

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO**

**ABAD DEL CUSCO**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS, MENCIÓN QUÍMICA ESPECIALIDAD PRODUCTOS  
NATURALES**



**TESIS**

**COMPOSICION QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *Citrata* (Ehrh.) Briq Y SU EFECTO INSECTICIDA PARA *Pagiocerus frontalis*.**

PRESENTADO POR LA BACHILLER:  
MAGNOLIA ZÚNIGA OLAGUIBEL

Para optar al Grado Académico de Maestro en  
Ciencias, Mención Química, Especialidad  
Productos Naturales.

ASESOR: Dr. Leoncio Solís Quispe

COASESORA: Dra. Anita Solís Quispe

**CUSCO – PERÚ**

**2022**

## ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO.....	ivii
RESUMEN .....	viii
ABSTRAC .....	iv
INTRODUCCION .....	1
CAPITULO I .....	3
EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. DESCRIPCION DEL PROBLEMA.....	3
1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA .....	4
1.3. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION.....	4
1.4. OBJETIVOS .....	5
1.4.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
1.4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	5
CAPITULO II .....	6
MARCO TEORICO.....	6
2.1 ANTECEDENTES .....	6
2.1.1 <i>Minthostachys spicata</i> .....	6
2.1.2 <i>Clinopodium bolivianum</i> .....	7
2.1.3 <i>Tanacetum vulgare</i> .....	7
2.1.4 <i>Mentha X piperita</i> VAR. <i>Citrata</i> (EHRH.) BRIQ .....	8
2.2 DESCRICION BOTANICA DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO .....	10
2.2.1 <i>Minthostachys spicata</i> (BENTH) EPLING.....	10
2.2.2 <i>Clinopodium bolivianum</i> (BENTH) KUNTZE.....	12
2.2.3 <i>Tanacetum vulgare</i> LINNAEUS.....	13
2.2.4 <i>Mentha X piperita</i> VAR. <i>Citrata</i> . .....	14
2.2.5 <i>Zea maíz</i> L. ....	15
2.2.6 <i>Pagiocerus frontalis</i> (gorgojo).....	16
2.3 BASES TEORICAS .....	19
2.3.1 ACEITES ESENCIALES.....	19
2.3.1.1 PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	20
2.3.1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES. ....	21
2.3.1.3 FUNCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES. ....	21
2.3.2 MONOTERPENOS Y SESQUITERPENOS.....	22

2.3.3 FENILPROPANOS.....	23
2.3.4 BIOSÍNTESIS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	24
2.3.4.1 FORMACIÓN DE ÁCIDO MEVALÓNICO.....	24
2.3.4.2 FORMACIÓN DE ISOPENTILPIROFOSFATO Y DIMETILALILPIROFOSFATO.....	26
2.3.4.3 CONDENSACIÓN CABEZA-COLA DE IPP Y DMAPP.....	27
2.3.5 BIOSÍNTESIS DE FENILPROPANOS.....	28
2.3.6 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	29
2.3.6.1 POR ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA.....	29
2.3.6.2 EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES.....	31
2.3.6.3 EXTRACCIÓN CON GRASAS.....	31
2.3.6.4 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	32
2.3.7 CONSERVACIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	33
2.3.8 ACOPLAMIENTO CROMATOGRAFÍA DE GASES- ESPECTROMETRIA DE MASAS.....	33
2.4 INSECTICIDA.....	35
2.4.1 INSECTICIDAS NATURALES.....	35
2.4.1.1 ROTENONA.....	35
2.4.1.2 SABADILLA.....	36
2.4.1.3 NICOTINA.....	37
2.4.1.4 RIANODINA.....	37
2.4.1.5 AZADIRACTINA.....	38
2.4.1.6 PIRETRINAS.....	39
2.5 PROPIEDAD BIOCIDA DE LAS PLANTAS.....	39
2.5.1 MECANISMO DE DEFENSA DE LAS PLANTAS.....	40
2.5.2 RELACIÓN DE METABOLITOS SEGUNDARIOS CON LOS INSECTOS .....	40
2.5.3 USO DE PLANTAS CON PROPIEDADES BIOCIDAS.....	41
2.5.4 ACEITES ESENCIALES COMO INSECTICIDAS.....	42
2.6 CONCENTRACION LETAL MEDIA $CL_{50}$ .....	44
CAPITULO III.....	45
METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	45
3.1 TIPO DE INVESTIGACION.....	45
3.2 HIPOTESIS.....	45

3.3 VARIABLES .....	45
3.3.1 VARIABLE INDEPENDIENTE.....	45
3.3.2 VARIABLE DEPENDIENTE. ....	46
3.3.3 VARIABLES INTERVINIENTES.....	46
3.4 PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO.....	46
3.4.1 MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO	47
3.4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR EFECTO	
INSECTICIDA.....	48
3.4.3 MUESTREO DE ESPECIES VEGETALES .....	49
3.4.4 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA EXTRACCION DE	
ACEITES ESENCIALES.....	49
3.4.5 EXTRACION DE ACEITES ESENCIALES .....	51
3.4.6 ADAPTACION DE LOS PAGIOCERU FRONTALIS .....	50
3.5 DETERMINACION DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE	
LOS ACEITES ESENCIALES .....	51
3.5.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.....	52
3.5.2 DENSIDAD RELATIVA.....	52
3.5.3 ÍNDICE DE REFRACCIÓN.....	53
3.5.4 ROTACIÓN OPTICA .....	53
3.5.5 ÍNDICE DE ACIDEZ .....	53
3.6 DETERMINACION DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	54
3.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA .....	55
3.8 ANALISIS ESTADISTICO DEL EFECTO INSECTICIDA .....	55
CAPITULO IV.....	57
RESULTADO Y DISCUSIÓN .....	57
4.1 DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL .....	57
4.2 DE LA SOLUBILIDAD .....	58
4.3 DE LAS CARACTERISTICAS FISICOQUÍMICAS .....	58
4.4 DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	60
4.4.1 ACEITE ESENCIAL DE <i>Minthostachys spicata</i> .....	60
4.4.2 ACEITE ESENCIAL DE <i>Clinopodium bolivianum</i> .....	64
4.4.3 ACEITE ESENCIAL DE <i>Tanacetum vulgare</i> .....	68
4.4.4 ACEITE ESENCIAL DE <i>Mentha X piperita</i> Var. <i>Citrata</i> .....	71
4.5 DEL EFECTO INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	75

4.5.1 EFECTO INSECTICIDA DEL AE <i>Minthostachys Spicata</i> Epling.....	75
4.5.2 EFECTO INSECTICIDA DEL AE <i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth).....	78
4.5.3 EFECTO INSECTICIDA DEL AE <i>Tanacetum Vulgare</i> L .....	81
4.5.4 EFECTO INSECTICIDA DEL AE <i>Mentha x piperita</i> var. <i>Citrata</i> .....	84
4.6 DETERMINACION DE LA CL <sub>50</sub> METODO PROBIT .....	87
4.6.1 CONCENTRACION LETAL MEDIA DEL AE <i>M. spicata</i> .....	88
4.6.2 CONCENTRACION LETAL MEDIA DEL AE <i>C. bolivianum</i> . ....	89
4.6.3 CONCENTRACION LETAL MEDIA DEL AE <i>Tanacetum vulgare</i> L .....	90
4.6.4 CONCENTRACION LETAL MEDIA DEL AE DE <i>Mentha x piperita</i> Var. <i>Citrata</i> .....	91
CONCLUSIONES.....	93
RECOMENDACIONES .....	94
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	95
ANEXOS .....	107

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño experimental de efecto insecticida de aceites esenciales .....	48
Tabla 2. Porcentaje de Extracción de los Aceites Esenciales .....	57
Tabla 3. Resultados de la solubilidad de los aceites esenciales .....	58
Tabla 4. Características Organolépticas y Fisicoquímicas .....	59
Tabla 5. Composición Química del aceite esencial de <i>Minthostachys spicata</i> . ....	62
Tabla 6. Composición Química del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> . .	66
Tabla 7. Composición Química del aceite esencial de <i>Tanacetum Vulgare</i> .....	70
Tabla 8. Composición Química del AE de <i>Mentha x piperita</i> .....	73
Tabla 9. Efecto insecticida del aceite esencial de <i>Minthostachys spicata</i> para <i>Pagiocerus frontalis</i> .....	76
Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de <i>Pagiocerus frontalis</i> con el aceite esencial de <i>Minthostachys spicata</i> . .....	78
Tabla 11. Efecto insecticida del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> para <i>Pagiocerus frontalis</i> .....	79
Tabla 12. Porcentaje de mortalidad de <i>Pagiocerus frontalis</i> con el aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> .....	81
Tabla 13. Efecto Insecticida del AE <i>Tanacetum Vulgare L.</i> .....	82
Tabla 14. Porcentaje de mortalidad de <i>Pagiocerus frontalis</i> con aceite esencial de <i>Tanacetum Vulgare L.</i> .....	84
Tabla 15. Efecto insecticida del aceite esencial de <i>Mentha x piperita var. Citrata</i> para <i>Pagiocerus frontalis</i> .....	85
Tabla 16. <i>Mentha x piperita var. Citrata</i> <i>Mentha x piperita var. Citrata</i> .....	87
Tabla 17. Concentración letal media del efecto insecticida del aceite esencial <i>Minthostachys spicata</i> para <i>Pagiocerus frontales</i> .....	88
Tabla 18. Concentración letal media del efecto insecticida del aceite esencial <i>Clinopodium bolivianum</i> para <i>Pagiocerus frontalis</i> .....	89
Tabla 19. Concentración letal media del efecto insecticida del aceite esencial <i>Tanacetum vulgare</i> para <i>Pagiocerus frontalis</i> .....	90
Tabla 20. Concentración letal media del efecto insecticida del aceite esencial de <i>Mentha x piperita Var. Citrata</i> para <i>Pagiocerus frontalis</i> .....	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Minthostachys spicata</i> (Benth.) Eplin. ....	12
Figura 2. <i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze .....	13
Figura 3. <i>Tanacetum vulgare</i> Linnaeus .....	14
Figura 4. <i>Mentha x piperita</i> var <i>Citrata</i> .....	15
Figura 5. <i>Zea mays</i> L .....	16
Figura 6. Especie <i>Pagiocerus frontalis</i> (gorgojo de maíz) .....	17
Figura 7. Daños ocasionas por <i>Pagiocerus frontalis</i> .....	19
Figura 8. Monoterpenos de los aceites esenciales.....	22
Figura 9. Sesquiterpenos de los aceites esenciales.....	23
Figura 10. Fenilpropanos naturales presentes en aceites esenciales .....	24
Figura 11. Biosíntesis de Ácido mevalónico.....	25
Figura 12. Biogénesis de las unidades isoprenicas básicas: Isopentenilpirofosfato (IPP) y Dimetilalilpirofosfato (DMAPP) .....	26
Figura 13. Formación de los monoterpenos y sesquiterpenos a partir de IPP y DMAPP.....	27
Figura 14. Formación del ácido shikímico .....	28
Figura 15. Trampa de Clevenger.....	30
Figura 16. Rotenona.....	36
Figura 17: Sabadilla .....	37
Figura 18: Nicotina .....	37
Figura 19. Rianodina .....	38
Figura 20. Azadiractina .....	39
Figura 21. Piretrinas .....	39
Figura 22. Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger .....	51
Figura 23. Perfil Cromatográfico del aceite esencial de <i>Minthostachys spicata</i> . ..	61
Figura 24. Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Minthostachys Spicata</i> .....	64
Figura 25. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Clinopodium bolivianum</i> ..	65
Figura 26. Componentes Mayoritarios del aceite esencial <i>Clinopodium Bolivianum</i> . ..	67
Figura 27. Perfil cromatográfico del aceite esencial de <i>Tanacetum vulgare</i> . .....	69
Figura 28. Componentes Mayoritarios del AE <i>Tanacetum Vulgare</i> L.....	71

<i>Figura 29. Perfil Cromatografico del aceite esencial de Mentha x piperita var. citrata</i> .....	72
<i>Figura 30. Componentes Mayoritarios del AE Mentha x piperita</i> .....	74
<i>Figura 31. Efecto insecticida del AE de Minthostachys spicata para Pagiocerus Frontalis</i> .....	77
<i>Figura 32. Efecto insecticida del aceite esencial de Clinopodium bolivianum para Pagiocerus frontalis</i> .....	80
<i>Figura 33. Efecto insecticida del aceite esencial de Tanacetum Vulgare para Pagiocerus frontalis</i> .....	83
<i>Figura 34. Efecto insecticida del aceite esencial de Mentha x piperita var. Citrata para Pagiocerus frontalis</i> .....	86
<i>Figura 35: Lugar de muestreo en la comunidad de Ccorao distrito de San Sebastián</i> .....	108
<i>Figura 36: Lugar de muestreo en la comunidad de Ccorao distrito de San Sebastián</i> .....	108
<i>Figura 37: Muestreando la especie biológica Minthostachis spicata</i> .....	109
<i>Figura 38: Muestreando la especie biológica Clinopodium bolivianum.</i> .....	109
<i>Figura 39. Extrayendo aceite esencial de la especie biológica Mentha x piperita var. citrata</i> .....	110
<i>Figura 40: Extrayendo aceite esencial de la especie biológica Tanacetum Vulgare</i> .....	110
<i>Figura 41: Extrayendo aceite esencial de la especie biológica Minthostachys spicata (Benth) Epling</i> .....	111
<i>Figura 42: Adaptación y crianza de los insectos Pagiocerus Frontalis</i> .....	111
<i>Figura 43: Selección de la muestras infectadas con Pagiocerus Frontalis</i> .....	112
<i>Figura 44: Preparación de las diferentes concentraciones de AE</i> .....	112
<i>Figura 45: Separación de los veinte Pagiocerus frontalis</i> .....	113
<i>Figura 46: Aplicación de los aceites esenciales en los insectos</i> .....	113
<i>Figura 47: Aplicación de los aceites esenciales en los insectos</i> .....	114
<i>Figura 48: Observacion de los insectos a dos horas con AE de Minthostachys spicata</i> .....	114
<i>Figura 49: Observando que el AE se expanda durante 12horas</i> .....	115
<i>Figura 50: Observando los resultados del AE se expanda durante 12horas</i> .....	115



*Figura 51: Observando a las 24 horas el blanco sin AE..... 116*  
*Figura 52: Observando la mortalidad del 100% de Pagiocerus frontalis. .... 116*

## TABLA DE ABREVIATURAS

CG-MS:	Cromatografía de Gases acoplado a espectrometro de masas.
CL <sub>50</sub> :	Concentracion letal media.
DL <sub>50</sub> :	Dosis letal media
CG-FID:	Cromatografía de gases con detector de ionizacion de llama
μL/L:	Microlitros
μL/cm <sup>2</sup> :	Microlitros por centimetro cuadrado
mg/L:	Microgramo por litro
C <sub>10</sub> :	Monoterpenos
C <sub>15</sub> :	Sesquiterpenos
Acetil-CoA:	Acetil coenzima A
HS-CoA:	Hidroximetil glutaril coenzima A
IPP:	Isopropilpirofosfato
DMAPP:	Dimetilalilpirofosfato
PEP:	Pentosa fosfato
E-4-P:	Eritrosa-4-fosfato
IRAC:	Insecticide Resistance action committee
INTAGRI:	Instituto para la innovacion tecnologica en la agricultura
AE:	Aceite esenciales
Q.P:	Quimicamente puramente
INACAL:	Instituto Nacional de Calidad
CODEX:	Codigo alimentario
AOAC:	The official methods of analysis chemists
NTP:	Norma Tecnica Peruana
Da:	Dalton

## **DEDICATORIA**

A Dios, por haberme concedido la vida, haciéndome descubrir con sus maravillosas obras cuán grande puede ser el hombre, que gracias a Él he podido realizar mis estudios para llegar a cumplir uno de mis más grandes sueños.

A mi mamita, Irmita quien con amor, sacrificio, abnegación y constancia inculco en mí el amor y respeto al prójimo y supo apoyarme y guiarme hacia el sendero del éxito.

A mí adorado hijo Jafair Sebastián razón de mi vida, quien con su tierna existencia ha logrado dar sentido a mi vida llenándola de aspiraciones y ayudándome a ver la vida con madurez y responsabilidad.

Finalmente, a todos mis familiares, maestros y amigos que de una u otra forma me apoyaron durante la realización de este trabajo.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, por permitirme cumplir con este sueño, así mismo a mis profesores de la maestría.

Al Dr. Leoncio Solís Quispe, por su magnífica colaboración y asesoramiento de la presente Tesis, gracias por su tiempo, por su paciencia, por su apoyo incondicional; así como por todo el conocimiento que me transmitió en el desarrollo de mi formación profesional.

Al Departamento Académico de Química, al proyecto CANON de aceites esenciales y el convenio ARES por el uso de instrumentos, laboratorios y logística.

## RESUMEN

En estos últimos años se está buscando nuevas alternativas orgánicas basadas en la utilización de plantas aromáticas con propiedades insecticidas para el control de plagas de granos almacenados; que buscan reemplazar a los insecticidas sintéticos y minimizar la cantidad de residuos tóxicos en los granos para disminuir los efectos causados en la salud. En la investigación se ha determinado el rendimiento, las propiedades fisicoquímicas, la composición química y el efecto insecticida de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *Citrata* (Ehrh.) Briq sobre el *Pagiocerus frontalis*.

Los aceites esenciales fueron extraídos de muestras frascas por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger, la composición química fue determinado por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas y el efecto insecticida por el método de impregnación en papel en recipiente cerrado.

El rendimiento de los aceites esenciales fue para: *Minthostachys spicata* 0.61 %, *Clinopodium bolivianum* 0.81%, *Tanacetum vulgare* 0.4% y *Mentha x piperita* 0.83%. La composición química de los aceites esenciales muestran como componentes mayoritarios, para *M. spicata*, pulegona (49,50%); mentona (18,95%); isomentona (14,46%); 4,7,7- trimetilbiciclo[4.1.0] hept -3-eno (3,57%) y  $\beta$ - cariofileno (1,85%); para *C. bolivianum*, isomentona (24,08%), mentona (16,3%), timol (15,82%), *p*-cimeno (10,7%),  $\gamma$ -terpineno (7,21%) y la pulegona (6,55%); para *T. vulgare*, tuyona (91,77%); sabineno (3,02%); 1- isopropilBiciclo[3.1.0]hexan-3-ona (1,18%), *p*-cimeno (0,93%) y eucaliptol (0,73%) y para *M. x piperita*, mentol (43,35 %) acetato de metilo (22,21 %), limoneno (7,07 %); mentona (6,17 %), y eucaliptol (4,87%). Los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita* var. *Citrata* presenta efecto insecticida para *Pagiocerus frontalis*, con una concentración letal media (CL50), de 0.13 %; 0.1917 %; 0.0743 % y 0.0672 % respectivamente, a 12 horas de exposición.

**Palabras clave:** Aceite esencial, *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare*, *Mentha x piperita* var. *Citrata* y *Pagiocerus frontalis*, efecto insecticida

## ABSTRAC

In recent years, new organic alternatives are being sought based on the use of aromatic plants with insecticidal properties to control stored grain pests; that seek to replace synthetic insecticides and minimize the amount of toxic residues in grains to reduce health effects. The research has determined the performance, the physicochemical properties, the chemical composition and the insecticidal effect of the essential oils of *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus and *Mentha x piperita* var. *Citrata* (Ehrh.) Briq on *Pagiocerus frontalis*.

The essential oils were extracted from bottle samples by the hydrodistillation method with the Clevenger trap, the chemical composition was determined by Gas Chromatography - Mass Spectrometry and the insecticidal effect by the method of impregnation on paper in a closed container.

The yield of essential oils was for: *Minthostachys spicata* 0.61%, *Clinopodium bolivianum* 0.81%, *Tanacetum vulgare* 0.4% and *Mentha x piperita* 0.83%. The chemical composition of essential oils show as major components, for *M. spicata*, pulegone (49.50%); mentone (18.95%); isomethone (14.46%); 4,7,7-trimethylbicyclo [4.1.0] hept -3-ene (3.57%) and  $\beta$ -caryophyllene (1.85%); for *C. bolivianum*, isomenthone (24.08%), menthone (16.3%), thymol (15.82%), p-cymene (10.7%),  $\alpha$ -terpinene (7.21%) and the pulegone (6.55%); for *T. vulgare*, thujone (91.77%); sabinene (3.02%); 1- isopropylBicyclo [3.1.0] hexan-3-one (1.18%), p-cymene (0.93%) and eucalyptol (0.73%) and for *M. x piperite*, menthol (43.35%) acetate methyl (22.21%), limonene (7.07%); mentone (6.17%), and eucalyptol (4.87%). The essential oils of *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* and *Mentha x piperita* var. *Citrata* has an insecticidal effect for *Pagiocerus frontalis*, with a mean lethal concentration (LC50) of 0.13%; 0.1917%; 0.0743% and 0.0672% respectively, at 12 hours of exposure.

**Keywords:** Essential oil, *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare*, *Mentha x piperita* var. *Citrata* and *Pagiocerus frontalis*, insecticidal effect

## INTRODUCCION

Una de las preocupaciones más grandes en el mundo entero por conservar el medio ambiente es el uso y cantidad de insecticidas que se emplean en la agricultura.

El uso de plaguicidas químicos ha tenido un efecto positivo en el tratamiento de las plagas, sin embargo, no constituyen una panacea para controlar cualquier tipo de plaga; su abuso puede provocar graves daños a los ecosistemas que compromete la salud humana.

Afortunadamente a través de los años se han investigado distintas posibilidades para solucionar el problema y una de las alternativas factible es el uso de metabolitos secundarios presentes en las plantas como insecticidas, que han tomado gran importancia debido a su efectividad, la no contaminación del ambiente por ser biodegradables y su presencia en la naturaleza.

La aplicación de insecticidas sintéticos y el uso indiscriminado de los mismos ha conllevado a graves problemas de contaminación ambiental, dejan residuos no admisibles tanto en la planta como en los granos.

La Agricultura Orgánica ha surgido como una alternativa para un mejor desarrollo del sector agrícola del país y una alternativa importante es el empleo de aceites esenciales como insecticida, de plantas aromáticas propios de cada sector, cuyo uso puede disminuir el uso de plaguicidas, cada vez más caros, más concentrados, y peligrosos, cuyo uso continuo ha provocado una mayor resistencia en los insectos y enfermedades, y ha eliminado a los enemigos naturales de las plagas.

Pero el porcentaje de agricultores que aplican este tipo de agricultura en el país es relativamente bajo, el desconocimiento de sus cualidades y la carencia de elementos de juicio que les permita establecer los costos en los que se incurren en la elaboración de los mismos han limitado su uso.

En el departamento del Cusco, el maíz blanco gigante es uno de los productos de consumo diario y su principal plaga en almacenamiento es el *Pagiocerus frontalis* (gorgojo de maíz); por esta razón en este trabajo de investigación se evaluó la composición química y el efecto insecticida de aceites esenciales de cuatro especies aromáticas alto andinas por el método impregnación en papel a nivel de laboratorio tratando que se asemeje a las condiciones de almacenamiento frecuente.

Esta investigación de aceites esenciales como insecticida nos compromete al uso de estas plantas como bioplaguicida en el almacenamiento y conservación de alimentos; como una única alternativa de tecnología limpia dentro del manejo ecológico de plagas



# CAPITULO I

## EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.1. DESCRIPCION DEL PROBLEMA

El desarrollo de la agricultura de cultivos en el área andina, en los últimos años ha planteado nuevos retos en el manejo integral de los sistemas de producción agrícola, fundamentalmente en el control de plagas que afectan al desarrollo y producción de los cultivos andinos, esto es, la protección de las plagas depredadoras, como los insectos; sin provocar la contaminación de los alimentos, de los agricultores, ni del medio ambiente (Regnauld, 2004).

Los aceites esenciales podrían ser una alternativa de solución y reemplazo de los insecticidas tóxicos que causan efectos degenerativos en los seres humanos por su alto poder residual prolongado. Los aceites esenciales, parte de los metabolitos secundarios, son una fuente inagotable de investigación en el control de plagas; además investigaciones desarrolladas han demostrado que los metabolitos secundarios poseen una diversidad de efectos biológicos, como: antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, anticancerígenas y actividad biocida contra diversos organismos, como los virus patógenos, insectos y otras aplicaciones.

Existen antecedentes de investigaciones realizadas con aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* Labill y *Tagetes multiflora* Kunth como insecticida para *Pagiocerus frontalis*, con resultados muy positivos; también se han reportado investigaciones de efecto insecticida con otros aceites esenciales para otros insectos. Lo que indica que los aceites esenciales como insecticida, son una alternativa para el control de insectos depredadores de los cultivos andinos.

En la revisión de bibliografía especializada no se ha encontrado reportes sobre el efecto insecticida de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianun* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *citrata* (Ehrh.) Briq para *Pagiocerus frontalis*, insecto depredador del maíz; uno de los cultivos andinos más importantes de la alimentación humana. Razón por la cual, en la presente investigación se propone

evaluar la composición química, el efecto insecticida de los aceites esenciales de estas especies vegetales aromáticas, que se desarrollan en la región sur andino de nuestro país.

## **1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA**

¿Cuál es la composición química de los aceites esenciales extraídos por hidrodestilación de *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita var Citrata* (Ehrh.) Briq?

¿Presentan efecto insecticida los aceites esenciales de *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita var. citrata* (Ehrh.) Briq para *Pagiocerus frontalis*?

## **1.3. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION**

El conocimiento de la composición química y del efecto insecticida de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita*, son un aporte al conocimiento de los aceites esenciales como insecticida. También podrían permitir el uso de estos aceites esenciales para elaborar insecticidas verdes y poner disminuir el uso de insecticidas de síntesis química que causan serios problemas a la naturaleza.

La investigación de la tesis permitirá revalorar a las especies aromáticas de las zonas andinas, además de permitir el uso racional de estas especies vegetales como insecticida en las zonas donde se desarrollan las especies *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita*.

## **1.4. OBJETIVOS**

### **1.4.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la composición química de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* y su efecto insecticida para *Pagiocerus frontalis*.

### **1.4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar el porcentaje de extracción de los aceites por el método de hidrodestilación en trampa de Clevenger.
- Identificar las características fisicoquímicas de los aceites esenciales, por ensayos de laboratorio.
- Hallar la composición química de los aceites esenciales *Minthostachys spicata* (Muña), *Clinopodium bolivianum*(Cjuña muña), *Tanacetum vulgare*(Palma real) y *Mentha x piperita*(Menta) por Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas.
- Determinar el efecto insecticida de los aceites esenciales para *Pagiocerus frontalis* insecto depredador del maíz durante su almacenamiento, por el método de impregnación en papel.

## CAPITULO II MARCO TEORICO

### 2.1 ANTECEDENTES

#### 2.1.1 *Minthostachys spicata*

Tejada (1980) estudia el aceite esencial de *Minthostachys spicata* (Bent.) Epl de Cusco Perú por GC-MS y reporta la composición química en el que identificó pulegona (60,09 %), isomentona (13,7 %) y mentona (8,97 %) y probablemente carvona y limoneno en muy bajo porcentaje. De los resultados de las pruebas biológicas se reporta un DL50 de: 0,006 g/L para gusano de papa, 0,00075 g/L para gorgojo de maíz, 0,004 g/L para saltamontes, 0,0005 g/L para moscas y 0,0125 g/L para *astillus*.

Zygadlo et al., (1996) reportó resultados de la composición química de su aceite esencial de las hojas de *Minthostachys verticillata* de diferentes áreas fitogeográficas de Argentina obtenidas por hidrodestilación y analizado por GC-FID y GC/MS en donde la variabilidad fue extremadamente variable de una población a otra, lo que lleva a la conclusión de que hay varios quimiotipos en esta especie. El timol y carvacrol fueron los componentes principales (> 10 %) en los aceites de las poblaciones Potrero y Sebastián. La pulegona se encontró en los aceites esenciales de Córdoba, San Luis, Catamarca y Tucumán en cantidades elevadas (> 21,1 %). Un alto porcentaje de carvona (35,2 %) se encontró en el aceite esencial obtenido a partir de muestras de Rancho de la Cascada.

Schmidt-Lebuhn (2008) en sus estudios de *Minthostachys mollis* var. *Mandoniana* (Briq.) de Bolivia muestra que contienen cantidades importantes de pulegona (25,5%) y mentona (24,9 %). En Venezuela, en la especie *Minthostachys mollis* var. *mollis* o *Minthostachys septentrionalis* predominó la pulegona (>75 %). El aceite esencial de la especie *Minthostachys mollis* var. *mollis* de Ecuador mostró una composición de neomentol (29,3 %), mentol (20,6 %), mentona (24 %) y piperitona (9%). Otra muestra de *Minthostachys mollis* ecuatoriano tuvo mentona (16%), acetato de carvacrilo (10%), pulegona (10%) y carvacrol (9%).

Zegarra (2010) demostró que el aceite esencial de la muña se emplea para combatir parásitos, como piojos y pulgas; así como la gusanera de papas y maíz; la babosa de hortalizas y los piojos del repollo. El aceite esencial de la *Minthostachys mollis* Griseb está compuesto principalmente por monoterpenos, tales como: pulegona (19.3%), mentona (18.4%), carvona (1.7%); además se han reportado la presencia de limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, ácido piperínico, mentol, eucaliptol.

### **2.1.2 *Clinopodium bolivianum***

Tepe et al., (2007) investigaron la composición química del aceite esencial de la especie biológica de *Clinopodium vulgare* por GC-MS. Reportando la presencia de 40 compuestos, los que representa el 99,4 % del aceite esencial; los componentes principales encontrados fueron timol (38,9%),  $\gamma$ -terpineno (29,6%) y p-cimeno (9,1%).

Rojas (2007) el estudio se realizó en la comunidad Pairumani, Provincia Omasuyos-Bolivia; reporto efecto insecticida el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* y *Eucalyptus glóbulos Labill*, un producto químico tóxicos (etiqueta azul) como el karate; y un testigo (sin tratamiento), con dos variedades de papa Imilla negra. En cuanto a la eficiencia de los productos que presentaron mayor control en el insecto plaga, fue Karate con 65,9 % y 55,8 % de eficiencia para el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*, debido a la presencia de su componente mayoritario como isomentona (33,61%); carvacrol (11,14%); 1,8-Cineol (9,02 %) y pulegona (9,79%).

### **2.1.3 *Tanacetum vulgare***

Ekundayo (1979) el aceite volátil del *Tanacetum vulgare* fue analizado por la combinación de cromatografía de gas-líquido y cromatografía de gases - espectrometría de masas cuyos resultados arrojados fueron que el monoterpeno predominante es la isotuyona (66 a 81 %) y una menor proporción de sabineno (3 a 6 %) y  $\alpha$ -terpineno (1 a 4 %).

Baranauskiene et al., (2014) analizaron el aceite esencial de la muestra biológica de *Tanacetum vulgare* por hidrodestilación las muestras de Lituania y reportaron

un rendimiento de 0,52 %. Dentro de su composición el mayor componente fue  $\beta$ -tuyona (86,1 %), mientras que otros componentes superiores al 1% fueron  $\alpha$ -tuyona (2,5 %) y sabineno (2,5 %), mientras que *p*-cimeno (0,9 %), acetato de bornilo (0,7 %), germacreno (0,8 %),  $\alpha$ -terpineno (0,5 %).

Polatoglu et al., (2015) estudiaron la actividad insecticida del aceite esencial de la flor y el tallo de *Tanacetum abrotanifolium* contra *Sitophilus granarius*; su efecto insecticida por contacto fue con 81,30 % de mortalidad.

Attighi et al., (2013) su investigación dio como resultados que *Tanacetum Balsamita* se puede utilizar como una alternativa a los insecticidas sintéticos, pero puede ser necesaria una dosis más alta se evaluaron el efecto fungicida del aceite esencial de *Tanacetum balsamita* L. contra *Callosobruchus maculatus* F. a las concentraciones de 5.2; 7.23; 10.19; 14.36 y 20.24 u/L de aire para los adultos y 5.3; 8.5; 10.8; 13.7 y 17.4 u/L para los huevos. Todos los experimentos se realizaron a  $27 \pm 1$  °C y una humedad relativa del  $65 \pm 5\%$ . La mortalidad se controló después de 24, 48 y 72 h de exposición. Los adultos tratados con aceite eran más susceptibles que los huevos, en dosis más alta (20.24 u/L de aire).

Fuertes et al., (2010) con el fin de reemplazar los insecticidas sintéticos empleados en el cultivo del algodón, por sustancias inocuas que permitan un manejo integrado de plagas con fundamento ecológico, investigaron y colectaron 40 especies vegetales con propiedades biocidas, Entre las especies estudiadas por sus propiedades insecticidas tenemos: *Hura crepitans* (catahua), *Schinus molle* (molle), *Annona cherimola* (chirimoya), *Annona muricata* (guanábana o graviola), *Tagetes patula* (marigold), *Tanacetum vulgare*, etc. De la corteza y hojas de estas especies se obtuvieron extractos acuosos que fueron evaluados su composición química, bioactividad frente a los nauplios de *Artemia salina* y bioensayos a nivel de laboratorio y de campo. Entre las plagas investigadas figuran: *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci* y *Dysdercus peruvianus*.

#### **2.1.4 *Mentha X piperita* VAR. *Citrata* (EHRH.) BRIQ**

Kumar (2012) los aceites esenciales de dos especies de *Mentha*: *Mentha piperita* y *Mentha citrata* fueron evaluados por su composición química y la actividad insecticida frente a la mosca doméstica, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae).

Su composición química se analizó por (GC-MS), la *M. piperita* se encontró mentol (26,53%), mentona (25,83%), acetato de mentilo (7,35%), mientras que el aceite esencial de *M. citrata* mostró acetato de linalol (26,69%) y linalol (24%) como principales constituyentes. Su efecto insecticida se evaluó contra las larvas y pupas de mosca doméstica, a través de dos bioensayos diferentes: la toxicidad por contacto y fumigación. El ensayo larvicida, para la *M. piperita* la concentración letal fue de LC50 0,54  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (toxicidad por contacto) y 48,4  $\mu\text{l}/\text{L}$  (fumigación), mientras que para *M. citrata*, fue de 1,39  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (contacto toxicidad) y 61,9  $\mu\text{l}/\text{L}$  (fumigación). El efecto pupicida se midió en términos de tasa de porcentaje de inhibición, para *M. x piperita*, fue de 100% tanto por contacto y fumigación, mientras que para la *M. citrata* fue de 68% y 57% por contacto y fumigación, respectivamente. El trabajo de investigación mostro su potencia de ambos aceites esenciales de *Mentha* como agente de control contra la mosca doméstica.

Deschamps *et al.*, (2013) indican que el género *Mentha* cuenta con 18 especies y muchas quimiotipos. A pesar de su gran diversidad fitoquímica el principal interés económico en la producción de aceite esencial de menta es obtener el mentol. Se evaluó el mentol producción de 19 genotipos de tres especies de *Mentha*. Algunos genotipos, incluso con alta producción de biomasa hicieron no presentar mentol en la composición de aceite esencial. La más alta producción de mentol se obtuvo en el genotipo (*Mentha x piperita*) con 34,37 mL. Los genotipos *Mentha arvensis*, cultivadas tradicionalmente por su alto rendimiento de mentol, se ha mostrado a la baja producción de biomasa y aceite esencial de mentol y la productividad debido a la alta incidencia y la gravedad de "óxido de menta".

Pavela *et al.*, (2014), estudiaron actividad larvicida de los aceites esenciales obtenidos de *Mentha aquatica*, *M. longifolia*, *M. spicata*, *M. suaveolens*, *M. x piperita*, *M. x piperita var. crispa*, *M. x villosa*, y *Pulegium vulgare* contra larvas de *Culex quinquefasciatus*. Los aceites esenciales lo obtuvieron a través de hidrodestilación y la composición determinó por GC-MS. El grupo de las especies *M. piperita* mostro en sus resultados la presencia del monoterpeno mentol. Los aceites esenciales de *M. longifolia* y *M. suaveolens*, eran los únicos que contienen

una parte mayoritaria de óxido de piperitenona y mostraron los mayores efectos, el LD50 se estimó como 17 mg/L para ambos aceites esenciales.

Ramirez et al., (2010) La polilla guatemalteca (*Tecia solanivora* Povolny) que ataca a la papa y como alternativa se aplica aceites esenciales de *Ocimum basilicum*, *O. majorana*, *M. piperita*, *O. vulgare*, *P. cablin*, *R. officinalis*, *S. officinalis* y *T. vulgaris* sobre los huevos, larvas y adultos de *T. solanivora* al emplear sobre los tubérculos, y sobre la superficie del suelo. No se encontró ningún efecto de los tratamientos sobre el desarrollo larval ni sobre la longevidad de los adultos. En las dos modalidades de aplicación estudiadas, los aceites de *P. cablin* y *T. vulgaris* en una concentración del 0.25% produjeron una reducción significativa en la viabilidad de los huevos. Al aumentar la humedad del suelo y el volumen de aplicación de los aceites como *O. basilicum*, *O. majorana*, *M. piperita*, *R. officinalis* también tuvieron acción ovicida. Estos resultados son evidencia del potencial de estos aceites esenciales como controladores de *Tecia solanivora*

Solis et al., (2018) menciona que aceites esenciales de *Tanacetum vulgare* y *Menta piperita* tiene efecto insecticida al 5% a un tiempo de exposición de 2 horas y 12 horas al 100% de mortalidad contra el *Epitrix spp* y una CL<sub>50</sub> 2.79 % y 2.16 % respectivamente atribuyendo este efecto a los monoterpenos como el sabineno, mentona, mentol, tujona y limoneno.

## **2.2 DESCRIPCION BOTANICA DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO**

### **2.2.1 *Minthostachys spicata* (BENTH) EPLING.**

Clasificación Sistemática

División: Magnoliophyta (= Angiospermas)

Clase: Magnoliopsida = Tricolpados (Eudicotiledóneas)

Subclase: Asteridae

Súper orden: Asteranae

Orden: Lámbiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Minthostachys*

Especie: *Minthostachys spicata*  
(Bentgh.) Eplin.



## **Nombres Comunes**

“Muña – muña”, “Kuru muña”, Q’eshua muña”.

## **Descripción Morfológica.**

Es una planta arbustiva leñosa que alcanza de 0,80 a 1,20 m. de altura, frondosa en la parte superior, de aspecto glauco, erecta y pubescente, su tallo es ramificado desde la base de donde emergen varios ejes caulinares muy semejantes en cuanto a forma y tamaño, así en grosor.

La raíz es pivotante, leñosa, de color pardo oscuro, muy tortuosa debido al medio ambiente y al territorio donde se desarrolla; de longitud, de grosor y profundidad variables, la raíz principal es cilindrada tipo esfoliada desarrollada en forma horizontal al nivel superficial del terreno; acompañan a la raíz principal numerosas raíces secundarias las cuales a su vez se ramifican en otras más delgadas. El tallo es prismático, cuadrangular, leñoso pardo y se caracteriza por la presencia de ritidoma o células de protección que lo defienden del clima frío; las ramas jóvenes con nudos y entrenudos visibles y decrecientes. La hoja es un elemento vegetativo simple ligeramente aserrado carece de estípulas, cortamente pedunculada de filotaxia opuesta y decusada; su peciolo mide entre 4 a 6 mm de largo, pubescente, acanalado en la parte superior y convexa en la parte inferior.

Las flores se encuentran reunidas en cortos racimos; son flores heteroclamidias, pirianticas, zigomorfas, pentámeras y de color blanco poco vistosas por su pequeñez; el cáliz es pentámero, gamosépalo y muy pubescente en la base con cinco dientes terminales que indican la presencia de cinco sépalos, es escasamente más grande que la corola. (Tejada,1980)



**Figura 1. *Minthostachys spicata* (Benth.) Eplin.**

### **2.2.2 *Clinopodium bolivianum* (BENTH) KUNTZE.**

Clasificación Sistemática

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Super orden: Asteranae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Clinopodium*

Especie: *Clinopodium bolivianum*

(Benth.) Kuntze.

#### **Nombres Comunes**

“Ñut’u muña”, “Cjuñuca”, “Cjuñu muña”.

#### **Descripción Morfológica**

La inca muña es un arbusto hirsuto de 1 metro de alto. Las hojas opuestas, cortamente pecioladas (1-1.5 mm.); láminas abovadas a elípticas, sub-obtusas, bordes enteros o aserrados, 1-2 cm de largo; flores blanquecinas, subsésiles, solitarias o enfascículos axilares; cáliz tubuloso, lóbulos deltoides, corola tubular, bilabiada, internamente pubescente; estambres didínamos, epipétalos; frutos

tetraquenos, de 1 – 5mm de largo con una espícula pubescente en la parte superior. (Yapuchura, 2010).



**Figura 2.** *Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze

### **2.2.3 *Tanacetum vulgare* LINNAEUS.**

Clasificación Sistemática.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Super orden: Asteranae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Tanacetum*

Especie: *Tanacetum vulgare* LINNAEUS

### **Nombres Comunes.**

“Palma real”, “Atanasia”, “Hierba lombriguera”

### **Descripción Morfológica.**

Planta aromática perenne con una altura de 30 a 150 cm de altura; sus tallos son cortos y erectos cuyas hojas tiene la forma oblonga u oval a elíptica; miden hasta 20 por 10 cm; son glabras algo pelosas y presentan de 4 a 10 lóbulos de forma lanceolada de borde dentado. Sus flores: son de color amarillo; son corimbos compactos y finalmente su fruto es un aquenio de 1,2 a 1,8 mm. (Chávez,2013).



**Figura 3.** *Tanacetum vulgare* Linnaeus

#### **2.2.4 Mentha X piperita VAR. Citrata.**

Clasificación sistemática

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Género: Mentha

Especie: *Mentha x piperita* var. *Citrata*

#### **Nombres comunes.**

"Menta", "Menta de agua".

#### **Descripción morfológica.**

Es una planta herbácea, vivaz, de tallos erectos cuadrangulares, muy ramificados que puede alcanzar los 80 cm de altura. Las hojas opuestas, pecioladas, con bordes aserrados, de color verde oscuro en la cara superior y más claro en la cara inferior. Los estolones, de sección cuadrangular, crecen bajos y sobre la superficie de suelo en todas las direcciones. (Santos, 2013).



*Figura 4. Mentha x piperita var Citrata*

#### **2.2.5 Zea maíz L.**

Clasificación sistemática:

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Monocotiledóneas

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Panicoideae

Genero: Zea

Especie: *Zea mays* L.

#### **Nombres comunes**

"Maiz blanco gigante""maiz amilaceo"

#### **Descripción Morfológica**

Este maíz es originario del Departamento del Cusco, específicamente del Valle Sagrado de los Incas. Se desarrolla entre los 2,600 y 3,050 m.s.n.m.

Planta anual de 1,5-3 m. Tallos gruesos (>15 mm), macizos. Hojas anchas (2-10 cm), con nervio central marcado. Planta monoica, con las flores masculinas en

panícula terminal, flores masculinas formadas por lema, palea, 2 lodículas y 3 estambres, dos en cada espiguilla, también emparejadas, una casi sésil y la otra cortamente pedicelada. Flores femeninas en inflorescencias axilares (panoja o mazorca), dos por espiguilla (una de ellas estéril), lema y palea muy reducidas; espiguillas sentadas sobre el eje grueso de la mazorca, glumas reducidas, tiene mazorcas grandes de 8 hileras, de grano grande, su forma (plano circular) amiláceo y harinoso. (Inocente et al., 2006)



**Figura 5. Zea mays L**

#### **2.2.6 *Pagiocerus frontalis*. (Gorgojo de maíz)**

Distribución: *Pagiocerus frontalis*.

La distribución de *Pagiocerus frontalis*., se extiende desde el sur de EE.UU, en América Central y el Caribe de América del Sur, pero su importancia como plaga clave del maíz y granos almacenados, se ha informado solo de tierras altas de los andes, Perú, Chile, y Colombia. Los *Pagiocerus frontalis*, se reporta en la región de montaña en altitudes entre 1500 y 2600 m.s.n.m con una temperatura promedio de 14 a 18,5 ° C. (Castro y Mejia,2011, p.3).

La especie *Pagiocerus frontalis*, conocido por los agricultores como “gorgojo barrenador andino de los granos del maíz”, es considerada como una plaga clave

que ataca al maíz almacenado y que tiene marcada preferencia por el maíz amiláceo. (Bolivar,2007, p.180).

### **Posicion taxonomica**

Laboratorio de Entomologia de la Facultad de Ciencias biologicas - UNSAAC.

**Reino:** Animal

**División:** Exoterygota

**Clase:** Hexápoda

**Orden:** Coleóptera

**Familia:** Curculionidae

**Género:** *Pagiocerus*

**Especie:** *Pagiocerus frontalis*.

### **Morfología**

Estos insectos tienen el cuerpo alargado y algo truncado, tanto en el aspecto anterior como el ápice caudal las antenas son acodadas y clavadas, las tibias son aserradas. El huevo es pequeño y de color blanco algo cremoso. La larva es de color blanco amarillenta, ápada y ligeramente curvada; su tamaño es de 3 mm. La pupa es exórate o libre, de color blanco cremoso y mide entre 2 a 2,5 mm de longitud. Él adulto es un gorgojo pequeño que mide 2,5 mm de largo y 1,5 m de ancho. Presenta una probocis corta. (Alvarez,2020).



**Figura 6. Especie *Pagiocerus frontalis* (gorgojo de maíz)**

## **Comportamiento y biología**

Comportamiento: Los adultos raspan la epidermis de la semilla, perforan por la parte apical del grano preferentemente, luego de ingresar tanto macho como hembra excretaban a través de los agujeros realizados por ellos. Se observaron que su vida adulta lo pasan en el interior del grano; sin embargo, cuando la población se incrementa de dos a más adultos por grano, llegan a migrar a otros granos, además su huevo es oviopuesto y se encuentran en un orificio que la hembra lo realiza con la trompa, la larva barrena en el interior del grano destruyéndolo por completo; cuando está madura se transforma en crisálida y más tarde en barrenador adulto que sale del grano por un hueco redondo. El adulto es un volador hábil y no presenta dimorfismo sexual marcado. Tanto machos, como hembras son de color marrón oscuro, con alas membranosas bien desarrolladas y elitros con puntuaciones y pubescencias poco notorias y poseen un aparato bucal masticador dotado de mandíbulas bien quitinizadas y vigorosas.

Respecto al daño que causa *Pagiocerus frontalis* reporta que en la infestación de 10 gorgojos fue de un 98,7% siendo la plaga más destructora. (Alvarez,2020, p 8-9)

*Biología:* Las larvas del *Pagiocerus frontalis*. Pasan por cuatro estadios. La duración del estado larval es de 21 a 24 días. El periodo de pupa es de 10 a 12 días, la pre- ovoposición es de 4 a 6 días la, ovoposición de las hembras es de 15 a 27 días, la mayor capacidad de ovoposición es entre el 6 y 14 día, la longevidad de los adultos es mayor en las hembras que en los machos, teniéndose un promedio de 60 días para las hembras y 47 días para los machos. (Ortega, 2000)





*Figura 7. Daños ocasionados por Pagiocerus frontalis*

## **2.3 BASES TEORICAS**

### **2.3.1 ACEITES ESENCIALES.**

Los aceites esenciales son mezclas complejas de moléculas que pertenecen a los terpenos, que en su mayoría son mezclas de monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos. Dentro de las familias de plantas más ricas en aceites esenciales están las Asteraceae, Labiatae, Mirtaceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae y Apiaceae.

Estos aceites generalmente se hallan en regiones circunscritas de la planta, segregados por células ligeramente modificadas o estructuras especializadas como los tricomas glandulares, los conductos secretorios especiales y las cavidades lisígenas o esquizógenas. Respecto a su distribución, un aceite esencial puede localizarse en un determinado órgano vegetal, flores, hojas, frutos y hasta raíces o en toda la planta, y la composición puede ser igual o diferente entre especies, incluso entre la misma especie, ya que puede cambiar con la época de la recolección, el lugar geográfico o por pequeños cambios genéticos. (Martínez, 1996)

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos acíclicos, alcoholes, aldehidos, cetonas, esterres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biogenéticamente del ácido mevalónico, se les cataloga como monoterpenoides (C<sub>10</sub>) y sesquiterpenoides (C<sub>15</sub>). Las propiedades físicoquímicas de los aceites esenciales son muy diversas, puesto que el grupo engloba sustancias muy heterogéneas. (Sánchez, 2006).

El método más antiguo y sencillo para obtener aceites esenciales es la destilación por arrastre de vapor, a partir del material vegetal, lo más fresco posible; en cuanto al rendimiento de esencia obtenido de una planta, varía de unas cuantas milésimas por ciento de peso vegetal hasta 1 - 3 %. (Lock, 1994)

Muchos de estos aceites esenciales intervienen en la polinización pues sirven de atractivos a insectos polinizadores, regulan la transpiración, otros son repelentes para los animales, preservando así a las plantas de la herbivoría. Los productos derivados de plantas han sido usados extensamente como compuestos activos; ya que se ha encontrado que muchas mezclas crudas de aceites esenciales tienen actividad antifúngica, antimicrobiana, citotóxica e insecticida. (Ruiz et al., 2015).

### **2.3.1.1 PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES.**

Las propiedades físicas de los aceites esenciales, se detallan a continuación:

- Líquidos a temperatura ambiente.
- Muy raramente son coloreados.
- En general, su densidad es inferior a la del agua.
- Poseen un índice de refracción elevado.
- Desvían la luz polarizada.
- Son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos habituales.
- Arrastrables en vapor de agua (muy poco solubles en ella).
- Punto de ebullición es superior a los 100°C. (Lock, 1994)

### **2.3.1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES.**

Molecularmente los aceites esenciales son mezclas complejas de una gran variedad de sustancias orgánicas volátiles, de estructura química diversa; constituidas mayoritariamente por monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. (Martínez, 1996)

Los monoterpenos y sesquiterpenos, componentes mayoritarios de los aceites esenciales presentan estructuras acíclicas, monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas (solo sesquiterpenos); estas estructuras pueden ser hidrocarbonadas o derivados oxigenados, como alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, óxidos o peróxidos. Los componentes minoritarios son los derivados aromáticos fenilpropanoicos, generalmente oxigenados y con frecuencia presentan grupos fenólicos. (Solís, 2018)

En las especies vegetales, los aceites esenciales se encuentran como agliconas en su mayoría y una pequeña parte como glicósidos. Algunos aceites esenciales se encuentran en la planta en forma de precursores no volátiles, frecuentemente como glicósidos que se hidrolizan por acción enzimática o en medio de ácido diluido. (Mellado, 2019).

Además, los aceites esenciales pueden presentar en su composición otros compuestos de bajo peso molecular arrastrables en corriente de vapor de agua, como los ácidos orgánicos comprendidos entre C3 y C10, alcoholes, aldehídos, esteroides. (Martínez, 1996)

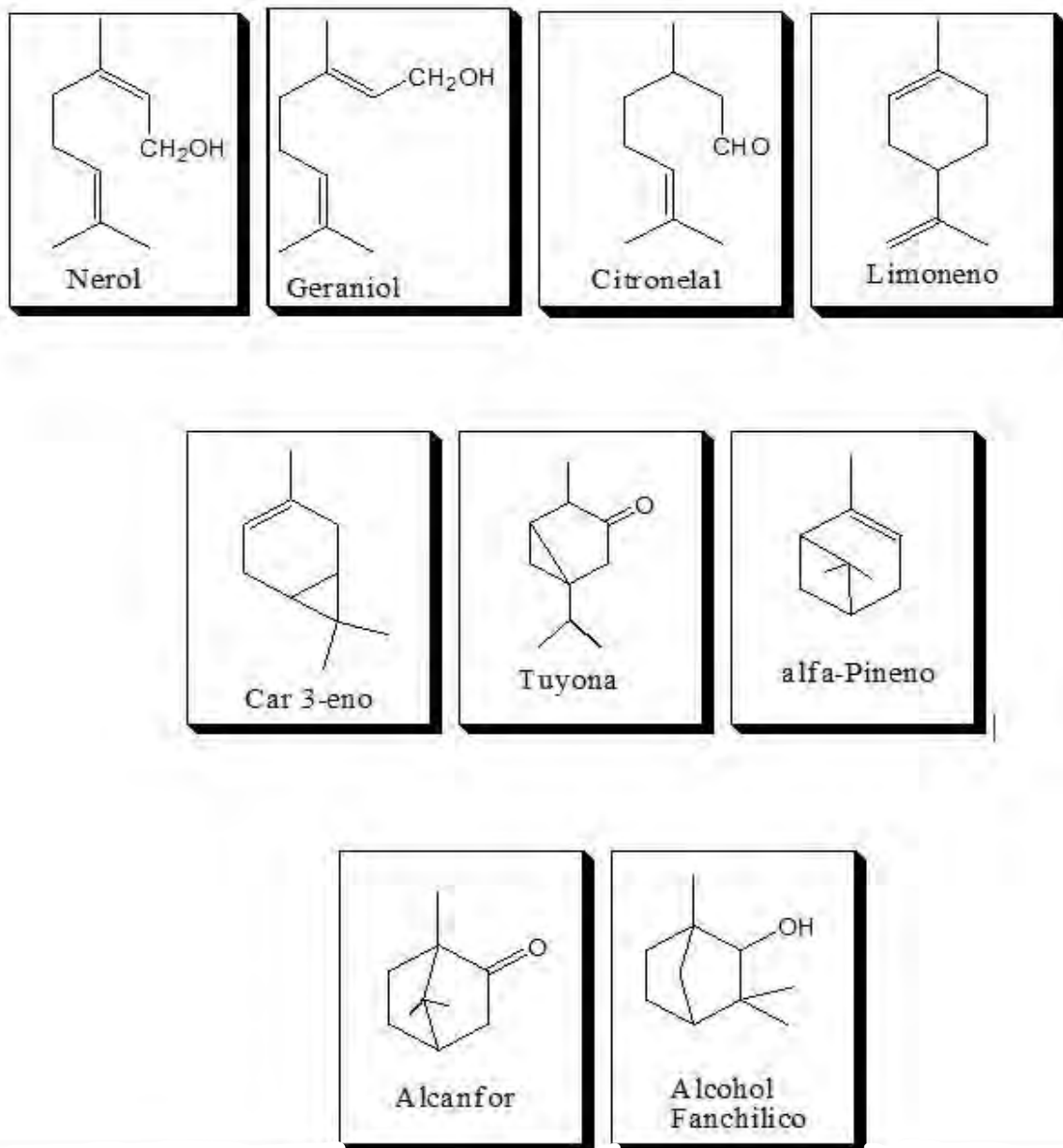
### **2.3.1.3 FUNCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.**

Cuando nos referimos a las funciones de los aceites esenciales dentro de la especie vegetal podemos aludirles muchos papeles dentro de ellos la función ecológica considerándolos como agentes alelopáticos las interacciones vegetales como agentes alelopáticos (inhibidores de germinación), en las interacciones vegetal- animal como protección contra depredadores (animales mayores, hongos, insecto) y como atrayentes de ciertos insectos polinizadores.

Los monoterpenos lineales podrían tener una función energética; actuar como reserva de estructuras carbonadas durante el día, para ser degradados a Acetil CoA por la noche. (Vivanco et al.,2005)

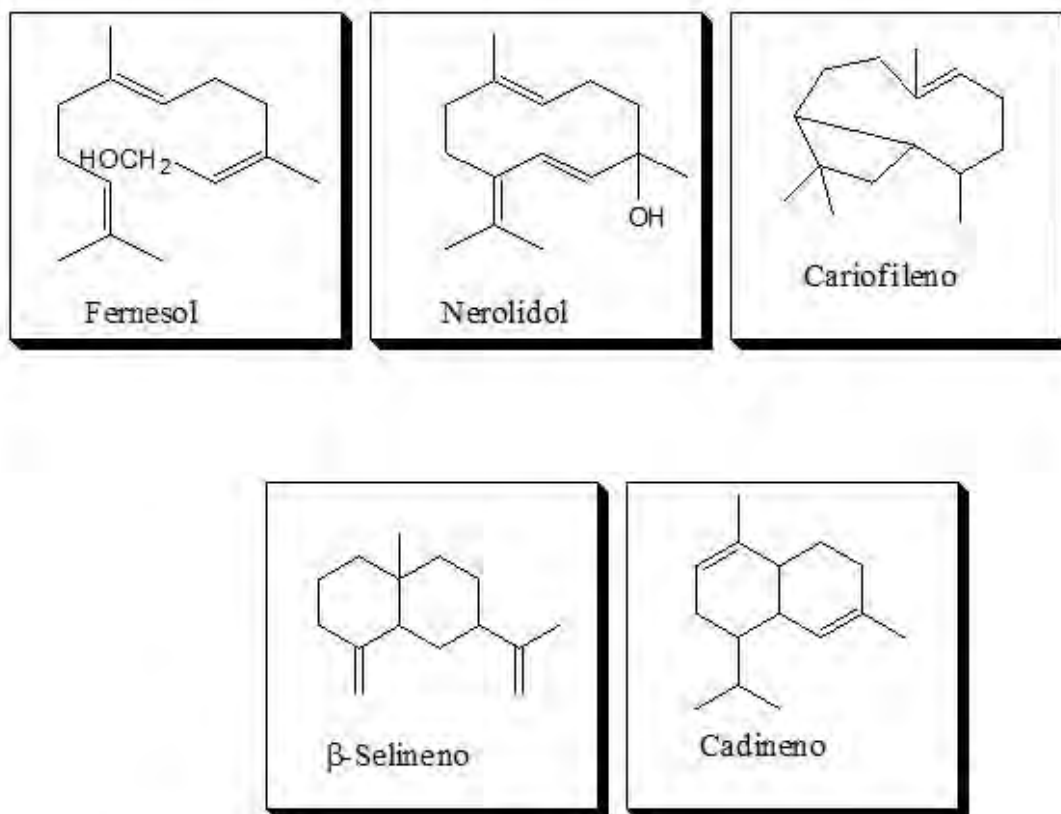
### 2.3.2 MONOTERPENOS Y SESQUITERPENOS.

Los aceites esenciales están formados en su mayoría de monoterpenos, algunos sesquiterpenos y compuestos aromáticos. Las moléculas son terpenos de C10 y C15, los monoterpenos pueden ser lineales y tener anillos.



**Figura 8. Monoterpenos de los aceites esenciales**

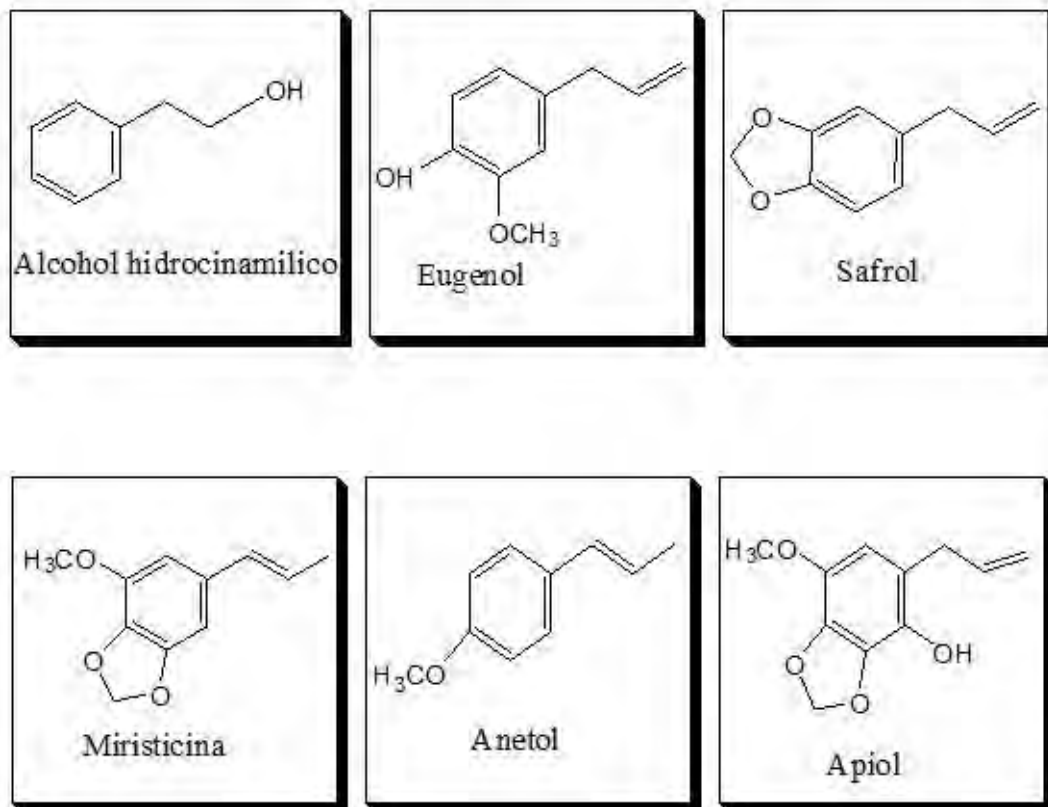
A los sesquiterpenos también se les conoce como sesquiterpenoides que contienen 15 átomos de carbono es decir son un monoterpenoide y medio.



*Figura 9. Sesquiterpenos de los aceites esenciales*

### 2.3.3 FENILPROPANOS.

Son sustancias naturales ampliamente distribuidas en los vegetales caracterizados por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikímico. Estas moléculas en su anillo aromático se encuentran sustituido en los carbonos 3, 4 y 5, con cadena lateral de grupos metilo, hidroximetileno, aldehído, carboxilo e insaturaciones en su mayoría. (Martínez, 2003).



*Figura 10. Fenilpropanos naturales presentes en aceites esenciales*

### 2.3.4 BIOSÍNTESIS DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Los terpenoides de origen vegetal como los monoterpenos en aceites esenciales, se biosintetizan generalmente por la ruta de la acetilcoenzima A y posee como intermedio común que ácido mevalónico esta biosíntesis se realiza en el citoplasma. Aunque aproximadamente hace unos 10 años se descubrió otra ruta alterna del metileritriol fosfato, a partir de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato esta biosíntesis se realiza en el cloroplasto. (Almaraz et al., 2006).

#### 2.3.4.1 FORMACIÓN DE ÁCIDO MEVALÓNICO.

Para la biosíntesis del ácido mevalónico se necesitan tres moléculas de acetil-CoA. Nuestra primera reacción parte de dos moléculas de acetil-CoA, que gracias a la enzima acetil-CoA tiasa lo transforma en acetoacetil CoA dejando una coenzima A fuera; al parecer es una simple combinación pero no es del todo simple; en esta primera fase ocurre la condensación de Claisen; todo comienza con una de las dos molécula de acetil-CoA transfiere uno de sus grupos de acetil-CoA a un residuo de una cisteína dentro de la enzima, liberando una coenzima A y la otra molécula de

acetil CoA sufre una desprotonación formando un enolato, uno de los carbonos del enolato ataca el carbón tioéster electrofílico este forma un intermediario que rápidamente es liberado de la cisteína produciendo una acetoacetil-CoA. Después de esto juntaremos la molécula de acetoacetil-CoA con una molécula de acetil-CoA; mediante la enzima de hidroximetilglutaril-CoA sintasa convirtiéndola en hidroximetilglutaril-CoA liberando una HS-CoA; el mecanismo es similar a la anterior solo que esta vez se produce una condensación aldólica, uniremos el acetoacetil-CoA a un residuo de cisteína y proseguimos con una adición aldólica formando un intermediario que rápidamente se libera con la ayuda de agua y una base se libera fácilmente la hidroximetilglutaril-CoA reacciona con una enzima llamada hidroximetilglutaril CoA reductasa transformándola en ácido mevalónico. (Ortiz, 2019).

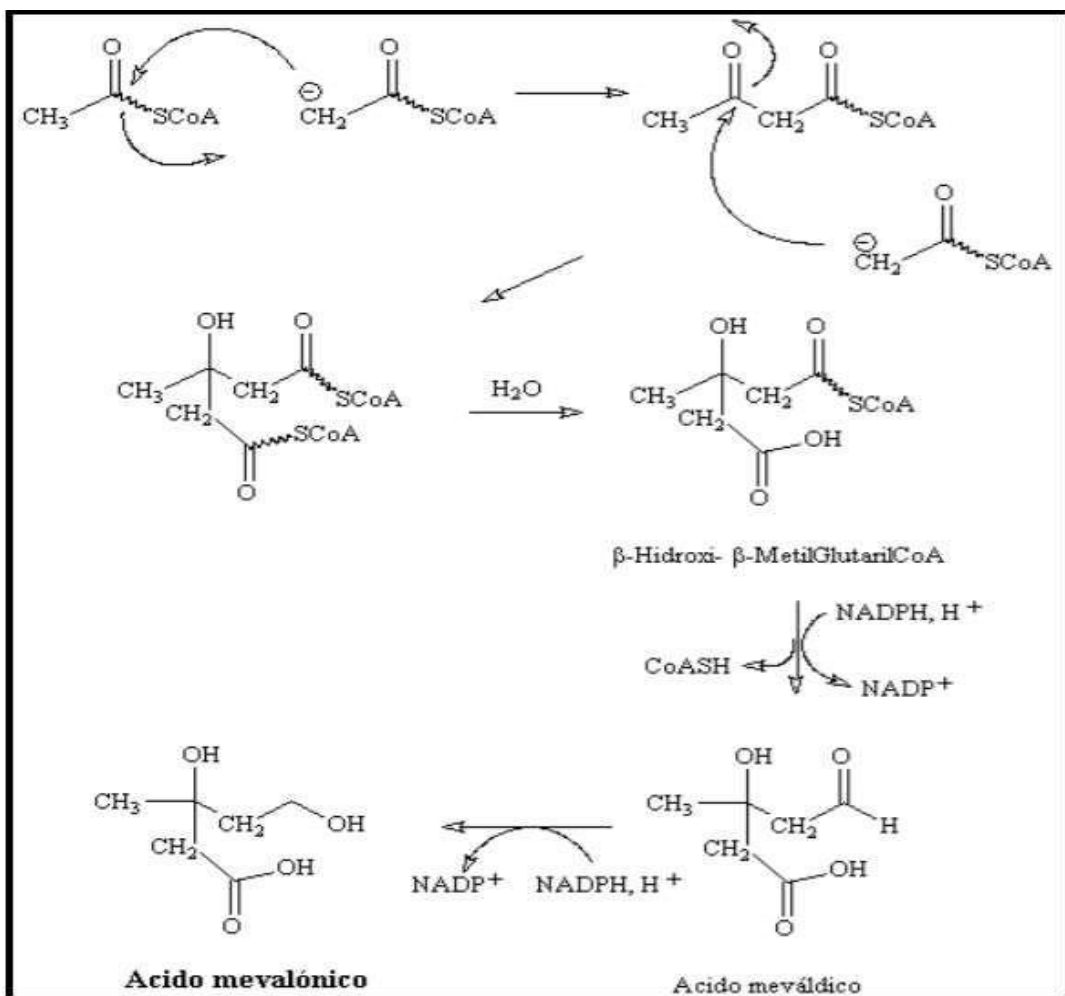


Figura 11. Biosíntesis de Ácido mevalónico

### 2.3.4.2 FORMACIÓN DE ISOPENTILPIROFOSFATO Y DIMETILALILPIROFOSFATO

El ácido mevalónico es el precursor de las dos unidades básicas que dan origen a los terpenoides: Isopentilpirofosfato (IPP) y dimetilalilpirofosfato (DMAPP).

En esta etapa se produce dos fosforilaciones consecutivas por la adición de ATP; la primera se da sobre el ácido y la segunda fosforilación sobre el alcohol terciario la cual favorece el proceso de descarboxilación que es paso final para producir los dos intermediarios. (Ortiz,2019).

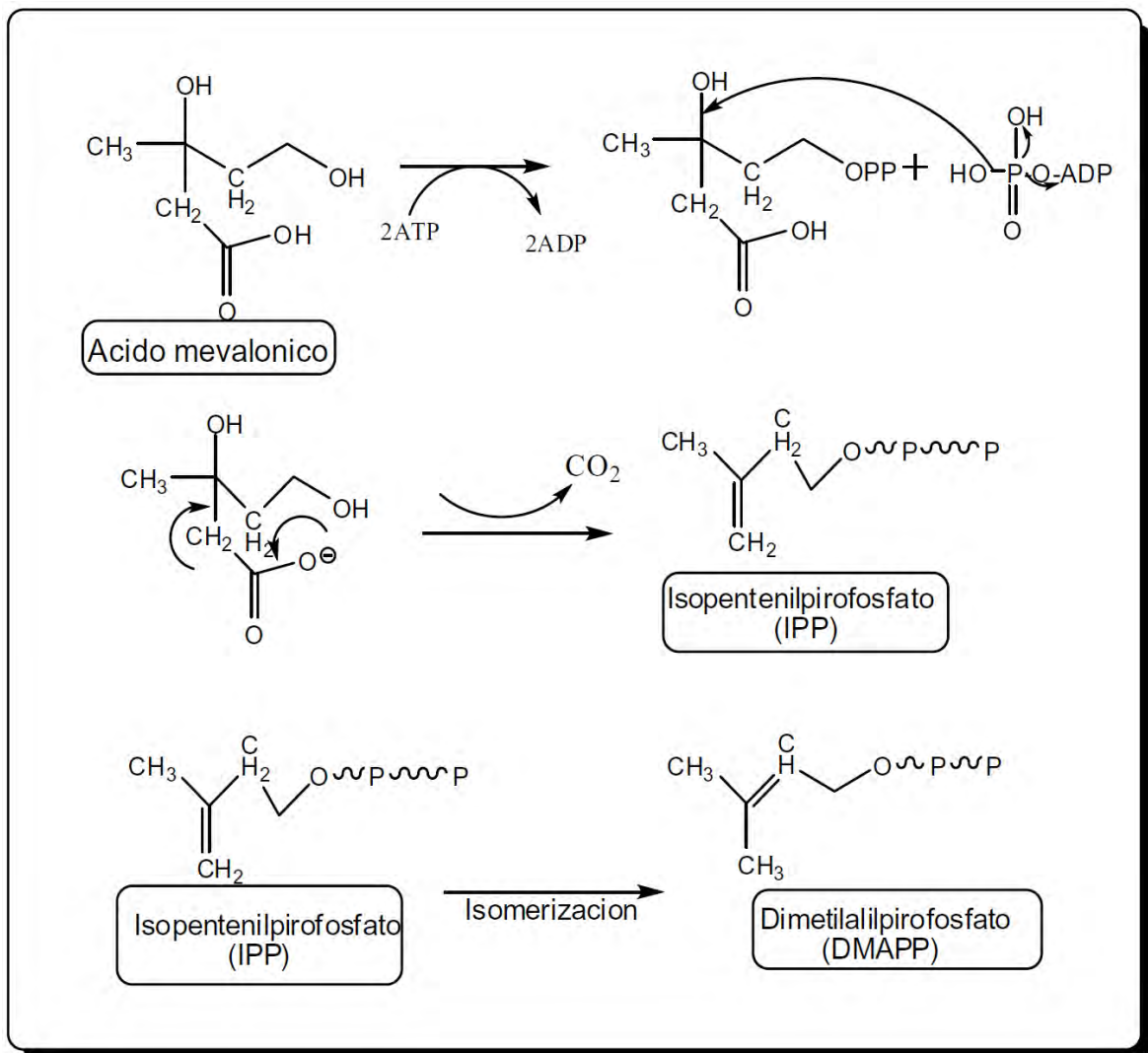


Figura 12. Biogénesis de las unidades isoprenicas básicas: Isopentenilpirofosfato (IPP) y Dimetilalilpirofosfato (DMAPP)



### 2.3.4.3 CONDENSACIÓN CABEZA-COLA DE IPP Y DMAPP.

Una unidad de IPP puede condensarse con muchas unidades DMAPP mediante un proceso de condensación comúnmente denominado condensación "cabeza-cola", siendo la cabeza la función pirofosfato y la cola el extremo donde están ubicados los metilos. El proceso de condensación de dos moléculas de 5 átomos de carbono (IPP y DMAPP) para dar origen a una molécula de 10 átomos de carbono: geranilpirofosfato, esta sustancia es el precursor inmediato de todos los monoterpenos naturales. La condensación de geranilpirofosfato con una nueva unidad IPP da origen al farnesilpirofosfato, el cual es el precursor de todos los sesquiterpenos naturales. (Martínez, 2003).

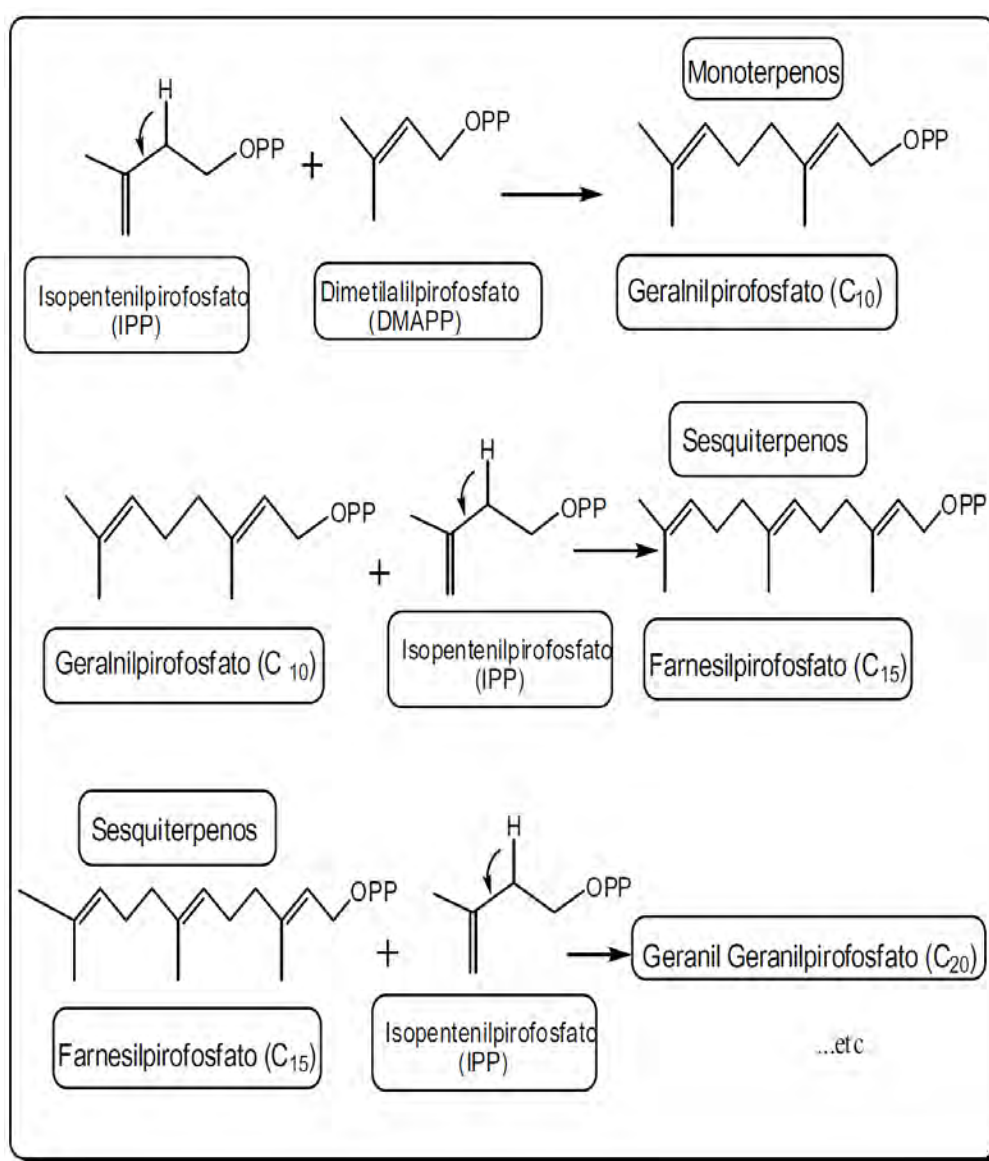


Figura 13. Formación de los monoterpenos y sesquiterpenos a partir de IPP y DMAPP.

### 2.3.5 BIOSÍNTESIS DE FENILPROPANOS.

Los fenilpropanos en los aceites esenciales se originan biosintéticamente por la vía del ácido shikímico, este ácido es el precursor de las moléculas que contienen anillos aromáticos diferentes a los formados por la ruta del malonilcoenzima-A. (Martínez,2003).

La síntesis de los aminoácidos aromáticos comienza con la condensación de una molécula de eritrosa-4-P, proveniente de la ruta de la pentosa fosfato y con una molécula de PEP que proviene de la glucólisis. El resultado es un azúcar de 7 carbonos, que es entonces ciclada y posteriormente reducida para formar shikimato y finalmente se pasan a formar los aminoácidos como la fenilalanina y tirosina los cuales dan origen al ácido cinámico también conocido como ácido p-hidroxicinámico. (Rodríguez,2008)

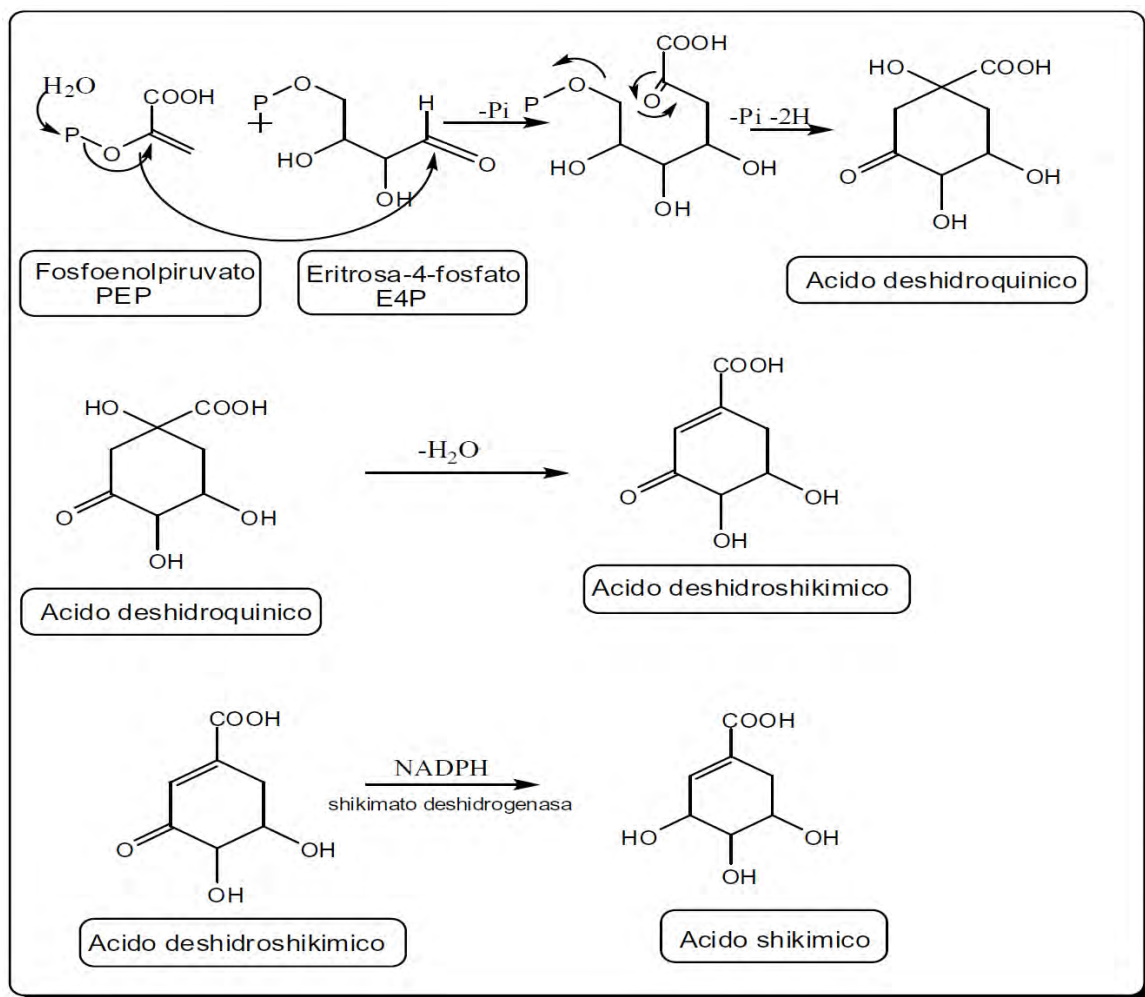


Figura 14. Formación del ácido shikímico

### **2.3.6 EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.**

Para la extracción de los aceites esenciales se han desarrollado diferentes métodos:

#### **2.3.6.1 POR ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA.**

La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables. (Ugaz, 1994), también se considera en este sistema el tema de la ley de Dalton donde se relaciona las presiones parciales con la presión total de la mezcla de gases que se produce dentro de proceso de destilación.

Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura a la cual la suma de las presiones de vapor es igual a la atmosférica. Esta temperatura será inferior al punto de ebullición del componente más volátil. Si uno de los líquidos es agua (destilación por arrastre con vapor de agua) y si se trabaja a la presión atmosférica, se podrá separar un componente de mayor punto de ebullición que el agua a una temperatura inferior a 100°C. Esto es muy importante cuando el compuesto se descompone a su temperatura de ebullición o cerca de ella. En general, esta técnica se utiliza cuando los compuestos cumplen con las condiciones de ser volátiles, inmiscibles en agua, tener presión de vapor baja y punto de ebullición alto. Este método presenta tres posibilidades de variación. (Gómez, 2010).

##### **2.3.6.1.1 LA HIDRODESTILACIÓN CON TRAMPA DE CLEVANGER.**

En la hidrodestilación, la especie vegetal es sumergido en agua, esto consiste en ebullición del agua y de esa forma penetra a los tejidos vegetales disolviendo el aceite esencial; esta disolución acuosa; se difunde a través de las membranas celulares y el aceite esencial se vaporiza. Este procedimiento es continuo hasta que se sale todo el aceite contenido en las glándulas de la planta, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados fácilmente. (Gómez. 2010)

Al equipo de hidrodestilación se le acopla la trampa de Clevenger, usado en muchos laboratorios y considerado en varios estándares internacionales, como el

más adecuado para la determinación del contenido total del aceite esencial de una planta aromática. (Solís, 2018).

Consta de un balón de vidrio de un litro, donde se deposita la especie vegetal picada en trozos pequeños con una cantidad conocida de agua y se somete a calor constantemente, la mezcla de aceite esencial y agua se evapora continuamente. Un condensador va acoplado al balón y una conexión en forma de D, permite acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada. El agua floral condensada regresa al balón por el rebose de la conexión. Las ventajas de este equipo son: su simplicidad y flexibilidad para trabajar con aceites de diferente densidad y naturaleza. Además, el hecho de estar partidas, genera que el aceite se encuentre disponible para su vaporización y “arrastre”. Con este método se agota todo el aceite contenido en la planta. (Cerpa, 2007).



*Figura 15. Trampa de Clevenger*

#### **2.3.6.1.2 LA DESTILACIÓN POR INYECCIÓN DE VAPOR DE AGUA.**

También conocida como destilación por arrastre con vapor seco, es una operación unitaria de extracción de aceite esencial de la especie vegetal con vapor de agua producido fuera del destilador en un generador llamado caldera. En este tipo de destilación se puede controlar la cantidad de vapor y la especie vegetal no es calentado por encima de 100°C y gracias a ello el aceite esencial no experimenta

degradación termina y así se protege a los componentes termolábiles (Cárdenas,2014).

#### **2.3.6.1.3 LA DESTILACIÓN MIXTA**

Este tipo de destilación es conocido también como destilación con vapor húmedo(agua-vapor), Donde la muestra vegetal y el agua se encuentran en el mismo recipiente, pero separados por una rejilla que mantiene a la muestra vegetal por encima de la superficie del agua, cuando se somete a ebullición el vapor de agua atraviesa la muestra y arrastra los aceites esenciales. Aquí se produce la cohobación que es la práctica de regresar el agua del destilado hacia el destilador después que el aceite ha sido separado; esto se hace con el fin de minimizar las pérdidas de componentes oxigenados, principalmente los fenoles. (Cárdenas,2014).

#### **2.3.6.2 EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES.**

El método se basa en la solubilización de los aceites esenciales en un disolvente, su elección depende de parámetros técnicos y económicos; selectividad, poder disolvente respecto a sus constituyentes; estabilidad, inercia química; temperatura de ebullición no muy alta pero que permita su eliminación total y evitar pérdidas; seguridad en su manipulación, si es posible no tóxico e inflamable. Los disolventes más utilizados son: éter de petróleo, éter etílico, hexano, pentano, diclorometano y etanol. Del extracto el disolvente se separa por destilación y el disolvente que embebe la masa vegetal se recupera por inyección de vapor de agua, generalmente este proceso es a temperatura baja, para cuidarse de la degradación inducida por la presencia de agua y el pH ácidos y debido a su poca selectividad extraen a otros componentes como triglicéridos, carotenoides, ceras, etc., lo que exige un proceso de purificación posterior. (Rodríguez et al.,2012)

#### **2.3.6.3 EXTRACCIÓN CON GRASAS.**

El método aprovecha la liposolubilidad de los aceites esenciales en materias grasas, se aplica sobre todo para extracción de aceites esenciales de pétalos de flores. El método presenta posibilidades de variación.

- Enflorado (*enfleurage*): la extracción se hace por difusión en frío hacia la materia grasa, consiste en colocar los pétalos entre dos placas de vidrio con películas de grasa en su superficie, con la misma grasa se hacen varias extracciones renovando los pétalos. (Rodríguez et al.,2012)
- Digestión: para la extracción los pétalos se ponen en contacto con grasa fundida. El proceso se realiza en caliente. Es un caso particular de extracción con disolvente. Los aceites esenciales disueltos en grasa pueden ser extraídos con alcohol y así obtener soluciones alcohólicas de aceite esencial. (Rodríguez et al.,2012)

#### **2.3.6.4 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.**

Domínguez y Parzanese (2013), dicen que todos conocemos bien los tres estados típicos de la materia: el gas, el líquido y el sólido. No obstante, al someter un fluido a altas presiones y muy bajas temperaturas se obtiene un estado diferente conocido como el supercrítico, aquí poseen propiedades intermedias entre líquido y gases aquí la muestra vegetal tiene la densidad de un líquido y la viscosidad de un gas, por tanto, la buena capacidad de difusión en los sólidos y un buen poder disolvente, entonces extraer en estas condiciones a los aceites esenciales es muy selectiva y no agresiva. Generalmente el gas que se usa es el CO<sub>2</sub>

El gas utilizado para la extracción es fácil de eliminar y se puede recuperar. Si bien el método presenta inconvenientes por el costo y la complejidad del equipo utilizado, pero las ventajas superan su elevado costo, como la de proporcionar productos que reproducen con gran fidelidad los productos, con una composición muy próxima al del producto natural.

Aunque en teoría se pueden utilizar varios gases, en la práctica se usa casi exclusivamente el dióxido de carbono, por ser un producto natural, químicamente inerte, ininflamable, atóxico, fácil de eliminar, fácilmente disponible, selectivo y de bajo costo. (Domínguez y Parzanese 2013)

### **2.3.7 CONSERVACIÓN DE ACEITES ESENCIALES**

El principal inconveniente que tienen los aceites esenciales es que son altamente concentrados y de alta pureza es por ello que se oxidan fácilmente es por ello que se debe tomar en cuenta la forma de almacenamiento, debiendo ser siempre en un frasco de vidrio ámbar o de color oscuro para protegerlo de la luz, con respecto al calor debe mantenerse a una distancia prudente evitando que sufra alteraciones, preferiblemente en un ambiente fresco y oscuro, si es que estaría en una refrigeradora a una temperatura de 4°C en lugares cálidos, se deben utilizar tapas de goma o cuentagotas de plástico porque a la larga el aceite esencial ablanda las gomas y producirá contaminación y la calidad del aceite esencial quedara alterado. (Montoya, 2010).

### **2.3.8 ACOPLAMIENTO CROMATOGRAFÍA DE GASES- ESPECTROMETRIA DE MASAS**

La cromatografía es una técnica de separación de los componentes de una mezcla haciéndolos pasar a través de una fase estacionaria mediante el flujo de fase móvil, El objetivo de la fase móvil es transportar la mezcla mientras que el de la fase estacionaria es retrasar el paso de los componentes; así cuando los componentes de la mezcla pasan a través del sistema estos son separados en distintos momentos según su afinidad con la fase estacionaria. (Leon,2020)

La cromatografía de gases es una técnica de separación que utiliza como fase móvil un gas y como fase estacionaria un sólido o un líquido situado en una columna cromatográfica; la cromatografía gas líquido tiene una aplicación en todos los campos de la ciencia y normalmente se denomina cromatografía de gases se lleva a cabo en una columna cerrada en la cual se encuentra retenida la fase estacionaria y por la cual se hace pasar el gas portador que actúa como fase móvil los componentes de la muestra se introducen a través del inyector la temperatura debe ser la adecuada, de tal forma que permita la vaporización de los componentes de la mezcla, el gas portador que actúa como fase móvil transporta los componentes de la muestra a través de la columna y el detector debe ser una especie químicamente inerte, térmicamente estable y debe tener una pureza elevada no puede contener oxígeno ni agua en la práctica los gases más utilizados son el helio, nitrógeno, hidrógeno y el argón. Los compuestos inyectados en el

cromatógrafo de gases se separan dentro de la columna cromatográfica según la tendencia que tengan de ser retenidos en la fase estacionaria o a permanecer en la fase móvil. Si no existiera esta interacción entre los componentes y la fase estacionaria estos se desplazarían por la columna a la misma velocidad que el gas y no sería posible la separación de los diferentes componentes de la mezcla. Finalmente, los componentes individuales aislados pasan inmediatamente a un detector que en este caso será un espectrómetro de masas. En el espectrómetro de masas las moléculas de la muestra entran en una fuente de ionización donde se ionizan los componentes de la muestra separados por el cromatógrafo de gases, las fuentes de ionización de los espectrómetros de masas moleculares tienen la energía suficiente para romper los enlaces químicos de las moléculas de la muestra pero no para descomponer estas moléculas en átomos, las fuentes de ionización en la espectrometría de masas produce moléculas fragmentadas e ionizadas cargados para luego ser graficada según su abundancia relativa, la espectrometría de masas logra esto haciendo uso de la relación de la masa de la partícula sobre la carga eléctrica  $m/z$ . La sección siguiente del espectrómetro de masas es el analizador que sirve para cuantificar los iones según valores de masa carga con la obtención de espectros de masas de los componentes separados mediante la cromatografía de gases y con la utilización del software adecuado si se compara el espectro incógnita con una serie de espectros contenidos dentro de la librería del espectrómetro de masas se puede llegar a conocer la naturaleza de cada sustancia separada por cromatografía de gases también se puede deducir información cuantitativa determinando el área o las alturas de cada uno de los picos cromatográficos. (Solís, 2018)

En los análisis de aceites esenciales por método CG-MS se puede realizar en una sola operación, se usa una muestra generalmente de 1  $\mu\text{L}$ , este es un método completamente adecuado para la identificación de aceites esenciales debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular (< 250 Dalton). La esencia se inyecta directamente en el cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo. (Leon,2020)



## **2.4 INSECTICIDA**

Es un producto fitosanitario, una mezcla de sustancias utilizados para controlar, prevenir, evitar, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga y/o enfermedad, o destruir directamente a los insectos; esto generalmente por la inhibición de enzimas. Los insecticidas tienen importancia para el control de plagas de insectos en la agricultura o para eliminar todos aquellos que afectan la Salud humana y animal. (Insecticide Resistance Action Committee [IRAC],2019, p.1)

Durante el siglo XX, se dio el desarrollo exponencial de la Industria de la síntesis química cuando se comienzan a producir y diseñar productos insecticidas de síntesis o sintéticos. Hacia fines de este siglo y comienzos del siglo XXI, a causa de la toxicidad inespecífica de los insecticidas sintéticos comienza el desarrollo de productos menos tóxicos y más específicos. [IRAC],2019, p.2

Características ideales de un insecticida tipo, aunque rara vez se encuentran conjugadas en un solo productos, ellas son:

- Gran especificidad. El producto solo afecta al organismo blanco, sin afectar el resto de los seres vivos y el medio ambiente. Baja toxicidad en humanos. El producto reviste un riesgo bajo tanto para sufrir intoxicaciones agudas como a exposiciones a bajas dosis.
- Baja dosis letal. El insecticida es efectivo con poca cantidad.
- Bajo costo. El producto tiene que ser barato de característica latente, el insecticida permanece en el lugar durante un período de tiempo matando a todo lo que se cruza en su trayectoria, (Insecticida botánicos, 2019, p. 191)

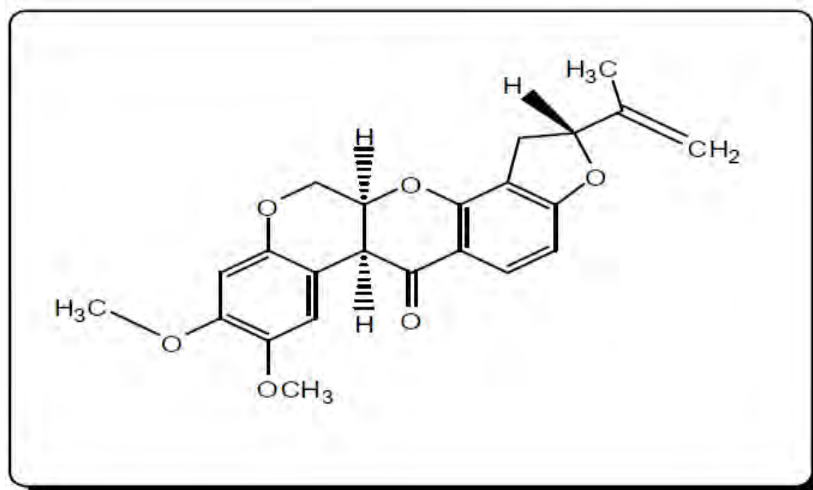
### **2.4.1 INSECTICIDAS NATURALES**

Los insecticidas naturales se han hecho indispensables frente a aquellos productos sintéticos utilizados para el control de plagas y de las patologías en los vegetales son determinantes en el aumento de la producción agrícola.

#### **2.4.1.1 ROTENONA**

La rotenona es un flavonoide que encuentra en 67 especies papilionáceas, extraído de las raíces de dos plantas que son *Derris* spp (Fabaceae) y *Lonchocarpus* spp

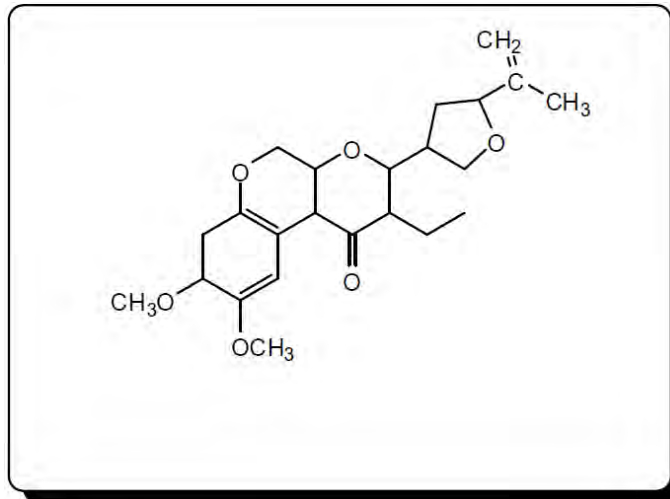
(Fabaceae). De la primera se puede obtener un 13% de rotenona mientras que de la segunda un 5%. *Derris* spp es nativa de los trópicos orientales, mientras que *Lonchocarpus* spp es del hemisferio occidental. Es inofensiva para animales de sangre caliente y muy activa para animales de sangre fría como peces. (Solis,2018) Su modo de acción implica una inhibición del transporte de electrones a nivel de mitocondrias bloqueando la fosforilación del ADP a ATP. Por esto se dice que actúa inhibiendo el metabolismo del insecto. Los síntomas que presentan los insectos intoxicados con rotenona son; disminución del consumo de oxígeno, depresión en la respiración y ataxia que provocan convulsiones y conducen finalmente a la parálisis y muerte del insecto por paro respiratorio. (Mejia,2012).



**Figura 16. Rotenona**

#### **2.4.1.2 SABADILLA.**

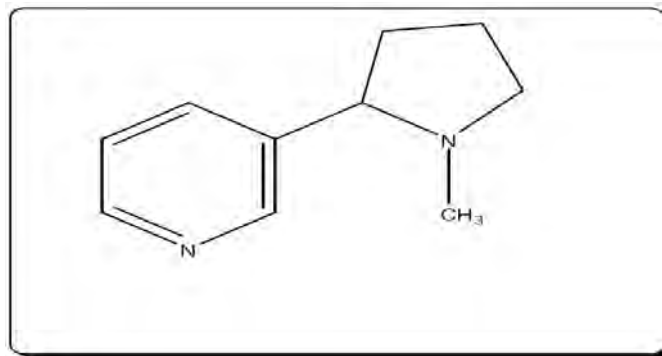
La sabadilla es un insecticida botánico, un compuesto derivado de las semillas de una planta de origen sudamericano conocido como *Schoenocaulon officinale* (Liliaceae). Las semillas de esta planta han demostrado tener cantidades importantes de alcaloides que le confieren las propiedades tóxicas. Su modo de acción es a través de las membranas celulares de las neuronas causando una disminución de las funciones nerviosas, parálisis y muerte. El polvo de estas semillas es uno de los insecticidas vegetales de menor toxicidad para mamíferos, pero no así si se aíslan sus alcaloides que pueden llegar a ser altamente tóxicos además de irritantes para la piel. (Solis,2018. p. 14)



**Figura 17: Sabadilla**

### 2.4.1.3 NICOTINA.

Es un alcaloide derivado de plantas de la familia *Solanaceae*, especialmente tabaco (*Nicotiana tabacum*). Este compuesto no se encuentra en la planta en forma libre, sino que formando maleatos y citratos. Es un líquido incoloro, que se oscurece en presencia de oxígeno, ya que forma oxopiridinas y oxobenzinas, adquiriendo el olor a tabaco cuando se expone al aire. La nicotina natural ósea la levógira es la que cuenta con efecto insecticida, es muy volátil y esto hace que se use como insecticida por inhalación. (Solis,2018)

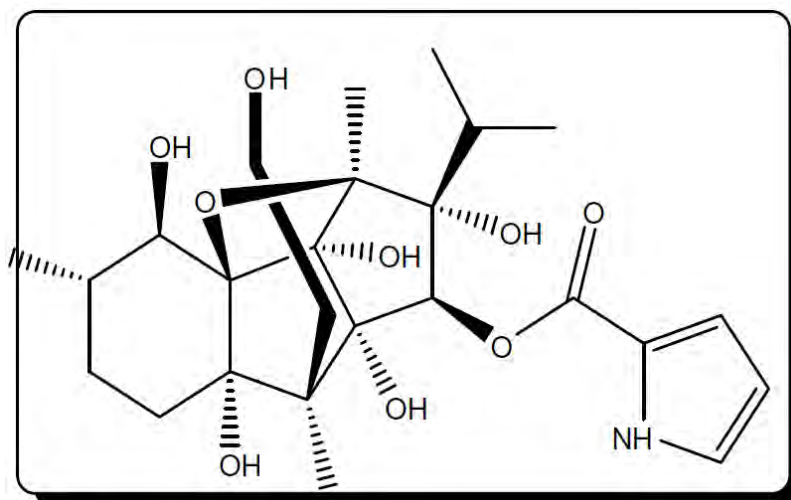


**Figura 18: Nicotina**

### 2.4.1.4 RIANODINA.

Se obtiene de los tallos y raíces de una planta originaria de América del Sur conocida como *Ryania speciosa*. De esta planta se obtiene una serie de alcaloides, siendo el más importante la rianodina. Este alcaloide actúa por contacto y vía

estomacal afectando directamente a los músculos impidiendo su contracción y ocasionando parálisis. (Rueda y de la Vega.2007).



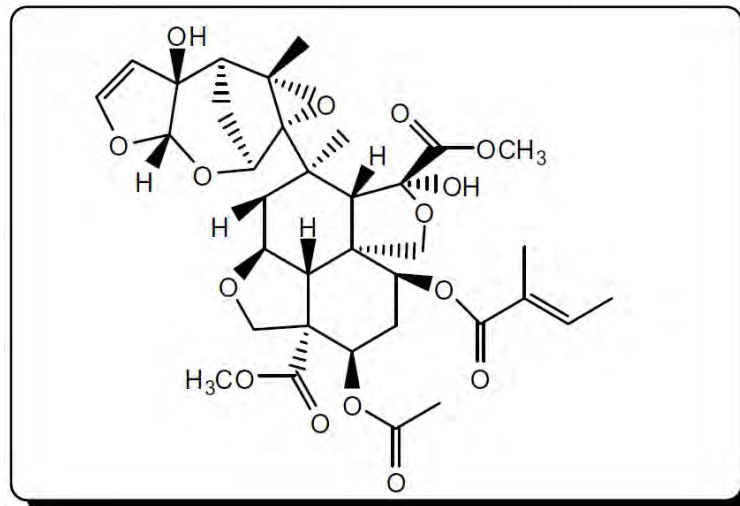
**Figura 19. Rianodina**

#### **2.4.1.5 AZADIRACTINA.**

La azadiractina es un tetraterpenoide altamente oxidado que tiene gran cantidad de funcionalidades del oxígeno, éstas comprenden enol, éter, acetal, hemiacetal, y oxirano sustituido como así también una variedad de ésteres carboxílicos.

Los grupos hidroxilos secundarios y terciarios y éter tetrahidrofurano están presentes y la estructura molecular revela 16 centros estereogénicos, 7 de los cuales son tetrasustituidos. Estas características explican la gran dificultad encontrada al tratar de producirla por aproximación.

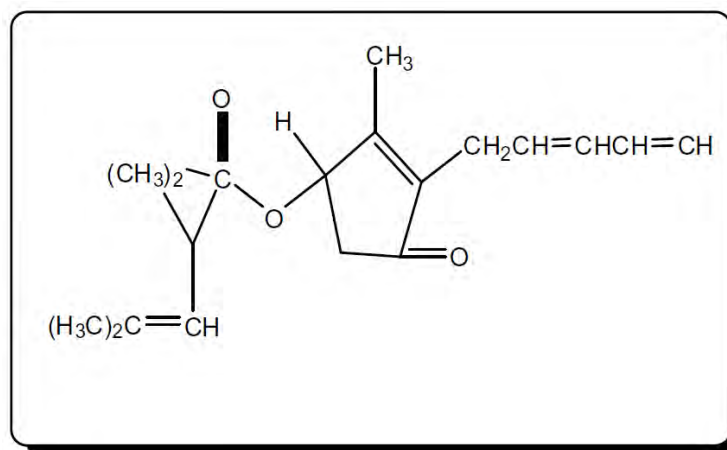
La Azadiractina es un compuesto químico que pertenece a los limonoides. Es un metabolito secundario característico de la familia *Meliaceae* pero especialmente del árbol Neem, originario de la India. Este se encuentra en la corteza, hojas y frutos de este árbol, pero la mayor concentración se ubica en la semilla. Se trata de un insecticida de amplio espectro, regulador del crecimiento de los insectos en todos sus estados larvarios, pero sin efectos sobre huevos ni adultos. Actúa por contacto e ingestión alterando el equilibrio hormonal de los insectos. (Solis,2018)



**Figura 20. Azadiractina**

#### 2.4.1.6 PIRETRINAS.

Las piretrinas son ésteres, y se encontraron seis ésteres con propiedades insecticida obtenidas de las flores del *piretro* (*T. cinerariaefolium*) donde un 20-25% del extracto seco de estas flores está formado por piretrinas. Las piretrinas matan a los insectos provocando parálisis muy rápida, el sistema nervioso es afectado produciendo convulsiones violentas y finalmente la muerte. Estos compuestos atacan el sistema nervioso central como el periférico lo que ocasiona descargas repetidas, seguidas de convulsiones. (Edgar,1997).



**Figura 21. Piretrinas**

### 2.5 PROPIEDAD BIOCIDA DE LAS PLANTAS

Se tiene probado que los insectos pueden destruir toda vegetación, pero si hasta ahora las plantas verdes aun dominan el paisaje, es porque estas plantas tienen sus mecanismos de defensa como puede ser propiedades insecticidas.

Algunas plantas aromáticas tienen patrimonio natural, decimos eso porque cada planta cuenta con productos bioactivos también conocidos como metabolitos secundarios, las plantas cuando sintetizan estas moléculas gastan mucha energía de ahí radica su poder y aunque sus funciones no están muy claras, pero su existencia si es clara y su uso como en farmacología, plaguicidas en colorantes, etc. (Solis,2018)

### **2.5.1 MECANISMO DE DEFENSA DE LAS PLANTAS**

La existencia de las especies vegetales no es tan sencilla como parece, ellas también se tienen que enfrentar las condiciones de su alrededor para sobrevivir y cumplir con su ciclo biológico, y para desarrollar este cometido ellas sintetizan compuestos químicos conocidos como metabolitos secundarios, estos corresponden a una serie de diferentes compuestos orgánicos con una variedad de grupo funcionales.

Es increíble pero las especies vegetales también se defienden de forma física como químicas, la forma física se refleja que las plantas forman gruesa epidermis, espinas, pelos.etc. y la defensa química se refiere a la síntesis de la de tóxicos, insecticidas, repelente. etc. en esta situación podríamos decir aceites esenciales, muchos de estos compuestos pueden crear sinergismo. (INTAGRI. 2007)

La mayoría de los insectos herbívoros discriminan las plantas a la hora de comerlas y muchos se alimentan de un pequeño número de especies afines, pertenecientes al mismo género, tribu o familia. Las plantas anfitrionas de un insecto dado pueden compartir metabolitos secundarios similares, pero ser diferentes en su morfología y anatomía. (Solis,2018)

### **2.5.2 RELACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON LOS INSECTOS**

Todas la plantas sintetizan toda su vida dos tipos de compuestos unos imprescindibles para su supervivencia a los que se le llama metabolitos primarios los cuales con las carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y ácidos nucleicos por otra parte los metabolitos secundarios quienes se sintetizan a partir de las metabolitos primarios aunque hace unos años se creía no imprescindibles para

subsistencia de las plantas ; hoy en día cada vez toman más importancia actuando incluso como compuestos semioquímicos, cumplen funciones de defensa contra insectos. (Mareggiani, 2001).

Se sabe que hasta la fecha se ha recopilado más de 30000 metabolitos secundarios de origen vegetal con una variedad de actividad biológica frente a la diversidad de insectos. Estos metabolitos secundarios comprenden una amplia variedad de estructuras químicas y estas de acuerdo a sus sistemas pueden defenderse según la ecología química de los insectos según. Mareggiani. (2001) dice que solo el 10 % de los metabolitos secundarios se ha estudiado para control de insectos.

Los metabolitos secundarios son producidos como estrategias de protección contra los insectos, estos tienen una importancia ecológica porque participan en la supervivencia de la planta, muchas veces la biosíntesis de los metabolitos secundarios se activa cuando la planta es expuesta a condiciones adversas de estrés abiótico. (Jiménez,2003).

Muchos metabolitos secundarios son muy tóxicos para los insectos. Esto no solo se refiere a los alcaloides, sino a muchos terpenoides y otros metabolitos secundarios de estructura química diversa. La planta puede tener alcaloides o flavonoides o terpenoides; es raro encontrar una planta con alto contenido de diferentes clases de metabolitos secundarios. (Solis,2018)

### **2.5.3 USO DE PLANTAS CON PROPIEDADES BIOCIDAS**

Desde la antigüedad muchos países del hemisferio norte utilizaron extractos de plantas junto con azufre y arsénico como biocidas, los romanos utilizaron polvos a partir de *veratum sp*, extractos de *taxus bacata*, extractos de *nim*; muchos de ellos como insecticidas y otros para conservar los alimentos almacenados. (Solis,2018).

El Perú es uno de los 12 países megadiversos del mundo, contando con 19500 especies de plantas, siendo los valles interandinos los que representan una alta diversidad de vegetales con múltiples usos. (De la Cruz,2007)

Uno de los usos de estas especies son sus propiedades biocidas ya que son instrumentos tecnológicos importantes dentro del manejo ecológico sobre insectos.; es un medio para prevenir la presencia de organismos dañinos; por ello se recomienda incorporar las especies de plantas dentro del sistema, ya sea como plantas repelentes, atrayentes o como refugios naturales de la fauna benéfica. Así, el uso en la zona andina del marco (*Ambrosia peruviana*) como barrera viva contra algunas plagas o la utilización de nabo silvestre (*Brassica napus*) como atrayente de pulgones, son una muestra de cómo las plantas durante su desarrollo pueden regular la presencia de plagas. (Pinedo,2008).

Las especies de plantas con propiedades insecticidas para ser usadas como biocidas, requieren formar parte de las unidades productivas, para garantizar su producción, transformación y comercialización. Si bien es cierto que muchas de las especies se encuentran en forma natural, su aprovechamiento irracional puede poner en peligro la reproducción natural de la especie, como viene sucediendo con el barbasco (*Lonchocarpus nicou*); por ello las plantas identificadas y validadas con fines biocidas deben ser multiplicadas y producidas dentro de los sistemas de producción (Tomaylla,2018)

#### **2.5.4 ACEITES ESENCIALES COMO INSECTICIDAS**

Los aceites esenciales están formados fundamentalmente por monoterpenoides y sesquiterpenoides, así como fenilpropanoides entre otros. (Martinez,2003). Estos compuestos que conforman los aceites esenciales son los responsables de la actividad insecticidas o mortalidad que causan sobre el insecto. Cada AE está compuesto por un gran número de compuestos, aunque suelen haber unos pocos predominantes que suponen más del 70% del total del aceite. (Cantó, Guirao y Pascual, 2017).

En la búsqueda de alternativas a los insecticidas convencionales, los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas han sido ampliamente investigados. Su toxicidad hacia insectos fue de especial interés durante la última década. (Celis et al., 2008)



Algunos aceites esenciales o alguno de sus componentes poseen propiedades repelentes o disuasorias bien conocidas (por ejemplo, el aceite de toronja) y otros se utilizan desde hace mucho tiempo para protección de granos almacenados. Se ha demostrado que numerosos componentes terpenoides de los aceites esenciales son tóxicos por contacto para una amplia gama de insectos, por lo que pueden ser utilizados como insecticidas de origen vegetal. (Olivero et al.,2009)

Entre los componentes químicos más potentes de este tipo figuran el timol, extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*, Lamiaceae) y el eugenol, extracto del clavo (*Eugenia caryophyllus*, Myrtaceae), la pulegona, extracto de menta (*Mentha pulegium*, Lamiaceae), (Santana y Martin,2013)

Las propiedades insecticidas de los aceites esenciales se han manifestado de diversas maneras: toxicidad por inhalación sobre los insectos adultos, acción ovicida y larvicida y actividad anti nutricional para las larvas intracotiledonares. Estas propiedades son explotables en dos campos de aplicación diferentes: la fumigación y la impregnación de los medios a proteger. (Baños et al.,2019)

Se ha comprobado que los compuestos más activos sobre un insecto no son forzosamente los más tóxicos para otra especie: así, el linalol es uno de los componentes más tóxicos para *A. obtectus*, es uno de los menos tóxicos para *C. capitata*; incluso el anetol que es muy activo sobre *A. obtectus* no es muy eficaz frente a otros insectos. (Badii y Garza, 2015)

En algunos casos la utilización de aceites esenciales en el campo fitosanitario puede resultar complicada en razón a la multiplicidad de perfiles fitoquímicos que presentan. Estas variaciones pueden presentar un inconveniente para la fiabilidad de tratamientos fitosanitarios escrupulosos y de limitar la sobredosis de pesticidas; para un uso adecuado es necesario determinar el componente más tóxico y realizar los análisis de estructura-actividad. (Solis,2018)

## **2.6 CONCENTRACION LETAL MEDIA CL<sub>50</sub>**

Medida estándar de la toxicidad del medio circundante. La mitad de la muestra de población (50%) de una prueba en un animal específico en un período determinado muere a causa de la exposición a través de la inhalación o la respiración. Como una comparación de toxicidad, los valores de CL<sub>50</sub> no tienen correlación directa de una especie a la otra o a los seres humanos. La medición CL<sub>50</sub> se hace en microgramos o miligramos de material por litro, o partes por millón (ppm), de aire o agua. Cuanto menor sea la cantidad, más tóxico es el material. También conocida como la concentración letal media o concentración crítica de la población 50. También visto como CL<sub>50</sub> (Llanos et al.,2012)

## CAPITULO III

### METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 TIPO DE INVESTIGACION

La investigación desarrollada es de tipo descriptivo – experimental.

La parte descriptiva, a través de métodos y técnicas de laboratorio describe las propiedades fisicoquímicas y la composición química de los aceites esenciales extraídos de las especies *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita*.

La parte experimental, establece la correlación de causa – efecto entre las variables independientes (tipo de aceite esencial y dosis de aplicación) con la variable dependiente (efecto insecticida frente a insectos adultos de *Pagiocerus frontalis*).

#### 3.2 HIPOTESIS

Los aceites esenciales del *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *Citrata* (Ehrh.) Briq, en su composición presentan una mezcla muy compleja compuestos volátiles, conformados por: monoterpenos, sesquiterpenos y fenil propanos.

Los aceites esenciales de *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *Citrata* (Ehrh.) Briq, debido a la presencia de metabolitos secundarios de efecto tóxico en su composición, presentan efecto insecticida de diferente grado para *Pagiocerus frontalis*, insecto depredador del maíz.

#### 3.3 VARIABLES

##### 3.3.1 VARIABLE INDEPENDIENTE.

Concentración de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium bolivianum* (Benth) Kuntze, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x*

*piperita* var. *Citrata* (Ehrh.) Briq en pruebas experimentales de efecto insecticida a nivel de laboratorio.

### **3.3.2 VARIABLE DEPENDIENTE.**

Efecto insecticida de los aceites esenciales para *Pagiocerus frontalis*.

### **3.3.3 VARIABLES INTERVINIENTES.**

**CONTROLADAS:** Lugar de muestreo, tipo de muestra, periodo vegetativo de la planta, las condiciones de extracción, tiempo de vida de los animales de experimentación y las condiciones de experimentación.

**NO CONTROLADAS:** Humedad y temperatura del ambiente de experimentación.

## **3.4 PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO**

La investigación se ha desarrollado siguiendo la metodología de trabajo que se detalla a continuación:

Colección de las muestras y preparación de las muestras de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita*.

- Extracción de los aceites esenciales por hidroddestilación en trampa de Clevenger y luego la determinación del porcentaje de rendimiento.
- Pruebas de solubilidad y características fisicoquímicas de los aceites esenciales.
- Determinación de la composición de los aceites esenciales por Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas.
- Determinación del efecto insecticida de los aceites esenciales para insectos adultos de *Pagiocerus frontalis*, insecto depredador del maíz durante su almacenamiento.
- Análisis estadístico de los resultados con la aplicación del programa BioStat 2009 Profesional Análisis Próbit, para determinar la Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>), del efecto insecticida de los aceites esenciales.

### 3.4.1 MATERIALES, REACTIVOS E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

#### Materiales:

- Bolsas de papel para colección de la muestra.
- Dispositivo móvil.
- Libreta de notas virtuales.
- Balón de vidrio de 2000 mL.
- Refrigerante de vidrio.
- Vaso de precipitados de 50, 100 mL.
- Bureta de vidrio de 25 mL.
- Soporte universal.
- Matraz Erlenmeyer de 100 mL.
- Fiolas de 25 y 50 mL.
- Pipetas de vidrio de 1 y 5 mL.
- Micropipetas de 1, 2  $\mu$ L.
- Picnómetro de vidrio de 10 mL.
- Papel filtro circular de 8 cm. de filtración rápida Whatman.
- Recipientes de plástico de 250 mL.
- Tela negra.

#### Reactivos

- Sulfato de sodio anhidro QP Sigma
- Solución estándar de KOH 0.0136 N.
- Solución etanólicas de KOH 0.1 N.
- Etanol neutralizado.
- Solución estándar de HCl 0.0958 N.
- Indicador fenolftaleína al 0.1 % p/v.
- Tween 80.
- Etanol al 40, 70 y 96 %
- Metanol (Q.P.)
- Acetona (Q.P.)
- Acetato de etilo (Q.P.)
- Cloroformo (Q.P.)

- Hexano (Q.P)
- Éter etílico.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

### Instrumentos y equipos

- Estufa marca Memmert
- Equipo de hidroddestilación con trampa de Clevenger.
- Balanza analítica marca Mettler Toledo
- Refractómetro Abbe.
- Polarímetroo Rudolpp Research Analytical Autopol I.
- Espectrofotómetro UV - Vis Thermo Scientific. Evolution 300.
- Equipo de cromatografía de gases (Modelo Agilent Technologies 6890N Network GC - Sistema) acoplado a un espectrómetro de masas (Modelo Agilent Technologies 5973B Inter XL EI/CI MSD)

### 3.4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAR EFECTO INSECTICIDA

Se aplicó, el diseño experimental con post prueba únicamente y grupo control, para la determinación del efecto insecticida de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita* sobre *Pagiocerus frontalis*; diseño que se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1. Diseño experimental de efecto insecticida de aceites esenciales**

Grupo	Tratamiento experimental	2 horas	12horas	24 horas
G1	X1	O1-1	O1-2	O1-3
G2	X2	O2-1	O2-2	O2-3
G3	X3	O3-1	O3-2	O3-3
G4	X4	O4-1	O4-2	O4-3
G5	X5	O5-1	O5-2	O5-3
G6	Blanco	O6-1	O6-2	O6-3

**Fuente: Elaboración propia**

## **Donde**

- G= Son grupos experimentales, cada uno constituidos por 20 insectos adultos de *Pagiocerus frontalis*, asignados en forma aleatoria.
- X = Tratamientos de aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* L y *Mentha x piperita* var. *Citrata*, emulsificados con Tween 80 al 0.2 %, a concentraciones de 0.2%,0.4%,0.6%,0.8%,1.0% de aceite esencial.
- O= Observación en tiempos de 2, 12 y 24 horas.
- Blanco = Solución de tween 80 (polioxietilen sorbitano) al 0.2 %.

### **3.4.3 MUESTREO DE ESPECIES VEGETALES**

Las muestras de las especies vegetales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* L y *Mentha x piperita* var. *Citrata* se colectaron de diferentes lugares de la comunidad de Ccorao; a 13° 28' 41,5" latitud sur, 71° 55' 22" longitud oeste y 3618 msnm del distrito de San Sebastián- Cusco

Estas fueron colectadas aplicando el método y la técnica del muestreo intencionado, según las recomendaciones de Rodríguez et al. (2012); en la colecta se tomó en cuenta las especies sanas, de un periodo de desarrollo fisiológico y en un área geográfica donde el desarrollo de la especie es abundante. Las muestras colectadas fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio de Fitoquímica, donde se conservó protegido de la luz y del calor, antes de su selección y extracción del aceite esencial.

### **3.4.4 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA EXTRACCION DE ACEITES ESENCIALES**

Para la extracción de los aceites esenciales, las muestras frescas previamente fueron seleccionadas tomando solo hojas y tallos verdes, de muestras totalmente sanas y libres de todo material extraño, en caso necesario fueron fragmentadas para someter a proceso de extracción.

### **3.4.5 EXTRACCION DE ACEITE ESENCIAL**

La extracción de los aceites esenciales, de las cuatro especies vegetales se realizó a partir de muestras frescas por arrastre de vapor de agua, por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger, en el laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

El equipo de hidrodestilación, consta de un balón de vidrio de capacidad de dos litros, donde se coloca la muestra de peso conocido totalmente inmersa en medio acuoso, este balón se encuentra conectado por unión esmerilada a la trampa de Clevenger; la trampa es un dispositivo que tiene conexión con el balón de destilación y con un refrigerante recto dispuesto en posición vertical, el que permite condensar y reflujar los vapores de agua junto al aceite esencial durante la extracción, los condensados caen sobre el tubo graduado de la trampa, donde se separa el aceite esencial del agua y se mide la cantidad de aceite esencial obtenido. La fuente de energía fue una manta de calentamiento para balón de 2L con temperatura regulada. (Solís, A, 2018, p.43-44)

La extracción se realizó con 300 g de muestra, la cantidad de aceite esencial se determinó directamente en la escala graduada de la trampa; una vez separado el aceite esencial se sometió inmediatamente a secado con sulfato de sodio anhidro y luego se conservó a 0°C en frascos de vidrio oscuro de tapa rosca.

Para cada muestra de especie aromática, la extracción se aceite esencial se realizó con 3 repeticiones y con los resultados se determinó el rendimiento de extracción. (Rodríguez, 2012)





*Figura 22. Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger*

#### **3.4.6 ADAPTACION DE LOS *PAGIOCERUS FRONTALIS***

Para la crianza de *Pagiocerus frontalis* en laboratorio, se realizó según la metodología reportada por Aragón (2015), se utilizó contenedores de plástico provistos en la parte superior de organza para facilitar la aireación. Para la alimentación del insecto se llenó el recipiente con maíz gigante blanco, al que se colocó unas 70 parejas adultas de *Pagiocerus frontalis*, aproximadamente; sin embargo, el número de parejas de *P. frontalis* es difícil de precisar debido a la dificultad para distinguir los sexos (genitales). Los *Pagiocerus frontalis* fueron procedentes de costales de maíz con granos infestados. Estos granos se colocaron sobre hielo, lo cual inmoviliza a los adultos, luego los insectos fueron pasados al recipiente de crianza sin que sufran ninguna alteración. Cada cinco días los recipientes fueron removidos con el fin de evitar el ataque de organismos patógenos, a partir de 30 días ya teníamos insectos adultos que fueron retirados para las pruebas correspondientes.

#### **3.5 CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Las principales propiedades fisicoquímicas determinadas para los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita*, se realizaron utilizando métodos y técnicas estandarizadas, como las normas nacionales de INACAL, CODEX alimentario y las normas internacionales AOAC.

### 3.5.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Las pruebas de solubilidad están relacionadas con la estructura de los compuestos y la facilidad de formar mezclas homogéneas entre los componentes del aceite esencial y los disolventes.

**Metodo:** Solubilidad.

**Fundamento:** Los aceites esenciales de acuerdo con su estructura y polaridad de sus componentes, a temperatura ambiente, son susceptibles a formar soluciones con diferentes disolventes químicamente puros y soluciones etanólicas de concentraciones conocidas.

**Procedimiento:** Se mezcló 0.2 mL de aceite esencial con 1 mL de diferentes disolventes, esta prueba fue realizada con tres repeticiones, los disolventes utilizados fueron hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol absoluto, etanol al 70%, etanol al 40% y metanol. (NTP 319.084:1974)

### 3.5.2 DETERMINACIÓN DE DENSIDAD RELATIVA

**Metodo:** Picnómetro

**Fundamento:** El picnómetro es aquel instrumento de medición cuyo volumen es conocido. Este método relaciona la masa y el volumen del aceite esencial con la masa de un volumen igual de agua destilada a la temperatura de 20°C como referencia.

**Procedimiento:** Para determinar la masa del picnómetro este se llena con agua destilada, evitando la formación de burbujas de aire. Se sumerge en un baño de agua a 20 °C durante 30 minutos controlando la temperatura del baño, cuando alcanzó la temperatura deseada, se enrazó la rama capilar del picnómetro con agua destilada a la misma temperatura y se tapa; se extrajo del baño, se limpió, se secó y se determinó su masa. El picnómetro se vació y luego de lavar con etanol, se secó y posteriormente se llenó el picnómetro con el aceite esencial, de igual forma se procedió como para el agua destilada y se determinó su masa. (NTP319.075:1974)

### 3.5.3 ÍNDICE DE REFRACCIÓN

**Método:** Refractómetro de Abbe

**Fundamento:** El índice de refracción permite determinar la relación existente entre la velocidad de propagación de la luz en el aire, con respecto a la muestra líquida de aceite esencial.

**Procedimiento:** El refractómetro se calibró con agua destilada y antes de colocar la muestra, se mantuvo a la temperatura próxima a la que se va a tomar la lectura. Se hace circular una corriente de agua en el refractómetro, con el objeto de que el instrumento esté a la temperatura de 20°C, a la cual se efectuará la lectura. En los prismas limpios y secos, se colocó una gota de aceite esencial, se esperó a que se estabilice la temperatura y se determinó la lectura en el refractómetro de Abbe. (NTP 319.084:1984)

### 3.3.4 DETERMINACIÓN DE LA ROTACIÓN OPTICA

**Método:** Del polarímetro

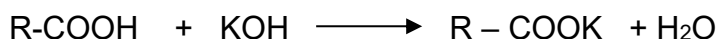
**Fundamento:** Es la rotación de un plano de polarización de un haz de luz polarizada por una sustancia ópticamente activa; viene dada por un ángulo  $\alpha$ , que forman los planos de polarización del haz incidente y el haz emergente en la sustancia, denominado ángulo de rotación óptica.

**Procedimiento:** Para la determinación de la rotación óptica se prepararon soluciones de aceite esencial al 1 % en etanol absoluto, de cuatro aceites. El instrumento se calibró con etanol absoluto y el tubo del polarímetro de 1 dm de largo y una capacidad de 10 mL se llenó con la solución de aceite esencial a la temperatura de 20°C, luego se determinó la lectura de la rotación óptica en el polarímetro. (NTP319.076:1974)

### 3.3.5 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE ACIDEZ

**METODO:** Volumétrico, titulación ácido – base

**FUNDAMENTO:** La determinación del índice de acidez se basa en la neutralización de los ácidos libres, con una solución etanólica de KOH de concentración conocida y en presencia de un indicador.



El índice de acidez es el contenido de los ácidos grasos libres en el aceite esencial y se expresa como el número de mg de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1 g de aceite esencial.

$$\text{Fórmula: IA} = \frac{56.1 \times V \times Z}{M}$$

Donde:

V = mL de KOH gastados

Z = Concentración normal de KOH

56.1 = Meq de KOH en mg

M = muestra en gramos.

### **3.4 DETERMINACION DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA**

La identificación de los componentes de los aceites esenciales se realizó, según el protocolo descrito por Solís-Quispe *et al.*, (2015), en un cromatógrafo de gases (Modelo Agilent Technologies 6890N Network GC - Sistem) acoplado a un espectrómetro de masas (Modelo Agilent Technologies 5973B Inert XL EI/CI MSD), en los laboratorios de Control de Calidad de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Se inyecta la muestra del aceite esencial bajo las siguientes condiciones: programa de temperatura de horno, inicial 60 °C, gradiente 5 °C/min, temperatura final 240 °C (5 min); gas portador helio con un flujo de 1 ml/min.; temperatura del inyector y detector de 250 °C, volumen de inyección 1µL y relación de Split 1:20. Después de la corrida se obtuvieron los cromatogramas y el contenido porcentual de cada componente se calculó a partir del área bajo el pico y se comparó con el total del pico áreas de todos los componentes; mientras que la identificación de los componentes de cada cromatograma se realizó mediante la obtención del espectro de masas.

En el espectrómetro de masas, los parámetros fueron: temperatura de fuente 230°C, temperatura de cuadrupolo 150°C; energía de ionización 70 eV y un rango de masas 40 - 400 m/z.

Los diferentes componentes de los aceites esenciales se identificaron utilizando los tiempos de retención de la cromatografía de gases y los espectros de masa de cada componente. Los espectros de masas se compararon con los datos estándar de referencia correspondientes a los espectros de masas de la base de datos librería NIST 1L y Flavor 2L. Lo que permitió valorar la composición mayoritaria de cada aceite y así determinar la identificación y cuantificación de los aceites esenciales. (Stashenko y Martínez. 2010)

### **3.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA**

Para la determinación del efecto insecticida de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* L y *Mentha x piperita* var. *Citrata*, se utilizaron insectos adultos de *Pagiocerus frontalis*, obtenidos por reproducción de los insectos sobre un sustrato de granos de maíz, variedad maíz blanco gigante Cusco, al abrigo de la luz, a las condiciones de laboratorio a  $17 \pm 2^{\circ}\text{C}$  de temperatura y  $63 \pm 5\%$  de humedad relativa en un recipiente de crianza aireado.

El efecto insecticida se evaluó mediante el método de impregnación de papel, descrito y reportado por Tapondjou et al. (2005). Para la evaluación se utilizó 1.0 mL de la emulsión de aceite esencial que fue impregnado en forma uniforme en toda la superficie en un papel filtro de 8 cm. de diámetro, colocados en la base de recipientes de polietileno de 250 mL con tapa hermética; las concentraciones de evaluación fueron de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 % v/v de aceites esenciales emulsificados en agua destilada con Tween 80 al 0.2 %; estas concentraciones fueron las mismas para los cuatro aceites esenciales en estudio. A cada recipiente se le colocó en forma aleatoria 20 insectos y para cada concentración de aceite esencial se evaluó con 6 repeticiones. El número de insectos muertos se registró a las 2, 12 y 24 horas de exposición; comparado con el blanco (suspensión de Tween 80 al 0.2 % con agua destilada).

### **3.6 ANALISIS ESTADISTICO DEL EFECTO INSECTICIDA**

El análisis estadístico del efecto insecticida de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* L y *Mentha x piperita* var. *Citrata*. para *P. frontalis*, se realizó utilizando el programa BioStat 2009

Profesional. Analisis Probit Metodo Finney (Distribución normal) para calcular la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), concentración capaz de matar al 50% de insectos adultos de *P. frontalis*.

El modelo Próbit constituye una alternativa log-lineal para manejar conjuntos de datos con variable dependiente categórica. Típicamente, este modelo se utiliza para analizar datos del tipo dosis respuesta. Los datos obtenidos de un bioensayo no pueden ser analizados con la metodología estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo, sino que se debe utilizar lo que se llama estadística cuantil, la cual se caracteriza por la respuesta a un estímulo de  $n$  unidades experimentales, donde  $r$  unidades responden y  $n - r$  no lo hacen. El principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como  $DL_{50}$  por dosis letal media (o  $DE_{50}$  por dosis efectiva media,  $CL_{50}$  por concentración letal media,  $CE_{50}$  por concentración efectiva media y por límite de tolerancia media). (Colque, 2017, p-22-23).

## CAPITULO IV

### RESULTADO Y DISCUSIÓN

#### 4.1 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Los resultados de los porcentajes de extracción de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita var. Citrata* por el método de hidrodestiacion con trampa de Clevenger, que es una variante del método por arrastre de vapor de agua, se muestran en la tabla 2:

**Tabla 2. Porcentaje de Extracción de los Aceites Esenciales**

Especie	Porcentaje de extracción (p/v)			Promedio (%)
	PE <sub>1</sub>	PE <sub>2</sub>	PE <sub>3</sub>	
<i>Minthostachys spicata</i>	0,6	0,64	0,6	0,61
<i>Clinopodium bolivianum</i>	0,79	0,81	0,84	0,81
<i>Tanacetum vulgare</i>	0,38	0,4	0,43	0,4
<i>Mentha x piperita var. Citrata</i>	0,79	0,84	0,87	0,83

**Fuente:** Elaboración propia

Como se observa en la tabla 2, el porcentaje de rendimiento peso/volumen para las especies *Clinopodium bolivianum* es de 0,81% y *Mentha x piperita* es de 0,83% son mayores al del rendimiento de *Minthostachys spicata* es de 0,61 % y *Tanacetum vulgare* es 0,4%. Cabe indicar que estos porcentajes de extracción se encuentran dentro del rango de contenido de aceites esenciales en especies aromáticas. (Solís, 2018; Tomaylla, 2014; Lock,2019)

Sin embargo, Pino (1996) indica que el porcentaje de extracción aceite esencial por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger, suele ser mayor, en comparación con los otros métodos de extracción, por ser esta una destilación directa y un sistema cerrado.

## 4.2 SOLUBILIDAD

Los resultados de las pruebas de solubilidad de los aceites esenciales están ordenados según la polaridad de los disolventes y se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Resultados de la solubilidad de los aceites esenciales**

Disolvente	<i>Minthostachys spicata</i>	<i>Clinopodium bolivianum</i>	<i>Tanacetum vulgare</i> L	<i>Mentha x Piperita</i>
Hexano	++	+++	+++	++
Cloroformo	+++	+++	+++	+++
Acetato de etilo	+++	+++	+++	+++
Acetona	+++	+++	+++	+++
Etanol absoluto	+++	+++	+++	+++
Metanol	++	++	++	++
Etanol al 70%	+	+	+	+
Etanol al 40%	-	-	-	-

**Leyenda:** Muy soluble = (+++), Soluble = (++) , Poco soluble = (+) e Insoluble= (-)

Los resultados de las pruebas de solubilidad de la tabla 3, indican que los aceites esenciales en estudio son muy solubles en disolventes de mediana polaridad y en disolventes apolares, muy poco solubles o insolubles en disolventes de alta polaridad. Resultados que nos permiten inferir que la mayoría de las moléculas componentes de estos aceites esenciales, son de naturaleza medianamente polar y apolar, con una presencia minoritaria de componentes con alta polaridad.

## 4.3 DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

Los resultados de las características fisicoquímicas de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita* var. *Citrata*, se apreciarán en la tabla 4.



**Tabla 4. Características Organolépticas y Fisicoquímicas**

Aceite esencial	<i>Minthostachys Spicata</i>	<i>Clinopodium bolivianum</i>	<i>Tanacetum vulgare</i> L	<i>Mentha x piperita</i>
Olor	Aroma agradable	Aroma fuerte agradable	Aroma agradable	Aroma refrescante
Color	Ligeramente amarillento	Amarillo tenue	Transparente	Amarillo tenue
Aspecto	Líquido fluido aceitoso	Líquido fluido aceitoso	Líquido fluido aceitoso	Líquido fluido aceitoso
Densidad g/mL	0,9183	0,9010	0,9293	0,9078
Índice de refracción	1,4727	1,4769	1,4648	1,4595
Rotación óptica	3,43	3,69	-0,135	0,313
Índice de acidez	1,6269	1,7110	0,870	1,308

**Fuente: Elaboración propia**

Los resultados de la tabla 4, muestran que la densidad de los aceites esenciales de *M. spicata* y *C. bolivianum* son mayores al valor de 0,9 g/mL y sus índices de refracción son también mayores a 0,47, resultados que nos permiten afirmar, según Domenguez (1973), que estos aceites esenciales en su composición presentan mayor proporción de compuestos oxigenados aromáticos y alicíclicos. Mientras los aceites esenciales de *T. vulgare* y *M. x piperita* presentan densidades mayores que 0,9 g/mL e índices de refracción ligeramente menores que 0,47, que según Dominguez (1973), en su composición presentan una mayor composición de compuestos oxigenados alifáticos y alicíclicos.

El resultado de la densidad del aceite esencial *Minthostachys spicata* es 0,9183 g/mL, un valor muy semejante a 0,9189 g/mL a lo reportado por Cano, (2008); mientras que el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* presenta una densidad de 0,9010 g/mL, dato cercano a 0,886 g/mL reportado por Huanqui (2019). De igual manera la densidad determinada para el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* es de 0,9293 g/mL y para *Mentha x piperita* es de 0,9078 g/mL, resultados que se asemejan a lo reportado por Tomaylla (2014) para los aceites esenciales de estas especies, valores de 0,9315 g/mL y 0,9147 g/mL respectivamente.

Con la polarimetría podemos distinguir isómeros ópticos y encontramos que los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum* y *Mentha x piperita* tienen una rotación óptica positiva ósea son dextrógiro en cambio el *Tanacetum vulgare* muestra una rotación óptica negativa lo que indica que es levógira, por lo que podemos concluir que los compuestos orgánicos tienen centros quirales.

#### **4.4 COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Utilizando CG-MS se determinó la composición cuantitativa y cualitativa de los aceites esenciales de las especies *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *Citrata*.

En los cromatogramas se observan los picos que registran en el detector cuando un componente individual eluye de la columna; cada pico es definido por su tiempo de retención, área, altura y ancho; los datos, como el tiempo de retención y el espectro de masa, permiten determinar a los componentes por comparación con los estándares de referencia correspondientes a la base de datos de las librerías Flavor 2L y NIST11 L. Así mismo permiten calcular el porcentaje de cada uno de sus componentes por integración del área de cada pico, en referencia a la sumatoria del total de áreas,

##### **4.4.1 ACEITE ESENCIAL De *Minthostachys spicata***

El perfil cromatográfico de la composición química del aceite esencial de *Minthostachys spicata*, determinado por Cromatografía de Gases, se muestra en la figura 23.

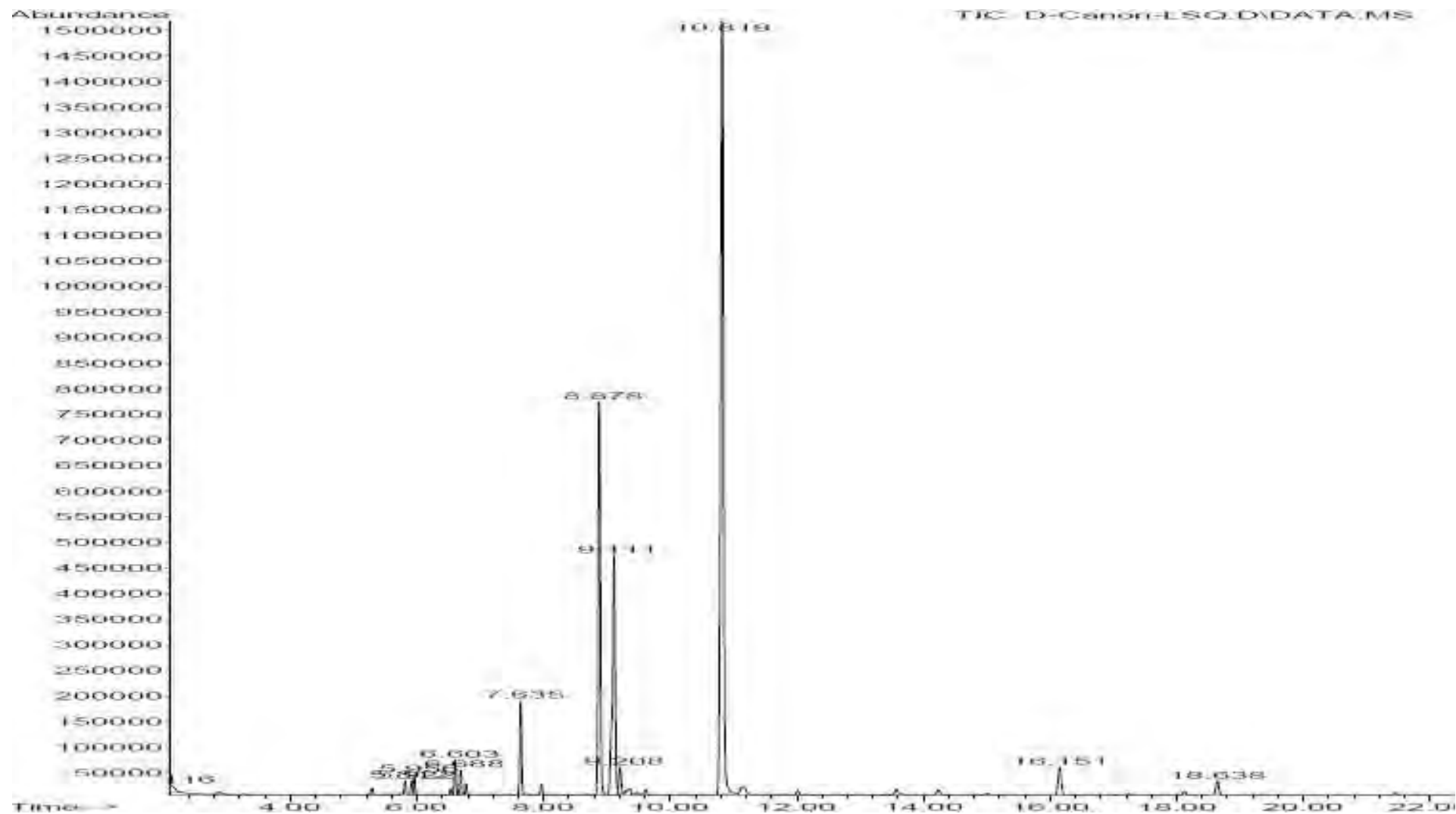


Figura 23. Perfil Cromatográfico del aceite esencial de *Minthostachys spicata*.

Los resultados de la composición química del aceite esencial de *Minthostachys spicata*, se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5. Composición Química del aceite esencial de *Minthostachys spicata*.**

Nº. Pico	Compuesto	TR (Min)	%
1	n.i.	2.89	0.22
2	$\alpha$ – Pineno	5.29	0.39
3	Sabineno	5.81	0.49
4	n.i.	5.96	1.31
5	p – Cimeno	6.53	0.2
6	Limoneno	6.6	1.21
7	Eucaliptol	6.69	0.86
8	$\beta$ – Ocimeno	6.78	0.34
9	4,7,7 trimetilbicyclo[4.1.0] hept -3-eno	7.64	3.57
10	n.i.	7.97	0.41
11	Mentona	8.88	18.95
12	Isomentona	9.11	14.46
13	1, 7, 7 trimetilbicyclo [4.1.0] heptano	9.21	1.45
14	n.i.	9.36	0.6
15	n.i.	9.49	0.15
16	n.i.	9.61	0.28
17	Pulegona	10.81	49.5
18	n.i.	11.15	1
19	n.i.	12.01	0.22
20	n.i.	13.57	0.42
21	n.i.	14.24	0.35
22	$\beta$ – Cariofileno	16.15	1.85
23	n.i.	18.13	0.22
24	n.i.	18.64	0.95
25	n.i.	21.45	0.21
Nº. de compuestos identificados			12
% Total en compuestos detectados			99.61

**Notas: RT, tiempo retención; n.i. compuesto no identificado. No se reportan compuestos que están presentes en menores del 0,1 % por estar considerados como trazas.**

Los resultados de la tabla 5, muestran de que, en el aceite esencial de la especie *Minthostachys spicata* se identificó 12 compuestos por GC-MS con porcentajes mayores a 0,1%; los cinco primeros compuestos mayoritarios son la pulegona (49,50%); mentona (18,95%); isomentona (14,46%); 4,7,7 trimetilbicyclo [4.1.0] hept-3-eno (3,57%) y  $\beta$ -cariofileno (1,85%).

De los componentes identificados en el aceite esencial de *Minthostachys spicata*; todos son monoterpenos, de los cuales son hidrocarburos, algunos cíclicos con dobles enlaces oxigenados; también están presentes compuestos aromáticos oxigenados como la pulegona, mentona e isomentona. Componentes que también fueron reportados para esta especie por Solís (2018). En este grupo se identificó el eucaliptol, un epóxido muy inestable porque tiene mucha tensión angular y puede abrirse fácilmente frente a muchos reactivos inclusive a proteínas, ácidos nucleicos y otros metabolitos; además se identificó compuestos bicyclicos con dobles enlaces como el 4,7,7 trimetilbicyclo [4.1.0] hept-3-eno,  $\beta$ -cariofileno; 1,7,7-trimetilbicyclo[4.1.0]heptano, sabineno y  $\alpha$ -pineno ; un componente de hidrocarburos cíclicos con dobles enlaces aislados como es el limoneno que posee un carbono asimétrico con estereocentro lo cual e dará lugar a la existencia de isómeros ópticos y puede ser oxidado en ambientes húmedos a carvona; la presencia del *p*-cimeno que es un componente cíclico de dobles enlaces conjugados conocido como alquilbenceno y finalmente el  $\beta$ -ocimeno que es un hidrocarburos de cadena abierta con dobles enlaces.

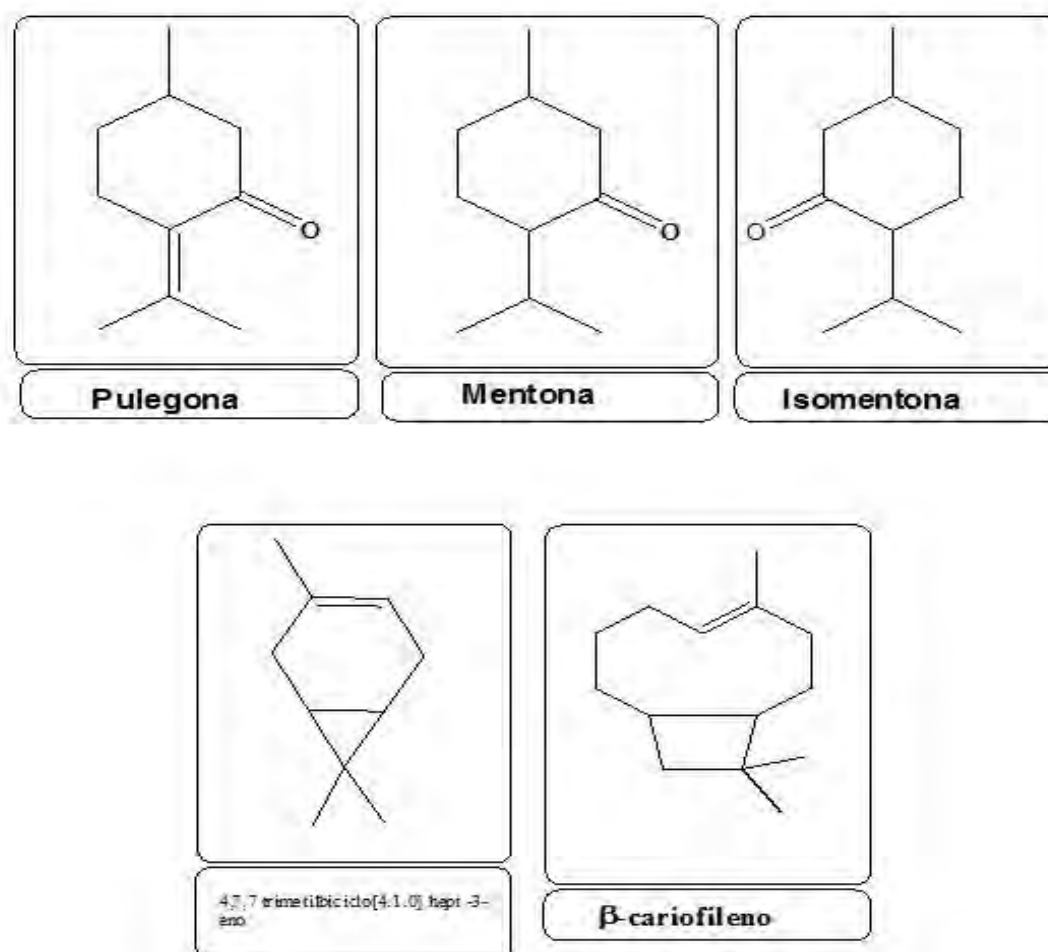
El compuesto mayoritario coincide con los resultados demostrados por Tejada (1980)<sup>3</sup> donde la pulegona tiene hasta una (60,09 %) y mentona (8,97 %). También Fuerte (2001), en su estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb "Muña" de tres regiones peruanas identificó mentona, pulegona, linalol,  $\beta$ -cariofileno y piperitona en diferentes porcentajes de abundancia.

En su trabajo de investigación Zygadlo et al. (1996) reportaron para el aceite esencial del género *Minthostachys* de argentina pulegona como componente mayoritario en porcentajes mayores al 21%; así mismo el botánico Alemán Schmidt y Lebuhn (2008), en estudios realizados, en diferentes países de Latinoamérica, para el género *Minthostachys* de Bolivia reportó como componente mayoritario a la pulegona y mentona, y para muestras de Venezuela reportó pulegona como

componente mayoritario; estos resultados de componentes mayoritarios reportados en diferentes investigaciones coinciden con los resultados encontrados en la investigación.

Zegarra (2010) reportó para el aceite esencial de *Minthostachys Mollis* Griseb, como componentes mayoritarios a la pulegona, mentona, limoneno,  $\beta$ - mirceno y  $p$ - cimeno; estos datos se asemejan a los resultados del trabajo.

La estructura química de los cinco componentes mayoritarios del aceite esencial de *M. spicata*, se muestran en la figura 24.



**Figura 24. Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Minthostachys Spicata***

#### **4.4.2 ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium bolivianum***

El perfil cromatográfico de la composición química del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*, se muestra la figura 25.

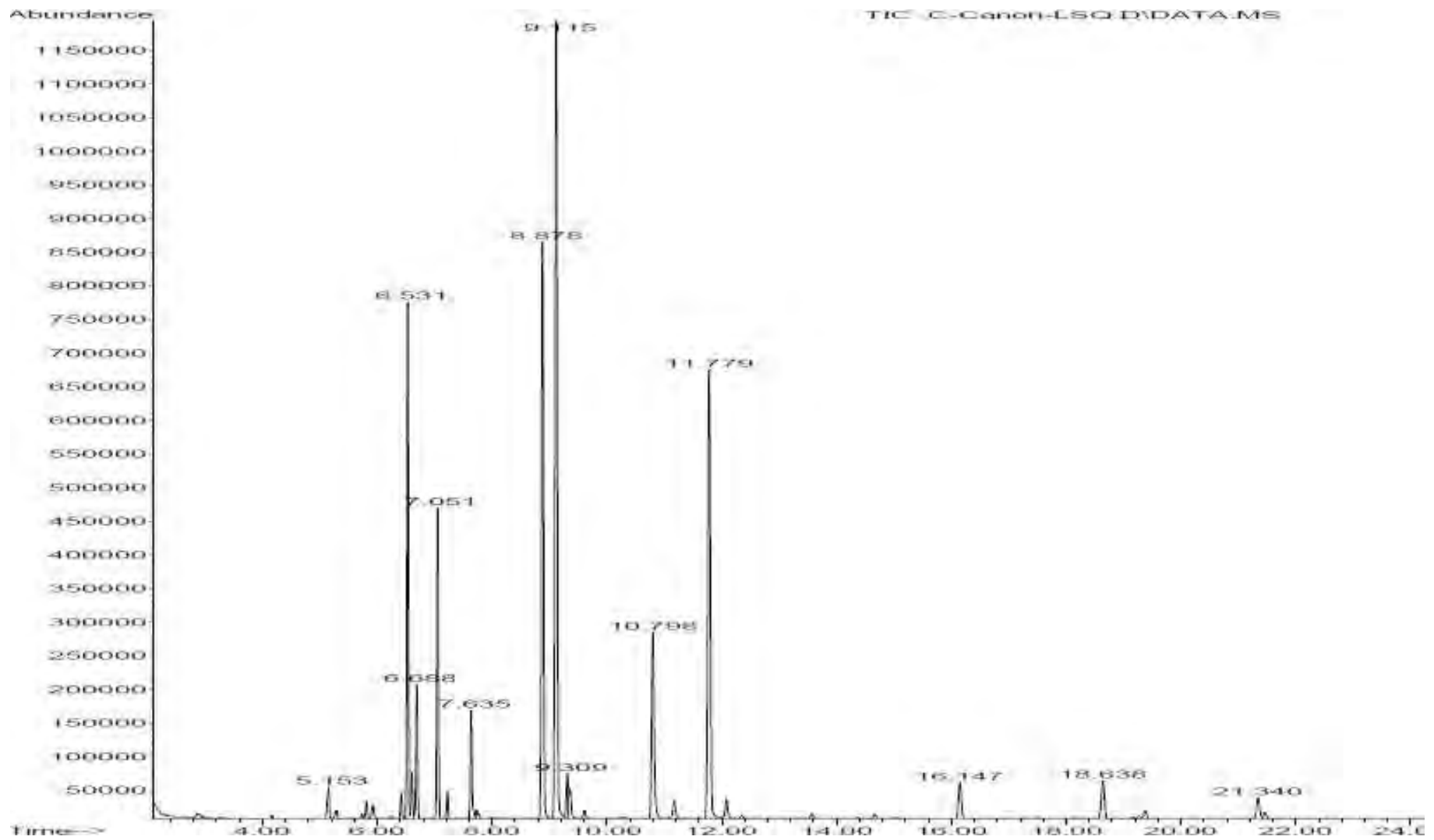


Figura 25. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*

Los resultados de la composición química del aceite esencial de *C. bolivianum*, determinados por Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas, se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Composición Química del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*.**

No. Pico	Compuesto	Tiempo Retención (min.)	<i>Clinopodium bolivianum</i>
1	$\alpha$ – Felantreno	5.15	0.94
2	$\alpha$ – Pineno	5.29	0.27
3	Sabineno	5.81	0.37
4	$\beta$ – Pineno	5.92	0.44
5	$\alpha$ – Terpineno	6.42	0.5
6	$p$ – Cimeno	6.53	10.7
7	Limoneno	6.6	0.98
8	Eucaliptol	6.69	2.87
9	$\gamma$ – Terpineno	7.05	7.21
10	$\delta$ – 3 – Careno	7.64	2.54
11	n.i.	7.74	0.3
12	Mentona	8.88	16.3
13	Isomentona	9.11	24.08
14	n.i.	9.31	1.3
15	n.i.	9.61	0.27
16	Pulegona	10.81	6.55
17	$d$ – Piperitona	11.17	0.73
18	Timol	11.78	15.82
19	Carbacrol	12.08	0.75
20	n.i.	12.34	0.1
21	n.i.	13.57	0.21
22	n.i.	14.36	0.11
23	n.i.	14.67	0.16
24	$\beta$ – Cariofileno	16.15	1.48
25	n.i.	18.64	1.71
26	n.i.	19.16	0.1
27	n.i.	19.27	0.11
28	n.i.	19.38	0.34
29	n.i.	21.34	0.94
30	n.i.	21.45	0.27
No. de compuestos identificados			17
% Total en compuestos detectados			98.45

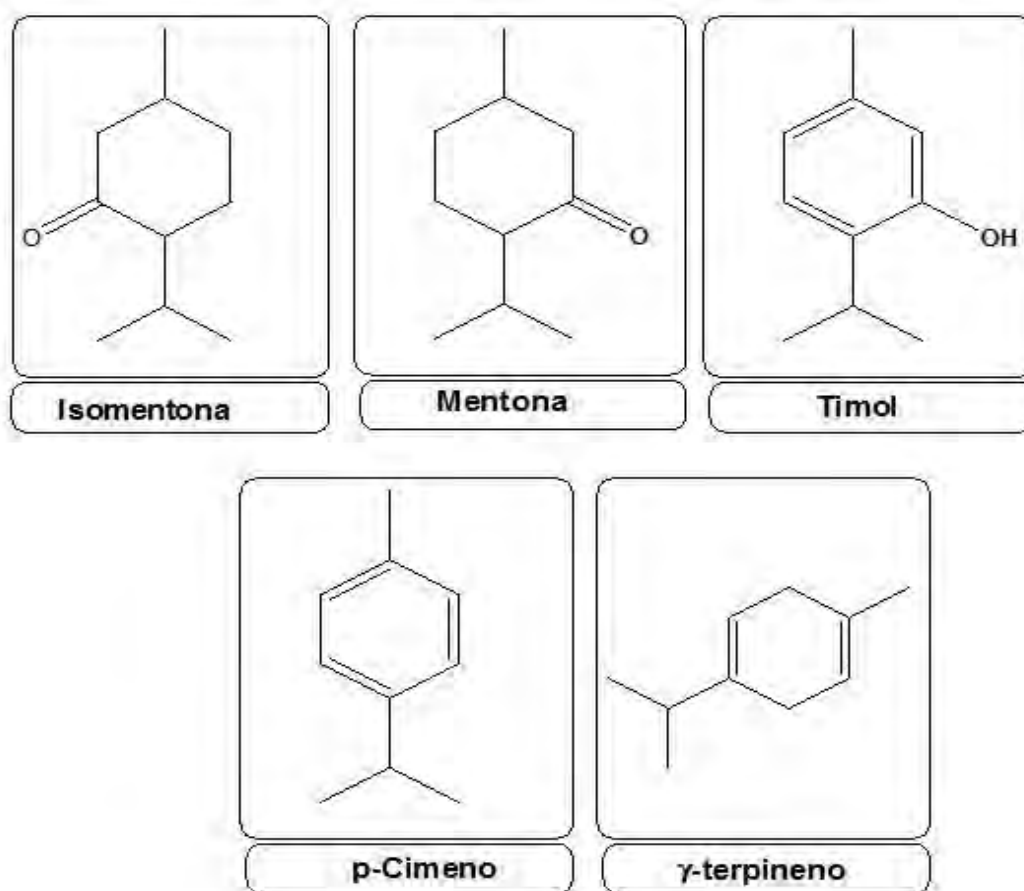
**Notas:** RT, tiempo retención; n.i. compuesto no identificado. No se reportan compuestos que están presentes en menores del 0,1 % por estar considerados como trazas

La tabla 6, sobre la composición química del aceite esencial de la especie *Clinopodium bolivianum*, indica que se identificó 17 componentes, de los cuales los seis componentes mayoritarios corresponden a la isomentona (24,08%), mentona (16,3%), timol (15,82%),  $p$ -cimeno (10,7%), terpineno (7,21%) y la pulegona



(6,55%). De los compuestos identificados, 7 son monoterpenos oxigenados, de aroma muy penetrante (isomentona, mentona, timol, pulegona, eucaliptol, carvacrol y  $\delta$  piperitona); 4 son monoterpenos de estructura son bicílicos ( $\gamma$ -3-careno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno y sabineno); y 5 son compuestos que pertenecen a los monoterpenos cíclicos ( $p$ -cimeno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -felandreno, limoneno y  $\alpha$ -terpineno); y uno es un compuesto que pertenece a los sesquiterpenos bicílicos como es el  $\beta$ -cariofileno. Rojas (2007) reporta haber identificado en el aceite esencial de esta especie, como componentes mayoritarios a isomentona, carvacrol, 1,8-Cineol y pulegona; Tepe *et al.* (2007) para esta especie, reportan como mayores componentes, la presencia de timol (38,9%),  $\gamma$ -terpineno (29,6%) y  $p$ -cimeno (9,1%) lo que coincide con los resultados de la investigación validando así nuestro trabajo de investigación. La variación de la composición del aceite esencial de esta especie, en muestras de diferentes lugares, es consecuencia de la influencia del medio ecológico al desarrollo de las especies vegetales.

La estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *C. bolivianum*, se muestra en la figura 26.



**Figura 26.** Componentes Mayoritarios del aceite esencial *Clinopodium Bolivianum*.

#### **4.4.3 ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum vulgare***

El perfil cromatográfico de la composición química del aceite esencial de *Tanacetum vulgare*, se muestra en la figura 27.

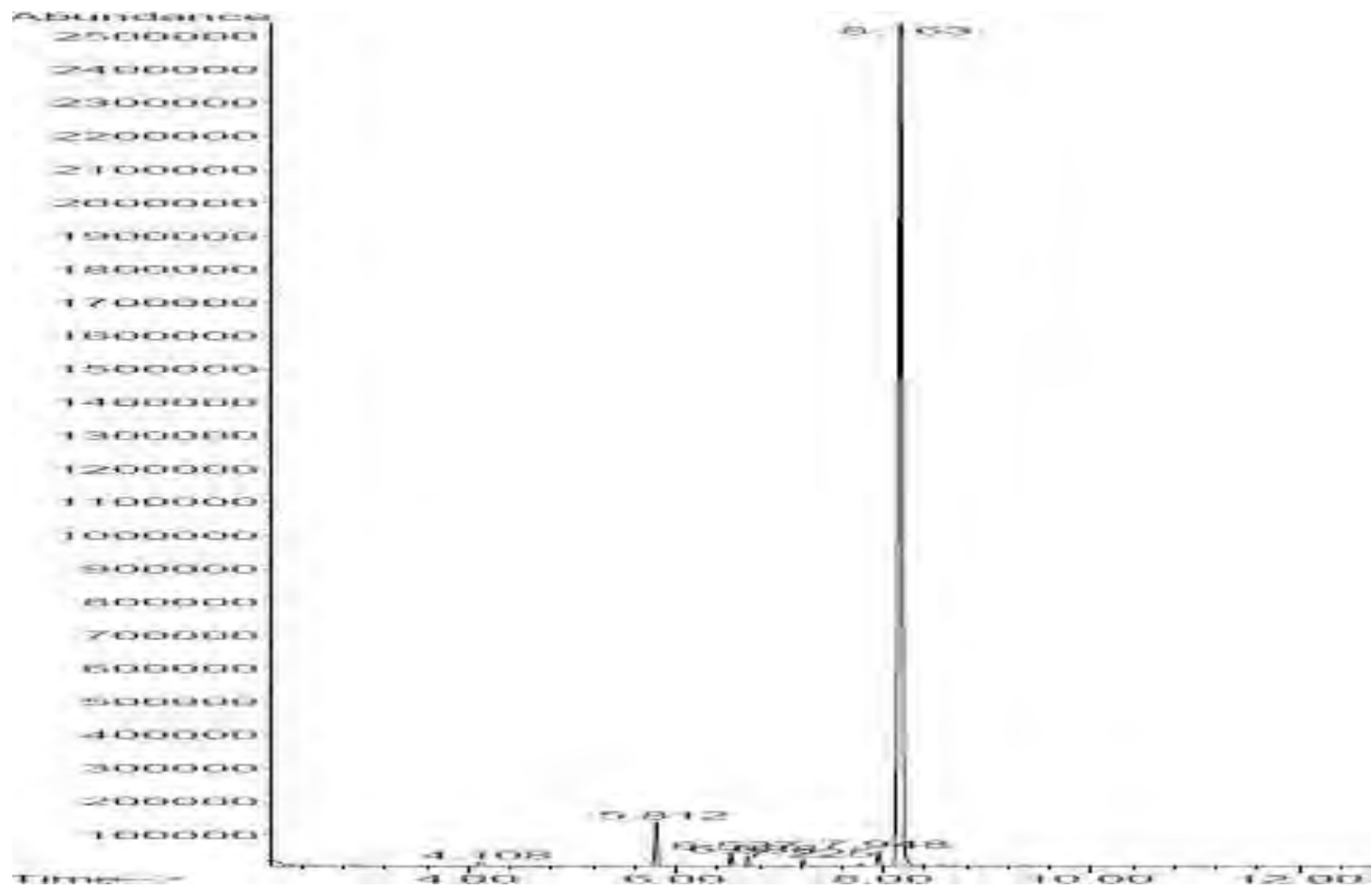


Figura 27. Perfil cromatográfico del aceite esencial de *Tanacetum vulgare*.

En cuanto a la composición química del aceite esencial de *Tanacetum vulgare*, se muestran en la tabla 7

**Tabla 7. Composición Química del aceite esencial de *Tanacetum Vulgare***

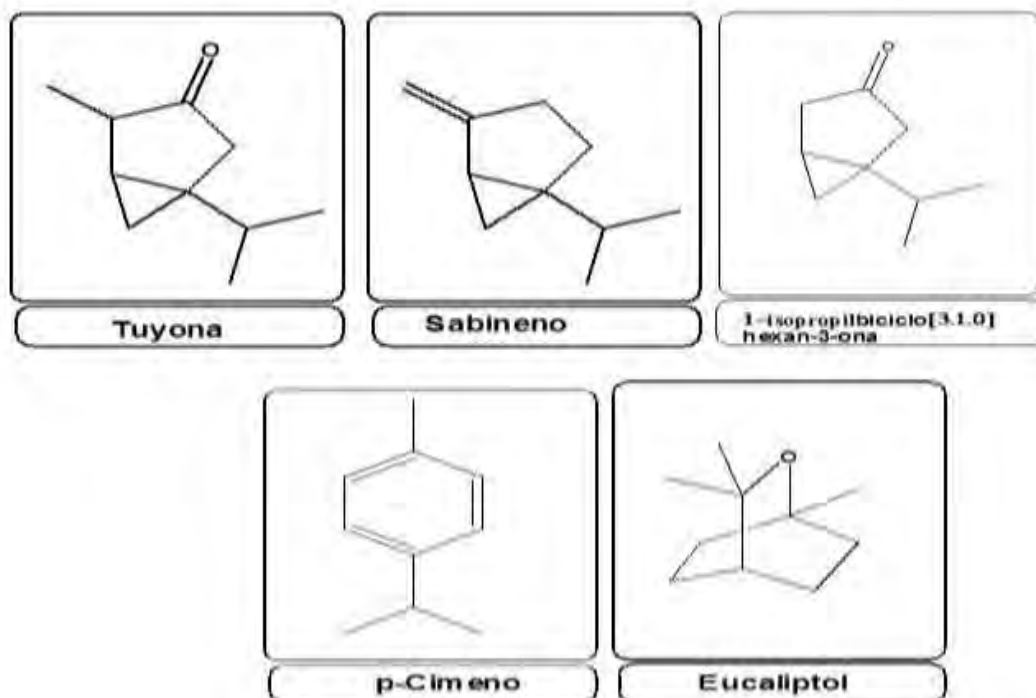
No. pico	Compuesto	Tiempo de Retención (min.)	%
1	n.i.	4.11	0.64
2	Sabineno	5.81	<b>3.02</b>
3	p – Cimeno	6.53	0.93
4	Eucaliptol	6.69	0.73
5	γ – Terpineno	7.05	0.46
6	n.i.	7,77	0.25
7	1,1-(1-metiletil) Biciclo [1.1.0] hexan- 3 – ona.	7.95	1.18
8	Tuyona	8.16	<b>91.77</b>
9	n.i.	8.37	0.16
10	n.i.	8.55	0.11
11	n.i.	8.67	0.1
12	n.i.	9.34	0.12
No. de compuestos identificados			6
% Total en compuestos detectados			99.47

**Notas:** RT, tiempo retención; n.i. compuesto no identificado. No se reportan compuestos que están presentes en menores del 0,1 % por estar considerados como trazas

se identificaron 6 componentes, de los cuales el más abundante es la tuyona con (91,77%) y los otros componentes con bajo porcentaje, como el sabineno (3.02%); 1-isopropilBiciclo[3.1.0]hexan-3-ona (1,18%), p-cimeno (0,93%) y el eucaliptol (0.73%); de los cuales dos son monoterpenos monocíclicos oxigenados (tuyona y eucaliptol), dos son monoterpenos bicíclicos (sabineno y 1-isopropilbiciclo[3.1.0]hexan-3-ona) y dos compuestos monocíclicos (p-cimeno y γ-terpineno); el 100% de los componentes identificados son monoterpenos.

Para el aceite esencial de esta especie, Solís et al (2018) reportaron a la tuyona (92,6 %) como componente mayoritario, Baranauskiene et al. (2014) reportaron como mayor componente a la  $\beta$ -tuyona con un 86,1 % y también Tomaylla (2016) reportó como componente mayoritario a la tuyona con (82.2%).; resultados que son muy cercanos a lo reportado en el presente trabajo, tuyona en un 91,77%.

La estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *T. vulgare*, se muestra en la figura 28.



**Figura 28. Componentes Mayoritarios del AE *Tanacetum Vulgare L***

#### **4.4.4 ACEITE ESENCIAL DE *Mentha X piperita* Var. *Citrata***

El perfil cromatográfico de la composición química del aceite esencial de *Mentha x piperita*, se muestra la figura 29.

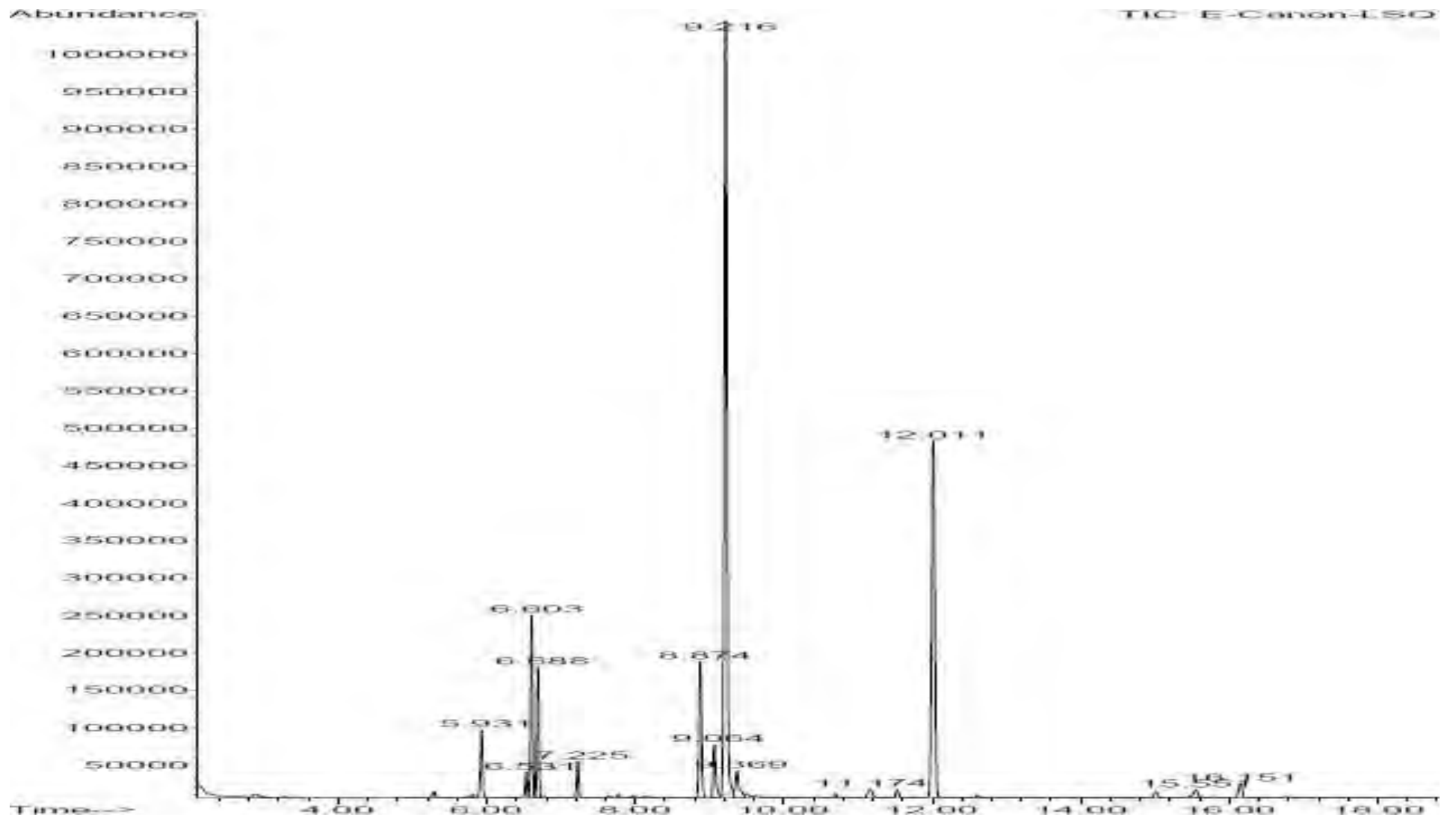


Figura 29. Perfil Cromatografico del aceite esencial de *Mentha x piperita* var. *citrata*

Los resultados de la composición química del aceite esencial de *Mentha x piperita*, se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8. Composición Química del AE de *Mentha x piperita***

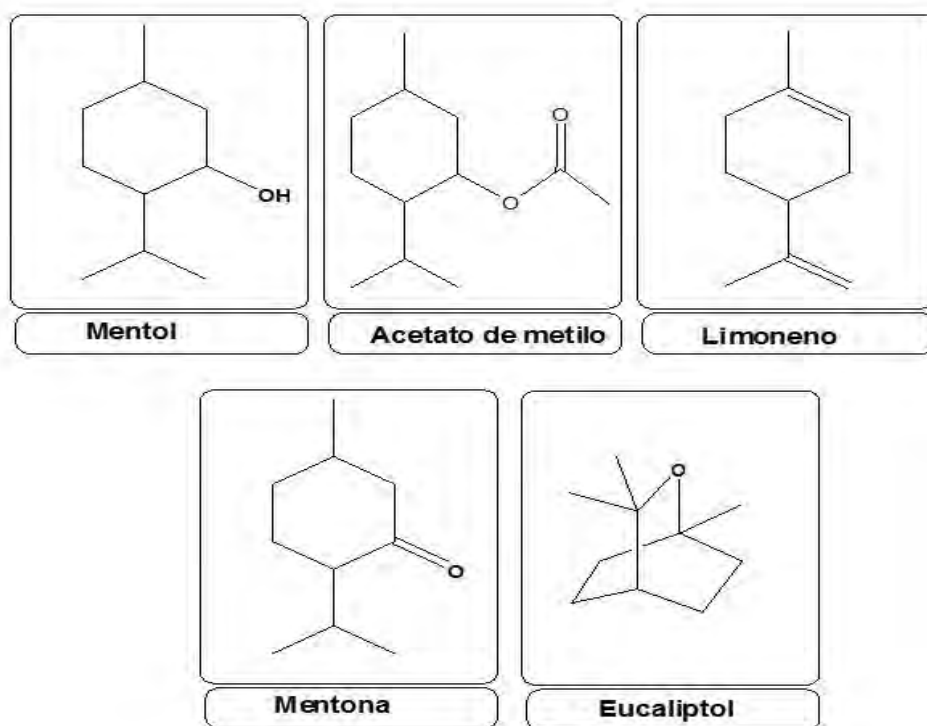
No. Pico	Compuesto	Tiempo Retención (min.)	%
1	$\alpha$ – Pineno	5.29	0.35
2	Sabineno	5.81	0.12
3	$\beta$ – Pineno	5.92	2.85
4	$\rho$ – Cimeno	6.53	0.91
5	Limoneno	6.6	7.07
6	Eucaliptol	6.69	4.87
7	$\gamma$ – Terpineno	7.05	1.36
8	n.i.	7,77	0.18
9	n.i.	7.97	0.11
10	Mentona	8.88	6.17
11	4-Metil-1-(1-Metiletil)ciclohexanona	9.06	2.42
12	Mentol	9.22	43.35
13	n.i.	9.37	1.94
14	n.i.	9.49	0.17
15	n.i.	10.69	0.21
16	$\delta$ – Piperitona	11.17	0.83
17	n.i.	11.53	0.41
18	Acetato de mentilo	12.02	22.21
19	n.i.	12.61	0.13
20	n.i.	15.01	0.41
21	n.i.	15.55	0.78
22	$\beta$ – Cariofileno	16.15	0.99
23	n.i.	21.73	0.12
24	n.i.	22.02	0.4
No. de compuestos identificados			13
% Total en compuestos detectados			98.36

**Notas:** RT, tiempo retención; n.i. compuesto no identificado. No se reportan compuestos que están presentes en menores del 0,1 % por estar considerados como trazas.

Conforme se observa en la tabla 8, en el aceite esencial de la especie *Mentha x piperita* se han identificado 13 componentes y los de mayor abundancia son el mentol (43,35 %), acetato de metilo (22,21 %), limoneno (7,07 %); mentona (6,17 %), y el eucaliptol (4,87%); de los componentes identificados seis son monoterpenos monocíclicos oxigenados (mentol, mentona, eucaliptol, 2-isopropil-4-metilciclohexanona,  $\delta$ -piperitona y acetato de mentilo); dos son monoterpenos bicíclicos (sabineno,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno); uno es sesquiterpenos bicíclicos como el  $\beta$ -cariofileno y tres son monoterpenos monocíclicos ( $\gamma$ -terpineno,  $\rho$ -cimeno y limoneno).

Los resultados de composición obtenidos para el aceite esencial de *Mentha x piperita*, son comparables con los reportados por varios investigadores como Kumar (2012) como componentes mayoritarios, reporta al mentol (26,53%), mentona (25,83%), acetato de mentilo (7,35%). También Deschamps et al. (2013) quienes indican que del genotipo *Mentha x piperita* se obtuvo la mayor producción de Mentol. Martínez (2003) como componentes mayoritarios reportó mentol (50 %) y mentona (10%); Tomaylla (2014) reporta como componentes mayoritarios al mentol con 35.3% mentil acetato con 19.7%, mentona con 7.4 % y limoneno 5.7 %.

La estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Mentha x piperita*, se muestran en la figura 30.



**Figura 30. Componentes Mayoritarios del AE *Mentha x piperita***

En los cuatro aceites esenciales se encontraron componentes no identificados y no reportados, considerados como trazas. Fuertes (2001) afirma que debemos considerar que la variabilidad en la composición química de los aceites esenciales depende no solo de la especie sino del lugar de recolección, altura sobre el nivel del mar, la naturaleza del terreno, la época de recolección o pequeños genéticos y la diferencia entre las hojas y tallos de las plantas.



En la composición química de los cuatro aceites esenciales de las especies *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* y *Mentha x piperita*; se muestran tres componentes en común, pero en diferentes concentraciones; los cuales sabineno con 0,49 %; 0,37%; 3,02% y 0,12 % respectivamente; p - cimeno con concentraciones 0,20%; 10,7%; 0,93% y 0.91 % respectivamente y como tercer componente en común Eucaliptol con 0,86%; 2,87%; 0,73% y 4,87%. En el caso el sabineno se reporta datos que puede causar dificultades respiratorias y parálisis del sistema nervioso central, pero eso dependerá de la concentración. El p-cimeno es irritante cutáneo y también puede provocar depresión del sistema nervioso central. Por otra parte, el eucaliptol causa irritación gastrointestinal, deficiencia de oxígeno, convulsiones y la muerte. López (2008); por consiguiente, estos compuestos contribuyan de alguna manera con su poder insecticida.

Podemos decir que, de los cinco primeros componentes mayoritarios, de los cuatro aceites esenciales en estudio el 96 % se trata de monoterpenos y solo un bajo porcentaje son sesquiterpenos como afirma Martínez (2003) indicando que los aceites esenciales son en su mayoría terpenicos.

#### **4.5 EFECTO INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES**

El efecto insecticida de los aceites esenciales se determinó por el método de impregnación en papel filtro reportado por Tapondjou et al. (2005) y Aragón (2015). El trabajo experimental se realizó en un ambiente cerrado sin aireación debido a que los granos secos de *Zea mays*, también son almacenados en ambientes cerrados.

Los resultados del efecto insecticida de los aceites esenciales a diferentes concentraciones de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *Citrata* sobre *Pagiocerus frontalis*, son el promedio de seis repeticiones, evaluados a diferentes tiempos de exposición.

##### **4.5.1 EFECTO INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys Spicata* (Benth) Epling.**

Los resultados del efecto insecticida del aceite esencial de *Minthostachys Spicata* para *Pagiocerus frontalis*, expresados en mortalidad de insectos, se muestran en la tabla 9.

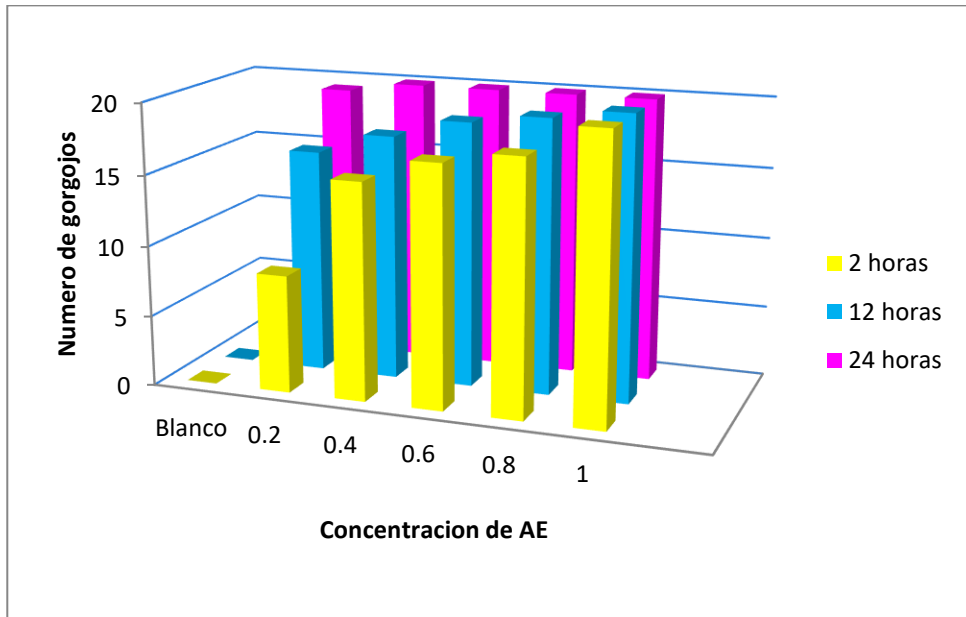
**Tabla 9. Efecto insecticida del aceite esencial de *Minthostachys spicata* para *Pagiocerus frontalis***

Concentración %V/V	Mortalidad		
	2 horas	12 horas	24 horas
0% (Blanco)	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
0.2 %	9	15	19
	7	16	20
	7	15	19
	10	17	19
	8	16	19
	9	16	20
	8.33 ± 1.21	15.83 ± 0.75	19.33 ± 0.52
0.4 %	16	19	20
	16	18	20
	14	17	20
	15	17	20
	15	16	20
	16	17	20
	15.33 ± 0.82	17.33 ± 1.00	20 ± 0.00
0.6 %	17	19	20
	17	19	20
	16	18	20
	18	19	20
	17	18	20
	17	19	20
	17 ± 0.63	18.67 ± 0.52	20 ± 0.00
0.8 %	18	19	20
	17	19	20
	18	20	20
	19	20	20
	17	19	20
	18	19	20
	17.83 ± 0.75	19.33 ± 0.52	20 ± 0.00
1 %	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20 ± 0.00	20 ± 0.00	20 ± 0.00

Estos resultados, muestran que el aceite esencial de *Minthostachys Spicata*, presenta un buen efecto insecticida desde las 2 horas de exposición para los

insectos de *Pagiocerus frontalis*, a 24 horas de exposición, prácticamente todos los tratamientos ocasionan el 100 % de mortalidad. La mortalidad presenta un incremento muy pequeño con respecto a la concentración del aceite esencial y al tiempo de exposición.

Los resultados del efecto insecticida del aceite esencial de *M. spicata* para *P. frontalis*, se resumen figura 31.



**Figura 31. Efecto insecticida del AE de *Minthostachys spicata* para *Pagiocerus Frontalis***

La figura 31, muestra el incremento del efecto insecticida para *P. frontalis* del aceite esencial *M. spicata*, conforme aumenta la concentración del aceite esencial y el tiempo de exposición.

Los porcentajes de mortalidad de *P. frontalis* a diferente concentración del aceite esencial de *M. spicata* y a diferente tiempo de exposición, se reportan en la tabla 10.

**Tabla 10. Porcentaje de mortalidad de *Pagiocerus frontalis* con el aceite esencial de *Minthostachys spicata*.**

Concentración de %V/V	Porcentaje de Mortalidad de Pagiocerus Frontalis (%)		
	2 horas	12 horas	24 horas
0% (Blanco)	0	0	0
0.2 %	41.65	79.15	95.65
0.4 %	76.65	86.7	99.15
0.6 %	85	93.35	100
0.8 %	89.15	96.85	100
1 %	100	100	100

En la tabla 10 se observa que, en el rango de las concentraciones de aceite esencial ensayadas, a 24 horas de exposición todos muestran efecto insecticida en un 100%. Mientras que, con la concentración del 1 %, desde 2 horas de exposición muestran un efecto insecticida del 100%. El efecto insecticida del AE de la *Minthostachys spicata* probablemente se debe a su componente principal la pulegona, porque esta sustancia tiene propiedades insecticidas. (Calle et al., 2004)

#### **4.5.2 EFECTO INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium bolivianum* (Benth)**

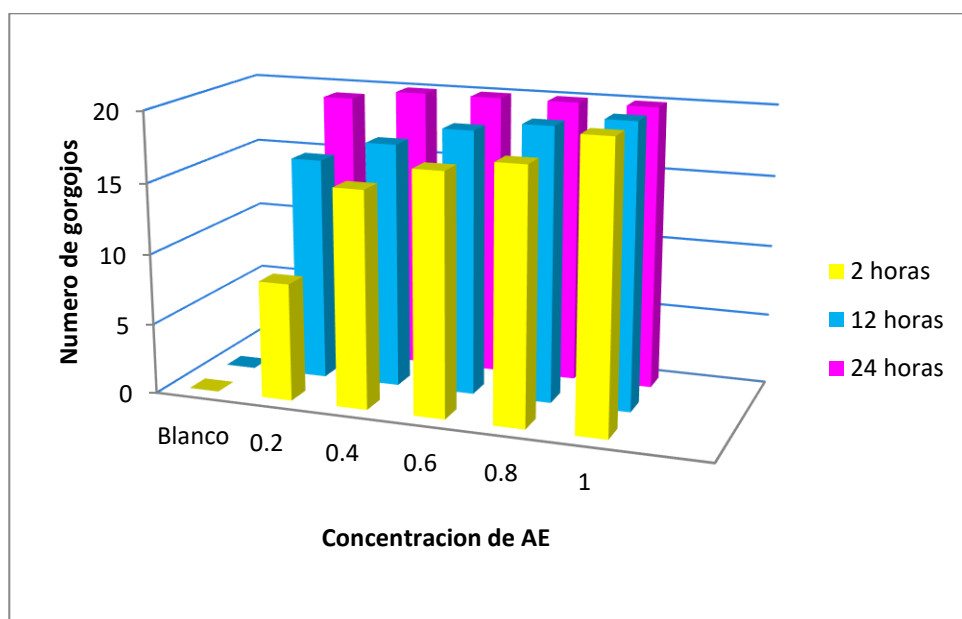
Los resultados del efecto insecticida del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* para *Pagiocerus frontalis*, expresados en mortalidad de insectos, se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11. Efecto insecticida del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* para *Pagiocerus frontalis***

Concentración (%V/V)	Mortalidad		
	2 horas	12 horas	24 horas
0% (Blanco)	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	<b>0 ± 0.00</b>	<b>0 ± 0.00</b>	<b>0 ± 0.00</b>
0.2 %	2	11	17
	3	12	17
	3	11	16
	2	13	16
	3	11	17
	3	11	17
	<b>2.67 ± 0.52</b>	<b>11.50 ± 0.84</b>	<b>16.67 ± 0.52</b>
0.4 %	4	16	20
	5	17	20
	5	15	20
	5	16	20
	4	16	20
	6	15	20
	<b>4.83 ± 0.75</b>	<b>15.83 ± 0.75</b>	<b>20 ± 0.00</b>
0.6 %	17	20	20
	18	20	20
	16	20	20
	18	20	20
	17	20	20
	17	20	20
	<b>17.17 ± 0.75</b>	<b>20 ± 0.00</b>	<b>20 ± 0.00</b>
0.8 %	18	20	20
	18	20	20
	17	20	20
	17	20	20
	19	20	20
	<b>17.83 ± 0.75</b>	<b>20 ± 0.00</b>	<b>20 ± 0.00</b>
1 %	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	<b>20 ± 0.00</b>	<b>20 ± 0.00</b>	<b>20 ± 0.00</b>

Los resultados de la tabla 11 muestran que el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*, presenta efecto insecticida para los insectos de *Pagiocerus frontalis*; a concentraciones menores de 0.4 % el efecto insecticida a 2 horas de exposición es muy baja, pero desde 12 horas de exposición el efecto insecticida muestra un incremento considerable para todos lo tratamientos. También se observa una correlación positiva del efecto insecticida para *Pagiocerus frontalis*, con la concentración de los aceites esenciales y el tiempo de exposición. Observándose un buen efecto insecticida del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum*, porque a concentración de 1 % genera mortalidad del 100 % de insectos desde 2 horas de exposición y a concentración de 0.4 % produce la mortalidad del 100 % de insectos a 24 horas de exposición.

Los resultados del efecto insecticida del aceite esencial de *C. bolivianum* para *P. frontalis*, determinados a diferente concentración y a diferente tiempo de exposición, se muestran en la figura 32.



**Figura 32. Efecto insecticida del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* para *Pagiocerus frontalis***

La figura 32 muestra que la mortalidad es progresiva, porque a mayor concentración mayor mortalidad y a mayor tiempo de exposición también se muestra mayor mortalidad.

Los porcentajes promedio de mortalidad de *P. frontalis* a diferente concentración de aceite esencial y a diferente tiempo de exposición, se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12. Porcentaje de mortalidad de *Pagiocerus frontalis* con el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum***

Concentración %V/V	Mortalidad		
	2 horas	12 horas	24 horas
0% (Blanco)	0%	0%	0%
0.2 %	13.35	57.5	83.15
0.4 %	24.15	79.15	100
0.6 %	85.85	100	100
0.8 %	89.15	100	100
1 %	100	100	100

La tabla 12 muestra que a concentración de 1 % la mortalidad es del 100 % de insectos desde 2 horas de exposición y a partir del 0.4 % de concentración del aceite esencial, la mortalidad es del 100 % a 24 horas de exposición.

#### **4.5.3 EFECTO INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL *Tanacetum Vulgare L***

Los resultados del efecto insecticida del aceite esencial de *Tanacetum Vulgare* para *Pagiocerus frontalis*, expresados en mortalidad de insectos, se muestran en la tabla

13

**Tabla 13. Efecto Insecticida del AE *Tanacetum Vulgare L.***

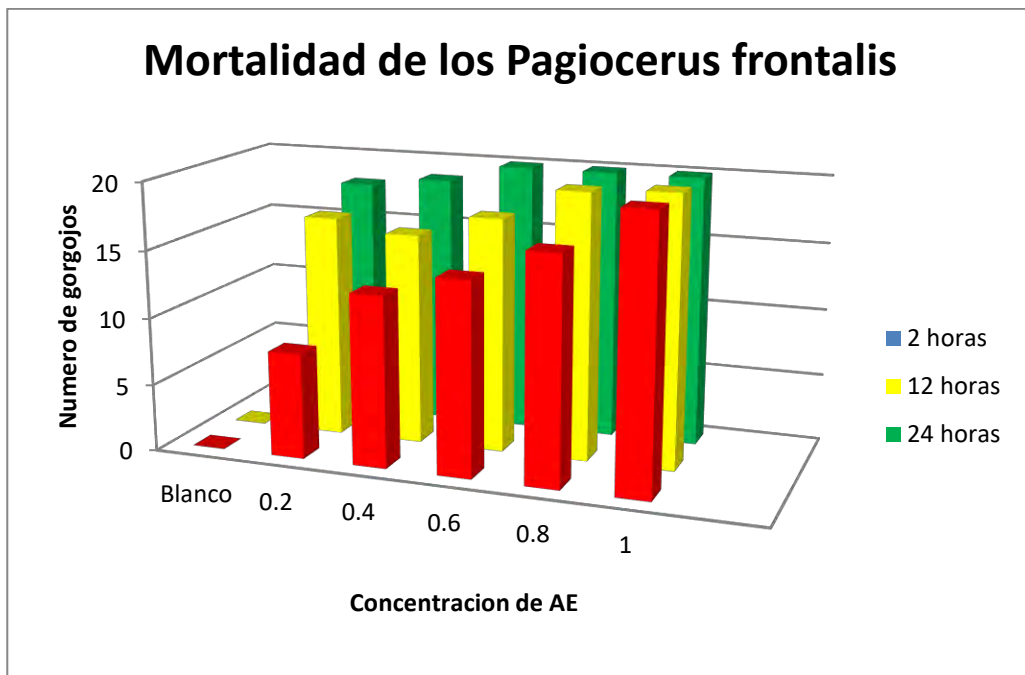
Concentración %V/V	Mortalidad		
	2 horas	12 horas	24 horas
0% (Blanco)	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	$0 \pm 0.00$	$0 \pm 0.00$	$0 \pm 0.00$
0.2 %	7	17	19
	7	16	18
	8	17	18
	9	17	18
	9	16	17
	7	16	18
	$7.83 \pm 0.98$	$16.50 \pm 0.55$	$18 \pm 0.63$
0.4 %	13	15	18
	13	15	18
	13	15	19
	12	16	19
	12	16	19
	13	17	19
	$12.67 \pm 0.52$	$15.67 \pm 0.82$	$18.67 \pm 0.52$
0.6 %	14	17	20
	15	18	20
	14	17	20
	15	18	20
	13	17	20
	15	17	20
	$14.33 \pm 0.82$	$17.33 \pm 0.52$	$20 \pm 0.00$
0.8 %	16	19	20
	16	19	20
	16	20	20
	17	20	20
	17	20	20
	18	20	20
	$16.67 \pm 0.82$	$19.67 \pm 0.82$	$20 \pm 0.00$
1 %	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	$20 \pm 0.00$	$20 \pm 0.00$	$20 \pm 0.00$

Los resultados de la tabla 13 permiten afirmar que el aceite esencial de *Tanacetum vulgare*, presenta efecto insecticida para los insectos de *Pagiocerus frontalis*; a



concentración del 1 % de aceite esencial, a partir de las 2 horas de exposición, el efecto insecticida es del 100 % para los insectos y a mayores tiempos de exposición, el efecto insecticida se incrementa muy poco. Pero muestra una correlación positiva del efecto insecticida con la concentración del aceite esencial y con el tiempo de exposición.

Los resultados del efecto insecticida del aceite esencial de *T. vulgare* para *P. frontalis*, determinados a diferente concentración y a diferente tiempo de exposición, se muestran en la figura 33.



**Figura 33.** Efecto insecticida del aceite esencial de *Tanacetum Vulgare* para *Pagiocerus frontalis*

En la figura 33 se visualiza más claramente la correlación del efecto insecticida con la concentración del aceite esencial y el tiempo de exposición; a mayor concentración de aceite esencial y a mayor tiempo de exposición mayor mortalidad de los insectos.

Los porcentajes promedio de mortalidad de *P. frontalis* a diferente concentración de aceite esencial de *Tanacetum Vulgare*, se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14. Porcentaje de mortalidad de *Pagiocerus frontalis* con aceite esencial de *Tanacetum Vulgare* L.**

Concentración %V/V	Mortalidad		
	2 horas	12 horas	24 horas
0% (Blanco)	0%	0%	0%
0.2 %	39.15	82.5	90
0.4 %	63.35	78.35	93.35
0.6 %	78.35	86.65	100
0.8 %	83.35	98.35	100
1 %	100	100	100

En la tabla 14 se observa que con todas las concentraciones ensayadas a las 2 horas de exposición la mortalidad es alta y a mayores tiempos de exposición la mortalidad se incrementa ligeramente. A la concentración de 1 % se logra una mortalidad del 100 % a partir de las 2 horas de exposición.

#### **4.5.4 EFECTO INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL *Mentha x piperita* var. *Citrata***

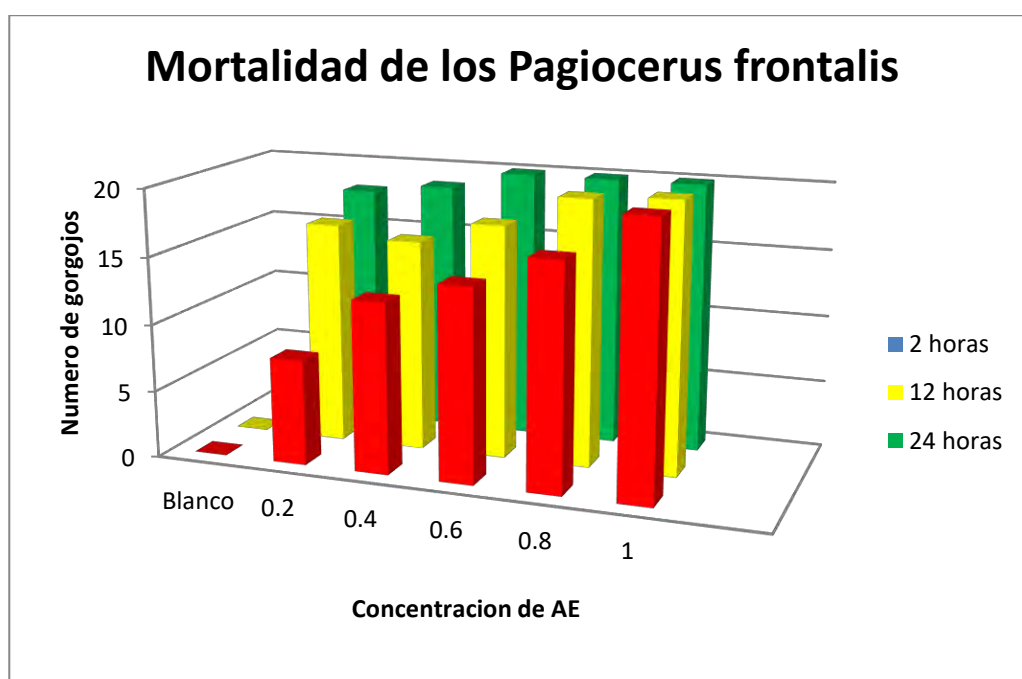
Los resultados del efecto insecticida del aceite esencial de *Mentha x piperita* var. *Citrata* para *Pagiocerus frontalis*, expresados en mortalidad de insectos, se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15. Efecto insecticida del aceite esencial de *Mentha x piperita* var. *Citrata* para *Pagiocerus frontalis***

Concentración %V/V	Mortalidad		
	2 horas	12 horas	24 horas
0% (Blanco)	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
	<b>0 ± 0.00</b>	<b>0 ± 0.00</b>	<b>0 ± 0.00</b>
0.2 %	8	16	19
	7	18	19
	7	17	19
	6	16	18
	6	16	18
	7	16	18
	<b>6.83 ± 0.75</b>	<b>16.50 ± 0.84</b>	<b>18.50 ± 0.55</b>
0.4 %	9	16	20
	11	18	20
	10	15	20
	11	16	20
	10	16	20
	11	17	20
	<b>10.33 ± 0.82</b>	<b>16.33 ± 1.03</b>	<b>20 ± 0.00</b>
0.6 %	14	18	20
	14	18	20
	16	18	20
	15	18	20
	16	17	20
	16	17	20
	<b>15.17 ± 0.98</b>	<b>17.67 ± 0.52</b>	<b>20 ± 0.00</b>
0.8 %	17	20	20
	17	20	20
	17	20	20
	17	19	20
	17	20	20
	18	20	20
	<b>17.17 ± 0.41</b>	<b>19.83 ± 0.41</b>	<b>20 ± 0.00</b>
1 %	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	20	20	20
	<b>20 ± 0.00</b>	<b>20 ± 0.00</b>	<b>20 ± 0.00</b>

Los resultados de la tabla 15 permiten afirmar que el aceite esencial de *Mentha x piperita* var. *Citrata*, presenta efecto insecticida para los insectos de *Pagiocerus frontalis*. Los tratamientos de concentraciones menores de aceite esencial de muestran una baja mortalidad de los insectos a 2 horas de exposición, pero a partir de las 12 horas la capacidad insectida aumenta rápidamente y a 24 horas de exposición todas las concentraciones generan el 100 % de mortalidad.

Los resultados del efecto insecticida del aceite esencial de *Mentha x piperita* var. *Citrata* para *P. frontalis*, se muestran en la figura 34



**Figura 34.** Efecto insecticida del aceite esencial de *Mentha x piperita* var. *Citrata* para *Pagiocerus frontalis*

La figura 34 permite observar el efecto insecticida del aceite esencial de *Mentha x piperita* var. *Citrata*, en una correlación positiva frente a la concentración del aceite esencial y al tiempo de exposición.

Los porcentajes promedio de mortalidad de *P. frontalis* a diferente concentración de aceite esencial de *Mentha x piperita* var. *Citrata* y a diferente tiempo de exposición, se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16.****Porcentaje de mortalidad de *Pagiocerus frontalis* con el aceite esencial de *Mentha x piperita var. Citrata***

Concentración %V/V	Mortalidad		
	2 horas	12 horas	24 horas
0% (Blanco)	0%	0%	0%
0.2 %	34.15	82.5	92.5
0.4 %	51.65	81.65	100
0.6 %	75.85	88.35	100
0.8 %	83.85	99.15	100
1 %	100	100	100

Los resultados de la tabla 16, permiten observar que el aceite esencial de *Mentha x piperita var. Citrata*, No permite corroborar los resultados anteriores y afirmar que la tasa de mortalidad total comienza a la concentración de 0.4% de aceite esencial a 24 horas de exposición con un promedio de 98.35%; pero no alcanza el 100% de mortalidad. Así mismo observamos que las emulsiones al 0.6 y 0.8 % muestran una tasa de mortalidad al 100% en un tiempo de exposición de 24 horas. En cambio, la emulsion con una concentración del 1% alcanza una mortalidad total a 2 horas exposición haciendo evidente su poder insecticida; también podemos indicar que al 1%; a 2 horas de exposición *Mentha x piperita var. Citrata* as de exposición la mortalidad es total evidenciando que los aceites esenciales son volátiles.

**4.6 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION LETAL MEDIA CL50 METODO PROBIT**

La concentración letal media (CL50), del efecto insecticida de los aceites esenciales de *Minthostachys spicata*, *Clinopodium bolivianum*, *Tanacetum vulgare* L y *Mentha x piperita var. Citrata*. para *P. frontalis*, se ha calculado utilizando el programa BioStat 2009 Profesional. Analisis Probit Metodo Finney (Distribución normal).

#### 4.6.1 CONCENTRACION LETAL MEDIA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys spicata*

Los resultados de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), del efecto insecticida del aceite esencial de *Minthostachys spicata* para *Pagiocerus frontalis*, se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17. Concentración letal media del efecto insecticida del aceite esencial *Minthostachys spicata* para *Pagiocerus frontales***

Aceite esencial	Concentració % V/V	Mortalidad		
		2 horas	12 horas	24 horas
	0	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
	0.2	8.33 ± 1.21	15.83 ± 0.75	19.33 ± 0.52
<i>Minthostachys spicata</i> (Benth) Epling	0.4	15.33 ± 0.82	17.33 ± 1.00	20 ± 0.00
	0.6	17 ± 0.63	18.67 ± 0.52	20 ± 0.00
	0.8	17.83 ± 0.75	19.33 ± 0.52	20 ± 0.00
	1	20 ± 0.00	20 ± 0.00	20 ± 0.00
	CL <sub>50</sub> (v/v)	0.2324	0.13	---

Los resultados de la tabla 17, muestran que el aceite esencial de *Minthostachys spicata* presenta efecto insecticida para *Pagiocerus frontalis*, con una CL<sub>50</sub> de 0.2324 % de aceite esencial a 2 horas de exposición y con CL<sub>50</sub> de 0.13 % de aceite esencial a 12 horas de exposición. Se observa que el efecto insecticida incrementa con el tiempo de exposición, porque a 24 horas de exposición la mortalidad es del 100 % de los insectos, para todas las concentraciones ensayadas.

El efecto insecticida del aceite esencial de la *Minthostachys spicata* para *Pagiocerus frontalis* probablemente se debe a la presencia la pulegona con un porcentaje de 49.5%, esta molécula es reportado como insecticida por la bibliografía especializada, como Renault et al. (2004) y Zegarra (2010). También Tejada (1980) reportó al aceite esencial de *Minthostachys spicata*, como insecticida para gorgojo de maíz con DL<sub>50</sub> de 0,004 g/L. La pulegona es considerado altamente tóxica (Castro, 2012), puede inducir la carcinogénesis, generando una disminución de glutatión y una disminución de la protección celular frente a especies como radicales libres y peróxido (Pino, 2014); por sus propiedades lipofílicas, afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana. (Cano et al., 2008).

Varias investigaciones han demostrado el efecto insecticida del aceite esencial de *Minthostachys spicata* para otros insectos, para *Premnotrypes latithorax* (Solís, 2018), *Symmetrischema tangoíos* (Gyen) (Vengoa, 2013) y *B. microplus* (Zegarra, 2010).

#### 4.6.2 CONCENTRACION LETAL MEDIA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium bolivianum*.

Los resultados de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), del efecto insecticida del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* para *Pagiocerus frontalis*, se muestran en la tabla 18.

**Tabla 18. Concentración letal media del efecto insecticida del aceite esencial *Clinopodium bolivianum* para *Pagiocerus frontalis***

Aceite esencial	Concentración % V/V	Mortalidad		
		2 horas	12 horas	24 horas
	0	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00
	0.2	2.67 ± 0.52	11.50 ± 0.84	16.67 ± 0.52
<i>Clinopodium</i>	0.4	4.83 ± 0.75	15.83 ± 0.75	20 ± 0.00
<i>Bolivianum (Benth) Kuntze</i>	0.6	17.17 ± 0.75	20 ±0.00	20 ±0.00
	0.8	17.83 ± 0.75	20 ±0.00	20 ±0.00
	1	20 ±0.00	20 ±0.00	20 ±0.00
	CL <sub>50</sub> (v/v)	0.43	0.1917	- - -

Los resultados de la tabla 18, muestran que el aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* presenta efecto insecticida para *Pagiocerus frontalis*, con una CL<sub>50</sub> de 0.43 % de aceite esencial a 2 horas de exposición y con CL<sub>50</sub> de 0.1917 % de aceite esencial a 12 horas de exposición. Se observa que el efecto insecticida incrementa con el tiempo de exposición, porque a 24 horas de exposición la mortalidad es del 100 % de los insectos, a partir de 0.4 % de concentración de aceite esencial.

El efecto insecticida del aceite esencial de la *Clinopodium bolivianum* para *Pagiocerus frontalis*, probablemente se debe a la presencia componentes

considerados insecticidas en su composición, como: Timol (15.82 %), Pulegona (6.55 %), Eucaliptol (2,87 %), Carbacrol (0.75%) y otros (Regnault et al., 2004). La mentona es considerada como tóxica (Schmidt, 2008) y mutagénico nuclear considerado como genotóxico al igual que la asarona y anetol y  $\alpha$ -terpineol. (Pino, 2014). El aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* fue reportada como repelente para insectos de papa durante su almacenamiento (Yapuchura, 2010); también como insecticida para larvas de *Premnotrypes latithorax*. (Solís, 2018).

#### 4.6.3 CONCENTRACION LETAL MEDIA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tanacetum vulgare* L

Los resultados de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), del efecto insecticida del aceite esencial de *Tanacetum vulgare* para *Pagiocerus frontalis*, se muestran en la tabla 19.

**Tabla 19. Concentración letal media del efecto insecticida del aceite esencial *Tanacetum vulgare* para *Pagiocerus frontalis***

Aceite esencial	Concentración %V/V	Mortalidad		
		2 horas	12 horas	24 horas
	0	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00
	0.2	7.83 ± 0.98	16.50 ± 0.55	18 ±0.63
<i>Tanacetum vulgare</i> Linnaeus	0.4	12.67 ± 0.52	15.67 ± 0.82	18.67 ± 0.52
	0.6	14.33 ± 0.82	17.33 ± 0.52	20 ± 0.00
	0.8	16.67 ± 0.82	19.67 ± 0.82	20 ± 0.00
	1	20 ± 0.00	20 ± 0.00	20 ± 0.00
	CL <sub>50</sub> (v/v)	0.2903	0.0743	-----

Los resultados de la tabla 19, muestran que el aceite esencial de *Tanacetum vulgare* presenta efecto insecticida para *Pagiocerus frontalis*, con una CL<sub>50</sub> de 0.2903 % de aceite esencial a 2 horas de exposición y con CL<sub>50</sub> de 0.0743 % de aceite esencial a 12 horas de exposición. Se observa que el efecto insecticida incrementa con el tiempo de exposición y a 24 horas de exposición la mortalidad es del 100 % de los insectos, a partir de 0.6 % de concentración de aceite esencial.

El efecto insecticida del aceite esencial de la *Tanacetum vulgare* Linnaeus para *Pagiocerus frontalis*, probablemente se debe a la presencia de tuyona (91.77 %) en su composición química; casi se podría decir que es el único componente;



además la bibliografía reporta a la tuyona como altamente tóxica y con actividad insecticida (Polatoglu et al., 2015). La tuyona posee una gran toxicidad sobre el sistema nervioso y hepático pudiendo causar la muerte; los efectos neurotóxicos se deben a que actúa como modulador de los receptores GABA (ácido gamma aminobutírico) en el cerebro. La tuyona es letal por su elevada toxicidad; exámenes toxicológicos han demostrado que por encima de los 6000 mg es mortal en el 100% (Tapia, 2013).

El aceite esencial de *Tanacetum vulgare* es reportado como un buen insecticida por Fuertes et al. (2010). También los aceites esenciales de otras especies *Tanacetum* son reportados como insecticidas, como: de *Tanacetum abrotanifolium* que ha mostrado efecto insecticida contra *Sitophilus granarius* (Polatoglu et al., 2015); de *Tanacetum balsamita* L muestra efecto insecticida contra *Callosobruchus maculatus* (Attighi et al., 2013); de *Tanacetum vulgare* con efecto insecticida contra los nauplios de *Artemia salina* (Fuerte et al., 2010); y como insecticida para *Premnotrypes latithorax* y *Epitrix spp* (Solís, 2018).

#### **4.6.4 CONCENTRACION LETAL MEDIA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Mentha x piperita* Var. *Citrata***

Los resultados de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>), del efecto insecticida del aceite esencial de *Mentha x piperita* Var. *Citrata* para *Pagiocerus frontalis*, se muestran en la tabla 20.

**Tabla 20. Concentración letal media del efecto insecticida del aceite esencial de *Mentha x piperita* Var. *Citrata* para *Pagiocerus frontalis***

Aceite esencial	Concentración % (V/V)	Mortalidad (Número de insectos muertos de 20)		
		2 horas	12 horas	24 horas
	0	0 ±0.00	0 ±0.00	0 ±0.00
	0.2	6.83 ± 0.75	16.50 ± 0.84	18.50 ± 0.55
<i>Mentha x piperita</i> <i>Var. Citrata (Ehrh.) Briq</i>	0.4	10.33 ± 0.82	16.33 ±1.03	20 ± 0.00
	0.6	15.17 ± 0.98	17.67 ± 0.52	20 ± 0.00
	0.8	17.17 ± 0.41	19.83 ± 0.41	20 ± 0.00
	1	20 ± 0.00	20 ± 0.00	20 ± 0.00
	CL <sub>50</sub> (v/v)	0.3197	0.0672	- - -

Los resultados de la tabla 20, muestran que el aceite esencial de *Mentha x piperita* Var. *Citrata* presenta efecto insecticida para *Pagiocerus frontalis*, con una CL<sub>50</sub> de 0.3197 % de aceite esencial a 2 horas de exposición y con CL<sub>50</sub> de 0.0672 % de aceite esencial a 12 horas de exposición. Se observa un buen efecto insecticida desde los primeros tiempos de exposición, porque a 24 horas de exposición, prácticamente la mortalidad de los insectos es del 100 %.

El efecto insecticida del aceite esencial de la *Mentha x piperita* Var. *Citrata* para *Pagiocerus frontalis*, probablemente se debe a la presencia de mentol (43.35 %), acetato de mentilo (22.21 %) en su composición; porque la bibliográfica reporta al mentol como tóxico (Gañan, 2014), como genotóxico y con efecto insecticida, provocando daños en los linfocitos (Pino, 2014), El aceite esencial de *Mentha x piperita* Var. *Citrata*, ha sido reportado como insecticida para *Musca domestica*, con una CL<sub>50</sub> de 0,54 µl/cm<sup>2</sup> (Kumar, 2012); para *Epitrex spp* (Solís, 2018). También se indica que el aceite esencial de *Mentha spp* tiene propiedades insecticidas y actúa en el control de hormigas, polillas, gorgojos, pulgones, moscas de la fruta, mariposas de la col y garrapatas (Fundesyram, 2012).

De los resultados de la determinación del efecto insecticida de los aceites esenciales sobre insectos adultos de *Pagiocerus frontalis*, se pone en evidencia que todos los aceites esenciales presentan efecto insecticida; sin embargo, los que muestran el mayor efecto insecticida, son el aceite esencial de *M. x piperita* Var. *Citrata* con CL<sub>50</sub> de 0.0672 %, seguido de *T. vulgare* con CL<sub>50</sub> de 0.0743 % a 12 horas de exposición; por contener altas concentraciones de componentes tóxicos con propiedades insecticida y con buenas posibilidades de aplicación práctica.

## CONCLUSIONES

1. El rendimiento de aceite esencial obtenido por hidrodestilación con trampa de Clevenger, para las especies *Mi spicata*, *C bolivianum*, *T vulgare* Linnaeus, *M x piperita*, fue de 0,61%; 0,81%; 0,4% y 0,83% respectivamente.
2. Las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales fueron, para *M.x spicata*, densidad: 0.9183 g/mL; Índice de refracción: 1.4727; Índice de acidez: 1.6269 y Rotación óptica: 3.43; Para *C. bolivianum*, densidad: 0.9010 g/mL; Índice de refracción: 1.4769; Índice de acidez: 1.711 y Rotación óptica: 3.69; Para *T. vulgare*, densidad: 0.9293 g/mL; Índice de refracción: 1.4648; Índice de acidez: 0.870 y Rotación óptica: -0.135; y para *M. x piperita* Var. *Citrata*, densidad: 0.9078 g/mL; Índice de refracción: 1.4595; Índice de acidez: 1.308 y Rotación óptica: 0.313.
3. La composición química de los aceites esenciales muestran como componentes mayoritarios, para *M. spicata*, pulegona (49,50%); mentona (18,95%); isomentona (14,46%); 4,7,7- trimetilbicyclo[4.1.0] hept -3-eno (3,57%) y  $\beta$ -cariofileno (1,85%); para *C. bolivianum*, isomentona (24,08%), mentona (16,3%), timol (15,82%), *p*-cimeno (10,7%),  $\gamma$ -terpineno (7,21%) y la pulegona (6,55%); para *T. vulgare*, tuyona (91,77%); sabineno (3,02%); 1-isopropilBicyclo[3.1.0]hexan-3-ona (1,18%), *p*-cimeno (0,93%) y eucaliptol (0,73%) y para *M. x piperita*, mentol (43,35 %) acetato de metilo (22,21 %), limoneno (7,07 %); mentona (6,17 %), y eucaliptol (4,87%).
4. Los aceites esenciales de *M. spicata*, *C. bolivianum*, *T. vulgare* y *M. x piperita* presentan efecto insecticida para insectos adultos de *Pagiocerus frontalis*, con una concentración letal media (CL<sub>50</sub>), de 0.13 %; 0.1917 %; 0.0743 % y 0.0672 % respectivamente, a 12 horas de exposición. Un 100% de mortalidad se determinó a la concentración de 1% a dos horas de exposición, para todos los aceites esenciales; los que muestran mayor efecto insecticida y buenas posibilidades de aplicación práctica, son los aceites esenciales de *M. x piperita* seguido de *T. vulgare*.

## RECOMENDACIONES

Del trabajo de investigación desarrollado se desprende las siguientes recomendaciones:

1. Se sugiere determinar el principio activo de los aceites esenciales que actúa como biocidas biológicos y elaborar una formulación para su aplicación.
2. Sabiendo de su poder insecticida de los aceites esenciales de las plantas estudiadas se recomienda la aplicación en otras semillas andinas de importancia alimentaria.
3. Se sugiere la formulación de un insecticida orgánico con estos aceites esenciales cuyas concentraciones deben ser un 1% para uso en almacenamiento y protección de los ataques de gorgojo.
4. Se sugiere la protección y preservación de las especies en estudio, puesta que a estas les encontramos en la naturaleza.

## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Agapito, T. (2003). *Sung I. fitomedicina: 1100 plantas medicinales*. 1ª edición. Lima: Editorial Isabel IRL.
2. Alea Pino, Jorge. Antonio. (2015). *Aceites esenciales: Química, Bioquímica, producción y usos*. Primera Edición. Editorial Universitaria. EPUB ISBN:9789591626097
3. Almaraz Abarca, N., Ávila Reyes, J. A., Delgado Alvarado, E. A., Naranjo Jiménez, N., & Herrera Corral, J. (2006). El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8292/1/METABOLISMO%20SECUNDARIO-ALMARAZ.pdf>
4. Álvarez Martínez, Jean. Paul. (2020). *Métodos de control para gorgojo de maíz (Pagiocerus frontalis) en almacén*. [Tesis de grado]. Universidad Nacional del centro del Perú. [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/6256/T010\\_47387151\\_t.pdf?sequence=1](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/6256/T010_47387151_t.pdf?sequence=1)
5. Alvarez, J. C., Espinosa, A. M., Núñez, C. P., Bautista, E., & Pinzón, R. (2004). Actividad insecticida del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb y sus componentes. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 33(2).
6. Aragón Alencastre, L. J. (2016). *Aceites esenciales de Eucaliptus globulus Labill y Tagetes multiflora kunth y su efecto insecticida para Pagiocerus frontalis*. [Tesis de maestría]. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco <http://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/2849>.
7. Arning, I., & Velásquez, H. (2000). *Plantas con potencial biocida. Metodologías y experiencias para su desarrollo* (No. H10 P4). Red de Acción en Alternativas al Uso de Agroquímicos-RAAA, Lima (Perú).
8. Attighi F, Khashaveh A, Attighi R. (2013). Fumigant toxicity of essential oil from *Tanacetum balsamita* L. (Compositae) against adults and eggs of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. Volume 46, Pages 2080-2086, Department of Entomology, College of Agriculture, Urmia University, Urmia,

- Iran. Disponible en <http://www.scopus.com/> fumigant toxicity; *Tanacetum balsamita*
9. Badii, M. H., & Garza-Almanza, V. (2015). Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. *Cultura Científica y Tecnológica*, (18). <http://erevistas.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/460>
  10. Baños, H. L., Gutiérrez-González, Y., & Pino-Pérez, O. (2019). Potencialidades de aceites esenciales de especies de tres familias botánicas para el manejo de *Bemisia tabaci* Biotipo B. *Revista de Protección Vegetal*, 34(1). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522019000100005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522019000100005)
  11. Barauskiene R, Kazernaviciute R, Pukalskiene M, Mazdzeriene R, Venskutonis R. (2014). Agrorefinery of *Tanacetum vulgare* L. into valuable products and evaluation of their antioxidant properties and phytochemical composition. *Revista Industrial Crops and Products*. Vol 60, pag113–122 <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143266574>
  12. Bruneton, Jean. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. Segunda edición. Impresa en Zaragoza (No. RS 164. B7818 2001).
  13. Cámara de sanidad agropecuaria y fertilizante. CAFASE. (2010) *Insecticidas y acaricidas. Estudios en Argentina* disponible en: <https://kardauni08.files.wordpress.com/2010/09/insecticidas.pdf>
  14. Cano, C., Bonilla, P., Roque, M., & Ruiz, J. (2008). Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 25(3), 298-301.
  15. Cantó-Tejero, M., Guirao, P., & Pascual-Villalobos, M. J. (2017). El uso de aceites esenciales como insecticidas y repelentes de pulgones. *Boletín SEEA*, 2,17-18. <http://seea.es/pdf/17%20Aceites%20esenciales%20contra%20pulgones.pdf>
  16. Cárdenas López, E. M. (2014). Determinación de parámetros de operación para la destilación por arrastre con vapor de agua del aceite esencial de molle (*Schinus molle* Linneo) en el equipo modular de extracción de aceites esenciales de la FIQM-UNSCH. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1032>
  17. Castro Mattos M. (2012) Comparación de los aceites terpenicos de la *Minthostachys Mollis* en los extractos de las hojas secas y frescas. [Tesis para

- grado]. Universidad Nacional del centro del Peru.<http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12894/2659/Castro%20Mattos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
18. Castro R. y Mejía, K. (2011). Preferencia alimentaria de *Pagiocerus frontalis* en variedades de maíz en el distrito de Coya-Provincia de Calca. (Seminario de Investigación). UNSAAC. 53 pp. [http://www.avocadosource.com/international/peru\\_papers/CastroRosa2011.pdf](http://www.avocadosource.com/international/peru_papers/CastroRosa2011.pdf)
  19. Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97-106. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13923>
  20. Cerpa Chávez Manuel Guillermo (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. [Tesis doctoral]. UNIVERSIDAD DE VALLADOLID Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. <https://www.anipam.es/downloads/43/hidrodestilacion-de-aceitesesenciales.pdf>
  21. Chávez Gonzales, L. M., & Gutiérrez Condori, D. A. (2013). Estudio fitoquímico y evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de *Tanacetum vulgare* L." Palma real". <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/52>
  22. Claros, m., Bilbao, p., Damiani, e., Gonzales, e., Estensoro, m., & Alvarez, m. T. (2007). Actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major*, *Clinopodium bolivianum*, *Caléndula officinalis* y *Piper angustifolium* por el método de difusión de disco. *Revistas bolivianas.org.bo*. Biofarbo v.15 n.1 La Paz.
  23. Colque Alave, E. G. (2017). Neutralización del efecto letal en ratones (mus músculos) del veneno de serpiente (*bothrops atrox*) por suero hiperinmune de llama (lama glama). [Tesis de grado]. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna-Perú. <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/3090>
  24. De la cruz Silva Horacio (2007). Uso tradicional (medicina y biocida de las especies vegetales silvestres de la cuenca del río Chillón [tesis doctoral]. Universidad Nacional La Molina. Lima - Perú <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/4317/de-la-cruz-silva-horacio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

25. De Ugaz, Olga. Lock. (1994). Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición. Universidad Católica Perú.
26. Deschamps C., Zanatta J.L., Ribeiro Bizzo H., Oliveira M., Roswalda L.C. (2007) Avaliação sazonal o rendimento de óleo essencial em espécies de *menta*. *Ciênc. agrotec.* No.3 Lavras, vol.32 Dpto Fitotecnia e Fitosanitario Pesquisa / Research. [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141370542008000300004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141370542008000300004&script=sci_arttext).
27. Domínguez S., Xorge. A. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. Limusa. Centro Regional de ayuda Técnica. México.
28. Domínguez, L., & Parzanese, M. (2013). Tecnologías para la industria alimentaria fluidos supercríticos. Alimentos Argentinos, [En línea]. Available: [http://www. Alimentos argentinos. gob. ar/contenido/sectores/tecnología/Ficha\\_01\\_Fluidos. pdf](http://www.Alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnología/Ficha_01_Fluidos.pdf).
29. Edgar, O. E. (1997). Efectividad biológica de insecticidas no convencionales *metarhizium anisopliae* y la piretrina para el control de plagas del maíz. [http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/80/Ocana\\_Esquinca\\_Edgar.pdf?sequence=1](http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/80/Ocana_Esquinca_Edgar.pdf?sequence=1)
30. Eidt-Wendt, J., & Schulz, F. A. (1990). Studies on the biology and ecology of *Pagiocerus frontalis* (Fabricius) (Coleoptera: Scolytidae) infesting stored maize in Ecuador. In 5. International working conference on stored-product protection, Bordeaux (France), 9-14 Sep 1990.
31. Ekundayo, Olusegn. (1979) . Essential Oils II. Terpene Composition of the Leaf Oil of *Tanacetum vulgare* L. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 92(3), 215–219. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(79\)80003-3](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(79)80003-3)
32. Esquivel, A., Vargas, P. (2007). Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marca.* Vol 20-04. P 450 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4835787>
33. Fournet, A., De Arias, A. R., Charles, B., & Bruneton, J. (1996). Chemical constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(3), 145-149.



34. Fuertes, C. M, Jurado, B, Gordillo, G. C, Negrón, L. P, Núñez, E, Esteban, M, & Távora V, A. (2010). Estudio integral de plantas Biocidas del algodónero. *Ciencia E Investigación*, 13(1), 34–41. <https://doi.org/10.15381/ci.v13i1.3186>
35. Gañán, Nicolas. A. (2014). Extracción y fraccionamiento de biocidas de origen natural mediante el uso de fluidos supercríticos. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional del Sur. Argentina. <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/bitstream/handle/123456789/532/TEISIS%20Ga%c3%b1an%20N.%202014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
36. Godinho, L. S., Aleixo de Carvalho, L. S., Barbosa de Castro, C. C., Dias, M. M., Pinto, P., Crotti, A. E., Pinto, P. L., de Moraes, J., & Da Silva Filho, A. A. (2014). Anthelmintic activity of crude extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 460342. <https://doi.org/10.1155/2014/>
37. Gómez Gómez. Reyna (2010). Manual de prácticas de Química Orgánica. I (1311). Universidad nacional autónoma de México. [http://organica1.org/1311/1311\\_a.pdf](http://organica1.org/1311/1311_a.pdf)
38. Gómez, D. L., & Aguilera, P. A. (1982). Biología de *Pagiocerus frontalis* (Fab.) (Coleoptera: Scolytidae) en la I Región de Chile. [Biology of *Pagiocerus frontalis* (Fab.) Coleoptera: Scolytidae) in región I of Chile.]. *Idesia* (Chile), 6, 79-92.
39. Gonzales Bocángel, P., Mancilla Tafur, A., Rengifo Urbietta, L., & Arévalo Ortiz, F. (2007). Extracción de aceite esencial de *Myrtus communis* L. y estudio de su actividad antimicrobiana.
40. Grajales Muñoz Ofelia. (2005). Apuntes de bioquímica vegetal. Bases para su aplicación fisiológica. Primera edicion. Cuautitlán (México), 23-24.
41. Herrera, O., Ventura, F., Rivera, A., Valenzuela, R., & Condorhuamán, M. (2015). Efecto gastroprotector de *Clinopodium bolivianum* (benth.) Kuntze “inca muña” sobre lesiones gástricas inducidas en ratones. *Ciencia e Investigación*, 18(2), 69-72. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-08072009000300006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072009000300006)
42. Huamani Quinte, William. (2015). Estudio de compuestos bioactivos del aceite esencial de muña (*Minthostachys spicata*), por cromatografía de gases-espectroscopia de masas en tres niveles altitudinales del distrito de Huando. [Tesis para optar título]. Universidad Nacional de Huancavelica.

- <http://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/116/TP%20%20UNH%20AGROIND%20%200030.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
43. Huanqui Franco, Angela. Senaida. (2019). Determinación de la actividad antioxidante y antibacteriana del aceite esencial de *Clinopodium Bolivianum* (Benth.) Kuntze “Cjuñuca” frente a la cepa de *Cutibacterium acnes* ATCC 6919. [Tesis de grado]. Universidad Nacional San Antonio Abad de Cusco. <http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/4628/253T20190606.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  44. Huayllahuaman De la Cruz, Efraín. (2019). Microencapsulación de aceite esencial de menta negra (*Mentha piperita* L.) por atomización. [Tesis para grado]. Universidad Peruana Unión. Facultad de Ingeniería de Alimentos. <https://repositorio.upeu.edu.pe/handle/20.500.12840/2076>
  45. Inocente, O., Sumar, L., & Loaiza, S. A. (2006). Denominación de origen maíz blanco gigante Cusco (No. F70 I5). Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IxisScript=inperupe.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=011477>
  46. Insecticidas botánicos. (2019, agosto 23). EcuRed. Consultado el 03:38, septiembre 19, 2021 en <https://www.ecured.cu/index.php?title=Insecticida&oldid=3520894>
  47. Insecticide Resistance Action Committee. IRAC-Argentina. (2019). Grupos de insecticidas y acaricidas basados en el modo de acción y sitio de acción. Editorial IRAC. Disponible en <https://irac-argentina.org/modos-de-accion/>
  48. INTAGRI 2007. Mecanismo de defensa de las plantas. Serie fitosanidad. Num. 86. Artículo técnico del INTAGRI. Mexico. p.9. <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/mecanismos-quimicos-de-defensa-en-las-plantas?p=registro>
  49. Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>
  50. Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (1999). Plant systematics: a phylogenetic approach. *Ecología mediterránea*, 25(2), 215 [https://ecologia-mediterranea.univ-avignon.fr/wp-content/uploads/sites/25/2017/07/Ecologia\\_mediterranea\\_1999-25\\_201.pdf#page=83](https://ecologia-mediterranea.univ-avignon.fr/wp-content/uploads/sites/25/2017/07/Ecologia_mediterranea_1999-25_201.pdf#page=83).

51. Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802-817.
52. Kumar, S., Wahab, N., & Warikoo, R. (2011). Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(2), 85–88. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60001-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60001-4)
53. Laupa Román, J. M., & Vengoa Valdiglesias, B. A. (2013). Efecto de tres especies de lamiaceas y tubérculos verdeados de papa sobre *Symmetrischema tangolias* (gyen) en condiciones de laboratorio. [Tesis para grado]. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Perú [repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/887/253T20130009.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/887/253T20130009.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
54. León, M. [Instituto de Química-UNAM]. (2020, 25 de junio). Cromatografía de gases. Fundamentos y aplicaciones [video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=ppzDFjQNg30&t=2106s>.
55. Ley que crea el Sistema Nacional para la Calidad y el Instituto Nacional de Calidad – INACAL. Lima, 18 de julio de 2016. Norma legal. Ley N° 30224.
56. Llanos, C., Monteza, C., & Scotto, C. (2012). Determinación de la concentración letal media (CL50) y eficacia del eugenol como anestésico sobre *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(4), 429-440.
57. López Belchí, María y Pascual Villalobos, María Dolores. (2008). Toxicidad volátil de monoterpenoides y mecanismos bioquímicos en insectos plaga del arroz almacenado. [Tesis doctoral]. Universidad de Murcia-España. <http://hdl.handle.net/20.500.11914/1017>
58. Mareggiani, G. (2001). Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de plagas (Costa Rica)* N°.60 P.22-30. <http://hdl.handle.net/11554/6534>
59. Martín, S. G., & Causapé, M. D. C. F. (2010). Los biocidas: incidencia normativa y social: situación en la Comunidad de Madrid. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
60. Martínez M Alejandro. (2003). Aceites esenciales. Universidad de Antioquia. Medellín Colombia. [www.medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA\\_esencias2001b.pdf](http://www.medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf)

61. Mejia Aguirre Yemen. (2012). Efecto biocida de la raíz pulverizada del Barbasco (*Lonchocarpus nicou* (Aubl.) DC.) in vitro e in vivo en el control de garrapatas (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) [Tesis para grado]. Universidad Nacional Agraria de la Selva-Tingo María - Perú. <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/794/TZT560.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
62. Mellado Vargas, O. (2019). Identificación de la estructura química de los metabolitos de *Oenothera multicaulis* por espectroscopia y RMN<sup>1</sup>H. [Tesis maestría] Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa <http://190.119.145.154/handle/UNSA/10833>
63. Montoya Cadavid, Gildardo de Jesús. (2010). Aceites esenciales: una alternativa de diversificación para el eje cafetero. Primera edición. © Universidad Nacional de Colombia sede Manizales. ISBN:9588280264
64. Mostacero, J., & Mejía, F. (1993). Taxonomía de fanerógamas peruanas. CONCYTEC, impreso en Perú.
65. Olivero-Verbel, J., Caballero-Gallardo, K., Jaramillo-Colorado, B., & Stashenko, E. (2009). Repellent activity of the essential oils from *Lippia organoides*, *Citrus sinensis* and *Cymbopogon nardus* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*, Herbst. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud, 41(3), 244-250.
66. Ortega C, Alejandro. (1987). Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. CIMMYT. Centro Nacional de mejoramiento del maíz y trigo. Editor CIMMYT, 1987; ISBN 9686127100, 9789686127102.
67. Ortega, S. (2000). Biología del barrenador del maíz *Pagiocerus frontalis* Fabr. [Tesis Grado] Universidad Nacional del Centro del Perú. Repositorio Institucional UNCP <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/4640/discover?query=1999&submit=Ir>
68. Ortiz Casas B. (2019). Ruta del mevalónico [video]. Disponible en: <https://www.youtube.com/watch?v=8xQ7Y0585pk>
69. Ortuño Sánchez, Manuel Francisco. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición. Aiyana ediciones. España ISBN 8493452211, 9788493452216

70. Owen Tony. (1996). Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna: conceptos básicos. Primera edición. Editorial ©copyright Agilent Technologies 2000.
71. Pavela, R., Kaffkova, K., & KUMŠTA, M. (2014). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from different *Mentha L.* and *Pulegium* species against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *Plant Protection Science*, 50(1).
72. Peredo, H.A., Luna, E., Palou, García A., López, M (2017) Aceites esenciales y método de extracción. Temas seleccionados de ingeniería de alimentos tsia Vol.3 No 1. [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf).
73. Pérez López, Edel (2012). Plaguicidas botánicos: Una alternativa a tener en cuenta. Instituto de investigación de sanidad vegetal. Fitosanidad. La Habana-Cuba. V 16(1), 51-59.
74. Pinedo Arevalo Harvey Pacifico. (2008). Efecto biocida de cuatro extractos de *paullinia clavigera schldl. Var. Bulluta* D.R. Simoson sobre tres artrópodos de Pucallpa [Tesis pre grado]. Universidad Nacional Agraria de la Selva. <https://agronomia.unas.edu.pe/sites/default/files/AGR-549.pdf>.
75. Polatoglu K., Karakoc, TC., Yücel YY., Demirci B., Gören N., Baser KC. (2015). Composition, insecticidal activity and other biological activities of *Tanacetum abrotanifolium* Druce. essential oil. *Revista Industrial Crops and Products*. Vol Pages 7-14, <http://www.scopus.com/> *Tanacetum abrotanifolium* Druce. essential oil
76. Ponce, G., Cantú, P. C., Flores, A., Badii, M., Zapata, R., López, B., & Fernández, I. (2006). Modo de acción de los insecticidas. *Revista salud pública y nutrición*, 7(4). <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=13294>
77. Ramírez, J. E., Gómez, M. I., Cotes, J. M., & Núñez, C. E. (2010). Efecto insecticida de los aceites esenciales de algunas lamiáceas sobre *Tecia solanivora* Povolny en condiciones de laboratorio. *Agronomía Colombiana*, 38(2), 255-263.
78. Renault C.R., Philogene B.R.J., Vincent Ch. (2004). Biopesticidas de Origen Vegetal. Madrid España: Ediciones Mundi-Prensa. <http://www.sidalc.net/cgi->

bin/wxis.exe/?IsisScript=FAUSAC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=026386

79. Rodríguez Enríquez, R. (2008) Caracterización de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus L.*). [tesis para maestría]. Instituto Potosino de investigación científica y tecnológica. <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/704/3/TMIPICYTR6C32008.pdf>
80. Rodríguez Torres, L. M. (2019). Actividad insecticida del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia Lag.*) sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*). <http://tesis.unap.edu.pe/handle/UNAP/13664>
81. Rodriguez Alvarez, M., Alcaraz Melendez, L., Real Cosio, S. (2012). Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. Edit. Centro de investigaciones Biológicas del Nor oeste, S.C. La Paz, Baja California Sur, Mexico. 38p.
82. Rojas Roque, J.C. (2007). Evaluación de aceites esenciales naturales e insecticida Químico en el control del gorgojo de Los Andes (*Premnotrypes spp.*) en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum ssp. andigena*). [Tesis doctoral]. Universidad Mayor de San Andres. La Paz-Bolivia. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=cidab.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=000086>.
83. Rueda, A., & de la Vega, S. (2007). Problema Bioquímico. Revista de Educación Bioquímica, 26(4), 142-143. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=37762>
84. Ruitón, C. M. F., & Chipana, Y. M. (2001). Estudio comparativo del aceite esencial de *minthostachys mollis* (kunth) griseb "muña" de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. Ciencia e Investigación, 4(1), 23-39.
85. Ruiz, Candy, Díaz, Camilo, & Rojas, Rosario. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú, 81(2), 81-94. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2015000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000200002&lng=es&tlng=es).
86. Sánchez, M. F. O. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. aiyana ediciones.

87. Santana, M. Martín, M. (2013). Conversión de recursos biomásicos de PAMC para la Obtención de biopesticidas. Departamento de Investigación, Desarrollo e Innovación. Kimitec Group. C/Santa [Arc PDF]. <http://www.valuepam.eu/files/socios/andanatura/Estudio%20Diversificacion%20Uso%20DEF.pdf>
88. Santos Benavides, j. M. (2013). Evaluación del contenido de L-mentol, L-mentona y L-acetato de mentilo en el aceite esencial de *Mentha piperita* L. [ tesis para grado] Universidad Católica de Santa María de Arequipa [https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UCSM\\_bada76a2d6708de1140337d4f9a3621f](https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UCSM_bada76a2d6708de1140337d4f9a3621f)
89. Schmidt-Lebuhn, A. N. (2008). Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 118(3), 343-353. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874108002894>
90. Solís Quispe, L., Tomaylla Cruz, C., Callo Choquelvilca, Y., Solís Quispe, A., Rodeiro, I., Hernández, I., ... & Pino, J. A. (2016). Chemical composition, antioxidant and antiproliferative activities of essential oil from *Schinus areira* L. and *Minthostachys spicata* (Benth.) Epl. grown in Cuzco, Peru. *Journal of Essential oil rEsEarch*, 28(3), 234-240.
91. Solís Quispe, L., Pino Alea J.A., Solís Quispe J., Tomaylla Cruz C., Aragón Alencastre L. (2018). Plantas y Aceites esenciales como insecticidas. Una alternativa de manejo ecológico. Primera edición. Impreso UNSAAC.ISBN:9786124236136.
92. Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
93. Tapia Zurita, O. G. (2013). Control orgánico del gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*), en semillas almacenadas de Chulpi (*Zea mays* var *rugosa*) con ajeno" Santa María"(*Parthenium hysterophorus*) y romero (*Rosmarinus officinalis*). Quito-Ecuador 2012 (Bachelor's thesis).
94. Tapondjou, A. L., Adler, C. F. D. A., Fontem, D. A., Bouda, H., & Reichmuth, C.H. (2005). Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research*, 41(1), 91-102.

95. Tejada Rodríguez Manuel Ángel. (1980) Ensayos químicos en el aceite esencial de *Minthostachys spicata* (Bent.) Epl. [Tesis para grado]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco - Perú. <http://repositorio.unsaac.edu.pe/>
96. Tepe Bektas, Sihoglu-Tepe Arzuhan, Daferera Dimitra, Polissiou Moschos, Sokmen Atalay. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. Food Chemistry. 103(3), 766–770.
97. Tomaylla Cruz, C. (2016). Composición química y efecto insecticida de los aceites esenciales de *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *Vulgaris* (Ehrh) Briq-sobre *Epitrix* spp.
98. Vargas, A., & Bottia, E. (2008). Estudio de la composición química de los aceites esenciales de seis especies vegetales cultivadas en los municipios de Bolívar y el peñón–Santander, Colombia. Proyecto de grado, Universidad Industrial de Santander Facultad de Ciencias, Escuela de Química.
99. Vivanco, Jorge. M., Cosio, Eric., Loyola-Vargas, V. M., & Flores, Hector. E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y ciencia, 341(2), 68-  
<https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/vivanco-et-al-2005.pdf>
100. Walton, Harnold. Frederic y Reyes J. (2021). Análisis químico e instrumental moderno. Primera edición. Editorial Reverté. ISBN:9788429175196.
101. Yapuchura Mamani, Roxana. (2010). Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) E inca muña (*Clinopodium bolivianum* (benth.) Kuntze).[Tesis de maestría].Universidad Nacional Agraria La Molina.
102. Zegarra Vílchez Graciela Herminia. (2010). Actividad deterrente y acaricida de principios activos de quinuas amargas, aceites esenciales de tarwi, muña y molle [Tesis de Licenciatura]. Lima Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú.
103. Zygadlo Julio A., Maestri Damian M., Lamarque Alicia L., Guzmán Carlos A., Velasco-Negueruela Arturo, Perez-Alonso María J., García-Vallejos María C. y Grosso Nelson R. (1996). Essential Oil Variability of *Minthostachys verticillata*. Biochemical Systematics and Ecology. Vol. 24, No. 4, pp. 319-323.
104. Tomaylla Cruz, C. (2016). Composición química y efecto insecticida de los aceites esenciales de *Tanacetum vulgare* Linnaeus y *Mentha x piperita* var. *Vulgaris* (Ehrh) Briq-sobre *Epitrix* spp.



# **ANEXOS**



***Figura 35: Lugar de muestreo en la comunidad de Ccorao distrito de San Sebastián***



***Figura 36: Lugar de muestreo en la comunidad de Ccorao distrito de San Sebastián***



**Figura 37: Muestrando la especie biológica *Minthostachis spicata***



**Figura 38: Muestrando la especie biológica *Clinopodium bolivianum*.**



**Figura 39. Extrayendo aceite esencial de la especie biológica *Mentha x piperita* var. *citrata* (Ehrh.) Briq**



**Figura 40: Extrayendo aceite esencial de la especie biológica *Tanacetum Vulgare***



**Figura 41: Extrayendo aceite esencial de la especie biológica *Minthostachys spicata* (Benth) Epling**



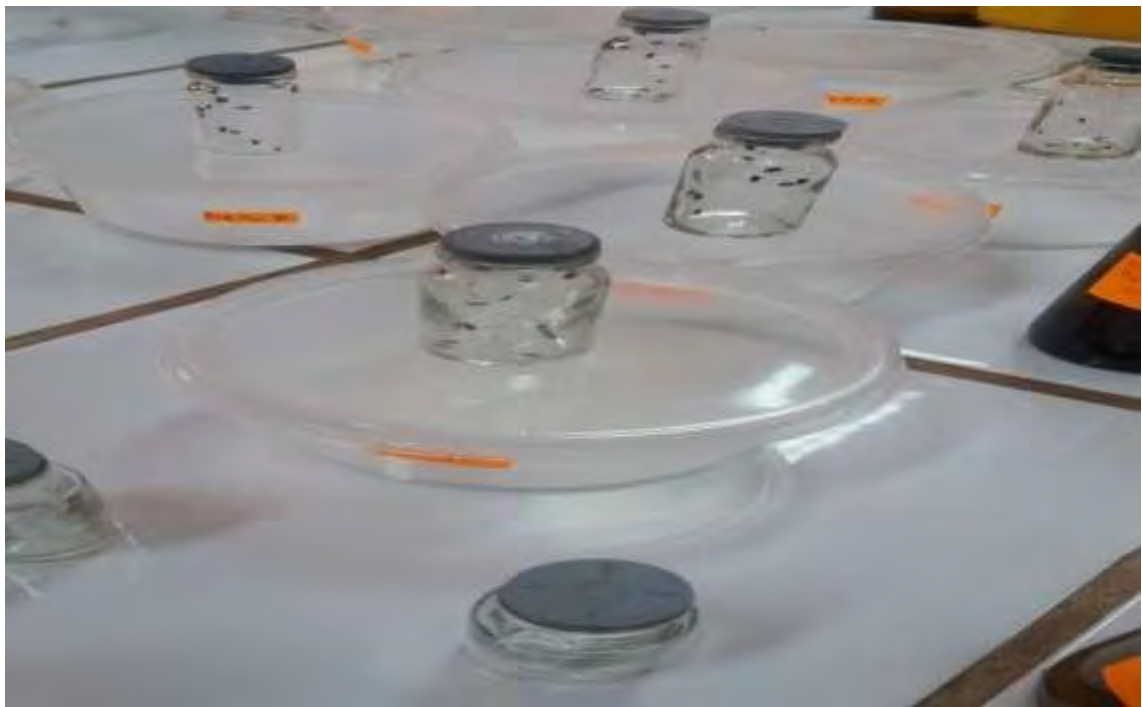
**Figura 42: Adaptación y crianza de los insectos *Pagiocerus Frontalis***



***Figura 43: Selección de la muestras infectadas con *Pagiocerus Frontalis****



***Figura 44: Preparación de las diferentes concentraciones de aceites esenciales.***



**Figura 45: Separación de los veinte *Pagiocerus frontalis***



**Figura 46: Aplicación de los aceites esenciales en los insectos**



**Figura 47: Aplicación de los aceites esenciales en los insectos**



**Figura 48: Observación de los insectos a dos horas con AE de *Minthostachys spicata***

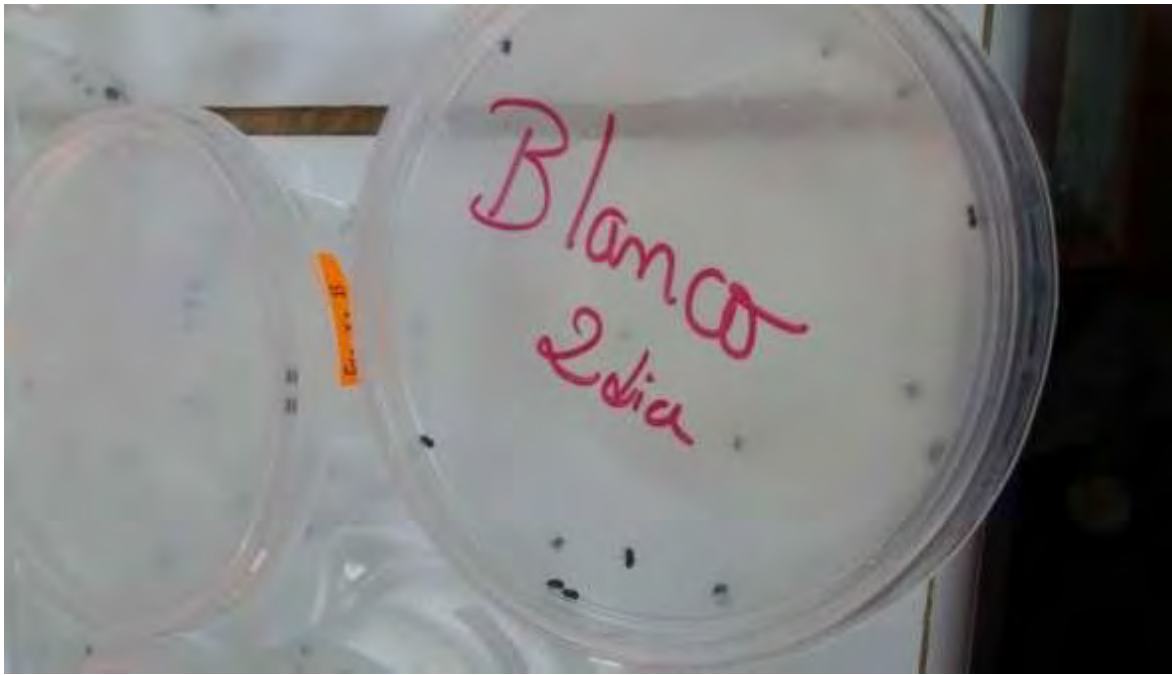




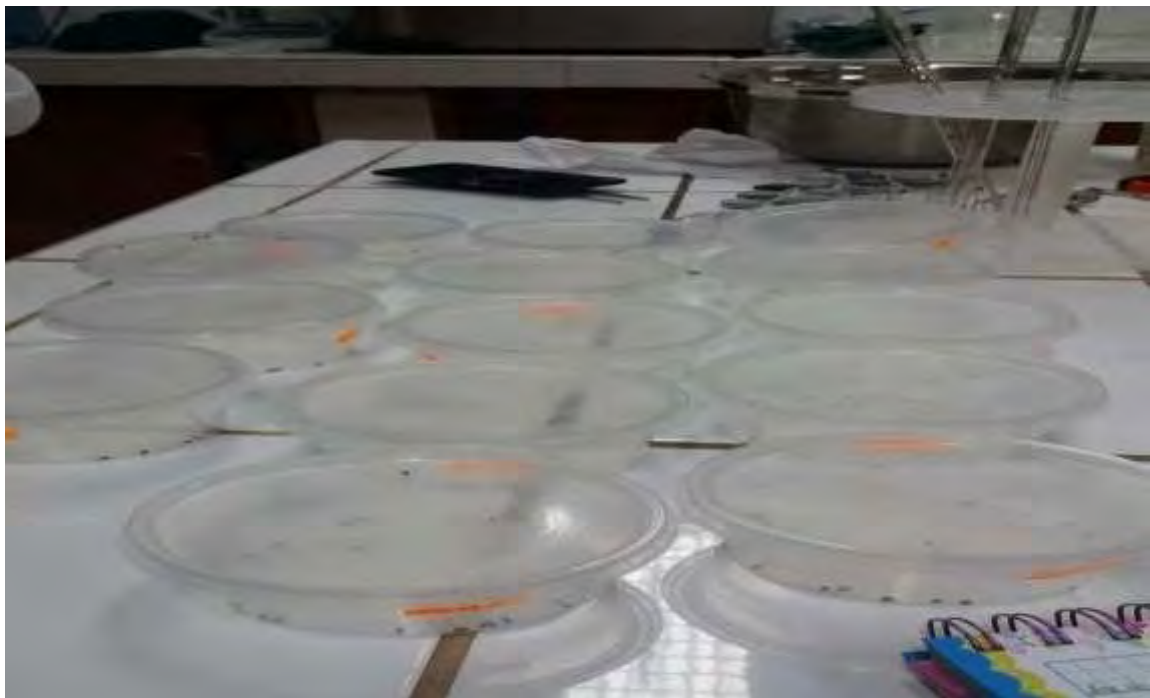
***Figura 49: Observando que el AE se expanda durante 12horas***



***Figura 50: Observando los resultados del AE se expanda durante 12horas***



**Figura 51: Observando a las 24 horas el blanco sin AE.**



**Figura 52: Observando la mortalidad del 100% de *Pagiocerus frontalis*.**