

## Investigación

# COMPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS DE BULBOS DE AJO (*Allium sativum* L.) Y SU EFECTO EN LA MORTALIDAD Y REPELENCIA DE *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

## Garlic (*Allium sativum* L.) bulbs extracts comparison and characterization and its effects over mortality and repellency on *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae)

Carlos Augusto Hincapié Ll.<sup>1</sup>, Gloria Eugenia López P.<sup>1</sup> y Ricardo Torres Ch.<sup>2</sup>

### RESUMEN

*Tetranychus urticae* Koch es una plaga que causa grandes pérdidas económicas porque ataca un numeroso grupo de cultivos. Además, algunas poblaciones han desarrollado resistencia a acaricidas comerciales. Este trabajo compara diferentes extractos a partir de bulbos de ajo (*Allium sativum* L.) a través de su toxicidad y repelencia sobre *T. urticae*. Los extractos se obtuvieron usando como solventes CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas (CSC), etanol y éter de petróleo usando el método soxhlet y maceración y agua usando maceración. La técnica de fluidos supercríticos permite obtener extractos a temperaturas bajas usando altas presiones, evitando la degradación de los compuestos y permitiendo su separación del solvente al exponerlo a temperatura ambiente. El ácaro fue criado en laboratorio sobre plantas de fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Campus Laureles de la Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia. La mortalidad fue evaluada colocando 10 ácaros en un disco de hoja de *P. vulgaris* de 3 cm de diámetro previamente sumergido en el extracto. Las concentraciones letales medias (CL<sub>50</sub>) más bajas se obtuvieron con el método CSC (8.1188, 5.4105, 2.8206 mg g<sup>-1</sup> a las 24, 48 y 72 h respectivamente). Los extractos se caracterizaron usando cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS), obteniendo en el extracto CSC principalmente vinilditiínas (63,11%), dialil disulfuro (10,88%) y di-2-propenil trisulfuro (10,4%). Se concluyó que la extracción con fluidos supercríticos permite obtener, a partir de bulbos de ajo, extractos con mayor concentración de compuestos biológicamente activos contra *T. urticae*, comparada con las otras técnicas usadas en este estudio.

**Palabras clave:** araña roja bimaculada, extractos de plantas, efecto acaricida, Liliaceae.

---

<sup>1</sup> Universidad Pontificia Bolivariana, Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Grupo de Investigaciones Agroindustriales (GRAIN), A.A. 56006, Medellín, Colombia. E-mail: [carlos.hincapie@upb.edu.co](mailto:carlos.hincapie@upb.edu.co) \*Autor para correspondencia

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, Magíster en Ciencias Químicas, Calle 59A No 63-20 Medellín, Colombia. E-mail: [rtorres@epm.net.co](mailto:rtorres@epm.net.co).

El resumen de este trabajo fue presentado en el XXXIII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología (SOCOLEN) en Manizales, Colombia el 28 de julio de 2006.

Recibido: 31 julio 2007.

Aceptado: 15 noviembre 2007.

## ABSTRACT

*Tetranychus urticae* Koch is a plague that causes great economic losses because it attacks a wide group of host plants. Also, some populations develop resistance against commercial acaricides. This work compares different extracts from garlic (*Allium sativum* L.) bulb measuring its toxicity and repellency over *T. urticae*. Extracts were obtained using as solvents CO<sub>2</sub> in supercritical conditions, ethanol and petroleum ether using soxhlet and soaking method and soaking in water. The supercritical fluid extraction technique allows obtaining extracts at low temperature using high pressures, avoiding compounds degradation and making possible solvent separation just exposing the extract at room temperature. Mites were bred over bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) in a laboratory environment in Laureles Campus, Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia. Mortality was evaluated putting 10 mites in *P. vulgaris* 3 cm diameter leaf discs previously submersed in the extract. The lowest mean lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) were obtained with CSC method (8.1188, 5.4105, 2.8206 mg g<sup>-1</sup> at 24, 48 and 72 h, respectively). Extracts were characterized using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), finding in CSC extract as main compounds vinyl dithiins (63.11%), diallyl disulfide (10.88%) and diallyl trisulfide (10.4%). The main conclusion is that, in comparison with other techniques of extraction from garlic bulbs used in this study, the supercritical fluids allows to obtain extracts with a higher concentration of biologically active compounds against *T. urticae*.

**Key words:** two-spotted spider mite, plant extracts, miticidal effect, Liliaceae.

## INTRODUCCIÓN

El ácaro *T. urticae* pertenece a la Clase Arácnida, Subclase Acari, Orden Acariformes y Familia Tetranychidae. Tradicionalmente ha sido combatido con acaricidas de síntesis química de alta residualidad y permanencia que se constituyen en barrera para la comercialización de productos agrícolas y que causan detrimento del ambiente y de la salud humana. Es una especie altamente polífaga. Se han reportado hasta la fecha 3877 especies de plantas hospederas en todo el mundo (Migeon y Dorkeld, 2007). Algunas poblaciones de *T. urticae* sometidas a presión de selección han desarrollado resistencia a los productos químicos usados para su control, tales como óxido de fenbutatina, hexitiazox y abamectina (Beers *et al.*, 1998), bifentrina,  $\lambda$ -cialotrina y dimetoato (Yang *et al.*, 2001), órganofosforados (Stumpf *et al.*, 2001; Anazawa *et al.*, 2003), imidacloprida (James y Price, 2002), metil-paration y metomil (Tsagkarakou *et al.*, 2002), tebufenpirad (Herron y Rophail, 2002) y clorfenapir y etoxazole (Uesugi *et al.*, 2002). El desarrollo de resistencias hace necesario usar mayores cantidades de producto, mayor número de aplicaciones o ingredientes activos más potentes. Dentro de un programa de Manejo Integrado de Plagas, se pueden utilizar extractos botánicos con propiedades acaricidas y/o repelentes, ya que tienen un efecto residual muy corto y pueden ser compatibles con el control biológico (Chiasson *et al.*, 2004). Además, estos extractos se degradan

con mayor rapidez que los productos de síntesis química, lo que implica menor posibilidad de encontrarlos en las plantas, así como en el suelo, el aire y el agua, aunque exijan mayor número de aplicaciones.

Algunas plantas con efecto acaricida y/o repelente contra el ácaro en cuestión son: *A. sativum* en solución acuosa (Boyd y Alverson, 2000), *Artemisia absinthium* L. y *Tanacetum vulgare* L. (Chiasson *et al.*, 2001), *Piper longum* L. (Park *et al.*, 2002), *Trichilia pallida* Swartz y *Melia azedarach* L. (Castiglioni *et al.*, 2002), *Azadirachta indica* A. Juss. (Castiglioni *et al.*, 2002; Knapp y Kashenge, 2003; Chiasson *et al.*, 2004); *Satureja hortensis* L., *Ocimum basilicum* L. y *Thymus vulgaris* L. (Aslan *et al.*, 2004); *Carum carvi* L., *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, *Eucalyptus citriodora* Hook, *Mentha pulegium* L., *Mentha piperita* L., *Mentha spicata* L. (Choi *et al.*, 2004), *Chenopodium ambrosioides* L. var. *ambrosioides* (Chiasson *et al.*, 2004). Algunos organismos sobre los cuales se ha probado la acción insecticida o repelente del ajo son: *Acanthoscelides obtectus* Say (Regnault-Roger y Hamraoui, 1993); *Tribolium castaneum* y *Sitophilus zeamais* (Ho *et al.*, 1996; Chiam *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000); *Cydia pomonella* L. (Landolt *et al.*, 1999); *Lipaphis erysimi* Kalténbach y *Dysdercus cingulatus* (Bandyopadhyay *et al.*, 2001; Banerjee *et al.*, 2004); *Meloidogyne incognita* (Chitwood, 2002); *Reticulitermes santonensis* y *Reticulitermes grassei* (Auger *et al.*, 2004); y *Attagenus unicolor japonicus* (Han *et al.*, 2006).

Los métodos de extracción usados tradicionalmente pueden causar interacciones entre los solventes y los extractos, provocando modificaciones en la estructura original de sus compuestos. Además, existe el riesgo de residualidad afectando la naturaleza ecológica del extracto. La extracción con fluidos supercríticos es una alternativa altamente beneficiosa para eliminar estos inconvenientes. Un fluido supercrítico es cualquier sustancia que se encuentre en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico; es un cuasi-estado con propiedades intermedias entre líquidos y gases. El CO<sub>2</sub> supercrítico es el que presenta mejores condiciones de extracción, menor interacción con el extracto y bajo impacto ambiental (McClain, 2000).

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto de diferentes métodos de obtención de extractos a partir de bulbos de *A. sativum* (CO<sub>2</sub> supercrítico, agua, etanol y éter de petróleo como solventes) sobre *T. urticae*. Cada extracto se caracterizó a través de CG/EM para identificar los compuestos presentes y determinar cuáles son los posibles responsables de la acción biológica sobre el ácaro.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en 2006 en La Universidad Pontificia Bolivariana (Campus Laureles), Medellín (6°14' lat. norte, 75°35' long. Oeste), Antioquia, Colombia, a una altitud promedio de 1450 m.s.n.m. y una temperatura media de 22 ± 1 °C (IDEAM, 1999). La colonia inicial de ácaros fue suministrada por la Universidad Militar Nueva Granada, sede Cajicá, Cundinamarca, Colombia. Para mantener la colonia y realizar los ensayos se sembraron plantas de fríjol var. Cargamanto ubicadas en laboratorio para su

germinación y crecimiento en condiciones aisladas. Semanalmente se sembró una bandeja con aproximadamente 12 semillas. Cuando las plantas completaron 4 semanas se inocularon con hojas infestadas por el ácaro. Estas plantas se renovaron cada 4 semanas. Se realizaron prácticas agronómicas de riego diario y una fertilización al momento de la siembra con abono orgánico. El control de plagas se hizo manualmente para no utilizar productos de síntesis química y así evitar introducir factores de error al experimento.

Los bulbos de ajo, cultivar conocido como “Chino blanco”, se obtuvieron en el mercado local, opción a la que han acudido otros investigadores (Kuo y Ho, 1992; Calvey *et al.*, 1994; Abu-Lafi *et al.*, 2004; Kimbaris *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2006). Posteriormente, en laboratorio, los bulbos se seleccionaron, limpiaron, cortaron y trituraron manualmente. El producto obtenido se usó para las extracciones. Para la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico se utilizó el gas (UN 2817, Agafano, Medellín, Colombia) en condiciones supercríticas como solvente, en un extractor (SFE1000, Thar Technologies, Pittsburgh, USA) en la empresa Colflavor S.A, Envigado, Antioquia. La temperatura en el extractor fue de 40 °C, la presión y el flujo de CO<sub>2</sub> fueron 25,33 MPa y 30 g min<sup>-1</sup>, respectivamente (Ryback *et al.*, 2004). El tiempo de extracción fue 1,5 h. Para la extracción por método Soxhlet se usaron 100 g de muestra y se utilizaron como solventes éter de petróleo 35-60 y etanol al 99,7%, durante 8 h. Para la maceración a temperatura ambiente se sometieron a agitación 100 g de muestra en un recipiente hermético durante 24 h, usando los mismos solventes que con Soxhlet. Al finalizar las extracciones se filtraron y se separaron los solventes a baja temperatura en un rotaevaporador (Waterbath-B-480, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza). También, se realizó maceración en agua. A diferencia de los métodos anteriores, en este último se determinó la concentración de extracto realizando un balance de materia. Para preparar cada tratamiento se retiró de manera exhaustiva el solvente, para evitar su incidencia en los ensayos. Los extractos preparados fueron: CO<sub>2</sub> supercrítico (CSC), maceración con éter de petróleo (MEP), soxhlet con etanol (SAE), soxhlet con éter de petróleo (SEP), maceración con etanol (MAE), y maceración con agua (MA). Los extractos, hasta su uso, se almacenaron refrigerados en envases de color ámbar herméticamente sellados, donde se inyectó nitrógeno gaseoso de alta pureza (Agafano, Medellín, Colombia).

Para determinar mortalidad con los extractos CSC, se prepararon concentraciones de 2 500, 5 000 y 10 000 mg kg<sup>-1</sup>; además, se prepararon concentraciones de 10 000, 25 000, 50 000, 100 000, 150 000 y 200 000 mg kg<sup>-1</sup> para los extractos MEP, MAE, SEP Y SAE. Para el extracto MA se prepararon concentraciones de 68500, 45 700, 22 800, 11 400 y 4 600 mg kg<sup>-1</sup>. Los extractos se disolvieron en agua destilada. Debido a condiciones inherentes al proceso de maceración y la concentración del solvente, no se obtuvieron extractos superiores a 76 800 mg kg<sup>-1</sup>. Se obtuvieron así 34 tratamientos con tres repeticiones cada uno. Para las pruebas de repelencia se usaron concentraciones de 1000, 2000 y 5000 mg kg<sup>-1</sup> en todos los extractos. Se utilizó un diseño completamente al azar con 24 tratamientos con tres repeticiones cada uno, 18 tratamientos (seis extractos con tres concentraciones), el testigo absoluto (agua destilada) y el testigo positivo,

Abamectina 75 mg kg<sup>-1</sup> (CATOMBE 1.8 EC, Químicos Oma, Colombia). Las concentraciones se determinaron tras pruebas preliminares realizadas para acotar los rangos de acción sobre el ácaro.

Para las pruebas de mortalidad se depositaron discos de hojas jóvenes de frijol de 3 cm de diámetro, previamente inmersos en cada tratamiento, en placas Petri con papel filtro humedecido con agua destilada. Al secarse, se colocaron 10 ácaros adultos en cada disco y se taparon. La mortalidad se evaluó a las 24, 48 y 72 h y se consideró muerto al ácaro que no presentara movimiento perceptible después de tocarlo con una cerda de cepillo (Chiasson *et al.*, 2001; 2004; Castiglioni *et al.*, 2002; Kwon y Ahn, 2002a; 2002b; Kim *et al.*, 2003; 2004a; 2004b; Choi *et al.*, 2004). El porcentaje de mortalidad se calculó considerando los datos obtenidos en el testigo absoluto y los tratamientos corrigiendo con la fórmula de Abbott (1925).

Para los bioensayos de repelencia se realizó el mismo procedimiento que para mortalidad, sólo que sobre la mitad de cada disco de 3 cm se colocó un disco de hoja de 14 mm sin tratar, y allí se pusieron 10 ácaros adultos. Se contaron los que se mantuvieron en estos últimos discos a las 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3 y 4 h (Boyd y Alverson, 2000). La información recogida en las pruebas de repelencia se analizó por medidas repetidas usando el módulo PROC MIX, del programa SAS (SAS Institute, 1999), con el cual se realizó el análisis de varianza. Las diferencias significativas se identificaron con la prueba de medias DMS (Diferencia Mínima Significativa). La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se determinó usando el módulo PROBIT del programa SAS, con el método del mismo nombre planteado por Bliss (1934) y desarrollado por Finney (1947).

Para el análisis cromatográfico se redisolviaron los extractos en sus respectivos solventes. El extracto CSC se disolvió en diclorometano (Calvey *et al.*, 1994). Para el extracto MA se agregó una cantidad igual de diclorometano para extraer por reparto los compuestos azufrados de baja a mediana polaridad presentes en dicho extracto (Kuo y Ho, 1992). Los solventes se eliminaron antes de entrar al detector de masas. La caracterización se realizó por CG/EM (6890N Network GC System, Mass selective detector 5973 Network e Inyector 7683 Series; Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA) en el laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Se usó una columna capilar de sílica fundida HP 5 (30 m x 0,25 mm, grosor de la película 0,25 µm) (Abu-Lafi *et al.*, 2004; Kimbaris *et al.*, 2006). Para la detección se utilizó energía de ionización de 70 eV. Las temperaturas del inyector y el detector se fijaron en 220 y 290 °C, respectivamente. El flujo del helio usado como gas de arrastre fue de 1 mL min<sup>-1</sup> (Kimbaris *et al.*, 2006). El horno se programó al inicio a 40 °C durante 2 min, aumentándose 2 °C cada 2 min (Block, 1992) hasta 300 °C que se mantuvieron 20 min (Abu-Lafi *et al.*, 2004). Los compuestos se identificaron con la librería NIST 98 incorporada con el equipo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Mortalidad

El extracto CSC fue el más tóxico, seguido de MEP (**Cuadro 1**). Con MA se obtuvieron mortalidades menores al 40% en la mayoría de los casos, por lo que se registró la CL<sub>30</sub>; cabe recordar que no se podía incrementar la concentración del extracto debido a que no se obtuvo puro sino que diluido en agua, a una concentración que no sobrepasó en promedio 76800 mg kg<sup>-1</sup>. Los extractos que mostraron mayor mortalidad se obtuvieron en condiciones de baja temperatura, lo que sugiere que estas condiciones favorecen la obtención de compuestos con mayor efecto acaricida que los que se pueden obtener a temperaturas mayores. La polaridad del solvente también parece influir en los resultados, pues el CO<sub>2</sub> y el éter de petróleo son solventes no polares. Estos dos extractos tienen porcentajes similares de dialil sulfuros (CSC: 23,058% y MEP: 24,842%) y de disulfuros (CSC: 12,537% y MEP: 14,798%), pero presentan grandes diferencias en el porcentaje de vinilditiínas (CSC: 63,11% y MEP: 10,173%). Con respecto a los disulfuros, los dos extractos tienen porcentajes superiores al del resto de los extractos (**Cuadro 2 y 3**). Con STATGRAPHICS PLUS V.5.0 (StatPoint Inc., 1994) se determinó la correlación entre el porcentaje relativo de disulfuros y la CL<sub>50</sub> a las 24 (r<sup>2</sup> = 79,4192 y p = 0,0424), 48 (r<sup>2</sup> = 73,9096 y p = 0,0617) y 72 h (r<sup>2</sup> = 75,3829 y p = 0,0563). Para este análisis no se consideró el macerado acuoso porque con él no se obtuvo CL<sub>50</sub>.

### Cuadro 1. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) sobre *Tetranychus urticae* de extractos obtenidos a partir de bulbos de ajo en cada tiempo evaluado.

Table 1. Mean lethal concentration (CL<sub>50</sub>) over *Tetranychus urticae* from garlic bulbs extract in each evaluated time.

Método de extracción	Tiempo					
	24 h		48 h		72 h	
	CL <sub>50</sub>	IC a 95%	CL <sub>50</sub>	IC a 95%	CL <sub>50</sub>	IC a 95%
	mg kg <sup>-1</sup>		mg kg <sup>-1</sup>		mg kg <sup>-1</sup>	
CSC	8118,8	(5815,1-17868,3)	5410,5	(3715,3-8514,3)	2820,6	(282,1-4425,6)
MEP	26794,6	(17087,9-37012,8)	17179,5	(7978,6-26683,7)	17665,0	(9969,7-25480,9)
SAE	117838,4	(87073,3-177283,5)	82080,6	(53166,7-142646,5)	47993,6	(3612,5-195831,5)
SEP	208759,5	(--)	209557,4	(--)	97872,9	(--)
MAE	231321,0	(140026,2-669253,3)	176537,4	(102478,7-586922,1)	71134,6	(--)
MA <sup>a</sup>	67296,9	(26566,8-103380)	55912,5	(--)	12130,8	(179,6-27863,4)

<sup>a</sup> Se registra CL<sub>30</sub> porque en ninguna de las pruebas se alcanzaron mortalidades del 50%, y en algunas ni siquiera el 40%.

IC: intervalo de confianza; (--): por el comportamiento de los datos el probit no arroja intervalo de confianza.

CSC: CO<sub>2</sub> supercrítico; MEP: maceración con éter de petróleo; SAE: Soxhlet con etanol; SEP: Soxhlet con éter de petróleo; MAE: maceración con etanol; MA: maceración con agua

**Cuadro 2. Porcentajes de repelencia sobre *Tetranychus urticae* de cada uno de los extractos de bulbos de ajo en cada tiempo evaluado.**

**Table 2. Repellency percentages over *Tetranychus urticae* from each garlic bulbs extract in each evaluated time.**

Método de extracción	Concent.	Repelencia (%) por cada tiempo de observación (h)						
		0,25	0,5	0,75	1	2	3	4
	mg kg <sup>-1</sup>	%						
CSC	1000	36,67a	30,00a	26,67a	26,67a	30,00a	23,33a	16,67a
	2000	36,67a	33,33a	36,67a	33,33a	30,00a	26,67a	26,67ab
	5000	83,33c	70,00cd	63,33bc	66,67bcde	66,67bcdef	66,67cdef	63,33def
MEP	1000	90,00c	90,00de	90,00cde	90,00ef	86,70ef	90,00f	90,00fgh
	2000	100,00c	100,00e	100,00e	100,00f	93,30f	93,30f	96,70h
	5000	96,70c	93,30de	90,00cde	90,00ef	86,70ef	90,00f	83,30efgh
SAE	1000	96,70c	93,30de	96,70de	93,30ef	93,30f	93,30f	90,00fgh
	2000	93,30c	86,70de	90,00cde	76,70cdef	66,70bcdef	70,00def	70,00defgh
	5000	86,70c	76,70de	86,70cde	86,70def	83,30ef	86,70ef	83,30efgh
SEP	1000	83,30c	76,70de	76,70bcde	76,70cdef	76,70def	76,70def	76,70defgh
	2000	96,70c	90,00de	90,00cde	93,30ef	83,30ef	76,70def	80,00efgh
	5000	93,30c	93,30de	93,30de	90,00ef	93,30f	90,00f	93,30gh
MAE	1000	83,30c	83,30de	83,30cde	80,00cdef	80,00ef	80,00ef	73,30defgh
	2000	83,30c	80,00de	76,70bcde	86,70def	73,30cdef	70,00def	73,30defgh
	5000	80,00c	80,00de	76,70bcde	76,70cdef	70,00cdef	73,30def	63,30def
MA	1000	43,30a	40,00ab	0,00a	40,00ab	40,00ab	40,00abc	33,30abc
	2000	53,30ab	53,30abc	53,30ab	53,30abc	50,00abcd	50,00abcd	50,00bcd
	5000	76,70bc	70,00cd	70,00bcd	70,00cde	63,30abcde	60,00bcde	56,70cde
Testigo absoluto	0	73,30bc	66,70bcd	63,30abc	53,30bcd	46,70abc	33,30ab	23,30ab
Testigo positivo (Abamectina)	750	86,67c	73,33cde	70,00bcd	70,00cde	66,67bcdef	66,67cdef	66,67defg

Datos seguidos de la misma letra no tienen diferencia significativa según prueba de diferencia mínima significativa (DMS, P < 0,05).

CSC: CO<sub>2</sub> supercrítico; MEP: maceración con éter de petróleo; SAE: Soxhlet con etanol; SEP: Soxhlet con éter de petróleo; MAE: maceración con etanol; MA: maceración con agua

**Cuadro 3. Comparación entre los compuestos mayoritarios en cada extracto.**  
**Table 3. Main compounds comparison from each extract.**

Nombre del compuesto	Área de los picos en cada método de extracción					
	CSC	MEP	SAE	SEP	MAE	MA
	%					
Metil 2-propenil disulfuro	1,66	8,20	Nd	1,18	2,48	0,92
Dimetil trisulfuro	Nd	5,08	1,15	7,89	2,51	0,87
Dialil disulfuro	10,88	6,60	7,25	5,06	5,01	2,23
2-Etilideno[1,3]ditiano	Nd	5,09	Nd	6,91	2,33	0,41
Metil 2-propenil trisulfuro	1,68	14,57	9,48	16,75	6,02	3,66
3-Vinil-1,2-ditiociclohex-4-	47,78	1,67	Nd	8,19	8,39	10,80
3-Vinil-1,2-ditiociclohex-5-	15,33	8,50	Nd	Nd	6,80	22,72
Desconocido <sup>a</sup>	Nd	Nd	32,16	Nd	Nd	Nd
Di-2-propenil trisulfuro	Nd	Nd	Nd	Nd	12,50	Nd
Di-2-propenil trisulfuro	10,40	16,76	19,82	16,39	11,71	5,96
Dialil tetrasulfuro	1,78	1,48	4,83	0,87	1,92	0,95
Bencenacetaldéhid	Nd	2,89	4,70	2,80	1,29	Nd
Total disulfuros <sup>c</sup>	12,54	14,80	7,25	6,25	7,49	3,15
Total trisulfuros <sup>d</sup>	12,08	36,40	30,45	41,03	32,74	10,50
Total vinilditiínas <sup>e</sup>	63,11	10,17	Nd	8,19	15,19	33,52
Total dialilsulfuros <sup>f</sup>	23,06	24,84	31,91	22,33	31,14	9,14
Total acíclicos azufrados <sup>g</sup>	26,40	52,68	42,53	48,15	29,65	14,60

CSC: CO<sub>2</sub> supercrítico; MEP: maceración con éter de petróleo; SAE: Soxhlet con etanol; SEP: Soxhlet con éter de petróleo; MAE: maceración con etanol; MA: maceración con agua

Nd: no se detectó por el equipo.

<sup>a</sup> Se considera desconocido por la baja probabilidad arrojada en la espectrometría de masas; <sup>b</sup> Se identificó el compuesto di-2-propenil trisulfuro en dos tiempos de retención diferentes en el extracto MAE, uno de ellos con una probabilidad del 95,5% y el otro del 98,8%; se asume este último como el compuesto señalado y el primero como un isómero dada la probabilidad tan alta; <sup>c</sup> Metil 2-propenil disulfuro y dialil disulfuro; <sup>d</sup> Dimetil trisulfuro, metil 2-propenil trisulfuro y di-2-propenil trisulfuro; <sup>e</sup> 3-Vinil-1,2-ditiociclohex-4-eno y 3-vinil-1,2-ditiociclohex-5-eno; <sup>f</sup> Dialil disulfuro, di-2-propenil trisulfuro y dialil tetrasulfuro; <sup>g</sup> Dialil tetrasulfuro, di-2-propenil trisulfuro, metil 2-propenil trisulfuro, dialil disulfuro, dimetil trisulfuro, y metil 2-propenil disulfuro.

## Repelencia

Mediante la comparación de las estructuras de covarianza, usando pruebas de bondad de ajuste o criterios de información que se generan para cada estructura, se identificó el tipo de comportamiento de los datos, y se encontró que poseen estructura simétrica compuesta. Se usó el criterio de información Bayesiano de Schwarz (BIC) (Correa, 2004) por ser el más exacto de todos. Posteriormente, se realizó el análisis de varianza, encontrando diferencias significativas entre las medias de los tratamientos y significancia en la interacción de primer orden entre los tratamientos y el tiempo ( $F = 1,31$ ;  $df = 114$ ;  $P = 0,0427$ ). Como la interacción fue significativa, no fue adecuado hacer análisis individuales de los efectos principales (Correa, 2004). Se observa que el extracto más repelente fue el obtenido por maceración con éter de petróleo (MEP) (**Cuadro 2**).

Los compuestos que se encuentran en mayor cantidad en el extracto MEP son metil 2-propenil disulfuro, dimetil trisulfuro, dialil disulfuro, 2-etilideno[1,3]ditiano, y di-2-propenil trisulfuro y el 3-vinil-1,2-ditiociclohex-5-eno (**Cuadro 3**). Estos podrían ser los responsables del efecto repelente de los extractos

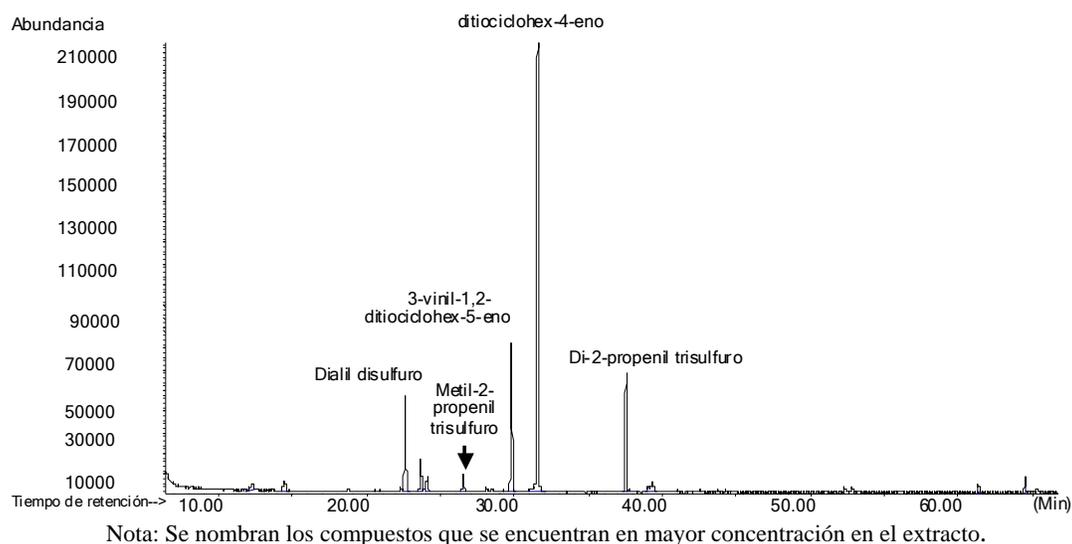
debido a su volatilidad y fuerte olor. El extracto MA tiene poco porcentaje de tales compuestos y el CSC posee sólo 1,657% de metil 2-propenil disulfuro y trisulfuro, pero una concentración apreciable de dialil disulfuro (10,88%). Esos dos extractos fueron los menos repelentes. Estos resultados son mejores que los obtenidos por Boyd y Alverson (2000), quienes usaron concentraciones de 100, 50, 20 y 10% de Garlic Barrier AG (un repelente de insectos comercial, descrito como jugo acuoso de ajo [Garlic Barrier, 1999]), jugo acuoso de ajo producido en el laboratorio y una mezcla de aceite mineral con polvo de ajo. Se observó repelencia significativa del producto comercial al 100% en todos los tiempos, y al 50% en 30 y 45 min. Esto sugiere que este tipo de extractos se debe usar casi puro para que tenga algún efecto.

Desde el punto de vista estadístico, es indiferente la utilización de cualquier extracto como repelente de *T. urticae* en las concentraciones usadas en este estudio (con la excepción del acuoso y el CSC a 1000 y 2000 mg kg<sup>-1</sup>). Además, se encontró que hay relación estadísticamente significativa entre el porcentaje de compuestos azufrados acíclicos y la repelencia máxima obtenida a las 4 h ( $r^2 = 87,2046$  y  $p = 0,0064$ ). Esta correlación sugiere que los compuestos acíclicos presentes en los extractos son los responsables, en gran medida, de la repelencia sobre el ácaro. Para definir un posible producto comercial o para realizar más pruebas habría que analizar factores tales como rendimiento de la extracción, costo del solvente, ahorro de energía y tiempo de proceso, entre otros.

### **Compuestos identificados y su influencia en la mortalidad y la repelencia**

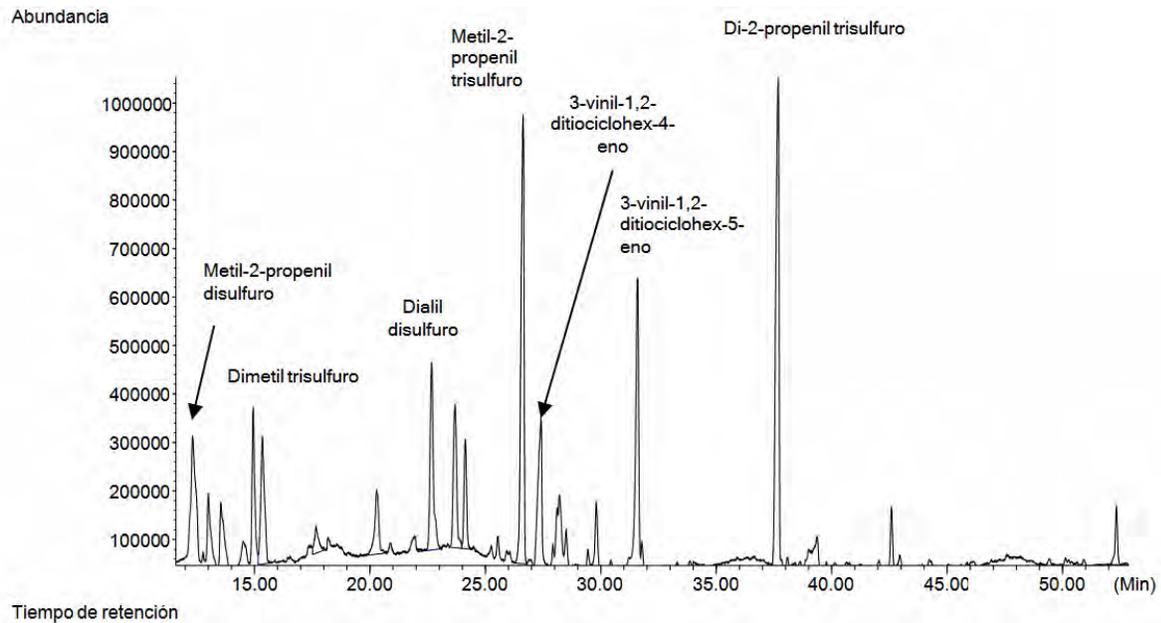
Entre los 10 y los 63 min (tiempo de retención), en la mayoría de los extractos se identificó un número importante de compuestos azufrados (**Figuras 1 y 2**). Después de ese tiempo se obtuvieron diferentes compuestos que no fueron de interés para la investigación, principalmente hidrocarburos de cadena larga. Los principales compuestos del extracto CSC son 2 vinilditiínas que representan juntas un 63,11% (**Cuadro 3**). Estos compuestos también fueron identificados por Yu *et al.* (1989), Abu-Lafi *et al.* (2004) y Calvo-Gomez *et al.* (2004). Block (1992) postuló que la conversión de alicina en vinilditiínas, así como en otros compuestos, se presenta durante el análisis cromatográfico bajo ciertas condiciones. Como una manera de verificar si la transformación de la alicina no se produce durante el proceso extractivo, Abu-Lafi *et al.* (2004) usaron técnicas criogénicas de extracción y CG/EM y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) como métodos de análisis, y aún así las obtuvieron como compuestos predominantes en todos los extractos analizados, concluyendo así que estos compuestos son los mayores componentes azufrados del ajo fresco y que durante algunos procesos (destilación con vapor, freído o blanqueamiento) se descomponen, formando otros compuestos. En los extractos obtenidos con éter de petróleo se encontraron mayores porcentajes relativos de trisulfuros (MEP: 36,407% y SEP: 41,03%) y, en los obtenidos con alcohol etílico se obtuvieron porcentajes un poco menores (MAE: 32,743% y SAE: 30,446%); en cambio, en los obtenidos con agua y CO<sub>2</sub> supercrítico los porcentajes de trisulfuros fueron sustancialmente más bajos (CSC: 12,08% y MA: 10,50%) (**Cuadro 3**). La **Figura 3** muestra las estructuras de los principales compuestos encontrados.

La interacción con los solventes parece ser un factor muy influyente para la formación de compuestos dentro de los extractos. Sobresale el caso de los extractos obtenidos usando éter de petróleo y alcohol etílico, cuyas concentraciones relativas de dimetil trisulfuros van desde 30,47% hasta 41,03%, mientras que en el agua y el CO<sub>2</sub> alcanzan como máximo 12,08%. En estos últimos extractos predominan los compuestos cíclicos. El tiempo de permanencia del CO<sub>2</sub> con el extracto fue el mismo del proceso de extracción (1,5 h), pues se gasificó al encontrarse a temperatura ambiente, mientras que en los demás solventes la permanencia fue de 8 h (soxhlet) y 24 h (maceración), más el tiempo que transcurría entre la extracción y la separación del solvente. Iberl *et al.* (1990) postulan que las vinilditiínas no son directamente producidas por reacciones catalizadas por la alinasa, sino por la descomposición de la alicina producida en solventes menos polares que el agua.



**Figura 1. Cromatograma con los picos que indican los compuestos identificados en el extracto obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico.**

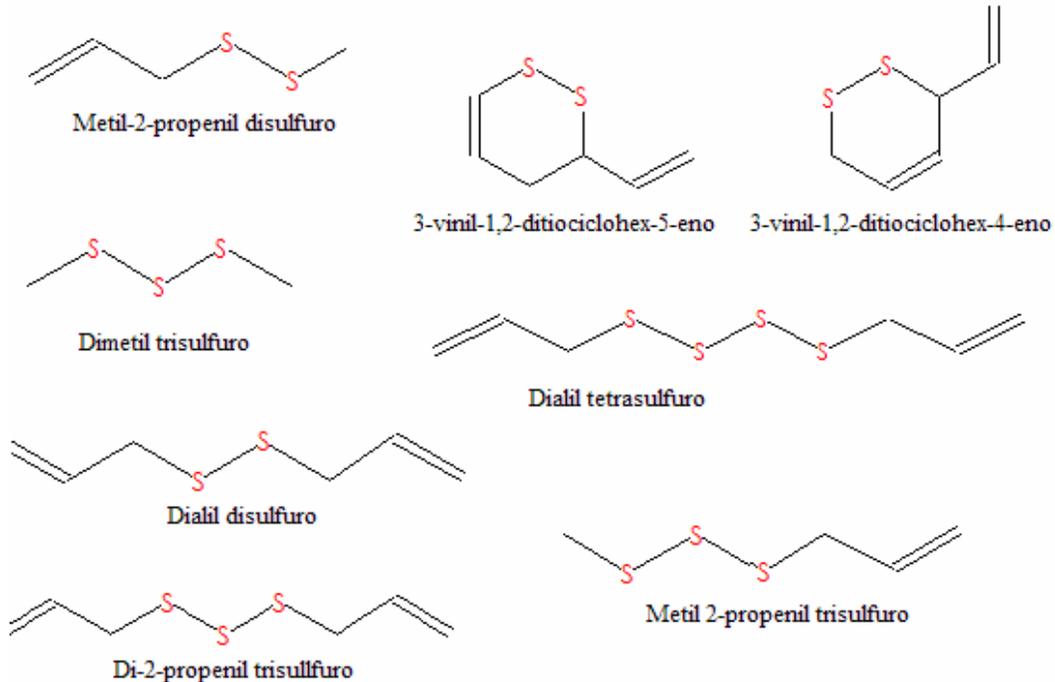
**Figure 1. Chromatogram with peaks that indicates identified compounds from supercritical CO<sub>2</sub> extract.**



**Figura 2. Cromatograma con los picos que indican los compuestos identificados en el extracto obtenido por maceración con éter de petróleo.**

**Figure 2. Chromatogram with peaks that indicates identified compounds from petroleum ether soaking extract.**

Nota: Se nombran los compuestos que se encuentran en mayor concentración en el extracto



**Figura 3. Estructura de los compuestos mayoritarios en los extractos.**

**Figure 3. Extract main compounds structures.**

Fuente: Base de datos NIST98 (National Institute for Standards and Technology, 1998)

La temperatura también parece influir en el tipo de compuestos encontrados en los diferentes extractos. Las vinilditiínas se encontraron principalmente en los extractos obtenidos a bajas temperaturas (excepto por un 8,19% encontrado de una de ellas en el extracto SEP, aproximadamente a 60 °C). Sin embargo, una correlación lineal simple entre las temperaturas de proceso y el porcentaje de vinilditiínas en cada extracto mostró que no hay relación estadísticamente significativa entre ellos ( $r^2 = 11,7894\%$  y  $p = 0,5052$ ). Sin embargo, analizando sólo la información de los extractos obtenidos con alcohol etílico y éter de petróleo se obtuvo que hay relación estadísticamente significativa entre la temperatura y el porcentaje de vinilditiínas, ( $r^2 = 73,232\%$  y  $p = 0,1212$ ). Es muy probable que la mayor toxicidad ejercida por el extracto CSC se deba a su sobresaliente porcentaje de vinilditiínas con respecto a los demás extractos. Además, se encontró que el extracto CSC tiene muy poca cantidad de otros compuestos azufrados diferentes a vinilditiínas, di-2-propenil trisulfuro, metil 2-propenil disulfuro y dialil disulfuro y tetrasulfuro, resultando en un producto relativamente limpio. Estas observaciones son compartidas por Calvey *et al.* (1998) y Ryback *et al.* (2004). El extracto acuoso también posee un porcentaje relativamente importante de vinilditiínas (33,52%) probablemente debido a que para obtener el extracto para el análisis cromatográfico se usó diclorometano, solvente que también fue utilizado para disolver el extracto obtenido por CO<sub>2</sub> supercrítico para realizar la misma operación.

Otro compuesto sobresaliente en el extracto CSC es el dialil disulfuro (DADS), con el mayor porcentaje de todos los extractos (10,88%). Auger *et al.* (2004) encontraron que la CL<sub>50</sub> de esta sustancia pura contra *R. santonensis* y *R. grassei* fue de 3400 y 2500 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente; se sugiere así, que DADS puede ser también responsable de la actividad acaricida. En ese mismo estudio el dimetil disulfuro mostró una CL<sub>50</sub> contra esas dos termitas de 150 y 100 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente; en ningún extracto de la presente investigación se encontró este compuesto, quizás por su alta volatilidad, no siendo posible su captura en las condiciones utilizadas en este estudio.

## CONCLUSIONES

El extracto de bulbos de ajo obtenido por CO<sub>2</sub> supercrítico mostró la CL<sub>50</sub> más baja en condiciones de laboratorio contra *T. urticae* en comparación con los demás extractos. Su alta concentración de compuestos cíclicos pudo ser la causa de este efecto.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la gran mayoría de los métodos de extracción en cuanto a la repelencia sobre *T. urticae* en las concentraciones analizadas en este estudio (excepto el extracto acuoso y el CSC a 1000 y 2000 mg kg<sup>-1</sup>). La concentración de compuestos acíclicos explica en un 87,21% la repelencia ejercida por cada extracto sobre *T. urticae* (con un nivel de confianza del 99%).

La extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico fue el método que permitió obtener mayor concentración de compuestos azufrados, con respecto a las demás técnicas usadas en este estudio, resultando un producto relativamente limpio.

Los resultados sugieren que con los métodos de extracción a temperatura alta se obtienen compuestos acíclicos y los procesos a temperatura ambiente propician la formación de compuestos cíclicos en mayor proporción. El extracto obtenido a temperatura ambiente usando éter de petróleo fue más tóxico que los demás extractos (excepto el obtenido con CO<sub>2</sub> supercrítico) y, a pesar de no mostrar diferencias significativas con la mayoría de los demás tratamientos, se observa como tendencia que es el extracto más repelente.

### RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a Rodrigo Vergara R., Fernando Cantor, José Ricardo Cure, a la Facultad de Ciencias Agrarias y Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, y al Centro Integrado para el Desarrollo de la Investigación (CIDI) de la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín.

### LITERATURA CITADA

Abbott, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J.Econ. Entomol.* 18:265-267.

Abu-Lafi, S., J. Dembicki, P. Goldshlag, L. Hanuš, and V. Dembitsky. 2004. The use of the 'Cryogenic' GC/MS and on-column injection for study of organosulfur compounds of the *Allium sativum*. *J. Food Compos. Anal.* 17:235-245.

Anazawa, Y., T. Tomita, Y. Aiki, T. Kozaki, and Y. Kono. 2003. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33:509-514.

Aslan, I., H. Özbek, Ö. Çalmasur, and F. Sahin. 2004. Toxicity of essential oil vapors to two greenhouse pests, *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Ind. Crops Prod.* 19:167-173.

Auger, J., I. Arnault, S. Diwo-Allain, M. Ravier, F. Molia, and M. Pettiti. 2004. Insecticidal and fungicidal potential of *Allium* substances as biofumigants. *Agroindustria* 3:5-8.

Bandyopadhyay, S., A. Roy, and S. Das. 2001. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Sci.* 161:1025-1033.

Banerjee, S., D. Hess, P. Majumder, D. Roy, and S. Das. 2004. The interactions of *Allium sativum* leaf agglutinin with a chaperonin group of unique receptor protein isolated from a bacterial endosymbiont of the mustard aphid. *J. Biol. Chem.* 279:23782-23789.

Beers, E.H., J.E. Dunley, and H. Riedl. 1998. Resistance to abamectin and reversion to susceptibility to fenbutatin oxide in spider-mite (Acari: Tetranychidae) populations in the Pacific-Northwest. *J. Econ. Entomol.* 9:352-360.

Bliss, C.I. 1934. The method of probits, a correction. *Science* 79:409-410.

Block, E. 1992. The organosulfur chemistry of the Genus *Allium* – Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1135-1178.

Boyd, D.W., and D.R. Alverson. 2000. Repellency effects of garlic extracts on two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *J. Entomol. Sci.* 35:86-90.

Calvey, E., J. Matusik, K. White, J. Betz, E. Block, M. Littlejohn, *et al.* 1994. Off-Line supercritical fluid extraction of thiosulfinates from garlic and onion. *J. Agric. Food Chem.* 42:1335-1341.

Calvey, E.M., K.D. White, J.E. Matusik, D. Sha, and E. Block. 1998. *Allium* Chemistry?: identification of organosulfur compounds in ramp (*Allium tricoccum*) homogenates. *PhytoChem.* 49(2):359-364.

Calvo-Gómez, O., J. Morales, and M. López. 2004. Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation. *J. Chrom. A* 1036:91-93.

Castiglioni, E., J. Vendramin, y M. Tamai. 2002. Evaluación del efecto tóxico de extractos acuosos y derivados de meliáceas sobre *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae). *Agrociencia* 6(2):75-82.

Chiam, W.Y., Y. Huang, S.X. Chen, and S.H. Ho. 1999. Toxic and antifeedant effects of allyl disulfide on *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* 92:239-245.

Chiasson, H., A. Belanger, N.J. Bostanian, C. Vincent, and A. Poliquin. 2001. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *J. Econ. Entomol.* 94:167-171.

Chiasson, H., N.J. Bostanian, and C. Vincent. 2004. Acaricidal properties of a *Chenopodium*-based botanical. J. Econ. Entomol. 97:1373-1377.

Chitwood, D.J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. Annu. Rev. Phytopathol. 40:221-249.

Choi, W., S. Lee, H. Park, and Y. Ahn. 2004. Toxicity of plant essential oils to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae). J. Econ. Entomol. 97:553-558.

Correa, L.G. 2004. Análisis de medidas repetidas. 41 p. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

Finney, D.J. 1947. Probit analysis. 256 p. University Press, Cambridge, UK.

Garlic Barrier. 1999. Material safety data sheet. Available at <http://www.garlicbarrier.com> (Accessed 30 May 2005).

Han, M-K., S-I. Kim, and Y-J. Ahn. 2006. Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae). J. Stored Prod. Res. 42:15-22

Herron, H., and J. Rophail. 2002. The stability of tebufenpyrad resistance in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) under laboratory conditions. Exp. Appl. Acarol. 26(3-4):253-256.

Ho, S.H., L. Koh, Y. Ma, Y. Huang, and K.Y. Sim. 1996. The oil of garlic, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), as a potential grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. Postharvest Biol. Technol. 9:41-48.

Huang, Y., S.X. Chen, and S.H. Ho. 2000. Bioactivities of methyl allyl disulfide and diallyl trisulfide from essential oil of garlic to two species of stored-product pests, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Econ. Entomol. 93:537-543.

Iberl, B., G. Winkler, B. Muller, and K. Knobloch. 1990. Quantitative determination of allicin and alliin from garlic by HPLC. Planta Med. 56:320-326.

IDEAM. 1999. Cartas climatológicas, medias mensuales. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Bogota, Colombia. Disponible en <http://bart.ideam.gov.co/cliciu/mede/mede.htm> (Leído el 27 de noviembre de 2006).

James, D.G., and T.S. Price. 2002. Fecundity in two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae) is increased by direct and systemic exposure to imidacloprid. *J. Econ. Entomol.* 95:729-732.

Kim, H.K., J.R. Kim, and Y.J. Ahn. 2004a. Acaricidal activity of cinnamaldehyde and its congeners against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *J. Stored Prod. Res.* 40:55-63

Kim, E.H., H.K. Kim, D.H. Choi, and Y.J. Ahn. 2003. Acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *Appl. Entomol. Zool.* 38:261-266.

Kim, S.I., J.H. Yi, J.H. Tak, and Y.J. Ahn. 2004b. Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet. Parasitol.* 120:297-304.

Kimbaris, A.C., N.G. Siatis, D.J. Deferera, P.A. Tarantilis, C.S. Pappas, and M.G. Polissiou. 2006. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrason. Sonochem.* 13:54-60.

Knapp, M., and S.S. Kashenge. 2003. Effects of different neem formulations on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Insect Sci. Appl.* 23:1-7.

Kuo, M., and C. Ho. 1992. Volatile constituents of the distilled oils of Welsh onions (*Allium fistulosum* L. var. Maichuon) and Scallions (*Allium fistulosum* L. var. Caespitosum). *J. Agric. Food Sci.* 40:111-117.

Kwon, J.H., and Y.J. Ahn. 2002a. Acaricidal activity of butylidenephthalide identified in *Cnidium officinale* rhizome against *Dermatophagoides farinae* y *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *J. Agric. Food Chem.* 50:4479-4483.

Kwon, J.H., and Y.J. Ahn. 2002b. Acaricidal activity of *Cnidium officinale* rhizome derived butylidenephthalide against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). *Pest Manage. Sci.* 59:119-123.

Landolt, P.J., R.W. Hofstetter, and L.L. Biddick. 1999. Plant essential oils as arrestants and repellents for neonate larvae of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environ. Entomol.* 28:954-960.

McClain, J. 2000. Processing with supercritical solvents. *Chem. Eng. (New York)* 107:72-79.

Migeon, A, and F. Dorkeld. 2007. Spider Mites Web: a comprehensive database for the Tetranychidae. Available at <http://www.montpellier.inra.fr/CBGP/spmweb>. (Leído el 27 de abril de 2008).

National Institute for Standards and Technology. 1998. Libreria NIST98. Gaithersburg, Maryland, USA.

Park, B., S. Lee, W. Choi, C. Jeong, C. Song, and K. Cho. 2002. Insecticidal and acaricidal activity of piperonaline and piperocetadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum* L. *Crop Prot.* 21:249-251.

Regnault-Roger, C., and A. Hamraoui. 1993. Efficiency of plants from the South of France used as traditional protectants of *Phaseolus vulgaris* L. against its bruchid *Acanthoscelides obtectus* (Say). *J. Stored Prod. Res.* 29:259-264.

Ryback, M.E., E.M. Calvey, and J.M. Harnly. 2004. Quantitative determination of Allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of allicin. *J. Agric. Food Chem.* 52:682-687.

SAS Institute. 1999. SAS Online doc, version eight. Cary, North Caroline, USA.

StatPoint, Inc, 1994. STATGRAPHICS PLUS V.5.0. Herndon, Virginia, USA.

Stumpf, N., C.P. Zebitz, W. Kraus, G.D. Moores, and R. Nauen. 2001. Resistance to organophosphates and biochemical genotyping of acetylcholinesterases in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 69:131-142.

Tsagkarakou, A., N. Pasteur, A. Cuany, C. Chevillon, and M. Navajas. 2002. Mechanisms of resistance to organophosphates in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) from Greece. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:417-424.

Uesugi, R., K. Goka, and M.H. Osakabe. 2002. Genetic basis of resistances to chlorfenapyr and etoxazole in the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 95:1267-1274.

Yang, X., D.C. Margolies, K.Y. Zhu, and L.L. Buschman. 2001. Host plant-induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the two-spotted spider mite (Acari: Tetranychidae). *J. Econ. Entomol.* 94:381-387.

Yu, T.H., Ch. Wu, and Y.C. Liou. 1989. Volatile compounds from garlic. *J. Agric. Food Sci.* 37:725-730.