T. molitor* se mantuvieron en cámaras de crecimiento de 20 cm × 20 cm × 30 cm (largo x ancho x alto) bajo oscuridad a  $29 \pm 2$  °C, 50 - 70% de HR y en oscuridad. Cada una de ellas contenía una mezcla de harina de trigo, harina de maíz y avena (2: 1: 1 p/p).

Las colonias de *B. dubia* se mantuvieron en cámaras de crecimiento bajo oscuridad de 35 cm × 20 cm × 23 cm (largo x ancho x alto) a  $29 \pm 2$  °C, 50 - 70% de HR y cubiertos con una tapa con orificios para la ventilación. Las cucarachas fueron alimentadas con alimento para perros en forma de croquetas (Purina Dog Chow, Nestlé Argentina S.A).

##### **4. B.3.a Bioensayos en *Cx. p. pipiens***

Para evaluar la toxicidad de los AEs, estos se agregaron directamente a 250 ml de agua corriente que contenía Tween 80 (1% p / v); para el caso de las NPs, las mismas se adicionaron a 250 ml de agua corriente sola. Las mezclas se mantuvieron bajo agitación magnética durante 15 min y

se trasvasaron 50 ml de las mismas a un recipiente plástico. Las concentraciones empleadas variaron de 5 a 150 ppm. Para el control positivo, se aplicó una solución de  $\beta$ -cipermetrina en acetona en un rango de concentraciones de 0,05 a 5 ppm. Como controles negativos se utilizaron i) agua sola, ii) agua + Tween 80 (1% p / v), iii) agua + Tween 80 (1% p / v) + acetona y iv) agua sola + PEG 6000 (en la proporción correspondiente a la usada para la elaboración de las NPs) a la máxima concentración. A cada recipiente se agregaron veinte larvas de IV estadio de *Cx. p. pipiens* que se mantuvieron en condiciones controladas ( $29 \pm 2$  °C, 50 - 70% de HR y fotoperiodo luz/oscuridad de 16: 8 horas). Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado (n = 80). Después de 24 horas de exposición se registró la mortalidad. Con estos datos se determinaron los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$ . Se consideró que las larvas estaban muertas cuando no reaccionaban al tocarlas con una aguja.

#### **4. B.3.b Bioensayos ecotoxicológicos en *A. salina***

Los AEs y sus NPs se adicionaron de forma directa a 30 ml de agua de mar sintética bajo agitación magnética (15 min) con el fin de obtener concentraciones que variaron de 5 a 100 ppm. Se tomaron 6 ml de estas mezclas y se trasvasaron a tubos de vidrio a los que se agregaron diez metanauplios de *A. salina* de 72 horas. Cada recipiente se mantuvo en condiciones controladas ( $29 \pm 2$  °C, 50 - 70% de HR y fotoperiodo luz/oscuridad de 16: 8 horas). Para el control positivo, se aplicó una solución de 0,05 a 5 ppm de  $\beta$ -cipermetrina en acetona. Se realizaron tres controles negativos, uno con agua de mar sola, otro con agua de mar + acetona y el último con agua de mar + PEG-6000 (en la proporción correspondiente a la usada para la elaboración de las NPs) a una concentración máxima. Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado (n = 40). Después de 24 horas de exposición se registró la mortalidad, considerándose que las larvas estaban muertas cuando no se observaron movimientos de apéndices.

Con estos datos se determinaron los valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>. De acuerdo a los valores de CL<sub>50</sub> se determinaron los grados de toxicidad de los AEs y sus NPs (Tabla 4.1) (Kamrin, 1997) y se calculó un índice de selectividad como: IS = CL<sub>50</sub> de larvas *A. salina* (organismo no blanco) / CL<sub>50</sub> larvas de *Cx. p. pipiens* (organismo plaga). Valores de IS mayores a 1 indican que el producto es selectivo en relación con el organismo plaga.

**Tabla 4.1.** Valores de referencia de toxicidad en organismos no blanco acuáticos (Kamrin, 1997).

Organismos no blanco	Categoría	CL <sub>50</sub> (ppm)
Acuáticos	extremadamente tóxico	CL <sub>50</sub> < 0,1
	altamente tóxico	0,1 < CL <sub>50</sub> > 1
	moderadamente tóxico	1 < CL <sub>50</sub> > 10
	ligeramente tóxico	10 < CL <sub>50</sub> > 100
	prácticamente no tóxico	CL <sub>50</sub> > 100

#### 4. B.3.c Bioensayos ecotoxicológicos en *T. molitor* y *B. dubia*

Se estudió el efecto de los AEs y sus NPs en larvas de 8vo a 10mo estadio de *T. molitor* y ninfas I de *B. dubia*. Para ello, papeles de filtro (28,5 cm<sup>2</sup>) se trataron con 0,5 ml de AEs diluidos en acetona o NPs a concentraciones equivalentes. Las concentraciones variaron de 50 a 800 µg cm<sup>-2</sup>. Luego de la evaporación del solvente (15 minutos), los papeles de filtro se introdujeron en un frasco de vidrio (2 cm de diámetro x 9 cm de alto). Después, se agregaron diez larvas de *T. molitor* o ninfas de *B. dubia* que se cubrieron con tela de voile. En el control positivo, los papeles de filtro se trataron con β-cipermetrina en un rango de 2,5 a 400 µg cm<sup>-2</sup> mientras que en el control negativo se utilizó acetona sola o PEG 6000 en caso de las NPs. Se realizaron cuatro réplicas independientes (n = 40). Todos los experimentos se mantuvieron a 29 ± 2 °C, 50 - 70% de HR y fotoperiodo luz/oscuridad de 16: 8 horas. La mortalidad se determinó después de 72 horas (el tiempo de exposición es equivalente al utilizado en los bioensayos con adultos de *S. oryzae* y *L.*

*serricorne*) y se analizó la selectividad de los productos. Los insectos se consideraron muertos cuando no se observaron movimientos abdominales ni de apéndices.

#### **4. B.3.d. Bioensayo de viabilidad celular**

Esta parte de la investigación se realizó bajo la supervisión de las doctoras Valeria Gili y Graciela Santillán del Laboratorio de Química Biológica A perteneciente al INBIOSUR (Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur – CONICET-UNS). Para los experimentos, las células de fenotipo osteoblástico se descongelaron y sembraron en placas de vidrio de 10 cm de diámetro hasta alcanzar 80% de confluencia. Luego, se desprendieron con tripsina, se sembraron en multiwells (Costar, 48 pocillos) a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y se cultivaron durante 2-3 días en  $\alpha$ -MEM 10% SFB. De este modo, cada lote de células empleado en los experimentos tiene dos pasajes o repiques. Este procedimiento evita posibles transformaciones del fenotipo celular debido a sucesivos pasajes (Towler y Arnaud, 2002). Cuando alcanzaron el 80% de confluencia, las células se expusieron a  $\alpha$ -MEM 1% SFB durante 16 h antes de comenzar los tratamientos. Los experimentos se llevaron a cabo empleando las NPs cargadas con AE, que se adicionaron directamente al medio que contenía a las células de fenotipo osteoblástico. Dadas las características del medio de cultivo, se decidió evaluar el efecto de las NPs a dosis equivalentes de CL<sub>90</sub> registrados en el ensayo de *A. salina*. También se analizaron dos condiciones de control: una que contiene el medio solo, otra que contenía el medio + PEG 6000 (procesado según 2.B.1 sin agregado de los AEs) en la proporción correspondiente a las de mayor valor de CL<sub>90</sub> de las NPs. Se realizaron tres ensayos independientes a fin de evaluar la viabilidad celular 24, 48 y 72 h. En cuanto a la determinación de la viabilidad celular, ésta se llevó a cabo mediante la tinción con Rojo Neutral según Repetto et al. (2008). Al finalizar el período experimental, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con el colorante en  $\alpha$ -MEM por 3 h a 37 °C. Luego, se removió el exceso de colorante con PBS 1X y se fotografió en un microscopio invertido. Se extrajo el colorante mediante una solución removedora (50:49:1; etanol, agua, ácido acético) y esta solución se cuantificó a 540 nm. Paralelamente se realizó un blanco de

reactivos. Cabe aclarar que se consideró que los tratamientos tuvieron efectos citotóxicos si provocaron una reducción mayor al 30% sobre la viabilidad celular (Jung et al., 2019).

#### **4. B.4. Análisis estadístico**

Los valores de  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  se calcularon con sus respectivos intervalos de confianza del 95% empleando el software estadístico SPSS 25.0. Estos valores se consideraron significativamente diferentes si no se superponían los intervalos de confianza.

Por otra parte, para el caso del bioensayo de viabilidad celular, los datos se analizaron usando el programa InfoStat. Se eligió ANOVA como método para determinar diferencias estadísticas entre los valores medios de los tratamientos. Estos valores se compararon utilizando el test post hoc para múltiples comparaciones de Bonferroni.

#### 4. C. Resultados

##### 4. C.1. Bioensayos de los AEs y sus NPs en *Cx. p. pipiens*

En larvas IV de *Cx. p. pipiens*, con los AEs y sus NPs se estimaron valores de  $CL_{50}$  entre 14,74 a 101,32 ppm, y valores de  $CL_{90}$  de 27,94 a 165,17 ppm (Tabla 4.2). La actividad insecticida de la  $\beta$ -cipermetrina fue significativamente mayor que la de los AEs y sus NPs ( $P < 0,05$ ). No se observó mortalidad en ninguno de los controles negativos.

Los valores de  $CL_{50}$  obtenidos para los AEs fueron entre 40,19 y 101,32 ppm. Basados en este parámetro toxicológico, los AEs con mayor actividad larvicida fueron los de laurel, orégano y palmarosa, no encontrándose diferencias significativas entre ellos ( $P > 0,05$ ). Los efectos tóxicos de los AEs de geranio y menta no difirieron entre sí y con el AE de palmarosa ( $P > 0,05$ ), aunque lo hicieron los aceites de laurel y orégano ( $P < 0,05$ ). Los aceites de lavanda y árbol de té fueron los menos efectivos ( $P < 0,05$ ).

En el caso de las NPs los valores de  $CL_{50}$  calculados fueron de 14,74 a 96,60 ppm. Las NPs de orégano fue el tratamiento con mayor efecto larvicida, encontrándose diferencias significativas con todos los AEs y el resto de las NPs ( $P < 0,05$ ). Siguiendo el orden toxicidad, se observó que las NPs de geranio y laurel no difirieron en su efectividad ( $P > 0,05$ ) pero sí con las elaboradas con el aceite de orégano ( $P < 0,05$ ). Por su parte, las NPs de lavanda y palmarosa generaron efectos larvicida de magnitud similar ( $P > 0,05$ ), pero de menor efectividad que todas las anteriores ( $P < 0,05$ ). Las NPs con menor efecto tóxico fueron las elaboradas con menta y árbol de té.

Cabe destacar que el efecto insecticida generado por las NPs de orégano, geranio y lavanda fue mayor que la de los AEs libre ( $P < 0,05$ ); las primeras incrementaron la actividad insecticida del aceite 2,92 veces, las NPs de geranio, 1,87 veces y las de lavanda, 1,46 veces. No se evidenciaron diferencias significativas entre los efectos tóxicos de los AEs de menta, palmarosa, laurel y árbol de té y sus NPs ( $P > 0,05$ ).

**Tabla 4.2.** Actividad larvica de los AEs y sus NPs en *Cx. p. pipiens*.

Tratamientos	CL <sub>50</sub> (ppm) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub>	CL <sub>90</sub> (ppm) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub>	X <sup>2</sup> (gl=4)	p
AE de Menta	54,74 <b>ef</b>	48,63 – 66,05	84,08 <b>cd</b>	73,12 – 102,32	9,363	0,053
AE de Palmarosa	46,20 <b>de</b>	41,91 – 51,22	82,98 <b>cd</b>	67,80 – 111,02	9,181	0,057
AE de Geranio	54,46 <b>ef</b>	48,05 – 65,83	91,50 <b>cd</b>	79,49 – 110,79	8,005	0,091
AE de Orégano	42,95 <b>d</b>	37,83 – 47,81	90,62 <b>d</b>	82,43 - 101,39	6,153	0,188
AE de Laurel	40,19 <b>cd</b>	35,52 – 44,93	85,56 <b>cd</b>	77,91 – 95,53	4,577	0,334
AE de Lavanda	88,26 <b>g</b>	81,68 – 96,54	136,82 <b>e</b>	124,17 – 154,75	3,392	0,494
AE de Árbol de té	101,32 <b>g</b>	91,41 – 115,47	165,17 <b>e</b>	145,01 – 196,43	4,805	0,308
NP de Menta	70,20 <b>f</b>	61,62 – 81,48	140,56 <b>e</b>	122,17 – 167,66	5,649	0,227
NPs de Palmarosa	53,12 <b>e</b>	47,88 – 58,74	105,55 <b>d</b>	95,93 – 118,40	6,577	0,160
NPs de Geranio	28,97 <b>c</b>	22,57 – 37,75	59,98 <b>c</b>	48,39 – 82,42	7,159	0,128
NPs de Orégano	14,74 <b>b</b>	13,05 – 16,72	27,94 <b>b</b>	24,82 – 32,38	6,617	0,158
NPs de Laurel	36,72 <b>cd</b>	29,74 – 46,90	66,79 <b>cd</b>	54,55 – 89,96	7,460	0,113
NPs de Lavanda	60,41 <b>e</b>	55,42 – 65,90	107,41 <b>d</b>	98,46 – 119,16	2,715	0,607
NPs de Árbol de té	96,60 <b>g</b>	83,29 – 116,60	179,73 <b>e</b>	151,84 – 224,66	4,502	0,342
β-Cipermetrina	0,288 <b>a</b>	0,25 – 0,33	0,57 <b>a</b>	0,51 – 0,67	5,533	0,237

<sup>a</sup> valores de CL<sub>50</sub> que muestran distinta letra presentan diferencias significativas (NSIC, P<0,05). IC<sub>95</sub>= intervalo de confianza de 95%, gl= grados libertad. Actividad larvica de AEs y sus NPs se consideraron significativamente diferentes cuando no hubo superposición de IC<sub>95</sub>.

#### 4. C.2. Bioensayos ecotoxicológicos de los AEs y sus NPs en *A. salina*

En larvas metanauplios de *A. salina*, los valores de  $CL_{50}$  estimados de los AEs y sus NPs se encontraron en un rango de 11,38 a 77,37 ppm, y valores de  $CL_{90}$  entre 28,41 y 144,58 ppm (Tabla 4.3). No se observó mortalidad en los controles negativos. La actividad insecticida de la  $\beta$ -cipermetrina fue significativamente mayor que la de los AEs y sus NPs ( $P < 0,05$ ). No se observó mortalidad en ninguno de los controles negativos.

En este organismo con los AEs se obtuvieron valores de  $CL_{50}$  entre 19,92 y 77,37 ppm, por lo que pueden considerarse productos ligeramente tóxicos. Los aceites con mayor bioactividad fueron los de geranio y menta, sin encontrarse diferencias entre ellos ( $P < 0,05$ ). Los efectos del AE de palmarosa observados en *A. salina* fueron menores que los anteriores, aunque mayores que los generados por los demás aceites ( $P < 0,05$ ). Los AEs de orégano, lavanda, árbol de té y laurel fueron los que menor toxicidad produjeron en este crustáceo. Basados en los valores del IS, los AEs de orégano ( $IS = 1,29$ ) y de laurel ( $IS = 1,92$ ) pueden considerarse productos selectivos en relación a larvas de *Cx. p. pipiens*.

Con respecto a las NPs, y dado que con estas se observaron valores de  $CL_{50}$  entre 11,38 y 63,45 ppm, se puede considerar que estos productos son ligeramente tóxicos para *A. salina*. Las NPs de árbol de té fueron las más tóxicas para este organismo ( $P < 0,05$ ), seguido de las elaboradas con los aceites de menta, palmarosa, orégano y laurel en las que no se evidenciaron diferencias entre sus efectos ( $P > 0,05$ ). Luego, las NPs de lavanda difirieron en su actividad únicamente con las elaboradas con el AE de palmarosa ( $P < 0,05$ ). Las NPs de geranio fueron las que produjeron menor actividad tóxica en este organismo no blanco ( $P < 0,05$ ). Cabe destacar que la toxicidad promovida por las NPs de geranio fue significativamente menor respecto al AE libre ( $P < 0,05$ ). Además, no se observaron diferencias entre el aceite de menta y sus NPs ( $P > 0,05$ ). Todas las demás nanoformulaciones generaron mayor bioactividad que los AEs libres ( $P < 0,05$ ). Por otra

parte, al analizar el IS se observó que las NPs elaboradas con aceite de geranio (IS = 2,19) y de orégano (IS = 1,96) fueron selectivas para las larvas de *Cx p. pipiens*.

#### **4. C.3. Bioensayos ecotoxicológicos de los AEs y sus NPs en *T. molitor* y *B. dubia***

Los resultados de los bioensayos ecotoxicológicos en larvas de 8vo a 10mo estadio de *T. molitor* mostraron que los AEs a dosis máxima (800 ug cm<sup>-2</sup>) produjeron mortalidades en un rango de 0 a 5%, mientras que ninguna de sus NPs produjo mortalidad. En ninfas I de *B. dubia*, los AEs a dosis máxima produjeron un rango de mortalidad entre un 5 y 55%, mientras que sus NPs, entre 2,5 y 47,5%. Cabe resaltar que al analizar la toxicidad promovida por estos productos en ambos organismos no blanco terrestres y en relación con *S. oryzae* y *L. serricorne*, se observó que tanto los AEs como sus NPs fueron selectivas para los organismos plaga, salvo las NPs de lavanda y laurel en *S. oryzae*, que a la máxima concentración no generaron mortalidad. Es importante destacar que la  $\beta$ -cipermetrina tuvo mayor efecto letal que los AEs y sus NPs en *T. molitor* y *B. dubia*. En *T. molitor*, los valores CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> para  $\beta$ -cipermetrina fueron de 98,47  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (56,64 - 161,24) y 226,04  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (162,64 - 442,58) ( $\chi^2= 8,87$ ; P= 0,06; gl= 4), mientras que en *B. dubia* fueron de 113,60  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (54,61 - 166,46) y 294,04  $\mu\text{g cm}^{-2}$  (225,06 - 466,25) ( $\chi^2= 7,07$ ; P= 0,13; gl= 4).

**Tabla 4.3.** Actividad larvica de los AEs y sus NPs en *A. salina*.

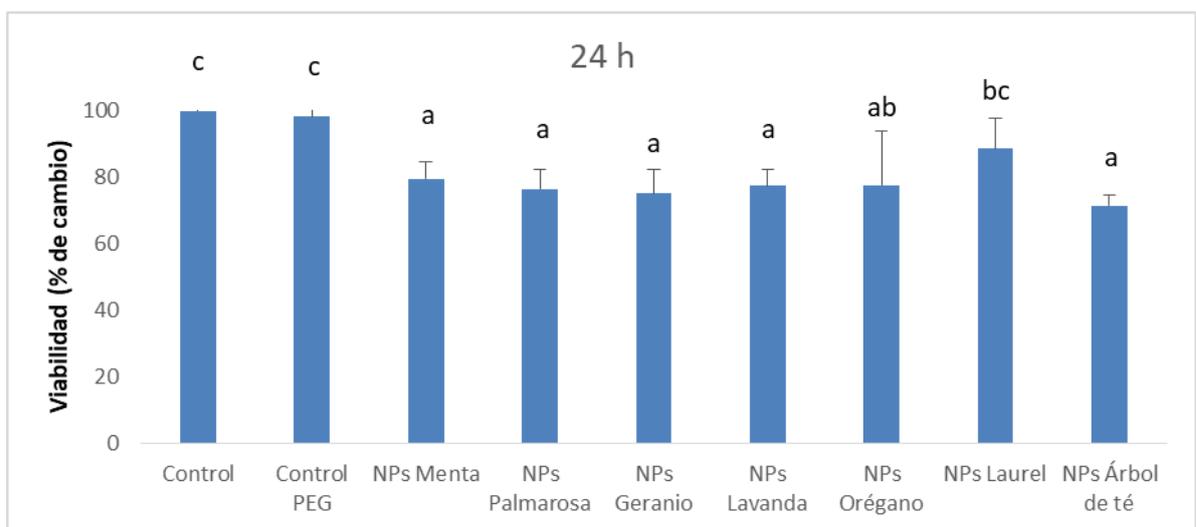
Tratamientos	CL <sub>50</sub> (ppm) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub>	CL <sub>90</sub> (ppm) <sup>a</sup>	IC <sub>95</sub>	X <sup>2</sup> (gl=4)	p
AE de Menta	22,03 <b>c</b>	17,88 – 26,91	49,09 <b>c</b>	41,46 – 61,49	6,345	0,175
AE de Palmarosa	41,39 <b>d</b>	35,87 – 48,68	71,15 <b>c</b>	61,41 -86,39	5,355	0,253
AE de Geranio	19,92 <b>c</b>	16,19 – 24,28	43,75 <b>bc</b>	37,06 – 54,48	2,819	0,589
AE de Orégano	55,44 <b>e</b>	48,85 – 62,82	99,56 <b>d</b>	88,55 – 115,56	5,419	0,247
AE de Laurel	77,37 <b>e</b>	55,45 – 132,90	144,58 <b>d</b>	103,90 – 282,95	8,187	0,085
AE de Lavanda	58,78 <b>e</b>	50,74 – 69,07	106,54 <b>d</b>	92,15 – 128,33	5,856	0,210
AE de Árbol de té	74,91 <b>e</b>	64,21 – 90,05	133,88 <b>d</b>	113,63 – 166,86	4,454	0,348
NPs de Menta	24,75 <b>cd</b>	16,91 – 36,78	47,72 <b>bc</b>	35,99 – 78,72	8,627	0,071
NPs de Palmarosa	26,64 <b>c</b>	20,15 – 32,75	67,12 <b>c</b>	57,99 – 80,89	3,369	0,498
NPs de Geranio	63,45 <b>e</b>	56,53 – 71,50	108,59 <b>d</b>	96,71 – 126,06	4,984	0,289
NPs de Orégano	28,91 <b>cd</b>	24,76 – 34,07	53,32 <b>c</b>	46,03 – 64,57	5,922	0,205
NPs de Laurel	26,15 <b>cd</b>	18,90 – 37,10	49,21 <b>c</b>	37,96 – 76,14	7,252	0,123
NPs de Lavanda	38,75 <b>d</b>	33,29 – 45,92	69,72 <b>c</b>	59,85 – 85,26	6,627	0,157
NPs de Árbol de té	11,38 <b>b</b>	8,56 – 14,46	28,41 <b>b</b>	23,40 – 37,44	1,296	0,862
β-Cipermetrina	0,28 <b>a</b>	0,12 – 0,44	1,23 <b>a</b>	0,93 – 1,81	1,096	0,895

<sup>a</sup> valores de CL<sub>50</sub> que muestran distinta letra presentan diferencias significativas (NSIC, P<0,05). IC<sub>95</sub>= intervalo de confianza de 95%, gl= grados libertad. Actividad larvica de los AEs y sus NPs se consideraron significativamente diferentes cuando no hubo superposición de IC<sub>95</sub>. \* valores de χ<sup>2</sup> no significativos en niveles de P>0,05.

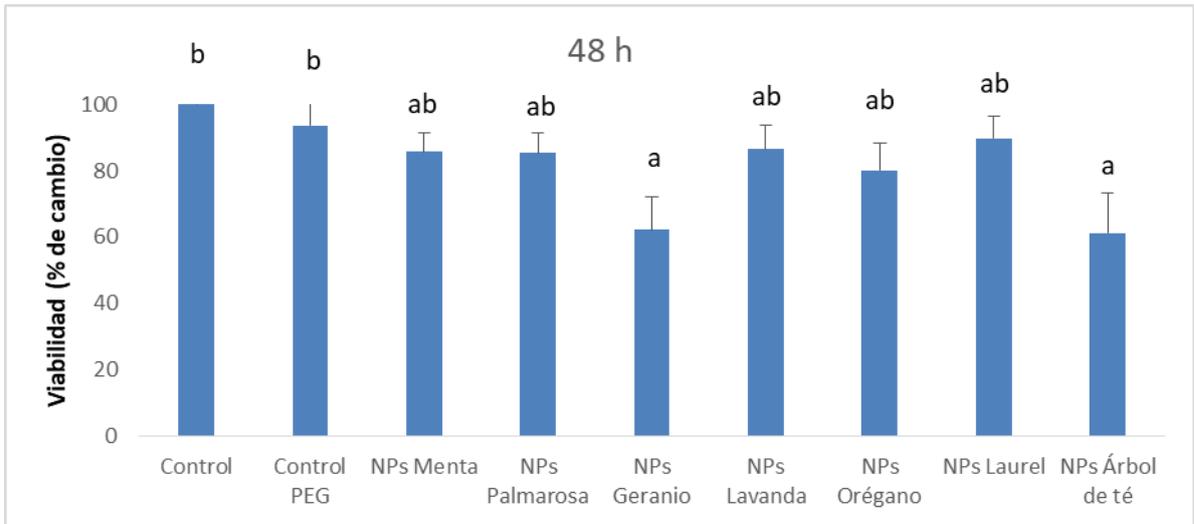
#### 4. C.4. Bioensayo de viabilidad celular

En la Lámina 4.7 se muestran los resultados del ensayo de viabilidad con células de fenotipo osteoblástico tratadas con las NPs a las 24, 48 y 72 h. Como se puede observar, el control de PEG afectó la viabilidad celular únicamente a las 72 h, disminuyéndola a menos de un 20% ( $P < 0,05$ ). Al analizar el efecto de las nanopartículas a las 24 h, se observó que, a excepción de las elaboradas con el aceite de laurel, las NPs disminuyeron significativamente la viabilidad celular en comparación con ambos controles ( $P < 0,05$ ), aunque no generaron efectos citotóxicos (reducción en la viabilidad celular menor a 30%) (Lámina 4.7.A) ( $P < 0,05$ ). A las 48 h, solo las NPs de geranio y árbol de té disminuyeron significativamente la viabilidad celular en relación a ambos controles, ( $P < 0,05$ ) y generaron efectos citotóxicos (reducción de la viabilidad celular aproximadamente a un 40%) (Lámina 4.7.B). Por último, a las 72 h, no se observaron diferencias entre los efectos en la viabilidad celular promovidos por las NPs de menta, geranio, lavanda, orégano y laurel y el control de PEG ( $P > 0,05$ ). A este tiempo, solo las NPs de árbol de té disminuyeron significativamente la viabilidad celular ( $P < 0,05$ ) y generaron efecto citotóxico (reducción de la viabilidad celular a un 47%) (Lámina 4.7.C).

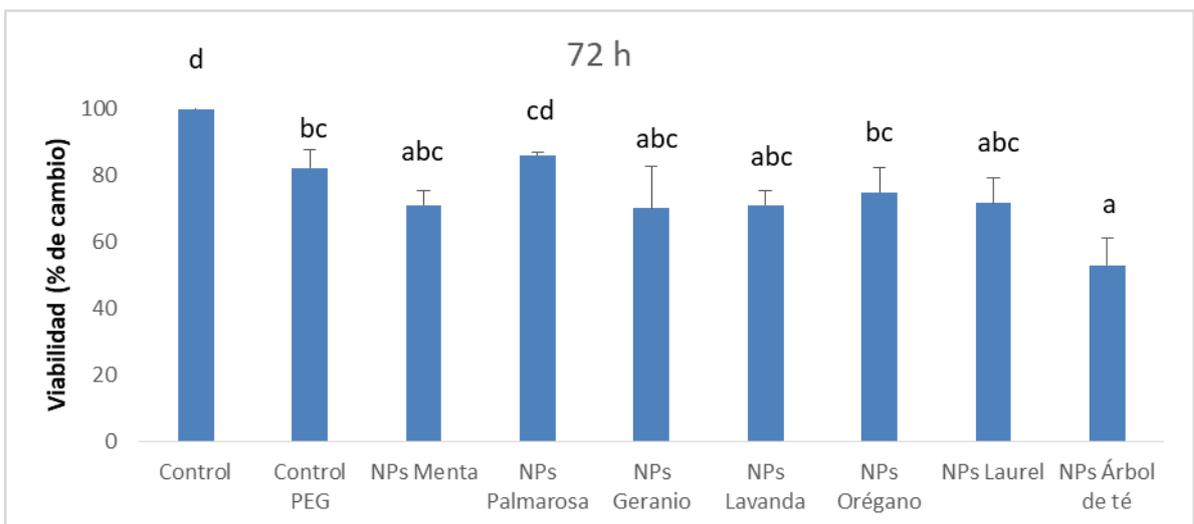
**Lámina 4.7.A.** Efectos de las NPs en la viabilidad celular a las 24 h de exposición.



**Lámina 4.7.B.** Efectos de las NPs en la viabilidad celular a las 48 h de exposición.



**Lámina 4.7.C.** Efectos de las NPs en la viabilidad celular a las 72 h de exposición.



#### 4. D. Discusión

El control de mosquitos vectores es fundamental para alcanzar numerosos objetivos de desarrollo sostenible según las Naciones Unidas (Stensgaard et al., 2019). En los últimos años, debido a la exhaustiva investigación de las propiedades larvicidas de los AEs, se ha postulado que estos podrían reemplazar a algunos de los insecticidas sintéticos (Esmaili et al., 2021). Pavela (2015) propone que un AE pueden considerarse un larvicida si el efecto tóxico que este genera deviene en un valor  $CL_{50} < 100$  ppm. En nuestro estudio, los valores calculados de  $CL_{50}$  de los AEs fueron entre 40,19 a 101,32 ppm, mientras que las NPs entre 14,74 a 96,60 ppm. Basados en este criterio, tanto los AEs (a excepción del aceite de árbol de té) como sus NPs pueden considerarse productos eficaces en el control de larvas de *Cx. p. pipiens*. En relación con esta observación, trabajos previos demostraron la efectividad de los AEs pertenecientes a las familias Zingiberaceae, Lamiaceae, Geraniaceae, Poaceae, Myrtaceae y Amaranthaceae como larvicidas ( $CL_{50}$  menor a 100 ppm) en *Cx. p. pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *C. tritaeniorhynchus*, *Anopheles gambiae* (Giles), *A. subpictus* (Grassi), *A. albopictus* (Amer y Melhorn, 2006; Bossou et al., 2013; Govindarajan et al., 2018 Jesser et al., 2020a; Werdin et al., 2017). En cuanto a las NPs, se determinó que las elaboradas con orégano, geranio y lavanda potenciaron el efecto insecticida de los AEs. Según Lucía y Guzmán (2021), esto podría deberse a que en las NPs, los constituyentes se encuentran en mayores concentraciones respecto a los AEs libres. Resultados similares demostraron que las nanoemulsiones del AE de menta y NPs de geranio y bergamota potenciaron los efectos de los AEs con  $CL_{50} < 50$  ppm en *Cx. p. pipiens* (Jesser et al., 2020a; Werdin et al., 2017). De la misma manera, NPs de laurel, *T. ammi*, *Elettaria cardomomum* (L.) y *Cinnamomum zeylanicum* (J. Presl) potenciaron los efectos de los AEs en *A. stephensi* con  $CL_{50}$  por debajo de los 20 ppm (Sanei-Dehkordi et al., 2021; Zarenezhad et al., 2022).

Pese a que existen datos sobre el uso de nanoformulaciones en el sector fitosanitario, los nanoinsecticidas previo a su comercialización, deben pasar por exhaustivas evaluaciones, entre ellas, analizar su efecto en organismos no blanco (Walker, 2012). Bajo esta premisa, se deben

tener en cuenta los efectos tóxicos de los componentes libres como nanoformulados en organismos no blanco de ambientes acuáticos y terrestres (Antwi y Reddy, 2015; Grillo et al., 2021; Rodrigues et al., 2017). De acuerdo a Kamrin (1997), en *A. salina*, los AEs y sus NPs tuvieron efectos ligeramente tóxicos con valores de  $CL_{50}$  entre 19,92 y 77,37 ppm, para los primeros, y entre 11,38 y 63,45 ppm, para las segundas. Cabe destacar que la toxicidad promovida por las NPs de geranio en este organismo no blanco fue significativamente menor respecto al AE libre. Esto podría deberse a la pérdida de varios constituyentes del aceite durante su encapsulación en la matriz polimérica que posiblemente otorgan efectos sinérgicos a los compuestos mayoritarios en los aceites libre. De la misma manera, estudios recientes demostraron que NPs cargadas con los AEs de *P. anisum*, *T. ammi* y *Citrus lemon* (L.), *Citrus reticulata* (L.) y *Citrus sinensis* (L.) tuvieron efectos tóxicos menores o iguales que los compuestos libres en *D. magna* y en la chinche *Nesidiocoris tenuis* (Reuter) (Campolo et al., 2020; Sánchez-Gomes et al., 2022).

Teniendo en cuenta el índice de selectividad (IS), los AEs de orégano y laurel y las NPs de geranio y orégano fueron selectivos para las larvas de *Cx. p. pipiens* ( $IS > 1$ ). Esta susceptibilidad podría deberse a variaciones en los mecanismos toxicocinéticos y toxicodinámicos entre el organismo plaga y el organismo no blanco. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la aplicación directa de las NPs de geranio y orégano en reservorios de agua o su escorrentía, al ser utilizados para el control de insectos plaga de producto almacenado, podrían disminuir el desarrollo y densidad de poblaciones de mosquitos ocasionando leves efectos en los organismos no blanco. Estudios previos mostraron resultados similares en la que los AEs y sus nanoformulaciones tuvieron escasos impactos negativos en organismos no blanco acuáticos. Para el caso de los AEs, se demostró que el AE de *Mentha pulegium* (L.) fue ligeramente tóxico para *A. salina* (George et al., 2010), mientras que los AEs de *L. sidoides*, *L. alba*, *Ocimum gratissimum* (L.), *M. alternifolia*, *Peumus boldus* (Mol.) y *P. anisum* en *D. magna* (Conti et al., 2014; Miura et al., 2021; Pavela et al., 2014, 2019). Asimismo, los AEs de *Amonum sublatum* (Robx), *Origanum scabrum* (Boiss.), *Pinus kesiya* (Gord), *Schinus terebinthifolius* (Raddi) y *Kaempferia galangal* (L.) fueron

prácticamente no tóxicos en los insectos acuáticos *Anisops bouvieri* (Kirkaldi), *D. indicus* y *Acilius sulcatus* (L.) y los peces *Poecilia reticulata* (Peters) y *Gambusia affinis* (Baird y Girard) y (Alsalhi et al., 2020; Govindarajan et al., 2016a, b, 2018). Por otro lado, teniendo en cuenta las nanoformulaciones, trabajos recientes demostraron que las nanoemulsiones de los AEs de menta y palmarosa fueron ligeramente tóxicas para *A. salina* (Jesser et al., 2020a). Además, las NPs elaboradas con los aceites de *Schinus terebinthifolius* (Raddi) y *P. anisum* fueron seguras para el pez *G. affinis* y el cladóceros *D. magna* (Nenaah et al., 2022; Sanchez-Gómez et al., 2022). Por otro lado, las NPs cargadas con el AE de *Siparuna guianensis* (Aublet) mostraron una ligera y moderada toxicidad en peces (Ferreira et al., 2019). Por último, NPs de arcilla cargadas con los AEs *Foeniculum vulgare* (Mill.) y *Camellia sinensis* (L.) fueron ligeramente tóxicas para *G. affinis* y los insectos acuáticos *Cybister tripunctatus* (Olivier) y *Sphaeroderma urinator* (Dufour) (Radwan et al., 2022).

Según Sánchez-Bayo, (2012) los organismos acuáticos son más susceptibles a los efectos de los productos insecticidas que los terrestres debidos a que los primeros poseen de sistemas de detoxificación menos eficientes. En relación a esta premisa, en el presente estudio se determinó que en los organismos no blanco terrestres, los AEs y sus NPs fueron prácticamente no tóxicos a concentraciones máximas. Estudios previos demostraron la seguridad de los AEs y sus nanoformulados en ambientes terrestres; específicamente, los AEs de *Eugenia caryophyllata* (L.) y *T. vulgaris* y *Leptospermum scoparium* (Forst) fueron prácticamente no tóxicos en *T. molitor* (George et al., 2010) mientras que los AEs de *Schizogyne sericea* (L.), *Origanum syriacum subs. syriacum* (L.) *Ledum palustre* (L.), *Cuminum cyminum* (L.), *P. anisum* y *Schinus terebinthifolius* (Raddi) en larvas de *H. axyridis* y adultos de *Eisenia fétida* (Savigna) (Benelli et al., 2018, 2019a, b, 2020; Nenaah et al., 2021). En cuanto a las NPs, las elaboradas con los AEs de *P. anisum* y *T. ammi* fueron relativamente seguras para *E. fétida* (Sanchez-Gómez et al., 2022). Además, las NPs de zeína cargadas con el AE de *Azadirachta indica* (A. Juss.) no causaron toxicidad

significativa en *C. elegans* ni fitotoxicidad en *Z. mays* (Pasquoto-Stigliani et al., 2017; Pascoli et al., 2019).

En los últimos años, los avances de la nanotecnología abrieron oportunidades para la introducción nuevos insecticidas en el sector del control de insectos plaga. En consecuencia, resulta necesario profundizar los estudios ecotoxicológicos sobre organismos no blanco para comprender los impactos de las NPs a nivel ecosistémico y obtener un perfil integro su toxicidad.

A su vez, dados los potenciales efectos que las NPs pueden generar sobre la salud humana, los bioensayos que analizan la viabilidad celular resultan cruciales como una primera aproximación para estimar y medir los resultados de las interacciones entre los nanosistemas y las células (Vidau et al., 2009; Yun et al., 2017). Por ello, en este trabajo se estudió el efecto de las NPs en un modelo celular de mamífero (células de fenotipo osteoblástico). Luego de 24 h de exposición, se observó que las NPs redujeron levemente la viabilidad celular (salvo las NPs de laurel, para las cuales no se observaron diferencias significativas con el control) aunque ninguna generó efecto citotóxico. El efecto leve promovido por las NPs sobre la viabilidad celular podría deberse a que ciertos componentes de los AEs pueden afectar la permeabilidad de las biomembranas o inactivar sistemas enzimáticos (Bhavaniramya et al., 2019; Yap et al., 2021). Una situación similar fue reportada por Jesser et al. (2020a) quienes trabajando con nanoemulsiones de aceite de menta y palmarosa sobre este mismo modelo celular reportaron efectos leves luego de 24 h. Además, se ha informado que las NPs de policaprolactona cargadas con AEs de *O. vulgare* y *Thymus capitatus* y las NPs de quitosano elaboradas con aceite *E. cardomomum* no afectaron a la viabilidad celular de queratinocitos humanos y células epiteliales de la córnea luego de 24 h de exposición (Jamil et al., 2016; Kapustová et al., 2021). Por último, las nanoemulsiones de los AEs de *C. citratus* y *E. globulus* no tuvieron efectos citotóxicos en las células mononucleares de la sangre periférica luego de 24 h (Bonferroni et al., 2017; de Godoi et al., 2017).

A las 48 h de exposición, se observó que las NPs de menta, palmarosa, lavanda y orégano reversionaron sus efectos sobre la viabilidad celular y únicamente las NPs de geranio y árbol de té ejercieron un efecto citotóxico. Es probable que la reversión observada se deba a que los efectos que generan las NPs durante las primeras 24 h se compensan, debido a que la disfunción celular ocasionada sea leve, y los procesos de adaptación y reparación celular se incrementen, promoviendo un aumento en la tasa de crecimiento de las células, que en esta fase del cultivo (hasta las 48 h) actúa como un mecanismo compensatorio. Por último, a las 72 h se observó que las NPs de geranio reversionaron sus efectos, y solo las NPs de árbol de té acentuaron su actividad citotóxica reduciendo la viabilidad celular a un 47%. Estudios previos demostraron la actividad citotóxica de terpien-4-ol y  $\alpha$ -terpineol (componentes mayoritarios de las NPs de árbol de té) en distintas líneas celulares (Chen et al., 2020; di Martile et al., 2021; Loughlin et al., 2008; Sales et al., 2020).

En líneas generales, se observó los efectos de las NPs sobre la viabilidad de células fenotipo osteoblástico disminuye a medida que el tiempo de exposición se incrementa. Aunque son necesarios mayores estudios que permitan comprender los efectos de las NPs desarrolladas en la presente tesis tanto en distintas líneas celulares como modelos animales experimentales, estos resultados preliminares permiten inferir la seguridad de estas nanoformulaciones para el ser humano y ambiente.

#### 4. E. Conclusiones

- ❖ Al analizar la actividad insecticida de los AEs y sus NPs en *Cx. p. pipiens*, se observó que las NPs de geranio, lavanda, orégano y árbol de té potenciaron los efectos de los AEs. Además, los AEs de orégano y laurel y las NPs de geranio y orégano, resultaron ser selectivos para *Cx. p. pipiens* en comparación con el organismo no blanco acuático *A. salina*.
- ❖ En cuanto a los bioensayos ecotoxicológicos realizados, se pudo observar que tanto los AEs y sus NPs presentaron una leve toxicidad para el organismo no blanco acuático *A. salina*, siendo las NPs de geranio las que generaron un menor efecto tóxico que el aceite libre. Respecto a los organismos no blanco terrestres, se pudo comprobar que los AEs y sus NPs produjeron una baja tasa de mortalidad en *T. molitor* y *B. dubia*, lo que se sugiere que son prácticamente seguros para estos organismos.
- ❖ En el bioensayo de viabilidad de celular, se comprobó que a las 24 h de exposición, ninguna de las NPs generó efecto citotóxico sobre células de fenotipo osteoblástico. A las 48 h, las NPs de geranio y árbol de té demostraron tener efectos citotóxicos. Sin embargo, a las 72 h, las NPs de geranio revirtieron dichos efectos, mientras que solo las NPs de árbol de té intensificaron su actividad citotóxica disminuyendo la viabilidad celular a un 47%.

---

## 5. CONSIDERACIONES FINALES

---

Esta tesis proporciona una perspectiva sobre el diseño y la caracterización de nanopartículas poliméricas de PEG 6000 cargadas con AEs con el fin último de potenciar sus efectos letales y subletales en insectos plaga de producto almacenado, *S. oryzae* y *L. serricorne*.

Inicialmente, se analizó la composición química de los AEs de menta, palmarosa, geranio, lavanda, orégano, laurel y árbol de té por CG-EM indicando que distintos monoterpenos y sesquiterpenos fueron los compuestos mayoritarios. Teniendo en cuenta la bioactividad, los AEs de geranio y orégano fueron los más efectivos en el control de *S. oryzae* y *L. serricorne*, dado que generaron efectos letales (por exposición a superficies tratadas y/o a vapores) y subletales (repelencia y alteraciones en el comportamiento y/o fisiología nutricional) (Láminas 5.1 y 5.2).

Es sabido que las fuertes limitaciones de los AEs, como su baja solubilidad y alta inestabilidad, dificultan su uso masivo como bioinsecticidas en el sector agroalimentario. Por esta razón, se desarrollaron nanopartículas poliméricas de todos los AEs por el método de fusión-dispersión, que es una metodología de síntesis práctica, reproducible y efectiva. El PEG 6000 se utilizó como sistema matricial dado que es un polímero de fácil procesamiento y biodegradable. Los estudios de caracterización revelaron que las NPs tuvieron una EC>70% y un rango de tamaños entre 191 y 534 nm, con una distribución monodispersa (aceites de palmarosa, geranio, orégano y laurel), variable (AEs de lavanda y árbol de té) y polidispersa (aceite de menta). Al igual que los aceites libres, las NPs de geranio y orégano fueron las más efectivas en el control de *S. oryzae* y *L. serricorne*, al mantener y potenciar la actividad insecticida de los AEs por exposición a superficies tratadas, los efectos repelentes, y alterar la fisiología nutricional y variables conductuales de ambos insectos plaga (Láminas 5.1 y 5.2); además ambas NPs fueron selectivas para larvas de *Cx p. pipiens*. De este estudio, se desprende que los constituyentes mayoritarios de los AEs aumentan en porcentaje relativo dentro de las NPs y sumado a su pequeño tamaño, alta solubilidad y agregación, permiten una mayor absorción e interacción de estos productos con

los tejidos biológicos, incrementando su bioactividad.

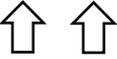
Por otro lado, dados los resultados de los estudios ecotoxicológicos, se puede concluir que todas las NPs resultaron ser seguras para organismos no blanco terrestres como *T. molitor* y *B. dubia*, y ligeramente tóxicas en *A. salina*. En células de fenotipo osteoblástico, luego de 72 h de exposición, solo las NPs elaboradas con AE de árbol de té generaron efectos citotóxicos.

Los futuros trabajos deberán estar destinados a desarrollar NPs a través de metodologías que usen menor cantidad de polímero y generen NPs con una distribución homogénea de tamaños. También, debería enfocarse en la encapsulación de mezclas binarias o ternarias de componentes de AEs con diferentes vías de acción probadas junto con insecticidas sintéticos a fin de generar nanoformulaciones con actividad sinérgica que disminuyan la cantidad a aplicar de productos sintéticos.

Además, resulta necesario ampliar los estudios sobre las interacciones de las NPs poliméricas desarrolladas en este trabajo con microorganismos, plantas y otros animales de diferentes niveles tróficos para tener datos sobre el destino ambiental de estas nanoformulaciones y su posible impacto negativo en diversos organismos no blanco.

A fin de visualizar los efectos a campo, se espera que las NPs puedan aplicarse en las superficies de las instalaciones de acopio, maquinarias, sistemas de norias y cintas de transporte (previo al ingreso del grano a depósito), para controlar y prevenir las infestaciones de insectos plaga.

En conclusión, en esta tesis se contribuyó al desarrollo de nuevos nanoinsecticidas, consolidando la metodología de formulación y sentando los efectos letales y subletales en insectos plaga de productos almacenado.

**Lámina 5.1.** Resumen de los efectos letales y subletales de los AEs y sus NPs en *S. oryzae*.  Alta actividad por exposición a superficies tratadas, fumigante y repelencia.  Fuertes modificaciones de variables comportamentales.  Disminución de índices nutricionales.

	AEs	NPs
Menta	 Contacto   Repelencia	  Contacto   Repelencia
Palmarosa	  Contacto  Combinación   Repelencia	  Contacto  Combinación   Repelencia
Geranio	  Contacto  Fumigante  Combinación  Repelencia  Comportamiento  TCR, TRC y ECAI	  Contacto  Combinación  Repelencia  Comportamiento  TCR, TRC y ECAI
Lavanda	 Contacto  Repelencia	 Combinación  Repelencia
Orégano	 Contacto  Combinación   Repelencia  TCR, TRC y ECAI	  Contacto  Combinación   Repelencia  TCR, TRC y ECAI
Laurel	 Contacto  Fumigante  Combinación  Repelencia	 Combinación  Repelencia
Árbol de té	 Contacto   Fumigante  Repelencia  Comportamiento	  Contacto   Repelencia  Comportamiento

**Lámina 5.1.** Resumen de los efectos letales y subletales de los AEs y sus NPs en *L. serricorne*.   Alta actividad por exposición a superficies tratadas, fumigante y repelencia.  Fuertes modificaciones de variables comportamentales.  Disminución de índices nutricionales.

	AEs	NPs
Menta	 Contacto   Repelencia  Combinación	 Contacto   Repelencia  Combinación
Palmarosa	  Contacto   Repelencia	 Contacto  Combinación   Repelencia
Geranio	 Contacto   Fumigante  Repelencia  Comportamiento  TCR, TRC y ECAI	  Contacto  Combinación  Repelencia  Comportamiento  TCR, TRC y ECAI
Lavanda	 Contacto  Repelencia  Combinación  Comportamiento	 Contacto  Repelencia  Comportamiento
Orégano	 Contacto  Combinación   Repelencia  Comportamiento  TCR, TRC y ECAI	  Contacto  Combinación   Repelencia  Comportamiento  TCR, TRC y ECAI
Laurel	 Contacto  Fumigante  Repelencia  Comportamiento	 Contacto  Repelencia
Árbol de té	 Contacto  Fumigante  Repelencia  Comportamiento	 Contacto   Repelencia  Comportamiento

---

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

Abdel-Aziz, H., Hasaneen, M.N., Omar, A. (2016). Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14, 17.

Abdel-Fattah, N.A., Boraie, D. (2017). Fumigant and repellent effects of some natural oils against *Sitophilus oryzae* (L.) and *Callosobruchus maculatus* (F.). *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 95, 123-131.

Abdelgaleil, S.A., Mohamed, M.I., Badawy, M. E., El-arami, S.A. (2009). Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. *Journal of chemical ecology*, 35, 518-525.

Abdelgaleil, S.A.M., Gad, H.A., Ramadan, G.R., El-Bakry, A.M., El-Sabrout, A.M. (2021). Monoterpenes: chemistry, insecticidal activity against stored product insects and modes of action—a review. *International Journal of Pest Management*, 1-23.

Abdel-Hady, A.A., Ramadan, M.M., Lü, J., Hashem, A.S. (2021). High-temperature shock consequences on the red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and the rice weevil (*Sitophilus oryzae*). *Journal of Thermal Biology*, 100, 103062.

Abdollahdokht, D., Gao, Y., Faramarz, S., Poustforoosh, A., Abbasi, M., Asadikaram, G., Nematollahi, M.H. (2022). Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: An overview on recent advances. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 9, 1-19.

Abou Baker, D.H., Amarowicz, R., Kandeil, A., Ali, M.A., Ibrahim, E.A. (2021). Antiviral activity of *Lavandula angustifolia* L. and *Salvia officinalis* L. essential oils against avian influenza H5N1 virus. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 100135.

Abouelatta, A.M., Keratum, A.Y., Ahmed, S.I., El-Zun, H.M. (2020). Repellent, contact and fumigant activities of geranium (*Pelargonium graveolens* L.'Hér) essential oils against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.). *International Journal of Tropical Insect Science*, 40, 1021-1030.

Abriata, J.P., Turatti, R.C., Luiz, M.T., Raspantini, G.L., Tofani, L.B., do Amaral, R. L. Marchetti, J. M. (2019). Development, characterization and biological in vitro assays of paclitaxel-loaded PCL polymeric nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 96, 347-355.

Adak, T., Kumar, J., Dey, D., Shakil, N.A., Walia, S. (2012). Residue and bio-efficacy evaluation of controlled release formulations of imidacloprid against pests in soybean (*Glycine max*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47, 226-231.

Adarkwah, C., Ulrichs, C., Schaarschmidt, S., Badii, B.K., Addai, I.K., Obeng-Ofori, D., Schöller, M. (2014). Potential of Hymenopteran larval and egg parasitoids to control stored-product beetle and moth infestation in jute bags. *Bulletin of Entomological Research*, 104, 534-542.

Adel, I., Seada, M.A., Arab, R.A., Seif, A.I. (2018). Contact toxicity of four essential oils, a synthetic insecticide and three monoterpenoids against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae).

Adedara, I.A., Mohammed, K.A., Da-Silva, O.F., Salaudeen, F.A., Gonçalves, F.L., Rosemberg, D.B., Farombi, E.O. (2022). Utility of cockroach as a model organism in the assessment of toxicological impacts of environmental pollutants. *Environmental advances*, 100195.

Adeoye, O., Cabral-Marques, H. (2017). Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: a mini review. *International Journal of Pharmaceutics*, 531, 521-531.

Adisa, I.O., Pullagurala, V.L.R., Peralta-Videa, J.R., Dimkpa, C.O., Elmer, W.H., Gardea-Torresdey, J.L., White, J.C. (2019). Recent advances in nano-enabled fertilizers and pesticides: a critical review of mechanisms of action. *Environmental Science: Nano*, 6, 2002-2030.

Adler, C. (2003). Working Group" Integrated Protection of Stored Products". IOBC WPRS Bulletin, 26, 93-94.

Ahmadi, Z., Saber, M., Akbari, A., Mahdavinia, G.R. (2018). Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 111-119.

Ahmadi, Z., Saber, M., Bagheri, M., Mahdavinia, G.R. (2017). *Achillea millefolium* essential oil and chitosan nanocapsules with enhanced activity against *Tetranychus urticae*. *Journal of Pest Science*, 91, 837-848.

Akhtar, Y., Pages, E., Stevens, A., Bradbury, R., da Camara, C.A., Isman, M.B. (2012). Effect of chemical complexity of essential oils on feeding deterrence in larvae of the cabbage looper. *Physiological Entomology*, 37, 81-91.

Akhtar, Y., Yeoung, Y.R., Isman, M.B. (2008). Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. *Phytochemistry Reviews*, 7, 77-88.

Akhtar, M.S., Degaga, B., Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *Journal Issues ISSN*, 2350, 1588.

Aldridge, W.N. (1990). An assessment of the toxicological properties of pyrethroids and their neurotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 21, 89-104.

Ali, A.M., Ibrahim, A.M. (2018). Castor and camphor essential oils alter hemocyte populations and induce biochemical changes in larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisduval)(Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21, 631-637.

Al-Harbi, N.A., Al Attar, N., Hikal, D.M., Mohamed, S.E., Abdel Latef, A.A.H., Ibrahim, A.A., Abdein, M.A. (2021). Evaluation of insecticidal effects of plants essential oils extracted from basil, black seeds and lavender against *Sitophilus oryzae*. *Plants*, 10, 829.

Allotey, J., Unanaowo, I.E. (1993). Aspects of the biology of *Lasioderma serricorne* (F.) on selected food media under tropical conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, 14, 595-601.

Allouche, J. (2013). Synthesis of organic and bioorganic nanoparticles: an overview of the preparation methods. *Nanomaterials: a danger or a promise?* 27-74.

AlSalhi, M.S., Elumalai, K., Devanesan, S., Govindarajan, M., Krishnappa, K., Maggi, F. (2020). The aromatic ginger *Kaempferia galanga* L. (Zingiberaceae) essential oil and its main compounds are effective larvicidal agents against *Aedes vittatus* and *Anopheles maculatus* without toxicity on the non-target aquatic fauna. *Industrial Crops and Products*, 158, 113012.

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

Anderson, D.T. (1967). Larval development and segment formation in the branchipod crustaceans *Limnadia stanleyana* King (Conchostraca) and *Artemia salina* (L.)(Anostraca). *Australian Journal of Zoology*, 15, 47-91.

Andrić, G.G., Marković, M.M., Adamović, M., Daković, A., Golić, M.P., Kljajić, P.J. (2012). Insecticidal potential of natural zeolite and diatomaceous earth formulations against rice weevil (Coleoptera: Curculionidae) and red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 105, 670-678.

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

- Ansari, M.S., Moraiet, M.A., Ahmad, S. (2014). Insecticides: impact on the environment and human health. In *Environmental deterioration and human health* (pp. 99-123). Springer, Dordrecht.
- Anton, S., Gadenne, C. (1999). Effect of juvenile hormone on the central nervous processing of sex pheromone in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5764-5767.
- Al Ashry, H.A., Kenawy, M.A., Shobrak, M. (2018). Ecological aspects of the Bancroftian filariasis vectors, *Culex pipiens* and *Cx. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Hail. Saudi Arabia. *Int. J. Mosq. Res.* 5, 25-32.
- Antwi, F. B., Reddy, G.V. (2015). Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(3), 915-923.
- Anukiruthika, T., Jian, F., Jayas, D.S. (2021). Movement and behavioral response of stored product insects under stored grain environments-A review. *Journal of Stored Products Research*, 90, 101752.
- Aprotosoai, A.C., Gille, E., Trifan, A., Luca, V.S., Miron, A. (2017). Essential oils of *Lavandula* genus: a systematic review of their chemistry. *Phytochemistry Reviews*, 16, 761-799.
- Arana Escalante, S.G. (2018). Manejo en cuativerio de *Tenebrio molitor* (coleoptera tenebrionidae) usando cinco tipos de harina.
- Arana-Sánchez, A., Estarrón-Espinosa, M., Obledo-Vázquez, E. N., Padilla-Camberos, E., Silva-Vázquez, R., Lugo-Cervantes, E. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* HBK) with different composition when microencapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 585-590.
- Araújo-Neto, R.P., Silva-Freitas, E. L., Carvalho, J. F., Pontes, T.R.F., Silva, K.L., Damasceno, I.H. M., Carriço, A.S. (2014). Monodisperse sodium oleate coated magnetite high susceptibility

nanoparticles for hyperthermia applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 364, 72-79.

Arthur, F.H., Takahashi, K., Hoernemann, C.K., Soto, N. (2003). Potential for autumn aeration of stored rough rice and the potential number of generations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky in milled rice in Japan. *Journal of Stored Products Research*, 39, 471-487.

Asiamah, J.Y., Tachie-Menson, J.W., Agyirifo, D.S., Agbeko, R., Essem, F. (2020). Pesticides; A necessary evil in the agricultural value chain-A review. *STED Journal*, 53-63.

Aslan, İ., Çalmaşur, Ö., Şahin, F., Çağlar, Ö. (2005). Insecticidal effects of essential plant oils against *Ephestia kuehniella* (Zell.), *Lasioderma serricorne* (F.) and *Sitophilus granarius* (L.) *Journal of Plant Diseases and Protection*, 257-267.

Ataei, P., Gholamrezai, S., Movahedi, R., Aliabadi, V. (2021). An analysis of farmers' intention to use green pesticides: The application of the extended theory of planned behavior and health belief model. *Journal of Rural Studies*, 81, 374-384.

Athanassiou, C., Bray, D.P., Hall, D.R., Phillips, C., Vassilakos, T.N. (2018). Factors affecting field performance of pheromone traps for tobacco beetle, *Lasioderma serricorne*, and tobacco moth, *Ephestia elutella*. *Journal of Pest Science*, 91, 1381-1391.

Athanassiou, C.G., Arthur, F.H. (Eds.). (2018). Recent advances in stored product protection. Berlin, Heidelberg: Springer (p. 273).

Athanassiou, C.G., Arthur, F.H., Hartzler, K.L. (2018). Efficacy of low temperatures for the control of all life stages of *Plodia interpunctella* and *Liposcelis bostrychophila*. *Journal of Pest Science*, 91, 1363-1369.

Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Benelli, G., Losic, D., Rani, P.U., Desneux, N. (2018). Nanoparticles for pest control: current status and future perspectives. *Journal of Pest Science*, 91, 1-15.

- Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Evergetis, E., Katsoula, A.M., Haroutounian, S.A. (2013). Insecticidal efficacy of silica gel with *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* (Pinales: Cupressaceae) essential oil against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 106, 1902-1910.
- Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Sciarretta, A., Trematerra, P. (2016). Mating disruption of *Ephestia kuehniella* (Zeller)(Lepidoptera: Pyralidae) in a storage facility: spatio-temporal distribution changed after long-term application. *Journal of Stored Products Research*, 67, 1-12.
- Athanassiou, C.G., Kavallieratos, N.G., Vayias, B.J., Tomanović, Ž., Petrović, A., Rozman, V., Milovanović, D. (2011). Laboratory evaluation of diatomaceous earth deposits mined from several locations in central and southeastern Europe as potential protectants against coleopteran grain pests. *Crop Protection*, 30, 329-339.
- Athanassiou, C.G., Riudavets, J., Kavallieratos, N.G. (2011). Preventing stored-product insect infestations in packaged-food products. *Stewart Postharvest Rev*, 3, 1.
- Attaullah, M.K.Z., Zahoor, M.A., Mubarik, M.S., Rizvi, H., Majeed, H.N., Zulhussnain, M., Qamer, S. (2020). Insecticidal, biological and biochemical response of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to some indigenous weed plant extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 106.
- Ávila, D.S., Roncato, J.F., Jacques, M.T. (2018). Nanotoxicology assessment in complementary/alternative models. *Energy, Ecology and Environment*, 3, 72-80.
- Bachrouch, O., Jemaa, J.M.B., Talou, T., Marzouk, B., Abderraba, M. (2010). Fumigant toxicity of *Pistacia lentiscus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. *Bulletin of Insectology*, 63, 129-135.
- Bahrami, R., Kocheili, F., Ziaee, M. (2016). Effects of asafoetida, geranium and walnut leaves essential oils on nutritional indices and progeny reduction on *Rhyzopertha dominica* adults (Coleoptera: Bostrychidae). *Journal of Crop Protection*, 5, 369-375.

- Bagheri, R., Ariaii, P., Motamedzadegan, A. (2021). Characterization, antioxidant and antibacterial activities of chitosan nanoparticles loaded with nettle essential oil. *Journal of Food measurement and characterization*, 15, 1395-1402.
- Bantz, A., Camon, J., Froger, J.A., Goven, D., Raymond, V. (2018). Exposure to sublethal doses of insecticide and their effects on insects at cellular and physiological levels. *Current opinion in insect science*, 30, 73-78.
- Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., Sarmiento, B. (2020). The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *Journal of Essential Oil Research*, 32, 279-295.
- Baranová, B. (2020). Bio-insecticidal efficacy of four essential oils against adults of *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and larvae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientific Bulletin of the Uzhhorod University. Series Biology*, (48).
- Barbosa, D.R.S., de Oliveira, J.V., da Silva, P.H., Breda, M.O., de Andrade Dutra, K., Lopes, F. S., de Araújo, A.M. (2020). Efficacy of bioactive compounds and their association with different cowpea cultivars against their major stored pest. *Pest Management Science*, 76, 3770-3779.
- Barbosa, L.C.A., Filomeno, C.A., Teixeira, R.R. (2016). Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus spp.* essential oils. *Molecules*, 21, 1671.
- Baricevic, D., Bartol, T. (2002). The biological/pharmacological activity of the *Origanum* genus. *Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles, Oregano. The genera Origanum and Lippia*, 25, 177-213.
- Barra, P., Rosso, L., Nesci, A., Etcheverry, M. (2013). Isolation and identification of entomopathogenic fungi and their evaluation against *Tribolium confusum*, *Sitophilus zeamais*, and *Rhyzopertha dominica* in stored maize. *Journal of Pest Science*, 86, 217-226.

Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Dicko, M.H. (2010). Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules*, 15, 7825-7839.

Batista, F.A., Fontele, S.B.C., Santos, L.K.B., Filgueiras, L.A., Nascimento, S.Q., e Sousa, J. M.D.C., Mendes, A.N. (2020). Synthesis, characterization of  $\alpha$ -terpineol-loaded PMMA nanoparticles as proposed of therapy for melanoma. *Material Today Communication*, 22, 100762.

Bayramzadeh, N., Mehrkhou, F., Pourmirza, A.A., Mahmoudian, M. (2019). Fumigant toxicity of two nano-capsulated essential oils with sublethal rate of phosphine against three stored-product pests. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 21, 857-872.

Beigi, M., Toriki-Harchegani, M., Ghasemi Pirbalouti, A. (2018). Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha x piperita* L.) leaves under different drying methods. *International Journal of Food Properties*, 21, 267-276.

Benelli, G. (2018). Mode of action of nanoparticles against insects. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 12329-12341.

Benelli, G., Canale, A., Flamini, G., Cioni, P.L., Demi, F., Ceccarini, L., Conti, B. (2013). Biototoxicity of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae) essential oil against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and its parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *Industrial Crops and Products*, 50, 596-603.

Benelli, G., Ceccarelli, C., Zeni, V., Rizzo, R., Verde, G.L., Sinacori, M., Canale, A. (2022). Lethal and behavioural effects of a green insecticide against an invasive polyphagous fruit fly pest and its safety to mammals. *Chemosphere*, 287, 132089.

Benelli, G., Maggi, F., Romano, D., Stefanini, C., Vaseeharan, B., Kumar, S., Canale, A. (2017). Nanoparticles as effective acaricides against ticks—a review. *Ticks and tick-borne diseases*, 8, 821-826.

Benelli, G., Pavela, R., Cianfaglione, K., Sender, J., Danuta, U., Maślanko, W., Aguzzi, C. (2020). Ascaridole-rich essential oil from marsh rosemary (*Ledum palustre*) growing in Poland exerts insecticidal activity on mosquitoes, moths and flies without serious effects on non-target organisms and human cells. *Food and Chemical Toxicology*, 138, 111184.

Benelli, G., Pavela, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Bartolucci, F., Canale, A., Maggi, F. (2019a). *Origanum syriacum* subsp. *syracum*: From an ingredient of Lebanese 'manoushe' to a source of effective and eco-friendly botanical insecticides. *Industrial Crops and Product*, 134, 26-32.

Benelli, G., Pavela, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Canale, A., Senthil-Nathan, S., Maggi, F. (2018). Not just popular spices! Essential oils from *Cuminum cyminum* and *Pimpinella anisum* are toxic to insect pests and vectors without affecting non-target invertebrates. *Industrial crops and products*, 124, 236-243.

Benelli, G., Pavela, R., Rakotosaona, R., Nzekoue, F.K., Canale, A., Nicoletti, M., Maggi, F. (2020). Insecticidal and mosquito repellent efficacy of the essential oils from stem bark and wood of *Hazomalania voyronii*. *Journal of ethnopharmacology*, 248, 112333.

Benelli, G., Pavela, R., Zorzettom C., Sánchez-Mateo, C.C., Santini, G., Canale, A., Maggi, F. (2019b). Insecticidal activity of the essential oil from *Schizogyne sericea* (Asteraceae) on four insect pests and two non-target species. *Entomologia Generalis*, 39, 9-18.

Benelli, G., Pavoni, L., Zeni, V., Ricciardi, R., Cosci, F., Cacopardo, G., Lucchi, A. (2020). Developing a highly stable *Carlina acaulis* essential oil nanoemulsion for managing *Lobesia botrana*. *Nanomaterials*, 10, 1867.

Berrehal, D., Boudiar, T., Hichem, L., Khalfallah, A., Kabouche, A., Al-Freihat, A., Kabouche, Z. (2010). Comparative composition of four essential oils of oregano used in Algerian and Jordanian folk medicine. *Natural product communications*, 5, 1934578X1000500631.

Bhalla, Y., Gupta, V.K., Jaitak, V. (2013). Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3643-3653.

Bharani, R.A., Namasivayam, S.K.R. (2017). Biogenic silver nanoparticles mediated stress on developmental period and gut physiology of major lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Fab.)(Lepidoptera: Noctuidae)—An eco-friendly approach of insect pest control. *Journal of environmental chemical engineering*, 5, 453-467.

Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M.S., Vijayakumar, R., Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & oil science and technology*, 2, 49-55.

Bhargava, P., Kumar, A., Kumar, S., Azad, C.S. (2018). Impact of fungicides and nanoparticles on *Ustilaginoidea virens* causing false smut disease of rice. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7, 1541-1544.

Bilia, A.R., Isacchi, B., Righeschi, C., Guccione, C., Bergonzi, M.C. (2014). Flavonoids loaded in nanocarriers: an opportunity to increase oral bioavailability and bioefficacy. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 1-16.

Bilia, A.R., Piazzini, V., Asprea, M., Risaliti, L., Vanti, G., Bergonzi, M.C. (2018). Plants extracts loaded in nanocarriers: An emergent formulating approach. *Natural Product Communications*, 13, 1934578X1801300914.

Bishop, C.D. (1995). Antiviral activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (maiden amp; Betche) Cheel (arbol de té) against tobacco mosaic virus. *Journal of Essential Oil Research*, 7, 641-644.

Biswas, J. K., Sarkar, D., 2019. Nanopollution in the aquatic environment and ecotoxicity: No nano issue! *Curr. Pollut. Rep.* 5, 4-7.

Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M.F.L., Cabral, C., Pires, I.M. (2018). Anticancer properties of essential oils and other natural products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 12.

Bonferoni, M.C., Sandri, G., Rossi, S., Usai, D., Liakos, I., Garzoni, A., Ferrari, F. (2017). A novel ionic amphiphilic chitosan derivative as a stabilizer of nanoemulsions: Improvement of antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 385-392.

Borzoui, E., Naseri, B., Abedi, Z., Karimi-Pormehr, M.S. (2016). Lethal and sublethal effects of essential oils from *Artemisia khorassanica* and *Vitex pseudo-negundo* against *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental entomology*, 45, 1220-1226.

Bossou, A.D., Mangelinckx, S., Yedomonhan H, Boko, P.M., Akogbeto, M.C., De Kimpe, N., Sohounhloue, D.C. (2013). Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasit Vectors* 6:337.

Bougherra, H.H., Bedini, S., Flamini, G., Cosci, F., Belhamel, K., Conti, B. (2015). *Pistacia lentiscus* essential oil has repellent effect against three major insect pests of pasta. *Industrial Crops and Products*, 63, 249-255.

Bouzouita, N., Nafti, A., Chaabouni, M.M., Lognay, G.C., Marlier, M., Zghoulli, S., Thonart, P. (2001). Chemical composition of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 116-117.

Boyer, S., Zhang, H., Lempérière, G. (2012). A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bulletin of entomological research*, 102, 213-229.

Brito, V.D., Achimón, F., Pizzolitto, R.P., Ramírez Sánchez, A., Gómez Torres, E.A., Zygadlo, J.A., Zunino, M.P. (2021). An alternative to reduce the use of the synthetic insecticide against the maize weevil *Sitophilus zeamais* through the synergistic action of *Pimenta racemosa* and *Citrus sinensis* essential oils with chlorpyrifos. *Journal of Pest Science*, 94, 409-421.

Brügger, B.P., Martínez, L.C., Plata-Rueda, A., Castro, B.M.D.C.E., Soares, M.A., Wilcken, C.F., Zanuncio, J.C. (2019). Bioactivity of the *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its

terpenoid constituents on the predatory bug, *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Scientific reports, 9, 8358.

Brügger, B.P., Plata-Rueda, A., Wilcken, C.F., Souza, L.S.A.D., Serrão, J.E., Carvalho, A.G., Martínez, L.C. (2021). Exposure to lemongrass essential oil and its components causes behavior and respiratory disturbs in *Anticarsia gemmatalis*. International Journal of Pest Management, 1-9.

Brusca, R.C. Brusca, G.J. (1990). Invertebrates. Sinauer, Sunderland.

Bulgarini, G., Bortolini, S., Maistrello, L. (2021). Repellent activity of essential oils on adults of *Halyomorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) in different physiological-behavioural phases. Journal of Applied Entomology, 145, 575-586.

Caballero, K., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. (2012). Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii* *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. Journal of Stored Products Research, 50, 62-65.

Caballero-Gallardo, K., Rodriguez-Niño, D., Fuentes-Lopez, K., Stashenko, E., Olivero-Verbel, J. (2021). Chemical composition and bioactivity of essential oils from *Cymbopogon nardus* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Against *Ulomoides dermestoides* (Fairmaire, 1893)(Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Essential Oil Bearing Plants, 24, 547-560.

Cagáň, L., Apacsová Fusková, M., Hlávková, D., Skoková Habuštová, O. (2022). Essential Oils: Useful Tools in Storage-Pest Management. Plants, 11, 3077.

Caldefie-Chézet, F., Fusillier, C., Jarde, T., Laroye, H., Damez, M., Vasson, M.P., Guillot, J. (2006). Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 20, 364-370.

Calzoni, E., Cesaretti, A., Polchi, A., Di Michele, A., Tancini, B., Emiliani, C. (2019). Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies. *Journal of Functional Biomaterials*, 10, 4.

Campolo, O., Cherif, A., Ricupero, M., Siscaro, G., Grissa-Lebdi, K., Russo, A., Palmeri, V. (2017) Citrus peel essential oil nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: chemical properties and biological activity. *Sci Rep* 7:1-10.

Campolo, O., Giunti, G., Laigle, M., Michel, T., Palmeri, V. (2020). Essential oil-based nano-emulsions: Effect of different surfactants, sonication and plant species on physicochemical characteristics. *Industrial Crops and Products*, 157, 112935.

Campolo, O., Giunti, G., Russo, A., Palmeri, V., Zappalà, L. (2018). Essential oils in stored product insect pest control. *Journal of Food Quality*, 1-18.

Campolo, O., Puglisi, I., Barbagallo, R.N., Cherif, A., Ricupero, M., Biondi, A., Zappala, L. (2020). Side effects of two citrus essential oil formulations on a generalist insect predator, plant and soil enzymatic activities. *Chemosphere*, 257, 127252.

Campos, E.V.R., De Oliveira, J.L., Da Silva, C.M.G., Pascoli, M., Pasquoto, T., Lima, R., Fraceto, L. F. (2015). Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of carbendazim and tebuconazole in agricultural applications. *Scientific Reports*, 5, 1-14.

Cao, J.Q., Guo, S.S., Wang, Y., Pang, X., Geng, Z. F., Du, S.S. (2018). Toxicity and repellency of essential oil from *Evodia lenticellata* Huang fruits and its major monoterpenes against three stored-product insects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 160, 342-348.

Cao, J.Q., Guo, S.S., Wang, Y., Pang, X., Geng, Z.F., Du, S.S. (2018). Contact toxicity and repellency of the essential oils of *Evodia lenticellata* Huang and *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. leaves against three stored product insects. *Journal of Oleo Science*, 67, 1027-1034.

Cao, J.Q., Pang, X., Guo, S.S., Wang, Y., Geng, Z.F., Sang, Y.L., Du, S.S. (2019). Pinene-rich essential oils from *Haplophyllum dauricum* (L.) G. Don display anti-insect activity on two stored-product insects. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 140, 1-8.

Cao, Y., Xu, K., Zhu, X., Bai, Y., Yang, W., Li, C. (2019). Role of modified atmosphere in pest control and mechanism of its effect on insects. *Frontiers in physiology*, 10, 206.

Cardoso, A., Balcarce, L.E.I. (2013). Incidencia y control de insectos plaga en silobolsas. Curso Internacional de Agricultura de Precisión. Manfredi, Córdoba.

Carstens, K., Anderson, J., Bachman, P., De Schrijver, A., Dively, G., Federici, B., Waggoner, A. (2012). Genetically modified crops and aquatic ecosystems: considerations for environmental risk assessment and non-target organism testing. *Transgenic research*, 21, 813-842.

Carvalho, M.O., Pires, I., Barbosa, A., Barros, G., Riudavets, J., Garcia, A.C., Navarro, S. (2012). The use of modified atmospheres to control *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae* on stored rice in Portugal. *Journal of Stored Products Research*, 50, 49-56.

Carvalho, O., Charalambides, M.N., Djekić, I., Athanassiou, C., Bakalis, S., Benedito, J., Tonda, A. (2021). Modelling Processes and Products in the Cereal Chain. *Foods*, 10, 82.

Ćavar, S., Maksimović, M. (2012). Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. *Food control*, 23, 263-267.

Cavion, F., Fusco, L., Sosa, S., Manfrin, C., Alonso, B., Zurutuza, A., Pelin, M. (2020). Ecotoxicological impact of graphene oxide: toxic effects on the model organism *Artemia franciscana*. *Environmental Science: Nano*, 7, 3605-3615.

Chandra, J.H., Raj, L.A., Namasivayam, S.K.R., Bharani, R.A. (2013). Improved pesticidal activity of fungal metabolite from *Nomureae rileyi* with chitosan nanoparticles. In *International Conference on Advanced Nanomaterials & Emerging Engineering Technologies* (pp. 387-390). IEEE.

- Chaudhari, A.K., Singh, V.K., Kedia, A., Das, S., Dubey, N.K. (2021). Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: prospects and retrospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 18918-18940.
- Chen, D., Wang, J., Sullivan, D.A., Kam, W.R., Liu, Y. (2020). Effects of terpinen-4-ol on meibomian gland epithelial cells in vitro. *Cornea*, 39, 1541.
- Chhipa, H. (2017). Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. *Environmental chemistry letters*, 15, 15-22.
- Chowański, S., Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Bufo, S.A. (2016). A review of bioinsecticidal activity of Solanaceae alkaloids. *Toxins*, 8, 60.
- Chua, L.Y., Chong, C.H., Chua, B.L., Figiel, A. (2019). Influence of drying methods on the antibacterial, antioxidant and essential oil volatile composition of herbs: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 450-476.
- Clemente, Z., Grillo, R., Jonsson, M., Santos, N.Z.P., Feitosa, L.O., Lima, R., Fraceto, L.F. (2014). Ecotoxicological evaluation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 4911-4917.
- Conti, B., Flamini, G., Cioni, P.L., Ceccarini, L., Macchia, M., Benelli, G. (2014). Mosquitocidal essential oils: are they safe against non-target aquatic organisms? *Parasitology Research*, 113, 251.
- Correa, Y.D.C.G., Faroni, L.R., Haddi, K., Oliveira, E.E., Pereira, E.J.G. (2015). Locomotory and physiological responses induced by clove and cinnamon essential oils in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 125, 31-37.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. (2001). Determining the antimicrobial actions of arbol de té oil. *Molecules*, 6, 87-91.

- Crucho, C.I., Barros, M.T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 771-784.
- Culliney, T.W. (2014). Crop losses to arthropods. In *Integrated pest management* (pp. 201-225). Springer, Dordrecht.
- Cytryńska, M., Wojda, I., Jakubowicz, T. (2016). How insects combat infections. In *Lessons in immunity* (pp. 117-128). Academic Press.
- D'souza, A.A., Shegokar, R. (2016). Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert opinion on drug delivery*, 13, 1257-1275.
- Daglish, G.J., Nayak, M.K., Arthur, F.H., Athanassiou, C.G. (2018). Insect pest management in stored grain. In *Recent advances in stored product protection*. Springer, Berlin, Heidelberg. 45-63.
- Dara, S.K. (2019). The new integrated pest management paradigm for the modern age. *Journal of Integrated Pest Management*, 10, 12.
- de Andrade Brito, F., Bacci, L., da Silva Santana, A., da Silva, J.E., de Castro Nizio, D.A., de Lima Nogueira, P.C., Blank, A.F. (2020). Toxicity and behavioral alterations caused by essential oils of *Croton tetradenius* and their major compounds on *Acromyrmex balzani*. *Crop protection*, 137, 105259.
- de Araújo, A.M.N., Faroni, L.R.D.A., de Oliveira, J. V., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., Breda, M. O., de França, S.M. (2017). Lethal and sublethal responses of *Sitophilus zeamais* populations to essential oils. *Journal of Pest Science*, 90, 589-600
- De França, S.M., Breda, M.O., Barbosa, D.R., Araujo, A.M., Guedes, C.A. (2017). The sublethal effects of insecticides in insects. *Biological control of pest and vector insects*, 23-39.

de Godoi, S.N., Quatrin, P.M., Sagrillo, M.R., Nascimento, K., Wagner, R., Klein, B., Ourique, A.F. (2017). Evaluation of stability and in vitro security of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil. *BioMed Research International*, 2017.

de Lira Pimentel, C.S., Albuquerque, B.N.D.L., da Rocha, S.K.L., da Silva, A.S., da Silva, A.B.V., Bellon, R., Navarro, D.M.D.A.F. (2022). Insecticidal activity of the essential oil of *Piper corcovadensis* leaves and its major compound (1-butyl-3, 4-methylenedioxybenzene) against the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Pest Management Science*, 78, 1008-1017.

de Matos, S.P., Teixeira, H.F., de Lima, Á.A., Veiga-Junior, V.F., Koester, L.S. (2019). Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: A review. *Biomolecules*. 9, 138.

de Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., Goncalves da Silva, C.M., Pasquoto, T., Lima, R., Fraceto, L.F. (2015). Solid lipid nanoparticles co-loaded with simazine and atrazine: preparation, characterization, and evaluation of herbicidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 422-432.

Djernæs, M., Varadinova, Z., Kotyl, M., Eulitz, U., Klass, K. (2020). Phylogeny and life history evolution of Blaberoidea (Blattodea). *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 78, 29-67.

Deka, B., Babu, A., Baruah, C., Barthakur, M. (2021). Nanopesticides: A systematic review of their prospects with special reference to tea pest management. *Frontiers in Nutrition*, 8.

Delay, M., Frimmel, F.H. (2012). Nanoparticles in aquatic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402, 583-592.

Deruytter, D., Coudron, C.L., Teerlinck, S. (2019). Influence of crate size, oviposition time, number of adults and cannibalism on the reproduction of *Tenebrio molitor*. *Journal of Insects as Food and Feed*, 5, 247-255.

Deruytter, D., Coudron, C.L., Claeys, J. (2021). The influence of wet feed distribution on the density, growth rate and growth variability of *Tenebrio molitor*. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7, 141-149.

Devi, S.R., Thomas, A., Rebijith, K.B., Ramamurthy, V.V. (2017). Biology, morphology and molecular characterization of *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 73, 135-141.

Di Martile, M., Garzoli, S., Sabatino, M., Valentini, E., D'Aguanno, S., Ragno, R., Del Bufalo, D. (2021). Antitumor effect of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol in combination with target therapy in melanoma models. *Cell Death Discovery*, 7, 127.

Diniz do Nascimento, L., Barbosa de Moraes, A.A., Santana da Costa, K., Pereira Galúcio, J.M., Taube, P.S., Leal Costa, C. M., Guerreiro de Faria, L.J. (2020). Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications. *Biomolecules*, 10, 988.

Dittgen, C.L., da Silveira, M.M., Kröning, D.P., Ziegler, V., de Oliveira, M., Ferreira, C.D. (2021). Chemical, physical, and sensory changes in rice subjected to UV-C radiation and its acceptability to rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae) and humans. *Journal of Stored Products Research*, 90, 101760.

Djenane, D., Aïder, M., Yangüela, J., Idir, L., Gómez, D., Roncalés, P. (2012). Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157: H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat science*, 92, 667-674.

Ealia, S.A.M., Saravanakumar, M.P. (2017). A review on the classification, characterization, synthesis of nanoparticles and their application. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263, 032019.

Ebadollahi, A., Safaralizadeh, M., Pourmirza, A. (2010). Fumigant toxicity of *Lavandula stoechas* L. oil against three insect pests attacking stored products. Journal of Plant Protection Research.

Ebadollahi, A., Ziaee, M., Palla, F. (2020). Essential oils extracted from different species of the Lamiaceae plant family as prospective bioagents against several detrimental pests. *Molecules*, 25, 1556.

Edde, P.A. (2019). Biology, ecology, and control of *Lasioderma serricorne* (F.)(Coleoptera: Anobiidae): A review. *Journal of Economic Entomology*, 112, 1011-1031.

Ehler, L.E. (2006). Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest management Science*, 62, 787-789.

El-Ghany, N.M.A. (2019). Semiochemicals for controlling insect pests. *Journal of Plant Protection Research*, 59.

Engelmann, F. (2013). *The Physiology of Insect Reproduction: International Series of Monographs in Pure and Applied Biology: Zoology*. Elsevier.

El-Salam, A., Ahmed, M.E. (2010). Fumigant toxicity of seven essential oils against the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) and the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, F. Toxicology & Pest Control*, 2, 1-6.

Ephrem, E., Greige-Gerges, H., Fessi, H., & Charcosset, C. (2014). Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *Journal of microencapsulation*, 31, 746-753.

Eroglu, N., Emekci, M., Athanassiou, C.G. (2017). Applications of natural zeolites on agriculture and food production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3487-3499.

Esan, V., Elanchezhiyan, C., Mahboob, S., Al-Ghanim, K.A., Al-Misned, F., Ahmed, Z., Marimuthu, G. (2020). Toxicity of *Trewia nudiflora*-mediated silver nanoparticles on mosquito larvae and non-target aquatic fauna. *Toxin Reviews*, 1-12.

Esmaili, M., Vojoudi, S., Parsaeyan, E. (2013). Fumigant toxicity of essential oils of *Mentha pulegium* L. on adults of *Callosobruchus maculatus*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma serricorne* and *Sitophilus oryzae* in laboratory conditions. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences, Giza, 3, 732-735.

Esmaili, F., Sanei-Dehkordi, A., Amoozegar, F., Osanloo, M. (2021). A review on the use of essential oil-based nanoformulations in control of mosquitoes. Biointerface Res Appl Chem, 11, 12516-12529.

Farré, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barceló, D. (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. Analytical and bioanalytical chemistry, 393, 81-95.

Fernández-Díaz, C., Coste, O., Malta, E.J. (2017). Polymer chitosan nanoparticles functionalized with *Ulva ohnoi* extracts boost in vitro ulvan immunostimulant effect in *Solea senegalensis* macrophages. Algal research, 26, 135-142.

Feroz, A. (2020). Efficacy and cytotoxic potential of deltamethrin, essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Cinnamomum camphora* and their synergistic combinations against stored product pest, *Trogoderma granarium* (Everts). Journal of Stored Products Research, 87, 101614.

Ferreira, M.A.M., Filipe, J.A. (2018). Nanotechnology Applications—The Future Arrived Suddenly. Computational Approaches in Biomedical Nano-Engineering, 23-41.

Ferreira, T.P., Haddi, K., Corrêa, R.F., Zapata, V.L., Piau, T.B., Souza, L.F., Grisolia, C.K. (2019). Prolonged mosquitocidal activity of *Siparuna guianensis* essential oil encapsulated in chitosan nanoparticles. PLoS Negl. Trop. Dis. 13, e0007624.

Filippova, A.A., Szhénova, T.M., Golovina, N.V., Garnova, N.Y., Bokov, D.O. (2020). Standardization of geranium essential oil. Moscow University Chemistry Bulletin, 75, 200-206.

- Filomeno, C.A., Barbosa, L.C.A., Teixeira, R.R., Pinheiro, A.L., de Sá Farias, E., Ferreira, J.S., Picanço, M.C. (2020). Chemical diversity of essential oils of Myrtaceae species and their insecticidal activity against *Rhyzopertha dominica*. *Crop Protection*, 137, 105309.
- Flint, M.L., Bosch, R.V.D. (1981). A history of pest control. In *Introduction to Integrated Pest Management* (pp. 51-81). Springer, Boston, MA.
- Foster, J.G., Gervan, C.A., Coghill, M.G., Fraser, L.H. (2021). Are arthropod communities in grassland ecosystems affected by the abundance of an invasive plant?. *Oecologia*, 196, 1-12.
- Frank, D.S., Matzger, A.J. (2018). Probing the interplay between amorphous solid dispersion stability and polymer functionality. *Molecular Pharmaceutics*, 15, 2714-2720.
- Gallardo, A., Picollo, M.I., González-Audino, P., Mougabure-Cueto, G. (2012). Insecticidal activity of individual and mixed monoterpenoids of geranium essential oil against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Journal Medical Entomology*, 49, 332-335.
- Gallardo, A., Picollo, M.I., Mougabure-Cueto, G. (2015). Lethal activity of individual and mixed monoterpenoids of geranium essential oil on *Musca domestica*. *Parasitology research*, 114, 1229-1232.
- Gandhi, P.R., Jayaseelan, C., Kamaraj, C., Rajasree, S.R., Mary, R.R. (2018). In vitro antimalarial activity of synthesized TiO<sub>2</sub> nanoparticles using *Momordica charantia* leaf extract against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Applied Biomedicine*, 16, 378-386.
- George, A., Shah, P.A., Shrivastav, P.S. (2019). Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *International journal of pharmaceutics*, 561, 244-264.
- George, D.R., Sparagano, O.A.E., Port, G., Okello, E., Shiel, R.S., Guy, J.H. (2010). Toxicity of plant essential oils to different life stages of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, and non-target invertebrates. *Med Vet Entomol*, 24, 9-15.

Germinara, G.S., Di Stefano, M.G., De Acutis, L., Pati, S., Delfine, S., De Cristofaro, A., Rotundo, G. (2017). Bioactivities of *Lavandula angustifolia* essential oil against the stored grain pest *Sitophilus granarius*. *Bulletin of Insectology*, 70, 129-138.

Ghorbanpour, M., Bhargava, P., Varma, A., Choudhary, D.K. (2020). Biogenic Nano-Particles and their Use in Agro-ecosystems (1<sup>st</sup> Ed.). Singapore: Springer, (Chapter 6).

Gomes, S.I., Scott-Fordsmand, J.J., Campos, E.V., Grillo, R., Fraceto, L.F., Amorim, M.J. (2019). On the safety of nanoformulations to non-target soil invertebrates—an atrazine case study. *Environ. Sci. Nano*. 6, 1950-1958.

Gourgouta, M., Baliota, G.V., Morrison III, W.R., Domingue, M.J., Athanassiou, C.G. (2021). Comparative capture of *Trogoderma granarium* (Coleoptera: Dermestidae) and *T. variabile* in floor traps in single species releases with previously captured conspecific or heterospecific individuals. *Journal of Economic Entomology*, 114, 2591-2597.

Govindarajan, M., Rajeswary, M., Senthilmurugan, S., Vijayan, P., Alharbi, N.S., Kadaikunnan, S., Benelli, G. (2018). Larvicidal activity of the essential oil from *Amomum subulatum* Roxb. (Zingiberaceae) against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), and non-target impact on four mosquito natural enemies. *Physiol. Mol. Plant. P.* 101, 219-224.

Govindarajan, M., Kadaikunnan, S., Alharbi, N.S., Benelli, G. (2016b). Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 23228-23238.

Govindarajan, M., Rajeswary, M., Benelli, G. (2016a). Chemical composition, toxicity and non-target effects of *Pinus kesiya* essential oil: an eco-friendly and novel larvicide against malaria, dengue and lymphatic filariasis mosquito vectors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 129, 85-90.

Granata, G., Stracquadiano, S., Leonardi, M., Napoli, E., Consoli, G.M.L., Cafiso, V., Geraci, C. (2018). Essential oils encapsulated in polymer-based nanocapsules as potential candidates for application in food preservation. *Food chemistry*, 269, 286-292.

Grillo, R., Clemente, Z., de Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., Chalupe, V.C., Jonsson, C.M., Fraceto, L.F. (2015). Chitosan nanoparticles loaded the herbicide paraquat: the influence of the aquatic humic substances on the colloidal stability and toxicity. *Journal of hazardous materials*, 286, 562-572.

Grillo, R., Fraceto, L. F., Amorim, M. J., Scott-Fordsmand, J.J., Schoonjans, R., Chaudhry, Q. (2021). Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124148.

Grillo, R., Pereira, A.E., Nishisaka, C.S., De Lima, R., Oehlke, K., Greiner, R., Fraceto, L.F. (2014). Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: an environmentally safer alternative for weed control. *Journal of Hazardous Materials*, 278, 163-171.

Guedri, M.M., Romdhane, M., Lebrihi, A., Mathieu, F., Bouajila, J. (2020). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of Tunisian, France and Austrian *Laurus nobilis* (Lauraceae) essential oils. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48, 1929-1940.

Guettal, S., Tine, S., Hamaidia, K., Tine-Djebbar, F., Soltani, N. (2021). Effect of Citrus limonum essential oil against granary weevil, *Sitophilus granarius* and its chemical composition, biological activities and energy reserves. *International Journal of Tropical Insect Science*, 41, 1531-1541.

Gürsu, B.Y. (2020). Potential antibiofilm activity of farnesol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles against *Candida albicans*. *Journal of Analytical Science and Technology*, 11, 1-10.

Haddi, K., Oliveira, E.E., Faroni, L.R., Guedes, D.C., Miranda, N.N. (2015). Sublethal exposure to clove and cinnamon essential oils induces hormetic-like responses and disturbs behavioral and

respiratory responses in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of economic entomology*, 108, 2815-2822.

Hadidi, M., Pouramin, S., Adinepour, F., Haghani, S., Jafari, S.M. (2020). Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities. *Carbohydrate polymers*, 236, 116075.

Hagstrum, D.W., Flinn, P. W. (2014). Modern stored-product insect pest management. *Journal of Plant Protection Research*, 54, 205-210.

Hajji-Hedfi, L., Chhipa, H. (2021). Nano-based pesticides: challenges for pest and disease management. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 6, 1-8.

Haleem, A.M. (2020). Fabrication and characterization for phosphate nanofertilizer through polymer coating technique: synthesized of nanofertilizer. *Engineering and Technology Journal*, 38, 34-40.

Hamel, D., Rozman, V., Liška, A. (2020). Storage of Cereals in Warehouses with or without Pesticides. *Insects*, 11, 846.

Harbach, R.E. (2012). *Culex pipiens*: species versus species complex—taxonomic history and perspective. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 28, 10-23.

Harbach, R.E., Dahl, C., White, G.B. (1985). *Culex pipiens* Linnaeus (Diptera, Culicidae)-concepts, type designations, and description. *Proc Entomol Soc Wash*, 87, 24.

Hart, P.H., Brand, C., Carson, C.F., Riley, T.V., Prager, R.H., Finlay-Jones, J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, 49, 619-626.

Hasheminejad, N., Khodaiyan, F., Safari, M. (2019). Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. *Food chemistry*, 275, 113-122.

Hategekimana, A., Erler, F. (2020). Comparative repellent activity of single, binary and ternary combinations of plant essential oils and their major components against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127, 873-881.

He, F., Liu, J.Y., Chen, L.J., Cheng, Z.Q., Cheng, M.Q., Du, S.S., Hao, Y.J. (2021). Contact toxicity and repellence of essential oil from *Senecio scandens* and its major components against three stored product insects. *Natural Product Research*, 1-5.

Heidary, M., Karimzadeh, J., Jafari, S., Negahban, M., Shakarami, J. (2022). Aphicidal activity of urea–formaldehyde nanocapsules loaded with the *Thymus daenensis* Celak essential oil on *Brevicoryne brassicae* L. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42, 1285-1296.

Hernández, A.F., Gil, F., Lacasaña, M. (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Archives of Toxicology*, 91, 3211-3223.

Hernández, A.F., Parrón, T., Tsatsakis, A.M., Requena, M., Alarcón, R., López-Guarnido, O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136-145.

Heydarzade, A., Valizadegan, O., Negahban, M., Mehrkhou, F. (2019). Efficacy of *Mentha spicata* and *Mentha pulegium* essential oil nanoformulation on mortality and physiology of *Tribolium castaneum* (Col.: Tenebrionidae). *Journal of Crop Protection*, 8, 501-520.

Hikal, W.M., Baeshen, R.S., Said-Al Ahl, H.A. (2017). Botanical insecticide as simple extractives for pest control. *Cogent Biology*, 3, 1404274.

Himeidan, Y.E., Kweka, E.J., Temu, E.A. (2012). Insecticides for vector-borne diseases: Current use, benefits, hazard and resistance (pp. 683-708). London: INTECH Open Access Publisher.

Hocsman, L.D., Arach, O.A. (2015). Agro-food and agro-energy complex. Argentine national-developmentalism on the global scene.

Holtze, C., Rowat, A.C., Agresti, J.J., Hutchison, J.B., Angile, F.E., Schmitz, C.H.J., Weitz, D.A. (2008). Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions. *Lab on a Chip*, 8, 1632-1639.

Hosie, A., Sattelle, D., Aronstein, K. (1997). Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in neurosciences*, 20, 578-583.

Hughes, S., Asmatulu, E. (2021). Nanotoxicity and Nanoecotoxicity: Introduction, Principles, and Concepts. *Nanotoxicology and Nanoecotoxicology Vol. 1*, 1-19.

Hulla, J.E., Sahu, S.C., Hayes, A.W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, 34, 1318-1321.

Husain, F.M., Ahmad, I., Khan, M.S., Ahmad, E., Tahseen, Q., Khan, M.S., Alshabib, N.A. (2015). Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 420.

Hussein, H. S., Salem, M. Z., Soliman, A. M. (2017). Repellent, attractive, and insecticidal effects of essential oils from *Schinus terebinthifolius* fruits and *Corymbia citriodora* leaves on two whitefly species, *Bemisia tabaci*, and *Trialeurodes ricini*. *Scientia Horticulturae*, 216, 111-119.

Iavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D.H., Shvedova, A.A. (2017). Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and applied pharmacology*, 329, 96-111.

Ibarra, L.E., Tarres, L., Bongiovanni, S., Barbero, C.A., Kogan, M.J., Rivarola, V.A., Yslas, E.I. (2015). Assessment of polyaniline nanoparticles toxicity and teratogenicity in aquatic environment using *Rhinella arenarum* model. *Ecotoxicological and Environmental safety*, 114, 84-92.

Ibrahim, S.S. (2022). Polyethylene Glycol Nanocapsules Containing *Syzygium aromaticum* Essential Oil for the Management of Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica*. *Food Biophysics*, 1-12.

Ikawati, S., Himawan, T., Abadi, A.L., Tarno, H. (2021). Toxicity nanoinsecticide based on clove essential oil against *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of pesticide science, 46, 222-228.

Ikawati, S., Himawan, T., Abadi, A.L., Tarno, H. (2020). Thermostability, photostability, and toxicity of clove oil nanoparticles against *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Laemophloeidae). Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 21, 4764-4771.

Iqbal, C., Pavela, R. (2019). Essential oils as active ingredients of botanical insecticides against aphids. Journal of Pest Science, 1-16.

Ingabire, J.P., Hategekimana, A., Bhuvanewari, K., Mohan, S., Ganapathy, S. (2013). Management of pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* (F) population by nitrogen based modified atmosphere. Journal of Entomology and Zoology Studies, 1, 48-52.

Iqbal, D., Khan, M.S., Waiz, M., Rehman, M.T., Alaidarous, M., Jamal, A., Alturaiki, W. (2021). Exploring the binding pattern of geraniol with acetylcholinesterase through in silico docking, molecular dynamics simulation, and in vitro enzyme inhibition kinetics studies. Cells, 10, 3533.

Ismail, S. (2021). Synergistic efficacy of plant essential oils with cypermethrin and chlorpyrifos against *Spodoptera littoralis*, field populations in egypt. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 9, 128-137.

Ismail, S.M., Hassan, N. A., Wahba, T.F., Shaker, N. (2022). Chemical composition and bioactivities of Melaleuca alternifolia essential oil and its main constituents against *Spodoptera littoralis* (Boisadual, 1833). Bulletin of the National Research Centre, 46, 1-6.

Isman, M.B. (2020). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. Phytochemistry Reviews, 19, 235-241.

Isman, M.B., Grieneisen, M.L. (2014). Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. Trends in Plant Science, 19, 140-145.

Ivask, A., Kurvet, I., Kasemets, K., Blinova, I., Aruoja, V., Suppi, S., Kahru, A. (2014). Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS one*, 9, e102108.

Izadi, H., Mohammadzadeh, M., Mehrabian, M. (2019). Cold tolerance of the *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), under different thermal regimes: impact of cold acclimation. *Journal of Economic Entomology*, 112, 1983-1988.

Jacques, M.T., Oliveira, J.L., Campos, E.V., Fraceto, L.F., Ávila, D.S. (2017). Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicological and Environmental safety*, 139, 245-253.

Jamil, B., Abbasi, R., Abbasi, S., Imran, M., Khan, S.U., Ihsan, A., Imran, M. (2016). Encapsulation of cardamom essential oil in chitosan nano-composites: In-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and cytotoxicity studies. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1580.

Jampilek, J., Kos, J., Kralova, K. (2019). Potential of nanomaterial applications in dietary supplements and foods for special medical purposes. *Nanomaterials*, 9, 296.

Jampílek, J., Kráľová, K. (2015). Application of nanotechnology in agriculture and food industry, its prospects and risks. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 22, 321-361.

Jampílek, J., Kráľová, K. (2022). Biopesticides for management of arthropod pests and weeds. In *Biopesticides*. Woodhead Publishing. 133-158

Jankowska, M., Lapied, B., Jankowski, W., Stankiewicz, M. (2019). The unusual action of essential oil component, menthol, in potentiating the effect of the carbamate insecticide, bendiocarb. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158, 101-111.

Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J., Stankiewicz, M. (2018). Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review. *Molecules*, 23, 34.

Jankowska, M., Wiśniewska, J., Fałtynowicz, Ł., Lapied, B., Stankiewicz, M. (2019). Menthol increases bendiocarb efficacy through activation of octopamine receptors and protein kinase A. *Molecules*, 24, 3775.

Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9, 1050-1074.

Jesser, E., Yeguerman, C., Gili, V., Santillan, G., Murray, A.P., Domini, C., Werdin-González, J.O. (2020a). Optimization and characterization of essential oil nanoemulsions using ultrasound for new ecofriendly insecticides. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8, 7981-7992.

Jesser, E., Yeguerman, C., Stefanazzi, N., Gomez, R., Murray, A.P., Ferrero, A.A., Werdin-González, J.O. (2020b). Ecofriendly approach for the control of a common insect pest in the food industry, combining polymeric nanoparticles and post-application temperatures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68, 5951-5958.

Jesser, E.N., Werdin-González, J.O., Murray, A.P., Ferrero, A.A. (2017). Efficacy of essential oils to control the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20, 1122-1129.

Jezkova, T., Wiens, J.J. (2017). What explains patterns of diversification and richness among animal phyla?. *The American Naturalist*, 189, 201-212.

Jian, F., Subramanyam, B., Jayas, D.S., White, N.D. (2013). Models to predict mortality of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) exposed to elevated temperatures during structural heat treatments. *Journal of Economic Entomology*, 106, 2247-2258.

Jiang, X., Xu, H., Zheng, N., Yin, X., Zhang, L. (2020). A chemosensory protein detects antifeedant in locust (*Locusta migratoria*). *Insects*, 12, 1.

- Jummes, B., Sganzerla, W.G., da Rosa, C.G., Noronha, C.M., Nunes, M.R., Bertoldi, F.C., Barreto, P.L.M. (2020). Antioxidant and antimicrobial poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles loaded with *Cymbopogon martinii* essential oil. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101499.
- Jung, O., Smeets, R., Hartjen, P., Schnettler, R., Feyerabend, F., Klein, M., Kopp, A. (2019). Improved in vitro test procedure for full assessment of the cytocompatibility of degradable magnesium based on ISO 10993-5/-12. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 255.
- Kah, M., Hofmann, T. (2014). Nanopesticide research: current trends and future priorities. *Environment international*, 63, 224-235.
- Kah, M., Kookana, R.S., Gogos, A., Bucheli, T.D. (2018). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. *Nature nanotechnology*, 13, 677-684.
- Kah, M., Weniger, A.K., Hofmann, T. (2016). Impacts of (Nano) formulations on the Fate of an insecticide in soil and consequences for environmental exposure assessment. *Environmental science & technology*, 50, 10960-10967.
- Kahkeshani, N., Hadjiakhoondi, A., Navidpour, L., Akbarzadeh, T., Safavi, M., Karimpour-Razkenari, E., Khanavi, M. (2018). Chemodiversity of *Nepeta menthoides* Boiss. & Bohse. essential oil from Iran and antimicrobial, acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic properties of 1, 8-cineole chemotype. *Natural product research*, 32, 2745-2748.
- Kamrin, M.A., (1997). *Pesticides profiles toxicity. Environmental impact and fate.* Lewis Publishers, EUA, 676 p.
- Kanda, D., Kaur, S., Koul, O. (2017). A comparative study of monoterpenoids and phenylpropanoids from essential oils against stored grain insects: acute toxins or feeding deterrents. *Journal of Pest Science*, 90, 531-545.
- Kapustová, M., Puškárová, A., Bučková, M., Granata, G., Napoli, E., Annušová, A., Geraci, C. (2021). Biofilm inhibition by biocompatible poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules loaded with

essential oils and their cyto/genotoxicity to human keratinocyte cell line. *International Journal of Pharmaceutics*, 606, 120846.

Karalija, E., Dahija, S., Parić, A., Zeljković, S.Ć. (2020). Phytotoxic potential of selected essential oils against *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle, an invasive tree. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, 100219.

Kariyanna, B., Mohan, M., Rajeev Gupta, B.N. (2017). Species composition and distribution pattern of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae) across India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 6, 1677-1688.

Kavallieratos, N.G., Athanassiou, C.G., Vayias, B.J., Kotzamanidis, S., Synodis, S.D. (2010). Efficacy and adherence ratio of diatomaceous earth and spinosad in three wheat varieties against three stored-product insect pests. *Journal of Stored Products Research*, 46, 73-80.

Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2017). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 908-931.

Khater, H.F. (2012). Prospects of botanical biopesticides in insect pest management. *Pharmacologia*, 3, 641-656.

Khoobdel, M., Ahsaei, S.M., Farzaneh, M. (2017). Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with *Rosmarinus officinalis* essential oil in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Entomological Research*, 47, 175-184.

Kiran, S., Kujur, A., Patel, L., Ramalakshmi, K., Prakash, B. (2017). Assessment of toxicity and biochemical mechanisms underlying the insecticidal activity of chemically characterized *Boswellia carterii* essential oil against insect pest of legume seeds. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 139, 17-23.

Kitherian, S. (2017). Nano and bio-nanoparticles for insect control. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7, 1-9.

Kljajić, P., Andrić, G., Jokić, G., Pražić-Golić, M., Blažić, T., Jovičić, I. (2021). Protection of organic cereals from insect and rodent pests in a warehouse by combined use of traps and sticky tapes. *Pesticidi i Fitomedicina*, 36, 61-72.

Kongratarpon, T., Tauthong, P., Sutantawong, M., Wongpiyasatid, A. (2003). Effects of gamma radiation on the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (F.). Thailand.

Kookana, R.S., Boxall, A.B., Reeves, P.T., Ashauer, R., Beulke, S., Chaudhry, Q., Van den Brink, P.J. (2014). Nanopesticides: guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62, 4227-4240.

Köstler, S. (2012). Polyaldehydes: homopolymers, block copolymers and promising applications. *Polymer international*, 61, 1221-1227.

Koul, O. (2008). Phytochemicals and insect control: an antifeedant approach. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27, 1-24.

Krukemeyer, M.G., Krenn, V., Huebner, F., Wagner, W., Resch, R. (2015). History and possible uses of nanomedicine based on nanoparticles and nanotechnological progress. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 6, 336.

Kumar, A., Singh, P., Gupta, V., Prakash, B. (2020). Application of nanotechnology to boost the functional and preservative properties of essential oils. In *Functional and preservative properties of phytochemicals*, 241-267.

Kumar, J., Shakil, N.A., Singh, M.K., Pankaj, Singh, M.K., Pandey, A., Pandey, R.P. (2010). Development of controlled release formulations of azadirachtin-A employing poly (ethylene glycol) based amphiphilic copolymers. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45, 310-314.

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

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

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S. (2013). Housefly (*Musca domestica* L.) control potential of *Cymbopogon citratus* Stapf. (Poales: Poaceae) essential oil and monoterpenes (citral and 1, 8-cineole). Parasitology research, 112, 69-76.

Kumar, P., Sharma, U. (2021). PEG supported nano formulations of essential oils for agricultural applications. Natural Volatiles & Essential oils Journal, 9367-9374.

Kumar, R.S., Shiny, P.J., Anjali, C.H., Jerobin, J., Goshen, K.M., Magdassi, S., Chandrasekaran, N. (2013). Distinctive effects of nano-sized permethrin in the environment. Environmental Science and Pollution Research, 20, 2593-2602.

Kumar, S., Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Hassan, A.A., Kim, K.H. (2019). Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. Journal of Controlled Release, 294, 131-153.

La Pergola, A., Restuccia, C., Napoli, E., Bella, S., Brighina, S., Russo, A., Suma, P. (2017). Commercial and wild Sicilian *Origanum vulgare* essential oils: chemical composition, antimicrobial activity and repellent effects. Journal of essential oil research, 29, 451-460.

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

Lee, K.P., Jang, T., Rho, M.S. (2022). Recent trends in integrative insect nutrition: a nutritional geometry perspective. Korean journal of applied entomology, 61, 129-142.

Lee, S., Tsao, R., Peterson, C., Coats, J.R. (1997). Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari:

Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*, 90, 883-892.

Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E.P., Vazquez-Olivo, G., Heredia, J.B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22, 989.

Li, Y., Maciel, D., Rodrigues, J., Shi, X., & Tomas, H. (2015). Biodegradable polymer nanogels for drug/nucleic acid delivery. *Chemical reviews*, 115(16), 8564-8608.

Liang, J., Shao, Y., Wu, H., An, Y., Wang, J., Zhang, J., Kong, W. (2021). Chemical constituents of the essential oil extracted from *Elsholtzia densa* and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. *Foods*, 10, 2304.

Liang, J.Y., An, Y., Hou, Z. B., Wang, X.D., Zhou, F., Zhang, J., Wang, J.L. (2022). Acute toxicity of *Zanthoxylum bungeanum* against two stored product insects and synergistic interactions between two major compounds limonene and linalool. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 1-6.

Liao, M., Yang, Q.Q., Xiao, J.J., Huang, Y., Zhou, L.J., Hua, R.M., Cao, H.Q. (2018). Toxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil to the mitochondrion and NAD<sup>+</sup>/NADH dehydrogenase in *Tribolium confusum*. *PeerJ*, 6, e5693.

Lichtfouse, E., Morin-Crini, N., Fourmentin, M., Zemmouri, H., do Carmo Nascimento, I.O., Queiroz, L.M., Crini, G. (2019). Chitosan for direct bioflocculation of wastewater. *Environ. Chem. Lett.* 1, 1-19.

Liébana Ortega, A. (2020). Materiales Nanoestructurados de Carbono. Aplicaciones Catalíticas.

Lima, J.K.A., Chicuta, C.P.D.L., de Macedo Costa, M., da Costa, M.L.A., Grillo, L.A.M., dos Santos, A.F., Gomes, F.S. (2020). Biototoxicity of aqueous extract of *Genipa americana* L. bark on red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst). *Industrial Crops and Products*, 156, 112874.

Liška, A., Rozman, V., Korunić, Z., Halamić, J., Galović, I., Lucić, P., Baličević, R. (2015). The potential of Croatian diatomaceous earths as grain protectant against three stored-product insects. *Integrated Protection of Stored Products IOBC-WPRS Bulletin*, 111, 107-113.

Loha, K.M., Shakil, N.A., Kumar, J., Singh, M.K., Srivastava, C. (2012). Bio-efficacy evaluation of nanoformulations of  $\beta$ -cyfluthrin against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 47, 687-691.

López, M. D., Pascual-Villalobos, M.J. (2015). Are monoterpenoids and phenylpropanoids efficient inhibitors of acetylcholinesterase from stored product insect strains?. *Flavour and Fragrance Journal*, 30(1), 108-112.

López, M.D., Campoy, F.J., Pascual-Villalobos, M.J., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C.J. (2015). Acetylcholinesterase activity of electric eel is increased or decreased by selected monoterpenoids and phenylpropanoids in a concentration-dependent manner. *Chemico-Biological Interactions*, 229, 36-43.

López-Meneses, A.K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Rodríguez-Félix, F., Mouriño-Pérez, R.R., Cortez-Rocha, M.O. (2018). *Schinus molle* L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *LWT*, 96, 597-603.

Loughlin, R., Gilmore, B.F., McCarron, P.A., Tunney, M.M. (2008). Comparison of the cidal activity of tea tree oil and terpinen-4-ol against clinical bacterial skin isolates and human fibroblast cells. *Letters in applied microbiology*, 46, 428-433.

Lourenço, A.M., Haddi, K., Ribeiro, B.M., Corrêia, R.F., Tomé, H.V., Santos-Amaya, O., Aguiar, R. W. (2018). Essential oil of *Siparuna guianensis* as an alternative tool for improved lepidopteran control and resistance management practices. *Scientific reports*, 8, 1-13.

Lucia, A., Guzmán, E. (2021). Emulsions containing essential oils, their components or volatile semiochemicals as promising tools for insect pest and pathogen management. *Advances in Colloid and Interface Science*, 287, 102330.

Mackled, M. I., EL-Hefny, M., Bin-Jumah, M., Wahba, T. F., Allam, A. A. (2019). Assessment of the toxicity of natural oils from *Mentha piperita*, *Pinus roxburghii*, and *Rosa* spp. against three stored product insects. *Processes*, 7, 861.

Maedeh, M., Hamzeh, I., Hossein, D., Majid, A., Reza, R.K., 2012. Bioactivity of essential oil from *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) against three stored-product insect species. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 15, 122-133.

Makadia, H.K., Siegel, S.J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3, 1377-1397.

Malik, S. (Ed.). (2019). *Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production*. 1<sup>st</sup> edition. Springer.

Manna, I., Bandyopadhyay, M. (2019). A review on the biotechnological aspects of utilizing engineered nanoparticles as delivery systems in plants. *Plant Gene*, 17, 100167.

Mansoor-ul-Hasan, A.A., Jafir, M., Javed, M.W., Shehzad, M., Chaudhary, M.Z., Aftab, M. (2017). Effect of temperature and relative humidity on development of *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5, 85-90.

Mariod, A.A., Mirghani, M.E.S., Hussein, I. (2017). *Unconventional oilseeds and oil sources*. Cambridge, MA, USA: academic press. (pp. 293-297).

Marouane, C.H.O.T.T. (2017). Aspects of life history of *Artemia salina* (Crustacea, Branchiopoda) from Algeria reared in different conditions of salinity. *Vie et milieu-life And enVironment*, 67, 15-20.

Maruyama, C.R., Guilger, M., Pascoli, M., Bileshy-José, N., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F., De Lima, R. (2016). Nanoparticles based on chitosan as carriers for the combined herbicides imazapic and imazapyr. *Sci. Rep.* 6, 19768.

Mason, L.J., McDonough, M. (2012). Biology, behavior, and ecology of stored grain and legume insects. *Stored product protection*, 1.

Maurya, V.K., Shakya, A., Aggarwal, M., Gothandam, K.M., Bohn, T., Pareek, S. (2021). Fate of  $\beta$ -Carotene within Loaded Delivery Systems in Food: State of Knowledge. *Antioxidants* 2021, 10, 426.

Melanie, M., Miranti, M., Kasmara, H., Malini, D.M., Husodo, T., Panatarani, C., Hermawan, W. (2022). Nanotechnology-based bioactive antifeedant for plant protection. *Nanomaterials*, 12, 630.

Melo, C.R., Blank, A.F., Oliveira, B.M.S., Santos, A.C.C., Cristaldo, P.F., Araújo, A.P.A., Bacci, L. (2021). Formicidal activity of essential oils of *Myrcia lundiana* chemotypes on *Acromyrmex balzani*. *Crop Protection*, 139, 105343.

Mills, C., Cleary, B.V., Walsh, J.J., Gilmer, J.F. (2004). Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56, 375-379.

Miura, P.T., Queiroz, S.C.N., Jonsson, C.M., Chagas, E.C., Chaves, F.C.M., Reyes, F.G. (2021). Study of the chemical composition and ecotoxicological evaluation of essential oils in *Daphnia magna* with potential use in aquaculture. *Aquac Res*, 52, 3415-3424.

Monikh, F.A., Chupani, L., Vijver, M.G., Vancová, M., Peijnenburg, W.J. (2019). Analytical approaches for characterizing and quantifying engineered nanoparticles in biological matrices from an (eco) toxicological perspective: old challenges, new methods and techniques. *Science of The Total Environment*, 660, 1283-1293.

- Morrison, W.R., Bruce, A., Wilkins, R.V., Albin, C.E., Arthur, F H. (2019). Sanitation improves stored product insect pest management. *Insects*, 10, 77.
- Mossa, A.T.H. (2016). Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Journal of environmental science and technology*, 9, 354.
- Motta-Delgado, P.A., Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6, 77-90.
- Mullen, M.A., Vardeman, J.M., Bagwell, J. (2012). Insect-Resistant Packaging. *Stored product protection*, 135.
- Müller, C. (2018). Impacts of sublethal insecticide exposure on insects—Facts and knowledge gaps. *Basic and Applied Ecology*, 30, 1-10.
- Muñoz, J., Pacios, F. (2010). Global biodiversity and geographical distribution of diapausing aquatic invertebrates: the case of the cosmopolitan brine shrimp, *Artemia* (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana*, 83, 465.
- Murali, S. (2013). Management of stored-product insect pests through biorational approaches: a review. *Biosciences*, 6, 133-137.
- Na, J.H., Nam, Y.W., Ryoo, M.I., Chun, Y.S. (2006). Control of Food Pests by Modified Atmosphere: Effects of Packing Materials and Exposure Time on the Mortality of *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella*. *Korean Journal of Applied Entomology*, 45, 363-369.
- Namasivayam, K.R.S., Aruna, A., Gokila. (2014). Evaluation of silver nanoparticles-chitosan encapsulated synthetic herbicide paraquate (AgNp-CS-PQ) preparation for the controlled release and improved herbicidal activity against *Eichhornia crassipes*. *Research Journal of Biotechnology*, 9, 19-27.

- Narayanan, M., Ranganathan, M., Subramanian, S.M., Kumarasamy, S., Kandasamy, S. (2020). Toxicity of cypermethrin and enzyme inhibitor synergists in red hairy caterpillar *Amsacta albistriga* (Lepidoptera: Arctiidae). *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 81, 1-8.
- Nasir, A., Kausar, A., Younus, A. (2015). A review on preparation, properties and applications of polymeric nanoparticle-based materials. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54, 325-341.
- Naskar, S., Kuotsu, K., Sharma, S. (2018). Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *Journal of Drug Targeting*, 27, 379-393.
- Nath, R., Saha, P., Nath, D., Choudhury, M.D., Talukdar, A.D. (2019). Plant Essential Oils and Anticancer Properties: An Update. In *Medicinal Plants*. CRC Press. 189-203
- Naveena, K., Sridhar, R.P., Roseleen, S.S.J. (2019). Host suitability for mass multiplication of the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (F.)(Coleoptera: Anobiidae) under stored conditions. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8, 1846-1850.
- Nawrot, J., Harmatha, J. (2012). Phytochemical feeding deterrents for stored product insect pests. *Phytochemistry reviews*, 11, 543-566.
- Nayak, M.K., Darglish, G.J. (2018). Importance of stored product insects. In *Recent advances in stored product protection*. Springer, Berlin, Heidelberg. 1-17.
- Nayak, M.K., Darglish, G.J., Phillips, T.W., Ebert, P.R. (2020). Resistance to the fumigant phosphine and its management in insect pests of stored products: a global perspective. *Annual Review of Entomology*, 65, 333-350.
- Nehra, M., Dilbaghi, N., Marrazza, G., Kaushik, A., Sonne, C., Kim, K.H., Kumar, S. (2020). Emerging nanobiotechnology in agriculture for the management of pesticide residues. *Journal of Hazardous Materials*, 401, 123369.

Nenaah, G.E., Almadiy, A.A., Al-Assiuty, B.A., Mahnashi, M.H. (2021). The essential oil of *Schinus terebinthifolius* and its nanoemulsion and isolated monoterpenes: investigation of their activity against *Culex pipiens* with insights into the adverse effects on non-target organisms. *Pest Management Science*.

Ni, Z.J., Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J.G., Wei, Z.J. (2021). Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 78-89.

Nikolaou, P., Marciniak, P., Adamski, Z., Ntalli, N. (2021). Controlling Stored Products' Pests with Plant Secondary Metabolites: A Review. *Agriculture*, 11, 879.

Nuruzzaman, M.D., Rahman, M.M., Liu, Y., Naidu, R. (2016). Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64, 1447-1483.

Oliveira, A.P., Santana, A.S., Santana, E.D., Lima, A.S., Faro, R.R., Nunes, R.S., Bacci, L. (2017). Nanoformulation prototype of the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol to population management of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products*, 107, 198-205.

Oliveira, C.R., Domingues, C.E., de Melo, N.F., Roat, T.C., Malaspina, O., Jones-Costa, M., Fraceto, L.F. (2019). Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. *Chemosphere*, 236, 124282.

Omara, A.E.D., Elsakhawy, T., Alshaal, T., El-Ramady, H., Kovács, Z., Fári, M. (2019). Nanoparticles: A Novel Approach for Sustainable Agro-productivity. *Environ. Biodiv. Soil Secur.* 3, 29-62.

Osanloo, M., Sedaghat, M., Sereshti, H., Rahmanian, M., Saeedi Landi, F., Amani, A. (2019). Chitosan nanocapsules of tarragon essential oil with low cytotoxicity and long-lasting activity as a green nano-larvicide. *J Nanostruct*, 9, 723-735.

- Oyediji, A.O., Okunowo, W.O., Osuntoki, A.A., Olabode, T.B., Ayo-Folorunso, F. (2020). Insecticidal and biochemical activity of essential oil from *Citrus sinensis* peel and constituents on *Callosobrunchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 168, 104643.
- Padin, S.B., Dal Bello, G.M., Vasicek, A.L. (1995). Potencial bioinsecticida de hongos entomopatogenos de plagas en granos almacenados. *Revist de la Facultad de Agronomia*, 15, 1-7.
- Palermo, D., Giunti, G., Laudani, F., Palmeri, V., Campolo, O. (2021). Essential oil-based nano-biopesticides: Formulation and bioactivity against the confused flour beetle *Tribolium confusum*. *Sustainability*, 13, 9746.
- Pandey, C., Li, W., Wang, Y., Jiang, S. (2005). Octopamine levels in *Blattella germanica* L. tissues by capillary gas chromatography with electron capture detection. *International Journal of Molecular Sciences*, 6, 188-197.
- Pandit, J., Aqil, M., Sultana, Y. (2016). Nanoencapsulation technology to control release and enhance bioactivity of essential oils. In *Encapsulations*, 597-640.
- Pang, X., Feng, Y.X., Qi, X.J., Wang, Y., Almaz, B., Xi, C., Du, S.S. (2020). Toxicity and repellent activity of essential oil from *Mentha piperita* Linn. leaves and its major monoterpenoids against three stored product insects. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 7618-7627.
- Panpatte, D.G., Jhala, Y.K. (Eds.). (2019). *Nanotechnology for Agriculture: Crop Production & Protection*. Springer Nature.
- Parra, J.R., Panizzi, A.R., Haddad, M.L. (2012). Nutritional indices for measuring insect food intake and utilization. *Insect bioecology and nutrition for integrated pest management*. CCR Press, Boca Raton, FL, 13-51.

Pascoli, M., Jacques, M.T., Agarrayua, D.A., Avila, D.S., Lima, R., Fraceto, L.F. (2019). Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective. *Science of the total environment*, 677, 57-67.

Pascoli, M., Lopes-Oliveira, P.J., Fraceto, L. F., Seabra, A.B., Oliveira, H.C. (2018). State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications: a minireview. *Energy, Ecology and Environment*, 3, 137-148.

Pasquoto-Stigliani, T., Campos, E.V., Oliveira, J.L., Silva, C.M., Bilesky-José, N., Guilger, M., De Lima, R. (2017). Nanocapsules containing neem (*Azadirachta indica*) oil: development, characterization, and toxicity evaluation. *Scientific reports*, 7, 1-12.

Pateiro, M., Barba, F.J., Domínguez, R., Santana, A.S., Khaneghah, A.M., Gavahian, M., Lorenzo, J.M. (2018). Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 113, 156-166.

Patel, H., Rawtani, D., Agrawal, Y.K. (2019). A newly emerging trend of chitosan-based sensing platform for the organophosphate pesticide detection using Acetylcholinesterase-a review. *Trends in food science & technology*, 85, 78-91.

Patiño-Bayona, W.R., Nagles Galeano, L.J., Bustos Cortes, J.J., Delgado Ávila, W.A., Herrera Daza, E., Suárez, L.E., Patiño-Ladino, O.J. (2021). Effects of essential oils from 24 plant species on *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera, Curculionidae). *Insects*, 12, 532.

Pavela, R. (2014). Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *J. Asia-Pac Entomol*, 17, 287-293.

Pavela, R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. *Industrial crops and products*, 76, 174-187.

Pavlič, B., Teslić, N., Zengin, G., Durović, S., Rakić, D., Cvetanović, A., Zeković, Z. (2021). Antioxidant and enzyme-inhibitory activity of peppermint extracts and essential oils obtained by conventional and emerging extraction techniques. *Food Chemistry*, 338, 127724.

Pereira, K.D.C., Quintela, E.D., Da Silva, D.J., Do Nascimento, V.A., Da Rocha, D.V., Forim, M.R., Casal, C.D.M. (2018). Characterization of nanospheres containing *Zanthoxylum riedelianum* Fruit essential oil and their insecticidal and deterrent activities against *Bemisia tabaci* (hemiptera: aleyrodidae). *Molecules*, 23, 2052.

Perera, A.G.W.U., Karunaratne, M.M.S.C., Chinthaka, S.D.M. (2019). Qualitative determination, quantitative evaluation and comparative insecticidal potential of *Ruta graveolens* essential oil and its major constituents in the management of two stored pests *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Corcyra cephalon*. *Sustainable Development Research*, 1.

Perrucci, S. (1995). Acaricidal activity of some essential oils and their constituents against *Tyrophagus longior*, a mite of stored food. *Journal of food protection*, 58, 560-563.

Phillips, T.W., Throne, J.E. (2010). Biorational approaches to managing stored-product insects. *Annual review of entomology*, 55, 375-397.

Pina-Barrera, A.M., Álvarez-Román, R., Báez-González, J.G., Amaya-Guerra, C.A., Rivas-Morales, C., Gallardo-Rivera, C.T., Galindo-Rodríguez, S.A. (2019). Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to increase the shelf life of table grapes (*Vitis vinifera* L.). *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 18, 549-557.

Pinkus Rendón, M.Á. (2010). El hombre y los artrópodos: un vínculo inalienable. *Península*, 5, 81-100.

Piri, A., Sahebzadeh, N., Zibaee, A., Sendi, J.J., Shamakhi, L., Shahriari, M. (2020). Toxicity and physiological effects of ajwain (*Carum copticum*, Apiaceae) essential oil and its major constituents against *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae). *Chemosphere*, 256, 127103.

Plata-Rueda, A., Fiaz, M., Brügger, B.P., Cañas, V., Coelho, R.P., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E. (2022). Lemongrass essential oil and its components cause effects on survival, locomotion, ingestion, and histological changes of the midgut in *Anticarsia gemmatalis* caterpillars. *Toxin Reviews*, 41, 208-217.

Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., da Silva Rolim, G., Coelho, R.P., Santos, M.H., de Souza Tavares, W., Serrão, J.E. (2020b). Insecticidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids (citral and geranyl acetate) against *Ulomoides dermestoides*. *Crop Protection*. 137, 105299.

Plata-Rueda, A., Martínez, L.C., da Silva Rolim, G., Coelho, R. P., Santos, M.H., de Souza Tavares, W., Serrão, J.E. (2020). Insecticidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids (citral and geranyl acetate) against *Ulomoides dermestoides*. *Crop protection*, 137, 105299.

Plata-Rueda, A., Rolim, G.D.S., Wilcken, C.F., Zanuncio, J.C., Serrão, J.E., Martínez, L.C. (2020a). Acute toxicity and sublethal effects of lemongrass essential oil and their components against the granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Insects*, 11, 379.

Plata-Rueda, A., Santos, M.H.D., Serrão, J.E., Martínez, L.C. (2022). Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) essential oil against the stored product beetle, *Sitophilus granarius*. *Agronomy*, 12, 2204.

Prakash, B., Kujur, A., Yadav, A., Kumar, A., Singh, P.P., Dubey, N.K. (2018). Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. *Food control*, 89, 1-11.

Prasad, R., Bhattacharyya, A., Nguyen, Q.D. (2017). Nanotechnology in sustainable agriculture: recent developments, challenges, and perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8, 1014.

Praveena, A., Sanjayan, K.P. (2011). Inhibition of acetylcholinesterase in three insects of economic importance by linalool, a monoterpene phytochemical. *Insect pest management, a current scenario*, 240-345.

Radwan, I.T., Baz, M.M., Khater, H., Alkhaibari, A. M., Selim, A.M. (2022). Mg-LDH nanoclays intercalated fennel and green tea active ingredient: field and laboratory evaluation of insecticidal activities against *Culex pipiens* and their non-target organisms. *Molecules*, 27, 2424.

Rai, R., Alwani, S., Badea, I. (2019). Polymeric nanoparticles in gene therapy: New avenues of design and optimization for delivery applications. *Polymers*, 11, 745.

Rajeswara Rao, B.R., Rajput, D.K., Patel, R.P. (2009). Essential oil profiles of different parts of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia Burk.). *Journal of Essential Oil Research*, 21, 519-521.

Rajkumar, V., Gunasekaran, C., Christy, I.K., Dharmaraj, J., Chinnaraj, P., Paul, C.A. (2019). Toxicity, antifeedant and biochemical efficacy of *Mentha piperita* L. essential oil and their major constituents against stored grain pest. *Pesticide biochemistry and physiology*, 156, 138-144.

Rajkumar, V., Gunasekaran, C., Paul, C. A., Dharmaraj, J. (2020). Development of encapsulated peppermint essential oil in chitosan nanoparticles: characterization and biological efficacy against stored-grain pest control. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104679.

Randriamiharisoa, R.P., Gaydou, E.M. (1987). Composition of palmarosa (*Cymbopogon martinii*) essential oil from Madagascar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35, 62-66.

Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A.S., Srivastav, A.L., Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 238, 124657.

Rao, B.R., Kaul, P.N., Syamasundar, K. V., Ramesh, S. (2005). Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.). *Industrial Crops and Products*, 21, 121-127.

Rashidipour, M., Maleki, A., Kordi, S., Birjandi, M., Pajouhi, N., Mohammadi, E., Davari, B. (2019). Pectin/chitosan/tripolyphosphate nanoparticles: efficient carriers for reducing soil sorption, cytotoxicity, and mutagenicity of paraquat and enhancing its herbicide activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 5736-5745.

Ravali, C., Rao, K.J., Anjaiah, T., Suresh, K. (2020). Effect of zeolite on soil physical and physico-chemical properties. *Journal of agricultural engineering*, 10, 776-781.

Rees D., (2004). *Insects of Stored Products*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia. 181 pp.

Regnault-Roger, C., Vincent, C., Arnason, J.T. (2012). Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. *Annual review of entomology*, 57, 405-424.

Reiskind, M.H. (2005). *Oviposition behavior and larval ecology of Culex mosquitoes in southeast Michigan*. University of Michigan.

Reno, F., Demeter, S., Degand, H., Nicolis, S.C., Lebbe, O., Martin, H., Hance, T. (2022). The modes of action of *Mentha arvensis* essential oil on the granary weevil *Sitophilus granarius* revealed by a label-free quantitative proteomic analysis. *Journal of Pest Science*, 95, 381-395.

Repetto, G., Del Peso, A., Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, 3, 1125- 1131.

Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., López-Malo, A. (2015). Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Reviews*, 7, 275-297.

Reyes-Jurado, F., Navarro-Cruz, A.R., Ochoa-Velasco, C.E., Palou, E., López-Malo, A., Ávila-Sosa, R. (2020). Essential oils in vapor phase as alternative antimicrobials: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60, 1641-1650.

Ribeiro, A.V., de Sá Farias, E., Santos, A.A., Filomeno, C.A., dos Santos, I.B., Barbosa, L.C.A., Picanço, M.C. (2018). Selection of an essential oil from *Corymbia* and *Eucalyptus* plants against *Ascia monuste* and its selectivity to two non-target organisms. *Crop Protection*, 110, 207-213.

Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., de Melo, N.R., Sanches-Silva, A. (2017). Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 61, 132e140.

Riudavates, J., Catane, C., Pons, M.J., Gabarra, R. (2006). Response of eleven stored product pest species to modified atmospheres with high carbon dioxide concentrations. 9th International Working Conference on Stored Products Protection, 578-585.

Rivas, C.J.M., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 532, 66-81.

Rizzo, R., Verde, G. L., Sinacori, M., Maggi, F., Cappellacci, L., Petrelli, R., Benelli, G. (2020). Developing green insecticides to manage olive fruit flies? Ingestion toxicity of four essential oils in protein baits on *Bactrocera oleae*. *Industrial Crops and Products*, 143, 111884.

Rocha, A.G., Oliveira, B. M.S., Melo, C.R., Sampaio, T. S., Blank, A. F., Lima, A. D., Bacci, L. (2018). Lethal effect and behavioral responses of leaf-cutting ants to essential oil of *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) and its nanoformulation. *Neotropical entomology*, 47, 769-779.

Rodrigues, S.M., Demokritou, P., Dokoozlian, N., Hendren, C. O., Karn, B., Mauter, M.S., Lowry, G.V. (2017). Nanotechnology for sustainable food production: promising opportunities and scientific challenges. *Environmental Science: Nano*, 4, 767-781.

- Romani, R., Bedini, S., Salerno, G., Ascrizzi, R., Flamini, G., Echeverria, M. C., Conti, B. (2019). Andean flora as a source of new repellents against insect pests: Behavioral, morphological and electrophysiological studies on *Sitophilus zeamais* (coleoptera: Curculionidae). *Insects*, 10, 171.
- Rosa, S.P., Costa, C., Kramp, K., Kundrata, R. (2020). Hidden diversity in the Brazilian Atlantic rainforest: the discovery of Jurasaidae, a new beetle family (Coleoptera, Elateroidea) with neotenic females. *Scientific Reports*, 10, 1-12.
- Rozado, A.F., Faroni, L.R., Urruchi, W.M., Guedes, R. N., Paes, J.L. (2008). Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 12, 282-285.
- Rumbos, C.I., Sakka, M., Berillis, P., Athanassiou, C.G. (2016). Insecticidal potential of zeolite formulations against three stored-grain insects, particle size effect, adherence to kernels and influence on test weight of grains. *Journal of Stored Products Research*, 68, 93-101.
- Sabarwal, A., Kumar, K., Singh, R.P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 63, 103–114.
- Saeed, M.B., Laing, M. D., Miller, R.M., Bancole, B. (2017). Ovicidal, larvicidal and insecticidal activity of strains of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* Fabricius (Coleoptera: Anobiidae), on rice grain. *Journal of Stored Products Research*, 74, 78-86.
- Sahaf, B.Z., Moharramipour, S., Meshkatsadat, M.H. (2008). Fumigant toxicity of essential oil from *Vitex pseudo-negundo* against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 11, 175-179.
- Said-Al Ahl, H.A., Hikal, W.M., Tkachenko, K.G. (2017). Essential oils with potential as insecticidal agents: A review. *International Journal of Environmental Planning and Management*, 34, 23-33.

Salem, N., Bachrouch, O., Sriti, J., Msaada, K., Khammassi, S., Hammami, M., Mediouni Ben Jemaa, J. (2017). Fumigant and repellent potentials of *Ricinus communis* and *Mentha pulegium* essential oils against *Tribolium castaneum* and *Lasioderma serricorne*. International journal of food properties, 20, S2899-S2913.

Sales, A., Felipe, L.D.O., Bicas, J.L. (2020). Production, properties, and applications of  $\alpha$ -terpineol. Food and bioprocess technology, 13, 1261-1279.

Salomón, O.D. (2005). Artrópodos de interés médico en Argentina. Fundación Mundo Sano. Serie Enfermedades Transmisibles. Publicación Monográfica, 6, 76-78.

Samkange, T., D'Souza, S., Obikeze, K., Dube, A. (2019). Influence of PEGylation on PLGA nanoparticle properties, hydrophobic drug release and interactions with human serum albumin. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 71, 1497-1507.

Sánchez-Bayo, F. (2012). Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. J. Environ. Anal. Toxicol. S, 4, S4-002.

Sánchez-Bayo, F. (2021). Indirect effect of pesticides on insects and other arthropods. Toxics, 9(8), 177.

Sánchez-Gómez, S., Pagán, R., Pavela, R., Mazzara, E., Spinozzi, E., Marinelli, O., Benelli, G. (2022). Lethal and sublethal effects of essential oil-loaded zein nanocapsules on a zoonotic disease vector mosquito, and their non-target impact. Industrial Crops and Products, 176, 114413.

Sanei-Dehkordi, A., Moemenbellah-Fard, M.D., Sereshti, H., Shahriari-Namadi, M., Zarenezhad, E., Osanloo, M. (2021). Chitosan nanoparticles containing *Elettaria cardamomum* and *Cinnamomum zeylanicum* essential oils; repellent and larvicidal effects against a malaria mosquito vector, and cytotoxic effects on a human skin normal cell line. Chemical Papers, 75, 6545-6556.

- Santos, F.A., Silva, R.M., Campos, A.R., De Araujo, R.P., Júnior, R.L., Rao, V.N. (2004). 1, 8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 579-584.
- Schöller, M., Prozell, S., Suma, P., Russo, A. (2018). Biological control of stored-product insects. In *Recent advances in stored product protection*. Springer, Berlin, Heidelberg. 183-209
- Schultz, A.G., Boyle, D., Chamot, D., Ong, K.J., Wilkinson, K.J., McGeer, J. C., Goss, G.G. (2014). Aquatic toxicity of manufactured nanomaterials: challenges and recommendations for future toxicity testing. *Environmental Chemistry*, 11(3), 207-226.
- Seada, M.A., Arab, R.A., Adel, I., Seif, A.I. (2016). Bioactivity of essential oils of basil, fennel, and geranium against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus maculatus*: Evaluation of repellency, progeny production and residual activity. *Egypt. J. Exp. Biol.(Zool.)*, 12, 1-12.
- Seifi, S., Naseri, B., Razmjou, J. (2016). Nutritional physiology of the Khapra beetle, *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) fed on various barley cultivars. *Journal of economic entomology*, 109, 472-477.
- Sfara, V., Zerba, E.N., Alzogaray, R.A. (2009). Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *Journal of medical entomology*, 46, 511-515.
- Shaala, N. M., Zulkifli, S. Z., Ismail, A., Azmai, M.N., Mohamat-Yusuff, F., Omar, H. (2017). Effects of tributyltin chloride (TBTCI) antifouling biocide on adult males and females of brine shrimp (*Artemia salina*). *Int. J. Biol. Res.*, 5, 30-35.
- Shah, M.A., Khan, A.A. (2014). Use of diatomaceous earth for the management of stored-product pests. *International journal of pest management*, 60, 100-113.
- Shahzad, K., Manzoor, F. (2021). Nanoformulations and their mode of action in insects: a review of biological interactions. *Drug and chemical toxicology*, 44, 1-11.

Shakiba, S., Astete, C.E., Paudel, S., Sabliov, C.M., Rodrigues, D.F., Louie, S.M. (2020). Emerging investigator series: polymeric nanocarriers for agricultural applications: synthesis, characterization, and environmental and biological interactions. *Environmental Science: Nano*, 7, 37-67.

Shakil, N.A., Singh, M.K., Pandey, A., Kumar, J., Pankaj, Parmar, V.S., Watterson, A.C. (2010). Development of poly (ethylene glycol) based amphiphilic copolymers for controlled release delivery of carbofuran. *Journal of Macromolecular Science®*, Part A: Pure and Applied Chemistry, 47, 241-247.

Sharma, P.R., Sharma, O.P., Saxena, B.P. (2008). Effect of sweet flag rhizome oil (*Acorus calamus*) on hemogram and ultrastructure of hemocytes of the tobacco armyworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Micron*, 39, 544-551.

Sharma, S., Mulrey, L., Byrne, M., Jaiswal, A.K., Jaiswal, S. (2022). Encapsulation of essential oils in nanocarriers for active food packaging. *Foods*, 11, 2337.

Sharon, M. (Ed.). (2019). *History of Nanotechnology: From Prehistoric to Modern Times*. John Wiley & Sons.

Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Kowalczyk, E., Szymańska, G., Kochan, E., Krukowska, J., Zielińska-Bliźniewska, H. (2017). The ability of selected plant essential oils to enhance the action of recommended antibiotics against pathogenic wound bacteria. *Burns*, 43, 310-317.

Sienkiewicz, M., Poznańska-Kurowska, K., Kaszuba, A., Kowalczyk, E. (2014). The antibacterial activity of geranium oil against Gram-negative bacteria isolated from difficult-to-heal wounds. *Burns*, 40, 1046-1051.

Silva, C.O., Rijo, P., Molpeceres, J., Figueiredo, I.V., Ascensão, L., Fernandes, A.S., Reis, C.P. (2015). Polymeric nanoparticles modified with fatty acids encapsulating betamethasone for anti-inflammatory treatment. *Int. J. Pharm.* 493, 271-284.

Silva, D.C., de Fátima Arrigoni-Blank, M., Bacci, L., Blank, A.F., Faro, R.R.N., Pinto, J.A.O., Pereira, K.L.G. (2019). Toxicity and behavioral alterations of essential oils of *Eplingiella fruticosa* genotypes and their major compounds to *Acromyrmex balzani*. *Crop Protection*, 116, 181-187.

Silva, S.M., Cunha, J.P.A.R.D., Carvalho, S.M.D., Zandonadi, C.H.S., Martins, R.C., Chang, R. (2017). *Ocimum basilicum* essential oil combined with deltamethrin to improve the management of *Spodoptera frugiperda*. *Ciência e Agrotecnologia*, 41, 665-675.

Silva-Flores, P.G., Pérez-López, L.A., Rivas-Galindo, V.M., Paniagua-Vega, D., Galindo-Rodríguez, S. A., Álvarez-Román, R. (2019). Simultaneous GC-FID quantification of main components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* essential oils in polymeric nanocapsules for antioxidant application. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2019, 1-9.

Silvestre, M., Legault, J., Dufour, D., Pichette, A. (2005). Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine*, 12, 299-304.

Simmonds, M.S. (2006). The search for plant-derived compounds with antifeedant activity. *Advances in phytomedicine*, 3, 291-324.

Simonet, B.M., Valcárcel, M. (2009). Monitoring nanoparticles in the environment. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393, 17-21.

Singh, A. V., Laux, P., Luch, A., Sudrik, C., Wiehr, S., Wild, A.M., Sitti, M. (2019). Review of emerging concepts in nanotoxicology: Opportunities and challenges for safer nanomaterial design. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29, 378-387.

Singh, D.K. (2007). *Toxicology of insecticides*.

Singh, K.D., Mobolade, A.J., Bharali, R., Sahoo, D., Rajashekar, Y. (2021). Main plant volatiles as stored grain pest management approach: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 100127.

Snuossi, M., Trabelsi, N., Ben Taleb, S., Dehmeni, A., Flamini, G., De Feo, V. (2016). *Laurus nobilis*, *Zingiber officinale* and *Anethum graveolens* essential oils: composition, antioxidant and antibacterial activities against bacteria isolated from fish and shellfish. *Molecules*, 21, 1414.

Soliman, A.M., Abdel-Latif, W., Shehata, I. H., Fouda, A., Abdo, A.M., Ahmed, Y.M. (2021). Green approach to overcome the resistance pattern of *Candida* spp. using biosynthesized silver nanoparticles fabricated by *Penicillium chrysogenum* F9. *Biological Trace Element Research*, 199, 800-811.

Sousa, A.H., Faroni, L.R.D.A., da Silva Freitas, R. (2014). Relative toxicity of mustard essential oil to insect-pests of stored products. *Revista Caatinga*, 27, 222-226.

Spochacz, M., Chowański, S., Walkowiak-Nowicka, K., Szymczak, M., Adamski, Z. (2018). Plant-derived substances used against beetles—pests of stored crops and food—and their mode of action: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 17, 1339-1366.

Sriti Eljazi, J., Bachrouch, O., Salem, N., Msaada, K., Aouini, J., Hammami, M., Mediouni Ben Jemaa, J. (2017). Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from coriander fruit against *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, and *Lasioderma serricorne*. *International journal of food properties*, 20, S2833-S2845.

Stadler, T. (1988). Caracterización taxonómica, susceptibilidad a insecticidas y resistencia a malatión en *Sitophilus oryzae* (L) (Coleóptera: Curculionidae): Plaga del grano almacenado de la República Argentina (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).

Stefanova, G., Girova, T., Gochev, V., Stoyanova, M., Petkova, Z., Stoyanova, A., Zheljazkov, V. D. (2020). Comparative study on the chemical composition of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves from Greece and Georgia and the antibacterial activity of their essential oil. *Heliyon*, 6, e05491.

Stejskal, V., Vendl, T., Aulicky, R., Athanassiou, C. (2021). Synthetic and natural insecticides: Gas, liquid, gel and solid formulations for stored-product and food-industry pest control. *Insects*, 12, 590.

Stenersen, J. (2004). *Chemical pesticides mode of action and toxicology*. CRC press.

Stensgaard, A.S., Rinaldi, L., Bergquist, R. (2019). The future is now: New United Nations' Sustainable Development Goals report provides a perspective on vector-borne diseases. *Geospatial Health*, 14.

Stent, V. (2006). *The history of pest control*.

Stork, N.E. (2018). How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth?. *Annual review of entomology*, 63, 31-45.

Subramanyam, B., Hagstrum, D.W. (Eds.). (2012). *Alternatives to pesticides in stored-product IPM*. Springer Science & Business Media.

Suma, P., Amante, M., Bella, S., La Pergola, A., Russo, A. (2014). Stored-product insect natural enemies in wheat industry in Sicily. *IOBC-WPRS Bull*, 98, 227-233.

Sun, C., Verheggen, F., Zeng, Z., Cui, H. (2020). Polymer-Based Nanoinsecticides: Current Developments, Environmental Risks and Future Challenges-A Review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 24, 59-69.

Sur, S., Rathore, A., Dave, V., Reddy, K.R., Chouhan, R.S., Sadhu, V. (2019). Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 20, 100397.

Suresh Kumar, R.S., Shiny, P. J., Anjali, C.H., Jerobin, J., Goshen, K.M., Magdassi, S., Chandrasekaran, N. (2013). Distinctive effects of nano-sized permethrin in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 2593-2602.

- Swamy, K.N., Mutthuraju, G. P., Jagadeesh, E., Thirumalaraju, G.T. (2014). Biology of *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae) on stored maize grains. *Current Biotica*, 8, 76-81.
- Syafiq, R., Sapuan, S.M., Zuhri, M.Y.M., Ilyas, R.A., Nazrin, A., Sherwani, S.K., Khalina, A. (2020). Antimicrobial activities of starch-based biopolymers and biocomposites incorporated with plant essential oils: A review. *Polymers*, 12, 2403.
- Symondson, W.O.C., Sunderland, K.D., Greenstone, M.H. (2002). Can generalist predators be effective biocontrol agents?. *Annual review of entomology*, 47, 561-594.
- Tabari, M.A., Youssefi, M.R., Esfandiari, A., Benelli, G. (2017). Toxicity of  $\beta$ -citronellol, geraniol and linalool from *Pelargonium roseum* essential oil against the West Nile and filariasis vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Research in veterinary science*, 114, 36-40.
- Tak, J. H., Isman, M. B. (2015). Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. *Scientific reports*, 5, 1-10.
- Tavares, M., da Silva, M.R M., de Siqueira, L.B.D.O., Rodrigues, R.A.S., Bodjolle-d'Almeida, L., Dos Santos, E.P., Ricci-Júnior, E. (2018). Trends in insect repellent formulations: A review. *International journal of pharmaceutics*, 539, 190-209.
- Terzi, V., Morcia, C., Faccioli, P., Vale, G., Tacconi, G., Malnati, M. (2007). In vitro antifungal activity of the arbol de té (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 613-618.
- Toan, D. H., Van Hoang, D., Hoang, V. D., Dai Lam, T. (2021). Application of botanical pesticides in organic agriculture production: Potential and challenges. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 59, 679-701.
- Toews, M. D., Nansen, C. (2012). 21 Trapping and interpreting captures of stored grain Insects. *Stored Product Protection*, 243.
- Tolochko, N.K. (2009). History of nanotechnology. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*.

- Tomar, O., Akarca, G., Gök, V., Ramadan, M.F. (2020). Composition and antibacterial effects of Laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves essential oil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23, 414-421.
- Tong, F., Coats, J.R. (2010). Effects of monoterpene insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> uptake in American cockroach ventral nerve cord. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98, 317-324.
- Tork, M.B., Khalilzadeh, R., Kouchakzadeh, H. (2017). Efficient harvesting of marine *Chlorella vulgaris* microalgae utilizing cationic starch nanoparticles by response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 243, 583-588.
- Touihri, I., Boukhris, M., Marrakchi, N., Luis, J., Hanchi, B., & Kallech-Ziri, O. (2015). Chemical composition and biological activities of *Allium roseum* L. var. *grandiflorum* Briq. essential oil. *Journal of Oleo Science*, 15055.
- Towler, D.A., Arnaud, R.S. (2002). Use of cultured osteoblastic cells to identify and characterize transcriptional regulatory complexes. In *Principles of bone biology*, Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan, G.A (Eds.). Academic Press, San Diego, USA, 1503-1527 pp.
- Tracey, K.M. (1958). Effects of parental age on the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus. *Annals of the Entomological Society of America*, 51, 429-432.
- Trematerra, P. (2012). Advances in the use of pheromones for stored-product protection. *Journal of Pest Science*, 85, 285-299.
- Tsakas, S., Marmaras, V. J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7, 228-238.
- Uhl, P., Franke, L.A., Rehberg, C., Wollmann, C., Stahlschmidt, P., Jeker, L., Brühl, C.A. (2016). Interspecific sensitivity of bees towards dimethoate and implications for environmental risk assessment. *Scientific reports*, 6, 1-7.

Umezū, T., Nagano, K., Ito, H., Kosakai, K., Sakaniwa, M., Morita, M. (2006). Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 85, 713-721.

Urrutia, R.I., Yeguerman, C., Jesser, E., Gutierrez, V.S., Volpe, M.A., Gonzalez, J.O.W. (2021). Sunflower seed hulls waste as a novel source of insecticidal product: Pyrolysis bio-oil bioactivity on insect pests of stored grains and products. *Journal of Cleaner Production*, 287, 125000.

Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S.A., Rehman, H., Sanaullah, M. (2020). Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. *Science of the Total Environment*, 721, 137778.

Valdivieso-Ugarte, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Díaz, J., Gil, Á. (2019). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11, 2786.

Vélez, M., Bernardes, R.C., Barbosa, W.F., Santos, J.C., Guedes, R.N.C. (2019). Walking activity and dispersal on deltamethrin-and spinosad-treated grains by the maize weevil *Sitophilus zeamais*. *Crop Protection*, 118, 50-56.

Venditti, I. (2019). Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *Journal of King Saud University-Science*, 31, 398-411.

Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R.K., Kumar, A. (2015). Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55, 1320-1323.

Verma, S. K., Nandi, A., Sinha, A., Patel, P., Jha, E., Mohanty, S., Suar, M. (2021). Zebrafish (*Danio rerio*) as an ecotoxicological model for Nanomaterial induced toxicity profiling. *Precis. Nanomed.* 4, 750-781.

Vidau, C., Brunet, J. L., Badiou, A., Belzunces, L.P. (2009). Phenylpyrazole insecticides induce cytotoxicity by altering mechanisms involved in cellular energy supply in the human epithelial cell model Caco-2. *Toxicology in Vitro*, 23, 589-597.

Vishwakarma, G.S., Gautam, N., Babu, J.N., Mittal, S., Jaitak, V. (2016). Polymeric encapsulates of essential oils and their constituents: A review of preparation techniques, characterization, and sustainable release mechanisms. *Polymer reviews*, 56, 668-701.

Vivas-Carmona, L.E. (2017). El Manejo Integrado de Plagas (MIP): Perspectivas e importancia de su impacto en nuestra región. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5, 67-69.

Wakil, W., Schmitt, T., Kavallieratos, N.G. (2021). Mortality and progeny production of four stored-product insect species on three grain commodities treated with *Beauveria bassiana* and diatomaceous earths. *Journal of Stored Products Research*, 93, 101738.

Walker, C.H., Sibly, R.M., Hopkin, S.P., Peakall, D.B. (2012) *Principles of ecotoxicology*. Boca Raton, CRC Press, New York.

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

Wang, Y., Zhang, L.T., Feng, Y.X., Guo, S.S., Pang, X., Zhang, D., Du, S.S. (2019a). Insecticidal and repellent efficacy against stored-product insects of oxygenated monoterpenes and 2-dodecanone of the essential oil from *Zanthoxylum planispinum* var. *dintanensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 24988-24997.

Wang, Y., Zhang, L.T., Feng, Y.X., Zhang, D., Guo, S.S., Pang, X., Du, S.S. (2019b). Comparative evaluation of the chemical composition and bioactivities of essential oils from four spice plants (Lauraceae) against stored-product insects. *Industrial Crops and Products*, 140, 111640.

Werdin González, J.O., Gutiérrez, M.M., Ferrero, A.A., Band, B.F. (2014). Essential oils nanoformulations for stored-product pest control—Characterization and biological properties. *Chemosphere*, 100, 130-138.

Werdin González, J.O., Jesser, E.N., Yeguerman, C.A., Ferrero, A.A., Fernández, B.B. (2017). Polymer nanoparticles containing essential oils: new options for mosquito control. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 17006-17015.

Werdin Gonzalez, J.O., Stefanazzi, N., Murray, A.P., Ferrero, A.A., Fernández Band, B. (2015). Novel nanoinsecticides based on essential oils to control the German cockroach. *Journal of Pest Science*, 88, 393-404.

Werdin González, J.O., Yeguerman, C., Marcovecchio, D., Delrieux, C., Ferrero, A., & Band, B.F. (2016). Evaluation of sublethal effects of polymer-based essential oils nanoformulation on the German cockroach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 11-18.

White, B. (2019). *Biological Control of Insects Pests*. Scientific e-Resources.

Wiesner, M.R., Bottero, J.Y. (2017). *Environmental nanotechnology: applications and impacts of nanomaterials*. McGraw-Hill Education.

Worrall, E.A., Hamid, A., Mody, K.T., Mitter, N., Pappu, H.R. (2018). Nanotechnology for plant disease management. *Agronomy*, 8, 285.

Wu, H. (2013). *Biology of Blaptica dubia (Blattodea: Blaberidae)* (Doctoral dissertation).

Wu, L., Huo, X., Zhou, X., Zhao, D., He, W., Liu, S., Wang, C. (2017). Acaricidal activity and synergistic effect of thyme oil constituents against carmine spider mite (*Tetranychus Cinnabarinus* (Boisduval)). *Molecules*, 22, 1873.

Yadav, E., Kumar, S., Mahant, S., Khatkar, S., Rao, R. (2017). Tea tree oil: a promising essential oil. *Journal of essential oil research*, 29, 201-213.

- Yang, F.L., Li, X.G., Zhu, F., Lei, C.L. (2009). Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 57, 10156-10162.
- Yang, X., Han, H., Li, B., Zhang, D., Zhang, Z., Xie, Y. (2021). Fumigant toxicity and physiological effects of spearmint (*Mentha spicata*, Lamiaceae) essential oil and its major constituents against *Reticulitermes dabieshanensis*. *Industrial Crops and Products*, 171, 113894.
- Yang, Y., Wilson, L.T., Arthur, F.H., Wang, J., Jia, C. (2017). Regional analysis of bin aeration as an alternative to insecticidal control for post-harvest management of *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.). *Ecological Modelling*, 359, 165-181.
- Yap, P.S.X., Yusoff, K., Lim, S.H.E., Chong, C.M., Lai, K.S. (2021). Membrane disruption properties of essential oils—A double-edged sword?. *Processes*, 9, 595.
- Yeguerman, C., Jesser, E., Massiris, M., Delrieux, C., Murray, A.P., González, J.W. (2020). Insecticidal application of essential oils loaded polymeric nanoparticles to control German cockroach: Design, characterization and lethal/sublethal effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, 110047.
- Yeguerman, C.A., Urrutia, R.I., Jesser, E.N., Massiris, M., Delrieux, C.A., Murray, A.P., González, J.O.W. (2022). Essential oils loaded on polymeric nanoparticles: bioefficacy against economic and medical insect pests and risk evaluation on terrestrial and aquatic non-target organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-15.
- Yenice Gürsu, B. (2020). Potential antibiofilm activity of farnesol-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide)(PLGA) nanoparticles against *Candida albicans*. *Journal of Analytical Science and Technology*, 11(1), 1-10.
- Yun, X., Huang, Q., Rao, W., Xiao, C., Zhang, T., Mao, Z., Wan, Z. (2017). A comparative assessment of cytotoxicity of commonly used agricultural insecticides to human and insect cells. *Ecotoxicology and environmental safety*, 137, 179-185.

Zanetti, M., Mazon, L.R., de Meneses, A.C., Silva, L.L., de Araújo, P.H.H., Fiori, M.A., de Oliveira, D. (2019). Encapsulation of geranyl cinnamate in polycaprolactone nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 198-207.

Zarenezhad, E., Ranjbar, N., Firooziyan, S., Ghoorkhanian, M., Osanloo, M. (2022). Promising larvicidal effects of chitosan nanoparticles containing *Laurus nobilis* and *Ttrachyspermum ammi* essential oils against *Anopheles stephensi*. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42, 895-904.

Zhai, Y., Monikh, F.A., Wu, J., Grillo, R., Arenas-Lago, D., Darbha, G.K., Peijnenburg, W.J. (2020). Interaction between a nano-formulation of atrazine and rhizosphere bacterial communities: atrazine degradation and bacterial community alterations. *Environmental Science: Nano*, 7, 3372-3384.

Zhang, Z., Pang, X., Guo, S., Cao, J., Wang, Y., Chen, Z., Du, S. (2019). Insecticidal activity of *Artemisia frigida* Willd. essential oil and its constituents against three stored product insects. *Rec Nat Prod*, 13, 176-181.

Zhi-Qiang, Z. (2011). *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness* (en inglés). Magnolia Press. p. 8. ISBN 1869778499.

Ziaee, M., Ebadollahi, A., Wakil, W. (2019). Integrating inert dusts with other technologies in stored products protection. *Toxin Reviews*, 1-16.

Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A.M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Souto, E.B. (2020). Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25, 3731.

Zielińska, A., Costa, B., Ferreira, M.V., Miguéis, D., Louros, J., Durazzo, A., Souto, E.B. (2020). Nanotoxicology and nanosafety: Safety-by-design and testing at a glance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 4657.

Zimmermann, R.C., de Carvalho Aragao, C.E., de Araújo, P.J.P., Benatto, A., Chaaban, A., Martins, C.E.N., Zawadneak, M.A. (2021). Insecticide activity and toxicity of essential oils against two stored-product insects. *Crop Protection*, 144, 105575.

Zimmermann, R.C., Poitevin, C.G., Bischoff, A.M., Beger, M., da Luz, T.S., Mazarotto, E.J., Zawadneak, M.A. (2022). Insecticidal and antifungal activities of *Melaleuca raphiophylla* essential oil against insects and seed-borne pathogens in stored products. *Industrial Crops and Products*, 182, 114871.

Zowada, C., Frerichs, N., Zuin, V.G., Eilks, I. (2020). Developing a lesson plan on conventional and green pesticides in chemistry education—a project of participatory action research. *Chemistry Education Research and Practice*, 21, 141-153.

---

## 7. TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS

---

### Publicaciones en revistas científicas

**Yeguerman, C.**, Urrutia, R., Jesser, E.; Massiris, M., Delrieux C., Murray, A.P., Werdin González, J.O.2022. Essential oils loaded on polymeric nanoparticles: bioefcacy against economic and medical insect pests and risk evaluation on terrestrial and aquatic non-target organisms. *Environmental Science and Pollution research*. (Factor de Impacto: 5,19).

**Yeguerman, C.**, Jesser, E.; Gili, V., Rodriguez, S., Santillan, G., Murray, A.P., Werdin González, J.O.2022. Polymeric nanoparticles reinforce lethal and sublethal effects of essential oils and pyrethroids susceptibility on rice weevil and cigarette beetle. *Journal of Pest Science*. (Factor de Impacto: 5,74). (En revisión).

### Trabajos presentados en congresos

**Yeguerman, C.**; Urrutia, R.; Jesser, E.; Rodriguez, S.; Murray, P.; Werdin, J. Nanoformulaciones de aceites esenciales en el control de insectos plaga de productos almacenado. XI Congreso Argentino y XII Congreso Latinoamericano de Entomología, La Plata, octubre de 2022.

**Yeguerman, C.**; Jesser, E., Urrutia, R.; Stefanazzi, N.; Rodriguez, S.; Murray, P.; Werdin, J. Efecto combinado de la  $\beta$ -cipermetrina y aceites esenciales en control de insectos plaga. XI Congreso Argentino y XII Congreso Latinoamericano de Entomología, La Plata, octubre de 2022.

**Yeguerman, C.**; Jesser, E.; Urrutia, R.; Massiris, M.; Stefanazzi, N.; Murray, P.; Werdin, J. Evaluación de la actividad repelente del aceite esencial de menta libre y nanoformulado en el Escarabajo del Tabaco. Workshop de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agronómicas. Diciembre de 2020.

**Yeguerman, C.**; Jesser, E.; Stefanazzi, N.; Murray, P.; Werdin, J. Films Cargados con Aceite Esencial de Palmarosa, una Novedosa Estrategia en el Manejo del Gorgojo del Arroz, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). XL Congreso Nacional de Entomología, Concepción, Chile, octubre de 2019.

**Yeguerman, C.**; Urrutia, R.; Jesser, E.; Stefanazzi, N.; Murray, P.; Werdin, J. Estrategias de Bajo Impacto Ambiental para el Control del Escarabajo del Tabaco. Primer Congreso Argentino de Agroecología, Mendoza, Argentina, septiembre de 2019.

**Yeguerman, C.**; Jesser, E.; Stefanazzi, N.; Murray, A.; Werdin, J. Evaluación de la actividad insecticida de los aceites esenciales libres y sus nanoformulados en el gorgojo del tabaco, *Lasioderma serricorne* (f.) (Coleoptera: Anobiidae). IV Jornadas Patagónicas de Biología. Trelew, Argentina. Septiembre 2018.