



ACTIVIDAD INSECTICIDA DE ACEITES ESENCIALES DE DOS ESPECIES DE *Eucalyptus* SOBRE *Rhyzopertha dominica* Y SU EFECTO EN ENZIMAS DIGESTIVAS DE PROGENIES

INSECTICIDAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM TWO *Eucalyptus* SPECIES ON *Rhyzopertha dominica* (COLEOPTERA: BOSTRICHIDAE) AND ITS EFFECTS ON DIGESTIVE ENZYMES OF PROGENIES

Ramiro Reyes-Guzmán¹; Jesús Borboa-Flores^{1*}; Francisco J. Cinco-Moroyoqui¹; Ema C. Rosas-Burgos¹; Pablo S. Osuna-Amarillas¹; Francisco J. Wong-Corral¹; María M. Ortega-Nieblas²; Juan D. D. León-Lara³

¹Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos,

²Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas,

³Departamento de Ingeniería Industrial, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, col. Centro. C. P. 83000. Hermosillo, Sonora, México.

Correo-e: jborboa@guayacan.uson.mx (*Autor para correspondencia).

RESUMEN

La fracción volátil de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus camadulensis* se utilizaron para evaluar su actividad insecticida sobre el barrenador menor de los granos *Rhyzopertha dominica* (F.). Muestras de granos de trigo fueron infestadas con el insecto y expuestas a los vapores de diferentes volúmenes (5, 10 y 15 µL) de los aceites por diferentes periodos (24, 48 y 72 h). La actividad enzimática amilolítica y proteolítica se determinaron en las progenies (F1) que emergieron de los granos. Ambos aceites ocasionaron una estimulación en la actividad enzimática amilolítica y proteolítica de las progenies; sin embargo, solamente *E. globulus* ocasionó la muerte de éstas ($P < 0.05$). Al incrementar el volumen de aceite de *E. camadulensis*, la actividad proteolítica del insecto aumentó, incluso al mayor tiempo de exposición. Los resultados de este estudio muestran que la fracción volátil de los aceites esenciales de eucalipto, especialmente la de *E. globulus*, es un agente insecticida efectivo para el control de *R. dominica* en trigo almacenado.

Recibido: 10 de marzo de 2012
Aceptado: 17 de agosto de 2012
doi: 10.5154/r.rchscfa.2012.02.015
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE: Eucaliptos, mortalidad, barrenador menor de los granos, amilólisis, proteólisis, trigo.

ABSTRACT

The volatile fraction of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camadulensis* was used to evaluate their effective insecticidal toxicity against the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* (F.). Wheat grain samples were infested with the beetle and exposed to the vapors of different volumes (5, 10 and 15 µL) of the essential oils for different periods (24, 48 and 72 h). Emerging adults from each wheat sample were counted and analyzed in terms of amyolytic and proteolytic activity. Both essential oils were effective at promoting high amyolytic and proteolytic activity in emerged progenies, but only *E. globulus* caused lethal effects on the progenies ($P < 0.05$). By increasing the volume of *E. camadulensis* oil, the proteolytic activity of the insect increased, even at longest exposure time. The results of this study show that the volatile fraction of the essential oils from eucalyptus, especially *E. globulus*, is an effective insecticidal agent for controlling *R. dominica* in stored wheat.

KEYWORDS: Eucalyptus, mortality, lesser grain borer, amyolysis, proteolysis, wheat.

INTRODUCCIÓN

El insecto *Rhyzopertha dominica* es una de las especies más destructoras y con mayor abundancia y distribución en grano de trigo almacenado (Cuperus, Prickett, Bloome, & Pits, 1986). Los insectos que infestan al grano de trigo durante su almacenamiento poseen un sistema enzimático muy eficiente que les permite alimentarse exitosamente causando grandes pérdidas económicas. En el caso de *R. dominica*, el insecto posee varias isoamilasas que hidrolizan eficientemente el almidón del grano de trigo (Cinco-Moroyoqui et al.,

INTRODUCTION

The insect *Rhyzopertha dominica* is one of the most destructive species and is the most prevalent in stored wheat grain (Cuperus, Prickett, Bloome, & Pits, 1986). Insects that infest wheat grain during storage have a very efficient enzyme system which enables them to feed successfully, resulting in great economic losses. In the case of *R. dominica*, the insect has several isoamylases that efficiently hydrolyze the starch in wheat grain (Cinco-Moroyoqui et al., 2008; Cinco-Moroyoqui, Rosas-Burgos, Borboa-Flores, & Cortez-Rocha, 2006), as well

2008; Cinco-Moroyoqui, Rosas-Burgos, Borboa-Flores, & Cortez-Rocha, 2006), así como varias enzimas del tipo serina proteasas (Zhu & Baker, 1999). Diversos estudios han demostrado que la presencia de inhibidores en la dieta de los insectos los induce a producir enzimas más resistentes como un mecanismo de adaptación para contrarrestar el efecto de los inhibidores (Oppert, Morgan, Hartzler, & Kramer, 2005).

Durante las últimas décadas, las medidas de control sobre las plagas que atacan los granos almacenados están limitadas al empleo de productos químicos líquidos o gaseosos, que resultan peligrosos para la salud de los animales y el ambiente (Isman, 2000). El control de *R. dominica* generalmente se lleva a cabo con pesticidas como fosfina (Schlipalius, Cheng, Reilly, Collins, & Ebert, 2002), con el cual el insecto presenta resistencia como resultado de una adaptación genética para contrarrestar su efecto letal (Rajendran & Gunasekaran, 2002). Los métodos alternativos para reducir la infestación de *R. dominica* han incluido el uso de tierras diatomáceas (Vardeman, Arthur, Nechols, & Campbell, 2006), formato de etilo en combinación con dióxido de carbono (Haritos, Damcevski, & Dojchinov, 2006), spinosad (Daglish & Nayak, 2006), así como la producción de variedades de trigo resistentes (Watts & Dunkel, 2003).

El empleo incorrecto e indiscriminado de biocidas ha propiciado el desarrollo de especies de insectos resistentes (Tyler, Taylor, & Rees, 1983). Para resolver estos problemas, se han llevado a cabo numerosos estudios utilizando compuestos naturales como los aceites esenciales de eucaliptos, en cuya composición se encuentran sustancias volátiles aromáticas (Zhang, An, Wu, Stanton, & Lemerle, 2010). Se ha encontrado que los compuestos fenólicos presentes en los aceites esenciales interactúan con grupos químicos de enzimas a través de puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas aumentando su actividad antibacteriana (Ouattara, Simard, Holley, Piette, & Bégin, 1997). En este contexto, los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto insecticida de la fracción volátil de los aceites esenciales de *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh) y *Eucalyptus globulus* (Labill) en el control de *R. dominica* en trigo almacenado, así como evaluar el efecto de dichos aceites en la actividad amilolítica y proteolítica de las progenies del insecto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Los aceites esenciales evaluados en este estudio fueron obtenidos de *E. camaldulensis* y *E. globulus*. El primero fue obtenido de hojas de eucalipto colectadas en la primavera de 2011 en un sitio ubicado en las coordenadas geográficas 29° 00' 44" LN y 111° 08' 02" LE. La identificación de *E. camaldulensis* se hizo en el

as several serine-type protease enzymes (Zhu & Baker, 1999). Several studies have shown that the presence of inhibitors in the diet of insects induces them to produce more resistant enzymes as an adaptation mechanism to counteract the effect of the inhibitors (Oppert, Morgan, Hartzler, & Kramer, 2005).

In recent decades, control measures on pests that attack stored grains have been limited to the use of liquid or gaseous chemical products, which are hazardous to animal and environmental health (Isman, 2000). Control of *R. dominica* is generally carried out with pesticides such as phosphine (Schlipalius, Cheng, Reilly, Collins, & Ebert, 2002), to which the insect presents resistance as a result of a genetic adaptation to counteract its lethal effect (Rajendran & Gunasekaran, 2002). Alternative methods to reduce *R. dominica* infestation have included the use of diatomaceous earth (Vardeman, Arthur, Nechols, & Campbell, 2006), ethyl formate in combination with carbon dioxide (Haritos, Damcevski, & Dojchinov, 2006), spinosad (Daglish & Nayak, 2006), and the production of resistant wheat varieties (Watts & Dunkel, 2003).

Incorrect and indiscriminate use of biocides has led to the development of resistant insect species (Tyler, Taylor, & Rees, 1983). To resolve these problems, numerous studies have been carried out using naturally occurring compounds such as eucalyptus essential oils, whose composition includes aromatic volatiles (Zhang, An, Wu, Stanton, & Lemerle, 2010). It has been found that phenolic compounds present in the essential oils interact with chemical groups of enzymes through hydrogen bonding or hydrophobic interactions, thereby increasing their antibacterial activity (Ouattara, Simard, Holley, Piette, & Bégin, 1997). In this context, the objectives of this study were to evaluate the insecticidal effect of the volatile fraction of essential oils obtained from *Eucalyptus camaldulensis* (Dehnh) and *Eucalyptus globulus* (Labill) on the control of *R. dominica* in stored wheat, as well as to evaluate the effect of these oils on the amylolytic and proteolytic activity of the progeny of the insect.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

Essential oils assessed in this study were obtained from *E. camaldulensis* and *E. globulus*. The former was obtained from eucalyptus leaves collected in the spring of 2011 at a site located at geographical coordinates 29° 00' 44" NL and 111° 08' 02" EL. Identification of *E. camaldulensis* was made in the herbarium of the Department of Scientific and Technological Research at the University of Sonora (Voucher 2011-225; herbarium catalog 17,277) (McClintock, 1993). The essential oil of *E. globulus* (Soria Natural brand)

herbario del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (Voucher 2011-225; catálogo del herbario 17277) (McClintock, 1993). El aceite esencial de *E. globulus* (marca Soria Natural) fue adquirido a través de la distribuidora Herbofarm (Madrid, España), el cual se obtiene por arrastre de vapor de agua en gran escala con un grado de pureza de 99 %.

Extracción del aceite esencial de *E. camaldulensis*

Las hojas de eucalipto fueron secadas a la sombra a 25 ± 5 °C por dos semanas acorde con lo recomendado por Moreno, López, y Siche (2010). La extracción del aceite esencial se hizo con la técnica de arrastre de vapor empleando un equipo extractor de destilación tipo Clevenger, de acuerdo con el método oficial 6.0006 de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990).

Insectos de *R. dominica*

Los ejemplares de *R. dominica* provinieron de una colonia desarrollada en el laboratorio de Entomología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Universidad de Sonora. La colonia se desarrolló bajo condiciones controladas de temperatura (27 ± 2 °C), humedad relativa (70 ± 5 %) y fotoperiodo (12L:12O). Después de siete días durante los cuales se llevó a cabo la oviposición, los insectos progenitores fueron removidos y los granos infestados se mantuvieron en incubación por 45 días adicionales para la emergencia de nuevos insectos. La progenie resultante fue empleada para infestar las muestras de grano de trigo que se expusieron a los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. camaldulensis*.

Bioensayo de mortalidad de *R. dominica*

Se acondicionaron tubos de polipropileno (Corning, 50 mL), modificándolos en la parte interna de las tapas para adherirles un trozo de esponja de poliuretano (0.5 x 0.5 cm). En cada uno de los tubos se agregaron 20 g de trigo y se infestaron con 20 ejemplares no sexados de *R. dominica*. Las esponjas fueron impregnadas con 5, 10 o 15 µL de aceite de *E. globulus* o de *E. camaldulensis*. Un tubo con trigo infestado y sin aceite fue empleado como control. Las tapas de los tubos fueron selladas con parafilm para impedir pérdidas de compuestos volátiles de los aceites y después se colocaron en una cámara de incubación (VWR Scientific Inc.) a 27 ± 2 °C y 70 ± 5 % RH. Los tiempos de exposición del insecto al aceite fueron de 24, 48 y 72 h. El experimento se realizó por triplicado. Al final de cada tiempo de exposición, los insectos fueron removidos y la tasa de mortalidad fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación publicada por Abbott (1925):

$$\text{mortalidad} = \frac{\% \text{ muertos tratados} - \% \text{ muertos control}}{100 - \% \text{ muertos control}} \times 100$$

was acquired through the distributor Herbofarm (Madrid, Spain); the oil is obtained by large-scale steam distillation with a purity of 99 %.

Extraction of *E. camaldulensis* essential oil

Eucalyptus leaves were dried in the shade at 25 ± 5 °C for two weeks in accordance with the recommendations by Moreno, López, and Siche (2010). Essential oil extraction was undertaken with the steam stripping technique using a Clevenger distillation extractor, in accordance with official method 6.0006 of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990).

R. dominica insects

Specimens of *R. dominica* came from a colony developed in the entomology laboratory of the Graduate Food Research Department at the University of Sonora. The colony was developed under controlled temperature (27 ± 2 °C), relative humidity (70 ± 5 %) and photoperiod (12L: 12D) conditions. After seven days, during which oviposition occurred, parent insects were removed and infested grains remained in incubation for 45 additional days for the emergence of new insects. The resulting progeny was used to infest wheat grain samples that were exposed to the essential oils from *E. globulus* and *E. camaldulensis*.

Bioassay of *R. dominica* mortality

Polypropylene tubes (Corning, 50 mL) were conditioned by modifying the inside of the lids in order to adhere a piece of polyurethane foam (0.5 x 0.5 cm) to them. Then 20 g of wheat were added to each tube and infested with 20 unsexed specimens of *R. dominica*. The sponges were impregnated with 5, 10 or 15 µL of *E. globulus* or *E. camaldulensis* oil. A tube with infested wheat and no oil was used as the control. The lids of the tubes were sealed with parafilm to prevent losses of volatile compounds in the oils and then placed in an incubation chamber (VWR Scientific Inc.) at 27 ± 2 °C and 70 ± 5 % RH. Exposure times of the insects to the oil were 24, 48 and 72 h. The experiment was performed in triplicate. At the end of each exposure time, insects were removed and the mortality rate was calculated according to the following equation published by Abbott (1925):

$$\text{mortality} = \frac{\% \text{ dead by exposure} - \% \text{ dead by no exposure}}{100 - \% \text{ dead by no exposure}} \times 100$$

The wheat grains were once again incubated for 45 days without exposure to essential oils, under the above conditions described for the emergence of new individuals. The resulting progeny were collected and used to evaluate their amyolytic and proteolytic enzyme activity.

Los granos de trigo fueron nuevamente incubados por 45 días sin exposición a los aceites esenciales, bajo las condiciones anteriormente descritas para la emergencia de nuevos individuos. Las progenies resultantes fueron colectadas y empleadas para evaluar su actividad enzimática amilolítica y proteolítica.

Obtención de extractos enzimáticos de progenies de *R. dominica*

Los extractos enzimáticos se prepararon utilizando el procedimiento de Cinco-Moroyoqui et al. (2008). Las progenies que emergieron de las muestras de trigo expuestas a los vapores de aceites esenciales se colectaron y maceraron en un mortero de porcelana. En el macerado se utilizaron 10 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM, pH 8, conteniendo NaCl 20 mM y CaCl₂ 10 mM (solución A). Posteriormente, el macerado se centrifugó a 4 °C por 30 min a 10,000 g. Los sobrenadantes fueron pasados a través de filtros de nylon Cameo 17N (0.45 µm; Osmomics Laboratory Products, Minnetonka, MN, USA). De cada extracto enzimático se tomaron alícuotas de 2 mL y se purificaron parcialmente mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en columnas de vidrio (1 x 5 cm) empacadas con fenil sefarosa CL-4B (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y equilibradas con Tris-HCl 20 mM, pH 8, conteniendo NaCl 20 mM, CaCl₂ 10 mM y sulfato de amonio al 25 % de saturación (solución B). Las proteínas que no se unieron a la columna fueron eluidas con aproximadamente 15 mL de la solución B. Por otra parte, las proteínas con actividad amilolítica y proteolítica fueron eluidas agregando aproximadamente 20 mL de Tris-HCl 20 mM, pH 8, conteniendo NaCl 20 mM, CaCl₂ 10 mM y etilenglicol al 20 % (v/v) (solución C). Se colectaron fracciones de 3 mL y se analizó la actividad enzimática correspondiente. Las fracciones con actividad amilolítica y proteolítica fueron combinadas y empleadas como fuente de actividad enzimática sin purificación adicional.

Determinación de la actividad enzimática de las progenies de *R. dominica*

La determinación de la actividad amilolítica y proteolítica de las progenies de *R. dominica* se realizó mediante el procedimiento descrito por Cinco-Moroyoqui et al. (2008) y Kakade, Rackis, McGhee, y Puski (1974), respectivamente.

Determinación de proteína en extractos enzimáticos

La determinación de proteína en los extractos enzimáticos obtenidos de la cromatografía de interacción hidrofóbica fue llevada a cabo de acuerdo con el procedimiento de Bradford (1976) usando seroalbúmina como estándar.

Análisis estadístico

El experimento se realizó con tres réplicas empleando

Collection of enzymatic extracts of *R. dominica* progeny

The enzymatic extracts were prepared using the procedure described by Cinco-Moroyoqui et al. (2008). The progeny that emerged from the wheat samples exposed to the essential oil vapors were collected and macerated in a porcelain mortar. In the mash, 10 mL of 20 mM Tris-HCl, pH 8 buffer solution containing 20 mM NaCl and 10 mM CaCl₂ (solution A), were used. Subsequently, the mash was centrifuged at 4 °C for 30 min at 10,000 g. The supernatants were passed through Cameo 17N nylon filters (0.45 µm; Osmomics Laboratory Products, Minnetonka, MN, USA). From each enzymatic extract, aliquots of 2 mL were taken and partially purified by hydrophobic interaction chromatography in glass columns (1 x 5 cm) packed with phenyl sepharose CL-4B (Sigma Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8, containing 20 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ and ammonium sulfate at 25 % saturation (solution B). The proteins that did not bind to the column were eluted with approximately 15 mL of solution B. On the other hand, proteins with amylolytic and proteolytic activity were eluted by adding approximately 20 mL of 20 mM Tris-HCl, pH 8, containing 20 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ and 20 % ethylene glycol (v/v) (solution C). Fractions of 3 mL were collected and the corresponding enzymatic activity was analyzed. Fractions with amylolytic and proteolytic activity were pooled and used as a source of enzymatic activity without further purification.

Determination of enzymatic activity of *R. dominica* progeny

Determination of the amylolytic and proteolytic activity of the *R. dominica* progeny was performed using the procedure described by Cinco-Moroyoqui et al. (2008) and Kakade, Rackis, McGhee, and Puski (1974), respectively.

Determination of protein in enzymatic extracts

Protein determination in the enzymatic extracts obtained from hydrophobic interaction chromatography was performed according to the method described by Bradford (1976), using serum albumin as the standard.

Statistical Analysis

The experiment was performed with three replicates using a completely randomized design with a factorial arrangement having the following sources of variation: oil source with two levels (*E. globulus* and *E. camaldulensis*), oil volume with four levels (0, 5, 10 and 15 µL) and exposure time with three levels (24, 48 and 72 h). The response variables were insect mortality, emergence percentage, amylolytic and proteolytic enzymatic activity

un diseño completamente al azar con arreglo factorial teniendo como fuentes de variación: fuente de aceite con dos niveles (*E. globulus* y *E. camaldulensis*), volumen de aceite con cuatro niveles (0, 5, 10 y 15 µL) y tiempo de exposición con tres niveles (24, 48 y 72 h). Las variables respuestas fueron porcentaje de mortalidad, emergencia de insectos y actividad enzimática amilolítica y proteolítica de las progenies. Se hizo un análisis de varianza y una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$), empleando el paquete estadístico JMP versión 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mortalidad de *R. dominica*

En el Cuadro 1 se puede apreciar que la fracción volátil del aceite esencial de *E. globulus* causó significativamente una mortalidad mayor de la población de *R. dominica* que el aceite de *E. camaldulensis* ($P < 0.05$). El aceite de *E. globulus* ocasionó el 100 % de mortalidad del insecto a cualquier dosis del aceite y en todos los tiempos de exposición del grano. El volumen de aceite más elevado (15 µL) y el mayor tiempo de exposición del grano de trigo (72 h) a *E. camaldulensis*, ocasionaron sólo una mortalidad máxima de aproximadamente 32 %. Sin embargo, se observó un comportamiento de segundo orden ($r = 0.88$) al hacer un análisis gráfico (no mostrado) de los datos de mortalidad en los tres tiempos de exposición del grano infestado al aceite. En este análisis se encontró que la máxima mortalidad de *R. dominica* que *E. camaldulensis* ocasionó al insecto se alcanzó a las 48 h sin observarse un cambio significativo a tiempos mayores de exposición ($P < 0.05$) (Cuadro 1). El aceite de *E. camaldulensis* ha sido reportado como uno de los causantes de mayor mortalidad en insectos que dañan granos almacenados (Negahban & Moharra-

of the progeny. Analysis of variance and Tukey's comparison of means test ($P < 0.05$) were performed using JMP version 8 statistical software.

RESULTS AND DISCUSSION

R. dominica mortality

Table 1 shows that the volatile fraction of *E. globulus* essential oil caused significantly higher mortality of the *R. dominica* population than the *E. camaldulensis* oil ($P < 0.05$). *E. globulus* oil caused 100 % insect mortality at any oil dose and at all grain exposure times. The highest oil volume (15 µL) and longest wheat grain exposure time (72 h) to *E. camaldulensis* caused only a maximum mortality rate of approximately 32 %. However, a second-order behavior ($r = 0.88$) was observed by making a graphical analysis (not shown) of *R. dominica* mortality data in the three exposure times of the infested grain to the oil. This analysis found that the highest insect mortality that *E. camaldulensis* caused was reached at 48 h with no significant change observed over longer exposure times ($P < 0.05$) (Table 1). *E. camaldulensis* oil has been reported as one of the causes of increased mortality in insects that damage stored grain (Negahban & Moharrampour, 2007), although in this study *R. dominica* was more resistant to the toxic effect of this oil.

The results suggest that differences in mortality caused by the volatile fraction of the two types of eucalyptus oil may be due to the concentration of active components. The variation in them can be caused by factors such as the age of the plant, season of the year and sampling site (Siramon & Ohtani, 2007; Zhang et al., 2010). However, the efficiency of *E. globulus* in the high mortality of *R. dominica* at low doses and short exposure times shows that it would be the oil to select for controlling insect infestation in stored wheat.

CUADRO 1. Porcentaje de mortalidad de poblaciones de *Rhyzopertha dominica* en trigo expuesto a la fracción volátil de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus camaldulensis*.

TABLE 1. Mortality rate of *Rhyzopertha dominica* populations in wheat exposed to the volatile fraction of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*.

Volumen de aceite (µL) / Oil volume (µL)	<i>E. globulus</i> Tiempo (h) / Time (h)			<i>E. camaldulensis</i> Tiempo (h) / Time (h)		
	24	48	72	24	48	72
0	0 (a)B	0 (a)B	0 (a)B	0 (a)C	0 (a)C	0 (a)C
5	98.3 ± 0.6 ^{(a)A}	100 (a)A	100 (a)A	8.3 ± 0.6 (b)B	11.7 ± 1.2 (b)B	21.7 ± 0.6 ^{(a)B}
10	100 (a)A	100 (a)A	100 (a)A	13.3 ± 0.6 ^{(b)B}	20.0 ± 1.0 ^{(ab)A}	23.3 ± 1.5 ^{(a)B}
15	100 (a)A	100 (a)A	100 (a)A	25.0 ± 1.0 ^{(a)A}	26.7 ± 0.6 ^{(a)A}	31.7 ± 1.2 ^{(a)A}

Los valores son el promedio de tres réplicas. ± Desviación estándar de la media. Valores con letra minúscula diferente en una fila dentro de una misma fuente de aceite son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P < 0.05$. Valores con letra mayúscula diferente en una columna dentro de una misma fuente de aceite son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P < 0.05$.

The values are the average of three replicates. ± Standard deviation of the mean. Values with a different lowercase letter in a row within a single source of oil are different according to Tukey's test at $P < 0.05$. Values with a different capital letter in a column within a single source of oil are different according to Tukey's test at $P < 0.05$.

mipour, 2007), aunque en este estudio *R. dominica* fue más resistente al efecto tóxico de dicho aceite.

Los resultados obtenidos sugieren que las diferencias en la mortalidad ocasionada por la fracción volátil de los aceites de los dos tipos de eucalipto pueden deberse a la concentración de componentes activos. La variación de éstos puede ser producto de factores tales como la edad de la planta, estación climática del año y sitio de recolecta (Siramón & Ohtani, 2007; Zhang et al., 2010). Sin embargo, la eficiencia de *E. globulus* en la alta mortalidad de *R. dominica* a dosis bajas y tiempos cortos de exposición, deja de manifiesto que sería el aceite a seleccionar para controlar la infestación del insecto en el trigo almacenado.

Emergencia de *R. dominica*

En el Cuadro 2 se muestra el número de insectos emergidos de las muestras de trigo expuestas a los vapores de los aceites de eucaliptos. Se puede observar que el número de las progenies emergidas del trigo expuesto a cualquier dosis del aceite de *E. globulus* fue significativamente menor solamente hasta las 72 h de exposición. Además, se observó que a medida que se incrementó la dosis de aceite, el número de progenies emergidas fue progresivamente menor, siendo nulo a dosis de 10 y 15 μL a las 72 h de exposición ($P < 0.05$). Se ha reportado que el uso del aceite de *E. globulus* disminuye la ovoposición de *R. dominica* (Batish, Pal-Singh, Kohli, & Kaur, 2008) y afecta la emergencia de *Sitophilus zeamais* en granos de maíz causando altas tasas de mortalidad (Mossi et al., 2011). En contraste con *E. globulus*, la emergencia de progenies de *R. dominica* en el trigo expuesto al aceite de *E. camaldulensis*,

Emergence of *R. dominica*

Table 2 shows the number of insects that emerged from wheat samples exposed to eucalyptus oil vapors. It can be seen that the number of progenies that emerged from wheat exposed to any dose of *E. globulus* oil was significantly lower only up to 72 hours of exposure. It was also observed that as the oil dose increased, the number of emerged progenies was progressively lower, being zero at doses of 10 and 15 μL at 72 h of emergence ($P < 0.05$). It has been reported that the use of *E. globulus* oil decreases *R. dominica* oviposition (Batish, Pal-Singh, Kohli, & Kaur, 2008) and affects the emergence of *Sitophilus zeamais* in maize grains, causing high mortality rates (Mossi et al., 2011). In contrast to *E. globulus*, emergence of *R. dominica* progeny in wheat exposed to *E. camaldulensis* oil, with all volumes evaluated and at all exposure times, was not significantly affected ($P < 0.05$) (Table 2). *E. camaldulensis* essential oil has been reported as an effective agent for reducing the population of insects in stored grains (Naseem & Khan, 2011; Negahban & Moharrampour, 2007); however, in this study it was not effective in reducing the emergence of *R. dominica* progenies.

Enzymatic activity of *R. dominica* progeny

Amylolytic activity. The progeny of *R. dominica* that emerged from wheat exposed to vapors of essential oils obtained from *E. globulus* and *E. camaldulensis* showed that amylolytic activity values increased with increasing exposure time and oil volume used (Table 3). However, the amylolytic activity of the progeny of insects exposed to *E. globulus* oil was higher than those exposed to that of *E. camaldulensis* ($P < 0.05$). *E. globulus* oil was more

CUADRO 2. Número de individuos en las progenies de *Rhyzopertha dominica* emergidos de muestras de trigo expuestas a la fracción volátil de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus camaldulensis*.

TABLE 2. Number of individuals in the progeny of *Rhyzopertha dominica* that emerged from wheat samples exposed to the volatile fraction of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*.

Volumen de aceite (μL) / Oil volume (μL)	<i>E. globulus</i> Tiempo (h) / Time (h)			<i>E. camaldulensis</i> Tiempo (h) / Time (h)		
	24	48	72	24	48	72
0	32.6 \pm 2.5 (a) ^A	34.3 \pm 4.0 (a) ^A	32.0 \pm 2.0 (a) ^A	31.3 \pm 2.3 (a) ^A	31.7 \pm 3.2 (a) ^A	30.0 \pm 1.0 (a) ^A
5	26.7 \pm 2.5 (a) ^B	25.0 \pm 1.0 (a) ^B	1.7 \pm 1.5 (b) ^B	27.3 \pm 5.5 (a) ^{AB}	29.3 \pm 1.5 (a) ^{AB}	26.3 \pm 2.5 (a) ^A
10	22.3 \pm 2.09 (a) ^C	22.3 \pm 0.6 (a) ^B	0.0 (b) ^B	22.0 \pm 4.3 (a) ^{BC}	22.0 \pm 3.4 (a) ^{BC}	24.3 \pm 2.5 (a) ^A
15	20.0 \pm 1.7 (a) ^C	14.0 \pm 1.7 (b) ^C	0.0 (c) ^B	15.7 \pm 6.5 (b) ^C	14.0 \pm 7.5 (b) ^C	29.3 \pm 5.0 (a) ^A

Los valores son el promedio de tres réplicas. \pm Desviación estándar de la media. Valores con letra minúscula diferente en una fila dentro de una misma fuente de aceite son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P < 0.05$. Valores con letra mayúscula diferente en una columna dentro de una misma fuente de aceite son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P < 0.05$.

The values are the average of three replicates. \pm Standard deviation of the mean. Values with a different lowercase letter in a row within a single source of oil are different according to Tukey's test at $P < 0.05$. Values with a different capital letter in a column within a single source of oil are different according to Tukey's test at $P < 0.05$.

con todos los volúmenes evaluados y en todos los tiempos de exposición, no fue afectada significativamente ($P < 0.05$) (Cuadro 2). El aceite esencial de *E. camaldulensis* ha sido reportado como un agente efectivo para reducir la población de insectos de granos almacenados (Naseem & Khan, 2011; Negahban & Moharrampour, 2007); sin embargo, en el presente estudio no fue eficaz para reducir la emergencia de progenies de *R. dominica*.

Actividad enzimática de progenies de *R. dominica*

Actividad amilolítica. Las progenies de *R. dominica* que emergieron del trigo expuesto a los vapores de aceites esenciales de *E. globulus* y *E. camaldulensis* mostraron valores de actividad amilolítica que incrementaron a medida que aumentó el tiempo de exposición y el volumen de aceite empleado (Cuadro 3). Sin embargo, la actividad amilolítica de las progenies del insecto expuestas al aceite de *E. globulus* fue mayor que las expuestas al de *E. camaldulensis* ($P < 0.05$). El aceite de *E. globulus* fue más eficaz causando la muerte de las progenies desde la dosis de 5 μL a 72 h de exposición. En el caso de las progenies expuestas al aceite de *E. camaldulensis*, la actividad amilolítica aumentó pero sin provocar la muerte de éstas. Los resultados sugieren que los aceites esenciales ejercen un efecto activador del metabolismo de los insectos para sintetizar una mayor cantidad de enzimas amilolíticas, y así contrarrestar el efecto insecticida, permitiéndole al insecto digerir el almidón del grano. Es interesante notar que las progenies que emergieron de las muestras de trigo expuestas a 72 h a cualquier dosis del aceite presentaron los valores más elevados de actividad amilolítica ($P < 0.05$). Adicionalmente, se observó que la actividad amilolítica está relacionada de manera inversa con el número de indivi-

effective killing the progenies with the dose of 5 μL at 72 h exposure. In the case of progenies exposed to *E. camaldulensis* oil, amyolytic activity increased but without causing their death. The results suggest that the essential oils exert an activator effect on the metabolism of the insects to synthesize a larger amount of amyolytic enzymes, thus counteracting the insecticidal effect and enabling the insect to digest the grain starch. Interestingly, progenies that emerged from wheat samples with 72 h exposure at any oil dose exhibited the highest amyolytic activity ($P < 0.05$). Additionally, it was observed that the amyolytic activity is inversely related to the number of progeny individuals, i.e. progenies with fewer individuals exhibited the highest amyolytic activity. These results suggest that *R. dominica* progeny activate metabolic mechanisms of resistance to chemicals that affect their survival. In other words, this can be described as a physiological adaptation of the insect to survive and feed on the wheat grain that it is infesting. Cinco-Moroyoqui et al. (2006) observed that wheat varieties with high inhibitor concentrations of the enzyme α -amylase resulted in increased amyolytic activity in progenies of the insect reared on the same grains. Hamedo and El Shamy (2008) found that the essential oil from *Eucalyptus rostrata* resulted in increased amyolytic activity by *Trichoderma virens* and *Fusarium solani*. Other studies have reported the enzymatic adaptation of insects in the presence of fumigants to survive, resulting in a metabolic cost for adaptation and resistance to the stress caused (Silva, Lopes, Oliveira, & Guedes, 2010).

Proteolytic activity. Essential oils from *E. globulus* and *E. camaldulensis* promoted an increase in the proteolytic activity of the progeny of *R. dominica* (Table 4). An exception was observed with *E.*

CUADRO 3. Actividad amilolítica* de las progenies de *Rhyzopertha dominica* emergidas de muestras de trigo expuestas a la fracción volátil de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus camaldulensis*.

TABLE 3. Amyolytic activity* of the *Rhyzopertha dominica* progeny that emerged from wheat samples exposed to the volatile fraction of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*.

Volumen de aceite (μL) / Oil volume (μL)	<i>E. globulus</i> Tiempo (h) / Time (h)			<i>E. camaldulensis</i> Tiempo (h) / Time (h)		
	24	48	72	24	48	72
0	342 \pm 12 (c)C	468 \pm 17 (b)C	530 \pm 14 (a)A	127 \pm 21 (c)C	260 \pm 8 (b)C	335 \pm 48 (a)D
5	512 \pm 30 (b)A	769 \pm 22 (a)B	0.0 (c)B	236 \pm 39 (b)B	228 \pm 11 (b)C	589 \pm 68 (a)C
10	472 \pm 24 (b)A	768 \pm 15 (a)B	0.0 (c)B	554 \pm 44 (c)A	682 \pm 50 (b)B	790 \pm 17 (a)B
15	439 \pm 13 (b)B	824 \pm 21 (a)A	0.0 (c)B	616 \pm 30 (c)A	750 \pm 11 (b)A	1,198 \pm 55 (a)A

Los valores son el promedio de tres réplicas. \pm Desviación estándar de la media. *La actividad amilolítica está expresada como actividad específica (unidades de actividad-mg proteína⁻¹). Valores con letra minúscula diferente en una fila dentro de una misma fuente de aceite son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P < 0.05$. Valores con letra mayúscula diferente en una columna dentro de una misma fuente de aceite son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey a una $P < 0.05$.

The values are the average of three replicates. \pm Standard deviation of the mean. *The amyolytic activity is expressed as a specific activity (activity units.mg protein⁻¹). Values with a different lowercase letter in a row within a single source of oil are different according to Tukey's test at $P < 0.05$. Values with a different capital letter in a column within a single source of oil are different according to Tukey's test at $P < 0.05$.

duos de las progenies; es decir, las progenies con menor número de individuos presentaron los valores más altos de actividad amilolítica. Estos resultados sugieren que las progenies de *R. dominica* activan mecanismos metabólicos de resistencia a los compuestos químicos que afectan su sobrevivencia. En otras palabras, esto se puede describir como una adaptación fisiológica del insecto para sobrevivir y nutrirse del grano de trigo que se encuentra infestando. Cinco-Moroyoqui et al. (2006) observaron que variedades de trigo con altas concentraciones de inhibidores de la enzima α -amilasa ocasionaron un incremento en la actividad amilolítica de progenies del insecto desarrolladas en los mismos granos. Hamedo y El Shamy (2008) observaron que el aceite esencial de *Eucalyptus rostrata* ocasionó un aumento en la actividad amilolítica de *Trichoderma virens* y *Fusarium solani*. Otros estudios han reportado la adaptación enzimática de los insectos en presencia de fumigantes para sobrevivir, lo cual ocasiona un costo metabólico para la adaptación y resistencia al estrés ocasionado (Silva, Lopes, Oliveira, & Guedes, 2010).

Actividad proteolítica. Los aceites esenciales de *E. globulus* y *E. camaldulensis* promovieron un incremento en la actividad proteolítica de las progenies de *R. dominica* (Cuadro 4). Una excepción fue la observada con el aceite de *E. globulus* que ocasionó una disminución de la actividad proteolítica con respecto al control, cuando se empleó un volumen de aceite de 5 μ L a tiempos de exposición de 24 y 48 h. Sin embargo, este volumen de aceite fue suficiente para ocasionar la muerte de la totalidad de los insectos a las 72 h ($P < 0.05$). Es importante hacer notar que en el resto de los casos, la actividad proteolítica se incrementó a medida que se

globulus oil, which caused a reduction in proteolytic activity relative to the control, when an oil volume of 5 μ L was used at exposure times of 24 and 48 h. However, this oil volume was sufficient to kill all the insects at 72 h ($P < 0.05$). It is important to note that in the other cases, proteolytic activity increased as the oil volume increased in each time exposure time. Between the two oil types, the observed values in the proteolytic activity showed no clear statistical differences in comparison with those observed in amylolytic activity. The effect of essential oils to kill microorganisms has been attributed to their inhibitory effect on the activity of enzymes such as proteases (Thoroski, Blank, & Biliaderis, 1989) and decarboxylases (Wendakoon & Sakaguchi, 1995).

CONCLUSIONS

The results of this study showed that the volatile fraction of *E. globulus* oil was more effective than that of *E. camaldulensis*, causing high mortality rates. Measurement of amylolytic and proteolytic activity of insect progeny that emerged from grains exposed to oil vapors allowed evaluating their toxic effect in a better way. The activities of both enzymes in the progenies increase when the insects are exposed to essential oils, which can be interpreted as a physiological way to counteract the toxic effects that these cause. The results indicate that the amylolytic activity is greater than the proteolytic activity. In the latter, there were no differences between the progenies that emerged from wheat grains exposed to the two oil sources. This leads to the conclusion that the essential oils cause an energy cost in the progenies, which eventually causes death.

CUADRO 4. Actividad proteolítica* de las progenies de *Rhyzopertha dominica* emergidas de muestras de trigo expuestas a la fracción volátil de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus camaldulensis*.

TABLE 4. Proteolytic activity* of the *Rhyzopertha dominica* progeny that emerged from wheat samples exposed to the volatile fraction of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*.

Volumen de aceite (μ L) / Oil volume	<i>E. globulus</i> Tiempo (h) / Time (h)			<i>E. camaldulensis</i> Tiempo (h) / Time (h)		
	24	48	72	24	48	72
0	72 \pm 8 (a)A	74 \pm 8 (a)B	73 \pm 7 (a)A	64 \pm 11 (c)BC	80.0 \pm 5 (a)C	70 \pm 1 (b)B
5	46 \pm 5 (a)B	54 \pm 5 (a)C	0.0 (b)B	68 \pm 7 (b)C	106 \pm 4 (a)B	64 \pm 1 (b)C
10	70 \pm 5 (a)A	74 \pm 6 (a)B	0.0 (b)B	83 \pm 2 (b)B	149 \pm 3 (a)A	81 \pm 11 (b)A
15	88 \pm 6 (b)A	106 \pm 6 (a)A	0.0 (c)B	91 \pm 4 (b)A	122 \pm 9 (a)B	90 \pm 5 (b)A

Los valores son el promedio de tres réplicas. \pm Desviación estándar de la media. *La actividad proteolítica está expresada como actividad específica (unidades de actividad \cdot mg proteína⁻¹). Valores con letra minúscula diferente en una fila dentro de una misma fuente de aceite son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P < 0.05$. Valores con letra mayúscula diferente en una columna dentro de una misma fuente de aceite son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P < 0.05$.

The values are the average of three replicates. \pm Standard deviation of the mean. *The amylolytic activity is expressed as a specific activity (activity units \cdot mg protein⁻¹). Values with a different lowercase letter in a row within a single source of oil are different according to Tukey's test at $P < 0.05$. Values with a different capital letter in a column within a single source of oil are different according to Tukey's test at $P < 0.05$.

umentaron los volúmenes de aceites en cada tiempo de exposición. Entre los dos tipos de aceite, los valores observados en la actividad proteolítica no mostraron diferencias estadísticas claras en comparación con las observadas en la actividad amilolítica. El efecto de los aceites esenciales para exterminar microorganismos ha sido atribuido a su efecto inhibitorio de la actividad de enzimas como proteasas (Thoroski, Blank, & Biliaderis, 1989) y descarboxilasas (Wendakoon & Sakaguchi, 1995).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio mostraron que la fracción volátil del aceite de *E. globulus* fue más efectivo que *E. camaldulensis* causando tasas altas de mortalidad. La medición de la actividad amilolítica y proteolítica de las progenies del insecto emergidas de granos expuestos a los vapores de los aceites permitió evaluar el efecto tóxico de éstos de una mejor forma. Las actividades de ambas enzimas en las progenies aumentan cuando los insectos son expuestos a los aceites esenciales, lo que puede interpretarse como una forma fisiológica para contrarrestar los efectos tóxicos que éstos ocasionan. Los resultados indican que la actividad amilolítica es mayor que la actividad proteolítica. En esta última no se observaron diferencias entre las progenies emergidas de granos de trigo expuestos a las dos fuentes de aceites. Lo anterior lleva a concluir que los aceites esenciales ocasionan a las progenies un gasto energético, lo que eventualmente les ocasiona la muerte.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) por el financiamiento otorgado para la realización del presente estudio (PROMEP/103.5/10/4593). El autor I.B.Q. R. Reyes Guzmán agradece a CONACyT por el apoyo económico otorgado para la realización de sus estudios de posgrado.

REFERENCIAS

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265–267. doi: 10.4067/S0718
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1990). *Official Methods of Analysis* (15th ed.). Arlington, VA, USA: Autor.
- Batish, D. R., Pal-Singh, H., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256, 2166–2174. doi: 10.1016/j.foreco.2008.08.008
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. doi: org/10.1016/j.foreco.2008.08.008
- Cinco-Moroyoqui, F. J., Díaz-Malvárez, F. I., Alanís-Villa, A., Barrón-Hoyos, J. M., Cárdenas-López, J. L., Cortez-Rocha, M. O., & Wong-Corral, F. J. (2008). Isolation and partial characterization of three isoamylases of *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part*

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Faculty Improvement Program (PROMEP) for granting funding for this study (PROMEP/103.5/10/4593). The author I.B.Q. R. Reyes Guzmán thanks CONACyT for the financial support given to carry out his graduate studies.

End of English Version

B: Biochemistry and Molecular Biology, 150, 153–160. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.02.008

- Cinco-Moroyoqui, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Borboa-Flores, J., & Cortez-Rocha, M. O. (2006). α -Amylase activity of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) reared on several wheat varieties and its inhibition with kernel extracts. *Journal of Economic Entomology*, 99, 2146–2150. doi: 10.1603/0022-0493-99.6.2146
- Cuperus, G. W., Prickett, C. K., Bloome, P. D., & Pitts, J. T. (1986). Insect populations in aerated and unaerated stored wheat in Oklahoma. *Journal of the Kansas Entomology Society*, 59, 620–627. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/25084836>
- Daglish, G. J., & Nayak, M. K. (2006). Long-term persistence and efficacy of spinosad against *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in wheat. *Pest Management Science*, 62(2), 148–152. doi: 10.1002/ps.1141
- Hamedo, H. A., & El Shamy, A. R. (2008). Effect of essential oil of *Eucalyptus rostrata* on the production of some enzymes by *Trichoderma virens* and *Fusarium solani*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4), 1223–1227. Obtenido de <http://www.ajbasweb.com/ajbas/2008/1223-1227.pdf>
- Haritos, V. S., Damcevski, K. A., & Dojchinov, G. (2006). Improved efficacy of ethyl formate against stored grain insects by combination with carbon dioxide in a "dynamic" application. *Pest Management Science*, 62, 325–333. doi: 10.1002/ps.1167
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603–608. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00079-X
- Kakade, M. L., Rackis, J. J., Mcghee, J. E., & Puski, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chemistry*, 51, 376–381. Obtenido de http://www.aaccnet.org/publications/cc/backissues/1974/Documents/chem51_376.pdf
- McClintock, E. (1993). Myrtaceae-Myrtle Family. In J. C. Hickman (Ed.), *The Jepson manual: Higher plants of California* (p. 766). Berkeley and Los Angeles, California, USA: University of California Press.
- Moreno, J., López, G., & Siche, R. (2010). Modelación y optimización del proceso de extracción de aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). *Scientia Agropecuaria*, 1, 147 – 154. Obtenido de https://sites.google.com/a/unitru.edu.pe/sci-agropecu/publicacion/scagropv1n2/scagrop01_147-154
- Mossi, I. J., Astolfi, V., Kubiak, G., Lerin, L., Zanella, C., Toniazzo, G.,... Restello, R. (2011). Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus* sp. against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(2), 273–277. doi: 10.1002/jfsa.4181
- Naseem, M. T., & Khan, R. R. (2011). Comparison of repellency of essential oils against red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 2(7), 131–134. Obtenido de <http://www.academicjournals.org/jsppr/PDF/pdf2011/Jul/Naseem%20and%20Khan.pdf>

- Negahban, M., & Moharrampour, S. (2007). Fumigant toxicity of *Eucalyptus intertexta*, *Eucalyptus sargentii* and *Eucalyptus camaldulensis* against stored-product beetles. *Journal of Applied Entomology*, 131(4), 256–261. doi: 10.1111/j.1439-0418.2007.01152.x
- Oppert, B., Morgan, T. D., Hartzler, K., & Kramer, K. J. (2005). Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140C, 53–58. doi: 10.1016/j.cca.2005.01.006
- Ouattara, B. R. E., Simard, R. A., Holley, G., Piette, J. P., & Bégin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 155–162. doi: 10.1016/S0168-1605(97)00070-6
- Rajendran, S., & Gunasekaran, N. (2002). The response of phosphine-resistant lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* and rice weevil *Sitophilus oryzae* in mixed-age cultures to varying concentrations of phosphine. *Pest Management Science*, 58, 277–281. doi: 10.1002/ps.446
- Schlupalius, D. I., Cheng, Q., Reilly, P. E. B., Collins, P. J., & Ebert, P. R. (2002). Genetic linkage analysis of the lesser grain borer *Rhyzopertha dominica* identifies two loci that confer high-level resistance to the fumigant phosphine. *Genetics*, 161, 773–782. Obtenido de <http://www.genetics.org/content/161/2/773.full.pdf>
- Silva, L. B., Lopes, K. V. G., Oliveira, M. G. A., & Guedes, R. N. C. (2010). Altered proteolytic and amyolytic activity in insecticide susceptible and resistant strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *10th International Working Conference on Stored Product Protection. Julius-Kühn-Archiv.*, 425, 845–850. doi: 10.5073/jka.2010.425.184
- Siramon, P., & Ohtani, Y. (2007). Antioxidative and antiradical activities of *Eucalyptus camaldulensis* leaf oils from Thailand. *Journal of Wood Science*, 53, 498–504. doi: 10.1007/s10086-007-0887-7
- Thoroski, J., Blank, G., & Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 52, 399–403.
- Tyler, P. S., Taylor, R. W., & Rees, D. P. (1983). Insect resistance to phosphine fumigation in food warehouses in Bangladesh. *International Pest Control*, 25, 7–12.
- Vardeman, E. A., Arthur, F. H., Nechols, J. R., & Campbell, J. F. (2006). Effect of temperature, exposure interval, and depth of diatomaceous earth treatment on distribution, mortality, and progeny production of lesser grain borer (Coleoptera: Bostrichidae) in stored wheat. *Journal of Economic Entomology*, 99, 1017–1024. doi: 10.1603/0022-0493-99.3.1017
- Watts, V. M., & Dunkel, F. W. (2003). Postharvest resistance in hard spring and winter wheat varieties of the northern Great Plains to the lesser grain borer (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Economic Entomology*, 96, 220–230. doi: 10.1603/0022-0493-96.1.220
- Wendakoon, C. N., & Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58, 280–283.
- Zhang, J., An, M., Wu, H., Stanton, R., & Lemerle, D. (2010). Chemistry and bioactivity of *Eucalyptus* essential oils. *Allelopathy Journal*, 25, 313–330.
- Zhu, Y. C., & Baker, J. E. (1999). Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 1053–1063. doi: 10.1016/S0965-1748(99)00081-8