

# Actividad Fungicida e Insecticida de Emulsiones Agua/Aceite de Mezclas de Extractos de *Nicotiana tabacum*, *Azadiractha indica* y *Eucalyptus tereticornis*

Walter Murillo<sup>(1,2)</sup>, Pedronel Araque<sup>(1)</sup>, Carlos A Peláez<sup>\*(1)</sup>.

(1) Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM), Universidad de Antioquia, P.O. Box 1226, Medellín-Colombia.

(2) Grupo de investigación en Productos Naturales (GIPRONUT), Universidad del Tolima, Barrio Santa Elena A.A 546, Ibagué-Colombia (email: directorgiem@gmail.com)

Recibido Abr. 14, 2011; Aceptado May. 26, 2011; Versión Final recibida Jul. 02, 2011

## Resumen

Se realizó un estudio sobre el potencial insecticida agudo y crónico sobre *Drosophila melanogaster* y antifúngico en *Fusarium oxysporum* de emulsiones aceite-en-agua de mezclas binarias y ternarias de extractos de *Nicotiana tabacum*, *Azadiractha indica* (neem), y aceite esencial de *Eucalyptus tereticornis*. Se construyeron curvas dosis/respuesta para el tiempo letal medio, relación pupa-huevo, adulto-pupa y porcentaje inhibitorio para la actividad antifúngica. Se observó alta actividad insecticida aguda del tabaco a 6 g/L (tiempo letal medio=2,3 ± 0,5 minutos), larvicida en el neem a 0,2 g/L (pupa-huevo= 0,05) y fungicida en el eucalipto a 3 g/L (porcentaje inhibitorio =100%). Las bioactividades se potenciaron en la mayoría de las mezclas binarias, exceptuando la actividad fungicida. La mezcla ternaria presentó actividad fungicida antagónica. Se concluye sobre la potencial aplicación de estos desarrollos para controlar plagas y enfermedades.

*Palabras clave:* actividad fungicida, actividad insecticida. emulsiones agua-en-aceite, acción conjunta, sinergismo

## Fungicidal and Insecticide Activities of Water-in-Oil Emulsions of Mixtures from Extracts of *Nicotiana tabacum*, *Azadiractha indica* and *Eucalyptus tereticornis*

### Abstract

A study on the acute and chronic insecticide potential on *Drosophila melanogaster* and antifungal on *Fusarium oxysporum* of oil-in-water emulsions of binary and ternary mixtures of extracts of *Nicotiana tabacum* and *Azadiractha indica* (neem) and *Eucalyptus tereticornis* essential oil. Dose/response curves for the mean lethal time, pupae-egg ratio, adult-pupae and inhibitory rate for antifungal activity were constructed, compared with the bioactivity mixtures, measuring synergism, antagonism and joint activity. High insecticidal acute activity was observed in tobacco to 6 g/L (mean lethal time=2.3 ± 0.5 minutes), the neem larvicide to 0.2 g/L (pupae-egg ratio=0.05) and fungicide in the eucalyptus to 3 g/L (inhibitory rate=100%). The bioactivities were enhanced in almost all binary and ternary mixtures, except for the fungicidal activity. The ternary mixture exhibits fungicidal activity antagonistic. The study shows the potential application of these technologies to control pests and diseases.

*Keywords:* fungicidal activity, insecticide activity, water-in-oil emulsions, joint action, synergism

## INTRODUCCIÓN

El control de artrópodos plaga succionadores de sabia y de enfermedades causadas por hongos filamentosos tales como los pertenecientes al género *Fusarium*, que es catalogado como uno de los más importantes géneros de hongos patógenos en cultivos de frutales, ornamentales y hortalizas (Kyanko et al., 2010). El control de estos organismos nocivos es vital para la sostenibilidad de la agricultura y se fundamenta principalmente en la aplicación de agroquímicos, en su gran mayoría de origen sintético, siendo los de uso más común organoclorados, organofosforados y benzimidazoles (Shaalan et al., 2005; Marín et al., 2008), no obstante generan un alto riesgo tóxico por la exposición a múltiples residuos de agroquímicos en los alimentos y el ambiente que igualmente pueden potenciar efectos tóxicos indeseados en la población en general (Angier et al., 2002; Moretto, 2008; Reffstrup et al., 2010) y afectar los organismos que no son objeto de control.

Ante esta problemática se hace necesario el desarrollo de métodos de control alternativos (Isman, 2006), dando paso al uso de productos botánicos, cuyo interés radica no solo en la posibilidad de encontrar nuevos compuestos útiles, sino también en aprovechar la naturaleza compleja de sus mezclas y el sinergismo que se puede presentar entre sus componentes (Zhou et al., 2010). Sin embargo son pocos los metabolitos que se han mostrado promisorios para el desarrollo de agroquímicos verdes (Dayan, 2009).

Algunos de los más usados han sido las piretinas naturales obtenidos del Crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium* Vis.) (Zapata et al., 2006; Duso et al., 2008), la nicotina, un metabolito que actúa como insecticida de contacto y que ha retomado importancia en los últimos años en los estudios realizados por Casanova et al (2002, 2005) y Araque (2010); Igualmente, es popular el uso de los metabolitos provenientes de la familia Meliaceae, en especial del neem (*Azadiractha indica*) que se usa para fines comerciales (Morgan, 2008). También como fruto de diversos estudios, una buena cantidad de aceites esenciales son conocidos por ejercer actividad antimicrobiana (Schelz, et al., 2006; Inouye, et al., 2006) y antifúngica (Barreto, 2006; Bosquez-Molina et al., 2010; Monsálvez et al., 2010), destacándose los aceites esenciales de una gran variedad de especies del genero *Eucalyptus* como fuentes promisorias para el control de plagas y enfermedades agrícolas (Batish et al., 2008).

Por tanto, en este estudio se determinó el potencial para el control simultáneo de plagas y enfermedades de formulaciones de mezclas de extractos de tabaco, neem y aceite esencial de eucalipto, mediante diferentes pruebas de actividad biológica, siendo necesario la evaluación de los tres tipos de acción conjunta de las mezclas (acción conjunta independiente, acción conjunta similar, sinergismo y antagonismo). Lo anterior buscando la mejor combinación de mezcla, hecho que se sustenta en investigaciones que reportan la potenciación de la actividad biológica en extractos, por la combinación de varios de sus metabolitos bioactivos, conduciendo a la evaluación de combinaciones de los anteriores con fungicidas e insecticidas de síntesis con el fin de aumentar su efectividad (Carpinela et al., 2005; Hao et al., 2010) sin embargo poco es lo que se conoce sobre el comportamiento de mezclas de matrices vegetales frente a su actividad fungicida e insecticida simultanea como alternativa para el control de insectos plaga y hongos fitopatógenos en cultivos de importancia agrícola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Agar papa dextrosa (PDA) Silica gel 60 F, Acido propionico fueron adquiridos de MERCK®, Agar bacteriológico OXOID, Tween 80® (T80), papel filtro whatman y sulfato de sodio anhidro de Sigma Chemical Co, el aceite de girasol fue adquirido en un supermercado local y refinado mediante cromatografía en columna (1,5 cm de ancho x 75 cm de alto) y empacada con sílica gel 60 (MERCK®. Kieselgel 60G, Art. 7731)

Harina de maíz, Melaza de caña de azúcar, Levadura seca y Aceite de girasol fueron adquiridos en tiendas de la localidad.

*Eucalyptus tereticornis* (eucalipto)

Hojas de *Eucalyptus tereticornis* (Myrtaceae) recolectadas de un ejemplar ubicado en la Universidad de Antioquia (Medellín-Colombia), e identificado como HUA 2923 fueron sometidas a extracción por hidro destilación. El aceite recolectado fue secado sobre sulfato de sodio anhidro dando lugar a un líquido amarilloso traslucido de densidad 0.86 g/mL.

*Nicotiana tabacum* (tabaco)

Hojas de *N. tabacum* fueron mezcladas con una solución de hidróxido de sodio al 5% g/g en una relación en masa de 1:1,5, se dejó en digestión por una hora y posteriormente se adicionó periódicamente bencina de petróleo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, filtró y finalmente se retiró el solvente bajo presión reducida hasta sequedad.

*Azadiractha indica* (neem)

Semillas de *A. indica* se molieron y se desengrasaron con bencina de petróleo, posteriormente se extrajeron con metanol. La fase polar se concentró bajo presión reducida hasta sequedad.

*Preparación de fases oleosas*

Los extractos y mezclas de extractos fueron adicionados lentamente con agitación continua en aceite de girasol a 25°C, hasta disolución completa, luego se adicionó lentamente Tween 80® 10% g/g. El contenido de los extractos en la fase oleosa corresponde a: *eucalipto* (3% g/g), *tabaco* (3% g/g), *neem* (0,1%), *eucalipto-tabaco* (3% g/g y 3% g/g respectivamente), *eucalipto-neem* (3% g/g y 0,1% g/g respectivamente), *tabaco-neem* (3% g/g y 0,1% g/g respectivamente), *eucalipto-tabaco-neem* (3% g/g; 3% g/g; 0,1% g/g respectivamente).

*Preparación y caracterización de las emulsiones*

La emulsión de aceite girasol (20% g/g de fase oleosa, 18% g/g de aceite girasol, 2% g/g de Tween 80®), la emulsión eucalipto-tabaco (20% g/g de fase oleosa, 16,8% g/g de aceite girasol; 0,6% g/g de aceite de eucalipto; 0,6% g/g de extracto de tabaco y 2% g/g de Tween 80®), la emulsión eucalipto-neem (20% g/g de fase oleosa, 17,38% g/g de aceite girasol; 0,6% g/g de aceite de eucalipto; 0,02% g/g de extracto de neem y 2% g/g de Tween 80®), la emulsión tabaco-neem (20% g/g de fase oleosa, 17,38% g/g de aceite girasol; 0,6% g/g de extracto de tabaco; 0,02% g/g de extracto de neem y 2% g/g de Tween 80®) y la emulsión eucalipto-tabaco-neem (20% g/g de fase oleosa, 16,78% g/g de aceite girasol; 0,6% g/g de aceite de eucalipto; 0,6% g/g de extracto de tabaco; 0,02% g/g de extracto de neem y 2% g/g de Tween 80®), fueron preparadas a 25°C, usando como emulsificador un sistema con llave de tres vías acoplada a un filtro (éster de celulosa 0.2µm) con un límite de presión de 0.51 MPa. Para la caracterización de las emulsiones se determinó el tamaño promedio de partícula ( $d_{32}$ ) mediante la técnica de dispersión de luz usando Mastersizer Malvern 2000. Todas las emulsiones fueron preparadas por triplicado.

*Biensayos de actividad insecticida aguda y crónica*

Los bioensayos de bioactividad aguda para las emulsiones sobre adultos de *D. melanogaster* se realizaron en discos de papel filtro (diámetro = 4 cm) impregnados con 0,20 mL de emulsión (después de preparada la emulsión) que fueron puestos en un vial de vidrio (5 cm de ancho x 6 cm de alto). Un total de 30 individuos adultos (cuatro días de nacidos) por vial fueron introducidos y la mortalidad fue monitoreada, dependiendo de la actividad de la emulsión, cada uno o cinco minutos durante 60 minutos. Se realizaron cuatro replicas por cada tratamiento y los valores de tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) y el análisis de regresión fue calculado utilizando el software Statgraphics Centurion XV.

La bioactividad crónica de las emulsiones sobre *D. melanogaster* fue realizada a partir de viales con 15 mL de alimento (mezcla semisólida de proteína, grasa y carbohidratos biodisponibles) que fue mezclado con 1,0 mL de las emulsiones después de preparadas hasta completa homogenización. Un total de 6 individuos (3 machos y 3 hembras) se introdujeron al vial. Transcurridas 24 horas de cruce entre los individuos adultos y a una temperatura de 25°C, estos se retiraron y se procedió al recuento de huevos. Los viales se incubaron hasta que emergió toda la F1, realizando el recuento de pupas y adultos con el propósito de evaluar el efecto de las distintas emulsiones sobre el ciclo de vida a través de la determinación de la relación entre las pupas y los huevos (P/H) y la relación entre los adultos y las pupas (A/P) (Peñalosa, 2008). Se realizaron 4 réplicas de cada concentración incluyendo un control tratado con la emulsión blanco y estableciendo el efecto mediante análisis de varianza ANOVA usando como parámetro de comparación múltiple el test de Tukey a un 95% de confianza.

#### Actividad fungicida

Se dispusieron tubos de ensayo con agar papa dextrosa (PDA) con 13mL del medio estéril, fundido y enfriado a 40 grados a estos se les adicionó la cantidad de emulsión necesaria y se homogenizó en un vórtex a 3000 rpm por 30 segundos, Luego se dispusieron en cajas de petri estériles hasta que el medio solidificó; se sembró una rodaja 0,5 cm de diámetro del micelio (Tzortzakis, 2007) de *Fusarium oxysporum* proveniente de un cultivo de 12 días y se incubó a temperatura ambiente durante 10 días, usando como blanco medio de cultivo PDA sin extracto. Se monitoreó el crecimiento radial de la colonia por un periodo de 13 días, tiempo en el cual el micelio alcanza el diámetro total de la caja de petri (9 cm) y calculando el porcentaje de inhibición de acuerdo con la expresión de la ecuación 1. Cada ensayo se realizó por triplicado, probando la actividad fungicida del aceite esencial de eucalipto en el rango de 0,01-4 g/L, para el extracto de tabaco se probó entre 0,19-6,0 g/L y entre 1,0-8,0 g/L para el extracto de neem.

$$\% \text{Inhibición} = \left( \frac{\text{Crecimientoradialcontrol} - \text{Crecimientoradialtratamiento}}{\text{Crecimientoradialcontrol}} \right) \times 100 \quad (1)$$

#### Evaluación de la actividad conjunta, sinergismo y antagonismo de emulsiones

Estos parámetros se evaluaron siguiendo la metodología propuesta por Wadley (1967) con algunas modificaciones. Se realizaron bioensayos con cada uno de los extractos y las mezclas por separado bajo todo el rango de su actividad tanto para la determinación de su actividad anti-insecto (actividad insecticida por contacto, actividad insecticida por ingestión) sobre el modelo biológico *Drosophila melanogaster* y su actividad fungicida sobre *F. oxysporum* determinando en cada caso la línea dosis- respuesta. Posteriormente se obtuvieron parámetros como el radio toxico (RT), el equivalente de la mezcla (EM) y el equivalente toxicológico calculado (ETC). Este último representó el TL<sub>50</sub> esperado para la mezcla en caso de la actividad anti-insecto o la CI<sub>50</sub> para la actividad fungicida. Con estos parámetros se obtuvieron los valores de respuesta esperada los cuales se compararon con los registrados para cada una de las mezclas evaluadas. Los parámetros anteriores se calcularon usando las siguientes ecuaciones:

$$\text{RT}_{\text{Mezcla}} = \frac{1}{2} \times \left( \frac{\text{CI}_{50\text{ComponenteA}}}{\text{CI}_{50\text{ComponenteB}}} + \frac{\text{CI}_{95\text{ComponenteA}}}{\text{CI}_{95\text{ComponenteB}}} \right) \quad (2)$$

$$\text{EM}_{\text{Mezcla}} = \frac{\text{CI}_{50\text{ComponenteA}}}{\text{CI}_{50\text{ComponenteB}}} \quad (3)$$

$$\text{ETC} = \text{CI}_y + (\text{CI}_y \times \text{RT} \times \text{EM}) \quad (4)$$

CI<sub>50</sub>A y CI<sub>95</sub>A = Concentración a la cual se obtiene respectivamente el 50 y 95% de la actividad biológica evaluada para el extracto A.

CI<sub>50</sub>B y CI<sub>95</sub>B; son las concentración a la cuales se obtiene el 50 y 95% de la actividad biológica evaluada para el extracto B.

CI<sub>y</sub> indica el valor de la actividad biológica a una concentración determinada de extracto tomando como base el más activo a la concentración empleada.

Las mezclas se prepararon manteniendo en ellas las mismas concentraciones a los que se probaron los extractos de manera independiente y en caso de la actividad insecticida por ingestión, se realizó la comparación entre las medias de la actividad del extracto de neem correspondiente, respecto a la actividad de cada una de las mezclas que lo contiene mediante análisis de varianza ANOVA.

#### *Análisis estadístico*

El análisis de los datos realizados que consistieron básicamente en la determinación de modelos de regresión simple, determinándose para estos el coeficiente de correlación de Pearson y verificando la autocorrelación entre los residuos mediante el test de Durbin-Watson y la significancia de los modelos a un ( $p < 0,05$ ). Para los análisis de varianza de una vía ANOVA se probó la normalidad de las variables mediante el test de Komogorov-Smirnov, la homogeneidad de varianza mediante el test de Levene y la prueba de comparación múltiple mediante la prueba de Tukey, con el programa Statgraphic Centurión XV, versión 15.1.02

## RESULTADOS Y DISCUSION

#### *Tamaño de partícula de emulsiones*

Los tamaños de partícula de las emulsiones de extractos y mezclas oscilo en el rango de 4,2  $\mu\text{m}$ , siendo este el menor tamaño de partícula obtenido con la emulsión de extracto de tabaco-aceite esencial de eucalipto y 5,0  $\mu\text{m}$ , el mayor registrados para la emulsión triple. En este rango todas las emulsiones fueron estables bajo las condiciones de incorporación en los distintos medios de cultivo.

#### *Actividad insecticida aguda*

En la tabla 1 se observa que las emulsiones de extracto oleoso de neem no presentaron actividad insecticida en un periodo de 60 minutos en las concentraciones evaluadas. Para las emulsiones de extracto de tabaco (6 g/L) y eucalipto (8 g/L) se presentaron valores de TL<sub>50</sub> de 2,3  $\pm$  0,5 minutos y 11  $\pm$  1 minutos, respectivamente. La emulsión de extracto de tabaco presentó mayor actividad insecticida que el extracto de eucalipto. Es importante resaltar que el proceso de emulsificación utilizado para la formulación del extracto oleoso de tabaco se debe precisamente a la naturaleza no polar del mismo, sin embargo la actividad insecticida de la nicotina no es potenciada en este sistema, como se ha planteado en estudios anteriores (Araque, 2010). Previendo la posible disminución de la actividad insecticida no se adicionó ácido oleico a la fase oleosa de las emulsiones de tabaco, evitando con ello el aumento de la polaridad de esta fase y garantizando una bioactividad representativa, tal como se aprecia en la tabla 1.

Tabla 1. Bioactividad aguda de extractos en emulsión sobre *D. melanogaster*

Fase oleosa	Bioactividad	Fase oleosa	Bioactividad	Fase oleosa	Bioactividad
Tabaco (g/L)	TL <sub>50</sub> (minutos)	Eucalipto (g/L)	TL <sub>50</sub> (minutos)	Neem (g/L)	TL <sub>50</sub> (minutos)
1,5	>60	2	>60	1	>60
3	27 $\pm$ 3	4	15 $\pm$ 2	3	>60
4	8 $\pm$ 2	5	12 $\pm$ 1	5	>60
5	4 $\pm$ 1	6	11 $\pm$ 1	7	>60
6	2,3 $\pm$ 0,5	8	11 $\pm$ 1	8	>60

La bioactividad insecticida aguda de las mezclas en emulsión que contiene extracto de tabaco, es decir las mezclas eucalipto-tabaco (1,33:1), tabaco-neem (2:1) y la mezcla triple (2,67:0,75:1) comparadas con respecto a su concentración de tabaco en g/L se aprecia en la (figura 1). Aquí se comparan los TL<sub>50</sub> esperados frente a los observados de las mezclas. Los valores esperados de las mezclas doble y triple resultaron ser iguales ya que ambas contienen los extractos de tabaco y aceite esencial de eucalipto como componentes activos, sin embargo se pueden apreciar diferencias importantes entre la actividad insecticida de estas dos mezclas. Los TL<sub>50</sub> observados para la mezcla doble mostraron diferencias frente a los valores esperados a todos los niveles de concentración, manifestando una importante actividad sinérgica, evidente a través de la disminución en los valores de los mismos. La mezcla triple presentó un comportamiento semejante al predicho en los valores esperados y solamente se apreció sinergismo a la concentración más alta (6 g/L); no se presentaron efectos antagónicos en ninguna de las concentraciones. En la mezcla doble, extracto de tabaco-extracto de neem, la actividad del tabaco fue antagonizada en todas las concentraciones por el extracto de neem mostrando un TL<sub>50</sub> de 10,4 min a la más alta concentración de tabaco en la mezcla (6 g/L). Por el contrario, el efecto insecticida agudo del eucalipto fue potenciado por el neem a todas las concentraciones de mezcla con valores respectivos en TL<sub>50</sub> de 40,4; 11,63; 7,9; 6,6 y 5,0 minutos comparados con los del aceite de eucalipto puro (tabla 1)

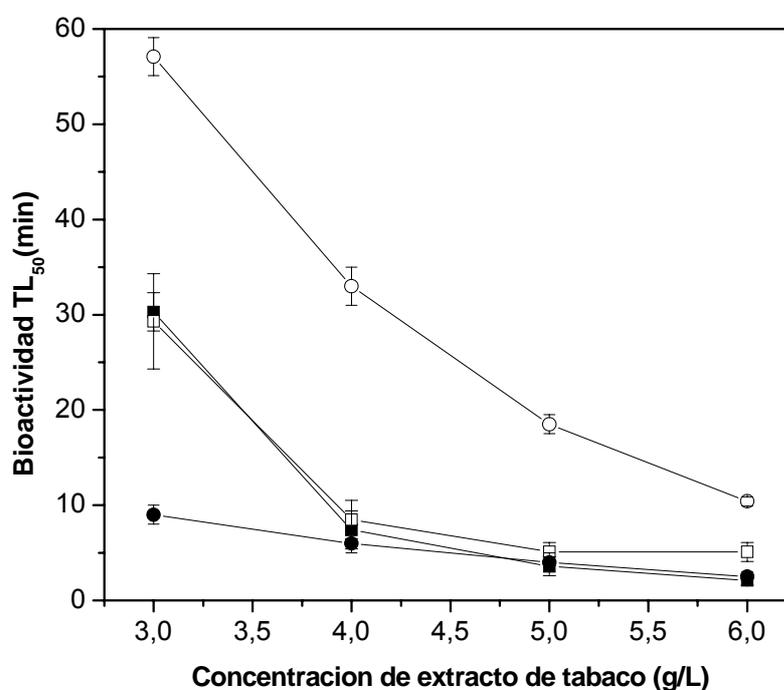


Fig. 1: Efecto de la concentración de extracto de tabaco en la actividad biológica de las mezclas binarias y ternarias de extractos; (●) valores mezcla tabaco-eucalipto observados, (○) valores mezcla tabaco-neem observados, (□) valores esperados de las mezclas tabaco-eucalipto y triple, (■) valores mezcla triple- observados. Porcentaje de error del 5%

Estos resultados son comparables con el sinergismo en pesticidas de síntesis demostrado y documentado en el caso de las combinaciones de los insecticidas piretroides y organofosforados o carbamatos en el control de plagas agrícolas (Bynum et al., 1997; Martin et al., 2003). En diferentes estudios, combinaciones diversas de los anteriores insecticidas y de otros de naturaleza no piretroide, mezclados con productos repelentes como el DEET y KBR 3025 también han mostrado su efectividad en el control de insectos tales como *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae*, conocidos por ser vectores de diversas enfermedades tropicales incluyendo la malaria (Bonnet et al., 2004; Darriet et al., 2003; Pennetier et al., 2007).

*Actividad insecticida por ingestión*

La evaluación de la actividad por ingestión de los extractos se resume en la tabla 2. El tabaco mostró acción larvicida significativa ( $p < 0,05$ ) a concentraciones de 0,2 y 0,4 g/L, con valores respectivos en la relación P/H de 0,6 y 0,4; pero sin efecto sobre el paso de pupa a adulto, ya que se registró un valor de 1 en la relación pupa-adulto para todas las concentraciones. El aceite esencial de eucalipto no tuvo efectos representativos sobre *D. melanogaster*. Los extractos más activos fueron los de neem, siendo el obtenido del lote 1 de semillas el más activo, ya que causó efectos estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ) sobre el desarrollo de larvas y pupas a una concentración de 0,02 g/L, registrando valores en la relación P/H y A/P de 0,05 y 0,2 respectivamente (tabla 3). Este extracto se usó en la preparación de la mezcla aceite de eucalipto-neem. El extracto de neem obtenido de un segundo lote de semillas y usado en la preparación de las demás mezclas fue menos activo, mostrando efecto larvicida apreciable a 3 g/L.

Tabla 2. Comparación de la actividad insecticida por ingestión de los extractos de neem y las diferentes mezclas que los contienen. Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas al 5%. Método: 95,0 % Tukey HSD. Porcentaje de error en replicas  $\leq 10\%$

Tabaco (g/L)	Media P/H	Media A/P	Eucalipto (g/L)	Media P/H	Media A/P	Neem lote1 (g/L)	Media P/H	Media A/P	Neem lote2 (g/L)	Media P/H	Media A/P
0	0.95c	1c	0	0.88c	1c	0	1.0b	0.95b	0	1c	1c
0.025	0.83c	0.9c	1	1c	0.94c	0.05	0.78b	0.82b	0.375	1c	1bc
0.05	0.83c	1c	1.5	1c	1c	0.1	0.38ab	0.79b	0.750	1c	0.91ab
0.1	0.88c	1c	2	1c	0.94c	0.2	0.05a	0.75	1.5	1c	0.99ab
0.2	0.6ab	0.98c	2.5	0.98c	0.96c				3	1c	0.92ab
0.4	0.55a	0.95c	3	0.55b	1c						

Al comparar los valores de actividad biológica de los extractos de neem registrados en la tabla 2 con el de las respectivas mezclas en la tabla 3 se aprecia como la mezcla extracto de tabaco-neem ejerce efectos sinérgicos significativos ( $p < 0,05$ ) con excepción de la concentración de 0,750 g/L donde los valores de las medias de la relaciones P/H y A/P son estadísticamente iguales a la que se observaron con el extracto de neem con la que se preparó ( $p > 0,05$ ).

También se puede observar un efecto más variable sobre la relación A/P para la mezcla triple con respecto a la del extracto de neem con la que se preparó. Las concentraciones de 0,750, 1,5 y 3 g/L de extracto de neem del segundo lote de semillas presentan mayor actividad que la mezcla y solamente se presentó un mejor efecto de ésta a 0,375 g/L, por lo tanto, el efecto casi generalizado sobre el paso de pupas a adultos es antagonizado por la mezcla de los otros extractos. Una mayor actividad insecticida crónica es observada en la mezcla aceite de eucalipto neem a concentraciones de 0,05 y 0,1 g/L donde es notable la disminución en los valores de P/H y A/P logrados por la mezcla con el aceite de eucalipto respecto de los que se obtuvieron con el extracto de neem del lote 1.

Las emulsiones control registraron en todos los bioensayos registraron valores mayores de 0,9 en las relaciones P/H y A/P sin afectar el desarrollo de *D. melanogaster*.

Tabla 3. Valores medios de las relaciones P/H y A/P de las mezclas que contienen extractos de neem. Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas al 5%. Método: 95,0 % Tukey HSD. Porcentaje de error en replicas  $\leq$  10%

Neem lote 2 (g/L)	Mezcla Tabaco-Neem (2:1)		Mezcla Triple (2,67:0,75:1)		Neem lote 1(g/L)	Mezcla Eucalipto-Neem (15:1)	
	Media P/H	Media A/P	Media P/H	Media A/P		Media P/H	Media A/P
0	1c	1c	1c	1c	0	1.0c	0.95c
0.375	0.51b	0.71b	0.12a	0.53a	0.05	0.3ab	0.22ab
0.750	0.49b	0.69b	0.39b	0.55a	0.1	0.0a	0.0a
1.5	0.39ab	0.55a	0.49b	0.69ab	0.2	0.0a	0.0a
3	0.12a	0.53a	0.51b	0.71ab			

#### Actividad fungicida de extractos y mezclas

El efecto causado por los diferentes extractos sobre el crecimiento del hongo *F. oxysporum* se observa en la tabla 4, donde se resumen los porcentajes de inhibición obtenidos a las distintas concentraciones.

El aceite esencial de eucalipto fue más efectivo, al afectar drásticamente el crecimiento radial del hongo a concentraciones superiores a 1 g/L e inhibir por completo su crecimiento a 3 g/L. El porcentaje de inhibición se representa mediante la ecuación:

$$\%inhibición = 1,73(Concentración)^{1/2}$$

$r^2 = 97,7\%$ ,  $p\text{-valor} = 0,0041$ .

Tabla 4. Porcentajes de inhibición en el crecimiento de *F. oxysporum* obtenidos con los distintos extractos. Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas al 5%. Método: 95,0 % Tukey HSD. Porcentaje de error en replicas  $\leq$  10%

Eucalipto g/L	PI	Tabaco g/L	PI	Neem lote 2 g/L	PI
0	0.0a	0	0.0a	0	0a
0.01	19.3b	0.188	4.4ab	1	0a
0.1	35.6c	0.375	10.3b	2	0a
1	68.5d	0.750	23.0c	4	0a
2	83.3e	1.5	37.8d	8	13.3b
3	100f	3	60.3e		
4	100f	6	100f		

El aceite esencial extraído de esta especie ha presentado actividad antimicrobiana (Alitonou et al., 2004). Otras especies como *E. globulus* ha mostrado actividad antimicótica sobre varias cepas de hongos entre las que se nombran *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* conocidos por infectar productos agrícolas almacenados (Rakotonirainy and Drine, 2005; Rocha et al., 2009).

El extracto de neem presentó una baja actividad fungicida, siendo poco apreciable a 8 g/L donde la inhibición fue del 13,3%. En diferentes reportes extractos de neem tanto polares como no polares, han mostrado efectos sobre el crecimiento radial de algunos hongos (Amadioha 2000), sin embargo los efectos sobre hongos filamentosos parecen estar más relacionados con daños formológicos y la producción de micotoxinas a concentraciones cercanas de extracto del 10 g/L según los reportaron Allameh et al., 2001 y Razzaghi et al., 2005.

Como en las emulsiones de las mezclas el neem no superó los 3 g/L, este no presenta ningún efecto que se deba tener presente para las predicciones de la actividad de la mezclas. La actividad fungicida del extracto total de alcaloides de tabaco fue dependiente de la concentración de nicotina presente e inhibió por completo el crecimiento de hongo a 6 g/L, tal como se aprecia en la tabla 4. La relación entre la concentración y la inhibición se expresa mediante la ecuación:

$$\%inhibición = 0,22 \times Concentración$$

$$r^2 = 98,24\% \text{ p-valor} = 0,000.$$

El comportamiento de la mezcla se observa en la figura 2 donde se comparan los valores observados frente a los esperados para la mezcla con respecto a la concentración de aceite de eucalipto. En la figura 2, se evidencia una actividad variable dependiente de la concentración de aceite de eucalipto en la mezcla y solamente en la concentración correspondiente a 1g/L se aprecia una disminución en la actividad que se puede considerar como un efecto antagónico, sin embargo en términos generales, la mezcla manifiesta un comportamiento semejante al mostrado por el aceite solo sobre el hongo *F. oxysporum*. Lo anterior indica que el neem no interfiere de manera apreciable sobre la actividad fungicida del aceite de eucalipto.

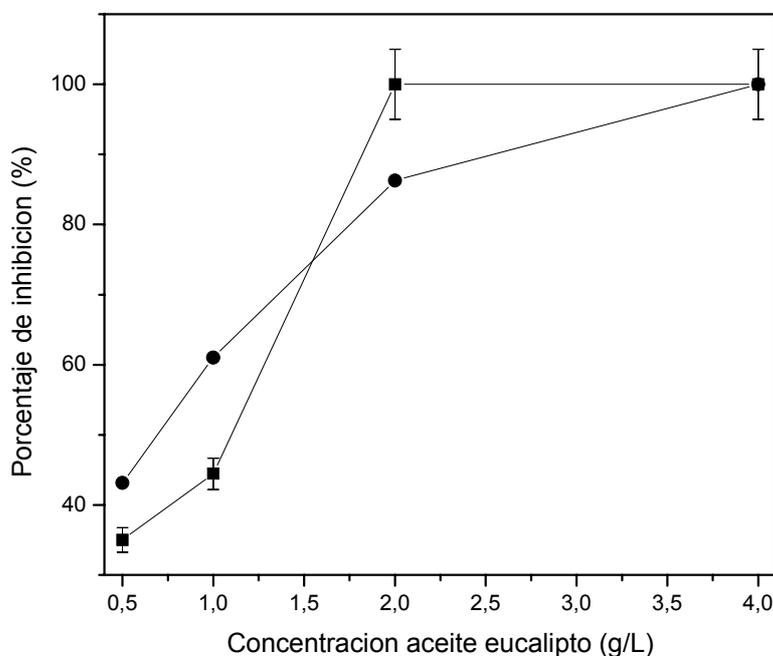


Fig. 2: Efecto de la concentración de extracto de la mezclas binarias aceite de eucalipto-neem en el porcentaje de inhibición sobre *F. oxysporum*; (■) Observado=  $1/(9,2 \times 10^{-3} \cdot \ln(\text{Concentración mezcla AE-N}))$   $r^2 = 98,3\%$ , (●) Esperado=  $1/(8,1 \times 10^{-3} + 7,6 \times 10^{-4} / \text{Concentración mezcla AE-N})$   $r^2 = 99,4\%$ . Porcentaje de error del 5%

El efecto de la mezcla aceite de eucalipto-extracto de tabaco que se presenta en la figura 3 muestra que a pesar de las mezcla de los extractos, cada uno de ellos sigue ejerciendo su acción fungicida de manera independiente, que permite un efecto aditivo o conjunto frente a la inhibición del hongo *F. oxysporum*. Lo anterior se evidencia a través de la alta correspondencia entre los valores esperados y los observados del porcentaje de inhibición.

Finalmente el comportamiento de la mezcla triple (figura 4) es marcadamente antagónico en todos los rangos de concentración que se evaluaron siendo inviable en el control del hongo. El porcentaje de inhibición a la máxima concentración de mezcla fue solamente del 51%

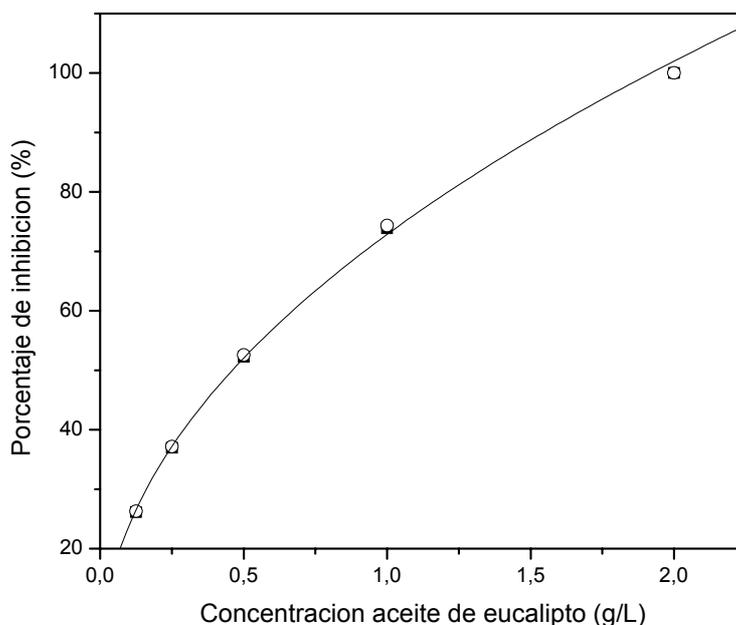


Fig. 3: Efecto de la concentración de extracto de la mezclas binarias tabaco-eucalipto en el porcentaje de inhibición sobre *F. oxysporum*; (■) Observado=  $e^{5,41+0,49 \times \ln \text{Concentración mezcla AE-T}}$   $r^2=99,9$ . (○) Esperado=  $e^{5,46+0,50 \times \ln \text{Concentración mezcla AE-T}}$   $r^2=99,9$ . Porcentaje de error del 5%

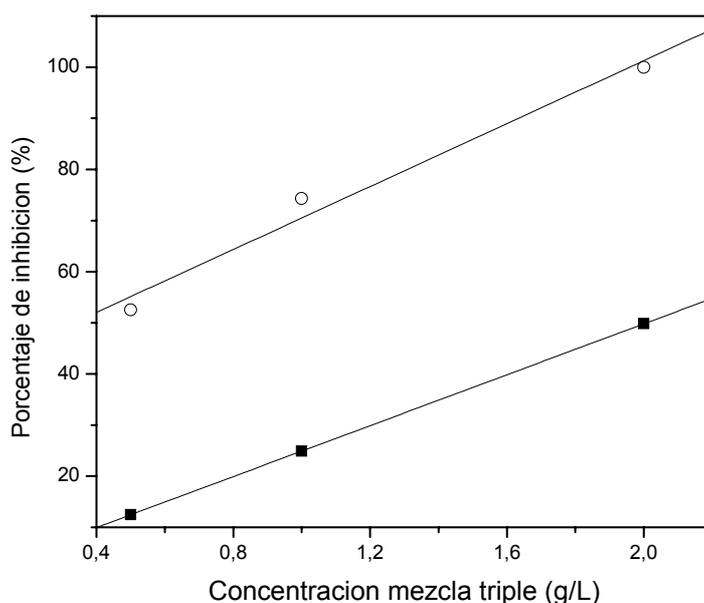


Fig. 4: Efecto de la concentración de extracto de la mezcla triple eucalipto-neem-tabaco en el porcentaje de inhibición sobre *F. oxysporum*; (■) Observado=  $(620 \times \text{Concentración mezcla triple}^2)$   $r^2=99$ , (○) Esperado=  $0,2 + 74 \times (\text{Concentración mezcla triple})^{1/2}$   $r^2=99$  %Porcentaje de error del 5%

Algunas de las interacciones comentadas anteriormente han sido reportadas, tal y como es el caso de la actividad antifúngica de la escopoletina, una cumarina que potenció el efecto fungicida del Mancozeb sobre el hongo patógeno *Fusarium verticillioides* (Carpinella et al., 2005), igualmente una saponina aislada de la planta de te potenció la actividad antifúngica del imazalil y procloraz, empleados en el control de hongos fitopatógenos poscosecha de cítricos (Hao et al., 2010). En matrices de origen natural se ha presentado con los metabolitos de naturaleza fenólica aislados de la planta *Melia azedarach* activos contra varios hongos patógenos de importancia médica y agrícola (Carpinella et al., 2003) y la combinación sinérgica de eugenol con cinamaldehído en el control de hongos que degradan la madera, con mayor efectividad que los métodos convencionales de control usados. (Yen y Chang, 2008)

## CONCLUSIONES

En este estudio se logró establecer el potencial uso de mezclas de extractos para el control simultáneo de plagas y enfermedades como una alternativa al uso de agroquímicos de síntesis, mostrando que la combinación adecuada de los principios activos presentes, puede conducir a la obtención de productos que pueden ser formulados a una concentración tal donde la actividad biológica se potencie a través del ataque sobre diferentes blancos, esto finalmente en el mejor de los casos permite obtener efectos sinérgicos que puedan redundar en mayores efectos, disminución de las dosis de aplicación y costos.

Los resultados de la actividad anti-insecto y fungicida de las mezclas evaluadas permitió establecer que las mezclas dobles presentan una mayor acción que los componentes que las conforman en la casi todo el rango de evaluación, no obstante la mezcla triple, aunque presento una actividad anti-insecto apreciable no fue efectiva en el control del hongo *F. oxysporum*.

Estos resultados sustentan la posibilidad de explorar sobre el uso de mezclas estandarizadas de extractos para el control de plagas y enfermedades en cultivos de importancia comercial.

## REFERENCIAS

Alitonou, G., Avlessi F., Wotto VD., Ahoussi E., Dangou J., Dominique C.K. Sohounhloué, DCK. Composition chimique, propriétés antimicrobiennes et activités sur les tiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. C. R. Chimie, 7, 1051–1055 (2004).

Allameh, A., Razzaghi-Abyaneh, M.R., Shams, M., Rezaee, M.B., Jaimand, K. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetase, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. Mycopathologia, 154, 79–84 (2001).

Amadioha, A.C Controlling rice blast in vitro and in vivo with extracts of *Azadirachta indica*. Crop Protection, 19, 287-290 (2000).

Angier, J. T., McCarty, G. W., Rice, C. P.; Bialek, K. Influence of a Riparian Wetland on Nitrate and Herbicides Exported from an Agricultural Field Journal of Agricultural Food Chemistry, 50, 4424-4428,(2002).

Araque, M.P., Pelaez, J.C. Evaluación de la actividad biológica de emulsiones aceite/agua de ácido oleico–nicotina sobre *Drosophila melanogaster*, Vitae, 17 (1), 83-89 (2010).

Barreto, A. G. Velázquez P.B.; Peña M. Rodríguez T. H. Evaluación in vitro de Extractos de *Eucalyptus citriodora* hook y *Eucalyptus saligna* sm Como Posibles Antisépticos Mamarios, Revista de .Producción. Animal, 18 (2), 135-140, (2006).

Batish, D.R., Singh, H. P., Kohli , R.K., Kaur, S. Eucalyptus essential oil as natural pesticide Forest Ecology and Management, 256: (12), 2166-2174, (2008).

Bonnet, J., Corbel,V., Darriet, F., Chandre, F., Hougard , J.M. Topical applications of pyrethroid and organophosphate mixtures revealed positive interaction against pyrethroid-resistant Anopheles gambiae. JAm Mosq Control Assoc, 20, 438–43, (2004).

Bosquez-Molina, E, Ronquillo-de Jesús, E., Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J.R., Morales-López, J. Inhibitory effect of essential oils against Colletotrichum gloeosporioides and Rhizopus stolonifer in stored papaya fruit and their possible application in coatings. Postharvest Biology and Technology, 57, 132–137, (2010)

Bynum, E.D., Archer, T.L., Plapp, F.W. Comparison of banks Grass Mite and Two-spotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae): responses to insecticides alone and synergistic combinations. *J Econ Entomol*, 90,1125–1130, (1997).

Carpinella, M.C., Giorda, L.M., Ferrayoli, C.G., Palacios, S.M., Antifungal Effects of Different Organic Extracts from *Melia azedarach* L. on Phytopathogenic Fungi and Their Isolated Active Components. *J. Agric. Food Chem*, 51, 2506-2511, (2003).

Carpinella, M.C., C.G Ferrayoli y S.M Palacios. Antifungal Synergistic Effect of Scopoletin, a Hydroxycoumarin Isolated from *Melia azedarach* L. Fruits. *J. Agric. Food Chem*, 53, 2922-2927(2005).

Casanova, H., C, Ortiz., C. Pelaez., A. Vallejo., M. Moreno., M. Acevedo. Insecticide Formulations Based on Nicotine Oleate Stabilized by Sodium Caseinate. *J. Agric. Food Chem*, 50, 6389-6394 (2002).

Casanova, H., P. Araque y C. Ortiz. Nicotine Carboxylate Insecticide Emulsions: Effect of the Fatty Acid Chain Length. *J. Agric. Food Chem*, 53, 9949-9953 (2005).

Darriet, F., V. Corbel y J.M. Hougard. Efficacy of mosquito nets treated with a pyrethroid organophosphorous mixture against Kdr<sub>-</sub> and Kdr<sub>+</sub> malaria vectors (*Anopheles gambiae*). *Parasite*, 10, 359–62 (2003).

Dayan, E.F., L.C. Cantrell y O.S. Duke. Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4022–4034 (2009).

Duso, C., Malagnini V., Pozzebon A., Castagnoli M., Liguori M., Simoni S., Comparative toxicity of botanical and reduced-risk insecticides to Mediterranean populations of *Tetranychus urticae* and *Phytoseiulus persimilis* (Acari Tetranychidae, Phytoseiidae) *Biological Control*, 47, 16–21 (2008).

Hao, W., G. Zhong., M. Hu., J. Luo., Q. Weng y M. Rizwan-ul-Haq. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 39–43 (2010).

Inouye, S., K. Uchida y S. Abe. Volatile Composition and Vapour Activity Against *Trichophyton mentagrophytes* of 36 Aromatic Herbs Cultivated in Chichibu District in Japan, *The International Journal of Aromatherapy* 159–168 (2006).

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

Kyanko, V.M., Russo, L.M., Fernández, M., Pose, G. Efectividad del Ácido Peracético sobre la reducción de la carga de Esporas de Mohos causantes de Pudrición Poscosecha de Frutas y Hortalizas, *Información Tecnológica*, 21(4), 125-130 (2010).

Marín, S., Ramos, J.A., Sanchis, V. Chemical Control of Mycotoxigenic, in *Fungi. Mycotoxins in Fruits and Vegetables* by R. Barkay-Golan and Paster, N. pp, 279-296 Elsevier (2008).

Martin, T., O.G. Ochou., M. Vaissayre y D. Fournier. Organophosphorous insecticides synergise pyrethroids in the resistant strain of cotton bollworm/helicoverpa armigera (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *J. Econ Entomol*, 96, 474–8 (2003).

Moretto, A. Exposure to multiple chemicals: when and how to assess the risk from pesticide residues in food. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 556-563 (2008).

Morgan, D.E. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4096-4105 (2009).

Monsálvez, M., Zapata, N., Vargas, M., Berti, M., Bittnerb, M., Hernández, V. Antifungal effects of n-hexane extract and essential oil of *Drimys winteri* bark against Take-All disease. *Industrial Crops and Products*, 31, 239–244 (2010).

Passreiter, M.C. y B.M. Isman. Antifeedant Bioactivity of Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata* and their Antagonism by  $\gamma$ -Aminobutyric Acid. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, No. 5, 371-377 (1997).

Pennetier, C., V. Corbel., P. Boko., A. Odjo., R. N'Guessan, B. Lapie y J. Hougard. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 6,(38) (2007).

Peñalosa, A.G., Pelaez, J.C. Evaluación de la Actividad Biológica de Extractos de *crotalaria juncea* Mediante el Modelo *Drosophila melanogaster*, *Vitae*, 15 (2), 279-284 (2008).

Rakotonirainy, M.S y B. Lavédrine. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *Int Biodeterior Biodegrad*, 55, 141–147 (2005).

Razzaghi-Abyaneh, M., A. Allameh., T. Tiraihi., M. Shams-Ghahfarokhi y M. Ghorbanian. Morphological alterations in toxigenic *Aspergillus parasiticus* exposed to neem (*Azadirachta indica*) leaf and seed aqueous extracts. *Mycopathologia*, 159, 565–570, (2005).

Reffstrup, T.K., J.C. Larsen y O. Meyer. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56, 174–192 (2010).

Rocha, G.V., S.G de Almeida., B. R.M. Regitano D'Arce., M.M. Duarte., J.O. Brito., G.F. da Silva y otros 5 autores. Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare, *Journal of Stored Products Research*, 45, 108-111,(2009).

Shaan, E.A., Canyon, D., Younes, M.W., Wahab, H.A., Mansour, A.K A review of Botanical Phytochemicals with mosquitocidal Potential. *Environment International*, 31, 1149-1166 (2005).

Schelz, Z., J. Molnar y J. Hohmann, Antimicrobial and Antiplasmid Activities of Essential oils, *Fitoterapia*, 77, 279-285. (2006).

Tzortzakis, G.N., Economakis, D.C., Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 253–258 (2007)

Yen, T y S. Chang. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology*, 99, 232–236 (2008).

Wadley, F.M. In: USDA, Washington, DC (Ed.), *Experimental Statistics in Entomology*. Graduate School Press, U.S.D.A., Washington, pp. 1–333 (1967).

Zhou, X., Li, Yongquan., Xin Chen. Computational identification of bioactive natural products by structure activity relationship. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 24, 38-45 (2010).

Zapata, N., F. Budia., Vifiuela, E y P. Medina. Laboratory Evaluation of Natural Pyrethrins, Pymetrozine and Triflumuron as Alternatives to Control *Ceratitis capitata* Adults. *Phytoparasitica*, 34(4):420-427, (2006).

