

Actividad repelente de los aceites esenciales de *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* y *Cymbopogon nardus* cultivadas en Colombia frente a *Tribolium castaneum*, Herbst

Repellent activity of the essential oils from *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* and *Cymbopogon nardus* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*, Herbst

Jesús Olivero-Verbel¹, Karina Caballero-Gallardo¹, Beatriz Jaramillo-Colorado¹
Elena E Stashenko²

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad repelente de tres aceites esenciales (AE) y un repelente comercial frente a la especie *Tribolium castaneum*, Herbst, una de las principales plagas de cereales y productos almacenados. **Materiales y métodos:** La actividad repelente fue medida utilizando el método de área de preferencia, además fue determinada la concentración de aceite esencial capaz de repeler el 50% de los insectos (CR₅₀). La prueba T pareada fue utilizada para encontrar diferencias significativas entre el número de insectos presentes en las áreas tratadas y no tratadas. **Resultados:** Todos los AEs mostraron actividad repelente contra *T. castaneum*, y la magnitud del efecto fue dependiente de la concentración utilizada. Los AE con mayor repelencia fueron los extraídos de *Lippia organoides* y *Citrus sinensis*, mientras que el aceite con menor actividad fue el de *Cymbopogon nardus*. **Discusión:** Aunque en términos de CR₅₀ el AE de *C. nardus* mostró actividad repelente inferior a la de *L. organoides* y *C. sinensis*, el primero presentó una eficacia superior a la del producto comercial IR3535. Estos AEs han mostrado propiedades repelentes frente a organismos diferentes a *T. castaneum*, lo cual sugiere que su espectro de acción es amplio. **Conclusiones:** Los resultados han demostrado que los AEs de la flora colombiana son una fuente importante de repelentes, por lo que podrían ser usados para el control biológico de insectos. *Salud UIS* 2009; 41: 244-250

Palabras clave: Actividad repelente, aceites esenciales, insectos, *Tribolium castaneum*. Herbst, Colombia

1. Grupo de Química Ambiental y Computacional (GQAC). Universidad de Cartagena.

2. Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales – CENIVAM, Universidad Industrial de Santander.

Correspondencia: Jesús Olivero Verbel PhD. Grupo de Química Ambiental y Computacional. Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Campus de Zaragocilla. Universidad de Cartagena, Colombia. Tel: 57-5-6698179, Fax: 57-5-6698323.

E-mail: jesusolivero@yahoo.com, joliverov@unicartagena.edu.co

Recibido: 12 de octubre de 2009 **Aceptado:** 12 de diciembre de 2009

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the repellent activity of three essential oils (EO), and a commercial repellent against species *Tribolium castaneum* Herbst, a major pest of grain and stored products. **Materials and methods:** The repellent activity was measured using the area of preference method, as well as the concentration of essential oil that is capable of repelling 50% of the insects (RC₅₀). A paired T test was used to find significant differences between the number of insects present in the treated and untreated areas. **Results:** All EOs showed repellent activity against *T. castaneum*, and the magnitude of the effect was dose-dependent. The AE with the highest repellence were those extracted from *Lippia organoides* and *Citrus sinensis*, whereas the one with the lowest activity was that from *Cymbopogon nardus*. **Discussion:** Although in terms of RC₅₀ the EO from *C. nardus* showed repellent activity lower than those registered for *L. organoides* and *C. sinensis*, the first had a greater efficacy than that showed by the commercial product IR3535. These EOs have shown repellent properties against organism different from *T. Castaneum*, suggesting that they have a wide spectrum of action. **Conclusions:** The results have shown that EOs from Colombian flora are an important source of repellents, which could be used for biological control of insects. *Salud UIS 2009; 41: 244-250*

Keywords: Repellent activity, essential oils, insects, *Tribolium castaneum*. Herbst, Colombia

INTRODUCCIÓN

El aumento continuo de la población humana ha creado un reto importante a la industria de alimentos, la cual debe desarrollar una adecuada gestión de los granos almacenados y otros productos agrícolas, no sólo para evitar su escasez, sino para proveer productos que protejan la salud humana. Los artrópodos afectan directamente la producción de alimentos mediante la reducción de la calidad y cantidad de la cosecha producida, o indirectamente al servir como vectores de las enfermedades de las plantas, lo que genera un impacto en la economía, siendo estos responsables de la pérdida de entre un 10 - 40% de los granos almacenados en todo el mundo¹.

Para el control de las plagas en la gestión de los granos almacenados y otros productos agrícolas, la utilización de diferentes insecticidas sintéticos es la herramienta empleada con mayor frecuencia. Sin embargo, el uso de los mismos para controlar plagas ha llevado a varios efectos adversos, incluyendo la contaminación del agua y el suelo, eliminación de insectos benéficos y toxicidad para las especies expuestas y los consumidores²⁻⁶. Además, los insectos han adquirido resistencia contra la mayoría de estos plaguicidas sintéticos^{3,7}, y la eficacia de estos últimos contra las plagas de granos almacenados suele variar mucho después del tratamiento⁸. De igual manera, el uso incontrolado de estos insecticidas sintéticos causa gran riesgo para el medio ambiente y sus residuos pueden afectar a los consumidores. Por lo tanto, existe una urgente necesidad de desarrollar alternativas de bajo costo que sean

seguras y convenientes para el ecosistema, además de eficaces en el control de las plagas. En este sentido, los esfuerzos investigativos están siendo orientados hacia el desarrollo de productos derivados de plantas, con utilidad potencial como bioinsecticidas⁹, en particular dada la baja predisposición de los extractos vegetales a generar fenómenos de resistencia en los organismos. Así mismo, en comparación con compuestos sintéticos, los bioinsecticidas pueden ser degradados con mayor rapidez en el ambiente¹⁰. Dentro de estos productos naturales, los aceites esenciales (AE) extraídos de diversas especies vegetales han sido ampliamente estudiados con el objetivo de evaluar sus propiedades repelentes, como una valiosa fuente natural. De hecho, muchos productos vegetales han sido evaluados para sus propiedades tóxicas contra diferentes plagas de grano almacenado^{11,12}, especialmente los AEs^{13,14}.

Los AE son una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles, algunos de ellos con actividad atrayente o repelente de insectos^{15,16}. Aunque la lista es inmensa, algunos de los AEs promisorios como repelentes son los obtenidos de *Cymbopogon* spp, *Ocimum* spp. y *Eucalyptus* spp., entre otras especies. Dentro de los compuestos presentes en estas mezclas con alta actividad repelente están: el α -pineno, eugenol, limoneno, terpineol, citronelol, citronelal, alcanfor y timol¹⁷⁻²⁰. Desde el punto de vista económico, los productos sintéticos aún son utilizados con mayor frecuencia como repelentes que los AEs, las posibilidades a futuro son prometedoras, ya que estos tienen potencial para proporcionar productos repelentes eficientes y seguros para las personas y el medio ambiente^{21,22}.

Entre los insectos de mayor cuidado en el almacenamiento de cereales y otros productos está el escarabajo rojo de la harina, *Tribolium castaneum*, Herbst, cuyo ciclo de vida aparece en la Figura 1. Esta especie es una de las principales plagas de la harina de trigo en grano²³. Para su control han sido empleados varios productos sintéticos, para los cuales se han reportado efectos adversos en animales expuestos y humanos²⁴. De igual forma, extractos botánicos y AEs también han sido utilizados con éxito en el control de este insecto^{25,26}.

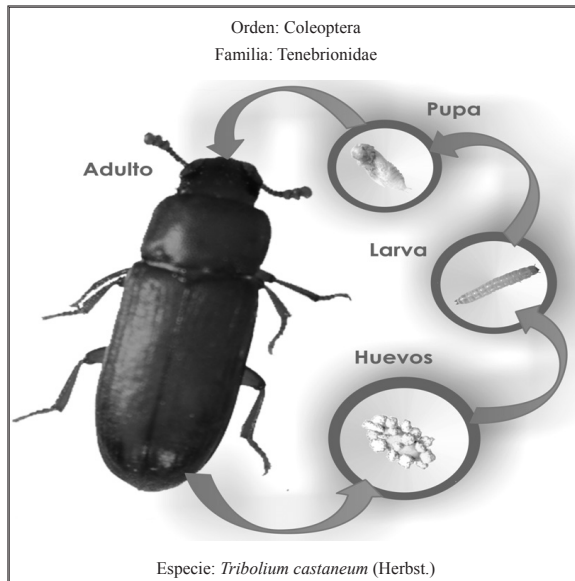


Figura 1. Ciclo de vida del *T. castaneum*. Al igual que otros insectos, *T. castaneum* posee cuatro etapas en su ciclo de vida: adulto, huevos, larva y pupa, el cual puede ser completado en tres semanas.

En virtud de la amplia distribución de plantas aromáticas en Colombia, y que eventualmente podrían ser empleadas como biopesticidas, en este estudio fue evaluada la acción repelente de los AEs de tres especies vegetales cultivadas en el país frente a *T. castaneum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos de la especie *T. castaneum*

Para los bioensayos fue utilizada una cepa de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae), conocida comúnmente como gorgojo de la harina, la cual fue obtenida de avena infestada por el gorgojo en locales comerciales del mercado municipal de la ciudad de Cartagena, Bolívar. En el laboratorio la

cepa es cultivada en recipientes de vidrio cubiertos por una malla de plástico, la cual contiene harina de avena como sustrato y alimento, y mantenida bajo condiciones controladas de luminosidad (fotoperíodos de 10:14 h, luz: oscuridad), temperatura de 26 ± 2 °C, y humedad relativa de 70-85%. Para los ensayos fueron seleccionados organismos adultos.

Obtención de aceites esenciales

Para la realización de los ensayos fueron utilizados los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus*, *Lippia organoides* y *Citrus sinensis*, los cuales fueron obtenidos por hidrodestilación de cultivos desarrollados en el CENIVAM, de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, siendo depositados especímenes de estas plantas en el herbario del centro con los vouchers CENIVAM-454, CENIVAM-009 y CENIVAM-455, respectivamente.

Los aceites fueron almacenados bajo congelación a una temperatura aproximada de -4 °C hasta su utilización para la realización de los experimentos.

Determinación de la actividad repelente.

La actividad repelente de los aceites esenciales y un repelente comercial contra *T. castaneum* fue evaluada utilizando el ensayo de área de preferencia²⁷. En este método, los organismos son colocados en el interior de una caja de Petri que contiene un papel de filtro cortado por la mitad, colocando sobre una de las secciones la solución a evaluar (AEs) y sobre la otra el respectivo vehículo (acetona). Los aceites esenciales fueron disueltos en acetona y las soluciones dispuestas en la sección correspondiente del papel de filtro, aplicando volúmenes iguales para generar concentraciones de 0,00002, 0,0002, 0,002, 0,02 y 0,2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$. Como control positivo fue utilizado una formulación repelente comercial (Stay off), la cual contiene como ingrediente activo etilbutilacetilaminopropionato (IR3535) al 15%. Por su naturaleza química, seguridad y baja toxicidad, este compuesto es considerado como un bioplaguicida (*biopesticide*, en inglés)²⁸. El experimento es iniciado al agregar en la parte central de cada caja de Petri un total de 20 adultos de *T. castaneum*, contando los organismos presentes en cada mitad luego de 2 y 4 horas de exposición. El porcentaje de repelencia (PR) para un determinado tiempo de exposición fue calculado empleando la siguiente fórmula: $PR = [(N_c - N_t) / (N_c + N_t)] 100x$, donde N_c y N_t son el número de insectos en las áreas control (acetona) y tratadas, respectivamente. Cada

concentración de aceite esencial es evaluada por quintuplicado y los experimentos son repetidos dos veces.

Análisis de los datos.

Los resultados son presentados como la media del porcentaje de repelencia \pm error estándar ($X \pm SE$). El número promedio de insectos presentes en cada mitad del papel filtro fue comparada mediante la prueba T-pareada. El signo obtenido en el cálculo de PR fue empleado para cualificar la acción repelente (positivo) o atrayente (negativo) del aceite esencial. En todos los casos, la distribución normal y la homogeneidad de varianzas fueron evaluadas previamente utilizando los test de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente. Con el fin de determinar la relación concentración-respuesta, para cada aceite fue calculada la concentración repelente media (CR_{50}), es decir, la concentración de aceite esencial capaz de repeler el 50% de los insectos, al igual que sus respectivos intervalos de confianza al 95%, empleando el análisis Probit²⁹. Los procedimientos estadísticos se realizaron con el software Graphpad Instat, empleando un valor de $P < 0.05$ como criterio de significancia estadística.

RESULTADOS

Los resultados de la actividad repelente de los tres aceites esenciales y el repelente comercial contra la especie *T. castaneum* son mostrados en la Tabla 1. De los tres aceites esenciales evaluados, sólo el obtenido a partir de *Cymbopogon nardus* presentó actividad atrayente a las dos concentraciones más bajas ensayadas, presentando valores similares (entre -14% y -24%) a ambos tiempos de exposición. No obstante, este mismo aceite presentó la mejor actividad repelente a la concentración más alta (0,2 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$) luego de 2 horas de exposición, con un porcentaje de repelencia del 96%. Por su parte, el aceite esencial de *Lippia origanoides* mostró una actividad repelente similar al de *C. nardus* (94%) cuando los organismos fueron expuestos por 2 horas, aunque luego de 4 horas el porcentaje de repelencia fue ligeramente mayor. Es de interés anotar que la repelencia generada tanto por los aceites como por el producto comercial no presentó diferencias significativas cuando fueron comparados los dos tiempos de exposición. Así mismo, en todos los casos, la variabilidad en los datos de repelencia fue mayor para las tres concentraciones de aceite esencial más diluidas (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de Repelencia, CR_{50} e intervalos de confianza obtenidos para los aceites esenciales y el repelente comercial (IR3535) frente a *Tribolium castaneum*, a diferentes tiempos de exposición.

Aceite Esencial	Concentración ($\mu\text{L}/\text{cm}^2$)	% Repelencia según tiempo de exposición	
		2 horas	4 horas
<i>Cymbopogon nardus</i>	0,00002	-14 \pm 11	-16 \pm 21
	0,0002	-24 \pm 11	-22 \pm 14
	0,002	42 \pm 8 ^b	38 \pm 10 ^b
	0,02	56 \pm 4 ^b	58 \pm 7 ^b
	0,2	96 \pm 2 ^b	86 \pm 5 ^b
	$^aCR_{50}$ ($\mu\text{L}/\text{cm}^2$)	0,008(0,004-0,017)*	0,011(0,005-0,024)
<i>Lippia origanoides</i>	0,00002	24 \pm 19	30 \pm 12 ^b
	0,0002	38 \pm 10 ^b	38 \pm 15
	0,002	50 \pm 13	52 \pm 15
	0,02	84 \pm 2 ^b	88 \pm 5 ^b
	0,2	94 \pm 4 ^b	98 \pm 2 ^b
	CR_{50} ($\mu\text{L}/\text{cm}^2$)	0,001(0,0002-0,002)	0,0005(0,0002-0,002)
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	0,00002	18 \pm 23	12 \pm 27
	0,0002	38 \pm 12 ^b	34 \pm 13
	0,002	42 \pm 16	42 \pm 14 ^b
	0,02	58 \pm 8 ^b	50 \pm 9 ^b
	0,2	78 \pm 7 ^b	72 \pm 7 ^b
	CR_{50} ($\mu\text{L}/\text{cm}^2$)	0,003(0,001-0,016)	0,008(0,002-0,038)
IR3535	0,00002	2 \pm 8	4 \pm 22
	0,0002	16 \pm 9	-6 \pm 18
	0,002	54 \pm 12	50 \pm 5 ^b
	0,02	60 \pm 13 ^b	40 \pm 11 ^b
	0,2	78 \pm 5 ^b	76 \pm 9 ^b
	CR_{50} ($\mu\text{L}/\text{cm}^2$)	0,005(0,002-0,015)	0,016(0,005-0,050)

^a El valor de la concentración repelente media (CR_{50}) es presentado con los intervalos de confianza al 95% entre paréntesis.

^b Diferencia estadísticamente significativa entre el número de organismos en las áreas tratadas y no tratadas ($P < 0,05$).

De acuerdo con los valores de CR_{50} , la capacidad repelente de los aceites esenciales evaluados decrece en el orden *Lippia origanoides* > *Citrus sinensis* > *Cymbopogon nardus*, siendo los mismos comparativamente menores a los observados para el repelente comercial.

DISCUSIÓN

Es ampliamente conocido que multitud de especies vegetales generan aceites esenciales con actividad insecticida y/o repelente^{21,22}. En Colombia, uno de los países con mayor biodiversidad, estos productos podrían ser utilizados en el control de diversos organismos perjudiciales para la industria de alimentos, entre los que el *Tribolium castaneum*, constituye uno de los más destacados en virtud de su elevado impacto económico sobre las harinas, cereales, pastas, galletas y nueces, entre otros²³. Aunque para el control de estos organismos están disponibles varios productos químicos sintéticos, uno de los argumentos en contra de su utilización es la baja selectividad y frecuente aparición de efectos nocivos en las personas que los usan²⁴. En el presente estudio, la actividad repelente de aceites esenciales de tres plantas cultivadas en Colombia fueron evaluados contra *T. castaneum*, y los resultados han demostrado que estos aceites tienen tan buenas o mejores propiedades repelentes que el producto comercial IR3535.

El aceite esencial de *L. origanoides* presentó la mejor capacidad repelente entre los tres evaluados, con valores de CR_{50} al menos cinco veces inferiores a los registrados para IR3535. Este hecho posiciona a este aceite esencial como candidato promisorio para ser utilizado en la formulación de productos repelentes contra insectos.

Las plantas del género *Cymbopogon* han sido tradicionalmente utilizadas para repeler mosquitos en regiones selváticas como el Amazonas Boliviano³⁰, y de hecho, es fuente de repelentes naturales con amplia popularidad mundial³¹. Aunque diversos extractos y aceites esenciales aislados de este género se han evaluado frente a distintas clases de artrópodos, la especie examinada en este estudio, *C. nardus*, no ha sido previamente reportada como repelente frente a *T. castaneum*.

Por otra parte, el aceite esencial de naranja (*C. sinensis*) también presentó buenas propiedades repelentes en términos de CR_{50} . Sin embargo, a diferencia de los aceites esenciales de *C. nardus* y *L. origanoides*, su eficacia fue

levemente menor (% máximo de repelencia $78 \pm 7\%$), aunque con valores comparativos a los obtenidos para el producto comercial. El control de plagas por parte de este aceite esencial es bastante conocido, como quiera que ha sido empleado para inhibir la reproducción del escarabajo *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae)³², y utilizado como repelente contra adultos de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* West)³³. La diversidad de acción reportada para los aceites esenciales utilizados en este trabajo denota su gran versatilidad, y un espectro amplio de acción para el control de plagas.

Al comparar los porcentajes de repelencia obtenidos a las 2 y 4 horas de exposición, no fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, existe una leve tendencia a la disminución de la actividad repelente con el aumento del tiempo de exposición, hecho que puede ser atribuido a la alta volatilidad de los metabolitos presentes en los aceites esenciales.

Estos resultados demuestran que los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas cultivadas en Colombia son una fuente potencial de repelentes contra la especie *T. castaneum*, los cuales en un futuro podrían ser utilizados como ingredientes en la elaboración de repelentes comerciales para insectos de almacenamiento.

CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de *Cymbopogon nardus*, *Citrus sinensis* y *Lippia origanoides* poseen similar o mejor capacidad repelente que el producto comercial IR3535 contra *Tribolium castaneum*. La actividad repelente de los aceites esenciales tiende a disminuir con el tiempo de exposición, aunque para períodos de 2 y 4 horas, las diferencias no son significativas. Los aceites esenciales de la flora colombiana son una fuente potencial de repelentes contra *T. castaneum*, por lo que podrían ser empleados para su control.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado gracias al apoyo del CENIVAM (proyecto RC 432-2004) y al Grupo de Química Ambiental y Computacional de la Universidad de Cartagena.

CONFLICTOS DE INTERES

Ninguno.

REFERENCIAS

1. Matthews GA. Insecticide application in the stores. In Matthews, G.A. and Hislop, E.C. (eds.). Application technology for crop protection. CAB, London. 1993. p.p. 305-315.
2. Zettler L. Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera, Tenebrionidae) from flour mills in the United States. *J Econ Entomol* 1991;84(3):763-767.
3. Zettler L, Cuperus GW. Pesticide resistance in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) in wheat. *J Econ Entomol* 1990;83(5): 1677-1681.
4. Donahay E, Zalach D, Rindner M. Comparison of the sensitivity of the development stages of three strains of the red four beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) to modified atmospheres. *J Econ Entomol* 1992;85(2):1450-1452.
5. Kostyukovsky M, Ravid U, Shaaya E. The potential use of plant volatiles for the control of stored product insects and quarantine pests in cut flowers. In: Berna' th, J., ZamborineNemeth, E., Crakerm, L., Kock, O. (Eds.), Proceedings of the International Conference on Medicinal and Aromatic Plants Possibilities and Limitations of Medicinal and Aromatic Plant Production in the 21st Century, 8-11 July 2001, Budapest, Hungary. *Act Hort* 2002a; 576: 347-358.
6. Ogendo JO, Belmain SR, Deng AL, Walker DJ. Comparison of toxic and repellent effects of *Lantana camara* L. with *Tephrosia vogelii* Hook and a synthetic pesticide against *Sitophilus zeamais* Motschulsky in maize grain storage. *Insect Science and Its Application*. 2003;23(2): 127-135.
7. Jembere B, Obeng-Ofori D, Hassanali A, Nyamasyo GNN. Products derived from the leaves of *Ocimum kilimandscharium* (Labiatae) as post-harvest grain protectants against the infestation of three major stored product insect pests. *Bull Entomol Res* 1995;85: 361-367.
8. Pinto ARJr, Furiatti Pereira PRVS, Lazzari FA. Avaliac, ao de insecticidas no controle de *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) em Arroz Armazenado. *An Soc Entomol Bras* 1997;26: 285-290.
9. Regnault-Roger C, Philogene BJR, Vincent C. Biopesticides d'origine vegetale. *Techiques and Documents*, Paris. 2002.
10. Koul O, Dhawiwal GS. Phytochemical Biopesticides. Harwood Academic Publishers, Australia. 2001.
11. Su HFC. Biological activities of hexane extract of *Piper cubeba* against rice weevils and cowpea weevils (Coleoptera: Curculionidae). *J Entomol Sc.* 1990;25(1): 16-20.
12. Mukherjee SN, Joseph M. Medicinal plant extracts influencing insect growth and reproduction. *J Med Arom Plant Sci* 2000;22: p.38.
13. Shaaya E, Ravid U, Paster N, Juven B, Zisman U, Pistarev V. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored product insects. *J Chem Ecol* 1991;17(3): 499-504.
14. Ngamo TLS, Goudoum A, Ngassoum MB, Mapongmetsen Lognay G, Malaisse F, Hance T. Chronic toxicity of essential oils of 3 local aromatic plants towards *Sitophilus zeamais* Motsch (Coleoptera: Curculionidae). *Afr J Agri Res* 2007;2(4): 164-167.
15. Asakawa Y, Dawson GW, Griffiths DC, Lallemand JY, Ley SV, Mori K, Mudd A, Pezechk-Leclaire M, Pickett JA, Watanabe H, Woodcock CM, Zhongning Z. Activity of Drimane Antifeedants and Related Compounds Against Aphids, and Comparative Biological Effects and Chemical Reactivity of (-)- and (+)-polygodial. *J Chem Ecol* 1988;14(10): 1845-1855.
16. Bruneton J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. *Technique et Documentation*, Lavoisier, France. 1995. p.p.915.
17. Ibrahim J, Zaki Z. Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian Plants. *ARBEC*. 1998;6: 1-7.
18. Yang YC, Choi HC, Choi WS, Clark JM, Ahn YJ. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J Agrie Food Chem* 2004;52(9): 2507-2511.
19. Jaenson TG, Palsson K, Borg-Karlson AK. Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. *J Med Entomol* 2006;43(1): 113-119.
20. Park BS, Choi WS, Kim JH, Lee SE. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *J Am Mosq Contr Assoc* 2005;21(1): 80-83.
21. Tripathi AK, Prajapati V, Aggrawal KK, Khanuja SPS, Kumar S. Toxicity towards *Tribolium castaneum* in the fraction of essential oil of *Anethum sowa* seeds. *J Med Arom Plant Sci* 2000a;22: p. 40.
22. Verma N, Tripathi AK, Prajapati V, Bahl JR, Khanuja SPS, Kumar S. Toxicity of essential oil from *Lippia alba* towards stored grain insects. *J Med Arom Plant Sci* 2000;22. p.50.

23. Howe RW. Losses caused by insects and mites in stored foods and foodstuffs. *Nutr Abstr Rev* 1965;35: 285-302.
24. Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour Technol.* 2010; 101: 372-378.
25. Emara TE, Ryan MF. Effect of two crude botanical extracts on the red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Egypt Ger Soc Zool* 1997;23: 125-140.
26. Tripathi AK, Prajapati V, Aggrawal KK, Khanuja SPS, Kumar S. Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored product beetles. *J Econ Entomol* 2000b;93(1): 43-47.
27. Tapondjou L, Adler C, Fontem D, Bouda H, Reichmuth C. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *J Stored Prod Res* 2005;41(1): 91-102.
28. O'Farrill-Nieves H. Las Plagas del Hogar y el Jardín. Departamento de Protección de Cultivos. Universidad de Puerto Rico. 2008. Número 8. p.p. 1-2.
29. Finney DJ. Probit analysis, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 1971.
30. Moore SJ, Hill N, Ruiz C, Cameron MM. Field evaluation of traditionally used plant-based insect repellents and fumigants against the malaria vector *Anopheles darlingi* in Riberalta, Bolivian Amazon. *J Med Entomol* 2007;44(4): 624-630.
31. Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C. Comparative Repellency of 38 Essential Oils against Mosquito Bites. *Phytother Res* 2005;19(4): 303-309.
32. Papachristos DP, Stamopoulos DC. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res* 2002;38(2): 117-128.
33. Santiago SV, Rodríguez HC, Ortega AL, Ochoa MD, Infante GS. Repelencia de adultos de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum* West.) con aceites esenciales. *Fitosanidad* 2009;13(1): 1-4