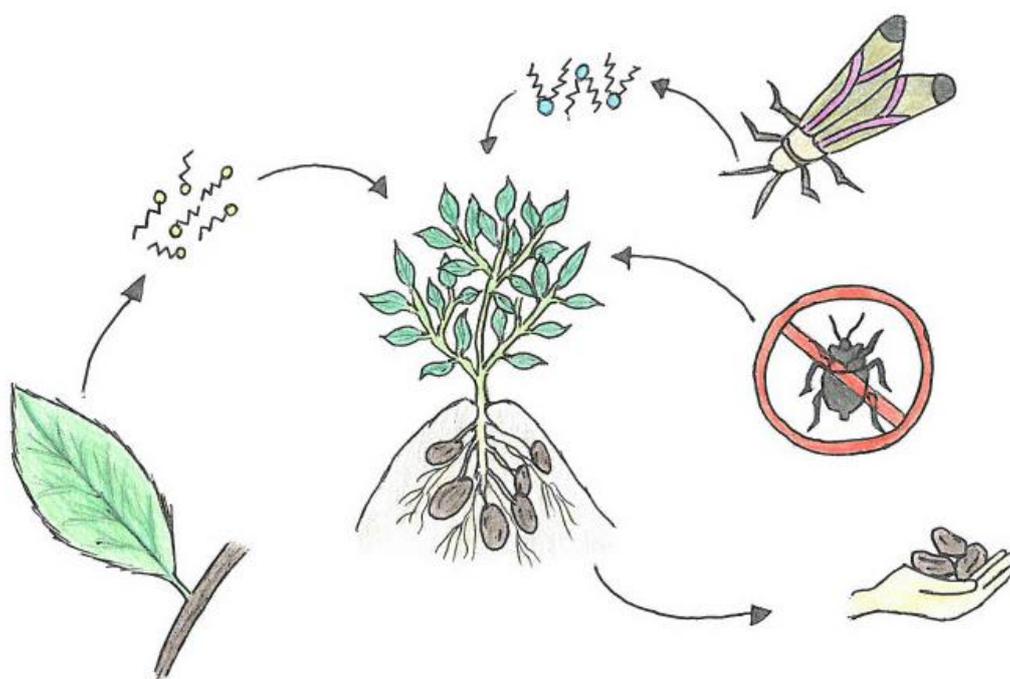


Aceites esenciales de la flora canaria como biopesticidas en el manejo integral de plagas

Essential oils from Canary flora as biopesticides in integral pest management



Trabajo de Fin de Grado

Ana del Carmen Rodríguez Suárez

Tutorizado por

Carolina Pérez Reyes (ULL)

Fernando R. Pinacho Crisóstomo (ECOBERTURA)

Grado en Biología

Julio 2021

Carolina Pérez Reyes, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética de la ULL, y Fernando R. Pinacho Crisóstomo, Director y Fundador de la empresa biotecnológica ECOBERTURA.

INFORMAN:

Que la memoria presentada por la alumna del Grado de Biología Dña. Ana del Carmen Rodríguez Suárez, titulada *Aceites esenciales de la flora canaria como biopesticidas en el manejo integral de plagas*, se ha realizado bajo su dirección durante el curso académico 2020-2021 en el Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética de la Universidad de La Laguna, alcanzando todas las competencias, condiciones de calidad y rigor científico que se requieren para optar a su presentación y defensa como Trabajo de Fin de Grado, en el curso 2020-2021.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente informe, en San Cristóbal de La Laguna, a 29 de junio de 2021.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
Situación actual de la agricultura.....	2
Biopesticidas.....	3
Características de los aceites esenciales	7
Interacción planta-insecto.....	8
Estrategias para el control de plagas en la agricultura.....	9
Objetivos	11
Material y Métodos	12
Recolección de material vegetal	12
Preparación de material vegetal previa extracción	12
Extracción de aceites esenciales	12
Determinación del rendimiento de aceites esenciales	13
Análisis químico del aceite esencial de <i>A. thuscula</i> Cav.....	13
Material entomológico.....	13
Actividad antialimentaria de los aceites	13
Actividad insecticida del aceite de <i>Artemisia thuscula</i> Cav. en campo	14
Resultados y discusión	15
Descripción botánica de <i>Artemisia thuscula</i> Cav.	15
Descripción botánica de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	16
Extracción y rendimiento de los aceites	17
Composición del aceite de <i>Artemisia thuscula</i> Cav.	19
Actividad antialimentaria de los aceites	20
Actividad insecticida del aceite esencial de <i>Artemisia thuscula</i> Cav. en campo	23
Conclusiones	25
Conclusions	26
Bibliografía.....	27

Resumen

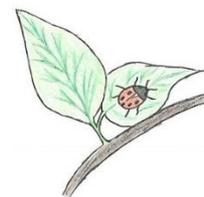
Las plantas y los insectos han coexistido y co-evolucionado desde hace millones de años. Esto ha llevado al desarrollo de sistemas de defensa-interacción en las plantas siendo capaces de producir una gran variedad de metabolitos para inhibir o atraer insectos. Muchos de estos metabolitos son aceites esenciales, compuestos orgánicos volátiles que funcionan como atractores o repelentes de insectos. En el presente trabajo se han extraído los aceites esenciales de *Artemisia thuscula* Cav. y *Ruta chalepensis* L. con el objeto de aplicarlos en combinación con feromonas. Esto constituye una alternativa sostenible al uso de pesticidas convencionales en el manejo integrado de plagas. Para ello, se llevó a cabo la optimización en la extracción de los aceites esenciales. Además, se evaluó la actividad antialimentaria *in vitro* de ambos aceites y se analizó la composición química del aceite esencial de *Artemisia thuscula* Cav. El objetivo final del trabajo es evaluar la actividad insecticida del aceite de *A. thuscula* Cav. en campo a través de la estrategia *push* and *pull* diseñada para controlar la plaga de *Tecia solanivora* en el cultivo de *Solanum tuberosum*, investigación que se llevará a cabo en colaboración con la empresa Ecobertura.

Palabras clave: aceite esencial, plaga, pesticidas, biopesticidas y feromonas.

Abstract

Plants and insects have coexisted and co-evolved for millions of years. This has led to the development of defense-interaction systems in plants that are capable of producing a wide variety of metabolites to inhibit or attract insects. Many of these metabolites are essential oils, volatile organic compounds that function as insect attractants or repellents. In the present work, the essential oils of *Artemisia thuscula* Cav. and *Ruta chalepensis* L. have been extracted with the aim of applying them in combination with pheromones. This constitutes a sustainable alternative to the use of conventional pesticides in integrated pest management. For this purpose, optimization of the extraction of essential oils was carried out. In addition, the *in vitro* antifeedant activity of both essential oils was evaluated and the chemical composition of the essential oil of *Artemisia thuscula* Cav. was analyzed. The final objective of the work is to evaluate the insecticidal activity of the oil of *A. thuscula* Cav. in the field through the *push* and *pull* strategy designed to control the pest *Tecia solanivora* in the *Solanum tuberosum* crop, research that will be carried out in collaboration with the company Ecobertura.

Key words: essential oil, pest, pesticides, biopesticides and pheromones.



Introducción

Situación actual de la agricultura

Estimaciones realizadas por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) ponen de manifiesto la necesidad de aumentar la producción de alimentos un 70% para poder abastecer a la futura población mundial en 2050 (FAO, 2019). Si a dicho factor añadimos la escasez de alimentos y la pérdida de productividad ocasionada por el cambio climático, la baja fertilidad del suelo y la incidencia, cada vez mayor de plagas y enfermedades, obtenemos un sistema de producción agrícola incapaz de abastecer la demanda de la futura población mundial.

Para poder cubrir la demanda, el sector agrícola tiene que adoptar estrategias modernas y avanzadas que puedan asegurar un aumento de la eficacia, productividad, sostenibilidad, así como la seguridad de los alimentos en la producción. Una de las opciones es la búsqueda de alternativas sostenibles al uso de fitosanitarios convencionales (Jha *et al.*, 2020; Sachdev y Singh, 2016).

Afortunadamente, en la actualidad el uso de los pesticidas químicos en la protección de cultivos está en declive. Esto se debe en gran medida, a la preocupación e interés social que cuestiona su aplicación debido a los efectos colaterales que provoca en el medio ambiente y en el ser humano. Ejemplo de ello es la contaminación de aguas y suelos, para los cuales se tiene que hacer un monitoreo y saneamiento (Marrero Domínguez, 2012). Otro ejemplo es el envenenamiento por pesticidas de los trabajadores agrícolas (Lamichhane *et al.*, 2016). Además, su uso causa la aparición de fenómenos de resistencia a plaguicidas (Raveau *et al.*, 2020), donde se ha visto que hay, en todo el mundo, más de 500 especies de artrópodos que han desarrollado mecanismos de resistencia a insecticidas incluso a varios de ellos (Chandler *et al.*, 2011). Un caso es el escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaenum*, un insecto plaga de granos en la etapa de almacenamiento que ha desarrollado una alta resistencia a insecticidas clorados, fosforados y piretroides (Ringuelet *et al.*, 2014).

Como alternativa sostenible al uso de los insecticidas tradicionales, en las dos últimas décadas ha crecido el interés de productos naturales obtenidos de plantas aromáticas que aportan un gran número de ventajas. Entre estos productos naturales, destacan los aceites esenciales (AE), que son frecuentemente usados en la industria cosmética como aromas, así como en la industria alimentaria. Pero, aun así, el uso de aceites esenciales como bioplaguicida

INTRODUCCIÓN

en el control de plagas ha sido y sigue siendo muy limitado debido a su disponibilidad, costo y aprobación regulatoria (Isman, 2020; Raveau *et al.*, 2020).

Biopesticidas

Los biopesticidas no tienen una definición formalmente acordada, pero se pueden definir como pesticidas derivados de animales, plantas y microorganismos que ofrecen una solución ecológica eficaz contra los problemas de plagas en los cultivos. Por ello, son llamados también insecticidas biorracionales (Chandler *et al.*, 2011). Se clasifican en tres categorías principales:

- Pesticidas microbianos o derivados de microorganismos. Son todos aquellos compuestos que derivan de hongos, bacterias, algas, virus, nematodos y protozoos. El más conocido y utilizado para el biocontrol de insectos plaga es *Bacillus thuringiensis*.
- Bioquímicos. Suelen ser productos naturales aislados de plantas, animales y microorganismos que controlan las poblaciones de plaga mediante diversas acciones, como puede ser interferir en el crecimiento o apareamiento y atraer o repeler diferentes plagas de insectos.
- Semioquímicos. Son compuestos químicos producidos por organismos que causan cambios en el modo de actuar de otro individuo de la misma o diferente especie. Los más utilizados son las feromonas sexuales de insectos, que pueden ser sintetizadas y utilizadas efectivamente para el control de plagas.

Dentro de los bioquímicos, se encuentran los biopesticidas botánicos. Estos han sido utilizados durante generaciones en la agricultura tradicional tanto para el tratamiento de los cultivos como para el almacenaje de estos. Son generalmente menos tóxicos que los plaguicidas convencionales, afectando sólo al parásito objetivo y en ocasiones a los organismos estrechamente relacionados. Además, son un producto de biocontrol de gran interés porque son capaces de reducir el uso de los plaguicidas convencionales mientras mantienen un buen rendimiento de la cosecha (Copping y Menn, 2000).

En la Tabla 1 se enumeran las ventajas e inconvenientes del uso de biopesticidas. En ella se puede ver cómo algunas de las virtudes se convierten en desventajas, como por ejemplo un biopesticida que se degrada fácilmente y por tanto es menos tóxico, cuando es aplicado se reduce su tiempo de almacenamiento y su efectividad en el campo. Por ello, su uso se basa en encontrar el equilibrio entre dichas ventajas e inconvenientes.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los biopesticidas (modificada de Gupta y Dikshit, 2010).

Beneficios	Inconvenientes
Menos tóxicos Biodegradable más rápido Específico a una plaga en concreto Modo específico de acción Agente de control más que de erradicación (mantienen el balance ecológico)	Corto período de almacenaje Corto período de efectividad en el campo Estrecho margen de uso Modo específico de acción Actúan más lentamente

Los biopesticidas orgánicos pueden inhibir el normal desarrollo de los insectos a través de diferentes mecanismos (Isman, 2006; Ujváry, 2010):

- Inhibiendo los factores reguladores del crecimiento de insectos o alterando su crecimiento. Un ejemplo es *Ocinum basilicum* (albahaca) de la que se extrajo la juvovinema II, que sirvió como modelo para la síntesis de piriproxifen o fenoxicarb.
- Antialimentarios. Son compuestos que al ser ingeridos por el insecto hacen que deje de comer muriendo por inanición. Muchos compuestos, sobre todo terpenos, tienen esta actividad y se han aislado de plantas medicinales de África, Latinoamérica e India.
- Repelentes. Un ejemplo es el ajo o la pimienta que se espolvorea en las paredes de los lugares donde se almacena las judías para prevenir el ataque de gorgojos. Otro caso es el uso de la ruda (*Ruta graveolens*) o eucalipto (*Eucalyptus globulus*) para repeler los hongos de la ropa.
- Atrayentes. Se basa en el uso de plantas que atraen a los insectos hacia otras plantas o hacia trampas.

Alrededor de 6000 plantas han sido identificadas como especies que poseen actividad insecticida (Nawaz *et al.*, 2016). Algunas de las más conocidas son la *Azadirachta indica* A. Juss. o árbol del “nim”, de la cual se extrae la azadiractina y *Tanacetum cinerariaefolium* (Trevir.) Sch.Bip., de la que se obtienen las piretrinas. Ambos compuestos presentan actividad insecticida (Ujváry, 2010).

En la tabla 2 se muestra los principales bioplaguicidas botánicos que se utilizan actualmente para el control de diversas plagas de cultivos agrícolas.

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Principales biopesticidas botánicos utilizados en la actualidad para el control de las plagas que afectan a los cultivos agrícolas (tabla de elaboración propia).

Planta	Tipo y/o compuesto activo	Actividad biológica	Diana	Referencia
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown	Aceite esencial, quimiotipo carvona-limoneno	Insecticida	<i>Tribolium castaneum</i>	(Ringuelet <i>et al.</i> , 2014)
<i>Cinnamomum verum</i> J. Presl	Aceite esencial, cinamaldehído	Fungicida	<i>Verticillium fungicola</i> y <i>Sclerotinia homeocarpa</i>	(Yoon <i>et al.</i> , 2013)
<i>Laminaria digitata</i> (Hudson) J.V. Lamouroux	Laminarina , un glucano de almacenamiento	Fungicida	Induce reacciones de defensa en cultivos como en la vid contra <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Plasmopara viticola</i>	Yoon <i>et al.</i> , 2013)
<i>Curcuma longa</i> L.	Compuestos fenólicos: curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina	Agentes antifúngicos	Efectivos contra el tizón del arroz y el tizón tardío del tomate	Yoon <i>et al.</i> , 2013)
<i>Cymbopogon martinii</i> (Roxb.) W. Watson <i>Thymus zygis</i> Loefl. ex L.	Sus aceites esenciales	Inhibidores de la germinación de esporas (actividad antifúngica)	Contra <i>Botrytis cinerea</i>	(Wilson <i>et al.</i> , 1997)
<i>Tanacetum cinerariaefolium</i> (Trevir.) Sch.Bip.	Oleoresina extraída de flores secas, piretrina I	Insecticida	Bloquea los canales de sodio de los axones neuronales en los insectos voladores	(López, 2012)
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	Aceite de neem extraído de las semillas, azadiractina	Insecticida y potente antialimentario para muchos insectos	Provoca en los insectos una muda incompleta y esterilidad	(López, 2012)
<i>Lantana camara</i> L.	Su actividad recae fundamentalmente en los triterpenos pentacíclicos que presenta	Insecticida, antialimentario, repelente y antimicrobiano, entre otras.	<i>Myzus persicae</i> , <i>Plutella xylostella</i> , <i>Henosepilachna vigintioctopunctata</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	(López, 2012)
<i>Lonchocarpus utilis</i> A.C.Sm.	Rotenona , un isoflavonoide producido por las raíces	Tóxico mitocondrial, insecticida	Debe ser ingerido por los insectos para que sea efectivo.	(Isman, 2006)

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Continuación.

<i>Schoenocaulon officinale</i> (Schltdl. & Cham.) A.Gray	Sabadilla, cevadina tipo alcaloide, obtenida de las semillas	Insecticida	Utilizada por cultivadores ecológicos para cultivos como los cítricos	(Isman, 2006)
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	Nicotina, un alcaloide obtenido de las hojas	Insecticida	Tóxico simpático que imita al neurotransmisor acetilcolina	(Isman, 2006)
<i>Ruta chalepensis</i> L.	Aceite esencial obtenido de las hojas	Potente repelente e insecticida	<i>Tribolium castaneum</i> Herbst.	(Najem <i>et al.</i> , 2020)
<i>Artemisia annua</i> L.	Aceite esencial y sus componentes: D-alcanfor, linalol, cineol, α-terpineol y L(-)-borneol	Fumigante, de contacto, insecticida y repelente	<i>Solenopsis invicta</i>	Gheorghe <i>et al.</i> , 2017)
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Potide-G	Antibacteriano	<i>C. michiganense</i> subsp. Michiganense y <i>Rhizoctonia solani</i>	(Marutescu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	O-Metilcapaurina	Antifúngico	<i>B. cinerea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Clonostachys</i>	(Marutescu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Tagetes patula</i> L.	Tiofenos, fenoles, flavonoides, cumarinas (de toda la planta)	Nematicida, insecticida y acaricida	--	(Nava-Pérez <i>et al.</i> , 2012)
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Terpenos, flavonoides y fenoles (del fruto y la hoja)	Insecticida, repelente y fungicida	--	(Nava-Pérez <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ocimum gratissimum</i> L.	Matrina y oximatrina (alcaloides de toda la planta)	Antialimentario y repelente	<i>Coptotermus formosanus</i>	(Mishra <i>et al.</i> , 2020)
<i>Pimpinella anisum</i> L. <i>Mentha piperita</i> L.	Sus aceites esenciales	Repelentes	<i>Rhopalosiphum padi</i> , principal plaga de cultivos de cereales	(Pascual-Villalobos <i>et al.</i> , 2017)
<i>Ryania speciosa</i> M. Vahl	Ryania (rianodina y 9,21-didehidroyanodina)	Insecticida de contacto y estomacal de acción lenta	Plaga de lepidópteros	(Ujváry, 2010)

INTRODUCCIÓN

Características de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias volátiles que se sintetizan en todos los órganos de las plantas aromáticas y lo hacen en pequeñas cantidades. En cuanto a su localización y almacenamiento, estos se encuentran asociados a estructuras secretoras como tricomas glandulares, cavidades o canales secretores, vellos glandulares y conductos de resina.

Los aceites esenciales se pueden obtener por distintos métodos. Los más frecuentes son la hidrodestilación, destilación al vapor, en seco y prensado mecánico en frío del material vegetal (Raveau *et al.*, 2020; Regnault-Roger *et al.*, 2012).

La bioactividad de los aceites esenciales está determinada por sus componentes químicos y su contenido en compuestos activos (Najem *et al.*, 2020). Esto último lo podemos ver en el aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, donde bajo las mismas condiciones de ensayo, el quimiotipo linalol no provocó mortalidad sobre *Tribolium castaneum* pero el quimiotipo carvona limoneno sí la mostró y fue significativa (Ringuelet *et al.*, 2014).

En cuanto a la composición química, ésta suele ser una mezcla compleja de terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos) y compuestos oxigenados (alcoholes, fenoles, ésteres y aldehídos). A menudo, la propiedad biológica de muchos aceites se debe al resultado de la sinergia entre sus componentes (Isman, 2020; Raveau *et al.*, 2020). Un ejemplo de ello son el linalol y el eugenol, componentes del aceite de albahaca que por separados solo el linalol muestra actividad antifúngica moderada, mientras que si se mezclan mejora las propiedades antifúngicas de dicho aceite (Yoon *et al.*, 2013).

Además, la composición de los aceites esenciales varía dependiendo del órgano del que se extrae el AE, aunque se trate de la misma planta o especie (Raveau *et al.*, 2020). También puede variar dependiendo del genotipo de la planta, la zona geográfica en la que se encuentra, las condiciones de crecimiento, la estación de la temporada de recolección, el secado y el almacenamiento, así como de las condiciones climáticas (Baj *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta todo lo anterior, para explotar industrialmente un AE es necesario controlar dichos parámetros a la hora de cultivar las plantas para evitar así la heterogeneidad de estos (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

Como pudimos ver en la tabla 2, los aceites esenciales tienen diversas propiedades biológicas que los hacen ser un producto de control de plagas muy interesante. Como cualquier producto, el uso de los AE tiene sus ventajas e inconvenientes, resumidas en la tabla 3. Uno de dichos inconvenientes se debe a su naturaleza no polar, que dificulta su eficacia y persistencia

INTRODUCCIÓN

en el medio ambiente. Para solucionarlo, es necesario usar tecnologías de formulación que protejan el aceite esencial a la hora de ser aplicado. La más usada y de mayor interés económico es la nanoemulsión (Raveau *et al.*, 2020).

Tabla 3. *Ventajas y desventajas del uso de aceites esenciales para el tratamiento de plagas (tabla de elaboración propia).*

Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Son selectivos, biodegradables, producen poco o ningún residuo tóxico y son menos costosos que los pesticidas químicos sintéticos.	Tasa de muerte más lenta, menor persistencia en el medio ambiente debido a su naturaleza volátil y menor eficacia si se usan solos en comparación con los pesticidas convencionales.	(Chandler <i>et al.</i> , 2011; Nava-Pérez <i>et al.</i> , 2012)
No son tóxicos para los mamíferos, aves y peces, por la falta de receptores de octopamina en ellos, pero sí lo son para los insectos.	Muchos estudios demuestran su eficacia <i>in vitro</i> pero muy pocos <i>in vivo</i> . Se necesita usar disolventes y emulsionantes para ser aplicados en campo debido a su naturaleza no polar.	(Isman, 2000; Isman, 2020)
No se ha informado hasta la fecha fenómenos de bioacumulación ni biomagnificación.	Pueden ser costosos debido a su bajo rendimiento de obtención.	(Raveau <i>et al.</i> , 2020; Regnault-Roger <i>et al.</i> , 2012)

Interacción planta-insecto

Las plantas y los insectos han coexistido y coevolucionado desde hace millones de años, actuando en cuestión de milisegundos, gracias al sistema sensorial y nervioso tan ajustado que poseen. Son capaces de distinguir, entre la gran diversidad de plantas que existe, cuáles son las adecuadas para alimentarse y reproducirse de las que no lo son. Por otro lado, las plantas han desarrollado sistemas de defensa, tanto constitutivos como inducidos después del ataque, que les permite defenderse de estos pequeños artrópodos.

En la interacción planta-insecto el tiempo, espacio, contexto de las señales, así como la fisiología de los insectos son claves y determinan el tipo de interacción. Un ejemplo de ello es la manera en que los insectos perciben los volátiles de las plantas, ya que la exposición a un tipo de volátil puede causar una respuesta totalmente diferente a la de una mezcla de varios tipos (Bruce, 2015).

INTRODUCCIÓN

Los insectos captan e interpretan los olores que perciben de su entorno a través de pelos sensoriales inervados (sensilias olfativas) que componen sus antenas, aunque algunos apéndices bucales (palpos) también pueden detectar los estímulos olfativos. En una antena hay distintos tipos morfológicos y funcionales de sénsulos y, en cada uno de estos, hay al menos tres proteínas que están involucradas en la detección de los olores: receptores de olores que se encuentran en la membrana de las neuronas, las proteínas de unión a odorantes y las enzimas de degradación de olores localizadas en el lumen del sénsulo (Guidobaldi y Guerenstein, 2012; Vogt, 2003).

La rápida acción de los aceites sobre algunos insectos plaga indica que se trata de un modo de acción neurotóxico (Isman, 2006). Uno de los sistemas afectados por dichos compuestos, sobre todo por mono y sesquiterpenoides es el sistema octopaminérgico, el cual representa un objetivo biorracional para el control de insectos (Isman, 2000). Otras dianas del sistema nervioso son los canales de cloruro activados por GABA (Isman, 2020) y la acetilcolinesterasa de los insectos. En cuanto al primer sistema mencionado, los aceites esenciales actúan como agonistas de los receptores de octopamina, aumentando los niveles de AMPc y calcio en el interior de la célula. Con respecto a los receptores de GABA localizados en los canales de cloruro, estos actúan como moduladores positivos de dichos receptores. Por último, los AE inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa (Jankowska *et al.*, 2018).

Estrategias para el control de plagas en la agricultura

Para lograr un manejo efectivo de plagas, la opción más sostenible y respetuosa con el agroecosistema es la combinación de tratamientos con técnicas, y que estos formen parte de los planes integrales del control de plagas. El objetivo que tienen los profesionales es desarrollar estrategias que reduzcan al máximo el uso de pesticidas convencionales a la vez que se mantiene un buen rendimiento y rentabilidad de los cultivos. De esta forma, se consigue manejar a las plagas por debajo de los niveles que causan daños económicos. Algunas de estas técnicas más destacadas son el uso de productos naturales como semioquímicos, extractos o derivados de plantas, cultivos de rotación o de trampa y cultivos genéticamente modificados resistentes a insectos (Lamichhane *et al.*, 2016; Najem *et al.*, 2020).

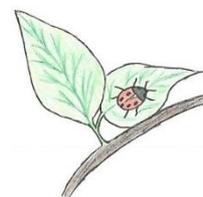
Según Raveau *et al.* (2020), “Los productos de biocontrol para el manejo integrado de plagas de cultivo se clasifican en cuatro clases principales, que incluyen macroorganismos, microorganismos, productos semioquímicos y sustancias naturales procedentes de plantas, algas, microorganismos, animales o fuentes minerales”. Como podemos ver, se reafirma que

INTRODUCCIÓN

los aceites esenciales son una alternativa ideal para combatir las plagas de cultivo, ya sean solos o combinados con otras moléculas. Lo mismo ocurre con los semioquímicos. Estos últimos son sustancias químicas que regulan el comportamiento de las especies. Se clasifican según el tipo de interacción entre ellas, que puede ser inter o intraespecífica. Cuando hablamos de interacción interespecífica, nos referimos a los aleloquímicos, entre los que destacan las kairomonas, cuando la sustancia química que emite una especie beneficia a la especie receptora y las alomonas, cuya acción beneficia a la especie emisora. Por otro lado, tenemos la interacción intraespecífica, que hace referencia a las feromonas. Estas sustancias son emitidas por una especie y afectan a la misma, a diferencia de los aleloquímicos, que afectan a individuos de diferentes especies (Kuniyoshi Virrueta, 2002).

Hay distintos tipos de feromonas, pero las más utilizadas y destacadas son las feromonas sexuales. Estas constituyen la base de los sistemas de monitoreo basados en semioquímicos más efectivos para la detección y cuantificación de plagas. Algunos de dichos sistemas o estrategias que más se usan son la detección y monitoreo, trapeo masivo, atraer y matar e interrupción del apareamiento o confusión sexual. El empleo de estos permite conocer el momento exacto donde el uso de los pesticidas es óptimo. De esta manera, se reduce los efectos colaterales dañinos sobre la salud y el medio ambiente. Otra ventaja que tienen es que no necesitan un registro en la mayoría de los países europeos, en contraste con los aceites esenciales (Chandler *et al.*, 2011; Jones, 2008).

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente expuestos, en este trabajo final de grado se ha planteado la búsqueda de alternativas naturales y eficaces en el control plagas de los cultivos. Por ello, se plantea extraer aceites esenciales de especies de la flora canaria para ser combinados con feromonas y crear así trampas biorracionales que permitan controlar la “polilla de la papa” (*Tecia solanivora*), plaga para la que aún no existe ningún tipo de tratamiento eficaz.

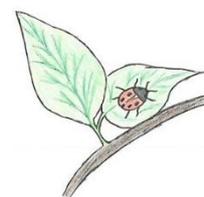


Objetivos

En base a lo anteriormente expuesto, se ha propuesto como objetivo general del presente trabajo: la obtención de aceites esenciales de *Artemisia thuscula* Cav. y *Ruta chalepensis* L. para evaluar su actividad como insecticida tanto en laboratorio como en campo, así como su posible uso, en combinación con feromonas, para el biocontrol y el manejo integrado de plagas.

Para la consecución de este objetivo general, se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Optimización de la metodología de extracción del aceite esencial de *Artemisia thuscula* Cav., teniendo en cuenta la variabilidad según la localización, mes de recolecta del material vegetal y su procesamiento previa a la extracción.
2. Optimización del sistema de extracción de *Ruta chalepensis* L. analizando la variabilidad en la producción del aceite vegetal según el procesamiento previo del material vegetal.
3. Análisis de los metabolitos presentes en el aceite esencial obtenido de *Artemisia thuscula* Cav. a través de una cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).
4. Evaluación de la actividad antialimentaria *in vitro* de los aceites esenciales obtenidos de *Artemisia thuscula* Cav. y *Ruta chalepensis* L. contra *Chrysodeixis chalcites*.
5. Evaluación en campo de la actividad insecticida (repelente) del aceite esencial de *Artemisia thuscula* Cav. así como su uso combinado con feromonas sexuales en cultivos de *Solanum tuberosum* afectadas con *Tecia solanivora*.



Material y Métodos

Recolección de material vegetal

Se recolectó *Artemisia thuscula* Cav. en dos localidades diferentes del norte de Tenerife: en la costa de la Guancha (Santo Domingo) y en el centro de recuperación de fauna silvestre “La Tahonilla” del Cabildo de Tenerife en los días que se muestran en la tabla 4. Además, el material vegetal utilizado fue recolectado en fechas diferentes (verano e invierno).

Tabla 4. Localidades de recolección de *A. thuscula* Cav.

	Localidad	Fecha
<i>Artemisia thuscula</i> Cav.	Santo Domingo (La Guancha)	18/08/2019 y 12-16/02/2021
	La Tahonilla	26/02/2021

Por otro lado, *Ruta chalepensis* L. fue comprada fresca en el mercado de La Laguna el día 20 de agosto de 2018 y el 22 de marzo de 2021. El material vegetal adquirido en el mercado proviene de un cultivo de la zona. Se dejó una muestra testigo en el herbario de la TFC-ULL.

Preparación de material vegetal previa extracción

El material vegetal obtenido fue procesado tanto en seco como en fresco. El material seco fue obtenido tras almacenar la biomasa vegetal en un lugar seco, oscuro y a temperatura ambiente durante una semana. Una vez seco, se procedió a moler, proceso que se realizó dos veces, la primera con un molino industrial y luego con uno más pequeño para obtener el material con un grano fino.

En el caso del material vegetal fresco, tras su recolección se separaron las hojas y se trocearon con una tijera para facilitar la extracción de los aceites. La biomasa fresca es almacenada a -20°C.

Antes de llevar a cabo la extracción de los aceites esenciales, se re suspendió la biomasa vegetal en agua durante 18 horas a 4°C previamente a la hidrodestilación.

Extracción de aceites esenciales

Se extrajo los aceites esenciales de la parte aérea de *Artemisia thuscula* Cav. y *Ruta chalepensis* L. por hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger. Las extracciones se realizaron utilizando una relación de 150 gramos de material vegetal en un litro (L) de agua. La duración de la destilación oscilaba entre 3-6 horas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El aceite obtenido se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenó en viales sellados a -20°C en un congelador hasta su posterior análisis y uso.

Determinación del rendimiento de aceites esenciales

Se ha determinado el rendimiento siguiendo el método empleado en el estudio de Najem *et al.* (2020), que sigue la norma AFNOR y emplea la siguiente fórmula: $EOY (\%) = (M'/M) * 100$, donde EOY es el rendimiento de aceite esencial (en porcentaje), M' es el peso del aceite esencial obtenido en gramos y M es el peso del material vegetal utilizado en gramos.

Análisis químico del aceite esencial de A. thuscula Cav.

El aceite esencial de *Artemisia thuscula* Cav. fue enviado a Barcelona para ser analizado por la empresa CHROMESSENCE, especializada en aceites esenciales. Los componentes se identificaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un detector de ionización de llamas (GC-FID) para su cuantificación.

Material entomológico

Para la actividad antialimentaria se utilizaron larvas adultas en estadio quinto del lepidóptero *Chrysodeixis chalcites*, criadas en el sótano del Departamento de Fitopatología, en la Facultad de Biología, bajo condiciones controladas de temperatura y humedad relativa (25°C y 80%) con un fotoperíodo automático 12/12 h de luz/oscuridad. Las larvas fueron alimentadas con una dieta de soja y judías en recipientes pequeños con agujeros en la tapa para permitir el intercambio gaseoso.

Actividad antialimentaria de los aceites

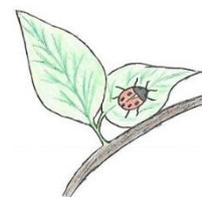
Esta actividad se basa en el método de discos de hoja llevado a cabo en los estudios de Escoubas *et al.* (1993) y González-Coloma *et al.* (1996). Los ensayos se llevaron a cabo en la Unidad de Fitopatología-Grupo CIPEV. Estos se realizaron con 16,2 mg de cada aceite esencial ensayados, el cual se dividía en dos partes: de elección y no elección. Estos acaban cuando pasan unas 6-8 horas o cuando las larvas se comen el 50% de la superficie de los controles.

Una vez terminado, se escanea las placas de Petri para digitalizar los resultados y calcular así el área ingerida por el insecto. El parámetro a calcular es el índice de consumo o tasa antialimentaria (FR), cuya fórmula es: $FR = \{1-(T/C)\} \times 100$, donde FR es la tasa antialimentaria, T es el porcentaje (%) ingerido del disco tratado y C es el porcentaje (%) ingerido del disco control.

MATERIAL Y MÉTODOS

Actividad insecticida del aceite de Artemisia thuscula Cav. en campo

Se evalúa la posible actividad insecticida del aceite de *A. thuscula* Cav. en una finca de cultivo de papa, *Solanum tuberosum*, en el que se utiliza la estrategia *push and pull* descrita en el estudio de Bruce (2010). Para ello, se emplean trampas que combinan la acción de una feromona sexual como atrayente de los machos de *Tecia solanivora* y el aceite esencial como repelente de dicha polilla. La cantidad de aceite que fue necesario obtener para realizar el ensayo fue 6 ml.



Resultados y discusión

Descripción botánica de Artemisia thuscula Cav.

El género *Artemisia* está compuesto por unas 500 especies que se distribuyen mayoritariamente por Asia, Europa y el Norte de América (Abad *et al.*, 2012). Entre ellas, *Artemisia thuscula* Cav., más conocida por el nombre de *A. canariensis* Less y vulgarmente como incienso canario, es una especie endémica de las Islas Canarias que se encuentra en los hábitats cardonal-tabaibal y bosque termófilo de todas las islas menos en Fuerteventura y Lanzarote, representadas en la figura 1 (Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias [BDBC], 2021; Pegoraro, 2019).

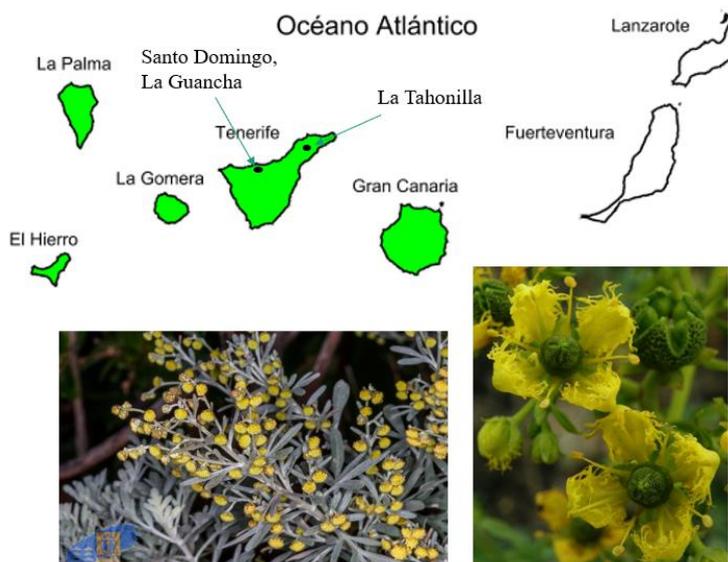
Es una planta que se reconoce fácilmente por el olor intenso y aromático que desprende sus hojas y flores. Este olor se debe a la presencia de grandes cantidades de terpenos volátiles en los aceites esenciales que posee (Abad *et al.*, 2012).

En cuanto a su descripción, se trata de un arbusto gris, muy ramificado, de hasta 1 metro de altura, con ramas levantadas o arqueadas, leñosas y follaje caduco o subpersistente, con las hojas secas persistentes. Las hojas, de 3 a 7 centímetros de largo, son muy variables, bipinnatisectas, bi-tripinnadas o tri-pinnatisectas, con lóbulos planos, de lineares a obtusos, de color verde-grisáceo o gris-plateado, de consistencia herbácea, alternas, pecioladas y de olor muy fuerte y característico. Los capítulos, agrupados en alargadas y densas inflorescencias terminales o subterminales, son globosos, dorados o amarillo-parduzco, de unos 4 milímetros (mm) de diámetro, con brácteas involucrales tomentosas, las interiores con bordes escariosos (Juanillo, 2021).

Esta especie ha sido muy utilizada en medicina tradicional como tónico diurético para tratar dolencias relacionadas con el sistema digestivo, como son los cólicos, flatulencias y las diarreas. Además, debido a su olor tan fuerte y penetrante ha sido muy utilizada en los cultivos de papas, durante su almacenamiento, como repelentes para prevenir plagas de insectos como la causada por la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Agaetespacioweb Videos, 2021, 17m28s; Mesa Morillo, 2021).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 1. Imagen de *R. chalepensis* L. y *A. thuscula* Cav. así como la distribución de esta última en el Archipiélago, indicando las zonas de recolección. La imagen inferior izquierda representa la inflorescencia de *A. thuscula* Cav., mientras que la de la derecha corresponde a *R. chalepensis* L. La distribución e imagen de la primera ha sido tomada de BDBC (2021) y la de la segunda de Gil González (2020).



Descripción botánica de Ruta chalepensis L.

Uno de los géneros que conforman la familia Rutaceae es el género *Ruta*. Este está formado por subarbustos de hoja perenne con fuerte aroma distribuidos principalmente en regiones templadas y tropicales, siendo nativos del Mediterráneo. A pesar de su origen, *Ruta chalepensis* L. o “ruda” se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo (Eurasia, Norte de África y América) (Coimbra *et al.*, 2020). En las Islas Canarias es una especie que ha sido introducida y que se cultiva en jardines y huertos (Gil González, 2020).

Según San Miguel (2021), *R. chalepensis* L. se describe como una hierba de hasta 1 metro de altura, perenne, leñosa en la base y verde azulada. Tiene hojas muy variadas, de haz verde-grisácea y con las glándulas más visibles, y envés ligeramente más claro. La inflorescencia es laxa, totalmente glabra; rama terminal con 2-8 flores; brácteas inferiores 1-2 pinnatisectas; brácteas superiores 5 veces más anchas que el pedúnculo en que se insertan, sésiles, de anchamente lanceoladas a deltoides o cordiformes; pedicelos de 1-4 veces la longitud de la cápsula. Receptáculo con disco anular de 2-2,9 mm de diámetro. Sépalos de deltoides a anchamente romboidal-ovados, glabros. Pétalos patentes, fimbriados, de amarillos a verdosos, con glándulas prominentes en toda la superficie. Estambres con filamentos de 4,8-6,8 mm. Cápsula persistente, de superficie rugosa; apéndices convergentes, redondeados, que terminan bruscamente en un mucrón. Semillas 1-5 por lóculo, pubérrulas, con 2 costillas laterales, prominentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se trata de una antigua planta medicinal que se sigue usando como laxante, antiinflamatorio, analgésico, antiespasmódico, abortivo, antiepiléptico, etc., en muchos países como Arabia Saudí, Turquía y China (Günaydin y Savci, 2005). Además, diferentes partes de la planta tratadas de una forma específica presentan actividad insecticida, larvicida o repelente de insectos. El extracto acuoso de las hojas y del meristemo presenta actividad insecticida contra la mosca blanca de la batata, *Bemisia tabaci*, mientras que el aceite esencial obtenido de las hojas frescas muestra actividad repelente contra el mosquito tigre asiático, *Aedes albopictus* (Coimbra *et al.*, 2020).

Extracción y rendimiento de los aceites

En el presente trabajo hemos llevado a cabo la extracción de aceites esenciales por hidrodestilación empleando un aparato tipo Clevenger de vidrio. Este aparato es aplicado en la mayoría de los métodos de hidrodestilación utilizados para estandarizar los aceites esenciales. Además, es el método recomendado por la Farmacopea Europea (Baj *et al.*, 2015).

Para la realización de las destilaciones se usaron dos matraces con capacidad de 2 L y 1 L en los que se introdujo agua (1 y 0,5 L respectivamente) y el material vegetal molido o troceado (aproximadamente 150 y 75 gramos respectivamente). Tras el proceso de maceración, se añadieron microporous carbon boiling chips para favorecer una evaporación homogénea y facilitar la extracción de los volátiles. Luego, se procedió a montar el aparato para llevar a cabo la hidrodestilación. Para ello, el matraz se calentó hasta llegar al punto de ebullición y se mantuvo así durante todo el proceso. Esto permite romper la cutícula de las glándulas que contienen los aceites liberando dichos volátiles, que son arrastrados por el vapor del agua y posteriormente condensados. Luego, tanto el agua como el aceite se separan debido a sus diferencias de densidad y miscibilidad, quedando el aceite por encima del agua. Cuando se finalizó el proceso, se retiró la fase acuosa y se recogió el aceite. Este se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenó en viales sellados a -20°C para mantener sus propiedades y evitar así su volatilización (Cervera del Mármol, 2016).

En la tabla 5 y en las figuras 2a y 2b se muestra y se representa las medias de los rendimientos obtenidos de las destilaciones de la parte aérea tratada tanto en seco como en fresco de *Artemisia thuscula* Cav. y *Ruta chalepensis* L. Esos valores se obtuvieron aplicando la fórmula descrita en el apartado de material y métodos. Para ello, se realizaron un total de 22 destilaciones (tiempo de duración de 4-6 horas): cuatro de ellas con material vegetal seco y cinco con material fresco recolectado de La Guancha; cuatro con hojas frescas y una con hojas secas de La Tahonilla y cuatro con material vegetal seco y cuatro con material fresco adquirido

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

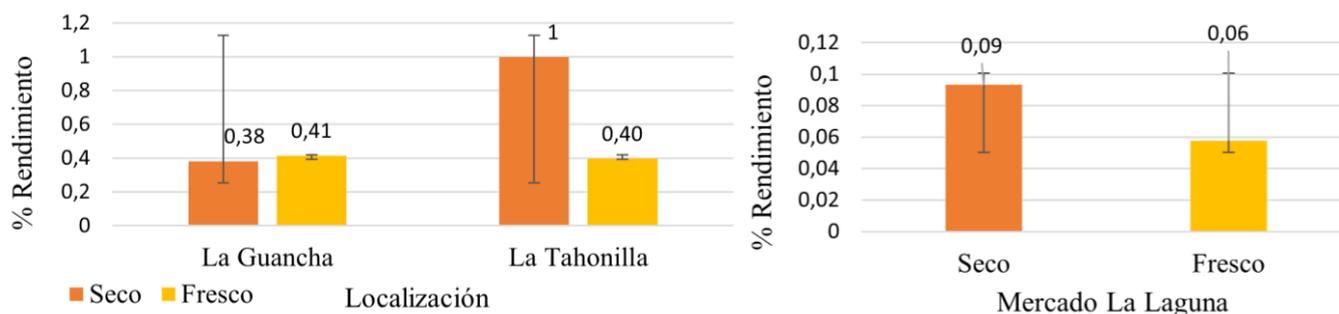
del mercado de La Laguna. De cada una se obtuvo el peso en gramos de los aceites extraídos. Dicha medida fue la diferencia del peso entre el vial con el aceite recogido de la destilación del momento menos el peso de dicho vial con el aceite recogido de la anterior destilación.

Tabla 5. Medias y desviaciones típicas de los rendimientos (en %) obtenidos en las extracciones de los aceites esenciales de *Artemisia thuscula* Cav. y *Ruta chalepensis* L.

Planta	Localización	Seco	Fresco	Total
<i>Artemisia thuscula</i> Cav.	La Guancha (Santo Domingo)	0,38 ± 0,44	0,41 ± 0,16	--
	La Tahonilla	1 --	0,40 ± 0,06	--
	Total	0,50 ± 0,47	0,41 ± 0,12	0,44 ± 0,28
<i>Ruta chalepensis</i> L.	Mercado La Laguna	0,09 ± 0,12	0,06 ± 0,07	0,08 ± 0,1

Si nos fijamos en ambas figuras, las medias de los rendimientos obtenidos dentro de cada localidad difieren según el tipo de tratamiento al que se sometió el material vegetal. En la figura 2a podemos ver cómo se obtuvo un rendimiento de 0,38% en seco y 0,41% en fresco del material recogido en La Guancha. Dicha diferencia es pequeña, pero se puede deducir que con el material tratado en fresco se obtiene un mejor rendimiento. Sin embargo, si observamos los rendimientos obtenidos en La Tahonilla, la diferencia entre tratamientos es mucho mayor y, en este caso, el mejor rendimiento lo obtuvo el tratamiento seco (1%) en comparación con el fresco (0,40%). En ambas zonas, el rendimiento del material tratado en fresco es muy similar (0,41% y 0,40%), siendo recolectado todo el material en el mes de febrero de 2021. Esto no ocurre con el material tratado en seco, ya que el material de La Guancha fue recolectado en diferentes períodos, en 2019 y en 2021, mientras que el de la Tahonilla se recolectó en febrero de 2021.

Figura 2. Representación de las medias y desviaciones típicas de los rendimientos obtenidos del aceite esencial de *Artemisia thuscula* Cav (a, izquierda) y *Ruta chalepensis* L. (b, derecha).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los datos anteriores y que todo material tratado en seco fue molido y aquel tratado en fresco fue troceado, se puede deducir que con el material molido se obtienen mejores rendimientos y además estos son mayores si el material ha sido recolectado recientemente. Esto último lo podemos ver en el rendimiento obtenido del material en seco y molido de La Guancha (0,38%), donde su media se vio reducida porque dos de las cuatro destilaciones se realizaron con hojas secas de 2019, en comparación con el rendimiento obtenido en La Tahonilla (1%), para el cual se realizó una sola destilación con material seco y molido pero recién recolectado, en 2021.

Por otro lado, en la figura 2b se muestran las medias de los rendimientos obtenidos del aceite de *Ruta chalepensis* L. Se puede observar que dichos rendimientos son muy inferiores a los que se obtuvieron del aceite esencial de *Artemisia thuscula* Cav. Para la media del rendimiento del material tratado en seco se realizaron 4 destilaciones con material seco y molido recolectado en 2018. Cabe destacar que el material seco estaba almacenado hace tres años, y al igual que lo que ocurría con *Artemisia thuscula* Cav., cuanto más reciente es el material mejor rendimiento se obtiene.

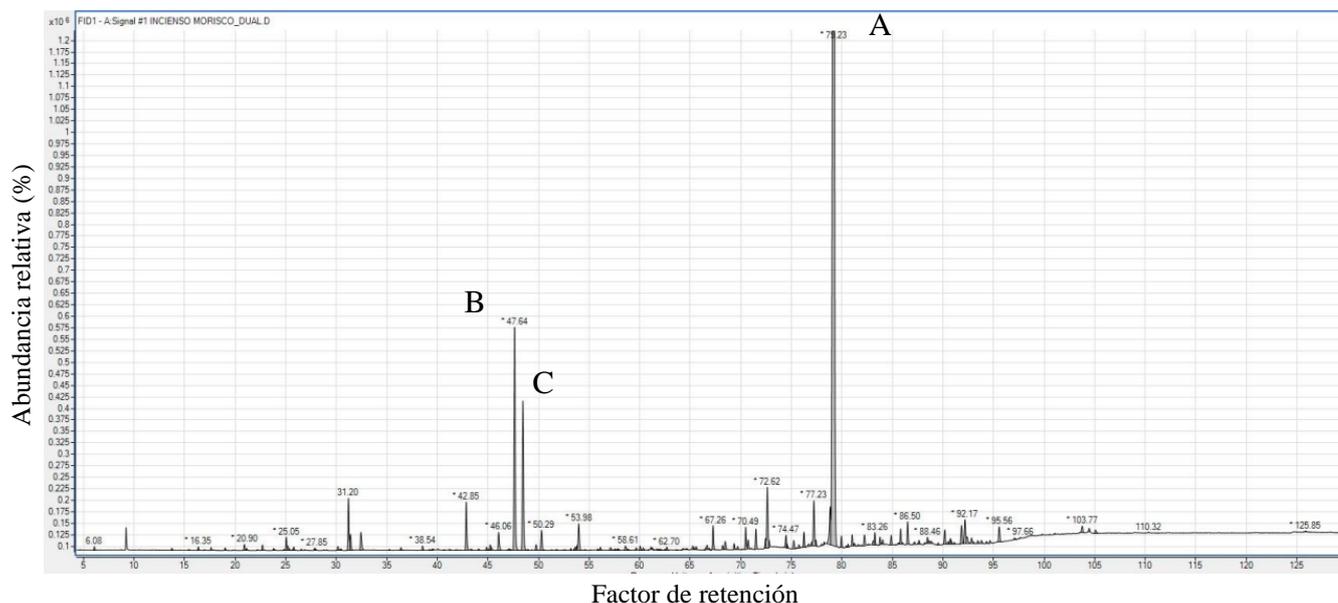
Como conclusión a todo lo comentado anteriormente, en nuestro ensayo se obtuvieron los mejores rendimientos utilizando material secado recientemente y molido mecánicamente. Esto va en consonancia con lo descrito en el trabajo realizado de Fontenla Razzetto (2006), donde expone que el triturado con cuchillas permite que haya una mayor superficie de contacto expuesta, permitiendo así que se libere una mayor cantidad de volátiles. Con el tratamiento en fresco y troceado del material de *A. thuscula* Cav. se obtuvieron unos rendimientos decentes, pero aun así no fueron altos. Tal vez con un troceado más intenso la superficie de contacto aumenta y se libera más aceite. Es un factor que se puede tener en cuenta para futuras extracciones de aceite por el método de hidrodestilación.

Composición del aceite de Artemisia thuscula Cav.

Los resultados obtenidos del análisis mediante cromatografía de gases del aceite esencial de *A. thuscula* Cav. recolectada en el norte de Tenerife se muestran en la figura 3. El cromatograma muestra los componentes identificados mediante su factor de retención y cuantificados mediante el porcentaje relativo de abundancia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 3. Cromatograma del aceite esencial extraído de las hojas de *A. thuscula* Cav. en el norte de Tenerife (GC-MS).



Este trabajo se ha desarrollado con la empresa Ecobertura y los resultados que se obtienen son confidenciales. Por ello, lo único que se puede decir de los constituyentes mayoritarios obtenidos (A, B y C) es que son compuestos terpénicos.

En la literatura consultada sobre la composición química del aceite esencial de *A. thuscula* Cav. hemos encontrado que los componentes de dicha especie varían en función del sitio de recolección. Por ejemplo, en el estudio de Bellomaria *et al.* (1993) los constituyentes del aceite de las plantas recolectadas en el Puerto de la Cruz (Tenerife) no son los mismos en abundancia que los que se encuentran en las plantas recolectadas en Valverde (El Hierro).

En general, en la composición química de las especies del género *Artemisia* el grupo mayoritario de metabolitos son terpenos (Abad *et al.*, 2012) que está en consonancia con el resultado que hemos obtenido. Además, existe una variación intraespecífica significativa en los constituyentes de sus aceites esenciales y, en concreto, de los terpénicos (Abad *et al.*, 2012). Esta variación se puede deber a muchos factores, cómo la localización, el momento de recolección y el estado fenológico. Esto puede ser un factor interesante para tener en cuenta en futuras investigaciones.

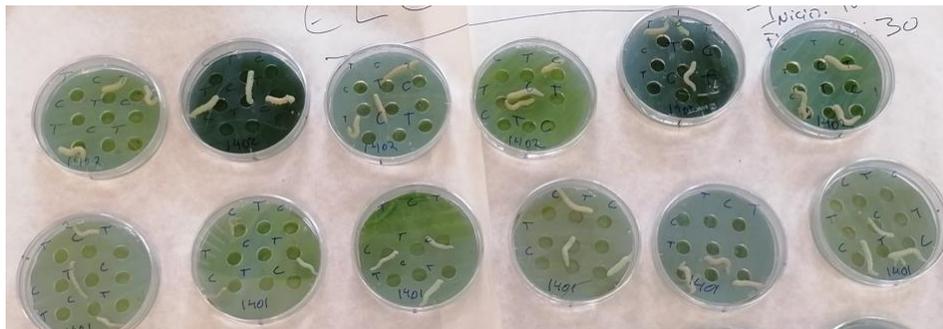
Actividad antialimentaria de los aceites

Este ensayo constó de dos partes: elección y no elección. Para la primera se preparó dos placas de Petri, una para ensayar cada aceite esencial, con hoja de platanera y encima gel de agarosa con 9 pocillos o discos que alternadamente van 5 tratados y 4 sin tratar (cambiando el

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

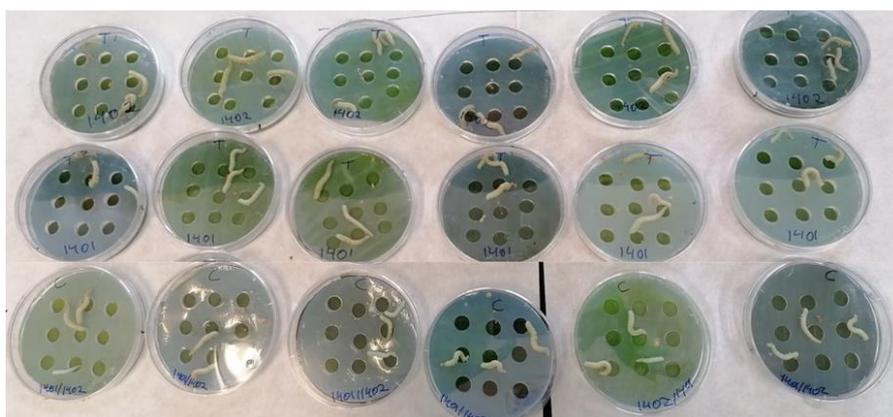
orden en la siguiente réplica). Con la ayuda de una pipeta se inoculó a partir de la solución stock (40 mg/ml en EtOH) 5 microlitros (ul) en cada disco a tratar, que equivale a 0,2 mg de aceite esencial. En los discos sin tratamiento se aplicó etanol. Después se dejó secar la superficie unos minutos y se colocaron 3 larvas en cada placa. Se realizaron 6 repeticiones de ambas placas, representadas en la figura 4.

Figura 4. Ensayo elección de la actividad antialimentaria. La primera fila de placas de Petri corresponde al ensayo con el aceite de *R. chalepensis* L., mientras que la segunda fila es con el aceite de *A. thuscula* Cav.



En cuanto al ensayo de no elección, las placas fueron preparadas de la misma manera a excepción del tratamiento. Aquí las 6 placas tenían los 9 pocillos tratados, tanto para el ensayo del aceite de *A. thuscula* Cav. como para el de *R. chalepensis* L. Como control se preparó 6 placas cada una con los 9 discos sin tratar, como se puede observar en la figura 5.

Figura 5. Ensayo no elección de la actividad antialimentaria. Las dos primeras filas corresponden a los tratamientos realizados con los aceites de *R. chalepensis* L. y *A. thuscula* Cav., respectivamente. La tercera fila es el control del ensayo.



El ensayo duró unas 7 horas y media. Luego, se escaneó cada placa para calcular el área ingerida por el insecto. Con los datos obtenidos se calculó la tasa antialimentaria (FR) con la fórmula descrita en el apartado de material y métodos. En la tabla 6 se muestra las medias de dicha tasa de los dos aceites esenciales para cada ensayo realizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nivel de referencia que determina si un compuesto presenta mínimamente o no actividad antialimentaria se sitúa arbitrariamente en $FR > 50\%$ (González-Coloma *et al.*, 1994).

Como se puede observar en la tabla 6, se obtuvo como resultado que el aceite esencial tanto de *A. thuscula* Cav. como de *R. chalepensis* L. son compuestos inactivos, es decir, no presentan actividad antialimentaria contra las larvas de *Chrysodeixis chalcites* según el criterio antes mencionado. No se obtuvo el resultado esperado, lo que nos llevó a plantear para futuros estudios la aplicación del aceite formulado previamente mediante el uso de emulsiones o encapsulaciones. El aceite esencial por su naturaleza es volátil y no polar, por lo que su eficacia y persistencia en el medio aplicado disminuye significativamente si no es formulado de manera correcta (Isman, 2020). En nuestro ensayo el aceite se volatilizó muy rápido y no pudo ejercer su acción como repelente. Por otro lado, las larvas que se usaron habían sido alimentadas, por lo que comieron muy poco de los discos tanto tratados como sin tratar. Además, el porcentaje ingerido de los discos tratados tuvo que ser parecido al de los discos sin tratar para obtener unos porcentajes de FR tan bajos. Esto se debe a la baja persistencia y eficacia que tuvo el aceite en los discos tratados. Aun así, los porcentajes de la FR que se obtuvieron no son tan bajos, a excepción del -10,84 %, por lo que los aceites mostraron un mínimo de actividad disuasoria, aunque no el suficiente para ser clasificados como compuestos mínimamente activos.

Tabla 6. Medias de la tasa antialimentaria de los aceites de *A. thuscula* Cav. y *R. chalepensis* L. en los ensayos de elección y no elección.

	Ensayo elección	Ensayo no elección	Conclusión
<i>Artemisia thuscula</i> Cav.	Baja actividad (-10,84%)	Baja actividad (49,06%)	Compuesto inactivo
<i>Ruta chalepensis</i> L.	Baja actividad (15,23%)	Baja actividad (21,69%)	Compuesto inactivo

Todo ello nos lleva a deducir que el ensayo como tal, diseñado para cuantificar la disuasión alimentaria de un extracto vegetal, no es el adecuado para evaluar la actividad disuasoria o repelente de un aceite esencial. Para realizar esto último, se plantea adaptar el ensayo a las características que tiene un aceite esencial y así poder evaluar su actividad repelente.

Actividad insecticida del aceite esencial de Artemisia thuscula Cav. en campo

Este ensayo forma parte del proyecto Interreg-MAC CUARENTAGRI (<https://www.cuarentagri.com/>) y es llevado a cabo por el Agrocabildo de Tenerife y el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA). Para diseñar la estrategia *push and pull* en campo es necesario 6 ml del aceite esencial de *A. thuscula* Cav., uno de los objetivos presentes del Trabajo Final de Grado. Por otro lado, la empresa Ecobertura se encargó de proporcionar las feromonas sexuales de *Tecia Solanivora*.

Este sistema se basa en la combinación de varias tácticas del Manejo Integral de plagas (MIP) como el uso de productos naturales derivados de plantas y animales para modificar la conducta del insecto plaga, manipulando así su distribución y abundancia en el cultivo que se quiere proteger. Se usan estímulos repelentes, disuasorios o que enmascaran la apariencia de la planta objetivo para alejar el insecto plaga (*push*). Algunos de estos son productos volátiles no hospedantes, feromonas anti-agregación, feromonas de alarma, disuasores de la oviposición y antialimentadores. Simultáneamente, se utilizan estímulos atrayentes como volátiles hospedantes, feromonas de agregación, feromonas sexuales y estimulantes de la oviposición en otras áreas del cultivo donde hay trampas que facilitan la eliminación de la plaga (*pull*). Para diseñar esta estrategia hay que conocer bien la biología del insecto plaga, así como su interacción con la planta huésped y enemigos naturales. Por ello, la estrategia *push and pull* difiere dependiendo del insecto a controlar y del cultivo a proteger (Cook *et al.*, 2007).

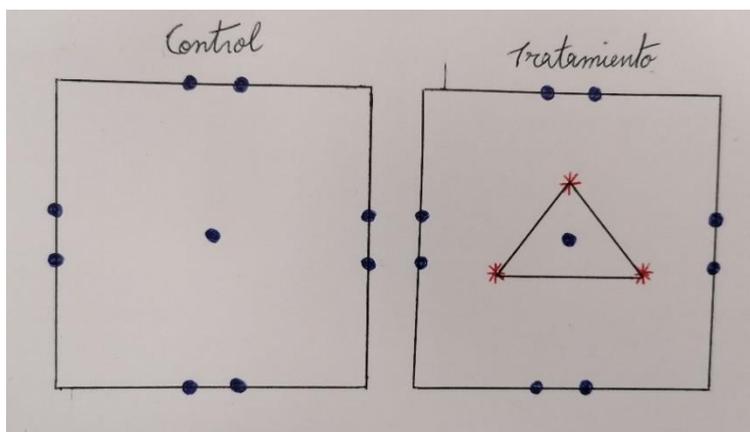
Este sistema ha sido desarrollado por el Centro Internacional de Fisiología y Ecología de Insectos (Icipe) en Kenia y está diseñado para mejorar la protección y seguridad de los cultivos contra plagas que causan grandes pérdidas en la producción de estos (Bruce, 2010). Uno de los cultivos en los que se ha usado esta estrategia es en el maíz, *Zea mays* L., cultivo de gran importancia alimentaria y comercial para África y países de Sudamérica que ha sufrido grandes daños por la acción de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) o cogollero del maíz (Midega *et al.*, 2018).

Para este ensayo se obtuvo 6 ml de aceite esencial de *A. thuscula* Cav. que se repartirán de manera homogénea en varias fincas de cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). En fincas experimentales del ICIA se seleccionarán dos parcelas, una control y otra tratamiento que tengan las mismas condiciones climáticas y orográficas. En la figura 6 se puede ver dichas parcelas y el diseño del sistema aplicado. Este consiste en la combinación del aceite esencial de *A. thuscula* Cav. con aceite de girasol como estímulo repelente. Como atrayente se encuentran las feromonas sexuales de machos de la polilla guatemalteca y, en el mismo sitio de aplicación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

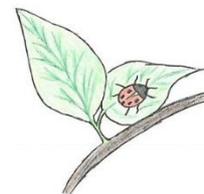
de estas, hay trampas que permitirán reducir su población. Se trata de una versión novedosa de la estrategia *push and pull* porque no usa un cultivo intercalado como parte del estímulo repelente, sino directamente semioquímicos.

Figura 6. Esquema de la estrategia *push and pull*. Los círculos azules son los puntos de aplicación de la feromona sexual junto a una trampa. Los asteriscos son los lugares de aplicación de la combinación del aceite esencial de *A. thuscula* Cav.



Los resultados que se pretenden obtener son que en el centro de monitoreo de la parcela control haya más capturas que en el centro de la parcela tratamiento, ya que en esta última los aceites aplicados estarían ejerciendo su acción repelente y no son atraídas tantas polillas al centro como en la de control. Luego, en la zona de la periferia de la parcela tratamiento se espera tener más capturas que en la de la parcela control. Esto es así porque en la parcela tratamiento las polillas son empujadas hacia el exterior al mismo tiempo que son atraídas hacia dicha zona, mientras que en la parcela control al no haber estímulos repelentes las capturas se distribuyen uniformemente entre las trampas.

El cultivo que se ha elegido es la papa porque es un subsector de la agricultura canaria muy importante que se encuentra en la actualidad en una grave crisis debida a la importación masiva de papas a bajo coste de otros países, a la falta de mano de obra local y, en particular, a la aparición de importantes plagas como la polilla guatemalteca, entre otras causas (Marrero Domínguez, 2012). Esta polilla, originaria de Guatemala, ha llegado a las Islas Canarias desde América donde constituye la plaga más peligrosa para el cultivo de papa en Centro y Sudamérica. En estos países no se ha conseguido controlar dicha plaga porque los factores naturales bióticos y abióticos para el control son prácticamente inexistentes (Pollet *et al.*, 2003). Debido a ello, este proyecto tiene como objetivo encontrar algunos de esos factores que permitan controlar la plaga de *Tecia solanivora* en el cultivo de papa mediante la aplicación de la estrategia *push and pull* anteriormente explicada.



Conclusiones

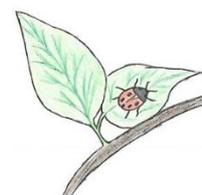
- Las partes aéreas de *Artemisia thuscula* Cav. recolectadas en la localidad de La Guancha y de La Tahonilla sometidas a un tratamiento de secado reciente y molido mecánico mostraron mejores rendimientos de aceite esencial en comparación con el tratamiento en fresco y troceado. Este último mostró rendimientos similares en ambas localidades y en general, más bajos que con el anterior tratamiento. Por otro lado, se cree que trabajando con un material vegetal recolectado recientemente se puede mejorar los rendimientos obtenidos del aceite esencial de *Ruta chalepensis* L.
- La literatura consultada sobre la composición del aceite de *Artemisia thuscula* Cav. pone de manifiesto que los volátiles que presenta, sobre todo terpenos, varían mucho en función del lugar de recolección, principalmente. Esto nos confirma la enorme variabilidad y heterogeneidad que presentan los aceites esenciales.
- A lo largo del desarrollo del presente trabajo se ha comentado la actividad repelente que presenta los aceites esenciales de *Artemisia thuscula* Cav. y *Ruta chalepensis* L. Esto pone de manifiesto que el ensayo de la actividad antialimentaria que se llevó a cabo no está diseñado para evaluar dicha actividad de los aceites esenciales de las especies estudiadas. Para ello, hay que adaptar el ensayo a las características de un aceite esencial.
- El ensayo de la estrategia *push and pull* es un proyecto que pretende encontrar una solución para combatir y controlar la plaga de *Tecia solanivora*. Si se obtienen buenos resultados, este sistema que forma parte del manejo integrado de plagas se puede adaptar al control de otros insectos, constituyendo así una alternativa sostenible y versátil en la protección de cultivos.

Los aceites esenciales son una alternativa sostenible al uso de los pesticidas convencionales que, combinados con otros productos naturales o incluso con fitosanitarios son muy eficaces en el control de plagas de los cultivos agrícolas. A pesar de ello, su conocimiento y uso en la agricultura está limitado. Por esta razón, se debe potenciar la investigación en este campo y conocer la interacción aceite esencial-insecto para conseguir un mejor uso y aprovechamiento de los mismos en la protección y seguridad de los cultivos.

Conclusions

- The aerial parts of *Artemisia thuscula* Cav. collected in the locality of La Guancha and La Tahonilla subjected to a recent drying treatment and mechanical grinding showed better yields of essential oil compared to the fresh and chopped treatment. The last one showed similar yields in both locations and in general, lower than with the previous treatment. On the other hand, it is believed that working with recently collected plant material can improve the yields obtained from the essential oil of *Ruta chalepensis* L.
- The literature consulted on the composition of *Artemisia thuscula* Cav. oil shows that the volatiles present, especially terpenes, vary greatly depending mainly on the place of collection. This confirms the enormous variability and heterogeneity of essential oils.
- Throughout the development of this work, the repellent activity of the essential oils of *Artemisia thuscula* Cav. and *Ruta chalepensis* L. has been discussed. This shows that the antifeedant activity assay that was carried out is not designed to evaluate the activity of the essential oils of the species studied. For this purpose, the assay must be adapted to the characteristics of an essential oil.
- The *push* and *pull* strategy is a project that aims to find a solution to combat and control the pest *Tecia solanivora*. If good results are obtained, this system, which is part of integrated pest management, can be adapted to the control of other insects, constituting a sustainable and versatile alternative in crop protection.

Essential oils are a sustainable alternative to the use of conventional pesticides which, combined with other natural products or even with phytosanitary products, are very effective in the control of agricultural crop pests. Despite this, their knowledge and use in agriculture is limited. For this reason, research in this field should be promoted and the essential oil-insect interaction should be known in order to achieve a better use and exploitation of these products in the protection and safety of crops.



Bibliografía

- Abad, M. J., Bedoya, L. M., Apaza, L. y Bermejo, P. (2012). The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules*, 17(3), 2542-2566. <https://doi.org/10.3390/molecules17032542>
- Agaetespacioweb Videos. (12 de abril de 2021). *Plantas que curan plantas - Cesar Augusto Díaz Ojeda - Ingeniero Técnico Agrícola* [Archivo de vídeo]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=z8q1b5HFvNo>
- Baj, T., Sieniawska, E., Kowalski, R., Wesolowski, M. y Ulewicz-Magulska, B. (2015). Effectiveness of the deryng and clewenger-type apparatus in isolation of various types of components of essential oil from the *Mutelina purpurea* Thell. flowers. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 72(3), 507-515.
- Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias (2021). *Artemisia thuscula* Cav. Recuperado el 4 de junio de 2021 de <https://www.biodiversidadcanarias.es/biota/especie/F01428>
- Bellomaria, B., Valentini, G. y Biondi, E. (1993). Essential Oil Composition of *Artemisia thuscula* Cav. from the Canary Islands. *Journal of Essential Oil Research*, 5(4), 391-396. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.1993.9698248>
- Bruce, T. J. A. (2010). Tackling the threat to food security caused by crop pests in the new millennium. *Food Security*, 2, 133-141. <https://doi.org/10.1007/s12571-010-0061-8>
- Bruce, T. J. A. (2015). Interplay between insects and plants: dynamic and complex interactions that have coevolved over millions of years but act in milliseconds. *Journal of Experimental Botany*, 66(2), 455-465. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru391>
- Cervera del Mármol, M. (2016). *Aceites esenciales en el género "Rosmarinus L." de la Península Ibérica* [Memoria para optar al grado de Doctor, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/36388/>
- Chandler, D., Bailey, A. S., Tatchell, G. M., Davidson, G., Greaves, J. y Grant, W. P. (2011). The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 366, 1987-1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>
- Coimbra, A. T., Ferreira, S. y Duarte, A. P. (2020). Genus *Ruta*: A natural source of high value products with biological and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 113076. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113076>
- Cook, S. M., Khan, Z. R. y Pickett, J. A. (2007). The use of push-pull strategies in integrated pest management. *The Annual Review of Entomology*, 52, 375-400. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091407>
- Copping, L. G. y Menn, J. J. (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56(8), 651-676.
- Escoubas, P., Lajide, L. y Mizutani, J. (1993). An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 66(2), 99-107. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb00697.x>
- FAO. 2019. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos*. Roma. <https://doi.org/10.4060/CA6030ES>
- Fontenla Razzetto, G. (2006). *Caracterización del aceite esencial de "Lanche" (Myrcianthes rhopaloides (H.B.K) Me Vaugh) proveniente del distrito de Chalaco, provincia de Morropón- Piura, obtenido por dos métodos de destilación* [Tesis para optar al título de Ingeniero Forestal, Universidad Nacional Agraria La Molina]. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/430>
- Gheorghe, I., Popa, M., Marutescu, L., Saviuc, C., Lazar, V. y Chifiriuc, M. C. (2017). Lessons from inter-regn communication for the development of novel, ecofriendly pesticides. En A. M. Grumezescu (Ed.), *New Pesticides and Soil Sensors* (pp. 1-45). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00002-3>
- Gil González, M. L. (12 de enero de 2020). *Ruta chalepensis* L. Flora Vasculare de Canarias. Recuperado el 4 de junio de 2021 de http://www.floradecanarias.com/ruta_chalepensis.html
- González-Coloma, A., Escoubas, P., Reina, M. y Mizutani, J. (1994). Antifeedant and Insecticidal Activity of Endemic Canary Lauraceae. *Applied Entomology and Zoology*, 29(2), 292-296. <https://doi.org/10.1303/aez.29.292>
- González-Coloma, A., Terrero, D., Perales, A., Escoubas, P. y Fraga, B. M. (1996). Insect Antifeedant Ryanodane Diterpenes from *Persea indica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 296-300. <https://doi.org/10.1021/jf9500593>
- Guidobaldi, F. y Guerenstein, P. (2012). El Sistema Olfativo de los Insectos. En J. C. Rojas y E. A. Malo (Eds.), *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos* (pp. 46-71). El Colegio de la Frontera Sur. <https://www.researchgate.net/publication/261731850>
- Günaydin, K. y Savci, S. (2005). Phytochemical studies on *Ruta chalepensis* (LAM.) lamarck. *Natural Product Research*, 19(3), 203-210. <https://doi.org/10.1080/14786410310001630546>

BIBLIOGRAFÍA

- Gupta, S. y Dikshit, A. K. (2010). Biopesticides: An eco-friendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides*, 3, 186-188.
- Huang, X., Chen, S., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, X., Bi, Z. y Yuan, H. (2019). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oils from Three *Artemisia* Species Against *Alternaria solani*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(6), 1581-1592. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1708812>
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603-608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Isman, M. B. (2020). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Reviews*, 19, 235-241. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>
- Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J. y Stankiewicz, M. (2018). Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system-A review. *Molecules*, 23, 34. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23010034>
- Jha, S., Tripathi, S. K., Singh, R., Dikshit, A. y Pandey, A. (2020). Global Scenario of Natural Products for Sustainable Agriculture. En J. Singh y A. N. Yadav. (Eds.), *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture* (pp. 291-307). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1_14
- Jones, O. (2008). *Semioquímicos en el manejo de plagas: ¿qué se ha conseguido durante los últimos 20 años y cuál es el futuro?*. Phytoma. Recuperado el 28 de mayo de 2021 de <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/198-abril-2008/semioquimicos-en-el-manejo-de-plagas-que-se-ha-conseguido-durante-los-ultimos-20-anos-y-cual-es-el-futuro>
- Juanillo (2021). *Incienso o ajeno morisco, Artemisia thuscula*. Atlas Rural de Gran Canaria. Recuperado el 2 de junio de 2021 de https://www.atlasruraldegrancanaria.com/fichas_int.php?n=323
- Kuniyoshi Virrueta, C. H. (2002). *Evaluación del uso de feromonas para el control y monitoreo de Spodoptera frugiperda y Helicoverpa zea en maíz dulce* [Proyecto especial para optar al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado Académico de Licenciatura, Universidad de Zamorano]. <http://hdl.handle.net/11036/2186>
- Lamichhane, J. R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P. y Messèan, A. (2016). Toward a Reduced Reliance on Conventional Pesticides in European Agriculture. *Plant Disease*, 100(1), 10-24. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0574-FE>
- López, E. P. (2012). Plaguicidas botánicos: Una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, 16(1), 51-59. <https://www.researchgate.net/publication/284284409>
- Marrero Domínguez, A. (2012). Agricultura canaria: situación actual y perspectivas. En Universidad de La Laguna (Ed.), *Semillas y letras: historia de la agricultura en Tenerife a través de los documentos escritos: exposición bibliográfica y documental* (pp. 133-146). Servicios de publicaciones, Universidad de La Laguna.
- Marutescu, L., Popa, M., Saviuc, C., Lazar, V. y Chifiriuc, M. C. (2017). Botanical pesticides with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity. En A. M. Grumezescu (Ed.), *New Pesticides and Soil Sensors* (pp. 311-335). Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-804299-1.00009-6>
- Mesa Morillo, D. (2021). *Molecular Phylogeny of Artemisia thuscula* [TFM de biomedicina, Universidad de La Laguna]. <http://riull.ull.es/xmlui/handle/915/23404>
- Midega, C. A., Pittchar, J. O., Pickett, J. A., Hailu, G. W. y Khan, Z. R. (2018). A climate-adapted push-pull system effectively controls fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), in maize in East Africa. *Crop protection*, 105, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.003>
- Mishra, P., Tripathi, A., Dikshit, A. y Pandey, A. (2020). Insecticides Derived from Natural Products: Diversity and Potential Applications. En J. Singh y A. N. Yadav. (Eds.), *Natural Bioactive Products in Sustainable Agriculture* (pp. 83-99). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3024-1_6
- Najem, M., Bammou, M., Bachiri, L., Bouiamrine, E. H., Ibjibjen J. y Nassiri, L. (2020). *Ruta chalepensis* L. Essential Oil Has a Biological Potential for a Natural Fight against the Pest of Stored Foodstuffs: *Tribolium castaneum* Herbst. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/5739786>
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R. y Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8 (3b), 17-29. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125177003>
- Nawaz, M., Mabubu, J. I. y Hua, H. (2016). Current status and advancement of biopesticides: microbial and botanical pesticides. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(2), 241-246.
- Pascual-Villalobos, M. J., Cantó-Tejero, M., Vallejo, R., Guirao, P., Rodríguez-Rojo, S. y Cocero, M. J. (2017). Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. *Industrial Crops & Products*, 110, 45-57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.019>

BIBLIOGRAFÍA

- Pegoraro, C. (2019). *Estudio Fitoquímico de Endemismos Canarios. Valorización de Compuestos Naturales, Artemisia thuscula: estudio fitoquímico y actividad antibacteriana* [TFG de farmacia, Universidad de La Laguna]. <http://hdl.handle.net/915/15980>
- Pollet, A., Barragán, A., Lagnaoui, A., Prado, M., Onore, G., Aveiga, I., Lery, X. y Zeddani, J. L. (2003). Predicción de daños de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: *Gelechiidae*) en el Ecuador. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 29, 233-242.
- Raveau, R., Fontaine, J. y Lounès-Hadj S., A. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Products against Plant Pathogens and Weeds: A Review. *Foods*, 9, 365. <http://dx.doi.org/10.3390/foods9030365>
- Regnault-Roger, C., Vincent, C. y Arnason, J. T. (2012). Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. *Annual Review of Entomology*, 57, 405-424. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120710-100554>
- Ringuelet, J. A., Ocampo, R., Henning, C., Padín, S., Urrutia, M. I. y Dal Bello, G. (2014). Actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown sobre *Tribolium castaneum* Herbst. en granos de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, 9(2), 214-222. <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/15442>
- Sachdev, S. y Singh, R. P. (2016). Current Challenges, Constraints and Future Strategies for Development of Successful Market for Biopesticides. *Climate Change and Environmental Sustainability*, 4(2), 129-136. <http://dx.doi.org/10.5958/2320-642X.2016.00014.4>
- San Miguel, E. (2021). In: Castroviejo, S. (coord. gen.). *Flora iberica* 9. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. Pp.: 129 – 134. Consulta en: <http://www.floraiberica.org/> [14.06.2021]
- Ujváry, I. (2010). Pest Control Agents from Natural Products. En R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 119-229). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00003-3>
- Vogt, R. G. (2003). Biochemical diversity of odor detection: OBPs, ODEs and SNMPs. En G. Blomquist y R. Vogt. (Eds.), *Insect pheromone biochemistry and molecular biology* (pp. 391-445). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012107151-6/50016-5>
- Wilson, C. L., Solar, J. M., El Ghaouth, A. y Wisniewski, M. E. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81(2), 204-210. <https://doi.org/10.1094/pdis.1997.81.2.204>
- Yoon, M., Cha, B. y Kim, J. (2013). Recent trends in studies on botanical fungicides in agriculture. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.RW.05.2012.0072>