



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
MODALIDAD DE ESTUDIOS A DISTANCIA

**CARRERA DE INGENIERIA EN ADMINISTRACIÓN Y
PRODUCCIÓN AGROPECUARIA**

TÍTULO:

**“EFECTO INSECTICIDA DE EUGENOL PURIFICADO EN EL
CONTROL DEL GORGOJO *Callosobruchus maculatus* EN
FRÍJOL DEL GÉNERO *Vigna*”**

Tesis previa a la obtención del título
de Ingeniera en Administración y
Producción Agropecuaria

AUTORA:

María José González Armijos

DIRECTOR:

Ing. Adolfo Fernando Flores Veintimilla Mg. Sc

LOJA - ECUADOR

2016

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

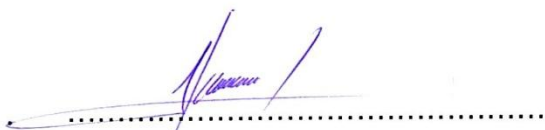
“EFECTO INSECTICIDA DE EUGENOL PURIFICADO EN EL CONTROL DEL GORGOJO *Callosobruchus maculatus* EN FRÍJOL DEL GÉNERO *Vigna*”

**TESIS PRESENTADA AL TRIBUNAL DE GRADO, COMO REQUISITO PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERA EN ADMINISTRACIÓN Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

Loja, Diciembre de 2016

APROBADA:



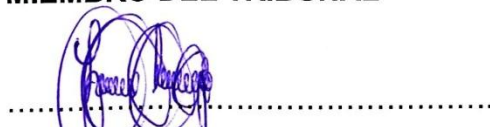
Ing. Julio Enrique Arévalo Camacho Mg. Sc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing. Laura Nohemy Poma López Mg. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Ing. Jaime Enrique Armijos Tandazo Mg. Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

CERTIFICACIÓN

Ing. Adolfo Fernando Flores Veintimilla, Mg. Sc.

DOCENTE DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN ADMINISTRACIÓN Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

CERTIFICA:

Que luego de haber, revisado minuciosamente y prolijamente el trabajo de tesis titulado **“EFECTO INSECTICIDA DE EUGENOL PURIFICADO EN EL CONTROL DEL GORGOJO *Callosobruchus maculatus* EN FRÍJOL DEL GÉNERO *Vigna*”** previa a la obtención del título de ingeniera en Administración y Producción Agropecuaria, de la egresada: María José González Armijos, autorizando su presentación debido a que el mismo se sujeta a las normas y reglamentos generales de graduación exigidos por la carrera de Ingeniería en Administración y Producción Agropecuaria en la modalidad de estudios a distancia.

Loja, Diciembre del 2016



Ing. Adolfo Fernando Flores Veintimilla, Mg. Sc.

DIRECTOR DE LA TESIS

AUTORÍA

Yo, María José González Armijos, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca virtual.

Autora: María José González Armijos

Firma:



Cédula: 1104384373

Fecha: Loja, 12 de Diciembre del 2016

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DE LA AUTORA, PARA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO.

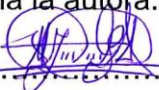
Yo, María José González Armijos, declaro ser autora de la tesis titulada **EFFECTO INSECTICIDA DE EUGENOL PURIFICADO EN EL CONTROL DEL GORGOJO *Callosobruchus maculatus* EN FRÍJOL DEL GÉNERO *Vigna***, como requisito para optar de Grado de Ingeniera en Administración y Producción Agropecuaria; autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja, para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Nacional de Loja.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 12 días del mes de diciembre del 2016, firma la autora.

Firma:

.....

Autora:

María José González Armijos.

Cedula:

1104384373

Dirección:

Loja, calle Brasil entre Honduras y Jamaica 24-200

Correo electrónico: majito130692@gmail.com

Teléfono:

2583370

DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de tesis:

Ing. Adolfo Fernando Flores Veintimilla Mg.Sc.

Presidente del tribunal:

Ing. Julio Enrique Arévalo Camacho Mg. Sc.

Miembro del tribunal:

Ing. Laura Nohemy Poma López Mg. Sc.

Miembro del tribunal:

Ing. Jaime Enrique Armijos Tandazo Mg. Sc.

DEDICATORIA

"La educación es el gran motor del desarrollo personal. Es a través de la educación como la hija de un campesino puede convertirse en una médica, el hijo de un minero puede convertirse en jefe de la mina, o el hijo de trabajadores agrícolas puede llegar a ser presidente de una nación"

Nelson Mandela

A Dios por darme vida, salud y fuerza para culminar mi etapa de pre-grado. A mi querida madre María Armijos por sus sabios consejos, a mi padre José González(+) que me dejó como mejor regalo su humildad y solidaridad, a mis hermanos Marisol, Mercedes, Carlos y mi sobrino Camilo por llenar mi vida de alegría.

A Luis Viteri Jumbo mi novio y amigo, que ha sido un pilar fundamental dentro de mi vida profesional.

A todos mis amigos y familiares que estuvieron siempre a mi lado constantemente apoyándome hasta lograr esta etapa profesional.

María José González Armijos

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios primeramente por haberme concebido la vida y la salud.

A mis padres José González (+) y María Armijos por sus consejos y su amor brindado, lo que me lleva a seguir adelante.

A la Universidad Nacional de Loja modalidad de estudios a distancia (UNL-MED) por la oportunidad de realizar mis estudios.

Al Ing. Julio Arévalo por su ayuda recibida durante toda mi formación y en la aprobación del proyecto de tesis.

A todas/os mis compañeras/os de aula por haberme brindado su amistad, y haberme permitido ser parte de su vida.

Al Ing. Adolfo Flores mi director de tesis, por haberme ayudado con toda la voluntad durante el desarrollo del presente trabajo.

A todos aquellos que creyeron y creen en mí y me siguen apoyando en el día a día de mi vida.

A todos los pequeños agricultores de mi país, que mismo siendo marginados por la sociedad moderna, creen en la educación como un camino para construir un país más justo, solidario y soberano.

Finalmente, a todos que de alguna forma contribuyeron para la realización de este trabajo.

LA AUTORA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	Pág.
PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	ii
CERTIFICACIÓN	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN	v
DEDICATORIA	vii
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
1. TÍTULO	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	6
4. REVISIÓN DE LITERATURA	8
4.1. FRÍJOL <i>caupí</i> (Género: <i>Vigna</i>)	8
4.1.1 Taxonomía del Fríjol <i>Vigna</i>	9
4.1.2 Morfología del Fríjol <i>Vigna</i>	9
4.1.2.1. Raíces	10
4.1.2.2. Tallos y ramas	10
4.1.2.3. Flores	11
4.1.2.4. Fruto	11
4.1.2.5. Semilla	12
4.2. GORGOJO DEL FRÍJOL <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae)	12
4.2.1. Taxonomía del gorgojo del frijol (<i>Callosobruchus maculatus</i>)	13
4.2.2. Descripción morfológica del gorgojo <i>Callosobruchus maculatus</i>	13
4.2.3. Ciclo de vida	14
4.2.4. Tiempo por cada generación	16
4.2.5. Identificación de los sexos	16
4.2.6. Principios generales de bioseguridad en el laboratorio	17

4.2.6.1. Clasificación de microorganismos infecciosos por grupos de riesgo....	17
4.2.6.2. Tipos de laboratorios según el grupo de riesgo (OMS 2005).....	17
4.3. EUGENOL.....	19
4.3.1. Fuentes naturales de Eugenol.....	20
4.3.2. Proceso de obtención del Eugenol.....	20
4.3.2.1 Destilación directa por arrastre de vapor.....	20
4.3.2.2 Destilación directa por arrastre de vapor, método vapor vivo.....	21
4.3.2.3 Extracción Soxhlet.....	21
4.3.3. Propiedades físicas y químicas.....	22
4.3.4. Propiedades farmacológicas de eugenol y su mecanismo de acción...	23
4.3.4.1. Actividad antibacterial.....	23
4.3.4.2. Actividad antifúngica.....	23
4.3.4.3. Actividad anticancerígena.....	24
4.3.4.4. Aplicación en la agricultura.....	24
4.3.4.5. Propiedades insecticidas y fumigantes.....	24
4.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	25
4.4.1 SAS probit 2002.....	25
4.4.2 SigmaPlot, 12,3.....	25
4.4.3 CorelDraw X7.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. MATERIALES.....	27
5.1.1. De laboratorio.....	27
5.1.2. De oficina.....	27
5.2. MÉTODOS.....	27
5.2.1. Lugar de desarrollo de la investigación.....	27
5.2.2. Condiciones meteorológicas.....	28
5.2.3 Métodos de investigación.....	28
5.2.3.1 Método científico.....	28
5.2.3.2. Método experimental.....	28
5.2.3.3. Métodos estadísticos.....	29
5.2.4. Técnicas de investigación.....	29

5.2.5.	Diseño experimental.....	29
5.2.6.	Proceso y mantenimiento de la población de <i>Callosobruchus maculatus</i> para los bioensayos.	30
5.2.7.	Acondicionamiento del fréjol caupí para los bioensayos.....	30
5.2.8.	Obtención del Eugenol.....	31
5.2.9.	Metodología para el primer objetivo.....	31
5.2.10.	Metodología para el segundo objetivo.....	32
5.2.11.	Metodología para el tercer objetivo.....	34
5.2.12.	Metodología para el cuarto objetivo.....	35
6.	RESULTADOS	36
6.1.	EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE <i>C. maculatus</i> EXPUESTO A EUGENOL PURO VÍA FUMIGANTE.....	36
6.2.	DETERMINAR LA TASA INSTANTÁNEA DE CRECIMIENTO Y EL PERIODO DE DESARROLLO DE <i>C. maculatus</i> EXPUESTOS A CONCENTRACIONES SUB-LETALES DE EUGENOL.....	38
6.3.	DESCUBRIR LA CAPACIDAD REPELENTE DE EUGENOL PARA <i>C. maculatus</i>	42
6.4.	CALCULAR LA PÉRDIDA DE MASA DE LOS GRANOS DE FRÉJOL TRATADOS CON DOSIS-SUBLETALES DE EUGENOL E INFESTADOS CON ADULTOS DE <i>C. maculatus</i>	44
7.	DISCUSIÓN	47
8.	CONCLUSIONES	50
9.	RECOMENDACIONES	51
10.	BIBLIOGRAFÍA	52
11.	ANEXOS	64

ÍNDICE DE CUADROS

CUADROS	Pág.
Cuadro 1. Características de los tratamientos.....	28
Cuadro 2. Susceptibilidad de <i>C. maculatus</i> expuestos a eugenol puro via fumigante.	35
Cuadro 3. Susceptibilidad relativa de eugenol vía fumigante para <i>C. maculatus</i>	35
Cuadro 4. Tasa instantanea de crecimiento y desarrollo de <i>Callosobruchus. maculatus</i> en 46 días.	38
Cuadro 5. Ecuaciones ajustadas para la curva de tasa instantánea de crecimiento de <i>Callosobruchus maculatus</i> expuesto a diferentes concentraciones de eugenol.....	39
Cuadro 6. Ecuaciones ajustadas para la curva de emergencia acumulada y emergencia diaria de <i>C. maculatus</i>	39
Cuadro 7. Repelencia de insectos usando concenctracion letal 50 y 100. ..	42
Cuadro 8. Pérdida de masa de granos de acuerdo a la concentracion letal apicada a <i>C. maculatus</i>	44
Cuadro 9. Ecuaciones ajustadas para la pérdida de masa de los granos.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
Figura 1. Morfología de <i>coleóptera Chrysomelidae</i> :.....	14
Figura 2. Biología de <i>C. maculatus</i> en fréjol caupi:.....	15
Figura 3. Vista dorsal de un adulto de <i>Callobruchus maculatus</i> :	17
Figura 4. Fórmula química del eugenol.....	22
Figura 5. Institución en donde se desarrollaron los bioensayos.....	28
Figura 6. Arena con 5 cajas y 4 brazos.....	35
Figura 7. Susceptibilidad de <i>C. maculatus</i> :	37
Figura 8. Tasa instantanea de crecimiento:	40
Figura 9. Emergencia diaria	40
Figura 10. Repelencia.....	42
Figura 11. Pérdida de masa.....	45

1. TÍTULO

“EFECTO INSECTICIDA DE EUGENOL PURIFICADO EN EL CONTROL DEL GORGOJO *Callosobruchus maculatus* EN FRÍJOL DEL GÉNERO *Vigna*.”

2. RESUMEN

La investigación denominada “EFECTO INSECTICIDA DE EUGENOL PURIFICADO EN EL CONTROL DEL GORGOJO *Callosobruchus maculatus* EN FRÍJOL DEL GÉNERO *Vigna*”.

El presente trabajo tuvo como objetivos evaluar la susceptibilidad de *C. maculatus* expuesto a eugenol puro vía fumigante; Determinar la tasa instantánea de crecimiento y el periodo de desarrollo de *C. maculatus* expuestos a concentraciones sub-letales de eugenol; Descubrir la capacidad repelente de eugenol para adultos de *C. maculatus*; Calcular la pérdida de masa de los granos de fréjol tratados con dosis sub-letales de eugenol e infestados con adultos de *C. maculatus*.

En la metodología se utilizó el método científico experimental, estadístico y la técnica observación directa para la elaboración de cada objetivo.

La toxicidad de eugenol para determinar el primer objetivo fue evaluada a través de testes preliminares para determinar la concentración letal para 50 y 95 % de mortalidad (CL₅₀ y CL₉₅) de los insectos adultos. Los testes fueron realizados en frascos (capacidad de 800 ml) con 50 gramos de fréjol caupí, en donde fueron introducidos 10 parejas de *C. maculatus* (adultos y < a 48 horas de edad) y expuestos a diferentes concentraciones. Para evitar el contacto directo del eugenol con los insectos o fréjol, con ayuda de hilo de algodón, pequeñas placas de papel filtro conteniendo el eugenol fueron suspendidas desde la parte interna de la tapa de cada frasco, cinco repeticiones por cada tratamiento fueron realizadas y la mortalidad fue contabilizada después de 24 horas.

La tasa instantánea de crecimiento (r_i) fue calculada a partir de las CL₂₀, CL₄₀, CL₆₀, CL₈₀, CL₁₀₀, siendo los testes (exposición) similares a los de toxicidad, la r_i fue obtenida con el número total de insectos emergidos después de 46 días.

Procedimiento similar fue realizado para obtener el periodo de desarrollo, con la diferencia que cada dos días (después del primer insecto emergido) se fueron contabilizando el número de insectos emergidos.

Para desarrollar la repelencia fue realizada con frejol tratado con la CL₅₀ y CL₁₀₀ por 24 horas, posteriormente el frejol fue colocado en arenas con cuatro brazos y con una caja en cada extremo del brazo (2 brazos para frejol no tratado y 2 para frejol tratado) y después de 24 horas se registró el número de insectos en cada caja.

La pérdida de masa fue calculada a partir del peso final de los granos de cada tratamiento y el peso inicial de estos mismos granos.

Los resultados nos muestran que la CL₅₀ es de 24,80 $\mu\text{L L}^{-1}$ y la CL₉₅ es 81,14 $\mu\text{L L}^{-1}$. Además se pudo constatar que la r_i decreció conforme se aumentó la concentración, logrando una estabilidad en la CL₄₀. El periodo de desarrollo también se vio afectado por las concentraciones letales de eugenol, retrasándose dos días el comienzo de la emergencia para los diferentes tratamientos respecto al control. Así mismo fue observado efecto repelente de eugenol en las CL₁₀₀ (134,13 $\mu\text{L L}^{-1}$) mientras que en la CL₅₀ (24,80 $\mu\text{L L}^{-1}$) eugenol tuvo efecto atrayente para este insecto. La pérdida de masa de frijol caupí fue proporcional al número de insectos emergidos.

De acuerdo a estos resultados se concluye que eugenol presenta actividad insecticida a *C. maculatus* vía fumigante, pudiendo ser una alternativa para el control de esta plaga en pequeñas unidades de frejol almacenamiento del género *Vigna*.

Como recomendación es de suma importancia utilizar productos orgánicos con la finalidad de evitar daños en la salud de los productores, el medio ambiente y también para evitar pérdidas masivas de la cosecha de granos almacenados.

ABSTRACT

The research denominated "INSECTICIDE EFFECT OF PURIFIED EUGENOL IN THE CONTROL OF GORGOJO *Callosobruchus maculatus* IN FRÍJOL DEL GÉNERO *Vigna*".

The present work had as objectives to evaluate the susceptibility of *C. maculatus* exposed to pure eugenol via fumigant; To determine the instantaneous rate of growth and development period of *C. maculatus* exposed to sub-lethal concentrations of eugenol; To discover the adult eugenol repellent capacity of *C. maculatus*; Calculate the mass loss of bean grains treated with sub-lethal doses of eugenol and infested with adults of *C. maculatus*.

In the methodology, the scientific experimental, statistical method and the technique direct observation was used to elaborate each objective.

Eugenol toxicity was evaluated through preliminary tests to determine the lethal concentration for 50 and 95% of mortality (LC₅₀ and LC₉₅) of adult insects. The tests were conducted in flasks (800 ml capacity) with 50 grams of cowpea beans, where they were introduced 10 couples *C. maculatus* (adults and <48 hours old) and exposed to different concentrations. To avoid direct contact of eugenol with insects or beans, using cotton thread small plates of filter paper containing the eugenol were suspended from the inside of the lid of each jar, five replicates per treatment were performed and mortality it was counted after 24 hours.

The instantaneous growth rate (r_i) was calculated from the CL₂₀, CL₄₀, CL₆₀, CL₈₀, CL₁₀₀, with the testes (exposure) similar to those of toxicity, r_i was obtained with the total number of insects emerged after 46 days. Similar procedure was performed for the period of development, with the difference that every two days (after first emerged insect) left counting the number of emerged insects.

Repellency was made with treated bean with CL₅₀ and CL₁₀₀ for 24 hours , then the bean was placed in arenas with four arms and a box at each end of the arm (2 arms for bean untreated and 2 for treated bean) and then 24 hours the number of insects in each box was recorded.

Mass loss was calculated from the final weight of the grains of each treatment and the initial weight of these same beads.

The results show that LC₅₀ is 24.80 uL L⁻¹ and the LC₉₅ is 81.14 uL L⁻¹. In addition it was found that the r_i decreased as the concentration was increased, achieving stability in the CL₄₀. The development period was also affected by the lethal concentrations of eugenol, two days delayed the start of the emergency for different treatments compared to control. Also was observed repellent effect of eugenol in CL₁₀₀ (134.13 uL L⁻¹) while the CL₅₀ (24.80 uL L⁻¹) eugenol was attractive effect for this insect. The mass loss of cowpea was proportional to the number of emerged insects.

According to these results it is concluded that eugenol has insecticidal activity to *C. maculatus* via fumigant, may be an alternative for controlling of beans this pest in small storage units of the genus.

As a recommendation it is extremely important to use organic products in order to avoid damage to the health of farmers, the environment and also to avoid massive losses of stored grain harvest

3. INTRODUCCIÓN

Eugenol es el principal componente fenólico de plantas de la familia Lauraceae, y algunas especies presentan este compuesto en más del 90% (Viteri Jumbo et al. 2014), que así mismo puede extraerse de pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otros aceites (Remington's Pharmaceutical. 1990). Los insecticidas sintéticos se utilizan actualmente para el control de plagas en centros de almacenaje; pero por su costo y la disponibilidad de su límite que utilizan los agricultores, en calidad de fumigantes pueden ser tóxicos para los usuarios si no se manipula cuidadosamente (Tovignan et al, 2001) y es bien sabido que la resistencia se puede desarrollar rápidamente (Georghiou, 1990, Dales, 1996).

El fréjol (Fabaceae) representa una de las principales fuentes de proteína en la dieta humana, producido en 75% de los países en desarrollo en todo el mundo (Schmale et al. 2006). Ocupa el tercer lugar a nivel mundial dentro de las leguminosas alimenticias más importantes, siendo solamente superado por la soja (*Glycine max* L.) y maní (*Arachis hipogea* L.) (Gonzalez et al. 2006).

En el año 2014 en Ecuador la producción nacional de fréjol seco aumento en 17.01% respecto al año 2013 (MAGAP 2014). Lo que hace necesario su almacenamiento para el posterior consumo o comercialización. Y es aquí durante el almacenamiento de los granos, son observadas considerables pérdidas, tanto de naturaleza cuantitativa como cualitativa.

Los métodos más comunes de control de los insectos de granos son realizados por medio del uso de insecticidas protectores (piretroides) y fumigantes (fosfina) en este último el precursor es el fosfato de aluminio (Sousa et al. 2008). Sin embargo el uso excesivo de insecticidas sintéticos causa riesgos e implicaciones toxicológicas para la salud humana (Everett & Matheson 2011, Zaganas et al. 2013, Corsini et al. 2013, Mostafalou and Abdollahi 2013, Kavvalakis and Tsatsakis 2012, Zhang et al. 2010, McKinlay et al. 2008, Bjørling-Poulsen,

Andersen and Grandjean 2008), y el aumento de la contaminación del medio ambiente (Wakil, Riasat and Lord 2013). Además, el uso indiscriminado de la fosfina contra plagas de granos almacenados ha favorecido el desarrollo de poblaciones resistentes a este fumigante (Song, Wang and Zhang 2013, Pimentel et al. 2009). Por estas razones cada vez existen más restricciones al uso de insecticidas para el control de plagas en productos almacenados.

Frente a esta situación varias investigaciones han sido desarrolladas buscando obtener métodos alternativos en el control de insectos durante el almacenamiento de granos, entre los cuales se destaca los productos de origen vegetal (Papachristos et al. 2004, Mondal 2006); cuyas ventajas son que provienen de recursos renovables y son rápidamente degradables.

Por lo expuesto anteriormente surge la necesidad de realizar la presente investigación sobre el uso de compuestos orgánicos aislados en este caso contra insectos plagas de orden Coleoptera, familia Chrysomelidae, género *Callosobruchus*, especie *maculatus* de granos almacenados; planeándose para ello los siguientes objetivos:

- ✓ Evaluar la susceptibilidad de *C. maculatus* expuesto a eugenol puro vía fumigante.
- ✓ Determinar la tasa instantánea de crecimiento y el periodo de desarrollo de *C. maculatus* expuestos a concentraciones sub-letales de eugenol.
- ✓ Descubrir la capacidad repelente de eugenol para adultos de *C. maculatus*.
- ✓ Calcular la pérdida de masa de los granos de fréjol tratados con dosis sub-letales de eugenol e infestados con adultos de *C. maculatus*.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. FRÍJOL *caupí* (Género: *Vigna*)

Fréjol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) es una de las leguminosas de grano más ampliamente adaptados, versátiles y nutritivos. La cosecha es cultivada en cerca de 7 millones de hectáreas en todas las regiones cálidas del mundo (Singh and Rachie 1985). Alrededor de dos tercios de la producción y más de las tres cuartas partes de la zona de producción se extiende sobre el vasto Sudán Sabana y zonas del Sahel de África subsahariana. Sin embargo cantidades sustanciales de fréjol caupí también se producen en América del Sur (en gran parte en el semiárido noreste de Brasil), Asia y el sudeste y otras regiones occidentales de América del Norte.

Tiene su origen en el continente Africano y se encuentra distribuido actualmente en todo el mundo adaptado a climas tropicales y subtropicales (Bezerra et al. 2010). El fréjol caupi es una leguminosa muy tolerante a la sequia y a altas temperaturas, por lo que es un cultivo de subsistencia en climas casi extremos (calidos) (de Magalhães Bertini, Teófilo and Dias 2009). Este tipo de fréjol en Ecuador se lo conoce comunmente como fréjol chileno, cuarenton, bocanegra, caupí, garbanzo criollo, etc; y es ampliamente plantado y consumido en los sectores cálidos, y convirtiendose en la mejor opcion como fuente de proteína para la poblacion del medio rural principalmente. En la provincia de Loja (Ecuador) este tipo fréjol es bien cultivado en los cantones de climas áridos (Zapotillo, Catamayo, Macará), en donde el periodo de lluvias es de solo 4 meses (enero-abril).

Los granos de este fréjol pueden ser consumidos tanto secos como en estado inmaduro, o como un vegetal (vainas con granos tiernos); las semillas contienen entre 20 y 25% de proteínas y 30 a 60% de hidratos de carbono (Ma and Bliss 1978, Venter and Van Eyssen 2001). Debido a sus atributos superiores nutricionales, versatilidad, adaptabilidad y productividad, fréjol caupí fue elegido por la Administración Nacional de Aeronáutica y del Espacio como uno de los

pocos cultivos digno de estudio para alimento en las estaciones espaciales (Ehlers and Hall 1997). No entanto las personas consumen este fréjol unicamente por temporadas debido a que la produccion y el almacenamiento son expuestas a pérdidas causadas por varias especies de insectos-plagas y entre ellos *C. maculatus* es el de mayor importancia. (Timko and Singh 2008, Júnior and Vilarinho 2011).

En el Ecuador es un cultivo característico de la Región Litoral, sembrado en superficies menores por agricultores de recursos limitados, al momento no existen estadísticas sobre la producción, superficie sembrada, etc. (INIAP 2015).

4.1.1 Taxonomía del Fríjol *Vigna*

Reino: Vegetal
Phylum: Magnolophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Leguminosae
Familia: Fabaceae
Género: *Vigna*
Especie: *caupí*

4.1.2 Morfología del Fríjol *Vigna*.

El frijol *Vigna* es de tipo herbácea con diferentes hábitos de crecimiento, erecto, semi-postrado, semi-erecto y postrado. Existen variedades precoces, de maduración uniforme (55-70 días), de tipo determinado y tardía (6 a 8 meses), de tipo indeterminado, que presentan maduración desigual. (Aspromor, 2012).

Según Haeff, V (1990) el fréjol es una planta hortícola por excelencia; se consume la vaina tierna (verde) o desgranadas (secas), siendo una importante fuente de proteínas. Primordialmente es cultivado con el fin de cosechar granos

secos, los cuales pueden consumirse frescos, enlatados o congelados. Además las semillas y vainas de estas plantas se usan como alimento forrajero.

Gispert C. (1996), el frejol es una especie de clima suave y por tanto, no crece bien en zonas demasiado frías o demasiado cálidas. El umbral térmico de la especie es de 10°C como temperatura mínima y 25°C como máxima. Las heladas producen la muerte de las plantas, en tanto que el exceso de calor afecta a la floración y aumenta la esterilidad de las flores (López, & Corintia, 2015). El tamaño de la planta es de 25 cms. (tipos erectos) erectos y 80 cms. (tipos semierectos).

4.1.2.1. Raíces

Profundas de tipo pivotante (hasta 1.95 m.), con abundantes ramificaciones laterales que pueden alcanzar una longitud de 1.40 m, lo que les permite absorber mayor cantidad de agua y nutrientes, en comparación a los frijoles comunes (López, & Corintia, 2015). En sus raíces crecen nódulos que son protuberancias donde viven bacterias del genero *Rhizobium* quienes fijan nitrógeno del aire que la planta utiliza, (Aspromor, 2012).

La densidad de raíces, profundidad de enraizamiento y materia seca radical por unidad de área, son parámetros que pueden ser utilizados como criterios de tolerancia a sequía, junto con el área foliar específica (Matsui & Singh, 2003).

4.1.2.2. Tallos y ramas

Los tallos son de forma cilíndrica con ligeros bordes, algunas veces son glabros (sin pubescencia) y huecos, con diferentes coloraciones de acuerdo a la especie. El número de entrenudos y guías o ramas laterales es variado, (Aspromor, 2012).

La ramificación se inicia generalmente en la axila de la primera axila de la primera hoja trifoliada y continua hacia la parte alta, siendo en general las dos primeras

ramas en formarse, las más importantes las ramas primarias que se originan en nudos más altos del tallo principal o ramas secundarias, el caso que los cultivares que las producen son de menor crecimiento y realizan un menor aporte al rendimiento, el desarrollo de ramas y nudos cotiledonar solo ocurre en caso que la planta sufra algún daño importante en su crecimiento (Fenalce, 2013).

4.1.2.3. Flores

Las flores Están agrupadas en inflorescencias simples “ramilletes “ramilletes florales”, florales”, cuyo color varía entre amarillo (fase inicial) a blanco (flor abierta) abierta). Las flores hermafroditas, por lo que son preferentemente autogamas (95%). Sin embargo, existe un 5 % de polinización cruzada, cruzada, principalmente por insectos. (Aspromor, 2012).

Flores nacen de múltiples racimos entre 8 y 20 cm de longitud, cada racimo está sujeto a un largo pedúnculo lo que es una característica propia del Caupi, y permite cosechar la semilla de manera sencilla. Es una especie generalmente autogamas (se auto poliniza). (SEMICOL, 2010).

4.1.2.4. Fruto

Fruto Es una vaina lineal o encorvada que alcanza un tamaño de 10 a 25 cm. de longitud y de 1.5 a 3.2 cm. de diámetro. Contiene de 6 a 21 granos por vaina. Las vainas pueden ser de color verde o presentar moteados púrpura o rojizo en sutura y valvas. Las valvas están adheridas al pedúnculo formando ángulos de 30 a 90°; son erectos o colgantes, dependiendo del ángulo que formen. Por su forma las vainas pueden ser derechas o presentar cierto grado de curvatura. Generalmente en cada tallo floral sólo 2 o 3 flores se convierten en vainas y el lapso en que las semillas se desarrollan en las vainas, es de 20 a 25 días (Aspromor, 2012).

4.1.2.5. Semilla

La semilla difiere en cuanto a color (crema, marrón, rojizo y negro), forma (redondo, oval, cuadrada), tamaño y textura (lisa, áspera o rugosa). Tamaño grande (peso de 100 semillas): > 25 gr. Tamaño mediano (peso de 100 semillas): entre 18 y 25. (Aspromor, 2012).

La forma de la semilla es arriñonada, de superficie lisa, de color crema de hilo de color blanco redondo de una tonalidad oscura. La semilla son de tamaño pequeño 0,4 a 0,8mm de largo, y el número de la semilla en una libra alrededor de 1600 (SEMICOL, 2010)

4.2. GORGOJO DEL FRÍJOL *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae)

Escarabajos del fréjol *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), son insectos plagas originalmente de África y Asia; actualmente se encuentran por todo el mundo tropical y subtropical. Esta especie también es conocida como el gorgojo del fréjol del sur. Las larvas de esta especie se alimentan y desarrollan exclusivamente en semillas de leguminosas (Fabaceae) de ahí el nombre de gorgojo del fréjol.

Callosobruchus maculatus es de importancia económica alta, las infestaciones a menudo causan calefacción, dando lugar a un amplio crecimiento de moho, su distribución es en todo el mundo, especialmente en regiones cálido templado y tropical, el daño económico que ocasiona es importante porque los granos dañados pierden parcial o totalmente su valor comercial, debido a que son rechazados para el consumo humano (Rees 2007).

(Fabricius 1775) nos dice que *C. maculatus* es una de las especies de plagas más destructivas de este tipo de fréjol. Caswell (1981) Asegura que más del 90% del daño de insectos a las semillas de fréjol *caupí* es causada por *C. maculatus*.

Esta plaga puede causar hasta un 100% la pérdida de granos de fréjol *caupí* almacenados en unos pocos meses (De Moura & De Andrade 2005, Kang, Pittendrigh and Onstad 2013). Lo que obliga a los pequeños productores a vender casi todo el fréjol al final de la cosecha, saturando así la oferta del en el mercado y causando con ello una caída de los precios (Schmale et al. 2006).

Se estima que cerca de 10 a 20% de los granos son perdidos durante el almacenamiento, y uno de los principales factores es el ataque de insectos plaga (Hertlein et al. 2011).

4.2.1. Taxonomía del gorgojo del fríjol (*Callosobruchus maculatus*)

Reino: Animalia
Phylo: Arthropoda
Clase: Insecta
Orden: Coleóptera
Familia Chrysomelidae
Genero: *Callosobruchus*
Especie: *maculatus*

4.2.2. Descripción morfológica del gorgojo *Callosobruchus maculatus*.

Callosobruchus maculatus es una plaga primaria pues atacan a los granos enteros y sanos tanto en la bodega como en el campo, los adultos miden 3-4 mm, de cuerpo oval, semicuadrado con patas largas los élitros no cubren

completamente el abdomen, con manchas negras visibles en la hembra, mientras que el macho son de color castaño con manchas negras muy pequeñas, el fémur posterior con dos escotaduras en forma de dientes, antenas largas y aserradas, las larvas tienen piernas parcialmente desarrolladas, los adultos son de vida corta; de 10 a 12 días y no se alimentan de granos almacenados.

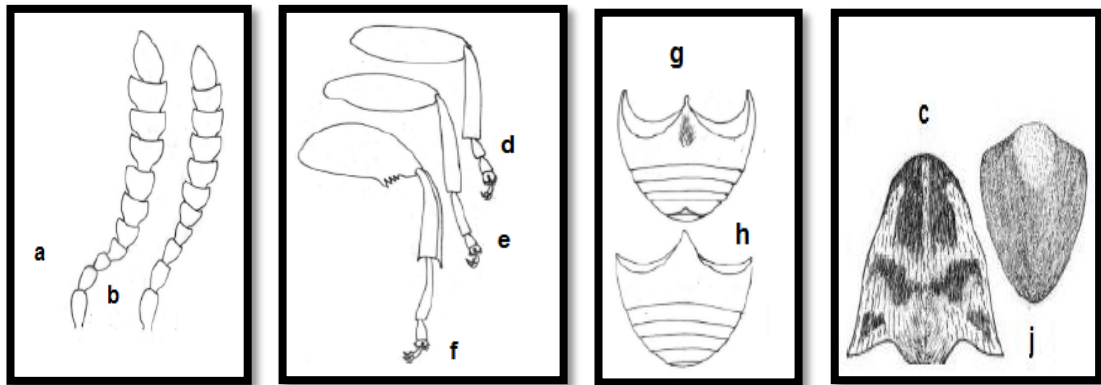


Figura 1. Morfología coleóptera Chrysomelidae: a) Antena masculina; b) Antena femenina; c) pronoto; d) pierna protorácica; e) pierna mesotorácica; f) pierna metatorácica; g) abdomen del macho; h) abdomen de una hembra; i) pigidio.

4.2.3. Ciclo de vida

Una vez copuladas, las hembras adultas colocan (ovipositan) huevos fertilizados individuales en la superficie externa de un grano de fréjol. Los huevos son ovals en forma de huso (0.75mm de longitud), de color claro, brillante y firmemente pegados a la superficie de frijol (Figura 2a). La larva ecloea del huevo, abre galerías a través de la cubierta de la semilla, ingresa al endospermo del fréjol sin moverse fuera de la protección del huevo. Una vez que la larva se ingresa en el fréjol, el huevo restante (cascaron) se convierte en blanco opaco (figura 2a) o moteado ya que se llena con restos (heces) de la joven larva. Las larvas (Figura 2b) abren madrigueras y se alimentan del endospermo del fréjol y del embrión, interamente se someten a una serie de mudas, abren madrigueras hasta colocarse en una sola posición justo por debajo de la cubierta del grano antes de empupar (después de 4 estadios larvales) (Devereau et al. 2003). Aunque la

cubierta de la semilla del grano permanece aún intacta, una ventana de 1-2mm redonda es visible y justo ahí es donde el gorgojo pupará. (Figura 2c). Pupación (Figuras 2d) la realiza al final de la metamorfosis (completa) y con ello pasa de ser una larva a ser un adulto con alas. El adulto que resulta de la pupación a través de la cubierta de la semilla y emerge (Figura 2e y 2f).

Los adultos son completamente maduros de 24 a 36 horas después de la emergencia. Los machos buscan las hembras para acasarse; y las hembras almacenan el esperma viable en su espermateca (una estructura en el tracto reproductor femenino para el almacenamiento de esperma). Ni el macho ni la hembra adultos necesitan comida o agua durante su corta vida adulta (10-12 días) (Beck and Blumer 2011).

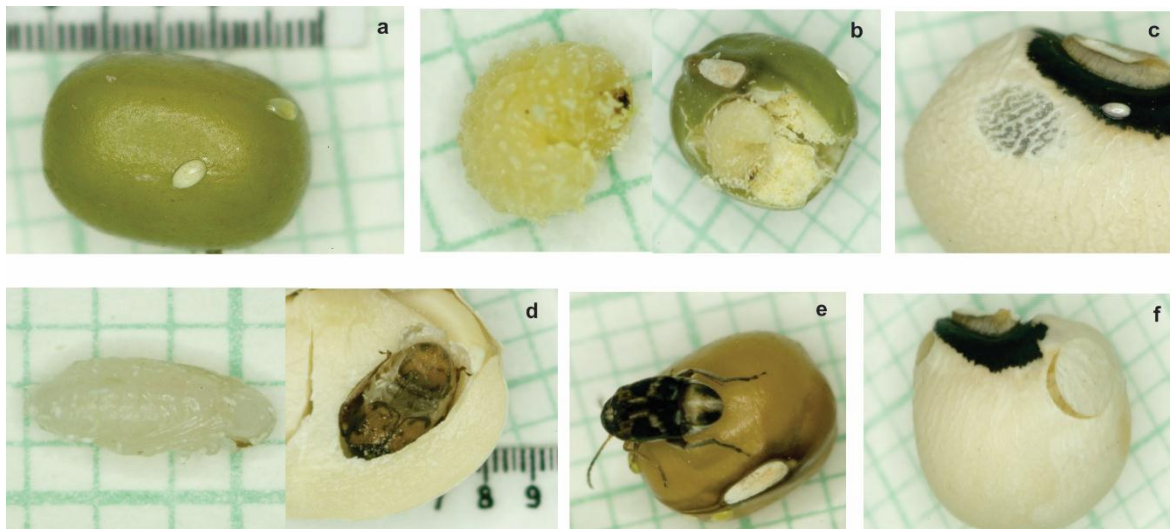


Figura 2. Biología de *C. maculatus* en fréjol caupí: a) huevo solo recién puesto (color claro) y viejo (color mas blanco) en frijol; b) Larva del gorgojó del frijol. La zona oscura en huevo la parte superior derecha de la larva aislada es la boca, en la parte derecha se observa una larva en un frijol; c) "Ventana" en la proteccion del grano de fréjol caupí, ubicación de la pupa de un gorgojo; d) pupa de un gorgojo, a la izquierda una joven pupa y a la derecha una pupa adulta en posición

cabeza abajo; e) gorgojo adulto; f) agujeros de emergencia de adultos. Los cuadrados de papel gráfico son de 1 mm.

4.2.4. Tiempo por cada generación

El tiempo transcurrido desde los huevos recién puestos a la aparición de los gorgojos adultos varía entre las cepas de gorgojos, del fréjol y las condiciones ambientales.

Estudios previos indican que la temperatura y la humedad relativa son las variables más importantes que influyen en los tiempos de generación (de huevo a adulto), cuando los gorgojos son criados en granos huésped preferidos (Howe and Currie 1964, Schoof 1941).

Dentro de un rango limitado, el aumento de temperatura disminuirá el tiempo de generación. Se han observado tiempos de una generación de tan sólo 3-4 semanas en una temperatura 30 °C (12:12 día: ciclo de luz de la noche), humedad ambiental (con un promedio de 30% de humedad relativa y que van desde 20% a 40% de humedad relativa). Gorgojos criados a 25 °C (12:12 día: ciclo de luz de la noche) y humedad ambiental (con un promedio de 50% de humedad relativa y que van desde 40% a 60% de humedad relativa) tuvieron un tiempos por cada generación de 5-6 semanas. Criaciones deste gorgojo a 22 °C (temperatura ambiente) con iluminación natural y humedad ambiente (con un promedio de 50% de humedad relativa y que van desde 40% a 60% de humedad relativa) demoraron en emregir 7 semanas (Beck and Blumer 2011).

4.2.5. Identificación de los sexos

Hembras y machos de estos gorgojos de fréjol caupí se distinguen fácilmente de otras por su aspecto general. La característica más distintiva es la coloración en la placa que cubre el extremo del abdomen. En la hembra, la placa se agranda y es de color oscuro en ambos lados (Figura 2). En el macho, la placa es más pequeña y carece de rayas (Brown and Downhower 1987). En algunas cepas,

las hembras son de mayor tamaño que los machos. Además, las hembras son de color negro y los machos son de color marrón (Beck and Blumer 2011).



Figura 3. Vista dorsal de un adulto de *Callobruchus maculatus*: vista dorsal de un adulto de *Callobruchus maculatus*: a) macho, b) hembra; a la derecha se observa el macho y la hembra dultos, nótase una mancha en la hembra en el extremo final del abdomen. Los cuadrados de papel gráfico son de 1 mm.

4.2.6. Principios generales de bioseguridad en el laboratorio.

Las actividades que se desarrollan en los laboratorios requieren un conjunto de medidas preventivas destinadas a proteger la salud de los usuarios que desempeñan en el laboratorio frente a los factores de riesgo con el fin de evitar accidentes y enfermedades.

4.2.6.1 Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo.

- ✓ **Grupo de riesgo 1.-** (riesgo individual y poblacional escaso o nulo)
Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
- ✓ **Grupo de riesgo 2.-** (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo)
Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente.

- ✓ **Grupo de riesgo 3.-** (riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo) Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro.
- ✓ **Grupo de riesgo 4.-** (riesgo individual y poblacional elevado) Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente.

4.2.6.2 Tipos de laboratorios según el grupo de riesgo (OMS 2005).

- ✓ **Tipo de laboratorio 1.-** nivel de bioseguridad básico, de enseñanza básica e investigación, apropiado para el grupo de riesgo 1 usado para práctica de laboratorio, no se utiliza ningún equipo de seguridad, se trabaja en mesa de laboratorio.
- ✓ **Tipo de laboratorio 2.-** nivel de bioseguridad básico, para el servicio de atención primaria y diagnósticos de investigación, adecuado para el nivel de grupo de riesgo de tipo 2, en este laboratorio se utiliza ropa protectora y señales de riesgo biológico, el trabajo se lo realiza en mesa de laboratorio y cámaras de seguridad biológica para posibles aerosoles.
- ✓ **Tipo de laboratorio 3.-** nivel de bioseguridad de contención que se lo utiliza para diagnósticos especiales e investigación, conveniente para el nivel de grupo de riesgo de tipo 3, aquí se realizan prácticas de nivel 2, con ropa especial, acceso controlado y flujo adicional de aire, el equipo de seguridad que se utiliza en este laboratorio es cámara de flujo biológico además de otros medios de contención primaria para todas las actividades.
- ✓ **Tipo de laboratorio 4.-** nivel de bioseguridad de contención máxima en el cual se realiza para diagnósticos de unidades de patógenos peligrosos, se realizan prácticas de nivel 3, mas cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos, el equipo

de seguridad que se utiliza es cámara de seguridad biológica de clase III, trajes presurizados, autoclave de doble puerta y aire filtrado.

4.3. EUGENOL

Moléculas naturales aisladas y sintetizadas representan un uso potencial para el control de plagas agrícolas, y especialmente de insectos que atacan a los granos almacenados. Esto puede evidenciarse en los insecticidas basados en moléculas naturales como los llamados piretroides, que provienen de las flores de margarita (*Tanacetum cinerariaefolium* Schulz -Bip.; syns *Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis., *Pyrethrum cinerariaefolium* Trevir.) con sus moléculas naturales “piretros” y son comercialmente importantes en el control de plagas. (Gilbert & Gill 2010, Soderlund et al. 2002).

Otra de las moléculas naturales con actividad biológica es el eugenol, presente en grandes cantidades en plantas de la familia Lauraceae, especialmente en el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (Fichi, et al 2007, Trajano et al 2010, González-Rivera, et al 2015, De Lima et al. 2016, El-Maati et al. 2016). Variando su efecto de acuerdo al organismo, su estado de desarrollo, y la vía de aplicación, que puede ser por contacto o fumigante.

El eugenol es un compuesto orgánico derivado del fenol, pertenece al grupo de los fenilpropanoides, es un importante constituyente volátil del aceite esencial obtenido a través de hidro-destilación principalmente de brotes y hojas de *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*). Es una molécula notablemente versátil incorporada como ingrediente funcional en numerosos productos y ha encontrado aplicación en la industria farmacéutica, agrícola, alimenticia, cosmética, etc. (Kamatou, Vermaak and Viljoen 2012).

Varios estudios muestran que eugenol tiene una amplia aplicación en la industria farmacéutica y agrícola. En este sentido ha sido demostrado que el eugenol presenta actividad anti fúngica (Ranasinghe, Jayawardena and Abeywickrama

2002, Fichi et al. 2007); altamente tóxico para artrópodos (El Hag, El Nadi and Zaitoon 1999, Viteri Jumbo et al. 2014, Trongtokit et al. 2005); posee actividad acaricida (Kim, Kim and Ahn 2003).

La forma de actuar del eugenol va desde la muerte de los insectos por contacto, repelencia, inhibición de la oviposición, reducción en el desenvolvimiento larval, reducción en la fecundidad y fertilidad de adultos; pudiendo ser tóxicos por vía tópica o fumigante (Papachristos et al. 2004, Phillips and Appel 2010).

A pesar de conocerse el potencial de mezclas orgánicas (aceites esenciales) que poseen eugenol como fungicidas e insecticidas son escasas las informaciones sobre el uso de eugenol puro en el control de insectos de granos almacenados y particularmente para el control de *C. maculatus*.

4.3.1. Fuentes naturales de Eugenol

Eugenol ha sido bien identificado en varias plantas aromáticas, como *Myristica fragrans* Houtt. (nuez moscada), *Cinnamomum verum* J.Presl (canela real), *C. loureirii* Nees. (Saigon canela), *Ocimum gratissimum* Forssk. (albahaca) y *Ocimum basilicum* L. (albahaca dulce). Sin embargo *Eugenia caryophyllata* (= *Syzygium aromaticum*) o clavo de olor puede ser considerada la principal fuente natural de este compuesto, y representa entre 45 y 95% del total de su aceite esencial. (Zheng, Kenney and Lam 1992).

Eugenol comercial es derivado de clavo de olor (hojas), hojas de canela obtenidos mediante hidro-destilación y es purificado.

4.3.2. Proceso de obtención del Eugenol

4.3.2.1 Destilación directa por arrastre de vapor

Ocampo, et al., (2008) & Fieser, L., (1985) dicen que cuando dos líquidos coexisten en un recipiente abierto a presión atmosférica, ambos contribuyen a la presión parcial sobre la superficie de los dos líquidos. Por ello cuando se

aumenta la temperatura la presión de vapor sobre la superficie de los líquidos aumentará. La ley de Dalton dice que la relación entre las presiones de vapor de dos líquidos es directamente proporcional a las concentraciones molares de ambas sustancias en fase gaseosa.

De esta manera al sumarse las dos presiones de vapor parciales, los dos líquidos pueden llegar al estado gaseoso con una temperatura menor a la que necesitarían las sustancias puras para hacerlo y así, en el caso del agua, arrastra o co-destila junto con una sustancia inmiscible como el aceite esencial.

En el caso de la destilación por el método directo, el agua y el líquido que se desea arrastrar se encuentran en el mismo recipiente.

4.3.2.2 Destilación directa por arrastre de vapor, método vapor vivo

A diferencia del método directo, en este caso el vapor del agua se genera en un recipiente diferente y luego pasa en forma de vapor de agua al recipiente donde se encuentra el material que contiene el líquido que se desea arrastrar con el vapor de agua. El principio por el cual se produce el arrastre o la co-destilación es el mismo que el método directo, es decir por la suma de las presiones parciales de cada líquido (Fieser, L., 1985).

4.3.2.3 Extracción Soxhlet

Este método se utiliza cuando se desea extraer un componente de un sólido que lo contiene, mediante un solvente orgánico que lo arrastra. Tiene la característica de ser una extracción continua debido a que el solvente se calienta en un balón de destilación que está conectado a un extremo de la cámara de extracción, en el interior de esta se encuentra la muestra en un cartucho de celulosa o vidrio, por el otro lado de la cámara hay un refrigerante, el vapor del solvente que se calentó en el balón de destilación sube por un tubo lateral y se condensa al llegar al refrigerante cayendo sobre la muestra, la cámara se llena hasta alcanzar el nivel del sifón y el solvente regresa al balón junto con el material orgánico que arrastró, este proceso se repite cuantas veces sea necesario para la extracción del analito deseado (Lamarque, et al., 2008) & (Sanz, et al., 2002).

4.3.3. Propiedades físicas y químicas

Eugenol (C₁₀H₁₂O₂), es un fenilpropanoide, levemente ácido, ligeramente soluble en agua y soluble en solventes orgánicos. Es un líquido aceitoso claro amarillento con un olor característico y agradable a clavo de olor y de sabor picante. En cuanto a la solubilidad es insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos (Gonzales., 2002).

Grandes cantidades de eugenol se utilizan en jabones y detergentes por para dar aroma, sin embargo puede causar decoloración en las prendas debido a su estructura de fenol.

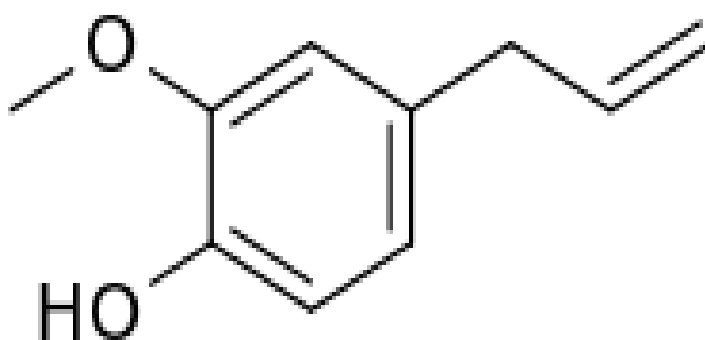


Figura 4. Fórmula química del eugenol.

Es un líquido aceitoso de color amarillo, su olor es característico y muy fácil de distinguir. Dentro de las propiedades físicas y químicas del eugenol podemos mencionar (Merck., 2014).

Punto de fusión:	- 9,2 °C
Punto de ebullición:	252 °C
Punto de inflamación:	> 110 °C
Densidad:	1,07 g/cm ³ (20 °C)

4.3.4. Propiedades farmacológicas de eugenol y su mecanismo de acción.

4.3.3.1 Actividad antibacterial

Diversos estudios han confirmado la actividad bactericida de eugenol contra varios patógenos como: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* y numerosos otros (Leite et al. 2007, Laekeman et al. 1990, Van Zyl et al. 2006). Investigaciones llevadas a cabo para evaluar el efecto de eugenol en la adherencia y formación de biopelículas patógenas de dos cepas de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron excelentes resultados, así: El tratamiento de *P. aeruginosa* con eugenol (0,5%) dio lugar a la inhibición de 60% de adherencia para *P. aeruginosa* (CIP A22) y 69% para *P. aeruginosa* (ATCC27853); así mismo se obtuvo inhibición de más de 90% cuando se testó eugenol para *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (El Abed et al. 2011).

4.3.3.2 Actividad antifúngica

Hongos micotoxigénicos causan enfermedades de las plantas durante el almacenamiento y el transporte, que pueden tener un efecto sobre la salud humana. Varios componentes de aceites esenciales, incluyendo eugenol han sido investigados, y mostraron efectos tóxicos sobre el crecimiento del micelio in vitro contra varias especies de *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* y *Alternaria alternata*. Varios otros estudios han confirmado la actividad antifúngica de eugenol contra patógenos tales como *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium viridicatum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *C. tropicalis* y *C. krusei* (Singh, Maurya and Catalan 2007, Gayoso et al. 2005).

4.3.3.3 Actividad anticancerígena

Debido a los efectos tóxicos de las drogas sintéticas, agentes naturales que pueden inhibir, retardar, bloquear o revertir la iniciación y eventos promocionales relacionados con la carcinogénesis son necesarios para la prevención y/o tratamiento del cáncer. Varios componentes de aceites esenciales, incluyendo el eugenol y sus compuestos relacionados, han sido investigados por su actividad anticancerígena. Así se encontró que eugenol (500 μM) para reducir la viabilidad celular de las células HeLa (agresivas) (Hussain et al. 2011). Varios estudios han demostrado que una combinación de sustancias puede producir una mejor actividad que cuando se utiliza un solo componente, y la terapia de combinación se utiliza a menudo para enfermedades como la malaria, el VIH y el cáncer. Una combinación de eugenol y 2-metoxiestradiol (un metabolito estrogénico endógeno) resultó como un agente antiproliferativo en varios modelos tumorales, inhibiendo el crecimiento de células de cáncer de próstata (Ghosh et al. 2009).

4.3.3.4 Aplicaciones en la agricultura

Formulaciones de eugenol (eugenol-Tween®; eugenol-etoxilato) en dosis de 150 $\mu\text{L/L}$ de eugenol volátil inhibió el crecimiento del micelio de agentes patógenos *Phlyctema vagabunda*, *Penicillium expansum*, *Monilia fructigena* y *Botrytis cinerea* que dañan las manzanas en la poscosecha en muchas regiones del mundo. En otros casos las concentraciones más bajas para eliminar en un 100% *Theobromae Lasodiplodia*, *Alternaria citrii*, *Penicillium digitatum* y *B. cinerea* fueron 500 $\mu\text{L/L}$. (Amiri et al. 2008, Combrinck, Regnier and Kamatou 2011).

4.3.3.5 Propiedades insecticidas y fumigantes

Estudios muestran a eugenol como un potencial protector de granos almacenados, así, este compuesto mostró toxicidad a cuatro especies de gorgojos de granos almacenados (*granarius Sitophilus*, *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* y *Prostephanus truncalus*). A más de ello, eugenol también fue altamente repelente estas cuatro plagas de granos (repelencia vario entre 80-100%); de igual forma existen registros que pueden incidir en el desarrollo de

huevos y estados inmaduros de estas plagas dentro de los granos (Obeng-Ofori and Reichmuth 1997, Viteri Jumbo et al. 2014). Según Miyazawa and Hisama (2001) aceite esencial con eugenol aplicado como fumigante (1ml/litro de aire) presentó toxicidad (98 y 100% de mortalidad) para *Rizoperta dominica*, *O. surinamensis*, *Callosobruchus chinensis* y *Oryzaephilus surinamensis*, la repelencia vario entre 37,5% a 100% y 45% a 100% respectivamente.

4.4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

4.4.1 SAS probit 2002

El procedimiento PROBIT calcula las estimaciones de máxima verosimilitud de los parámetros de regresión y las (O umbral) para los datos de respuesta cuántica a partir de ensayos biológicos u otros datos de eventos discretos. Esto incluye los modelos de probit, logit, logistic ordinal y de valor extremo (o gompit).

El análisis de Probit se desarrolló a partir de la necesidad de analizar las variables cualitativas (dicotómicas o politómicas) dependientes, variables dentro del marco de regresión. Muchas variables de respuesta son binarias por naturaleza (sí / no), mientras que otros se miden de manera ordinaria en lugar de continuamente (grado de gravedad).

Los investigadores han demostrado la regresión de mínimos cuadrados (OLS) es inadecuada cuando la variable dependiente es discreta (Collett 2003; Agresti 2002). Los análisis de Probit o logit son más apropiados en este caso.

4.4.2 SigmaPlot, 12,3

SigmaPlot® es un paquete de software de análisis de datos científicos y gráficos con curva avanzada, un lenguaje de programación basado en vectores, capacidad de macro y más de 50 pruebas estadísticas frecuentemente

utilizadas. SigmaPlot tiene las características analíticas necesarias para extraer la Información de sus datos de investigación.

Con más de 100 tipos de gráficos y una interfaz de usuario que permite la manipulación detallada de cada objeto del gráfico, puede crear el gráfico exacto para presentar los resultados.

4.4.3 CorelDraw X7

El programa CorelDRAW es parte del paquete de Corel Graphics Suite diseñado por Corel Corporation, que cuenta con varias versiones desde la más básica hasta la más avanzada y reciente.

Este software se utiliza en ámbitos de artes gráficas y comunicación con el propósito de producir, editar y transformar imágenes a nivel digital. Se trata de una aplicación de dibujo vectorial, con herramientas de diagramación, efectos y funciones sobre imágenes y páginas y alternativas de retoque y edición múltiples.

Se utiliza a menudo para generar imágenes y gráficos desde cero, pero también permite editar fotografías, dibujos y otro tipo de grafismos para corregir imperfecciones o defectos o incluso para brindar diversos efectos de cromatismo, brillo, contraste, curva tonal, efectos especiales, transparencias, mezclas y fundidos y otros.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. De laboratorio

- ✓ Frascos de vidrio
- ✓ Jeringa hamilton
- ✓ Demanda Bioquímica de Oxígeno (BOD)
- ✓ Eugenol purificado
- ✓ Fréjol (género: vigna)
- ✓ Papel filtro
- ✓ Hilo de algodón
- ✓ Insectos (*C. maculatos*)

5.1.2. De oficina

- ✓ Computadora. impresora
- ✓ Softwares estadísticos (SAS, SSPS,)
- ✓ Calculadora

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Lugar de desarrollo de la investigación

Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de Pre-procesamiento y Almacenamiento de productos Agrícolas del departamento de Ingeniería Agrícola (DEA) de la Universidad Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais-Brasil.



Figura 5. Institución en donde se desarrollaron los bioensayos.

5.2.2. Condiciones meteorológicas

- ✓ Temperatura 27 ± 2 °C
- ✓ Humedad relativa 75 ± 5 %
- ✓ Base húmeda 12%
- ✓ Escotofase 12 h.

5.2.3 Métodos de investigación

5.2.3.1 Método científico

Mediante este método se buscó la solución al problema planteado inicialmente, la cual se basó en estudios científicos previos realizados con la investigación como sustento para la aplicación del mismo.

5.2.3.2. Método experimental

Este método se basa en la experimentación y comprobación del problema inicial mediante insecticida orgánico purificado al 99%, aplicado al gorgojo del fréjol

caupí mediante tratamientos, aplicando concentraciones letales, los resultados se analizaron por cada tratamiento.

5.2.3.3. Métodos estadísticos

Los resultados de las curvas de concentración-respuesta fueron sometidos al análisis probit utilizando el procedimiento PROBIT do software (SAS Institute 2002), generando así las curvas de concentración-mortalidad. La tasa de instantánea de crecimiento (r_i), tasa de emergencia/desarrollo, pérdida de masa de los granos fueron sometidos a un análisis de regresión utilizando el *software* Sigma Plot (SPSS, 2001), y la repelencia fue sometida a un test ANOVA y test t.

5.2.4. Técnicas de investigación

Para el desarrollo del presente estudio investigativo se lo realizó mediante la técnica de observación directa en cada tratamiento al aplicar las respectivas dosis por tratamiento.

5.2.5. Diseño experimental

En la presente investigación se realizó en laboratorio de primer nivel, riesgo uno, se aplicó seis tratamientos, aplicando concentraciones letales diferentes CL₂₀, CL₄₀, iCL₆₀, CL₈₀, CL₁₀₀ y cinco repeticiones por cada tratamiento.

Cuadro 1. Características de los tratamientos.

Tratamiento Repetición	CL₂₀	CL₄₀	CL₆₀	CL₈₀	CL₁₀₀
I	I	I	I	I	I
II	II	II	II	II	II
III	III	III	III	III	III
IV	IV	IV	IV	IV	IV
V	V	V	V	V	V

Fuente: La Autora.

5.2.6. Proceso y mantenimiento de la población de *Callosobruchus maculatus* para los bioensayos.

Los insectos utilizados en los presentes bioensayos son provenientes de la ciudad de Viçosa-Minas Gerais-Brasil. La criación masal fue iniciada con 100 adultos de *C. maculatus* obtenidos de granos de esta ciudad, fueron mantenidos en frascos de vidrio con capacidad de 1,5 litros, sobre granos de fréjol caupí con una humedad de 12% (b.h.) y en un volumen del 50% en base a la capacidad del frasco. Con el objetivo de eliminar posibles infestaciones de campo, los granos de fréjol-caupí fueron previamente mantenidos sobre refrigeración (-18 °C) durante 15 días. Los frascos fueron acondicionados en cámaras climáticas con temperatura controlada de 27±2 °C y con 75±5% de humedad relativa y escotofase de 12 h.

5.2.7. Acondicionamiento del fréjol caupí para los bioensayos

Los granos de frejol fueron obtenidos del comercio local y fueron sometidos a una limpieza manual para la eliminación de tierra, grano quebrado y material extraño. Posteriormente, se los mantuvo a una temperatura de -18 °C durante 15 días, con el fin de eliminar posibles infestaciones internas procedentes del

campo. Previo a todos los bioensayos, y 48 horas antes, los granos de frejol fueron retirados de la cámara fría y expuestos a temperatura ambiente.

5.2.8. Obtención del Eugenol

El eugenol líquido (99% de pureza) fue adquirido en el mercado local (São Paulo-Brasil), en cantidad de 200 ml y con fecha vigente a la de los bioensayos.

5.2.9. Metodología para el primer objetivo:

Evaluar la susceptibilidad de *C. maculatus* expuesto a eugenol puro vía fumigante.

Para cumplir con el primer objetivo se ejecutó mediante el método científico mediante el cual se aplicó el método experimental para realizar la susceptibilidad de *C. maculatus* donde se evalúa la mortalidad de *C. maculatus* expuestos a eugenol puro vía fumigante, fueron hechos testes preliminares para estimar las concentraciones letales (CL) de dosis que causarían mortalidad de 50% (CL₅₀) y 95% (CL₉₅) de los insectos.

Las concentraciones letales (CL) de eugenol utilizadas en los testes definitivos fueron de CL₂₀ (13,46 $\mu\text{L L}^{-1}$), CL₄₀ (20,64 $\mu\text{L L}^{-1}$), CL₆₀ (29,80 $\mu\text{L L}^{-1}$), CL₈₀ (45,66 $\mu\text{L L}^{-1}$) y CL₁₀₀ (e 134,13 $\mu\text{L L}^{-1}$) en seis tratamientos y cinco repeticiones.

Los bioensayos fueron realizados en frascos de vidrio de 0,8 litros, con 50 gramos de frejol caupí y 20 insectos de *C. maculatus*, adultos con 1–2 días de edad; los frascos conteniendo los insectos fueron cerrados herméticamente con una tapa metálica enroscada y sellada con silicona durante el periodo de exposición. El eugenol fue aplicado en recortes de papel filtro de 2 cm² usando una microsiringa de 500 μL (Hamilton, Reno, NV, EUA), y fueron pendurados desde la tapa superior de los frascos, para así evitar el contacto con los insectos.

El periodo de exposición de los insectos a eugenol fue de 24 h. los frascos fueron acondicionados en cámaras climáticas tipo B.O.D. (modelo 347 CD, Farnem, São Paulo, SP, Brasil), a una temperatura de 27 ± 2 °C La mortalidad de los insectos será contabilizada al final de cada periodo de exposición. El tratamiento control fue expuesto a las mismas condiciones excepto a eugenol y posteriormente se usó la técnica de observación directa.

Para la generación de la curva de dosis-mortalidad se utilizó el metodo estadístico donde los datos de toxicidad fueron sometidos a analisis de Probit, utilizando el *Software* SAS (SAS Institute, 2002).

5.2.10. Metodología para el segundo objetivo:

Determinar la tasa instantánea de crecimiento y el periodo de desarrollo de *C. maculatus* expuestos a concentraciones sub-letales de eugenol.

Para desarrollar el segundo objetivo se lo realizó mediante el método experimental, para realizar estos experimentos se basó en el método científico el cual se determinó la instantánea de crecimiento poblacional (r_i) y el periodo poblacional de desarrollo *C. maculatus* expuestos a consentraciones sub-letales de eugenol, los insectos fueron expuestos a concentraciones sub-letales (CL) de eugenol este teste se lo realizó con la finalidad de evaluar si el eugenol purificado interfiere o no en los padrones reproductivos de *Callosobruchus maculatus*.

El bioensayo fue conduzido con seis tratamientos y cinco repeticiones, las unidades experimentales fueron contituidas por frascos de vidrio con capacidad de 0,8 litros. A cada frasco fue adicionado 50 g de fréjol caupí, con 12% de humedad, libres de cualquier infestacion e insecticida, y 20 insectos adultos de *C. maculados* sexados (10 parejas), com edad de 1-2 dias. Los insectos fueron expuestos a eugenol purificado por 24 h. en las concentraciones letales (CL) (CL₂₀) 13,46 $\mu\text{L L}^{-1}$; (CL₄₀) 20,64 $\mu\text{L L}^{-1}$; (CL₆₀) 29,80 $\mu\text{L L}^{-1}$; (CL₈₀) 45,66 $\mu\text{L L}^{-1}$ y (CL₁₀₀) 134,13 $\mu\text{L L}^{-1}$.

El eugenol fue aplicado en recortes de papel filtro de 2 cm², que fueron pendurados desde la tapa superior de los frascos, para así evitar el contacto directo de los insectos y de los granos con el producto. Los frascos fueron herméticamente sellados con cola tapa metálica tipo rosca e silicona. Enseguida fueron acondicionados en una cámara climática de tipo B.O.D., a una temperatura de 27±2 °C, humedad relativa de 70±5% y escotofase de 12 h. El tratamiento control fue realizado con la misma cantidad de granos e insectos sin exposición a eugenol.

Después de 24 horas fueron retirados los papeles filtros que contenían eugenol e las tapas enroscables de cada frasco fueron sustituidas por tapas de tela, finalizando de este modo el periodo de exposición de los insectos al eugenol.

Los frascos fueron retornados a la cámara climática (BOD) en las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa.

Se utilizó la técnica de observación directa para contabilizar el número total de insectos después de 46 días.

La tasa instantánea de crecimiento de los insectos fue calculada mediante el método estadístico por la ecuación sugerida por Walthall & Stark (1997).

Ecuación 1:

$$ri = \frac{\left[\ln\left(\frac{N_f}{N_0}\right) \right]}{\Delta t}$$

En que:

N_f = Número final de insectos;

N₀ = Número inicial de insectos

Δt = Número de días en que el ensayo fue realizado.

5.2.11. Metodología para el tercer objetivo:

Descubrir la capacidad repelente de eugenol para adultos de *C. maculatus*.

Al tercer objetivo se lo desarrolló mediante el método científico con en el cual se pudo desarrollar el método experimental de cada tratamiento con sus dosis respectivas y consistió descubrir la capacidad repelente de eugenol para adultos de *C. maculatus*, se realizó este bioensayo en el cual fue utilizada una arena formada por cinco cajas plásticas circulares (9 cm de diámetro e 8 cm de altura), siendo una caja central interconectada simétricamente a las demás por tubos plásticos (tipo pvc) de 12 cm dispuestos diagonalmente según la metodología expuesta por Fouad et al. (2012). Fueron expuestos a las CL₅₀ (24,80 µL L⁻¹) y a la CL₁₀₀ (134,13 µL L⁻¹) 50 gramos de fríjol por 24 h a una temperatura de 27 ± 2 °C, humedad relativa de 70±5% y escotofase de 12 h, fríjol control no fue expuesto previamente al eugenol.

Posteriormente el fríjol tratado y no tratado o fueron distribuidos en dos recipientes simétricamente opuestos de cada arena en cinco repeticiones. En la caja central se liberaron 50 adultos no sexados de *C. maculatus* y las arenas fueron colocadas en las mismas condiciones anteriores excepto las horas luz, que en este parte hubo ausencia de luz para evitar posible efecto de esta sobre los insectos.

Se utilizó la técnica de observación directa donde después de 24 horas se contó el número de insectos presentes en cada caja y el porcentaje de repelencia fue determinada de acuerdo a la metodología experimental propuesta por Mazzonetto & Vendramim (2003).

$$RI = (2 \times T)/(T + C) \times 100$$

En qué:

RI = índice de repelencia

C = número de insectos en los recipientes no tratados

T = número de insectos en los recipientes tratados.



Figura 6. Arena con 5 cajas y 4 brazos.

5.2.12. Metodología para el cuarto objetivo:

Calcular la pérdida de masa de los granos de fréjol tratados con dosis sub-letales de eugenol e infestados con adultos de *C. maculatus*.

Para desarrollar el cuarto objetivo se lo realizó mediante el método experimental, donde se calcula la pérdida de masa de los granos de fréjol tratados con dosis sub-letales de eugenol e infestados con adultos *C. maculatus* para esto fue determinada a partir del bioensayo de la tasa de crecimiento e periodo de emergencia/desarrollo.

Para obtener esta información fue necesario utilizar la técnica de observación directa donde se registra el peso del fréjol al inicio (día 0) y al final (día 46). El peso del fréjol fue realizado con una balanza analítica de precisión modelo GEHAKA bk 800.

6. RESULTADOS

6.1. EVALUAR LA SUSCEPTIBILIDAD DE *C. maculatus* EXPUESTO A EUGENOL PURO VÍA FUMIGANTE.

Cuadro 2. Susceptibilidad de *C. maculatus* expuesto a eugenol vía fumigante.

Tratamiento Repetición	I	II	III	IV	V	\bar{X}
Control	0	0	0	0	0	0
(CL ₂₀)	2	0	1	1	0	0.8
(CL ₄₀)	3	0	3	0	5	2.2
(CL ₆₀)	7	13	11	13	12	11.2
(CL ₈₀)	16	14	15	16	12	14.6
(CL ₁₀₀)	16	17	17	17	18	17

Fuente: La Autora

Cuadro 3. Susceptibilidad relativa de eugenol vía fumigante para *C. maculatus*.

Producto	N° de Insectos	Inclinación (± EPM ¹)	² CL ₅₀ (IF 95%) (µL/litro/50g frijol)	² CL ₉₅ (IF 95%) (µL/litro/50g frijol)	χ^2	P
Eugenol	600	3,17 ± 0,25	24,80 (22,79 – 27,03)	81,14 (68,25 – 103,92)	5,49	0,24

Fuente: La Autora

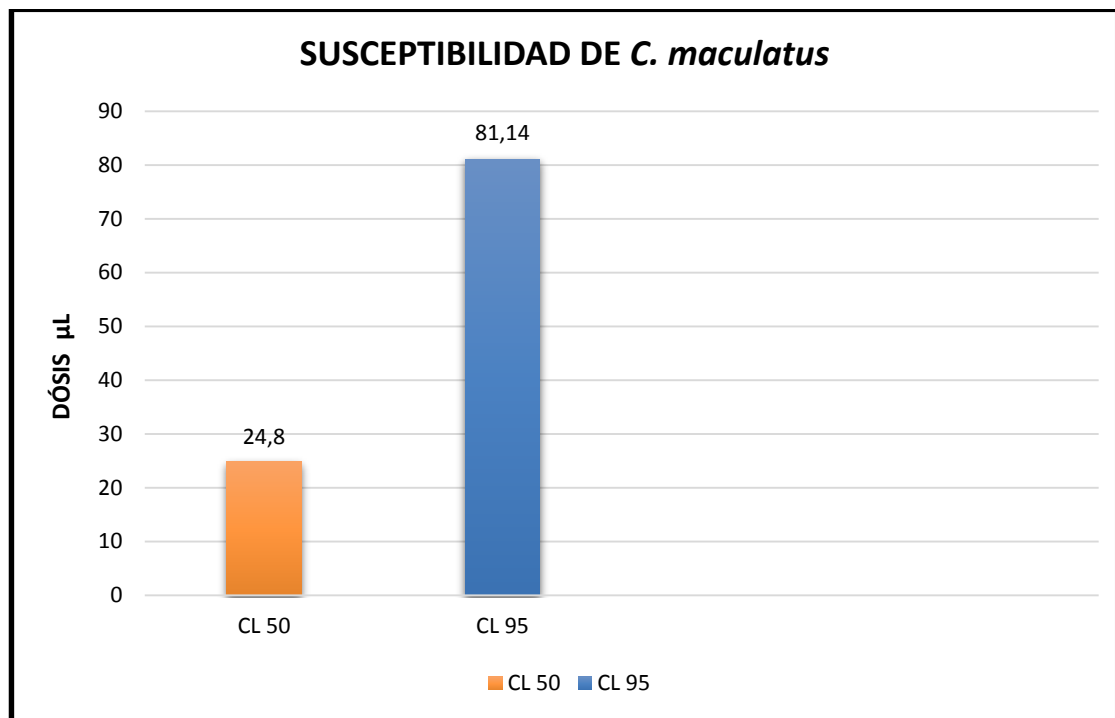


Figura 7. Susceptibilidad de *C. maculatus*.

Fuente: La Autora

Los resultados del cuadro 2 nos muestran la susceptibilidad de *C. maculatus* expuesto a eugenol puro 99% vía fumigante en seis tratamientos diferentes y 5 repeticiones cada uno, mientras que en el cuadro 3 y figura 7 se puede apreciar la dosis para la CL₅₀ y CL₉₅ (concentración letal), necesarias para ocasionar la mortalidad de los adultos de *Callosobruchus maculatus* fueron de 24,80 µL L⁻¹ y 134,13 µL L⁻¹ respectivamente y el p-value es de 0,24 y su Qui-cuadrado es de 5,49.

6.2. DETERMINAR LA TASA INSTANTÁNEA DE CRECIMIENTO Y EL PERIODO DE DESARROLLO DE *C. maculatus* EXPUESTOS A CONCENTRACIONES SUB-LETALES DE EUGENOL.

Cuadro 4. Tasa instantánea de crecimiento y periodo de desarrollo.

Repetición Tratamiento	Repetición n 1 día 46	Repetición n 2 día 46	Repetición n 3 día 46	Repetición n 4 día 46	Repetición n 5 día 46	\bar{X}
Tratamiento 1 Control	609,00	660,00	435,00	496,00	553,00	550,6
Tratamiento 2 (CL ₂₀)	213	234	260	139	311	331.4
Tratamiento 3 (CL ₄₀)	80	34	38	23	79	50.8
Tratamiento 4 (CL ₆₀)	34	13	40	25	60	34.4
Tratamiento 5 (CL ₈₀)	30	18	49	87	98	56.4
Tratamiento 6 (CL ₁₀₀)	20	19	74	13	17	28.6

Fuente: La Autora.

Cuadro 5. Ecuaciones ajustadas para la curva de tasa instantánea de crecimiento de *C. maculatus* expuesto a diferentes concentraciones de eugenol.

Producto	Modelo	Parámetros estimados (±EPM)			F	P	R ²
		y0	a	b			
Eugenol	f = y0+a* exp(- b*x)	0,0036±	0,0706	0,0653	10,64	0,0434	0,88
		0,0318	±0,0207	±0,033			

F = Test F; P = Probabilidad; R² = Coeficiente de determinación.

Fuente: La Autora

Cuadro 6. Ecuaciones ajustadas para la curva de emergencia y emergencia diaria de *C. maculatus* expuesto a diferentes concentraciones de eugenol.

Modelo	Tratamiento	Parámetros estimados (±EPM)			F	P	R ²
		a	b	x0			
f = a*exp(- ,5*((x-x0)/b)^2)	Control	219,86±	1,96±	6,63±	832,55	<0,0001	0,99
		5,42	0,05	0,05			
	CL ₂₀	89,21±	1,99±	7,94±	158,53	<0,0001	0,98
		4,94	0,13	0,13			
	CL ₄₀	21,26	1,83±	7,52±	87,43	<0,0001	0,96
		± 1,62	0,16	0,16			
	CL ₆₀	13,80	1,84±	7,10±	38,75	<0,0001	0,91
		± 1,57	0,25	0,24			
	CL ₈₀	25,39	1,63±	7,60±	136,47	<0,0001	0,97
		± 1,55	0,12	0,12			
	CL ₁₀₀	8,94	2,14±	9,01±	10,95	0,0051	0,73
		± 1,67	0,46	0,46			

F = Test F; P = Probabilidad; R² = Coeficiente de determinación.

Fuente: La Autora

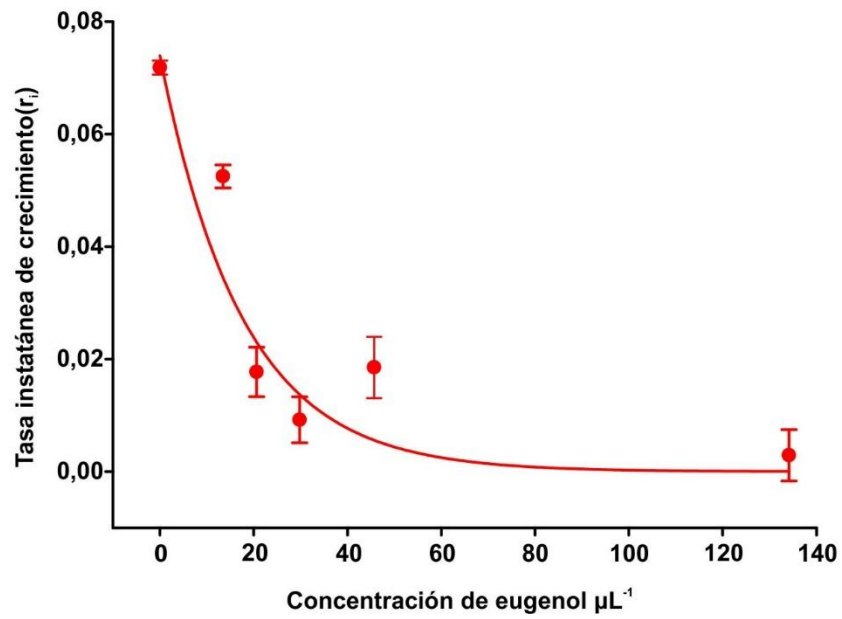


Figura 8. Tasa instantánea de crecimiento

Fuente: La Autora.

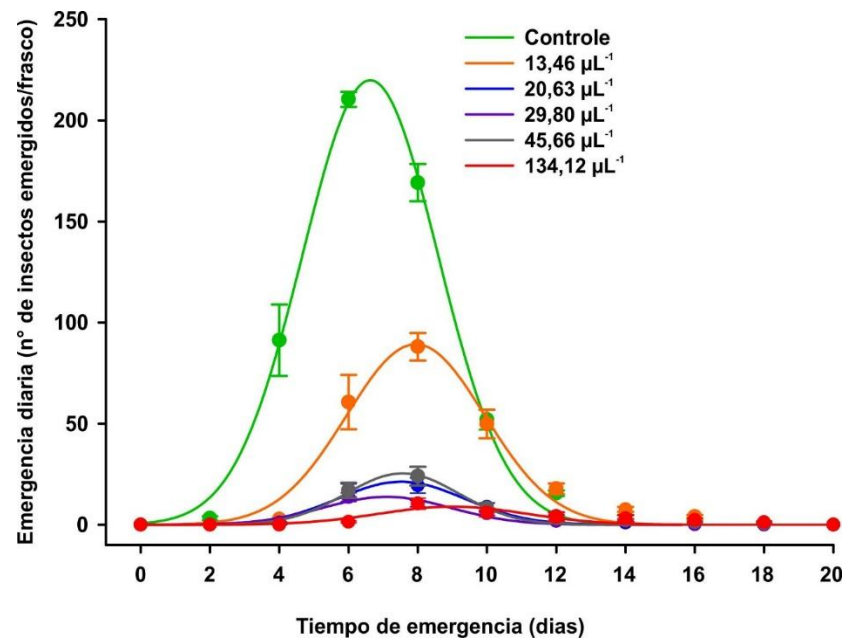


Figura 9. Emergencia diaria

Fuente: La Autora.

En el cuadro 4 se puede observar el periodo de desarrollo de los *C. maculatus* en 6 tratamientos con sus respectivas repeticiones y tratamientos, conforme aumenta la concentración de eugenol el crecimiento y desarrollo disminuye, mientras que en el cuadro 5 se aprecia la tasa instantánea de crecimiento (r_i) y modelo ajustado de *C. maculatus* expuestos a eugenol purificado. Esta r_i de *C. maculatus* fue influenciada significativamente por las concentraciones de eugenol a las que fueron expuestos los granos e insectos.

En el cuadro 6 observamos la emergencia diaria de *C. maculatus* fue afectada por las diferentes concentraciones a las que fueron expuestos ($13,46 \mu\text{L L}^{-1}$; $20,64 \mu\text{L L}^{-1}$; $29,80 \mu\text{L L}^{-1}$; $45,66 \mu\text{L L}^{-1}$ y $134,13 \mu\text{L L}^{-1}$), viéndose severamente reducida a medida que se incrementa las concentraciones de eugenol. Comparados los tratamientos entre sí puede observarse que entre el control y el resto hay una diferencia significativa y en la figura 8 observamos la tasa instantánea de crecimiento de *C. maculatus* expuestos a concentraciones de eugenol puro y sin la exposición de este producto (control) en función de las CL_{20} , CL_{40} , CL_{60} , CL_{80} y CL_{100} después de 46 días de exposición. Nótese que la tasa instantánea de crecimiento los insectos decrece a medida que las dosis son aumentadas hasta la CL_{40} ($20,64 \mu\text{L L}^{-1}$) no existiendo diferencia significativa entre esta y las CL_{60} ($29,80 \mu\text{L L}^{-1}$), CL_{80} ($45,66 \mu\text{L L}^{-1}$) y CL_{100} ($134,13 \mu\text{L L}^{-1}$).

En la Figura 9 se observa la emergencia diaria de *C. maculatus* expuestos a concentraciones de eugenol puro, esta figura describe el comportamiento de la emergencia diaria de *C. maculatus* expuestos a eugenol en diferentes concentraciones después de 46 días. Puede observarse que la emergencia de todos los tratamientos inicia cuatro días después de la iniciada en el control, de igual forma el pico de emergencia se da al día sexto para el control, al día ocho para las CL_{20} , CL_{40} , CL_{60} , CL_{80} , en tanto que para la CL_{100} es al día nueve. además de ello puede notarse además que la emergencia de las CL_{40} , CL_{60} , CL_{80} son semejantes y se diferencian en conjunto con el control e la CL_{20} , en tanto la CL_{100} difiere del resto.

6.3. DESCUBRIR LA CAPACIDAD REPELENTE DE EUGENOL PARA *C. maculatus*.

Cuadro 7. Repelencia de insectos usando concentraciones letales 50 y 100

Tratamientos	Repeticiones Tratamientos	Insectos en granos tratados	Insectos en granos no tratados	% insectos a granos tratados	% insectos en granos no tratados
CL50	R1	23	27	46	54
	R2	29	21	58	42
	R3	32	18	64	36
	R4	30	20	60	40
	R5	31	19	62	38
CL100	R1	17	33	34	66
	R2	23	27	46	54
	R3	24	26	48	52
	R4	16	34	32	68
	R5	19	31	38	62

Fuente: La Autora.

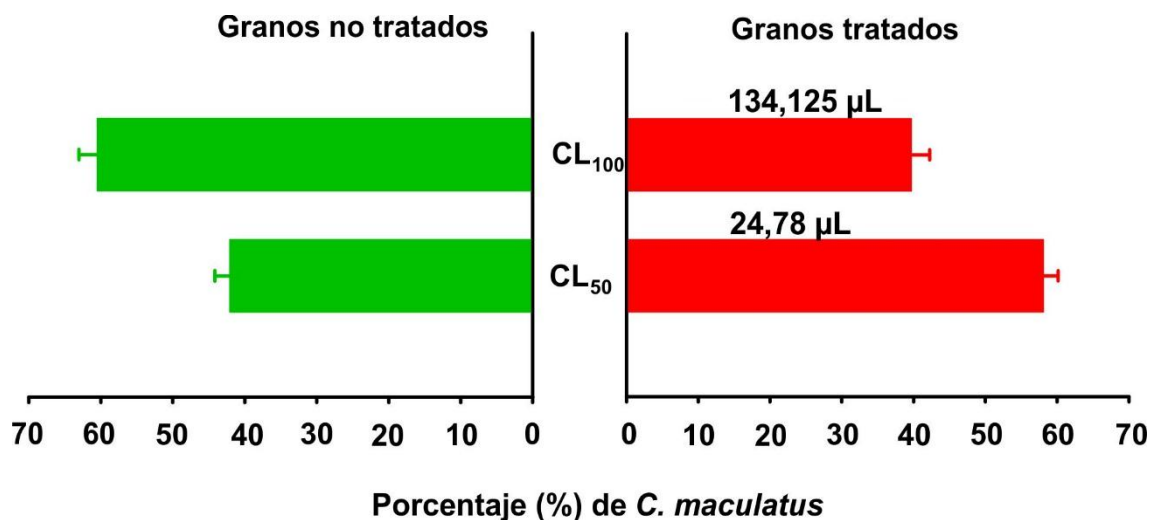


Figura 10. Repelencia

Fuente: La Autora.

En el cuadro 7 se puede observar la cantidad de insectos que eugenol repelió o atrajo de acuerdo a las dosis aplicadas por cada concentración letal (CL₅₀ y CL₁₀₀).

En la figura 10 se puede observar que no ejerció actividad repelente cuando fueron tratados los granos con la CL₅₀ (24,80 $\mu\text{L L}^{-1}$), por el contrario los insectos fueron atraídos de forma significativa hacia estas arenas. Sin embargo puede observarse que cuando el fréjol fue tratado con las dosis mas alta CL₁₀₀ (134,13 $\mu\text{L L}^{-1}$), si existio actividad repelente de forma significativa de este producto para *C. maculatus* además la repelencia es significativa entre los granos expuestos a la CL₅₀ (24,80 $\mu\text{L L}^{-1}$) y CL₁₀₀ (134,13 $\mu\text{L L}^{-1}$).

Con lo que podría asegurarse que la actividad repelente de eugenol para *C. maculatos* depende de la concentración a la que es expuesto el fréjol.

6.4. CALCULAR LA PÉRDIDA DE MASA DE LOS GRANOS DE FRÉJOL TRATADOS CON DOSIS-SUBLETALES DE EUGENOL E INFESTADOS CON ADULTOS DE *C. maculatus*.

Cuadro 8. Pérdida de masa de granos de acuerdo a la concentración letal.

Concentración	Repeticiones	Masa de grano antes (gr)	Masa de grano después (gr)	Pérdida de masa
Control	1	50,08	40,68	9,4
	2	50,05	39,41	10,64
	3	50,14	42,93	7,21
	4	50,16	41,52	8,64
	5	50,22	41,46	8,76
13,46	1	50,02	45,8	4,22
	2	50,04	45,5	4,54
	3	50,07	45,26	4,81
	4	50,04	46,68	3,36
	5	50,03	44,58	5,45
20,64	1	49,98	47,48	2,5
	2	50,02	48,06	1,96
	3	50,05	48,22	1,83
	4	50,01	48,24	1,77
	5	50,19	47,58	2,61
29,80	1	49,99	48,11	1,88
	2	50,00	48,45	1,55
	3	50,09	48,35	1,74
	4	50,03	48,45	1,58
	5	50,21	48,16	2,05
45,66	1	50,14	48,46	1,68
	2	50,02	48,50	1,52
	3	50,05	48,33	1,72
	4	50,07	47,67	2,4
	5	50,17	47,55	2,62
134,13	1	50,07	48,64	1,43
	2	50,04	48,56	1,48
	3	50,22	47,92	2,3
	4	50,16	48,92	1,24
	5	50,19	48,85	1,34

Fuente: La Autora

Cuadro 9. Ecuaciones ajustadas para la pérdida de masa de los granos expuestos a diferentes concentraciones de eugenol por un periodo de 46 días.

Producto	Modelo	Parâmetros estimados (±EPM)			F	P	R ²
		y0	a	b			
Eugenol	$f = y_0 + a \cdot \exp(-b \cdot x)$	2,99± 0,8615	14,96± 1,4093	0,0860± 0,0197	59,3032	0,0039	0,97

F = Test F; P = Probabilidad; R² = Coeficiente de determinación.

Fuente: La Autora

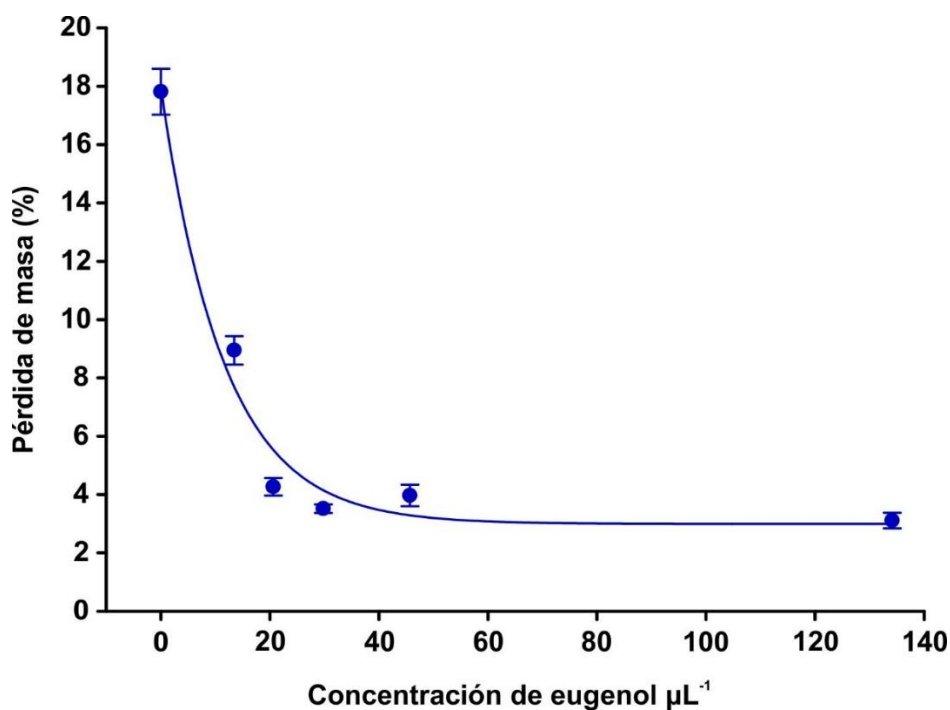


Figura 11. Pérdida de masa

Fuente: La Autora

En el cuadro 8 podemos observar los tratamientos con sus respectivas repeticiones donde nos muestra que la pérdida de masa de granos disminuye significativamente con respecto al control, estabilizándose en la concentración

letal 40 (CL_{40} 20,64 $\mu\text{L L}^{-1}$) y en el cuadro 9 se representa las curvas de regresión de la pérdida de masa y el modelo ajustado de los granos de fréjol caupí expuestos a eugenol purificado (24h) en diferentes concentraciones así como el tratamiento control por un periodo de 46 días de almacenamiento. Se puede observar la influencia significativa de las concentraciones de eugenol ($R^2 = 0,98$; $P=0,0039$) en la pérdida de masa de los granos.

En la figura 11 observamos la pérdida de massa en los granos expuestos a la CL_{20} (13,46 $\mu\text{L L}^{-1}$) fue 8% menos respecto al control; mientras que los granos tratados con las CL_{40} (20,64 $\mu\text{L L}^{-1}$), CL_{60} (29,80 $\mu\text{L L}^{-1}$), CL_{80} (45,66 $\mu\text{L L}^{-1}$) y CL_{100} (e 134,13 $\mu\text{L L}^{-1}$) fue 14% menos en relación al control, lo que indica que la exposición de los granos al eugenol reduce los daños causados po *C. maculatos*.

7. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que eugenol puro en concentración letal CL_{40} presenta actividad insecticida contra adultos de *C. maculatus* expuestos mediante vía fumigante y por un periodo de 24 horas; en artrópodos resultados similares fueron obtenidos por Phillips & Appel (2010) que mostraron que *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) fue susceptible cuando fue expuesta a eugenol purificado vía fumigante. Del mismo modo fue demostrada actividad insecticida de eugenol puro para huevos y adultos de *Pediculus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) vía fumigante (Yang et al. (2003). En tanto que termitas *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae) presentaron alta susceptibilidad cuando fueron expuesta a eugenol puro vía fumigante (Park & Shin 2005). Otro estudio realizado por Lee et al. (2008) en plagas de granos almacenados mostraron que existe actividad tóxica de eugenol purificado para adultos de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae); y en un estudio reciente la mortalidad elevada de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) expuestos a aceite esencial de canela y clavo de olor vía fumigante fue atribuida a la presencia de su principal constituyente (eugenol > 90%) (Correa et al. 2015). *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae) y *Tribolium castaneum* (Coleóptera: Tenebrionidae) también fueron susceptibles cuando fueron expuestos a concentraciones bajas de eugenol purificado (Rozman et al. 2007). En otro estudio eugenol purificado también mostró efecto tóxico vía contacto cuando fue aplicado a *Sitophilus oryzae* y *Tribolium castaneum* (Huang et al. 2002). Lo que indica que este compuesto presenta actividad insecticida contra ciertos artrópodos.

En el presente estudio la r_i de *C. maculatus* presenta diferencia significativa entre las concentraciones a las que fueron expuestos, notándose que la r_i decrece a medida que aumentan las concentraciones, lo que indica que hay una disminución de la progenie de este insecto hasta casi la extinción. Esta reducción de la progenie va hasta la CL_{40} estabilizándose en el resto de concentraciones

esto puede deberse a que las hembras pueden depositar huevos infértiles; esto puede ser debido a que a los insectos expuestos a concentraciones altas realizan una rápida oviposición a fin de garantizar su prole.

Estos datos concuerdan con el trabajo realizado por Correa et al. (2015) en donde observaron que la r_i de *Sitophilus zeamais* cuando fueron expuestos vía fumigante a aceite esencial de clavo y canela, con eugenol como su principal componente (>90%) fue reducida conforme se incrementó la concentración. La reducción de la r_i de *C. maculatus* puede ser debido a la muerte de los insectos por asfixia al ser expuestos al vapor de eugenol, debido a que la respiración de los insectos es traqueal y poseen una mayor área de absorción cuando son expuestos a compuestos volátiles (Almeida et al. 2005). Otro factor que pudo haber contribuido a la reducción de la r_i es que el efecto ovicida para los insectos de la familia Chrysomelidae es aumentado por la presencia de un espacio amplio entre el huevo y la superficie del grano. Este espacio tiene la forma de embudo en el final de la parte posterior del huevo de *C. maculatus*, lo que facilitaría la entrada del gas eugenol, causando así un posible efecto ovicida y larvicida (Credland 1992).

El período de desarrollo o emergencia de *C. maculatus* también fue afectada por la exposición a eugenol, cuando es comparado con el tratamiento control, esto puede deberse a que las hembras pueden depositar huevos infértiles o a su vez los huevos fértiles emergen después debido al grado de insecticida que ha sido aplicado; esto concuerda con un estudio realizado por Gurusubramanian & Krishna (1996) que expusieron varios artrópodos a volátiles naturales y encontraron que estos tienen efecto en los huevos de estos insectos y retardan la emergencia de adultos. Otro factor que pudo haber contribuido a la demora es de la emergencia es el efecto inhibitorio de eugenol en la alimentación de larvas recién emergidas, así *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) disminuyó su tasa de alimentación cuando fue expuesta a eugenol puro. (Muckensturm et al. 1982).

En el presente estudio no fue observado efecto repelente de eugenol a *C. maculatus* cuando fue expuesto a la CL₅₀, mientras que si ejerció esta actividad en la CL₁₀₀, esto se puede deber a que los insectos al captar los olores a mínimas concentraciones diferentes son atraídos o repelidos, lo cual concuerda con los resultados de un estudio realizado por Kafle & Shih (2013) en donde mostraron que eugenol purificado fue repelente a la hormiga *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). En tanto que la actividad atrayente de este mismo compuesto y a este mismo insecto cuando fue expuesto a bajas concentraciones puede ser explicado debido a que el efecto biológico de un compuesto depende de la concentración de este, y volátiles naturales en una determinada concentración sirven a los insectos de pistas para localizar su hospedero (Bernays & Chapman 2007, Schoonhoven et al. 2005).

Resultados en este trabajo muestran que la pérdida de masa de los granos es inversamente proporcional a la mortalidad de insectos y siendo directamente proporcional a la r_i ; esto concuerda con Almeida et al (2011) donde mostraron que extractos naturales de plantas redujeron la pérdida de masa de fréjol común infestado con *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae), y esta pérdida de masa disminuye a medida que se aumenta las concentraciones. En otro estudio similar fue mostrado que la pérdida de masa también fue reducida significativamente en granos de fréjol común cuando fueron tratados por aceite esencial de clavo y canela (eugenol>90%) (Viteri et al. 2014).

8. CONCLUSIONES

- ✓ Eugenol posee susceptibilidad insecticida en un 95% usando la concentración letal $81,14 \mu\text{L L}^{-1}$ a *Callosobruchus maculatus* vía fumigante por un periodo de 24 horas.
- ✓ Se constató que eugenol afecta en la ovoposición de *Callosobruchus maculatus*, así mismo afecta al desarrollo de este insecto plaga.
- ✓ La exposición a eugenol afectó la tasa instantánea de crecimiento de *Callosobruchus maculatus*, y redujo la pérdida de masa de los granos de frejol caupí conforme se aumenta las concentraciones de eugenol hasta la CL₄₀, estabilizándose en las concentraciones mayores.
- ✓ *Callosobruchus maculatus* no fue repelido por eugenol puro en las CL₅₀, más una concentración mayor presento efecto repelente para este insecto.
- ✓ Se debe usar la dosis adecuada para la repelencia de *Callosobruchus maculatus* CL₁₀₀ para obtener un resultado favorable.
- ✓ Eugenol puede ser utilizado como insecticida por el productor para evitar pérdidas en su almacenamiento, así mismo para ayudar a mantener el medio ambiente y la salud.

9. RECOMENDACIONES

- ✓ Nuevos estudios deben ser realizados para evaluar si eugenol ejerce actividad insecticida en mayor o menor grado vía contacto.
- ✓ Realizar nuevos estudios con un mayor periodo de exposición de *callosobruchus maculatos* a eugenol.
- ✓ Efectuar nuevos experimentos para determinar los efectos biológicos (comportamiento, deterrente, repelente, atrayente, inhibidor) que puede presentar eugenol para *callosobruchus maculatus*.
- ✓ Utilizar nuevos productos vegetales, repelentes, trampas, cebos para una organización saludable con el medio ambiente.
- ✓ A las autoridades que sigan apoyando en procesos investigativos para ayuda tanto ambiental, de la salud personal y así también evitar pérdidas de los granos después de las post-cosechas como el almacenado.
- ✓ Hacer estudios con otras variedades de frejol que se comercializan en nuestro medio y otras especies de plagas.

10. BIBLIOGRAFÍA

Almeida, F. D. A. C., COSTA, G., SILVA, J., SILVA, R., & PESSOA, E. Bioatividade de extratos vegetais no controle do *Zabrotes subfasciatus* isolado e inoculado em uma massa de feijão *Phaseolus*. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 13, 375-384.

Amiri, A., R. Dugas, A. L. Pichot & G. Bompeix (2008) In vitro and in vitro activity of eugenol oil (*Eugenia caryophyllata*) against four important postharvest apple pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 13-19.

Aspromor, 2012, buenos aires, salitral Y san juan de bigote cadena productiva de frijol Caupi. Dirección Regional Agraria-Piura: Dirección de Información Agraria, 2012.

Bagavan, A., A. A. Rahuman, C. Kamaraj, G. Elango, A. A. Zahir, C. Jayaseelan, T. Santhoshkumar & S. Marimuthu (2011) Contact and fumigant toxicity of hexane flower bud extract of *Syzygium aromaticum* and its compounds against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Parasitology research*, 109, 1329-1340.

Beck, C. W. & L. S. Blumer (2011) A handbook on bean beetles, *Callosobruchus maculatus*. *National Science Foundation*.

Bernays, E. A., & Chapman, R. F. (2007). *Host-plant selection by phytophagous insects* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.

Bezerra, A. K. P., C. F. d. Lacerda, F. F. F. Hernandez, F. B. d. Silva & H. R. Gheyi (2010) Rotação cultural feijão caupi/milho utilizando-se águas de salinidades diferentes. *Ciênc. rural*, 40, 1075-1082.

Bjørning-Poulsen, M., H. R. Andersen & P. Grandjean (2008) Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*, 7, 50.

Brown, L. & J. F. Downhower (1987) *Analyses in behavioral ecology: a manual for lab and field.*

Caswell, G. (1981) Damage to stored cowpea in the northern part of Nigeria. *Samaru: journal of agricultural research.*

Collett, D. (2003), *Modelling Binary Data*, 2nd Edition, London: Chapman & Hall.

Combrinck, S., T. Regnier & G. Kamatou (2011) In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*, 33, 344-349.

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.

Corsini, E., M. Sokooti, C. Galli, A. Moretto & C. Colosio (2013) Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology*, 307, 123-135.

Credland, P. F. (1992). The structure of bruchid eggs may explain the ovicidal effect of oils. *Journal of Stored Products Research*, 28(1), 1-9.

Dales, M.J., (1996). A Review of Plant Materials Used for Controlling Insect Pests of Stored Products. NRI Bulletin 65. Natural Resources Institute, Chatham.

De Lima Boijink, C., Queiroz, C. A., Chagas, E. C., Chaves, F. C. M., & Inoue, L. A. K. A. (2016). Anesthetic and anthelmintic effects of clove basil (*Ocimum gratissimum*) essential oil for tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquaculture*, 457, 24-28.

De Magalhães Bertini, C. H. C., E. M. Teófilo & F. T. C. Dias (2009) Divergência genética entre acessos de feijão-caupi do banco de germoplasma da UFC. *Revista Ciência Agronômica*, 40, 99-105.

- De Moura, M. N., & de Andrade, W. G. (2005). Bioactivity of vegetal powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in caupi bean and seed physiological analysis.
- Devereau, A., I. Gudrups, J. Appleby & P. Credland (2003) Automatic, rapid screening of seed resistance in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walpers, to the seed beetle *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae) using acoustic monitoring. *Journal of Stored Products Research*, 39, 117-129.
- Ehlers, J. & A. Hall (1997) Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, 53, 187-204.
- El Abed, S., A. Houari, H. Latrache, A. Remmal & S. I. Koraichi (2011) In vitro activity of four common essential oil components against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Research Journal of Microbiology*, 6, 394.
- El Hag, E., A. El Nadi & A. Zaitoon (1999) Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae). *Phytotherapy Research*, 13, 388-392.
- El-Maati, M. F. A., Mahgoub, S. A., Labib, S. M., Al-Gaby, A. M., & Ramadan, M. F. (2016). Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *European Journal of Integrative Medicine*.
- Everett, C. & E. Matheson (2011) Pesticide exposure and diabetes. *Encyclopedia Environ. Health*, 4, 407-411.
- Faroni, L. & A. Sousa (2006) Aspectos biológicos e taxonômicos dos principais insetos-praga de produtos armazenados. *Tecnologia de armazenagem em sementes. Campina Grande: UFCG*, 371-402.
- Fieser, L., (1985), Química Orgánica Fundamental, Editorial Reverté S.A., Barcelona, España
- Fernández-Andrés, M. D., J. A. Rangel-Lucio, J. M. Juárez-Goiz, R. Bujanoz-Muñiz, S. Montes-Hernández & M. Mendoza-Elos (2008) Oleorresina de jícama

para controlar *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleóptera: Bruchidae) en semilla de frijol. *agronomía mesoamericana*, 20, 59-69.

Fichi, G., G. Flamini, L. Zaralli & S. Perrucci (2007) Efficacy of an essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* against *Psoroptes cuniculi*. *Phytomedicine*, 14, 227-231.

Fouad, H., L. Faroni, R. Ribeiro, W. D. S. Tavares & F. Petacci (2012) Extraction and repellent activity of *Lepidoploa aurea* and *Memora nodosa* against stored grain and byproduct pests. *Vie et milieu*, 62, 11-15.

Gayoso, C., E. Lima, V. Oliveira, F. Pereira, E. Souza, I. Lima & D. Navarro (2005) Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, 76, 247-249.

Georghiou, P.G., 1990. Overview of insecticide resistance. In: Green, M.B., Lebaron, H.M., Moberg, W.K. (Eds.), *Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies*. ACS Symposium Series, 421. American Chemical Society, Washington, pp. 19-41.

Ghosh, R., M. Ganapathy, W. L. Alworth, D. C. Chan & A. P. Kumar (2009) Combination of 2-methoxyestradiol (2-ME 2) and eugenol for apoptosis induction synergistically in androgen independent prostate cancer cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 113, 25-35.

Gilbert, L. I., & Gill, S. S. (Eds.). (2010). *Insect control: biological and synthetic agents*. Academic Press. p 1-21.

Gonzalez, A., A. B. Monteagudo, P. Casquero, A. De Ron & M. Santalla (2006) Genetic variation and environmental effects on agronomical and commercial quality traits in the main European market classes of dry bean. *Field Crops Research*, 95, 336-347.

González-Rivera, J., Duce, C., Falconieri, D., Ferrari, C., Ghezzi, L., Piras, A., & Tine, M. R. (2015). Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove

buds): Chemical composition and thermal analysis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.

Gonzales, R., (2002), Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso, *Revista cubana de Estomatología*, 39 (2), pp. 139-156.

Gurusubramanian, G., & Krishna, S. S. (1996). The effects of exposing eggs of four cotton insect pests to volatiles of *Allium sativum* (Liliaceae). *Bulletin of Entomological Research*, 86(01), 29-31.

Haeff, V., Berlijn, J. N. M., Mondoñedo, J. D., & Salinas, J. R. K. (1990). *Horticultura* (No. F/630.7152 M3/15/1990).

Hertlein, M. B., G. D. Thompson, B. Subramanyam & C. G. Athanassiou (2011) Spinosad: a new natural product for stored grain protection. *Journal of Stored Products Research*, 47, 131-146.

Hertlein, M. B., G. D. Thompson, B. Subramanyam & C. G. Athanassiou (2011) Spinosad: a new natural product for stored grain protection. *Journal of Stored Products Research*, 47, 131-146.

Howe, R. & J. Currie (1964) Some laboratory observations on the rates of development, mortality and oviposition of several species of Bruchidae breeding in stored pulses. *Bulletin of Entomological Research*, 55, 437-477.

Huang, Y., Ho, S. H., Lee, H. C., & Yap, Y. L. (2002). Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch.(Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research*, 38(5), 403-412.

Huignard, J. (1985) Importance des pertes dûes aux insectes ravageurs des graines: problèmes posés par la conservation des légumineuses alimentaires,

source de protéines végétales. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 20, 193-199.

Hussain, A., K. Brahmabhatt, A. Priyani, M. Ahmed, T. A. Rizvi & C. Sharma (2011) Eugenol enhances the chemotherapeutic potential of gemcitabine and induces anticarcinogenic and anti-inflammatory activity in human cervical cancer cells. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 26, 519-527.

INIAP 463, s.f. Variedad de caupi de grano blanco y alto rendimiento para el Litoral Ecuatoriano..pdf disponible en http://www.iniap.gob.ec/sitio/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=2&sobi2Id=456&Itemid=(revisado el 25 de noviembre de 2016).

Isman, M. B. (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 45-66.

Júnior, A. L. M. & A. A. Vilarinho (2011) Resistência de cultivares de feijão-caupi ao ataque de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em condições de armazenamento. *Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient*, 9, 51-55.

Kafle, L., & Shih, C. J. (2013). Toxicity and repellency of compounds from clove (*Syzygium aromaticum*) to red imported fire ants *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of economic entomology*, 106(1), 131-135.

Kamatou, G. P., I. Vermaak & A. M. Viljoen (2012) Eugenol--from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17, 6953-81.

Kang, J. K., B. R. Pittendrigh & D. W. Onstad (2013) Insect Resistance Management for Stored Product Pests: A Case Study of Cowpea Weevil (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of economic entomology*, 106, 2473-2490.

Kavvalakis, M. P. & A. M. Tsatsakis (2012) The atlas of dialkylphosphates; assessment of cumulative human organophosphorus pesticides' exposure. *Forensic science international*, 218, 111-122.

- Kim, E.-H., H.-K. Kim & Y.-J. Ahn (2003) Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 885-889.
- Laekeman, G., L. Van Hoof, A. Haemers, D. Berghe, A. Herman & A. Vlietinck (1990) Eugenol a valuable compound for in vitro experimental research and worthwhile for further in vivo investigation. *Phytotherapy Research*, 4, 90-96.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., Maestri, D., (2008), Fundamentos teórico-prácticos de Química Orgánica, Editorial Encuentro, Córdoba, Argentina.
- Lee, E. J., Kim, J. R., Choi, D. R., & Ahn, Y. J. (2008). Toxicity of cassia and cinnamon oil compounds and cinnamaldehyde-related compounds to *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of economic entomology*, 101(6), 1960-1966.
- Leite, A. M., E. d. O. Lima, E. L. d. Souza, M. d. F. F. M. Diniz, V. N. Trajano & I. A. d. Medeiros (2007) Inhibitory effect of beta-pinene, alpha-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43, 121-126.
- López, S., & Corintia, L. (2015). Efecto de la aplicación foliar de fossil shellagro en el cultivo de frejol Caupi *Vigna unguiculata* L.
- Ma, Y. & F. Bliss (1978) Seed proteins of common bean. *Crop Science*, 18, 431-437.
- MAGAP. 2014. Ministerio de Agricultura, ganadería Acuacultura y pesca. Boletín situacional fréjol tierno y seco 8 p.
- Matsui, T., & Singh, B. B. (2003). Root characteristics in cowpea related to drought tolerance at the seedling stage. *Experimental Agriculture*, 39(01), 29-38.

Mazzonetto, F. & J. D. Vendramim (2003) Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. *Neotropical Entomology*, 32, 145-149.

McKinlay, R., J. Plant, J. Bell & N. Voulvoulis (2008) Endocrine disrupting pesticides: implications for risk assessment. *Environment International*, 34, 168-183.

Merck Millipore, hoja de seguridad eugenol, <http://www.merck-chemicals.com>, 15 de marzo de 2014.

Miyazawa, M. & M. Hisama (2001) Suppression of chemical mutagen-induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4019-4025.

Mondal, M. (2006) Toxicity of essential oils against red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Bio-Science*, 14, 43-48.

Mostafalou, S. & M. Abdollahi (2013) Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*, 268, 157-177.

Muckensturm, B., Duplay, D., Mohammadi, F., Moradi, A., Robert, P. C., Simonis, M. T., & Kienlen, J. C. (1982). Role of natural phenylpropanoids as insect anti-feeding agents. *Colloques de l'INRA (France)*.

Nenaah, G. (2011) Individual and synergistic toxicity of solanaceous glycoalkaloids against two coleopteran stored-product insects. *Journal of pest science*, 84, 77-86.

Nicholson, G. M. (2007) Fighting the global pest problem: preface to the special *Toxicon* issue on insecticidal toxins and their potential for insect pest control. *Toxicon*, 49, 413-422.

- Obeng-Ofori, D. & C. Reichmuth (1997) Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera. *International Journal of Pest Management*, 43, 89-94.
- Ocampo, R., Ríos, L., Betancur, L., Ocampo, D., (2008), Curso práctico de Química Orgánica. Enfocado a Biología y Alimentos, Editorial Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.
- OMS (2005). Manual de bioseguridad en el laboratorio. Ginebra. 3^{ra}ed. ISBN 92 4 354650 3
- Papachristos, D. P., K. I. Karamanoli, D. C. Stamopoulos & U. Menkissoglu-Spiroudi (2004) The relationship between the chemical composition of three essential oils and their insecticidal activity against *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Pest management science*, 60, 514-520.
- Park, I. K., & Shin, S. C. (2005). Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4388-4392.
- Phillips, A. K. & A. G. Appel (2010) Fumigant toxicity of essential oils to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of economic entomology*, 103, 781-790.
- Phillips, A. K., & Appel, A. G. (2010). Fumigant toxicity of essential oils to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of economic entomology*, 103(3), 781-790.
- Pimentel, M., L. D. A. Faroni, R. Guedes, A. Sousa & M. Tótola (2009) Phosphine resistance in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 45, 71-74.
- Rajendran, S. & V. Sriranjini (2008) Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, 44, 126-135.

Ranasinghe, L., B. Jayawardena & K. Abeywickrama (2002) Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et LM Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 208-211.

Rees, D. (2007). *Insects of stored grain: a pocket reference*. Csiro Publishing.

Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Co;1056,1328.

Rozman, V., Kalinovic, I., & Korunic, Z. (2007). Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 43(4), 349-355.

Sanz, I., Raigón, M., Llorens, J., Llopis, R., (2002), *Prácticas de Química Orgánica*, Editorial Universidad Politécnica de Valencia, España.

SAS Institute. 2002. JMP user's guide. SAS Institute Cary, NC, USA.

Schmale, I., F. Wäckers, C. Cardona & S. Dorn (2006) Biological control of the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Col.: Bruchidae), by the native parasitoid *Dinarmus basalis* (Rondani)(Hym.: Pteromalidae) on small-scale farms in Colombia. *Journal of Stored Products Research*, 42, 31-41.

Schoof, H. F. (1941) The Effects of Various Relative Humidities on the Life Processes of the Southern Cowpea Weevil, *Callosobruchus Maculatus* (FABR.) at 30° C., ±0.8°. *Ecology*, 22, 297-305.

Schoonhoven, L. M., Van Loon, J. J., & Dicke, M. (2005). *Insect-plant biology* (No. Ed. 2). Oxford University Press.

SEMICOL 2010. Frijol arbustivo caupi. Ficha técnica frijol Caupi o cabecita negra (*Vigna unguiculata* (L) "arbustiva". Variedad seleccionada SEMICOL 2010. Todos los derechos reservados 2010.

Singh, G., S. Maurya & C. A. Catalan (2007) A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1650-1661.

Singh, S. & K. O. Rachie. 1985. *Cowpea research, production, and utilization*. Wiley.

Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., & Weiner, M. L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1), 3-59.

Song, X., P. Wang & H. Zhang (2013) Phosphine resistance in *Rhyzopertha dominica* (Fabricius)(Coleoptera: Bostrichidae) from different geographical populations in China. *African Journal of Biotechnology*, 10, 16367-16373.

Sousa, A. d., L. D. A. Faroni, R. Guedes, M. Tótola & W. Urruchi (2008) Ozone as a management alternative against phosphine-resistant insect pests of stored products. *Journal of Stored Products Research*, 44, 379-385.

SPSS. Sigma Plot user's guide. Version 12.3 (Revised Edition). SPSS Inc. Chicago, USA. 2001.

Timko, M. P. & B. Singh. 2008. Cowpea, a multifunctional legume. In *Genomics of tropical crop plants*, 227-258. Springer.

Tovignan, S., Vodouhe, S. D., Dinham, B., 2001. Cotton pesticides cause more deaths in Benin. *Pesticides News* 52, 12e14.

Trajano, V. N., Lima, E. D. O., Travassos, A. E., & Souza, E. L. D. (2010). Inhibitory effect of the essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume leaves on some food-related bacteria. *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(3), 771-775.

Trongtokit, Y., Y. Rongsriyam, N. Komalamisra & C. Apiwathnasorn (2005) Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Research*, 19, 303-309.

Van Zyl, R. L., S. T. Seatlholo, S. F. Van Vuuren & A. M. Viljoen (2006) The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. *The Journal of essential oil research*, 18, 129-133.

Venter, C. & E. Van Eyssen (2001) More legumes for better overall health. *Magnesium (mg)*, 172, 280.

Viteri Jumbo, L., L. R. Faroni, E. E. Oliveira, M. A. Pimentel & G. N. Silva (2014) Potential use of clove and cinnamon essential oils to control the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* Say, in small storage units. *Industrial Crops and Products*, 56, 27-34.

Wakil, W., T. Riasat & J. C. Lord (2013) Effects of combined thiamethoxam and diatomaceous earth on mortality and progeny production of four Pakistani populations of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) on wheat, rice and maize. *Journal of stored products research*, 52, 28-35.

Yang, Y. C., Lee, S. H., Lee, W. J., Choi, D. H., & Ahn, Y. J. (2003). Ovicidal and adulticidal effects of *Eugenia caryophyllata* bud and leaf oil compounds on *Pediculus capitis*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(17), 4884-4888.

Zaganas, I., S. Kapetanaki, V. Mastorodemos, K. Kanavouras, C. Colosio, M. F. Wilks & A. M. Tsatsakis (2013) Linking pesticide exposure and dementia: What is the evidence? *Toxicology*, 307, 3-11.

Zhang, Y., M. Zhao, M. Jin, C. Xu, C. Wang & W. Liu (2010) Immunotoxicity of pyrethroid metabolites in an in vitro model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 2505-2510.

Zhang, Y., Zhao, M., Jin, M., Xu, C., Wang, C., & Liu, W. (2010). Immunotoxicity of pyrethroid metabolites in an in vitro model. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(11), 2505-2510.

Zheng, G. Q., Kenney, P. M., & Lam, L. K. (1992). Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *Journal of natural products*, 55(7), 999-1003.

11. ANEXOS

ANEXO 11.1 FOTOS DEL PROCESO DE INVESTIGACIÓN



Foto 1. Cámara de cría masal de plagas de granos almacenados

ANEXO 1.2. APLICACIÓN DE CONCENTRACIONES LETALES



Foto 2. Montaje de testes preliminares

ANEXO 11.3. EMERGENCIA Y DESARROLLO.



Foto 2. Montaje de tasa instantánea de crecimiento y período de desarrollo

ANEXO 11.4. TESTES DE EVALUACIÓN DE REPELENCIA



Foto 3. Repelencia CL50 y CL100



Foto 4. Búsqueda de la repelencia CL50 y CL100

ANEXO 11.5. PERSONAL DEL LABORATORIO



Foto 5. Miembros del laboratorio mip-granos-UFV