



Tesis de Licenciatura en Ciencias Básicas, Orientación BIOLOGÍA

**Evaluación de la eficacia del nanoinsecticida “NSA”
para el control de *Tribolium castaneum*, insecto plaga
secundaria de granos almacenados.**

Tesinista: Melisa A. Suans

Director: Dr. Teodoro Stadler

Codirectora: Dra. Susana R. Valdez



Mendoza, Argentina

-2016-

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por darme la posibilidad de estudiar una carrera universitaria, por confiar en mí como futura profesional y por acompañarme durante toda mi vida. Y a mi abuela le agradezco por su gran ayuda incondicional en momentos de dificultad.

A mis grandes amigos y compañeros de la facultad, Cris, Chino y Naara. Gracias por todos los momentos que pasamos juntos, horas de estudio, clases, recreos y tantas alegrías compartidas que hicieron de esta etapa de mi vida un recuerdo maravilloso.

A mi facultad, y a todos sus miembros, por hacer de éste un lugar especial para mí. Gracias a mis profesores por la excelente enseñanza brindada. Y en particular agradezco a Miguel Sosa, Walter Berón, Néstor Ciocco, Marcela Michaut y Adriana Marvaldi por sus consejos en el plano tanto académico como personal que me permitieron orientarme para alcanzar mis objetivos. Y al SAPOE, gracias por las becas de capacitación pre-profesional que ampliaron mis conocimientos y experiencia y me ayudaron económicamente cuando más lo necesité.

A la SeCTyP, por beneficiarme con las becas de Promoción a la Investigación. Gracias a estas becas aprendí a hacer ciencia, porque solo aprendes cuando te involucras, como dice un buen proverbio chino.

Un especial agradecimiento a mi compañero de laboratorio, el Lic. Guillermo Pablo López García. Gracias Guille por tu amabilidad, por ser tan servicial y por la enseñanza desde aspectos prácticos hasta fundamentos teóricos y estadísticos. Fuiste un gran profesor y amigo en todo este tiempo de tesis. Y te agradezco a vos y a Esteban por haber hecho del laboratorio un lugar agradable para mí.

A mi director, el Dr. Teodoro Stadler. Le agradezco de corazón por permitirme trabajar con su equipo de investigación, haciendo mi tesis de grado sobre un tema apasionante para mí. Gracias por las excelentes correcciones a todos mis escritos, por sus sugerencias, enseñanzas y tan buena disposición en todo momento.

A mi codirectora, la Dra. Susana R. Valdez, quien fue también mi compañera y amiga. Mil gracias por todo el apoyo que me brindaste durante este trabajo de tesis, por tus consejos, y por haber estado siempre pendiente de mí para que pueda hacer las cosas correctamente.

A Mayra Sottile, becaria de IMBECU, por su generosidad al prestarme material necesario para hacer parte de mis ensayos.

Al Ing. Mariano Agustín Bernardo de la empresa Nidera S.A., por proveer las semillas de trigo con identificación varietal, para los bioensayos.

Al Laboratorio de Toxicología Ambiental, al IMBECU-CONICET, y a sus autoridades y personal correspondiente, por brindarme el espacio, materiales y equipos para llevar a cabo mi trabajo de tesis.

A todos, muchas gracias.

Melisa A. Suans

PRÓLOGO

Los Nanoinsecticidas son una tecnología nueva y a la vez innovadora, de menor riesgo, con un alto potencial para optimizar el control de plagas en el agro, la industria y en programas para la protección de la salud humana y animal; poseen además la versatilidad necesaria para el diseño de nuevas aplicaciones específicas.

Los resultados promisorios obtenidos a partir de 2010 con la nanoalúmina, impulsaron al grupo de trabajo del Laboratorio de Toxicología Ambiental (IMBECU, CONICET CCT-Mendoza) a intensificar y refinar las investigaciones, especialmente en cuanto a su espectro de acción y mecanismo insecticida. Por otra parte, las mejoras en el proceso de síntesis y caracterización de la nanoalúmina fueron realizados en colaboración con el Departamento de Ingeniería Mecánica e Industrial en Montana EEUU (Montana State University – Bozeman USA).

Tal como sucede con cualquier producto nuevo, este Nanoinsecticida a base de alúmina nanoestructurada requiere una evaluación intensiva y extensiva con la finalidad de identificar el proceso de síntesis más eficiente y las especies plaga a las que logra controlar eficazmente, la dosis, el tipo de formulación y la información toxicológica y ecotoxicológica indispensable para su presentación ante las autoridades reguladoras. Parte de estos estudios se encuentran en desarrollo actualmente, siendo el presente trabajo de tesis una contribución a este proyecto general, a través del aporte de información parcial acerca de su eficacia para el control de una especie de insecto plaga sobre la cual el producto no había sido evaluado hasta el momento. El presente trabajo trata específicamente sobre toxicología de insectos aplicada a una especie plaga, mientras que la información sobre la caracterización físico-química del producto, propiedades, mecanismo de acción y toxicología fueron obtenidos de la bibliografía disponible.

RESUMEN

Los insecticidas orgánicos de síntesis química han sido utilizados desde los años 50' para la protección de granos de cereal y productos almacenados. Sin embargo, debido a sus efectos perjudiciales sobre la salud humana y el ambiente, existe un interés global por la búsqueda de nuevos productos y métodos de control. Los polvos nanoinsecticidas son una alternativa interesante a los pesticidas convencionales por ser efectivos, de fácil síntesis, de baja toxicidad aguda en mamíferos, ambientalmente amigables y con reducidas posibilidades de generar resistencia. En el presente trabajo, se evaluó la actividad insecticida de la alúmina nanoestructurada (NSA) en adultos y larvas del escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae), plaga secundaria de los granos y productos almacenados, en forma comparativa con otros polvos inertes comerciales: Protect-It® y DiatomiD®, en condiciones de laboratorio. Los resultados obtenidos mostraron que la NSA posee actividad insecticida por exposición a sustrato tratado en poblaciones de adultos de *T. castaneum*, con una eficacia similar a la de Protect-It® y superior a DiatomiD®. En los bioensayos de toxicidad por exposición a alimento con larvas de *T. castaneum*, la NSA no afectó la supervivencia de las mismas, pero se observaron efectos sub-letales a largo plazo en el desarrollo post larval del insecto. Los resultados demuestran que la NSA es un producto eficaz para el control de adultos de *T. castaneum* y que la presencia de este nanoinsecticida en el grano almacenado también puede afectar la dinámica poblacional de esta especie plaga.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LOS INSECTOS PLAGA	1
1.1.1	El concepto de plaga	1
1.1.2	¿Por qué algunas especies de insecto son consideradas plaga?.....	1
1.1.3	El status de plaga de una especie de insecto.....	2
1.2	INSECTOS PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS	3
1.2.1	Almacenamiento y pérdidas: la magnitud del problema	3
1.2.2	Principales especies de insectos plaga de los granos almacenados	4
1.2.3	Clasificación de los daños ocasionados por los insectos de granos almacenados	5
1.2.4	Clasificación de los insectos plaga de granos y productos almacenados	6
1.3	<i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i> : EL ESCARABAJO ROJO DE LA HARINA	7
1.3.1	Ubicación sistemática.....	7
1.3.2	Distribución geográfica.....	7
1.3.3	Alimentación y daños.....	8
1.3.4	Ciclo de vida.....	8
1.3.5	Identificación.....	9
1.4	MÉTODOS DE CONTROL DE PLAGAS DE GRANOS ALMACENADOS	10
1.4.1	Control químico.....	10
1.4.2	Manejo Integrado de Plagas (MIP)	12
1.4.3	Control físico.....	12
1.4.4	Control biológico.....	13
1.4.5	Métodos bioracionales.....	14
1.5	POLVOS INSECTICIDAS	15
1.5.1	Historia y descripción.....	15
1.5.2	Tipos de polvos inertes.....	15
1.5.3	Mecanismo de acción insecticida de los polvos inertes	16
1.5.4	Principales factores que afectan la eficacia insecticida de los PI.....	18
1.6	NANOINSECTICIDAS: NUEVAS PERSPECTIVAS PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA	19
1.6.1	La nanotecnología en la agricultura, una ciencia de rápido avance	19
1.6.2	Alúmina nanoestructurada (NSA)	20
2	HIPÓTESIS	25
3	OBJETIVOS	25
4	MATERIALES Y MÉTODOS	26

4.1	Material biológico utilizado para los bioensayos	26
4.2	Insecticidas utilizados para los bioensayos	26
4.3	Bioensayos	27
4.3.1	Bioensayos de toxicidad por exposición en adultos de <i>T. castaneum</i>	27
4.3.2	Bioensayos de toxicidad por exposición en larvas de <i>T. castaneum</i>	28
4.4	Análisis de datos.....	28
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Evaluación de la actividad insecticida de la NSA en contraste con Protect- It ® y DiatomiD® en adultos <i>T. castaneum</i>	29
5.2	Cálculo de la concentración letal (CL50 y CL99) a través de ensayos de toxicidad por exposición en adultos de <i>T. castaneum</i>	32
5.3	Resultados de los ensayos de toxicidad de NSA y DiatomiD® en larvas de <i>T. castaneum</i>	33
6	DISCUSIÓN	35
7	CONCLUSIONES	38
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS INSECTOS PLAGA

1.1.1 El concepto de plaga

Un ecosistema es un sistema donde los organismos se encuentran en equilibrio dinámico con su ambiente natural. Cuando el hombre modifica este ambiente por medio de prácticas agrícolas, se alteran las cadenas tróficas y el ecosistema sufre un desequilibrio. En tal situación, los organismos suelen alterar su dieta y se vuelcan a los alimentos que indirectamente les ofrece el hombre como consecuencia de la colonización agropecuaria. Al aumentar la oferta de alimento, aumenta la cantidad de consumidores, y es entonces cuando se desencadena la competencia entre el hombre con estos organismos, que ahora adquieren el status de “plaga” (Lantery & Aragón, 1994).

La definición de plaga puede ser muy subjetiva variando de acuerdo a diferentes criterios. En el sentido más amplio, cualquier animal o planta que causa daños al hombre, sus animales, sus cultivos o posesiones, aún si sólo causa molestia, es considerado plaga (Hill, 2008). Sin embargo, no debe considerarse plaga a cualquier organismo que aumente su densidad de población o que ocasione algún daño, ya que las medidas para su control podrían generar mayores problemas, principalmente si se trata de especies nativas (Lantery & Aragón, 1994). Algunos insectos pueden ser considerados plaga en ciertos momentos, o benéficos en otros. Desde un punto de vista agrícola, una planta o animal fuera de contexto es una plaga (individualmente) aunque no pertenezca a una especie que haya sido declarada como tal. Aquí, lo relevante son los daños que una especie ocasiona a los cultivos, desde el punto de vista cuali- y cuantitativo y si estos sobrepasan el “umbral de daño económico” (Hill, 2008).

1.1.2 ¿Por qué algunas especies de insecto son consideradas plaga?

Los insectos constituyen el grupo animal más diverso e importante de la Tierra, incluyendo más de un millón de especies descritas y representando a más de la mitad de todos los organismos vivos conocidos. Son la principal forma de vida multicelular, con tamaños que varían desde diminutas avispas parásitas de alrededor de los 0,2 mm a insectos palo que miden 35 cm de longitud. La mayoría de los insectos son importantes para el hombre y el ambiente. Por ejemplo, varias especies de insectos son predadores o parasitoides de insectos plaga, otros son polinizadores, descomponedores de materia

orgánica o productores de productos valiosos como la miel o la seda. Algunos pueden ser usados para producir compuestos farmacológicamente activos, como venenos o anticuerpos. Menos del 0,5% del número total de especies conocidas de insectos son consideradas plaga, y solo unas pocas pueden ser una amenaza seria para la población humana (Sallam, 2008).

Los insectos adquieren el rol de plaga por diferentes razones (Gullan & Cranston, 2014):

- Luego de la introducción accidental o intencional de una especie en áreas geográficas nuevas fuera de su rango nativo, donde escapan de la influencia controladora de sus enemigos naturales.
- Se vuelven vectores de patógenos de plantas o animales (incluyendo al humano).
- Cambian de huésped, de plantas nativas a plantas introducidas cultivadas, común en insectos polívoros u oligóvoros.
- Los cultivos extensivos e intensivos representan una concentración de recursos que promueven la proliferación de insectos especialistas y algunos generalistas.
- La introducción de ciertas prácticas agrícolas como el cultivo continuo, sin un periodo de barbecho, aumentan la concentración de insectos plaga.

1.1.3 El status de plaga de una especie de insecto

El estado de plaga de una población de insectos depende tanto de la abundancia de individuos como del tipo de molestia o daño que el insecto ocasiona. Una *lesión* (o herida) es usualmente el efecto deletéreo provocado por las actividades del insecto (principalmente en alimentación) en la fisiología del huésped (Gullan & Cranston, 2014). Cuando la lesión es tan grave que, como consecuencia, induce una reducción de la cosecha potencial (aquella que se hubiera obtenido en ausencia de la plaga) en cantidad o calidad, la lesión se ha convertido en un “daño” (Kranz & Theunissen, 1994). La distinción entre lesión y daño es importante al momento de decidir las medidas de control de la plaga.

La densidad poblacional de una especie de insecto permite definir su status de plaga (Fig. 1). El *nivel de daño económico* (NDE) de una plaga es la densidad poblacional más baja que causa un daño económicamente significativo al cultivo, y por ende a la producción. Para establecer el NDE es necesario relacionar los valores de densidad

poblacional con las pérdidas porcentuales registradas en las cosechas o con valores de producción obtenidos. El *umbral de daño económico* (UDE) de una plaga es la densidad poblacional de la plaga a partir de la cual las medidas de control deben ser aplicadas para prevenir un aumento de la población hasta niveles de daño económico (Lanteri & Aragón, 1994). El UDE se expresa como el número de individuos por unidad de muestreo. Aunque el umbral económico se define en términos de densidad poblacional, representa el momento en el cual se deben tomar medidas de control. Determinar los niveles de daño y umbral de daño económico es uno de los primeros y más importantes pasos para aplicar un buen programa de control integrado de plagas.

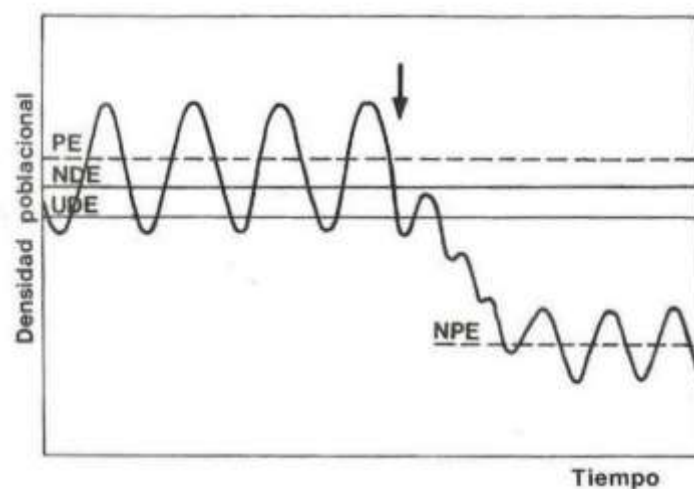


Fig. 1. Curva teórica de una población de insectos plaga de un cultivo, indicando: posición de equilibrio (PE), nivel de daño económico (NDE), umbral de daño económico (UDE), y una nueva posición de equilibrio (NPE). La flecha indica la aplicación de una medida de control. Adaptado de Lanteri & Aragón (1994).

1.2 INSECTOS PLAGA DE GRANOS ALMACENADOS

1.2.1 Almacenamiento y pérdidas: la magnitud del problema

El hambre y la desnutrición pueden existir a pesar de una producción adecuada de alimentos. Esto se da como resultado de una distribución desigual, de las pérdidas y del deterioro de los recursos disponibles de alimentos. Así, la utilización máxima de los alimentos y la minimización de las pérdidas post-cosecha son absolutamente esenciales (Chakraverty, 2001).

Las pérdidas de alimentos varían de acuerdo a: el tipo de cultivo, el año, la plaga, el periodo de almacenamiento, los métodos de trilla, secado, manejo, almacenamiento, procesamiento, transporte, distribución, y clima en el cual el alimento es producido y

consumido. En los países desarrollados más del 40 % de las pérdidas de alimentos se producen principalmente en la venta minorista y en el consumo, mientras que en los países en desarrollo esas pérdidas se producen en las etapas de post-cosecha y procesamiento (FAO, 2012). Para cada operación post-cosecha, hay posibilidad de pérdidas tanto en calidad como en cantidad. Si estas pérdidas pudiesen minimizarse, varios países del mundo se volverían autosuficientes en la producción de alimentos.

Se estima que las pérdidas totales post-cosecha de cereales, la fuente de alimentos más importante para las personas y el ganado, rondan entre el 5 y 20% (Chakraverty, 2001), siendo el almacenamiento la operación post-cosecha más significativa y crítica. Los granos de cereal cosechados son eventualmente almacenados por periodos de tiempo que dependen de la demanda del mercado, el tamaño de la producción y las necesidades del agricultor. Durante el almacenamiento, generalmente se produce un cambio en la calidad del grano debido al proceso respiratorio, lo que genera pérdidas de sustancias nutritivas. Combinado con las condiciones de almacenamiento inadecuadas, el deterioro ocurre más rápido llevando desarrollo de hongos e infestación por insectos, lo que se traduce en importantes daños y pérdidas económicas (Sallam, 2008). Para que el almacenamiento sea exitoso, en primer lugar, el grano debe estar entero, seco, sano y limpio. El daño ocasionado a los granos puede ocurrir durante las operaciones post-cosecha de trilla, secado y transporte. Cuando los granos se guardan sin alteraciones físicas y fisiológicas mantienen todos los sistemas propios de autodefensa y se conservan mejor durante el almacenamiento (Stefanazzi, 2010).

Los insectos constituyen las principales plagas de los cereales y de los productos almacenados, afectando su calidad, volumen y valor comercial. Se estima que entre el 5 y 10 por ciento de la producción mundial de granos de cereal se pierde a causa de los insectos, lo que equivale a la cantidad de granos necesaria para alimentar a 130 millones de personas anualmente (FAO, 1993). La magnitud del daño varía de región a región. En los países desarrollados, las pérdidas post-cosecha a causa de insectos de productos almacenados se estiman en un 9% y hasta un 20% o más en países en desarrollo (Phillips, 2010).

1.2.2 Principales especies de insectos plaga de los granos almacenados

Existen más de 100 especies de insectos que infestan los granos almacenados (Rajendran, 2001), siendo económicamente más importantes los insectos pertenecientes al orden Coleoptera (escarabajos), orden Lepidoptera (algunas polillas) y orden

Psocoptera (piojos de los libros) (Tabla 1). Varias especies de coleópteros y lepidópteros atacan los cultivos tanto en el campo como en los sistemas de almacenamiento. En el caso de las polillas, sólo las larvas son destructivas; los adultos no se alimentan y viven poco tiempo. Coleoptera es el orden más diverso de insectos y abarca las plagas de productos almacenados más comunes y relevantes, y tanto las larvas como los adultos son responsables del daño (Sallam, 2008).

Tabla 1: Principales insectos plagas de granos almacenados

Nombre común	Nombre científico	Cereal de preferencia
Escarabajos		
Gorgojo del arroz	<i>Sitophilus oryzae</i>	Trigo, arroz
Gorgojo del maíz	<i>S. zeamais</i>	Maíz
Gorgojo del granero	<i>S. granarius</i>	Trigo
Gorgojo Kaphra	<i>Trogoderma granarium</i>	Trigo, arroz
Pequeño barrenador	<i>Rhyzopertha dominica</i>	Trigo, arroz paddy
Barrenador mayor de los granos	<i>Prostephanus truncatus</i>	Maíz
Escarabajo rojo de la harina	<i>Tribolium castaneum</i>	Arroz
Escarabajo confuso de la harina	<i>T. confusum</i>	Arroz
Escarabajo de cabeza larga de la harina	<i>Latheticus oryzae</i>	Arroz
Escarabajo dentado de los granos	<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	Arroz
Escarabajo de los granos	<i>Crytolestes spp.</i>	Arroz
Polillas		
Polilla dorada del maíz	<i>Sitotroga cerealella</i>	Arroz paddy
Polilla de la almendra	<i>Ephestia cautella</i>	Trigo, arroz
Polilla del arroz	<i>Corcyra cephalonica</i>	Arroz
Polilla india de la harina	<i>Plodia interpunctella</i>	Trigo
Psócidos		
Piojo de los libros	<i>Booklice Liposcelis spp.</i>	Arroz

Adaptado de Rajendran, 2001. Handbook of Postharvest Technology.

En la Argentina, los insectos plaga de granos almacenados más importantes son: *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium castaneum*, *Tribolium confusum*, *Sitotroga cerealella*, *Tenebrio molitor* y *Oryzaephilus surinamensis* (Benzi, 2013).

1.2.3 Clasificación de los daños ocasionados por los insectos de granos almacenados

El daño que ocasionan los insectos a los granos y semillas almacenados puede ser: directo o indirecto.

- **Daño directo:** es causado por el consumo y contaminación del grano o producto almacenado. En algunas especies tanto la larva como el adulto ocasionan el

deterioro (cucújidos, curculiónidos y tenebriónidos), en otras sólo la larva se alimenta del producto almacenado (algunos brúquidos y derméstidos). El daño ocurre sobre el mismo grano, llevándolo a la pérdida de peso, reducción del poder germinativo, reducción del valor nutritivo, y la pérdida de humedad.

- **Daño indirecto:** los insectos plaga pueden deteriorar los granos almacenados hasta transformarlos en un producto no apto para el consumo humano y/o animal. Su presencia así como sus excretas, exuvias e individuos muertos hacen que el producto sea rechazado a nivel comercial, debido a que el material infestado por estas plagas adquiere un sabor y olor desagradables y su ingestión puede producir trastornos digestivos o alergias. Los insectos y ácaros atacan los granos dando inicio a un proceso de fermentación que genera calor en sitios localizados dentro de los silos. Esos focos de calor (hot spots) generan gradientes de humedad y temperatura en la masa de granos favoreciendo el desarrollo de hongos y finalmente, estas condiciones son favorables para el desarrollo de bacterias.

1.2.4 Clasificación de los insectos plaga de granos y productos almacenados

En base al tipo de alimentación y al daño ocasionado, los insectos de granos almacenados se clasifican en dos grupos: plagas primarias y plagas secundarias (Hill, 2003).

- **Plagas primarias:** tienen la capacidad de perforar la cubierta protectora de los granos enteros, alimentándose preferentemente de la región germinal de la semilla, y son por lo tanto responsables de las pérdidas en calidad y valor nutricional de granos de cereal, y la pérdida de la viabilidad (capacidad de germinación) de semillas. La larva del lepidóptero *Sitotroga* sp. pertenece a esta categoría, así como los adultos y larvas de *Sitophilus*, *Rhyzopertha*, *Trogoderma* y larvas de *Callosobruchus*. La larva, pupa y pre-adulto de estos coleópteros cumplen su ciclo vital dentro del grano.
- **Plagas secundarias:** sólo pueden alimentarse de granos y semillas dañados, donde la cubierta está agrietada, agujereada, desgastada o rota, ya sea por daño físico durante la cosecha o por un secado violento, o como consecuencia de los daños provocados por una plaga primaria. Algunas de estas especies se encuentran en los silos junto con plagas primarias como *Sitophilus* o *Sitotroga*. Sin embargo, las plagas secundarias aparecen masivamente en harinas y

productos procesados. Las plagas secundarias más comunes en granos y semillas incluye la larva de *Ephestia*, *Cadra*, *Plodia*, y larvas y adultos de *Oryzaephilus*, *Criptolestes*, *Tribolium* y otros tenebriónidos.

1.3 **TRIBOLIUM CASTANEUM: EL ESCARABAJO ROJO DE LA HARINA**

Tribolium castaneum (Herbst, 1797) es una plaga secundaria de cereales almacenados y productos alimenticios, de distribución cosmopolita que causa considerables pérdidas económicas. Posee la tasa de crecimiento poblacional más alta registrada entre las plagas de productos almacenados (Rees, 1996).

1.3.1 **Ubicación sistemática**

El escarabajo rojo de la harina pertenece la tribu Triboliini dentro de la familia Tenebrionidae, una de las más grandes del reino animal con más de 15.000 especies descritas. La tribu Triboliini comprende a dos géneros: *Palorous* y *Tribolium*, siendo *Tribolium* el género más estudiado por contener varias especies de importancia económica (Howard, 1987).

- Clasificación taxonómica

Phylum **Arthropoda**

Clase **Insecta**

Orden **Coleoptera**

Suborden **Polyphaga**

Serie **Cucujiformia**

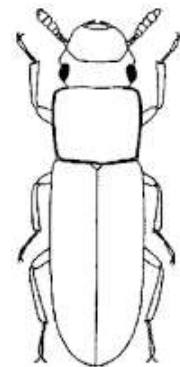
Superfamilia **Cucujoidea**

Familia **Tenebrionidae**

Tribu **Triboliini**

Género ***Tribolium***

Especie ***Tribolium castaneum*** Herbst 1797



1.3.2 **Distribución geográfica**

El género *Tribolium* incluye a 36 especies. Diez de ellas son plagas de productos agrícolas almacenados (Angelini, 2007), siendo *T. castaneum* y *T. confusum* las más importantes. Ambas especies, similares en estructura general y función, son cosmopolitas como consecuencia del comercio internacional de harinas y granos. *T. castaneum* se

encuentra más frecuentemente en áreas tropicales y cálido-templadas, mientras que *T. confusum* se distribuye ampliamente en zonas templadas (Rees, 1996). El probable origen geográfico de *Tribolium castaneum* es la India (Hill, 2003).

1.3.3 Alimentación y daños

Las larvas y adultos de *T. castaneum* muestran preferencia por la porción germinal de los granos para alimentarse, ya que sus piezas bucales no se encuentran adaptadas para fraccionar trozos grandes y duros de alimento. Su dieta abarca un amplio rango de productos: cereales, productos a base de cereal, nueces, especias, café, cacao, chocolate, bizcochos, frutos secos y a veces legumbres. Sin embargo, la harina y los productos molidos son los preferidos (Hill, 2003). El daño es causado tanto por las larvas como por los adultos.

1.3.4 Ciclo de vida

El escarabajo rojo de la harina es un holometábolo cuyo ciclo de vida comprende cuatro fases: huevo-larva-pupa-adulto (Fig. 2). El desarrollo puede completarse entre los



Fig. 2. Ciclo de vida de *T. castaneum*

19 y 20 días bajo condiciones óptimas de 35°C y 75% HR, pero también es posible entre los 20 y 40°C (Hill, 2003). Los adultos pueden vivir 6 meses o más (hasta 3 años) (Hill, 2003). Las hembras depositan entre 2 y 10 huevos diariamente a lo largo de su vida. La eclosión de los huevos requiere de 2-3 días. La humedad ambiente no afecta a los huevos. Las larvas atraviesan por 7 u 8 estadios (pudiendo ser entre 5-11) y después de los 13 días de desarrollo larval, pupan. La tasa de desarrollo larval depende de la humedad y la temperatura; el desarrollo es más rápido a la humedad más alta a cualquier temperatura, y a 35°C para cualquier humedad (Howe, 1956; White, 1987). El estado de pupa se completa en 4-5 días.

En condiciones óptimas, las poblaciones de *T. castaneum* pueden aumentar a una tasa de hasta 70 y 100 veces en un mes, más rápido que cualquier otra plaga de productos almacenados (Rees, 1996).

1.3.5 Identificación

La correcta identificación de las especies de insectos en los granos y productos almacenados es esencial para un control eficiente de la plaga y el manejo adecuado del grano.

Caracteres morfológicos de *T. castaneum*:

- **Adultos:** miden entre 3-4 mm de largo. De cuerpo achatado, elongado,



coloración marrón-rojiza, tienen el segundo par de alas desarrolladas y capacidad de vuelo. Poseen los últimos tres segmentos antenales de mayor tamaño que los anteriores, una de las diferencias con *T. confusum* el cual posee los segmentos antenales gradualmente

crecientes (Park, 1934). En una vista lateral de la región cefálica, se puede observar claramente una carena que divide el ojo en dos facetas. En vista ventral, la distancia entre ambos ojos es relativamente estrecha y puede observarse un proceso en forma de hacha entre el primer par de patas. Dorsalmente, el tórax presenta pequeños hoyos en la región central del pronoto (Stefanazzi, 2010).

- **Huevos:** pequeños, cilíndricos y blancos. Recién ovipuestos están cubiertos de una capa viscosa que les permite adherirse a las superficies
- **Larva:** típica de tenebriónido en apariencia. Amarillentas con la cabeza color marrón pálido.



- **Pupa:** de color blanco al comienzo de la fase, gradualmente se torna color amarillo y antes de emerger el adulto se torna de coloración castaño rojizo.



1.4 MÉTODOS DE CONTROL DE PLAGAS DE GRANOS ALMACENADOS

El control de insectos es esencial para el almacenamiento exitoso de granos y sub-productos del cereal. Los métodos de control pueden ser preventivos o curativos, físicos, químicos, biológicos o el control integrado. Las estrategias de control de plagas se deben enfocar principalmente en la combinación de técnicas que sean efectivas, económicas y que se acentúen en la prevención de la contaminación del producto alimenticio (Shadia & Aziz, 2011).

1.4.1 Control químico

El método más simple, rápido y económico para el control de insectos en los productos almacenados es el uso de insecticidas, frecuentemente en la forma de fumigantes (White & Leesch, 1996). Los fumigantes son sustancias volátiles (líquidos o polvos) que se vaporizan bajo condiciones ambientales, y los vapores o gases se distribuyen entre los granos de los almacenes o silos. Su efecto insecticida es el resultado de la toxicidad inhalatoria de estos productos, que ingresan al insecto a través de los espiráculos, alcanzando las tráqueas y traqueolas (Hill, 2003).

Actualmente, existen dos fumigantes principales utilizados para la protección de granos almacenados (Rajendran & Sriranjini, 2008): la fosfina y el bromuro de metilo, siendo la fosfina el fumigante más ampliamente utilizado en el mundo (Rajendran, 2001). El bromuro de metilo, un fumigante de amplio espectro, ha sido declarado como una sustancia destructora de la capa de ozono y, por lo tanto, su uso ha sido limitado completamente (Shadia & Aziz, 2011). Por otro lado, los insecticidas químicos de síntesis orgánica más empleados, que se adicionan directamente al grano en el momento del almacenamiento son: bioresmetrin, bromofos, carbaryl, clorpirifos-metil, diclorvos, fenitrothion, malation, pirimifos-methyl, piperonil butoxide y las piretrinas (White & Leesch, 1996). En Argentina, los más utilizados son los organofosforados como DDVP, mercaptotiothion, clorpirifos metil y pirimifos metil, los piretroides como deltametrina y el fumigante fosfina (Santa Juliana, 2013).

Todos los insecticidas usados en o cerca de alimentos almacenados deben cumplir con ciertos requisitos: matar rápidamente a la plaga sin dañar al hombre ni al ambiente, tener baja actividad residual, ser económico y fácil de manipular y preparar (White & Leesch, 1996). Sin embargo, la gran mayoría de insecticidas químicos convencionales no cumplen con todos estos requisitos, provocando daños colaterales a la salud del hombre, los animales y al ambiente.

Costos e impacto ambiental ocasionados por los insecticidas químicos tradicionales (Coscarón & Stock, 1994).

1. **Desarrollo de resistencia en las poblaciones de insectos plaga.** Desde el comienzo del uso de insecticidas de síntesis química (1950's), se ha observado que numerosas especies plaga se han vuelto insensibles a estos productos. Esto conduce a los productores a incrementar las dosis de aplicación, con el consecuente aumento de los costos de producción y la contaminación ambiental. Algunos estudios han mostrado que la resistencia a la fosfina es común en distintas especies de insectos plaga de los productos almacenados, en diferentes poblaciones y regiones del mundo (Chaudhry, 1997), en particular las especies *Rhyzopertha dominica* y *Tribolium castaneum* (Rajendran, 2001)
2. **Efecto de los insecticidas sobre las especies benéficas.**
3. **Resurgimiento de las plagas.** El uso de insecticidas de amplio espectro puede producir el resurgimiento de una plaga, alcanzando muchas veces niveles de densidad de población superiores que los previos al tratamiento. Esto ocurre porque las poblaciones de organismos benéficos, que controlan naturalmente a la plaga, son diezmadas por el insecticida y su recuperación es más lenta que la de las plagas.
4. **Surgimiento de nuevas plagas.** La destrucción de las poblaciones de enemigos naturales de las plagas a través de los insecticidas de amplio espectro puede dar como resultado que una especie inicialmente no perjudicial (plaga potencial) reemplace a la que motivó la aplicación. Este tipo de plaga resulta en algunos casos más destructiva y difícil de controlar que la plaga original.
5. **Concentración de residuos tóxicos a lo largo de la cadena alimentaria.** Los insecticidas liposolubles, por ejemplo los clorados, transitan a través de la cadena alimentaria sufriendo un proceso de bioacumulación, ya que son químicamente estables y el organismo los elimina muy lentamente.
6. **Impacto directo sobre la vida silvestre, los animales domésticos y las poblaciones humanas.** Los pesticidas pueden causar mortalidad de animales silvestres y domésticos que habitan áreas próximas a las parcelas de cultivo. Asimismo, pueden ocasionar serios trastornos para la salud humana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año, alrededor de 200.000 personas mueren a causa de envenenamiento con pesticidas, siendo este número mayor en países en vías de desarrollo (Benzi, 2013)

En vista a los problemas ocasionados por los insecticidas químicos actuales, existe un interés global en las estrategias alternativas que incluyan el desarrollo de sustitutos químicos con menor impacto para la salud y el medio ambiente.

1.4.2 Manejo Integrado de Plagas (MIP)

El MIP se desarrolló como resultado de las iniciativas tomadas para reducir la completa dependencia de los pesticidas sintéticos para el manejo de plagas. Se define a esta estrategia como “un sistema de manejo de plagas que en el contexto asociado y la dinámica poblacional de la especie plaga, utiliza técnicas apropiadas y métodos de la forma más compatible posible manteniendo la población de la plaga por debajo de los niveles que causan daño económico” (Dent, 2000). Esos métodos deben ser integrados a la producción agropecuaria de modo que la prioridad más alta sea la protección de la salud humana y del ambiente (Sholler *et al.*, 1997). El MIP propone el uso combinado de técnicas preventivas, biológicas, físicas, químicas, entre otras, de modo que mejoren el control del complejo de plagas que afecta a un cultivo o a productos almacenados. Diferentes técnicas podrían ser más efectivas que otras en determinado momento a lo largo del periodo de almacenamiento.

En el contexto bioracional del MIP, los insecticidas nuevos tendrán que cumplir con estándares completamente diferentes a los de los insecticidas tradicionales. Deben ser específicos para la plaga, no fitotóxicos, no tóxicos para mamíferos, amigables con el ambiente, menos propensos al desarrollo de resistencia, más económicos y localmente disponibles (Rajashekar *et al.*, 2012). Sin embargo, los insecticidas sintéticos de contacto y los fumigantes, en particular la fosfina, continuarán siendo herramientas importantes en los sistemas de productos almacenados (Phillips, 2010); en particular, en países en desarrollo donde las técnicas alternativas son caras, no están disponibles o no pueden ser adoptadas rápidamente (Chaudhry, 1997; Rajendran, 2001)

1.4.3 Control físico

Los insectos de productos almacenados han sido controlados a través de técnicas físicas desde hace ya miles de años, antes del uso intensivo y extensivo de químicos sintéticos y fumigantes (Banks & Fields, 1995). Sin embargo, debido a los problemas ocasionados por los pesticidas orgánicos de síntesis química se espera un resurgimiento de estas técnicas de control descritas en la literatura como “ancestrales”.

El control físico consiste en la manipulación del ambiente por medios físicos para hacerlo más hostil o inaccesible a los insectos plagas (Banks, 1976). Los métodos físicos

son: la higiene y exclusión (como medidas preventivas, mediante la limpieza y creación de barreras físicas a la entrada de insectos), el control de la temperatura (temperaturas altas o bajas fuera de los valores óptimos de desarrollo del insecto plaga, y la radiación infrarroja y microondas), las atmósferas controladas y modificadas (variación en la concentración de gases atmosféricos -O₂, CO₂, NO₂- desde valores tolerables a tóxicos), el control de la humedad relativa (inferior al 50% el insecto plaga no sobrevive), la desecación (por medio de polvos inertes y abrasivos, como la tierra de diatomeas), el impacto mecánico y la remoción física (movimiento de la masa de granos desde un compartimiento a otro y la posterior remoción del material roto), la radiación ionizante (radiación gamma y beta), la luz y el sonido, entre otros (Banks, 1976; Fields & Muir, 1995; Banks & Fields, 1995; Rajendran, 2001; Phillips & Throne, 2009; Shadia & Aziz, 2011)

1.4.4 Control biológico

Se denomina control biológico al empleo de parásitos, predadores y patógenos para mantener la densidad poblacional de las plagas a un nivel inferior al que se registraría en ausencia de ellos (Coscarón & Stock, 1994). Estos agentes son llamados enemigos naturales, presentes en el proceso de control natural de las plagas. En el ecosistema de los granos almacenados, los principales organismos que controlan a los insectos plaga incluyen a parasitoides pertenecientes al orden Himenoptera y predadores de los órdenes Hemiptera y Acari (Stefanazzi, 2010). El antocórico *Xylocoris flavipes* (Hemiptera: Anthocoridae) es un importante predador de *T. castaneum* (H.) (Aziz, 2007). En general, el control biológico actúa lentamente ya que solo uno o unos pocos estadios de desarrollo del insecto plaga son atacados (Scholler, 2010).

Por otro lado, agentes microbianos patógenos de insectos, altamente específicos, tales como los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), están disponibles comercialmente y son empleados para el control de insectos de granos almacenados. Bt ha mostrado ser efectivo para el control de *T. castaneum* (H.) (Moore *et al.*, 2000). Este método puede ser utilizado en conjunto con otros insecticidas, como la tierra de diatomeas que hace que el insecto resulte más susceptible al patógeno (Phillips, 2010). Sin embargo, la eficacia sigue siendo baja en comparación con los insecticidas convencionales.

1.4.5 Métodos bioracionales

Alternativas biológicas a los insecticidas químicos sintéticos para el control de granos almacenados, como componentes del MIP.

1. **Feromonas y otros semioquímicos:** las feromonas son compuestos químicos segregados por los insectos que actúan como señales químicas intra-específicas. En los últimos 40 años han sido identificadas diferentes feromonas para más de 40 especies de insectos de productos almacenados (Phillips, 2010). Existen distintos tipos de feromonas con diferente función (De los Mozos Pascual, 1997): Las feromonas sexuales liberadas por las hembras para atraer a los machos, como en algunos lepidópteros, y las feromonas de agregación, que son producidas por los machos y atraen a ambos sexos, como en el caso de algunos coleópteros de los granos almacenados. Estas feromonas están comercialmente disponibles para aproximadamente 20 especies de insectos plaga de productos almacenados (Phillips, 2010), entre ellos las más comúnmente utilizadas son de *P. interpunctella*, *Lasioderma serricorne*, *Tribolium castaneum* and *T. confusum* y *Trogoderma variabile*. Las feromonas sintéticas son utilizadas principalmente para el monitoreo de insectos en programas de manejo de plagas, permitiendo el seguimiento y el control.
2. **Insecticidas botánicos:** extractos de plantas con propiedades insecticidas que actúan como repelentes, deterrentes de la alimentación, tóxicos, protectores naturales de los granos, inhibidores de la reproducción e inhibidores del desarrollo y crecimiento de insectos (Rajashekar et al., 2012). El Pyrethrum es quizá el insecticida botánico más exitoso, en particular, para plagas de productos almacenados (Phillips, 2010).
3. **Reguladores de crecimiento de insectos:** Los reguladores de crecimiento (que se encuentran en la bibliografía internacional como “IGR”) son químicos que imitan a las hormonas reguladoras de la muda, provocando un desbalance hormonal en el insecto, interrumpiendo su normal desarrollo (Shadia & Aziz, 2007). Los IGRs más utilizados en productos almacenados son análogos de la hormona juvenil, como methoprene, hydroprene, y pyriproxyfen. La toxicidad de los IGR es baja para mamíferos y en general, representan una técnica efectiva para el control de plagas, aunque su costo es muy elevado.

4. **Cultivos resistentes:** Variedades de cultivos que expresan resistencia, con atributos físicos o bioquímicos que modifican las respuestas comportamentales o perjudican el desarrollo o supervivencia de la especie de insecto plaga (Throne *et al.*, 2000)

1.5 POLVOS INSECTICIDAS

1.5.1 Historia y descripción

Los polvos inertes (PI), también llamados polvos inorgánicos, incluyen a todos los polvos secos de orígenes diferentes que son químicamente no reactivos en la naturaleza (Subramanyam & Roesli, 2000). Estos polvos han sido utilizados tradicionalmente para la protección de granos almacenados. Las arcillas fueron usadas como insecticidas por pueblos aborígenes en América del Norte y África hace miles de años atrás (Fields & Muir, 1995). Sin embargo, sólo en las últimas décadas se ha intentado comercializar estos materiales para su uso en la tecnología moderna de protección de granos de cereal (Golob, 1997).

Los PI poseen un mecanismo de acción basado en fenómenos físicos en lugar de bioquímicos-toxicológicos como los que son propios de los insecticidas orgánicos de síntesis. Estos polvos exhiben características deseables como insecticidas, tales como: especificidad, baja toxicidad para el hombre y para los organismos benéficos, bajo costo y baja probabilidad de generar resistencia (Stadler *et al.*, 2010b).

1.5.2 Tipos de polvos inertes

Existen 4 tipos básicos de polvos inertes (Banks & Fields, 1995), los cuales pueden ser diferenciados por su composición química, su nivel de actividad, o el tamaño de la partícula:

- **Arcillas, arena y tierra.** Insecticidas tradicionales utilizados para la protección de granos almacenados. Este grupo incluye también al caolín, cenizas de cáscaras de arroz, cenizas de madera y cenizas volcánicas (Subramanyan & Roesli, 2000). Para que estos materiales tengan efecto, se requieren grandes cantidades, superior al 5% por peso (Golob, 1997).
- **Tierra de diatomeas (TD).** Son restos fósiles de diatomeas, algas microscópicas, unicelulares que poseen un esqueleto fino de sílice natural amorfa ($\text{SiO}_2+n\text{H}_2\text{O}$). Los esqueletos de diatomeas se han depositado en fondos de lagunas o mares hace millones de años atrás, y en algunos lugares

los depósitos pueden alcanzar los cientos de metros de espesor. Aunque el constituyente principal de estos depósitos es la sílice (dióxido de silicio- SiO_2) aproximadamente en un 90%, también existen pequeñas cantidades de otros minerales: aluminio, óxido de hierro, cal, magnesio y sodio (Banks & Fields, 1995). Existen varios polvos de TD registrados en todo el mundo. En Argentina, uno de los productos comercialmente disponibles es el DiatomiD® (98% tierra de diatomeas).

- **Sílices sintéticas.** Sílices producidas a través de síntesis química (por ejemplo, silicofosfatos) o geles de sílice formados por un 99.5% de sílice. Los geles de sílice son polvos finos con partículas menores de 3 micrones, con alta capacidad de absorción de líquidos y aceites, y por lo tanto son insecticidas más efectivos que la tierra de diatomeas. Los geles de sílice son utilizados actualmente en combinación con TD, siendo uno de los polvos más efectivos el Protect-It®, registrado en Estados Unidos y en otros países, donde se encuentra comercialmente disponible.
- **Polvos minerales sin sílice.** Este grupo incluye la dolomita, magnesita, oxiclورو de cobre, katelsous (fosfato de roca y azufre del suelo), cal (hidróxido de calcio), piedra caliza (carbonato de calcio), y la sal común (cloruro de sodio) (Subrammanyam & Roesli, 2000).

1.5.3 Mecanismo de acción insecticida de los polvos inertes

Para comprender el modo de acción de los polvos inertes, es necesario hacer referencia, en primer lugar, a las características de la cutícula de los insectos. El tegumento es la capa más externa del cuerpo de los insectos, y está formado por una sola capa de células ectodérmicas (epidermis), la cual está cubierta por la cutícula, una matriz extracelular apical quitinosa segregada por la epidermis (Chapman, 2013).

La cutícula se compone de tres capas distintas (Fig. 3): la *epicutícula*, la *exocutícula* y la *endocutícula*. La exo- y endocutícula son referidas como la procutícula. La epicutícula y la procutícula difieren en su composición. Mientras que la procutícula es una estructura quitinosa, la epicutícula no contiene cantidades significativas de quitina. La epicutícula, la parte más externa del tegumento con un espesor entre 1-4 μm , está compuesta primariamente por lípidos, proteínas y lipoproteínas.

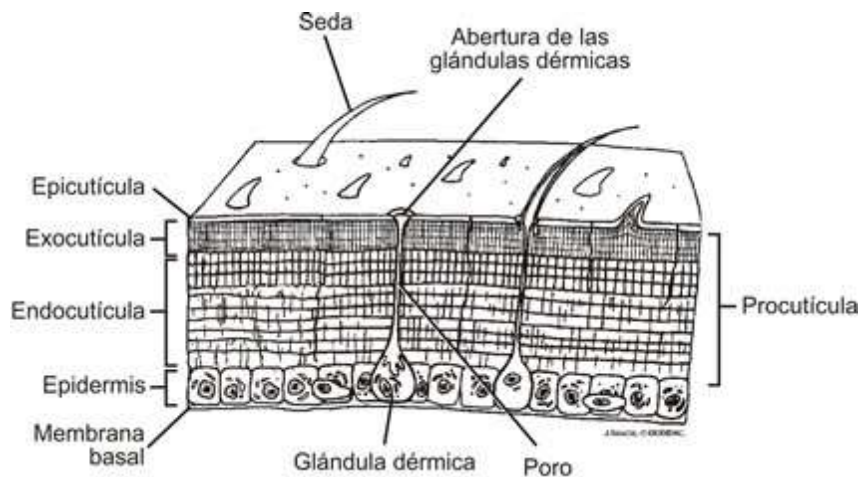


Fig. 3. Generalización esquemática de la estructura del tegumento de los insectos. Imagen extraída de: <http://www.asturnatura.com/articulos/artropodos/cargen.php>

Desde el punto de vista evolutivo, los artrópodos y en particular los insectos, han logrado independizarse del medio acuático a través de la impermeabilización. Los insectos secretan de modo continuo una capa lipídica epicuticular para evitar la pérdida de agua corporal por evaporación. La conservación de líquidos en los insectos se relaciona directamente con su superficie específica, de modo que los insectos más pequeños, con un área superficial mayor respecto a su volumen, resultan más susceptibles a la deshidratación. La composición de esta capa lipídica varía ampliamente entre los diferentes taxones, tanto cualitativa- como cuantitativamente, en función del ambiente y la forma de vida del insecto. El estrés ambiental, como las temperaturas altas o bajas, los insecticidas sintéticos o los polvos inertes pueden alterar los perfiles de hidrocarburos cuticulares, y el grado de alteración podría variar con la especie y el estado del ciclo de vida expuesto (Subramanyam & Roesli, 2000).

Se han propuesto diferentes teorías para explicar el mecanismo de acción de los polvos inertes en los insectos (Subramanyam & Roesli, 2000):

- 1) Los polvos inertes bloquean los espiráculos y los insectos mueren por asfixia.
- 2) Los polvos se alojan entre los segmentos corporales y aceleran la pérdida de agua por medio de la abrasión de la cutícula.
- 3) Los polvos absorben el agua desde la cutícula del insecto.
- 4) Los insectos mueren por intoxicación al ingerir las partículas de polvo.
- 5) Los polvos absorben los lípidos epicuticulares de los artrópodos llevándolos a la pérdida excesiva de agua a través de la cutícula.

Diferentes estudios se han llevado a cabo para comprender el mecanismo de acción correcto de los polvos inertes. La explicación más ampliamente aceptada es que

los PI actúan removiendo o absorbiendo los lípidos epicuticulares de los insectos causando la pérdida excesiva de agua a través de la cutícula, lo que lleva a la muerte del insecto por deshidratación (Stadler *et al.*, 2010b).

1.5.4 Principales factores que afectan la eficacia insecticida de los PI

Subramanyam & Roesli (2000) describen los factores más significativos que afectan la actividad de los polvos inertes, en particular de la TD.

1. **Propiedades físicas de los PI:** el tamaño, la densidad, superficie específica, dureza, forma y estructura de las partículas (amorfa, acicular, cilíndrica). El valor de la superficie específica del PI aumenta en función de la reducción del tamaño de la partícula. Las partículas ultra finas poseen mayor efecto insecticida que sus equivalentes de mayor tamaño e igual composición química, como consecuencia de la correlación directa entre la relación superficie/volumen por unidad de peso, y la energía de superficie de la partícula, de la que depende directamente su actividad biológica (Buteler *et al.*, 2011).
2. **Diferencias entre especies:** la eficacia de los PI está relacionada con características propias de cada especie de insecto plaga: la relación entre el área superficial y el volumen (los insectos más pequeños, son más susceptibles a los PI ya que tienden a perder humedad a una tasa más rápida); el espesor de la capa de cera cuticular (a mayor espesor, menor susceptibilidad del insecto al PI); la cantidad de pelos en el cuerpo (los insectos con más pelos son menos susceptibles, ya que el pelo evita que las partículas del PI entren en contacto con la cutícula del insecto); la capacidad de movimiento en los granos tratados (a mayor contacto del insecto con el insecticida, mayor susceptibilidad al producto) y la capacidad de obtener agua desde los granos. *R. dominica* y *T. castaneum* son las especies más tolerantes a los PI y en particular a la TD en comparación con otros insectos (Subramanyam & Roesli, 2000).
3. **Acceso a la comida:** los insectos alimentados son menos susceptibles que los ayunados.
4. **Retención de polvos de la masa de granos:** a mayor tasa de retención mayor eficacia.

5. **Temperatura del grano y humedad:** los PI son más efectivos a temperaturas más altas y con un contenido de humedad más bajo del grano. Sin embargo, para TD, *T. castaneum* es más susceptible a temperaturas más bajas.
6. **Humedad relativa:** por encima del 70% de HR, la actividad insecticida del polvo disminuye. *Esto sugiere que la muerte de los insectos por la acción de los PI se debe a la desecación.*
7. **Condición del grano:** mayor eficacia del PI en granos limpios que en granos rotos o en harina.

1.6 NANOINSECTICIDAS: NUEVAS PERSPECTIVAS PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA

1.6.1 La nanotecnología en la agricultura, una ciencia de rápido avance

La nanotecnología es una amplia área de investigación, desarrollo y actividad industrial que ha crecido rápidamente en la última década. Se trata de una ciencia enfocada en lo “ultra-pequeño” [desde 1 a 100 nanómetros (10^{-9} m)], una escala en la cual los materiales exhiben nuevas propiedades. Sobre la base del paradigma “lo mismo pero diferente”, los nanomateriales manufacturados difieren de las sustancias con idéntica estructura y composición química en propiedades como: reactividad, área específica, efectos cuánticos, carga eléctrica, etc. Estas nuevas propiedades surgen a partir de la reducción del tamaño de la partícula hacia el rango nanométrico, y se amplía así el espectro de aplicaciones del compuesto a diferentes productos industriales, agrícolas, electrónicos, vestimenta, pinturas, alimentos, cosméticos, medicamentos, entre otros (Stadler *et al.*, 2010b)

Los nanoplaguicidas, o nanoprodutos para la protección de cultivos, representan un desarrollo tecnológico reciente que, en relación al uso de los plaguicidas actuales, podrían ofrecer un rango de beneficios, entre ellos un aumento en la eficacia y en la residualidad del producto, y una reducción en las cantidades de ingredientes activos que se necesitan para ser utilizados (Kookana *et al.*, 2014). La nanotecnología aplicada a la agricultura dio lugar a la incorporación de productos formulados a partir de ingredientes orgánicos (polímeros) y/o ingredientes inorgánicos (metales, óxidos de metales y nanoarcillas) en diferentes formas (nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas) (Ragaei & Sabri, 2014). Las nanocápsulas o liposomas ya han sido incorporados en el desarrollo y formulación de agroquímicos, por ejemplo herbicidas nanoencapsulados con

polímeros que se liberan sólo cuando alcanzan la maleza, permitiendo la utilización de menores dosis de producto (Pérez de Luque & Rubiales, 2009). Por otro lado, nanopartículas de óxido de aluminio y de silicio, más amigables para el ambiente, han mostrado tener actividad insecticida contra principales insectos plagas de granos de cereal almacenados (Stadler *et al.*, 2010a, 2012; Debnath *et al.*, 2011).

Kah & Hofmann (2014) realizaron un análisis exhaustivo del estado científico actual en el que se encuentran los nanoplaguicidas, identificando y priorizando la necesidad de mayores investigaciones, entre ellas el mecanismo de acción asociado, la biodisponibilidad y durabilidad de los productos y la evaluación del impacto ambiental y en la salud humana de estos nanomateriales, de modo que pueda facilitarse el desarrollo de enfoques regulatorios, actualmente inexistentes.

1.6.2 Alúmina nanoestructurada (NSA)

1.6.2.1 Definición y caracterización

Descubierto recientemente (Stadler *et al.*, 2010a), la alúmina nanoestructurada (NSA) es un polvo insecticida caracterizado por partículas de óxido de aluminio (Al_2O_3) de 40-60 nm que forman grandes agregados de tamaño micrométrico (Fig. 4) con una superficie específica de 14 m²/g (Mimani & Patil, 2001; Toniolo *et al.*, 2005; Stadler *et al.*, 2012). El óxido de aluminio es una sustancia omnipresente en la naturaleza que, junto con el óxido de silicio, constituye uno de los principales ingredientes de las arcillas presentes en todos los suelos (Hurlbut & Klein, 1985). A diferencia de la alúmina natural, la NSA es el resultado de una síntesis química por combustión (Mimani & Patil, 2001; Toniolo *et al.*, 2005), cuyo producto final es un polvo homogéneo y de alto grado de pureza con características uniformes y propiedades físico-químicas específicas. Estas características son el resultado del proceso de fabricación y son el factor determinante de la actividad insecticida de la NSA (Stadler *et al.*, 2010a).

1.6.2.2 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la nanoalúmina aún no ha sido totalmente esclarecido. En principio, actúa sobre la base de la carga electrostática de las partículas, de los fenómenos de triboelectrificación propios del cuerpo de los insectos, y de la sorción de ceras cuticulares (Stadler *et al.*, 2010b). Los agregados de NSA están formados por nanopartículas cargadas positivamente y otras negativamente y en algunos casos son dipolos (Karasev *et al.*, 2004). Los insectos, por otro lado, poseen una carga eléctrica

netamente producida por el contacto con varias superficies o por fricción, fenómeno denominado triboelectrificación (Mc Gonigle *et al.*, 2002). Así, en aquellos insectos que exhiben cargas eléctricas, los agregados de NSA se adhieren firmemente a la superficie corporal (Fig. 5b; 6b) y las ceras cuticulares son “adsorbidas” - debido a la alta superficie específica ($14\text{m}^2/\text{g}$) de la NSA, y absorbidas en los aglomerados debido al fenómeno de capilaridad. De esta manera, la capa de cera que recubre al insecto se ve estructuralmente alterada, provocando la pérdida de agua corporal incontrolable e irreversible que lleva a la muerte del insecto por deshidratación (Cook *et al.*, 2008).

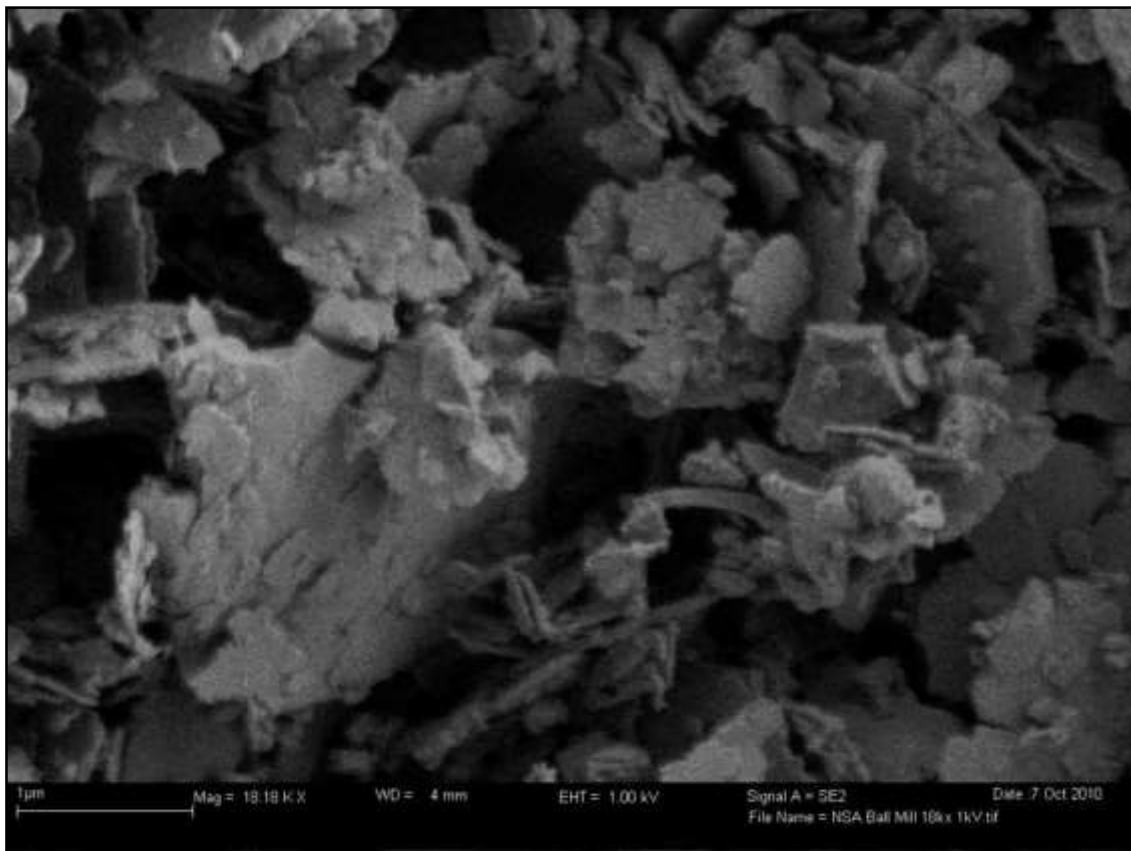


Fig. 4. Micrografía MEB de agregados de NSA. Alúmina nanoestructurada, a partir de nanopartículas de 40-60nm. (Stadler *et al.*, 2010b).

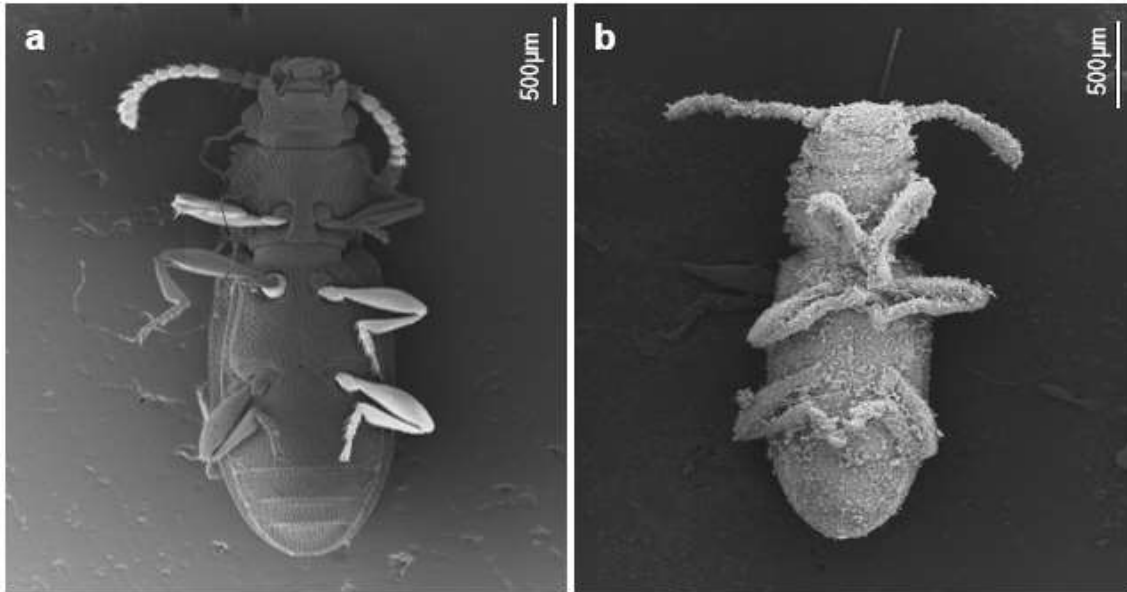


Fig. 5. Gorgojo del grano almacenado (*Oryzaephylus surinamensis*); a. Insecto expuesto a una superficie no tratada (CONTROL); b. Insecto expuesto a una superficie tratada con NSA. Se observan las partículas adheridas al cuerpo del insecto. (Micrografía MEB-Jeol 100X).

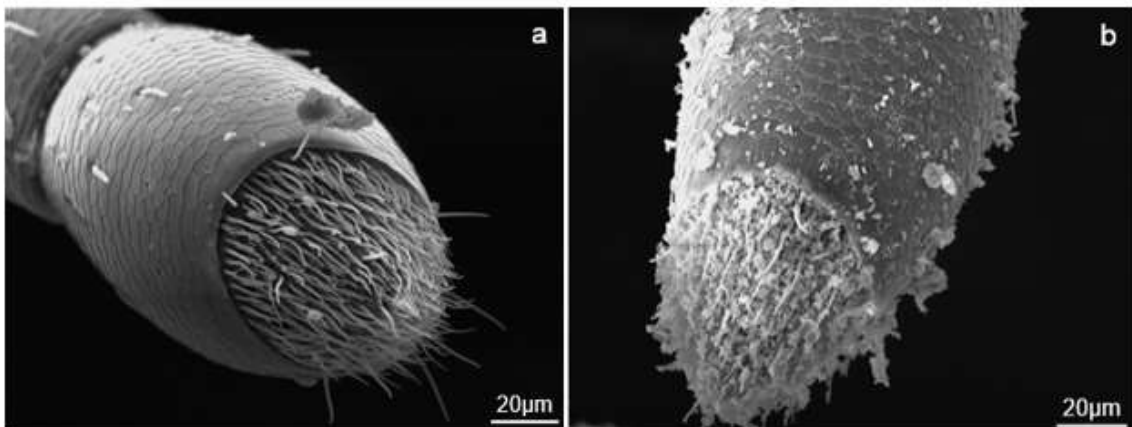


Fig.6. Antenito distal de *Sitophilus oryzae* (micrografía MEB 700x). a, Insecto sin tratamiento (control); b, Insecto tratado con NSA; p = partículas de NSA. (Stadler et al. 2010b).

1.6.2.3 Evaluación de la actividad insecticida de la NSA en diferentes insectos plagas de granos almacenados

En vista a la importancia de los insectos plagas en los granos y productos almacenados, y del uso de los PI como una alternativa de control efectiva y de baja toxicidad, la alúmina nanoestructurada ha sido evaluada por Stadler *et al.* (2012) en dos especies de insecto plaga primarias de los granos almacenados: el escarabajo del arroz, *Sitophilus oryzae* (L.), y al pequeño barrenador de los granos, *Rhyzopertha dominica* (F.), en forma comparativa con Protect-It®, uno de los PI más efectivos para el control de estas plagas. En estos ensayos, poblaciones de adultos de *S. oryzae* y *R. dominica* mantenidas en condiciones de laboratorio, fueron expuestas a granos de trigo tratados con NSA y

Protect-It® a diferentes concentraciones, intervalos de tiempo y humedad relativa del ambiente. Los resultados obtenidos mostraron una mortalidad superior en individuos de *S. oryzae* expuestos a NSA que aquellos que fueron expuestos a Protect-It®, mientras que en adultos de *R. dominica* ambos productos tuvieron similar efecto tóxico (Stadler *et al.*, 2012).

Actualmente, en el laboratorio de Toxicología Ambiental de IMBECU, se están llevando a cabo diferentes estudios con *S. oryzae*, tales como ensayos de toxicidad por ingestión de alimento tratado con NSA, ensayos de repelencia y ensayos para evaluación de efectos trans-generacionales, cuyos resultados sugieren que la NSA podría tener más de un mecanismo de acción debido a que se ha observado, por ejemplo, mortalidad en aquellos individuos expuestos a alimento tratado respecto al control. Además de los ensayos comparativos entre NSA y Protect-It®, también se está evaluando a la NSA comparativamente con DiatomiD®, un polvo insecticida comercial a nivel nacional, cuyos resultados han mostrado una menor eficacia de este producto respecto a NSA.

1.6.2.4 Evaluación de la toxicidad de la NSA en mamíferos

Los ensayos preliminares de toxicidad aguda y subcrónica en ratas realizados en el IMBECU no han mostrado diferencias significativas entre los animales tratados con NSA respecto al control (Stadler *et al.*, 2008). Para los estudios se utilizaron los protocolos toxicológicos internacionales OECD para la evaluación de medicamentos y cosméticos.

1.6.2.5 Importancia de la NSA para el control de plagas y perspectivas acerca de posibles desarrollos futuros

Los estudios desarrollados hasta el momento con la NSA, han mostrado que este insecticida es una alternativa promisoría para el control de plagas de insectos, por tratarse de un producto natural (*en cuanto a su composición química*), eficaz (*por la baja dosificación*), seguro para el hombre y el ambiente (*desde el punto de vista de su escasa reactividad química*), con reducidas probabilidades de provocar resistencia a corto o mediano plazo (*debido a su mecanismo de acción basado en fenómenos físicos y no bioquímicos*).

El descubrimiento reciente de los nanoinsecticidas está asociado con la demanda de la generación de conocimiento científico a través de evaluaciones experimentales exhaustivas acerca de su efecto sobre diferentes insectos perjudiciales para la agricultura, la ganadería, así como vectores de enfermedades humanas, que aún no han sido evaluados

intensivamente. Por ejemplo, insectos de granos almacenados: *Oryzaephilus surinamensi*, *Tribolium castaneum*, *Lasioderma sp*; insectos vectores (*Triatoma infestans*-vinchuca); hormigas cortadoras (*Acromyrmex sp.*) y el piojo humano (*Pediculus humanus*). Por estos motivos, el presente trabajo tiene como objetivo aportar nuevos conocimientos sobre la NSA, a través del estudio del efecto de este producto en insectos adultos y larvas de *Tribolium castaneum*, plaga secundaria de importancia económica internacional de granos y productos almacenados.

2 HIPÓTESIS

Hipótesis 1

La actividad insecticida de la alúmina nanoestructurada es mayor o igual que la de DiatomiD® y Protect-It®, en adultos de *Tribolium castaneum*, en ensayos de laboratorio por exposición a sustrato tratado.

Hipótesis 2

La actividad insecticida de la alúmina nanoestructurada es mayor que la de DiatomiD® en larvas de *Tribolium castaneum*, en ensayos de laboratorio por exposición a alimento tratado.

3 OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad insecticida de la alúmina nanoestructurada NSA en *Tribolium castaneum* en ensayos por exposición en adultos y larvas, con la finalidad de aportar información sobre la eficacia y el espectro de acción de este producto en una de las principales plagas secundarias del grano almacenado.

Objetivos específicos

1. Evaluar la toxicidad de la NSA en adultos de *T. castaneum* a través de bioensayos de exposición sobre sustrato tratado, en el marco de los protocolos internacionales (FAO, 1992), en forma comparativa con “tierra de diatomeas” (DiatomiD® y Protect-It®).
2. Evaluar la toxicidad de la NSA en larvas de *T. castaneum*, a través de bioensayos de exposición a alimento tratado, en el marco de los protocolos internacionales (FAO, 1992), en forma comparativa con “tierra de diatomeas” (DiatomiD®).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO UTILIZADO PARA LOS BIOENSAYOS

Se utilizaron larvas y adultos de *Tribolium castaneum* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae), plaga secundaria de granos almacenados, como modelo experimental. Los insectos fueron criados en condiciones de laboratorio en envases de vidrio con alimento, mezclado con aserrín para incrementar la ventilación y evitar la formación de hongos. Como alimento se utilizó harina de trigo (*Triticum aestivum*) 0000 con granulometría estimada en 300 a 500 μ , y maní sin tostar triturado. Los insectos fueron mantenidos en una cámara a 27° \pm 1°C y a 70% \pm 5% de HR en oscuridad, en el Laboratorio de Toxicología Ambiental, IMBECU CONICET CCT- Mendoza. Para los bioensayos se utilizaron adultos de edad y género no determinado y larvas de 2 mm de longitud.

4.2 INSECTICIDAS UTILIZADOS PARA LOS BIOENSAYOS

- **Alúmina nanoestructurada (NSA)**

La alúmina nanoestructurada (Al₂O₃) fue obtenida del Laboratorio de Toxicología Ambiental (IMBECU) donde fue sintetizada en colaboración con el Dto. de Ingeniería y Mecánica Industrial de Montana State University – Bozeman EEUU, por combustión glicina-nitrato utilizando una mezcla rédox, con glicina (NH₂CH₂COOH) como combustible y nitrato de aluminio [Al(NO₃)₃] como oxidante (Toniolo *et al.*, 2005, modificada; Mimani & Patil, 2001). La combustión glicina-nitrato da como producto aglomerados de nanopartículas de óxido de aluminio de 40-60nm, con una superficie específica de 14m²/g y una densidad del polvo de 0, 108g/cm³.

- **Protect-It®**

Obtenido desde Hedley Technologies Ltd. (Grand Junction CO, USA), consiste en una mezcla de tierra de diatomeas (TD) con un 10 % de silica aerogel (Korunic & Fields, 1998) cuya composición es: 87% de dióxido de silicio amorfo (SiO₂), 3% de óxido de aluminio (Al₂O₃), 1% de óxido férrico (Fe₂O₃), menos de 1% de CaO, MgO, TiO₂, P₂O₃, y de 3 a 6% de agua. La granulometría media es de 5,4 μ m y el rango de partículas entre 3 y 6 μ m con una densidad de 0,20g/cm³ (Korunic *et al.*, 1996).

- **DiatomiD®**

DiatomiD® es tierra de diatomeas natural obtenido de depósitos sedimentarios fosilizados de microalgas unicelulares (diatomeas) de San Juan, Argentina, el cual contiene más de 85% de SiO₂ amorfo; aproximadamente 4% Al₂O₃; 1% de Fe₂O₃; 1% de CaO y 2-4% de agua. El tamaño medio de las partículas es de 10 µm, y el rango de las partículas varía de 1 a 50 µm. La densidad es de 0,54g/cm³ (Bilbao *et al.*, 2007).

4.3 BIOENSAYOS

4.3.1 Bioensayos de toxicidad por exposición en adultos de *T. castaneum*

Los bioensayos fueron realizados en cajas de Petri de PVC de 9,5 cm de diámetro y constan de diez repeticiones de siete tratamientos y un control para cada producto evaluado. Se expusieron 20 individuos adultos de *T. castaneum* (Fig. 7) a 20g de trigo (NIDERA variedad Baguette 501) tratado con NSA, Protec-It® y DiatomiD® a concentraciones de: 500ppm, 700ppm, 1000ppm, 1500ppm, 2000ppm, 2500ppm y 3000ppm respectivamente, más una placa control con semillas sin tratar, según la metodología empleada por Stadler *et al.* (2010a). A cada placa se le agregaron 100 mg de harina como alimento, ya que las semillas de trigo cumplen la función de sustrato. Las condiciones de humedad y temperatura fueron las mismas utilizadas durante la cría (27° ± 1°C y a 70% ± 5% de HR). La mortalidad fue evaluada a los 7, 10 y 12 días del inicio del ensayo para NSA y Protec-It, mientras que para DiatomiD® las evaluaciones fueron realizadas los días 7, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35 y 40, dando por finalizado el ensayo el día 40 de exposición, cuando la mortalidad alcanza aproximadamente el 100% .



Fig. 7. Metodología empleada para bioensayo de toxicidad por exposición en adultos según protocolos internacionales (FAO, 1992). A cada tratamiento (control y tratado a distintas concentraciones de producto) se le adicionó 20 individuos adultos de *T. castaneum* por placa Petri.

4.3.2 Bioensayos de toxicidad por exposición en larvas de *T. castaneum*

Para los bioensayos se utilizaron 30 larvas de 2mm de longitud expuestas de forma individual en placas de cultivo de 24 pocillos (www.tpp.ch/page/produkte/09_zellkultur_testplatte.php) para evitar mortalidad por canibalismo. Como alimento se agregó harina de trigo 0000, tratada con NSA y DiatomiD®: 500ppm, 700ppm, 1000ppm, 1500ppm, 2000ppm y 2500ppm respectivamente, más un control con harina sin tratar. Las larvas fueron transferidas a los pocillos utilizando un pincel para evitar daños físicos. Los individuos fueron seleccionados por su largo corporal bajo el microscopio estereoscópico. Los bioensayos se desarrollaron a $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $70\% \pm 5\%$ de HR. Se observó la mortalidad de larvas cada 7 días, y se siguió el ensayo hasta que todos los individuos alcanzaron el estadio adulto en el control.

4.4 ANÁLISIS DE DATOS

Los datos obtenidos de los ensayos de toxicidad por exposición en adultos fueron analizados mediante análisis de varianza de doble vía seguidos por el test de Bonferroni para comparación de las medias. Para la comparación de medias de los resultados de todos los tratamientos para un solo producto se utilizó análisis de varianza de una vía, seguido por el test de Dunnett para múltiples comparaciones. Todos los datos fueron analizados con el programa de análisis estadístico GraphPadPrism versión 6.00 para Windows, www.graphpad.com. La mortalidad fue la variable respuesta y la concentración, producto, día de observación y su interacción los efectos principales. La mortalidad del control fue corregida utilizando la fórmula Abbott, www.ehabssoft.com/ldpline/onlinecontrol. Los cálculos de concentración letal (CL) (la concentración de producto requerida para matar una proporción determinada de insectos), los límites de confianza de 95%, los valores de la pendiente y el error fueron calculados usando el análisis Probit con el programa estadístico de Chou & Chou (1987).

Para el ensayo por exposición de larvas, se realizó análisis de la varianza ya que las variables fueron dos: el producto (NSA y DiatomiD®) y la concentración (de 500 a 2500ppm), seguido por el test de Bonferroni.

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar, ya que se pretendió conocer cuál fue la variabilidad de los valores individuales ($n=20$; $n=30$) respecto a la media. Los valores de $P<0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LA NSA EN CONTRASTE CON PROTECT-IT® Y DIATOMID® EN ADULTOS *T. CASTANEUM*

Todos los productos evaluados (NSA, DiatomiD® y Protect-It®) provocaron mortalidad de *T. castaneum*, aún en las concentraciones más bajas utilizadas. Sin embargo, la NSA y Protect-It® mostraron mayor eficacia respecto a la observada con DiatomiD®.

En los ensayos por exposición a NSA y Protect-It®, la mortalidad de *T. castaneum* aumentó en función de la concentración y del tiempo (Fig. 8). La interacción entre la concentración y el tipo de producto, y entre producto y tiempo de exposición fue significativa sobre los valores de mortalidad ($P < 0.05$). Ambos productos provocaron 100% de mortalidad en las concentraciones superiores (2500 y 3000 ppm) a los 7 días de exposición; en cambio, a menor concentración resultaron más evidentes las diferencias en la eficacia entre ambos insecticidas. A 500 ppm la NSA resultó más efectiva que Protect-It® ($P < 0.005$) luego de 7, 10 y 12 días de exposición (Fig. 8A, B y C; Fig. 9A), alcanzando valores de mortalidad de 20 a 35% superiores a Protect-It® (Fig. 8A), mientras que Protect-It® fue un 15 a 20% más efectivo que la NSA a 700ppm, luego de 10 días de exposición ($P = 0.01$) (Fig. 8B; Fig. 9B) y a 1500 ppm al día 7 (Fig. 9D).

Los resultados de los bioensayos con DiatomiD® también mostraron un incremento de la mortalidad de los insectos expuestos en función de la concentración y el tiempo de exposición (Fig. 8; Fig. 10). Sin embargo, en comparación con NSA y Protect-It®, DiatomiD® requirió de un tiempo de exposición más prolongado para alcanzar similares valores de mortalidad (Fig. 8; Fig. 10). Al séptimo día de exposición no hubo diferencias significativas en la mortalidad con las concentraciones entre 500 y 2500 ppm respecto al tratamiento control ($P > 0.05$) (Fig. 8A). La diferencia en la respuesta fue significativa a los 10 y 12 días para concentraciones superiores a 2000 ppm (Fig. 8B, 8C). Mientras que la NSA y Protect-It® produjeron un 50% de mortalidad al día 7 en las concentraciones más bajas, DiatomiD® mostró similar efecto al día 15 en las concentraciones más altas (Fig. 10). Al día 40, la mortalidad por exposición a DiatomiD® fue superior al 95% a la concentración mayor (3000 ppm) (Fig. 10).

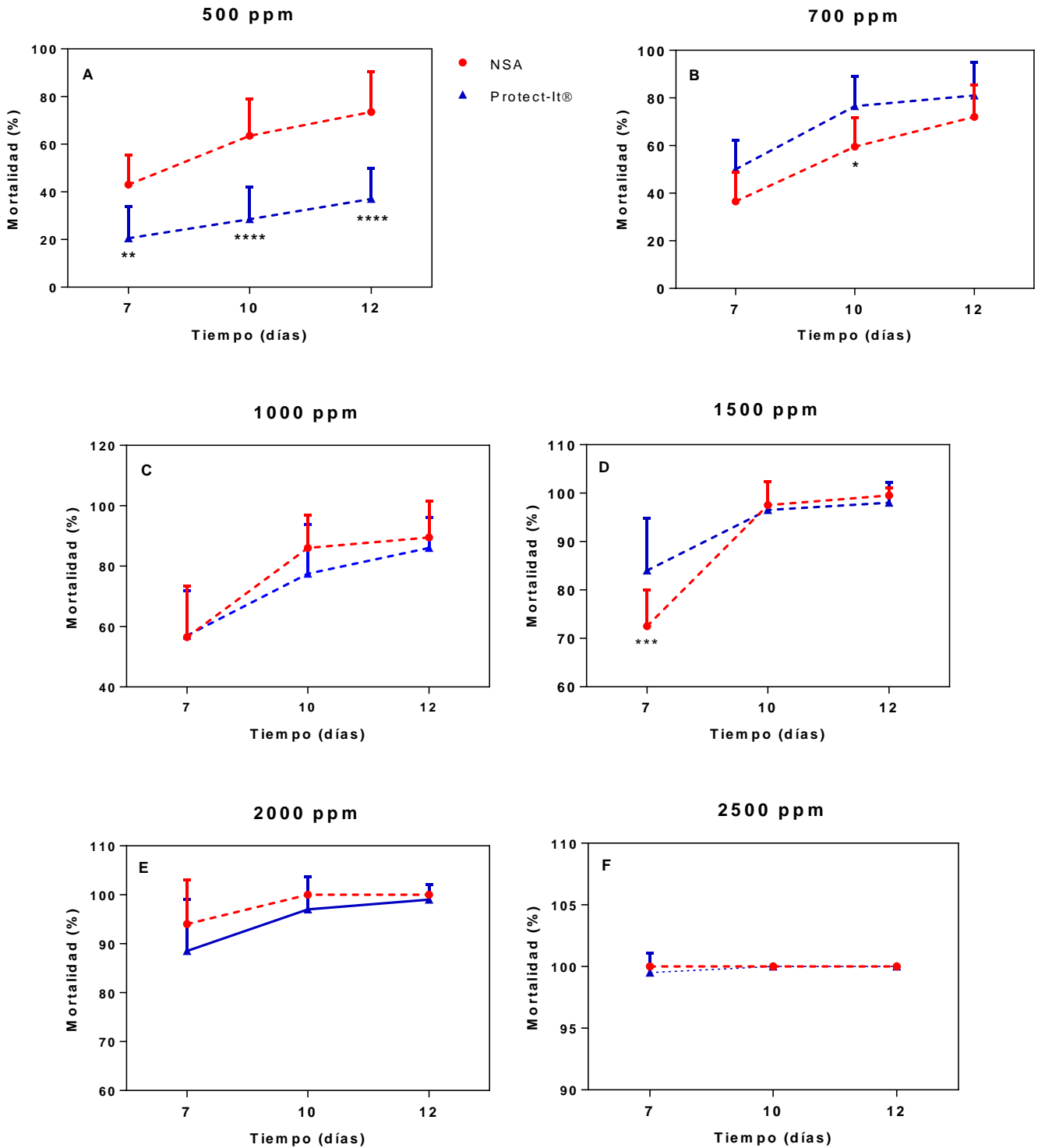


Fig. 9. Porcentaje de mortalidad de adultos de *T. castaneum* en función del tiempo de exposición, evaluada a las concentraciones de 500 ppm (A), 700 ppm (B), 1000 ppm (C), 1500 ppm (D), 2000 ppm (E) y 2500 ppm (F) para NSA (rojo) y Protect-It® (azul). Los valores en cada punto del día evaluado representan la media (n=20) y las barras verticales la desviación estándar. Los asteriscos indican la diferencia significativa entre las medias de ambos productos: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

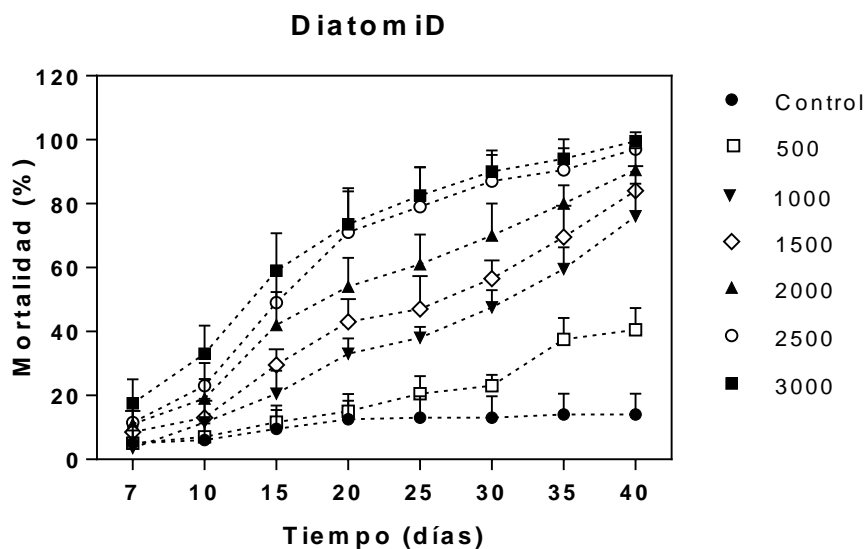


Fig. 10. Porcentaje de mortalidad de adultos de *T. castaneum* expuestos a DiatomiD® en función del tiempo. Los valores en cada punto representan la media ($n=20$) \pm desviación estándar (barras de error mostradas sólo por encima de cada valor de la media).

5.2 CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL (CL50 Y CL99) A TRAVÉS DE ENSAYOS DE TOXICIDAD POR EXPOSICIÓN EN ADULTOS DE *T. CASTANEUM*

Los resultados del análisis probit de los bioensayos de toxicidad con NSA y Protect-It® mostraron que la concentración necesaria para matar al 50% (CL50) y 99% (CL99) de la población de adultos de *T. castaneum* fue similar para ambos productos, tanto para el día 7 como para el día 12 de exposición (Tabla 2). Los valores de la pendiente fueron semejantes, lo que explica por qué a altas concentraciones no hubo diferencias significativas entre ambos productos. Por otro lado, los valores de la CL50 para DiatomiD® fueron similares a NSA y Protect-It® para un tiempo de exposición mucho mayor (40 días).

Tabla 2. Análisis Probit de los datos de mortalidad de individuos adultos de *T. castaneum*, expuestos a NSA, Protect-It® y DiatomiD®. CL50 y CL99: Concentración letal 50 y 99, respectivamente. CI: Intervalo de confianza.

Producto	Día de exposición	CL50 (CI) (ppm)	CL99 (ppm)	Pendiente	R
NSA	7	793.82 (779.69, 796.72)	2037.86	4.88	0.80
	12	556.29 (539.69, 559.04)	1189.51	6.05	0.95
Protect-It®	7	844.30 (829.72, 847.23)	2123.68	4.98	0.89
	12	642.49 (626.91, 645.30)	1470.77	5.55	0.95
DiatomiD®	40	716.44 (708.40, 719.29)	≥ 3000	2.81	0.95

5.3 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD DE NSA Y DIATOMID® EN LARVAS DE *T. CASTANEUM*

Los resultados de los ensayos en larvas por exposición a sustrato tratado con NSA y DiatomiD® respectivamente, no mostraron diferencias significativas en la mortalidad con respecto al control. Sin embargo, se observaron efectos sub-letales (en larvas) a largo plazo, ya que a concentraciones de 500, 1000, 2000 y 2500 ppm del 15 al 20% de las larvas expuestas a NSA no completaron su desarrollo ontogénico hasta el estadio adulto, a diferencia del control y del tratamiento con DiatomiD® (Tabla 3). El porcentaje total de adultos sobrevivientes al final del ensayo no varió con el incremento en las concentraciones ($P=0.79$) para ambos productos, pero el análisis de varianza mostró que hubo diferencias significativas ($P=0.01$) entre los productos (Fig. 11).

Tabla 3. Individuos sobrevivientes de la población inicial de larvas expuestas a NSA y DiatomiD® al día 80 de exposición

Producto	Tratamiento	Población inicial	Nro. de individuos vivos en cada estadio del desarrollo		
			Larvas	Pupas	Adultos
NSA	Control	N=30 larvas	0	2	26
	500 ppm		6	4	20
	700 ppm		0	2	24
	1000 ppm		6	2	18
	1500 ppm		2	2	22
	2000 ppm		5	2	21
	2500 ppm		4	0	23
DiatomiD®	Control	N=30 larvas	0	1	27
	500 ppm		0	1	28
	700 ppm		2	0	25
	1000 ppm		0	0	28
	1500 ppm		0	2	27
	2000 ppm		0	0	29
	2500 ppm		0	2	28

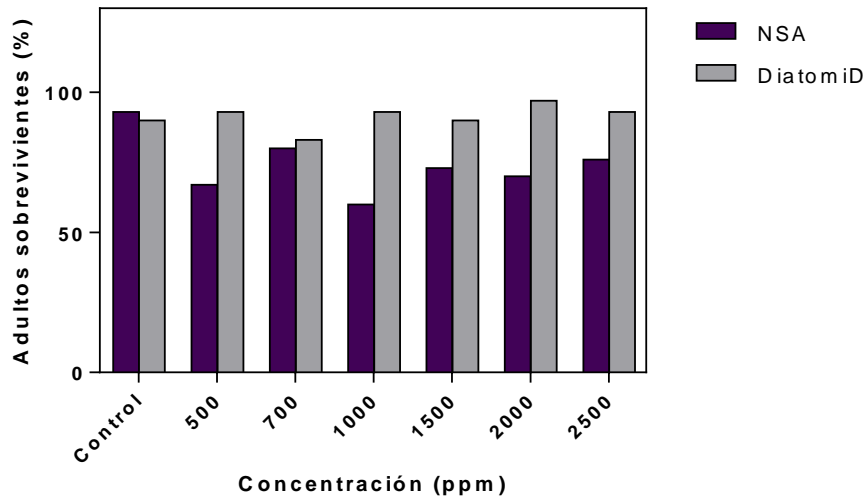


Fig. 11. Porcentaje de individuos que alcanzan el estadio adulto en cada concentración ensayada (una sola muestra con un n=30) al final del ensayo de exposición con larvas.

6 DISCUSIÓN

Los insecticidas orgánicos de síntesis química han sido utilizados desde los años 50' para la protección de granos y productos almacenados (Subramanyan & Hagstrum, 1995). A pesar de los reconocidos beneficios de estos productos para la agricultura, su empleo tiene consecuencias no deseadas, tales como su toxicidad para los mamíferos, los residuos en los alimentos y el incremento de poblaciones de insectos resistentes, que impacta negativamente sobre la eficacia del producto insecticida. Estas limitaciones, sumadas al avance de la agricultura orgánica, han dado un nuevo impulso a la evaluación y el uso de métodos alternativos de control, como insecticidas botánicos, reguladores de crecimiento, control biológico, y los polvos inorgánicos (Athanassiou *et al.*, 2005).

Los insecticidas a base de polvos inertes han experimentado sustanciales avances a partir del auge de la nanotecnología y el descubrimiento de la actividad insecticida de la nanoalúmina (Stadler *et al.*, 2010a) y la nanosílica (Debnath *et al.*, 2011). Debido a su descubrimiento relativamente reciente, la eficacia de los nanoinsecticidas para el control de diferentes especies plaga y sus posibles aplicaciones requieren de una evaluación experimental intensiva, a la cual contribuye el presente trabajo.

Los resultados obtenidos del presente trabajo mostraron que la alúmina nanoestructurada (NSA) posee actividad insecticida por exposición a sustrato tratado en poblaciones de adultos de *T. castaneum*, con una eficacia similar a la de Protect-It® y superior a DiatomiD®, en condiciones de laboratorio (Fig. 8). Por otra parte, tanto la NSA como DiatomiD® no afectaron la supervivencia de las larvas de *T. castaneum*, aunque se observaron efectos sub-letales de la NSA sobre el desarrollo post-larval del insecto hasta el estadio adulto (Tabla 3, Fig. 11).

En comparación con DiatomiD®, la NSA mostró mayor eficacia en el control de adultos de *T. castaneum*. Mientras que la NSA redujo el 100% de la población a una concentración de 2500ppm después de 7 días de exposición, DiatomiD® mostró el mismo nivel de control a los 40 días de exposición, a la misma concentración. Estos resultados responden, en principio, a las características de cada producto evaluado, y en especial al tamaño de las partículas, ya que el valor absoluto de superficie específica de una sustancia es inversamente proporcional al tamaño de las partículas que la componen y cuanto más pequeñas las partículas, mayor será la toxicidad de la sustancia (Buzea *et al.*, 2007) y por lo tanto, mayor será el efecto insecticida. Este principio justifica el efecto observado, ya que la NSA está compuesta por aglomerados de partículas de 40-60 nm (Stadler *et al.*,

2010b) y el DiatomiD® por partículas de 1 a 50 µm (Subramanyam & Roesli, 2000). Sin embargo, el efecto insecticida de los PI no radica únicamente en el tamaño de las partículas, ya que una combinación de sustancias (como lo es Protect-It®) puede incrementar la toxicidad del producto formulado más que su propia actividad de superficie.

Los resultados obtenidos con TD son coincidentes con los de otros autores y muestran que este PI es eficaz para el control de insectos plaga de granos almacenados a concentraciones altas y a tiempos de exposición prolongados (Korunic & Fields, 1998). Cabe destacar que el uso de altas concentraciones de TD afecta las propiedades físicas de la masa de granos y semillas, como su volumen y fluidez; deja residuos visibles dando al grano un aspecto “calcáreo”; provoca un mayor desgaste por abrasión en la maquinaria utilizada para el manejo del grano durante el almacenamiento; y el polvo disperso en el ambiente genera molestias a los trabajadores durante el tratamiento y movimiento de los granos (Korunic & Fields, 1998). Estos efectos adversos que se deben principalmente a las altas concentraciones de TD utilizadas para el control de plagas en el grano almacenado se observan en menor medida durante el empleo de Protect-It®, ya que se utiliza en concentraciones menores que la TD, hecho que posiciona a este producto como uno de los PI más efectivos del mercado.

De los resultados de los bioensayos se desprende que a concentraciones altas, la eficacia de la NSA es similar a la del Protect-It® para el control de adultos de *T. castaneum* (CL50 de NSA: 793.82 (779.69, 796.72) ppm, y CL50 de Protect-It®: 844.30 (829.72, 847.23) ppm) (Fig. 8). Sin embargo, los valores de mortalidad obtenidos a concentraciones bajas (500 ppm) fueron notablemente superiores en los ensayos con NSA en comparación con Protect-It® (Fig. 9A), en los tiempos de exposición evaluados. Este resultado señala una diferencia significativa en la eficacia de ambos productos, que se pone de manifiesto a concentraciones bajas.

El trabajo experimental con larvas de *T. castaneum* se redujo a un ensayo preliminar en el que se utilizó harina de trigo como sustrato, ya que es el principal medio en el cual las larvas se desarrollan naturalmente. De los resultados de los ensayos de laboratorio se desprende que la NSA y DiatomiD® no afectan la supervivencia de las larvas de *T. castaneum*. Sin embargo, a largo plazo, se observaron efectos sub-letales que afectan el desarrollo ontogenético del insecto (Tabla 3). A pesar de la ausencia de efectos agudos en las larvas, los efectos sub-letales durante la última etapa del desarrollo tendrían un relevante impacto sobre la dinámica poblacional de la plaga. Por otra parte, cabe

señalar que la ausencia de efectos agudos en larvas podría deberse a la metodología y a las condiciones de HR% y T°C utilizadas en el ensayo. La harina como sustrato y alimento podría ayudar a las larvas a remover las partículas del PI desde la cutícula, lo que evitaría que el producto insecticida entre en contacto con el insecto. De este modo, los efectos sub-letales observados en las larvas podrían ser causados por la ingestión del producto.

Los resultados obtenidos a partir de los bioensayos de toxicidad en larvas no son coincidentes con los de Shayesteh & Ziaee (2007), con tierra de diatomeas (SilicoSec). Los autores encontraron que este polvo insecticida afectó la supervivencia de las larvas de *T. castaneum* de los primeros estadios de desarrollo, expuestas a una humedad relativa inferior a la utilizada en este trabajo. Por otra parte, estos autores utilizaron granos de trigo quebrados como sustrato en lugar de harina de trigo. Resultaría entonces de interés reproducir los ensayos con larvas de *T. castaneum* utilizando diferentes sustratos.

Tribolium castaneum (H.) junto con *Rhyzopertha dominica* (F.), son las plagas de productos almacenados con el mayor número de casos de resistencia a insecticidas, en particular a la fosfina (Rajendran, 2001) y a la TD, (Fields & Muir, 1995; Subramanyam & Roesli, 2000). Stadler *et al.* (2012) demostraron que la NSA y Protect-It® afectan de forma similar a las poblaciones de adultos de *R. dominica*, coincidentemente con lo observado con *T. castaneum* a lo largo del presente trabajo. En comparación con *Sitophilus oryzae*, *R. dominica* y *T. castaneum* resultaron más tolerantes a la NSA, de acuerdo con los resultados de los ensayos realizados en condiciones similares y con el mismo tiempo de exposición. Como han demostrado otros autores (Korunic, 1994; Fields & Korunic, 2000; Arnaud *et al.*, 2005; Stadler *et al.*, 2012; Kabir, 2013) *R. dominica* y *T. castaneum* son en general las especies más tolerantes a los PI.

La eficacia de los PI puede verse afectada por varios factores, entre ellos, la humedad y temperatura durante la exposición de los insectos. A valores de humedad más bajos y temperaturas más altas los PI aumentan su actividad insecticida (Fields & Korunic, 2000; Stadler *et al.*, 2012). Así, la eficacia de la NSA para el control de *T. castaneum* podría alcanzar niveles más altos variando las condiciones de HR% y T°C dentro de los silos de acopio de grano. En el marco del Manejo Integrado de Plagas, los métodos de control combinatorios son los ideales, ya que permiten utilizar menores dosis de producto.

7 CONCLUSIONES

- A bajas concentraciones (500 ppm), la NSA resultó significativamente más eficaz que Protect-It® para el control de adultos de *T. castaneum*, en los días de exposición evaluados: 7, 10 y 12 (Fig. 9A).
- A la concentración de 700 ppm, Protect-It® fue significativamente más eficaz que la NSA en los días de exposición 7 y 10 (Fig. 9B).
- A concentraciones superiores a 700 ppm, la NSA y Protect-It® mostraron valores de toxicidad similares (Fig. 8C, D, E, F).
- DiatomiD® requirió tiempos de exposición más prolongados que la NSA y Protect-It®, para alcanzar similares valores de mortalidad en adultos de *T. castaneum* (Fig. 8, Fig 10).
- La NSA no afectó la supervivencia de las larvas de *T. castaneum*, pero se observaron alteraciones a largo plazo en el desarrollo del insecto al alcanzar el estadio adulto (Tabla 3).
- La NSA es un producto eficaz para el control de adultos del escarabajo rojo de la harina, *T. castaneum* y la presencia de NSA en el grano almacenado puede afectar la dinámica poblacional de esta especie plaga.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELINI, D. R. & JOCKUSCH, E. L. 2007. Relationships among pest flour beetles of the genus *Tribolium* (Tenebrionidae) inferred from multiple molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 46, 127–141
- ARNAUDA, L., THI LANB, H. T., BROSTAUXC, Y. & HAUBRUGEA, E. 2005. Efficacy of diatomaceous earth formulations admixed with grain against populations of *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research*, vol. 41, iss. 2, pp. 121-130
- ATHANASSIOU, C.G., KAVALLIERATOS, N.G., TSAGANOU, F.C., VAYIAS, B.J., DIMIZAS, C.B., BUCHELOS, C.TH. 2003. Effect of grain type on the insecticidal efficacy of SilicoSec against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Crop Protection* 22, 1141e1147.
- BANKS, H. J. & FIELDS, P. 1995. Physical methods for insect control in stored grain ecosystem. En Jayas, D. S., White, N. D. & Muir, W. E. *Stored grain ecosystem*. New York, pp. 353-409.
- BANKS, H. J. 1976. Physical control of insects-Recent developments. *Journal Austral Entomology Society*. 15, 89-100.
- BENZI, B. S. 2013. Productos de origen natural con bajo impacto ambiental como fuentes alternativas para el manejo integrado de plagas, aplicados al control de *Rhyzopertha dominica* (Insecta: Coleoptera). Tesis doctoral.
- BUTELER, M., STADLER, T., LÓPEZ GARCÍA, G. P., LASSA, M.S., TROMBOTTO LIAUDAT, D., D'ADAMO, P. & FERNANDEZ ARHEX, V. 2011. Propiedades insecticidas de la ceniza del complejo volcánico Puyehue-Cordon Caulle y su posible impacto ambiental. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*. 70 (3-4): 149-156.
- BUZEA, C., PACHECO, I. I. & ROBBIE, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* vol. 2, issue 4, pages MR17 - MR172 1
- CHACON, R. R. 2007. La alúmina como material aislante en la fusión termonuclear. Efecto de la incorporación de carbono en las propiedades físicas. Tesis Doctoral. Universidad Carlos III de Madrid, Departamento de Ciencia de los Materiales e Ingeniería Metalúrgica Instituto Álvaro Alonso Barba. 181pp.
- CHAKRAVERTY, A., MUJUMDAR, A. S., VIJAYA RAGHAVAN, G. S. & RAMASWAMY, H. S. 2001. *Handbook of Postharvest Technology*. New York. Marcel Dekker, Inc.
- CHAPMAN, R. F. 2013. *The insects: structure and function*. (5th edition). UK. Cambridge University Press
- CHAUDHRY, M. Q. 1997. Review A Review of the Mechanisms Involved in the Action of Phosphine as an Insecticide and Phosphine Resistance in Stored-Product Insects. *Pesticide Science*. 49(3):213 – 228
- CHOU, J. & CHOU, T. 1987. *Dose-Effect Analysis with Microcomputers*. Elsevier UK, 93pp
- COOK, D. A., M. E. WAKEFIELD & G. P. BRYNING. 2008. The physical action of three diatomaceous earths against the cuticle of the flour mite *Acarus siro* L. (Acari: Acaridae). *Pest Manag. Sci*. 64: 141-146.
- COSCARÓN, M. C. & STOCK, S.P. (1994) Enemigos naturales y control biológico. En LANTERI, A. A. Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa. De la Campana ediciones. La Plata, Argentina, pp. 57-72

- DE LOS MOZOS PASCUAL, M. 1997. Plagas de productos almacenados. Bol. S.E.A., 20:93-109.
- DEBNATH, N., DAS, S., SETH, D., CHANDRA, R., BHATTACHARYA, S. CH. & GOSWAMI, A. 2011. Entomotoxic effect of silica nanoparticles against *Sitophilus oryzae* (L). *Journal of pest science*. 84, 99-105.
- DENT, D. 2000. Insect Pest Management. CABI, 2nd edition. UK.
- FAO. 1992.- FAO plant protection paper 21. <http://www.fao.org/docrep/x5048e/x5048E00.htm#Contents>
- FAO. 1993. Prevención de pérdidas de alimentos post-cosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos. Manual de capacitación. Roma: Colección FAO, AGRIS
- FAO. 2012. Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. Roma.
- FIELDS, P. & KORUNIC, Z. 2000. The effect of grain moisture content and temperature on the efficacy of diatomaceous earths from different geographical locations against stored-product beetles. *Journal of Stored Products Research*. 36, 1-13
- FIELDS, P. G. & MUIR, W. E. 1995. Physical Control. En SUBRAMANYAM, B. & HAGSTRUM, D. W. Marcel Dekker, Inc. Integrated management of insects in stored products, pp. 195-221.
- GOLOB, P., 1997. Current status and future perspectives for inert dust for control of stored product insects. *Journal of Stored Products Research* 33, 69e79.
- GULLAN, P. J. & CRANSTON, P. S. 2014. The insects: an outline of entomology. Fifth edition. John Willey and Sons, Ltd. UK, pp. 418-455
- HILLS, D. S. 2003. Pests of Stored Foodstuffs and Their Control. Kluwer Academic Publishers. New York.
- HILLS, D. S. 2008. Pests of Crops in Warmer Climates and Their Control. Springer. UK.
- HOWARD, R. W. 1987. Chemosystematic studies of the Triboliini (Coleoptera: Tenebrionidae): Phylogenetic Inferences from the defensive chemicals of eight *Tribolium* spp., *Palorus ratzeburgi* (Wissmann), and *Latheticus oryzae* Waterhouse. *Annals of the Entomological Society of America*. 80(3):398-405.
- HOWE, R. W. 1956. THE EFFECT OF TEMPERATURE AND HUMIDITY ON THE RATE OF DEVELOPMENT AND MORTALITY OF *TRIBOLIUM CASTANEUM* (HERBST) (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE). *Annals of Applied Biology*. 44(2), 356-368.
- HURLBUT, C. S. & C. KLEIN. 1985. *Manual of Mineralogy*, 20th ed. John Wiley & Sons, New York. J. 9(30):116_124.
- KABIR, BGJ. 2013. Laboratory evaluation of efficacy of three diatomaceous earth formulations against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) in stored wheat. *Eur Sc*.
- KARASEV, V.V., ONISCHUK, A.A., GLOTOV, O.G., BAKLANOV, A.M., MARYASOV, A.G., ZARKO, V.E., PANFILOV, N.A., LEVYKIN, A.I. & SABELFELD, K.K. 2004. Formation of charged aggregates of Al₂O₃ nanoparticles by combustion of aluminum droplets in air. *Combustion and flame*. 138, 40-54.
- KAH, M. & HOFMANN, T. 2014. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. *Environment International*. 63 224–235
- KOOKANA, R. S., BOXALL, A. B. A., REEVES, P., ASHAUER, R., BEULKE, S., CHAUDHRY, Q., CORNELIS, G., FERNANDES, T., GAN, J., KAH, M., LYNCH, I., RANVILLE, J., SINCLAIR, C., SPURGEON, D., TIEDE, K & VAN DEN BRINK, P. J. 2014. Nanopesticides: Guiding Principles for Regulatory

- Evaluation of Environmental Risks. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 62, 4227–4240
- KORUNIC, Z. & FIELDS, P.G., 1998. Diatomaceous Earth Insecticidal Composition USA Patent 5,773,017.
- KORUNIC, Z. 1994. Dijatomejska zemlja prirodni insekticid. Diatomaceous Earth as Natural Insecticide. In: Proceedings of ZUPP 94, ed. Z. Korunic, p. 136_148.
- KORUNIC, Z., FIELDS, P.G., KOVACS, M., NOLL, J., LUKOW, O., DEMIANYK, C., SHIBLEY, K., 1996. The effect of diatomaceous earth on grain quality. *Postharvest Biology and Technology* 9, 373e387.
- KRANZ, J. & THEUNISSEN, J. 1994. El concepto de umbrales en la protección vegetal integrada. En Kranz, J, Theunissen, J & Raterink, S. B. Vigilancia y pronósticos en la protección vegetal, pp. 85.
- LANTERI, A. A. & ARAGÓN, J. R. (1994) Dinámica poblacional y métodos de control. En LANTERI, A. Bases para el control integrado de los gorgojos de la alfalfa. De la Campana ediciones. La Plata, Argentina, pp. 57-72
- LUCKMANN, W. H. & METCALF, R. L. 1994. The pest management concept. En METCALF, R. L. & LUCKMANN, W. H. Introduction to insect pest management. 3ed edition. Wiley-Interscience, John Wiley and Sons. New York, pp. 1-35.
- McGONIGLE, D. F., JACKSON, Ch. W. & DAVIDSON, J. L. 2002. Triboelectrification of houseflies (*Musca domestica* L.) walking on synthetic dielectric surfaces. *Journal of Electrostatic* 54: 167-177.
- MIMANI, T. & K. C. PATIL. 2001. Solution combustion synthesis of nanoscale oxides and their composites. *Mater. Phys. Mech.* 4: 134-137.
- MOORE, D., LORD, J. F. & SMITH, S. 2000. Pathogens. En Subramanyam, Bh., Hagstrum, D.W. (Eds.), Alternatives to Pesticides in Stored-product IPM. Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 193-227
- PARK, T. 1934. Observations on the general biology of the flour beetle, *Tribolium confusum*. *Quarterly Review of Biology*. Volume 9. 36-54.
- PEREZ-DE-LUQUE, A & RUBIALES, D. 2009. Nanotechnology for parasitic plant control. *Pest Management Sci* 65:540–545.
- PHILLIPS, T.W. & THRONE, J.E., 2010. Biorational approaches to managing stored-product insects. *Annual Review of Entomology* 55, 375e395.
- RAGAEI, M. & SABRY, AK. H. 2014. Nanotechnology for Insect pest control. *International Journal of Science, Environment and Technology*, Vol. 3, No 2, 528 – 545.
- RAJASHEKAR, Y., BAKTHAVATSALAM, N. & SHIVANANDAPPA, T. 2012. Botanicals as Grain Protectants. *Psyche*, Article ID 646740. doi:10.1155/2012/646740
- RAJENDRAN, S. 2001. Grain Storage: Perspectives and Problems. En Chakraverty, A., Mujumdar, A. S., Vijaya Raghavan, G. S. & Ramaswamy, H. S. Handbook of Postharvest Technology. New York. Marcel Dekker, Inc, pp. 183-214.
- REES, D. P. 1996. Coleoptera. En SUBRAMANYAM, B. & HAGSTRUM, D. W. Marcel Dekker, Inc. Integrated management of insects in stored products, pp. 195-221.
- REJENDRAN, S. & SRIRANJINI, V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*. 44:126 135.
- SALLAM MOHAMED, N. 2008. Chapter II. Insect damage: Damage on Post-harvest.
- SANTA JULIANA, D. M. 2013. Información sobre insecticidas aprobados para granos almacenados. INTA.

- SCHOLLER, M. 2010. Prospects for biological control of stored-product pests. En International European Symposium on Stored Product Protection "Stress on chemical products" Berlin, pp. 25-31
- SCHOLLER, M., PROZELL, S., AL-KIRSHI, A. G. & REICHMUTH, CH. 1997. Towards Biological Control as a Major Component of Integrated Pest Management in Stored Product Protection. *Journal of Stored Products Research*. Vol. 33, No. I, pp. 81-97.
- SHADIA, E & ABDEL AZIZ. 2011. Control strategies of stored product pest. *Journal of Entomology*. 8 (2). 101-122.
- STADLER, T., BUTELER, M., WEAVER, D. K. & SOLFIE, S. 2012. Comparative toxicity of nanostructured alumina and a commercial inert dust for *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhyzopertha dominica* (F.) at varying ambient humidity levels. *Journal of Stored Products Research*. 48, 81-90
- STADLER, T., BUTELER, M. & WEAVER, D. K. 2010b. Nanoinsecticidas: Nuevas perspectivas para el control de plagas. *Rev. Soc. Ent. Arg.* 69 (3-4): 1-8
- STADLER, T., BUTELER, M & WEAVER, D. K. 2010a. Novel use of nanostructured alumina as an insecticide. *PestManag. Sci.* 66: 577-579.
- STADLER, T., LASCALEA, G. E. & JAHN, G. A. 2008. Nanotoxicology: Acute toxicity assessment of engineered nanostructured aluminium oxide. XXVI Jornadas Interdisciplinarias de Toxicología, Jornadas Internacionales de Toxicología e Inocuidad Alimentaria, Contaminantes en Alimentos como Indicadores para la Evaluación del Riesgo Ambiental. Asociación Toxicológica Argentina (ATA), Buenos Aires.
- STEFANAZZI, A. 2010. Aceites esenciales, una herramienta alternativa en el manejo integrado de plagas de grano almacenado. Tesis doctoral.
- SUBRAMANYAM, B. & ROESLI, R. 2000. Inert dusts. In: Subramanyam, Bh., Hagstrum, D.W. (Eds.), *Alternatives to Pesticides in Stored-product IPM*. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, pp. 321-380.
- THRONE, J. E., BAKER, J. E., MESSINA, F. J., KRAMER, K. J. & HOWARD, J. A. 2000. Varietal resistance. En Subramanyam, B. & Hagstrum, D. W. *Alternatives to Pesticides in Stored-product IPM*. Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 165-192
- TONIOLO, J.C., LIMA, M.D., TAKIMI, A.S., BERGMANN, C.P., 2005. Synthesis of alumina powders by the glycine-nitrate combustion process. *Materials Research Bulletin* 40, 561e571.
- WHITE, G. G. 1987. Effects of Temperature and Humidity on the Rust-Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), in Wheat Grain. *Austral Journal Zoology*. 35, 43-59
- WHITE, N. D. G. & LEESCH, J. G. 1996. Chemical control. En SUBRAMANYAM, B. & HAGSTRUM, D. W. Marcel Dekker, Inc. *Integrated management of insects in stored products*, pp. 287-330.