

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

**DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE**



TESIS

**ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE PAMPA ANÍS
(*Tagetes filifolia* Lag.) SOBRE EL GORGOJO DEL MAÍZ (*Pagiocerus frontalis*)**

PRESENTADA POR:

LELIA MARÍA RODRIGUEZ TORRES

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

PUNO, PERU

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO



DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO
AMBIENTE

TESIS

ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE PAMPA ANÍS
(*Tagetes filifolia* Lag.) SOBRE EL GORGOJO DEL MAÍZ (*Pagiocerus frontalis*)

PRESENTADA POR:

LELIA MARÍA RODRIGUEZ TORRES

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE



Dr. WALTER ALEJANDRO ZAMALLOA CUBA

PRIMER MIEMBRO



Dr. FELIPE SANTIAGO AMACHI FERNANDEZ

SEGUNDO MIEMBRO



Ph.D. JOSÉ LUIS BAUTISTA PAMPA

ASESOR DE TESIS



Ph.D. BERNARDO ROQUE HUANCA

Puno, 27 de diciembre de 2019

ÁREA: Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.

TEMA: Actividad Insecticida del Aceite esencial de Pampa Anís sobre el gorgojo del maíz.

LÍNEA: Industrialización de Productos Andinos.

DEDICATORIA

A mis queridos padres: Claudio y Lelia.

*A mis dos pequeños hijos: José Eduardo y Fabian Andre,
tesoros, motivación e inspiración de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fortaleza y el espíritu para seguir adelante día a día.

Con todo mi amor a mis papás, grandes ejemplos a seguir, por sus consejos, apoyo incondicional, por su cariño y motivarme siempre a luchar por mis ideales.

Un agradecimiento muy especial a mi Asesor Ph.D. Bernardo Roque Huanca y Co Asesor Dr. Leoncio Solís Quispe, por su acompañamiento, asesoría y experiencia, me permitieron desarrollar y ayudaron al término satisfactorio de este trabajo.

A los dictaminates: Dr. Walter Alejandro Zamalloa Cuba, Dr. Felipe Santiago Amachi Fernandez y Ph.D. José Luis Bautista Pampa; quienes con su tiempo brindado, correcciones, observaciones y recomendaciones, ayudaron a mejorar el presente trabajo de investigación.

Gracias a los míos. A Elmer. A mis hermanos: Ivan, Marlene, Roger, Zeila y Jorge; quienes siempre están en todo momento apoyando, aconsejando y brindándome su cariño.

Al Dr. Cs. Jorge A. Pino, quien con su experiencia me permitió mejorar el presente trabajo. A mis amigos, Jean Piter Quispe, Angela, Ciro, y Jacqueline, quienes me apoyaron en algún momento en el desarrollo del trabajo.

Así mismo expreso mis agradecimientos a todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron con el desarrollo de mi tesis.

A todos expreso mi gratitud y reconocimiento.

INDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURA	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I**REVISIÓN DE LITERATURA**

1.1 Marco Teórico	3
1.1.1 Aspectos botánicos de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	3
1.1.2 Especie <i>Pagiocerus frontalis</i>	5
1.1.3 Especie <i>Zea maíz</i> L.	10
1.1.4 Aceite esencial	12
1.1.5 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	24
1.1.6 Características espectroscópicas de UV e IR	25
1.1.7 Insectos en almacenes de granos	28
1.1.8 Métodos de control de plagas en granos almacenados	29
1.2 Antecedentes	34

CAPÍTULO II**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

2.1 Identificación del problema	41
2.2 Enunciados del problema	43
2.3 Justificación	43
2.4 Objetivos	45
2.4.1 Objetivo general	45
	iii

2.4.2	Objetivos específicos	45
2.5	Hipótesis	45
2.5.1	Hipótesis general	45
2.5.2	Hipótesis específicas	45

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1	Lugar de estudio	47
3.2	Población	47
3.3	Muestra	47
3.4	Método de investigación	47
3.4.1	Materiales	50
3.5	Descripción detallada de métodos por objetivos específicos	53
3.5.1	Determinación del rendimiento de obtención del aceite esencial	53
3.5.2	Caracterización de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial	55
3.5.3	Determinación del perfil del espectro UV-Vis y espectro IR del aceite esencial	59
3.5.4	Determinación de la composición química del aceite esencial por cromatografía de gases–espectrometría de masas	60
3.5.5	Determinación de la concentración letal media sobre el gorgojo del maíz (<i>Pagiocerus frontalis</i>)	61

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Determinación del rendimiento de obtención del aceite esencial de Pampa Anís (<i>Tagetes filifolia</i> Lag.) - método de hidrodestilación con trampa de Clevenger	65
4.2	Caracterización de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del AE	66
4.3	Determinación del perfil del espectro UV-Vis y del espectro IR del AE	69
4.4	Determinación de la composición química del aceite esencial por cromatografía de gases-espectrometría de masas	72
4.5	Determinación de la concentración letal media sobre el gorgojo del maíz (<i>Pagiocerus frontalis</i>)	81

4.6 CL ₅₀ y CL ₉₀ de la actividad insecticida del AE de <i>T. filifolia</i> sobre <i>P. frontalis</i> , hasta 72 horas de exposición.	88
4.7 Comparación del efecto insecticida de las concentraciones del AE.	89
CONCLUSIONES	95
RECOMENDACIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	98
ANEXOS	110

INDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Grupos de insecticidas, modo de acción	31
2. Diseño de la investigación	49
3. Disolventes para las pruebas de solubilidad	56
4. Condiciones para determinar el efecto insecticida	63
5. Porcentaje de extracción del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	65
6. Características organolépticas del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	66
7. Pruebas de solubilidad del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	67
8. Características fisicoquímicas del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	68
9. Composición del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	73
10. Compuestos mayoritarios del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	74
11. Compuestos mayoritarios del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	80
12. Porcentaje de mortalidad de <i>P. frontalis</i> expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>T. filifolia</i> , durante las horas de control	81
13. CL ₅₀ del AE de <i>T. filifolia</i> y límites de confianza inferior y superior para <i>P. frontalis</i> durante las 2 y 72 h	83
14. CL ₉₀ del AE de <i>T. filifolia</i> y límites de confianza inferior y superior para <i>P. frontalis</i> durante las 2 y 72 h	86
15. CL ₅₀ y CL ₉₀ de la actividad insecticida del AE de <i>T. filifolia</i> sobre <i>P. frontalis</i> , hasta 72 horas de exposición	88
16. Resultados descriptivos del efecto insecticida de <i>T. filifolia</i> en porcentaje de mortlidad, hasta las 72 horas de exposición de las diferentes concentraciones del AE	89
17. Análisis de varianza (ANOVA), del efecto insecticida del AE <i>T. filifolia</i>	90
18. Prueba de Tukey para el efecto insecticida del AE <i>T. filifolia</i>	91

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. Pampa Anís (<i>Tagete filifolia</i> Lag.)	4
2. Gorgojo del maíz (<i>Pagiocerus frontalis</i>).	6
3. Ciclo y Estadios de Desarrollo del Gorgojo del maíz (<i>Pagiocerus frontalis</i>)	8
4. Grano de maíz atacado por <i>Pagiocerus frontalis</i> .	9
5. <i>Zea mays</i> L.- Maíz blanco gigante del Cusco. Secado del maíz .	10
6. Estructuras principales de un grano de maíz	11
7. Componentes mono- y sesquiterpénicos presentes en distintos aceites esenciales.	14
8. Componentes fenilpropiónicos de aceites esenciales	14
9. Clasificación de los aceites esenciales	16
10. Resumen biosintético de los terpenos	17
11. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno	18
12. Esquema de destilación por arrastre de vapor	20
13. Cromatografo de gases	25
14. Espectroscopia UV-Vis	26
15. Hidrodestilación con trampa de Clevenger	54
16. Espectro UV-Vis de aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	69
17. Espectro FTIR- ATR del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	70
18. Espectro FTIR- ATR del aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	71
19. Perfil cromatográfico de GC del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	75
20. Perfil cromatográfico de GC del Aceite Esencial de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	76
21. Porcentaje de mortalidad de <i>Pagiocerus frontalis</i> vs. tiempo de exposición	82
22. Porcentaje de mortalidad de <i>Pagiocerus frontalis</i> vs. concentración	82
23. CL ₅₀ durante el tiempo de exposición de 2 y 72 h del AE de <i>Tagetes filifolia</i> Lag. sobre <i>Pagiocerus frontalis</i> al 95 % de intervalo de confianza	84
24. CL ₉₀ durante el tiempo de exposición de 2 y 72 h del AE de <i>T. filifolia</i> sobre <i>P. frontalis</i> al 95 % de intervalo de confianza	86
25. Efecto insecticida de <i>T. filifolia</i> – media del % de mortlidad versus concentración del AE, hasta las 72 horas de exposición	92

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Certificación Del Herbario Vargas – Pampa Anís (<i>Tagetes filifolia</i> Lag.)	111
2. Identificación Del Gorgojo Del Maíz (<i>Pagiocerus frontalis</i>)	112
3. Espectroscopia de masas del aceite esencial de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	113
4. Determinación De La Actividad Insecticida - Conteo De Gorgojos Muertos	114
5. Datos Para La Determinación De La CL ₅₀ Y CL ₉₀ Mediante Probit	116
6. Datos Para La Determinación De La CL ₅₀ Y CL ₉₀ Mediante Probit-72 Horas	124
7. Fotográfico	125

ABREVIATURAS

Abs	: Absorbancia.
AE	: Aceite esencial.
FTIR- ATR	: Espectrómetro Infrarrojo con Transformadas de Fourier – Reflectancia Total Atenuada.
IR	: Infrarrojo.
msnm	: Metros sobre el nivel del mar.
OMS	: Organización Mundial de la Salud.
P	: Peso.
pH	: Potencial de Hidrógeno.
RT	: Tiempo de retención
UV-Visible	: Ultravioleta visible.
V	: Volumen.

RESUMEN

Los aceites esenciales son mezclas volátiles de terpenos obtenidas de plantas, muchos de estos productos poseen propiedad insecticida, siendo una alternativa para la eliminación de insectos depredadores de granos almacenados, constituyendo una tecnología limpia dentro del manejo ecológico de plagas. El deterioro en el almacenamiento de granos como es el maíz produce una gran pérdida y entre las causas están los insectos como el gorgojo *Pagiocerus frontalis*. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad insecticida del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.) sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*). La metodología utilizada en la extracción del aceite esencial (AE), fué por hidrodestilación con trampa de Clevenger; su composición química por cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-EM) y para la determinación del efecto insecticida se halló la concentración letal media CL₅₀ y CL₉₀, aplicándose el método de impregnación de papel, evaluándose las concentraciones de 0.1; 0.5; 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10 % de AE, durante 72 h de exposición. La CL₅₀ sobre *P. frontalis* fue 0.61% (v/v) y la CL₉₀ fue 1.96% (v/v) (P< 0.05). A partir de los resultados se concluye que el aceite esencial de *T. filifolia* puede convertirse en una posible alternativa potencial a los insecticidas sintéticos, en el manejo de *P. frontalis*.

Palabras clave: Aceite esencial, gorgojo del maíz, insecticida natural, *Pagiocerus frontalis*, Pampa anís, *Tagetes filifolia*.

ABSTRACT

Essential oils are volatile mixtures of terpenes obtained from plants, many of these products that possess insecticidal property, being an alternative for the elimination of predatory insects of stored grains, constituting a clean technology within the ecological management of pests. The damage in the storage of grains such as corn produces a great loss and among the causes are insects such as the *Pagiocerus frontalis* weevil. The objective of the present investigation was to evaluate the insecticidal activity of the essential oil of Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.) On the corn weevil (*Pagiocerus frontalis*). The methodology used in the extraction of the essential oil (AE) was by hydrodistillation with Clevenger trap; its chemical composition by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) and for the determination of the insecticidal effect the average lethal concentration CL50 and CL90 was found, applying the paper impregnation method, evaluating the concentrations of 0.1; 0.5; 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 10% of AE, during 72 hours of exposure. The LC₅₀ on *P. frontalis* was 0.61% (v / v) and the LC90 was 1.96% (v / v) (P <0.05). From the results it is concluded that the essential oil of *T. filifolia* can become a possible potential alternative to synthetic insecticides, in the management of *P. frontalis*.

Key words: Essential oil, corn weevil, natural insecticide, *Pagiocerus frontalis*, Pampa anise, *Tagetes filifolia*.

INTRODUCCIÓN

En la sierra peruana, el maíz es uno de los granos andinos de mayor consumo del poblador, es una fuente de alimento de origen inca, esta cultura estableció su economía y alimentación en base al maíz, siendo éste uno de los motivos principales por la que se le incluyó en la mayoría de sus ritos y festividades. Fuente importante de nutrientes como carbohidratos y proteínas, que contribuye en la seguridad alimentaria de la población el cual es almacenado después de la cosecha. La principal causa de pérdidas de granos almacenados es por causa de insectos, causando pérdidas de calidad en el grano, del valor nutritivo, de rendimiento, disminución del valor comercial; uno de los insectos relacionados en este deterioro en el almacenamiento de granos como es el maíz, es *P. frontalis*.

Para evitar el daño causado por *P. frontalis* y otros insectos en el almacenamiento del maíz, existen varios métodos para su manejo, y el de mayor uso es la aplicación de insecticidas químicos, frecuentemente utilizados sin justificación ni la orientación de personal capacitado. Los insecticidas convencionales son muy tóxicos, su uso frecuente ha llevado a la presencia de residuos tóxicos en el medio ambiente y en alimentos; causan resistencia en los insectos, pudiendo también matar a muchos animales, por lo que se les llama “biocidas” impactando en el medio ambiente, con efectos negativos en la salud humana.

El empleo de aceites esenciales extraídos de plantas es una opción importante para controlar y eliminar insectos depredadores de los cultivos y de granos almacenados, causantes de fuertes daños a la agricultura y en el almacenamiento, constituyendo una tecnología limpia dentro del manejo ecológico de plagas. El género *Tagetes*, incluye especies con propiedades medicinales y sus aceites medicinales tienen actividad insecticida, particularmente *T. filifolia* (Asteraceae) mostró diferente grado en su actividad insecticida entre diferentes grupos de insectos (Serrato et al., 2005; Serrato, 2008; camarillo et al., 2009). Los bajos costos de producción del aceite esencial de esta especie (Serrato, 2003) y su origen orgánico, representan una opción económica y ecológica importante comparada con insecticidas de origen sintético, los cuales afectan y dañan a la salud humana, son fuentes de contaminación ambiental y pueden ser causa de inestabilidad de los sistemas de producción agrícolas.

Estos problemas han destacado la necesidad de desarrollar alternativas nuevas y seguras basadas en la reducción del uso de insecticidas sintéticos tóxicos y promover el uso de nuevas técnicas y productos; por ello se planteó el presente trabajo de investigación, donde se determinó la composición química, características fisicoquímicas y el efecto insecticida sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*) del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.), muestra procedente del Departamento de Cusco-Perú.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco Teórico

1.1.1 Aspectos botánicos de *Tagetes filifolia* Lag.

La muestra sometida a diagnosis en base al análisis morfológico y comparación con ejemplares del Herbario Vargas (CUZ), de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco, en concordancia con el Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group. APG IV -2016), presenta la siguiente posición taxonómica:

Reino.....	Vegetal
División.....	Magnoliophyta (angiospermas)
Clase.....	Magnoliopsida
Subclase.....	Magnoliidae
Superorden.....	Asteranae
Orden.....	Asterales
Familia.....	Asteraceae.
Género.....	<i>Tagetes</i>
Especie.....	<i>Tagetes filifolia</i> Lag.

Muestra identificada por: M.Cs. Blgo. Alfredo Tupayachi Herrera – Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. (Anexo 1)

Sinonimias: *Diglossus variabilis* Cass., *Solenotheca tenella* Nutt., *Tagetes anisata* Lillo., *T. congesta* Hook. & Arn., *T. dichotoma* Turcz., *T. foeniculacea* Popp. Ex DC., *T. fragrantissima* Seesé & Moc., *T. multifida* DC., *T. pauciloba* DC., *T. pseudomicrantha* Lillo., *T. pusilla* Kunth., *T. scabra* Brandege., *T. Silenoides* Meyen & Walp.

Nombres comunes: “Pampa anís”, “Tuna anís”, “Anís de campo”, “Anís serrano”.

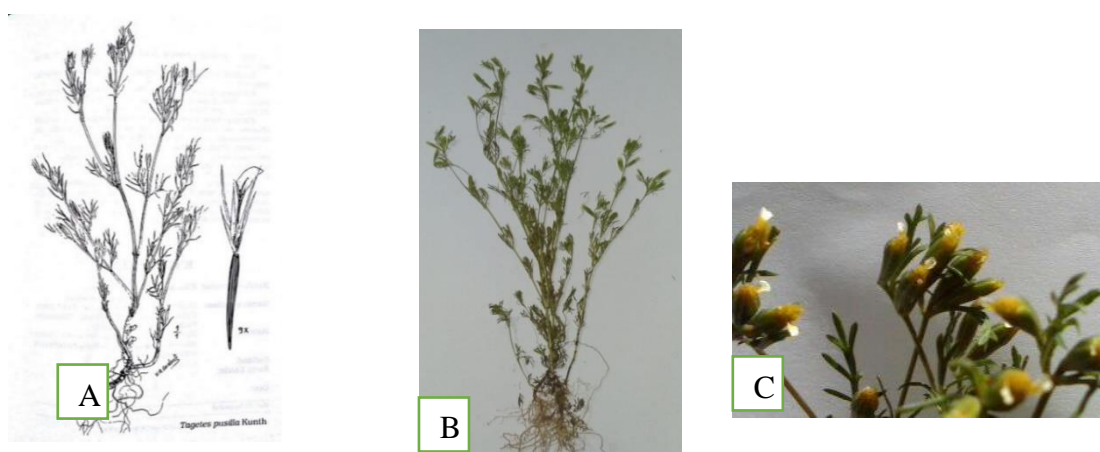


Figura 1. Pampa Anís (*Tagete filifolia* Lag.). B. Planta entera recolectada. C.

Flores de Pampa anís

Fuente: Roersch (1994) Plantas medicinales del Sur Andino del Perú.

Ubicación: *T. filifolia* es una hierba aromática, nativa de América, y cuya extensión abarca países desde México hasta Argentina; en el Perú se encuentra en Amazonas, Ancash, Cajamarca, Cusco, Huánuco, La Libertad y Lambayeque. Villarreal (2003).

Familia compositae: tribu tageteae.

Características: hierba de 10 a 30 cm, hasta de 50 cm de alto; tiene olor a anís, de ahí su nombre, siendo una especie muy diferente, se le encuentra en las lomas, pendientes medio húmedas.

Botánica, Etnobotánica: Es conocido en muchos países de América (México, Venezuela, Bolivia, Ecuador). Nombres comunes son anisillo, pampa anís, anís camarron, tuna anís, supiquehua, sacha-anís, allpa anís, anís del campo, tomillo, k'ita anís (anís silvestre). El sabor es semejante al anís (*Pimpinella anisum*), su uso principal es carminativa. (Roersch, 1994)

Calidad: Cálida

Ciclo de vida: Planta anual, herbácea, erecta

Partes usadas: Ramas

Tallo: Generalmente muy ramificado, estriado, a veces con pelillos.

Hojas: Todas opuestas o a veces las superiores alternas, hasta de 3 cm de largo, divididas en segmentos muy delgados que a su vez pueden estar divididos en segmentos, pueden parecer a agujas de un pino; a veces con pelillos.

Inflorescencia: Cabezuelas generalmente numerosas sobre pedúnculos de 0.5 a 2 cm de largo o a veces sésiles. (Turner, 1996)

Composición curativa: AE (anetol y otros componentes).

Usos: Dolor de estómago, cólicos y empacho, se reposan las ramas y se toma el mate hasta sentir mejoría. También se puede hervir en licor juntamente con “cilandro” seco, este preparado tomar al instante. · Diarrea por frío, hacer reposar la planta y tomar el mate. · Ventosidad, tomar en infusión las ramas · Mal aliento, las hojas se mastican en ayunas. Roersch (1994), dentro de sus usos medicinales señala que es carminativo, estomáquico, galactagogo, enemagogo, emoliente, antisifilítica, diaforético, para cólico, antihelmíntico y diurético.

1.1.2 Especie *Pagiocerus frontalis*

Pagiocerus frontalis, conocido por los agricultores como “gorgojo barrenador andino de los granos del maíz”, es considerado como una plaga clave que ataca al maíz almacenado y que tiene marcada preferencia por el maíz amiláceo. Los insectos causan contaminación del grano con partes de sus cuerpos y excrementos, niveles mayores a 9 insectos por kilogramo califican un lote de granos como infestado (Norma EUA) (Bolívar, 2007).

POSICIÓN TAXONÓMICA: La clasificación actual de los gorgojos se encuentra en revisión continua, debido a los nuevos personajes proporcionada por la morfología de adultos y larvas, la adición de datos moleculares y el análisis de esta información (Marvaldi y Lanteri, 2005):

Orden:	Coleóptera
Suborden:	Polyphaga
Superfamily:	Curculionoidea
Familia:	Curculionidae
Subfamilia:	Scolytinae
Tribu:	Hylesinini: Bothrosternina
Género:	Pagiocerus
Especie:	<i>Pagiocerus frontalis</i> (Fabricius, 1801)

Muestra identificada por: Dr. Erick Yábar Landa – Laboratorio de Entomología - Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (Anexo 2).



Figura 2. Gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*).

Fuente: Lauderdale, Broward County, Florida, USA Size: 2 mm. Iowa State University-Department of Entomology

La familia Curculionidae es numerosa de la cual se han descrito aproximadamente 40,000 especies y a la que pertenecen los llamados gorgojos, picudos o trompudos. Sus miembros pueden ser encontrados en diferentes hábitats, como barrenadores o minadores de plantas, tallos, raíces, semillas, granos que ya han sido cosechados, madera, etc. (Craigmead, 1931).

Descripción: Pequeño gorgojo que alcanza una longitud de 2.5 mm y 1.5 mm de ancho. Es de color marrón oscuro; su cabeza tiene una trompa corta, con poca vellosoidad en el área dorsal. Su larva alcanza una longitud de 3 mm, es de color blanco amarillento, sin pies y ligeramente curvada (Wille, 1952). El período de desarrollo, desde huevo a adulto es en promedio de 32 ± 2 días, a la temperatura promedio de 24.02 °C y 82.67% de humedad relativa. 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.

Distribución: Su distribución 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, Ecuador, Chile, y Colombia. *Pagiocerus frontalis* Fabr., se reporta en la región de montaña en altitudes entre 1500 y 2600 m con una temperatura promedio de 14 a 18.5 ° C (Castro y Mejía 2011). En el Perú fue descubierta como plaga en 1930 siendo denominado como el barrenador del maíz de la sierra (Wile, 1952)

Estadios de desarrollo de *Pagiocerus frontalis*:

Huevo: el huevo presenta una forma ovoidal, con corion flexible, pegajoso y transparente; superficie lisa con una coloración blanco opalescente, sus dimensiones varían en un promedio de 0.52 – 0.10mm de largo por 0.39-0.05 mm de ancho.

Larva: de tipo escarabeiforme con una coloración blanca, excepto la cabeza que es amarillenta, con segmentos torácicos más desarrollados que los abdominales, patas torácicas ausentes, miden en promedio 1.65 a 0.49 mm de largo por 0.81 a 0.31 mm de ancho.

Pupa: mide promedio 2.3 a 0.9 mm de largo y 1.06 a 0.32 mm de ancho, presenta una coloración blanquecina que posteriormente va oscureciendo en los ojos, mandíbulas y patas (Gomez y Aguilera, 1982).

Adulto: El gorgojo adulto mide 2,5 mm de largo y 1,5 mm de ancho; es de color marrón oscuro; su cabeza tiene una trompa corta, con escasas vellocidades en el lado dorsal (Wile, 1952).

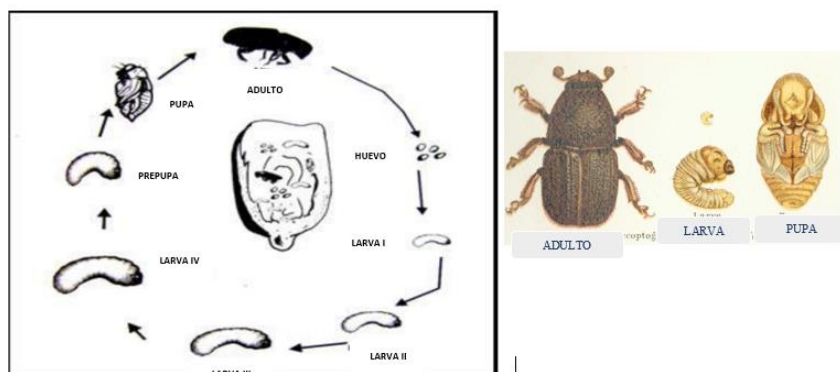


Figura 3. Ciclo y Estadios de Desarrollo del Gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*)

Fuente: Ortega (1999) Dictionnaires eta Encyclopédies sur “Academic”

Ciclo biológico: La duración mínima del ciclo de vida de huevo a adulto en el maíz suave es de 25 días a una temperatura de 23 °C con una humedad relativa del 90 al 60 %, después de un período de preoviposición de 2 y 2.3 días. El período más largo de supervivencia de un individuo adulto fue de 223 días en maíz suave (Wendt &Schulz).

Ataque Característico de *P. frontalis*: Los gorgojos adultos infestan tanto el grano almacenado como las mazorcas maduras, en el campo o durante el secado del maíz. Pueden atravesar la cubierta de la mazorca y taladrar el olote. La característica principal del ataque de este insecto es la gran cantidad de polvillo parecido a la harina que los adultos producen al taladrar y alimentarse de los granos. Los granos dañados se identifican fácilmente porque están cubiertos de una película de polvillo. En infestaciones severas los adultos pueden llegar a dañar las estructuras de madera o los contenedores de plástico. Es considerada como la plaga que más pérdidas y daños causa. Las hembras depositan sus huevos en perforaciones que hacen en el grano y luego los cubren con un mucílago transparente. Una hembra produce hasta 250 huevos en su vida reproductiva. Las larvas se alimentan del endospermo del grano, hasta que se transforman en pupa. Cuando se convierten en adultos, perforan el grano y salen al medio ambiente. Su ciclo de vida biológico desde huevo hasta insecto adulto se realiza en 40 días en el verano.

P. frontalis es un insecto fitófago, ataca al maíz cuando la mazorca aún se encuentra en la planta y el grano ha perdido su consistencia lechosa. Hace un pequeño orificio

con sus poderosas mandíbulas ayudado por sus fuertes patas protorácicas. Perfora el grano del cual se alimenta, preferentemente en la zona comprendida entre el extremo basal y el raquis de la mazorca, que es, por lo general, más blanda. La hembra, al llegar al embrión del grano construye pequeñas galerías secundarias donde ovipone un huevo en cada una de ellas. El daño ocasionado por la larva, en un comienzo, es imperceptible desde el exterior, pero a medida que avanza el desarrollo larvario, el grano se va tornando transparente por el consumo casi total del endospermo (Gómez & Aguilera, 1982)

Los granos dañados se encuentran contaminados de excrementos y restos de la exuvia y de los insectos muertos. Por lo tanto, los granos presentan un olor desagradable que disgusta el consumo.



Figura 4. A. Grano de maíz atacado por *Pagiocerus frontalis*. B. Mazorcas de maíz blanco amiláceo atacado por *P. frontalis*.

Fuente: Castro y Mejía (2011)

Control: Inicia en el campo, con el recojo o cosecha adelantado de las mazorcas con infestaciones iniciales y luego eliminarlas, con el cual se evita la infestación hacia los tendales y almacén. Al momento de recoger las mazorcas en el tendal, aquellas ubicadas con infestación deben ser separadas e eliminadas. Es preferible guardar granos de maíz desgranado, porque las infestaciones y los daños no progresan con facilidad (Catalan, 2012). **El control químico:** está centrado en el uso de las fosfaminas. Sus nombres comerciales incluyen Phostoxin, Gastión, Detia y otros. Las pastillas de fosfatina contienen fósforo de aluminio, cubiertas de parafina y mezcladas con carbonato de amónico. Esta formulación empieza a convertirse en gas sólo cuando se sacan del recipiente y quedan en contacto con la humedad del medio ambiente. El fosfuro de hidrógeno (PH_3) desprendido es un gas muy tóxico, incoloro

y es la materia activa que mata a los insectos en todas las etapas (huevo, larva, pupa y adulto). El fumigante penetra a los cuerpos de los insectos a través de los estigmas durante la respiración (Catalan, 2012).

1.1.3 Especie *Zea maiz* L.

POSICIÓN TAXONOMICA: Según Cronquist (1995) es:

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i> L.

Características del maíz blanco

Este maíz es originario del Departamento del Cusco, especialmente del Valle Sagrado de los Incas. Se desarrolla entre los 2600 y 3050 m.s.n.m., tiene mazorcas grandes de 8 hileras, de grano grande, su forma (plano circular) y harinoso. Las plantas crecen de 2 a 3 m de alto, se caracterizan por tener un tallo grueso sin hijuelos adecuados a las características climáticas del Valle Sagrado. El nombre del maíz blanco corresponde al color del grano y se le denomina gigante por el excepcional tamaño.



Figura 5. *Zea mays* L.- Maíz blanco gigante del Cusco. Secado del maíz después de la cosecha.

Pertenece a la especie *Zea mays* L. Es un grano de buen tamaño de color blanco, de forma plana circular, de textura suave harinosa. Rico en proteínas, almidones y azúcares.

El cultivo de las variedades de maíz se ubica en el departamento del Cusco (Perú), entre las provincias de Calca y Urubamba, desde el distrito de San Salvador y hasta el centro poblado de Chilca en el distrito de Ollantaytambo, ocupando un largo tramo de aproximadamente 70 Km, de longitud a ambos márgenes del río Vilcanota o Willka mayu (río sagrado) a esta zona se le denomina Valle Sagrado de los Incas (Castro y Mejía, 2011).

Un grano de maíz consta de tres estructuras:

- Pericarpio o cubierta del grano (5%), la capa externa o cascarita del grano. Protege a la semilla.
- Endospermo (82%), la parte donde se encuentran los nutrientes del grano, reserva energética. Almidón
- Germen o embrión (12%), la parte de la semilla de donde emergen nuevas plántulas, ricas en proteínas, grasas y vitaminas.
- El restante 1% corresponde a los restos del pedicelo en la base del grano. (Figura 6) (García *et. al.*, 2007)

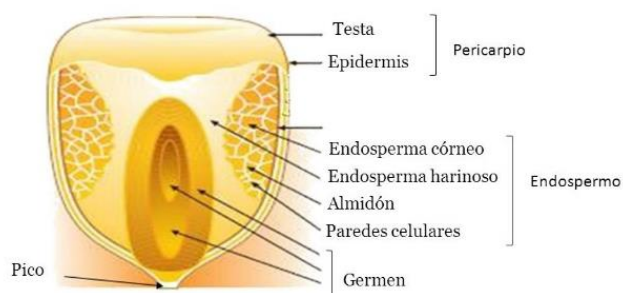


Figura 6. Estructuras principales de un grano de maíz

Fuente: García *et al.*, (2007)

Almacenamiento: En el almacenamiento de maíz se pueden producir grandes pérdidas cuando éste es atacado por insectos, se producen pérdidas de peso, los granos son contaminados con excretas, cuerpos enteros y exoesqueletos de insectos, los que le confieren olores y sabores extraños; los granos también pueden ser

indirectamente dañados. Para el almacenado del maíz el Ministerio de Agricultura, mediante el Instituto Nacional de Innovación agraria (INIA), recomienda embolsar y almacenar los granos en ambientes seguros, secos, limpios desinfectados y desinfectados para evitar el ataque de insectos, hongos y roedores. Y para el control de plagas como es el control de insectos de almacén como el gorgojo de los granos (*P. frontalis*) efectuar aplicaciones preventivas a base de sustancias químicas gasificantes, colocando los granos en ambientes o depósitos herméticamente cerrados (INIA 618-Maíz amiláceo).

Este tipo de práctica de almacenaje con uso de insecticidas sintéticos son tóxicos para el hombre y el medio ambiente y deben de ser remplazados por insecticidas naturales y ecoamigables; siendo el maíz un alimento cuyos granos se consumen bajo diferentes formas así: en choclo, mote, tostado, frito, tamales, cremas, mazamoras, panes y para fines industriales se obtiene el almidón y la harina; y gran cantidad de este maíz es exportado.

1.1.4 Aceite esencial

El origen de la palabra “aceite esencial” se cree que proviene del nombre acuñado en el siglo XVI por el alquimista suizo Paracelso von Hohenheim, el cual denominó a los componentes efectivos de los medicamentos como Quinta essentia (Burt, 2004).

Bajo la denominación de AE se agrupan las sustancias volátiles obtenidas mediante procesos físicos a partir de especies vegetales aromáticas, caracterizadas por una composición compleja, en la que predominan derivados terpénicos (mono- y sesquiterpénicos) y fenilpropánicos; pueden ser considerados como el grupo fitoquímico más importante dentro de aquellos que confieren olor a las especies vegetales que los contienen. Debido a su aspecto oleoso y a la capacidad de evaporarse cuando se exponen al aire a temperatura ambiente, se denominan también, aceites volátiles, siendo arrastrables en corriente de vapor de agua (Villar, 1999).

Composición química

Los AEs consisten en mezclas complejas que se originan del metabolismo secundario de las plantas. Pueden estar localizados en pelos, sistema vascular, hojas, tallos, flores o en otros sitios dependiendo de la especie vegetal. Básicamente contienen terpenos como los monoterpenos (C₁₀) (constituyen aproximadamente el 90 % de las

mezclas) y sesquiterpenos (C₁₅), y menos frecuentes compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, una variedad de fenoles aromáticos, óxidos, éteres, alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas que determinan el aroma y bioactividad característicos de la planta de la cual provienen (Batish *et al.*, 2008).

Los derivados terpénicos (Figura 7) se encuentran caracterizados en todos los casos por una masa molecular no excesivamente elevada. Dichos derivados pueden pertenecer a alguno de los siguientes grupos: 1. Hidrocarburos monoterpénicos (acíclicos, monocíclicos y bicíclicos), derivados oxigenados de los mismos (alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, óxidos, peróxidos, fenoles), y 2. Hidrocarburos sesquiterpénicos pertenecientes a distintos tipos estructurales (acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc.) y sus derivados oxidados.

Dentro de los derivados fenilpropánicos (Figura 8), predominan los alil y propenilfenoles, entre los que destacan el anetol, el eugenol y la asarona, característicos de determinados AE tales como los de anís, clavo y cálamo aromático (Villar, 1999).

La composición química de un determinado AE puede variar en diferentes ejemplares de la misma especie vegetal, e inclusive en los diferentes órganos de la misma planta, como resultado de su propia fisiología, o debido al clima y a las condiciones del suelo (Shaaya y Rafaeli, 2007).

La presencia de aceites esenciales volátiles en las plantas les proporciona una importante defensa estratégica, particularmente contra insectos herbívoros y hongos patógenos (Langenheim, 1994). Esta característica es precisamente aprovechada para el desarrollo de productos de utilidad agrícola y alimentaria, con el objeto de controlar el significativo número de plagas que afectan tanto cosechas como semillas ya almacenadas.

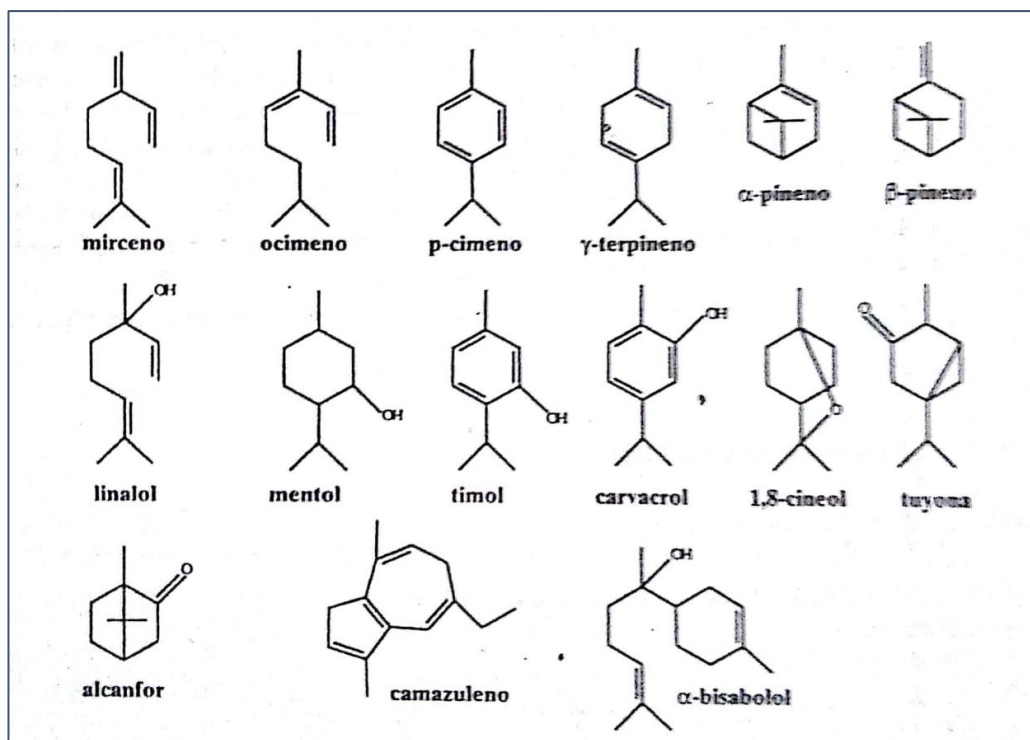


Figura 7. Componentes mono- y sesquiterpénicos presentes en distintos aceites esenciales.

Fuente: Villar (1999)

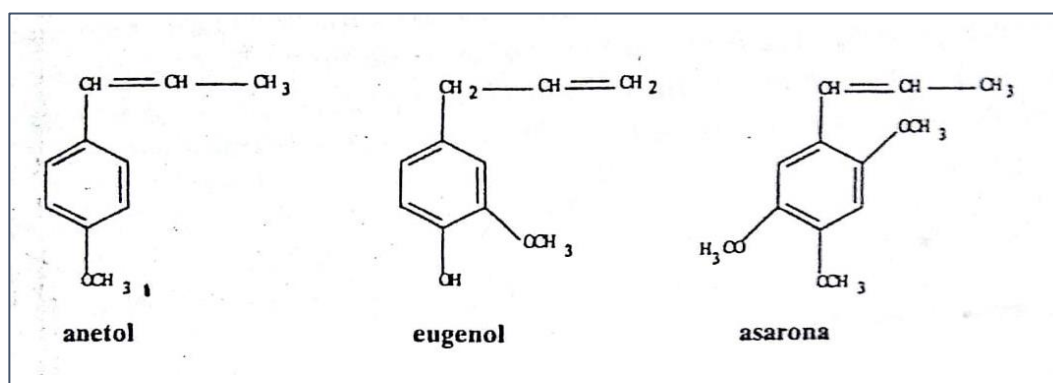


Figura 8. Componentes fenilpropiónicos de aceites esenciales

Fuente: Villar (1999)

Martínez (2001) definió a los aceites esenciales como fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: Compuestos alifáticos

de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), Monoterpenos, Sesquiterpenos y Fenilpropanos. En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

Clasificación. Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticas. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios (Figura 9).

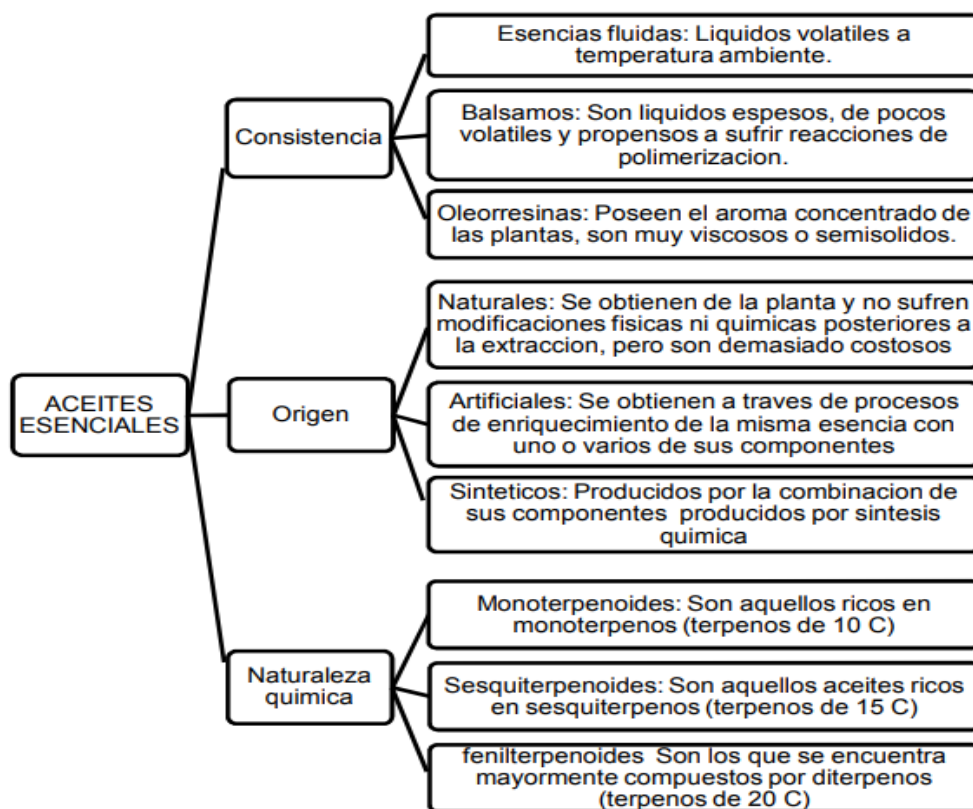


Figura 9. Clasificación de los aceites esenciales

Fuente: Martínez (2001)

Biosíntesis

Biosíntesis de monoterpenos y sesquiterpenos. Los monoterpenos y en general todos los compuestos terpenoides naturales se biosintetizan por la ruta de la acetilcoenzima a través de un intermedio común que es el ácido mevalónico. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que algunos terpenoides no se originan por esta ruta, sino por una ruta alterna que puede involucrar piruvato, gliceraldehído-3-fosfato y un intermedio de átomos de carbono: 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato. Para la Biosíntesis del ácido mevalónico, inicialmente se condensan dos moléculas de acetilCoA, con la participación hipotética de una β -cetotilasa y una enzima condensante. Enseguida esta unidad es atacada por otra unidad de acetilCoA que ha perdido un H-a. La hidrólisis de una de las dos funciones tioéster da lugar a la β -hidroxi- β -metilglutarilcoenzima-A. Una segunda hidrólisis del otro grupo tioéster seguida de dos reducciones sucesivas con una reductasa NADPH-dependiente se llega al ácido mevalónico.

Biosíntesis de fenilpropanos. Los fenilpropanos presentes en los aceites esenciales se originan biosintéticamente a partir del ácido shikímico. El ácido shikímico se aisló inicialmente de la planta asiática *Illicium* sp. (Fam. Illiciaceae) y es reconocido como un compuesto que es el punto de partida para un vasto número de compuestos naturales de muchas clases. Aunque es un discreto constituyente vegetal, no hay duda de que es un metabolito universal de las plantas superiores.

El ácido shikímico es el precursor de los constituyentes vegetales que contienen anillos aromáticos diferentes a los formados por la ruta de la malonilcoenzima-A. Hay en muchos casos dos patrones estructurales claros que permiten reconocer los compuestos aromáticos derivados biosintéticamente desde el ácido shikímico, y son: el patrón de oxigenación, y la presencia de anillos aromáticos ligados a cadenas de tres átomos de carbono (patrón C6 C3). La formación del ácido shikímico ocurre a partir de precursores de 3 y 4 átomos de carbono como son el fosfoenolpiruvato (FEP) y la eritrosa-4-fosfato (E4P) a través de la serie de etapas descritas. Este precursor es convertido posteriormente en los aminoácidos fenilalanina o tirosina,

los cuales por acción de amoniasas dan origen bien sea al ácido cinámico o phidroxicinámico (también llamado ácido *p*-cumárico por otros autores). Estos dos ácidos aromáticos son los precursores directos de los fenilpropanos naturales (Martinez, 2003).

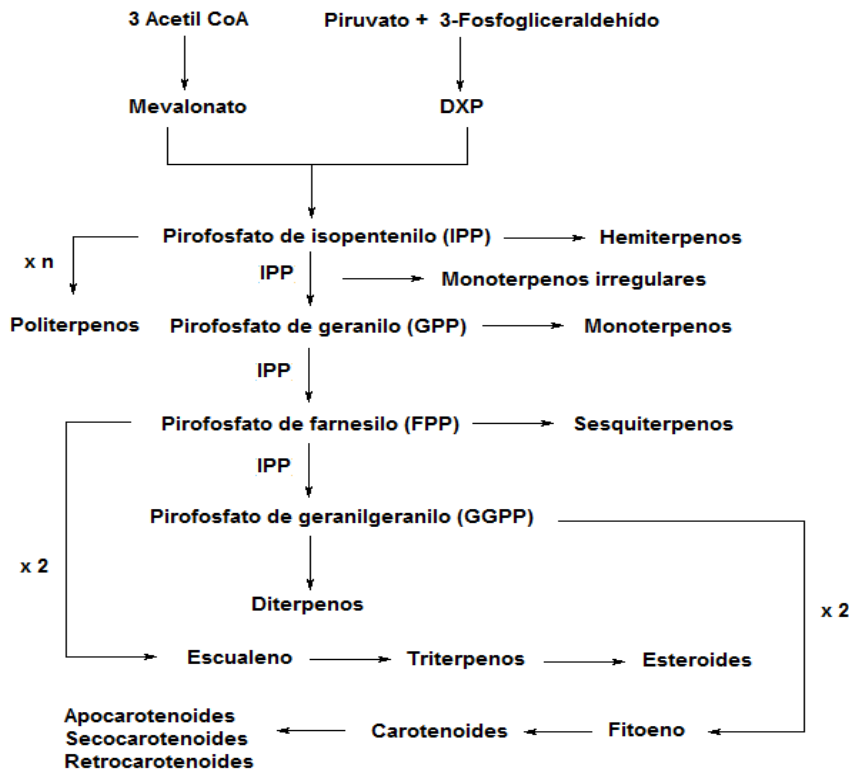


Figura 10. Resumen biosintético de los terpenos

Fuente: Eisenreich *et al.*, (2001)

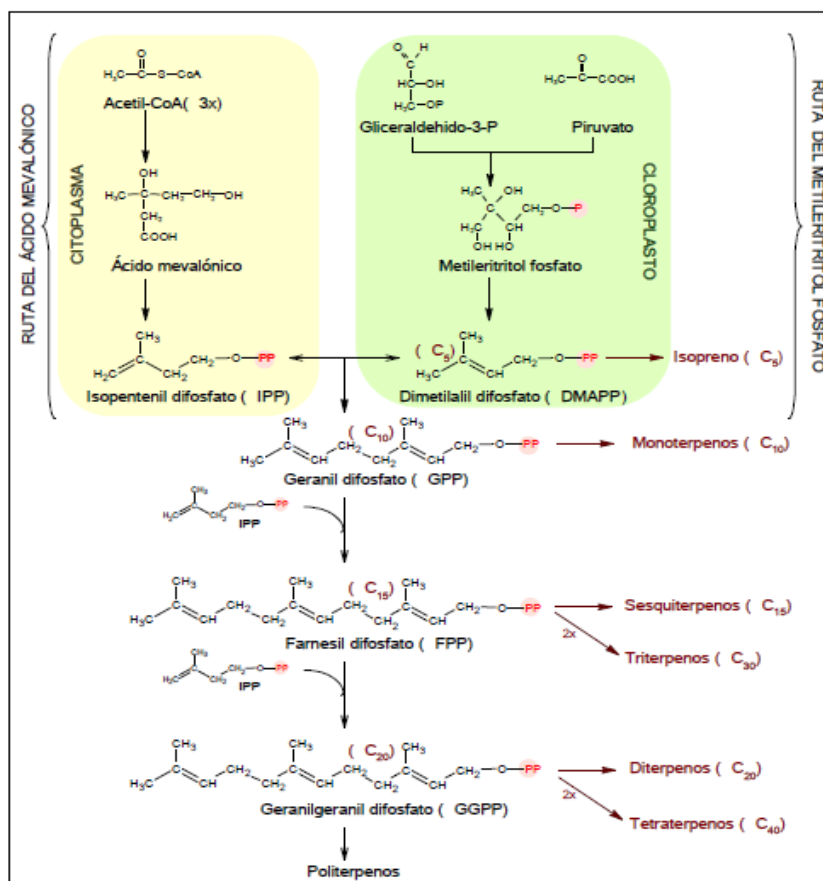


Figura 11. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno

Fuente: Adolfo y Pérez (2009)

Distribución y estado natural

Los AEs se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, Asteraceae etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamó, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sazafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí3, etc.), en las flores (arnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.). Los monoterpenoides se encuentran principalmente en plantas de los órdenes Ranunculales, Violales y Primulales, mientras que son

escasos en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. Por el contrario, los sesquiterpenoides abundan en Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales. *Tagetes* es un género de 56 especies de anuales y perennes en su mayoría plantas herbáceas de la familia de los girasoles (Asteraceae o Compositae). Ellos son nativos de América del Norte y del Sur (González, 1984; Stashenko, 1996).

Composición fitoquímica de los aceites esenciales obtenidas de plantas del género *Tagetes*

El género *Tagetes* es conocido por especies ricas en compuestos aromáticos y exudado, los que pueden estar presentes en las partes aéreas, capítulos, hojas, raíces, o en los aceites esenciales extraídos. Estos aceites esenciales son ricos en hidrocarburos monoterpenos (ocimenes, limoneno, terpinene, mirceno, etc.) y en cetonas monoterpeno acíclicas (tagetone, dihydrotagetone y tagetenone), que son los principales odorantes, además de cantidades más bajas de hidrocarburos sesquiterpeno y compuestos oxigenados. Dentro de estos grupos, la diversidad química es bastante alta. Las únicas diferencias notables en la composición de AE provienen de *T. lucida* y *T. filifolia*, cuyos AE están dominadas por fenilpropanoides como metileugenol, metilchavicol y anetol. El AE de las hojas de *T. tenuifolia* contenía 2.2% de metilchavicol (Bahare, 2018).

Extracción de aceites esenciales

Entre los principales métodos de extracción de éstos se encuentran la hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor, hidrofusión, extracción con dióxido de carbono y microondas (Stefanazzi, 2010). La destilación por arrastre de vapor de agua consiste en separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otros productos no volátiles. Se emplea cuando los aceites esenciales contenidos en el sólido seco o fresco se alteran por ebullición. Si el material es seco (canela, clavo de olor) se muele previamente, se cubre con una capa de agua para humectarlo y se pasa el vapor generado en una cámara independiente a través de la mezcla macerada (Figura 12).

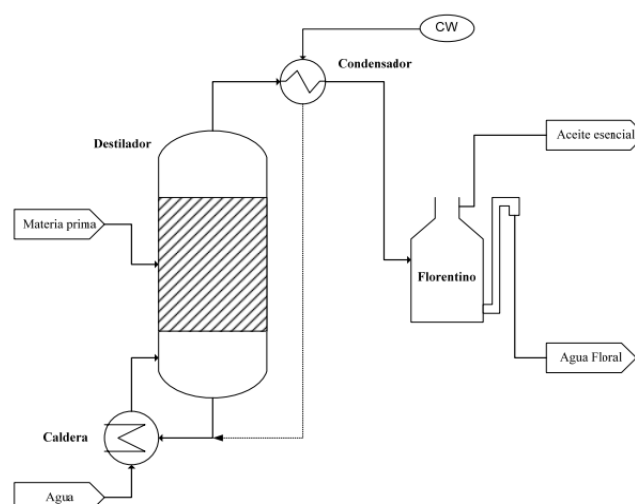


Figura 12. Esquema de destilación por arrastre de vapor

Fuente: Cerpa (2007)

La muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluídas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

Otros métodos son: expresión, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos. En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencias de cítricos. En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. En el método de enflorado, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de AE y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. El método de

extracción con fluidos supercríticos, es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ej. bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia; sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones.

Aplicaciones conservadoras de alimentos de plantas de género *Tagetes*

Los metabolitos sintetizados por plantas pertenecientes al género *Tagetes* muestran efectos significativos como antioxidantes, inhibidores enzimáticos, precursores de sustancias tóxicas y pigmentos. Además, estos compuestos bioactivos están involucrados en la fotosensibilización y la transferencia de energía, las acciones de las hormonas de crecimiento de las plantas y los reguladores, el control de la respiración y la fotosíntesis, y la defensa contra parásitos, bacterias, hongos y algunos insectos. Por otro lado, algunos de los metabolitos secundarios, especialmente los contenidos en las flores son responsables de la atracción de los polinizadores. Se cree que la actividad de los metabolitos secundarios en la especie *Tagetes* como en el caso de otras plantas, está relacionada con su composición, concentración y condiciones ambientales que afectan su contenido. Por lo tanto, los extractos de plantas y aceites esenciales obtenidos de diferentes partes pueden mostrar diferentes capacidades biológicas y pueden usarse en una variedad de industrias, incluida la producción cosmética, farmacéutica o alimentaria. Aunque los extractos de estas plantas no se usan tan popularmente como conservantes, *Tagetes* spp. se caracterizan por su alto potencial en el campo de la agricultura. El uso de los agentes bioactivos de *Tagetes* spp. en la protección de las plantas contra los microorganismos y macroorganismos se dirigen hacia las primeras etapas de la producción, principalmente en las etapas de fitomejoramiento o poscosecha (Bahare, 2018).

Uso de los aceites esenciales como alternativas a los pesticidas químicos en cosechas y granos almacenados

Las cosechas y granos almacenados son productos alimenticios para el consumo humano de primera necesidad (Padin et al., 2002). La presencia de plagas constituye un serio problema en el almacenamiento de granos y su industria derivada (Pérez Mendoza et al., 2004). Mundialmente, entre el 5 y el 15% del peso total de los cereales, semillas oleaginosas y leguminosas se pierden en la postcosecha, y entre el 5 y el 10% de estas pérdidas son causadas directamente por plagas (Hill, 1990). Por ej., solamente los gorgojos son responsables de cerca del 34% en la reducción del rendimiento de cosechas a nivel mundial (Oerke, 2006).

De los 32 órdenes de insectos, solamente tres, Coleoptera (gorgojos), Lepidoptera (mariposas y polillas) y Psocoptera (piojos de los libros), contienen especies que se encuentran como plagas de granos almacenados (Rees, 2004). Existen unas 1000 especies de insectos que infestan los productos almacenados, siendo las de mayor importancia económica las que se encuentran dentro de las dos primeras órdenes ya mencionadas (Nerio et al., 2009). La clasificación de estos insectos es realizada de acuerdo con la forma como atacan las semillas. Así, las plagas primarias están representadas por insectos altamente especializados con la capacidad de perforar la testa de las semillas (dentro de este grupo se encuentran *Sitophilus granarius*, *S. zeamais*, y *Prostephanus truncatus*); y las plagas secundarias, en cambio, son insectos poco especializados que atacan un amplio rango de productos almacenados, procesados y manufacturados (destaca *Tribolium castaneum*) (Stefanazzi, 2010). En nuestro medio está *Pagiocerus frontalis*, que ataca al maíz maduro en mazorcas y al maíz almacenado.

En la actualidad, los dos pesticidas químicos más ampliamente utilizados son el bromuro de metilo y la fosfina. El primero, ha sido usado por más de 70 años, siendo sus propiedades insecticidas reportadas en primera instancia por Le Goupil en 1932. Este es empleado como fumigante en la desinfestación de tierra y para el tratamiento de cuarentena o de preembarcado (Ristiano y Thomas, 1997). Por su parte, la fosfina es utilizada en más del 70 % de los granos almacenados (Mueller, 1990). Según datos de Agrow, el valor total del mercado agroquímico mundial se encuentra entre los 31

y 35 mil millones de dólares, de los cuales el 25 % corresponde a insecticidas (Agrow, 2007).

La resistencia de las plagas (cruzada y no cruzada), contaminación ambiental (cuerpos de agua, suelos y entornos urbanos) y problemas toxicológicos asociados con estos insecticidas sintéticos han conducido a la necesidad de encontrar alternativas más efectivas y amigables con la salud de los seres humanos y el ambiente. Además, la lucha contra la contaminación ambiental y sus efectos sobre la salud del hombre y de los sistemas ecológicos se constituye en uno de los más serios retos de nuestro mundo moderno. Como consecuencia, los aceites esenciales son algunos de los productos naturales más analizados hoy en día, así como las diferentes acciones biológicas de estos derivados de las plantas en el control de las plagas de alimentos almacenados (Golob et al., 1999; Rajendran y Sriranjini, 2008).

Los primeros intentos para caracterizar la actividad sobre el control de plagas de los aceites esenciales, bajo condiciones *in vitro*, comenzaron en la década de los 90 (Dorman y Deans, 2000).

Los aceites esenciales son fácilmente extraíbles, ecoamigables al ser biodegradables y son fácilmente catabolizados en el ambiente (Zygadio y Grosso, 1995). Asimismo, no persisten en el suelo y en el agua, (Isman, 2000; Isman y Machial, 2006) y poseen baja o no toxicidad hacia vertebrados (peces, aves y mamíferos principalmente) (Enan et al., 1998). Por su parte, en lo concerniente a la resistencia, se ha encontrado que los aceites esenciales son particularmente útiles contra especies de insectos que presentan esta característica.

A diferencia de los pesticidas sintéticos basados en productos químicos individuales, los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos que contienen muchas sustancias trazas que actúan de manera sinérgica como una defensa estratégica, por lo que dificultan el desarrollo de la resistencia en las plagas (Feng e Isman, 1995). Con relación a los estudios de los aceites esenciales en el control de plagas, se han abarcado ácaros (Choi *et al.*, 2004) e insectos, principalmente Coleópteros (Papachristos y Stamopoulos, 2002), Isópteros (Petersony Ems-Wilson, 2003), Himenópteros (Appel *et al.*, 2004), Dípteros (McQuate *et al.*, 2004) y Homópteros (Choi et al., 2003; Zhang *et al.*, 2004; Barajas *et al.*, 2005; y, Castillo *et al.*, 2005).

Investigaciones recientes indican que algunos aceites esenciales y, en particular, los monoterpenos, actúan sobre los receptores de la octopamina, lo cual los convierte en productos altamente selectivos dado que este tipo de receptores no está presente en los vertebrados (Enan, 2001, 2005; Price y Berry, 2006). De esta manera, el sistema octopaminérgico presente en los insectos se convierte en un blanco biorracional para su control. No es abundante la información disponible sobre el modo de acción de los aceites esenciales en los insectos. Sin embargo, algunos aceites o sus constituyentes producen síntomas específicos que sugieren que estarían actuando como neurotóxicos (Kostyukovky *et al.*, 2002; Isman, 2006).

1.1.5 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases (GC) acoplada a espectrometría de masas (MS) es una técnica muy utilizada para separar, cuantificar e identificar sustancias volatilizables. Los compuestos aptos para el análisis tanto por GC como por MS con impacto de electrones (EI, técnica de ionización de las moléculas más usadas en GC-MS), son moléculas con temperaturas de volatilidad mediana o alta, con termoestabilidad alta, de pesos moleculares o polaridades bajos o medianos (que no debe superar 400 a 450 Da), con concentraciones presentes en mezclas en el rango de ppb – ppm; son similares las características para ambas técnicas; además sus análisis transcurre en el mismo estado de agregación (fase vapor). Entre los detectores cromatográficos espectroscópicos (de emisión atómica, AED, de infrarrojo, IR o de masas, MS), útiles para la determinación de la estructura química o composición elemental de analitos, el más ampliamente usado hoy en día es el de espectrometría de masas, gracias a su sensibilidad, operatividad y, sobre todo, a un gran volumen de información estructural suigeneris que puede proporcionar (Solis *et al.*, 2018).

Un cromatógrafo de gases consta de los siguientes componentes básicos (Figura 13): Sistema de suministro de gas portador, Sistema de inyección de la muestra, Columna y fase estacionaria, Sistema de detección y Sistema de registro y tratamiento de datos.

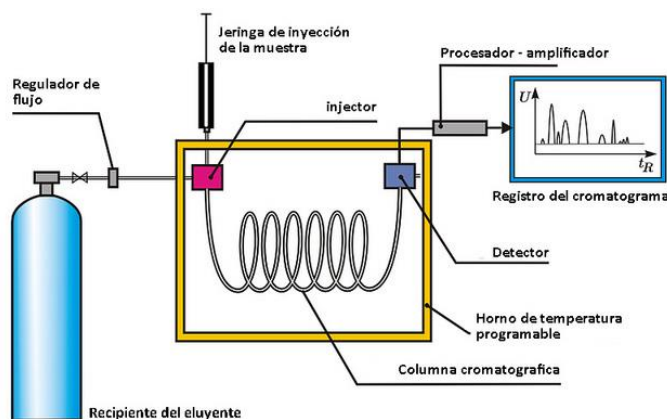


Figura 13. Cromatógrafo de gases

Fuente: Castaños, (2015)

Existen dos estrategias para identificar compuestos por GC-MS:

I. El uso de sustancias –estándar (patrones certificados). Sin embargo, no siempre todos los patrones se pueden conseguir, muchos de ellos no son accesibles o disponibles fácilmente.

II. La combinación de varias aproximaciones, como: a) los índices de retención (RI), conjuntamente con b) espectros de masas experimentales (EI; 70 eV) y c) su comparación con los de las bases de datos de índices de retención obtenidos en columnas de polaridad ortogonal (polar y apolar) y de espectros de masas estándar (EI, 70 eV).

La combinación de varios parámetros experimentales y datos, *i.e.*, índices de retención medidos en ambas columnas y espectros de masas, es obligatoria para la identificación estructural de componentes en la mezcla. La identificación puede ser tentativa (preliminar, presuntiva) o confirmatoria. La confirmación (identificación positiva o inequívoca) requiere, en muchos casos, el uso de un compuesto-estándar certificado (Solis *et al.*, 2018).

1.1.6 Características espectroscópicas de UV e IR

Una forma rápida de caracterizar a los aceites esenciales y valorar la calidad del producto, referente a su posible composición, a la homogeneidad de su composición durante su extracción, manipulación y uso, así como para la determinación de su

origen ecológico; sería a través del perfil espectroscópico del espectro ultravioleta-visible (UV-Vis) y del espectro infrarrojo (IR). Estas características pueden ser utilizadas como sustituto de las características fisicoquímicas de los aceites esenciales. Cualquier variación o alteración de su composición, también es reflejada en las características fisicoquímicas de los aceites esenciales. Cualquier variación o alteración de su composición, también es reflejada en las características de sus espectros.

Espectroscopia ultravioleta-visible

La Espectroscopia UV-Vis fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicaron en el análisis cuantitativo y determinación de estructuras moleculares. En la actualidad, la espectroscopia UV-Vis es más utilizada en el análisis cuantitativo, ya que para la determinación de estructuras es superada por otras técnicas como, la espectroscopia IR y RMN.

La espectroscopia UV-Vis utiliza la radiación electromagnética (luz) de las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético. Estas regiones espectrales van desde una longitud de onda entre 10 a 200 nm del UV lejano (denominada UV de vacío, porque el O2 absorbe en esta región, por debajo de 200nm), UV cercano entre 200 y 400 nm y visible entre 400 y 800 nm del espectro electromagnético, como lo muestra la Figura 14 (Arenas y López, 2004).

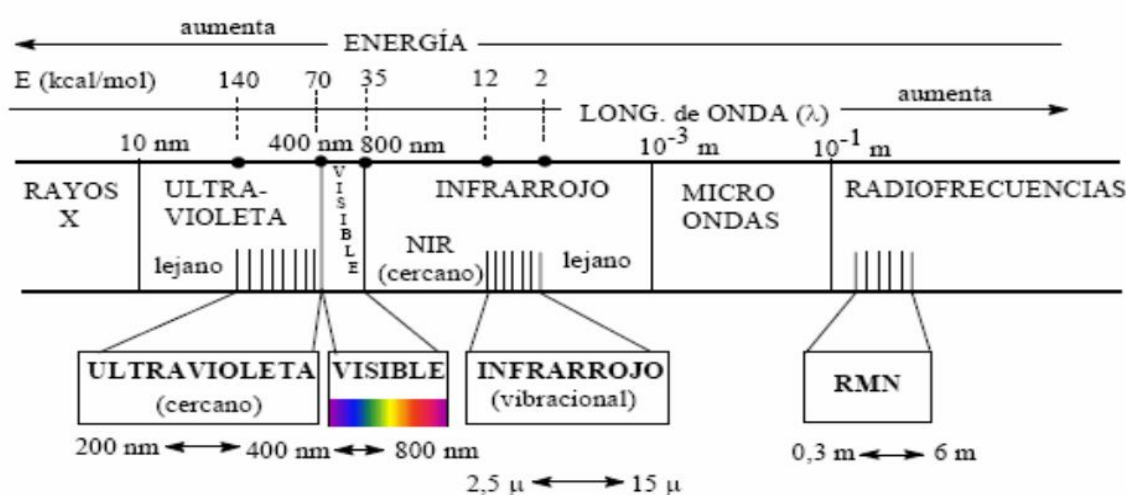


Figura 14. Espectroscopia UV-Vis

Fuente: Arenas y López (2004)

Los espectros UV de los aceites esenciales muestran características respecto a su composición, así absorciones intensas:

- Entre 202 y 210 nm es indicativa de compuestos saturados o de la presencia de insaturaciones aisladas;
- Entre 215 y 250 nm la presencia de compuestos insaturados y
- Entre 250 y 270 nm de hidrocarburos aromáticos.

Los máximos de absorción serían muy cercanos a la absorción de sus componentes mayoritarios. Estas características nos permiten aproximarnos a su composición aproximada (Dominguez, 1973; Lock, 1994).

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

La espectroscopia infrarroja es una técnica analítica que estudia las vibraciones de las moléculas en la zona infrarroja del espectro electromagnético. Las técnicas analíticas de espectroscopia son utilizadas con la finalidad de elucidar estructuras químicas en los diferentes campos de la ciencia, también en la determinación de rutas metabólicas. El principio de esta técnica es que los enlaces con los que están unidos los átomos vibran a determinadas frecuencias, que son los niveles de energía de la molécula.

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es un método para producir los espectros infrarrojos con mayor velocidad, esto básicamente se trata en dirigir la luz IR por un interferómetro luego de pasarla por la muestra para registrar el interferograma. Esto lo que hace es transformar los datos de tiempo a frecuencias para mostrarnos un espectro mucho más amigable para la lectura e interpretación de los resultados.

Los espectros IR de los aceites esenciales proporcionan una valiosa información cualitativa sobre la presencia o ausencia de grupos funcionales que presentan las moléculas del AE, como característica de sus componentes.

- Así la presencia de alcoholes puede ser detectada por señales a $3600 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ y la naturaleza de ellos 1° , 2° o 3° por las señales a $1200 - 900 \text{ cm}^{-1}$,
- Los grupos carbonílicos (aldehídos, cetonas, ésteres; saturados e insaturados) por las señales a $1800 - 1650 \text{ cm}^{-1}$,

- Las insaturaciones o anillos aromáticos entre 1670 – 1500 cm^{-1} .
- Eteres, absorción C-O entre 1300 y 1000 cm^{-1} .
- Compuestos aromáticos entre 1600 y 1475 (absorción C=C) y entre 3000 y 3100 (absorción =C-H).

Estas características, junto a las de UV nos permiten aproximarnos a la composición de los aceites esenciales (Dominguez, 1973; Lock, 1994; Pavia, 2008)

1.1.7 Insectos en almacenes de granos

Las cosechas y granos almacenados son productos alimenticios de primera necesidad para el consumo humano. La presencia de plagas constituye un serio problema en el almacenamiento de granos y su industria derivada. Mundialmente, entre el 5 y el 15% del peso total de los cereales, semillas oleaginosas y leguminosas se pierden en la postcosecha, y entre el 5 y el 10% de estas pérdidas son causadas directamente por plagas. Por ejemplo, solamente los gorgojos son responsables de cerca del 34% en la reducción del rendimiento de cosechas a nivel mundial (Pérez *et al.*, 2004).

Los insectos se convierten en plagas cuando el tamaño de la población o los daños que causan, o ambos, exceden los valores normales. Las plagas son capaces de infestar el maíz en cualquiera de las etapas de desarrollo y durante el almacenamiento; atacan el grano. Éste es una fuente ideal de alimento para los insectos. La aparición de plagas en poco tiempo se debe a la elevada tasa de reproducción de los insectos, asiduos a los sitios oscuros, se esconden en grietas muy reducidas a su tamaño pequeño y a su amplia capacidad de adaptación y tienen una gran capacidad de reproducción, lo que conlleva a que pocos insectos logren una gran población en muy corto plazo. De esta manera, una reducida infestación inicial puede dañar en poco tiempo, una gran cantidad de granos.

Las plagas más importantes, entre los insectos que atacan y más daños causan al maíz, están el grupo de las palomillas (gusano elotero, cogollero, barrenadores y palomillas de almacén) y los escarabajos (gorgojos y barrenadores del grano). Estas varían de acuerdo con la región, la estación del año y el sistema y el período del almacenamiento. Se dividen en primarios y secundarios, según su tipo de alimentación. Los insectos primarios tienen la capacidad de alimentarse de los granos enteros, sanos, sin daño previo; son los más importantes durante el almacenamiento

Entre los insectos primarios se encuentran, por ejemplo, el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*), el barrenador de grano (*Prostephanus truncatus*), y la palomilla de los granos (*Sitotroga cerealella*) que atacan a granos y cereales. Los insectos secundarios no atacan los granos enteros y se alimentan de los granos quebrados, partículas de granos y polvos que dejan los insectos primarios. Insectos de este grupo se alimentan también de los hongos que se desarrollan en los granos húmedos, o de granos sometidas a manejo o procesamiento. Entre los secundarios podemos mencionar a la polilla bandeada (*Plodia interpunctella*), el escarabajo castaño (*Tribolium castaneum*) y el barrenillo de los granos (*Rhyzopertha dominica*) (García *et al.*, 2007).

De los 32 órdenes de insectos, solamente tres, Coleoptera (gorgojos), Lepidoptera (mariposas y polillas) y Psocoptera (piojos de los libros), contienen especies que se encuentran como plagas de granos almacenados (Hill, 1990).

1.1.8 Métodos de control de plagas en granos almacenados

El artículo 2° del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (FAO, 1986) define los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”.

Las sustancias se denominan según el tipo de plaga contra el cual se utilizan, así:

- Los insecticidas se utilizan contra los insectos.
- Los herbicidas se utilizan contra la maleza.
- Los fungicidas se utilizan contra los hongos y el moho.
- Los rodenticidas se utilizan contra los roedores.
- Los molusquicidas se utilizan contra los moluscos.
- Los insecticidas se clasifican de acuerdo con su composición química en:

- Clorados: DDT, Clordano, Lindano, Metoxicloro, Pertane, Heptacloro, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Isodrin, etc.
- Organofosforados: Acefato, clorpirifos, metil demetón, diazinon, dimetoato, etión, fenitrotión, triclorfón, mercaptotión, metil azinfos, metidation, triazofós, etc.
- Carbamatos: carbofurán, carbosulfán, metomil, pirimicarb, formetanato, etc.
- Piretroides: Cipermetrina, ciflutrina, deltametrina, esfenvalerato, permetrina, fenpropatrina, lambdacihalotrina, etc.
- Nitroguanidinas: acetamiprid, imidacloprid.
- Benzoilureas: novalurón, clorfluazurón, teflubenzurón, etc
- Fumigantes: Fosfuro de aluminio, fosfuro de zinc

Tabla 1

Grupos de insecticidas, modo de acción

TIPO DE INSECTICIDA	LUGAR Y MODO DE ACCIÓN	EJEMPLOS COMUNES
CARBAMATOS	Inhibidores de la Acetilcolinesterasa. Sistema nervioso	Formetanato, metiocarb, metomilo, oxamilo, pirimicarb.
ORGANOFOSFORADOS	Inhibidores de la Acetilcolinesterasa. Sistema nervioso	Clorpirifos, dimetoato, etoprofós, fenamifós, fosmet, fostiazato, malatión, metil-clorpirifos, Metil-pirimifós. Paration
ORGANOCOLORADOS	Moduladores del canal de sodio. Sistema nervioso	DDT
CICLODIENO ORGANOCOLORADOS	Antagonista del canal de cloruro regulado por GABA	Clordano, Endosulfan, ganna-HCH (Lindano)
PIRETRINAS, PIRETROIDES	Moduladores del canal de sodio. Sistema nervioso	Acrinatrín, alfa-cipermetrín, betaciflutrín, cipermetrín, deltametrín, esfenvalerato, etofenprox, teflutrín, lambda-cihalotrín, tau-fluvalinato, zeta-cipermetrín. Piretrinas.
NEONICOTINOIDES SULFOXIMINAS BUTENOLIDES	Moduladores competitivos del receptor nicotínico de la acetilcolina. Sistema nervioso	Acetamiprid, clotianidina, imidacloprid, tiametoxam. Tiacloprid, Sulfoxaflor.
FOSFINAS	Inhibidores del transporte de electrones en el complejo mitocondrial IV. Metabolismo de la energía	Fosfuro de aluminio, fosfuro de magnesio.

Fuente: Devine *et al.*, (2008)

Las restricciones de la sostenibilidad acerca del uso de insecticidas incluyen los efectos sobre la salud humana, los ecosistemas agrícolas (insectos beneficiosos), el medio ambiente en general (especies que no son el objetivo, paisajes y comunidades) y la selección de rasgos que confieren la resistencia a los insecticidas en las especies

plagas. Para todas estas categorías es posible encontrar ejemplos donde los insecticidas han sido utilizados de manera desastrosa, y otros donde los peligros que representaban han sido mitigados (accidentalmente o por estrategias implementadas). La Organización Mundial de Salud ha calculado que alrededor de 20 000 personas mueren anualmente como consecuencia de la exposición a insecticidas, sin embargo, esas sustancias químicas también protegen la producción, las ganancias y la salud pública. También se ha demostrado que algunos insecticidas han devastado poblaciones de enemigos naturales en algunos sistemas, pero en otros, especialmente con algunos de los insecticidas más nuevos, parece tener un impacto mínimo (Devine et al., 2008).

En la actualidad, los dos pesticidas químicos más ampliamente utilizados son el bromuro de metilo y la fosfina. El primero, ha sido usado por más de 70 años. La fosfina es utilizada en más del 70% de los granos almacenados (Mueller, 1990).

Insecticida fosforo de aluminio

El fosforo de aluminio (AIP) es un fumigante sólido usado como una sustancia ideal para la conservación de los granos de la cosecha, ya que es altamente tóxico contra los insectos que invaden los granos en todos sus estadios (huevos, larvas, ninfas, pupa, adultos). No afectan la viabilidad de las semillas tratadas y sus residuos son muy escasos en los alimentos, principalmente en el maíz. Las características físicas de este veneno consisten en una tableta de 560 mg hasta 3 g, su color es gris oscuro. Éste a su vez en contacto con la humedad (hidrólisis del AIP) libera un gas llamado fosfín, fosfamina o gas fosfina (fosforo de hidrógeno - PH_3), el cuál es incoloro y cuyo muy particular olor es parecido a "pescado descompuesto" o "ajo concentrado", con una densidad similar a la del aire y de altísimo poder de penetración, lo que le permite llegar a todos los rincones del recinto fumigado. (Nath et al., 2011).



Mecanismo de acción. Penetra a través de los poros respiratorios causándoles la muerte instantánea por alteración de los procesos de respiración celular. Posee un gas irritante para el tracto respiratorio, destruye la membrana celular, con formación de radicales libres e inducción de la peroxidación lipídica. Puede causar

desnaturalización de la oxihemoglobina y de otras enzimas importantes para la respiración y metabolismo.

Toxicidad. En caso de ingestión, la humedad gástrica acelera la liberación del gas. La dosis letal reportada por este gas varía de los 50 a 500 mg; sin embargo, esta dosis puede ser menor para condicionar la defunción, e incluso la inhalación en niños puede ser letal a corto plazo. Es un producto clasificado por la OMS en la categoría IA como extremadamente tóxico, tanto por ingestión directa o inhalada (Nath et al., 2011; Wahab et al., 2008, Mathal, 2010).

Nombres comerciales: Phosfin, Gastion, Phostoxin.

Recomendaciones de uso: Gorgojo del maíz, gorgojo del arroz, de los cereales, carcoma grande y del tabaco, tribolios, palomita de los cereales, taladrillo de los granos, ácaros, polilla de la harina, polilla de la fruta seca, gorgojo de la harina de pescado, ratas. Tiempo de exposición: 4 a 10 días (Farmagro, 2018).

Bioensayos toxicológicos

Los bioensayos toxicológicos son herramientas de determinación y análisis de la toxicidad de un agente, generalmente de origen desconocido, diseñados para medir los efectos de uno o más contaminantes sobre una o más especies de organismos, obteniendo así, una relación dosis-respuesta del agente. Los individuos son expuestos a concentraciones crecientes del tóxico para determinar cambios en el organismo. En general la muerte es el criterio más utilizado en la prueba de CL₅₀ horas. Uno o más controles son utilizados en organismos expuestos a similares condiciones excepto cuando existe falta de disponibilidad del tóxico (Reish y Oshida, 1987).

El efecto se puede evaluar a diferentes niveles (subcelular, enzimático, morfológico, fisiológico, histológico, sistémico, poblacional o de la comunidad) y clasificarse en cuantales (cantidad de organismos afectados) o graduales (grado de alteración) (Esclapés, 1999).

Los bioensayos toxicológicos tienen por finalidad determinar las concentraciones de un tóxico dado que ocasionen efectos dañinos o nocivos en un organismo modelo. Estos efectos pueden incluirse en las siguientes categorías:

Afectación del término de vida

Alteración de la tasa de crecimiento

Cambios de los parámetros reproductivos (Reish y Oshida, 1987).

Tipos de bioensayos toxicológicos

Existen dos tipos de bioensayo toxicológicos, que se diferencian según su respuesta:

Los primeros son los ensayos de toxicidad aguda que cuantifican las concentraciones letales de un xenobiótico o sustancia a una especie en particular. El valor calculado se denomina concentración letal media (CL_{50}), y representa la concentración que causa la muerte al 50 % de la población experimental en un tiempo determinado (generalmente 48 o 96 horas) (Esclapés, 1999)

Los otros tipos de los de toxicidad crónica que estiman la concentración efectiva media (CE_{50}), la cual es la concentración de la sustancia de prueba que causa un efecto al 50 % de la población experimental, determinado al cabo de un tiempo de bioensayos son determinado (Esclapés, 1999).

Concentración letal media

La concentración letal media es la concentración a la que una sustancia genera la muerte del 50 % de los animales de experimentación, a los que se haya suministrado la sustancia supuestamente tóxica; es obtenida por tratamiento estadístico. El valor de la CL_{50} se expresa en cocentración y produce la muerte del 50 % de animales sometidos a experimentación, no tienen correlación directa de una especie a la otra o a los seres humanos. Cuando menor sea, más tóxico es el material (Repeto, 1997).

Para el cálculo de la CL_{50} se pueden utilizar técnicas de estimación de punto, tales como los métodos Probit, Spearman-Karber, gráfico, etc., para lo que se pueden utilizar programas computacionales especialmente diseñados (Díaz, 2000).

1.2 Antecedentes

Los aceites esenciales son mezclas volátiles de hidrocarburos con una diversidad de grupos funcionales y su actividad repelente se ha ligado a la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos. Sin embargo, en algunos casos, estos productos químicos pueden

trabajar sinérgicamente, mejorando su eficacia. El uso de los aceites esenciales o de sus componentes es amplio y variado; así se usa en las industrias: farmacéutica, alimentaria, de licores y bebidas; en productos se usó veterinario; en fitosanitaria los aceites esenciales y las hidrolasas (agua madres) se utilizan para controlar y repeler plagas, para preparar herbicidas, insecticidas, fungicidas nematocidas, repelentes, acaricidas, desodorizantes. Para el control de estas plagas es común la utilización de insecticidas de síntesis química como productos fosforados, clorinados, carbamatos y piretroides; los cuales son altamente contaminantes y tóxicos, dañan no sólo nuestra salud, sino también el medio ambiente (Aldana, 1994).

El uso como insecticida de los aceites esenciales podría ayudar a preservar los granos almacenados, ya que la presencia de insectos trae como consecuencia la pérdida de la calidad del grano, tanto para consumo humano como para el uso posterior de la semilla (Silva *et al.*, 2005). Estos productos de origen natural evitarían el uso de insecticidas sintéticos, químicos cuyo uso frecuente contribuye a la crisis de la agricultura, dañando los ecosistemas, los recursos naturales, afectando a la salud humana y de los frecuentes consumidores, contaminando y envenenando (UNODC, 2010).

Entre las familias de plantas con prometedores aceites esenciales utilizados como repelentes, *Cymbopogon spp.*, *Ocimum spp.* y *Eucalyptus spp.* son los más citados. Los compuestos presentes en estas mezclas con alta actividad repelente incluyen alfa-pineno, limoneno, citronelol, citronelal, alcanfor y timol. Aunque desde un punto de vista económico aún más con frecuencia se utilizan productos químicos sintéticos como repelentes que los aceites esenciales, estos productos naturales tienen el potencial para proporcionar repelentes eficientes y más seguros para los seres humanos y el medio ambiente. Muchas especies aromáticas andinas también muestran actividad contra insectos depredadores de cultivos, como las especies: *Minthostachys spicata* (Benth) Epling, *Clinopodium Bolivianun* (Beth) Kuntze, *Schinus areira* Linneo, *Eucalyptus glubulus* Labill, *Tanacetum vulgare* L., *Tagetes multiflora* Kunth y *Menta x piperita* var. *Vulgare* (Nerio *et al.*, 2010; Solís *et al.*, 2018).

El género *Tagetes* es rico en compuestos aromáticos y exudados resinosos, y los aceites esenciales (AE) de estas plantas son ricos en ocimenes, limoneno, terpineno, mirceno, tagetones, dihidrotagetona y tagetenones, Sin embargo, esta composición química de AE depende de varios factores como endógenos y exógenos, incluidos rasgos genéticos,

órganos de plantas (hojas, tallos, capítulos o raíces), condiciones de crecimiento, secado y almacenamiento, y factores de estrés tales como climatología adversa y enfermedades que afectan a la planta; también el tipo de extracción es un aspecto crucial, los solventes utilizados, y la estandarización de los extractos. Existen una correlación clara y factible de los efectos biológicos informados para los distintos AE y extractos con su composición química, y se pueden hacer algunas asociaciones. Por ejemplo, la actividad antimicrobiana del limoneno para fines médicos es bien conocida, efectos terapéuticos que involucran antiinflamatorios, antioxidantes, antinoceptivos, anticancerosos, antidiabéticos, y los efectos antihiperalgésicos, entre otros. Se evaluaron las actividades antibacterianas y antifúngicas de los enantiómeros de α -pineno y β -pineno, mostrando que los enantiómeros positivos tienen actividad antimicrobiana contra *C. albicans*, *C. neoformans*, *Rhizopus oryzae*, y *S. aureus* resistente a la metilicina (MRSA). Eugenol interfiere con funciones de membrana o suprime los factores de virulencia, incluidas las toxinas, las enzimas y la formación de biopelículas bacterianas y fúngicas. Curiosamente, los autores sugieren un efecto sinérgico de eugenol y otros compuestos presentes en los AE, tales como timol, carvacrol y mentol (los compuestos también están presentes en AEs de *Tagetes*). (Salehi *et al.*, 2018).

Serrato *et al.* (2008) evaluaron la composición del aceite esencial de 78 recolectas de *T. filifolia* de la región centro-sur de México, establecidas en Chapingo. Cuando las plantas presentaron floración se hizo la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor usando 500 g de tejido de la planta completa. La composición química del aceite se determinó con cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas; los compuestos principales fueron 4-alilanol y trans-anetol (4-propenilanol), en forma individual o en mezcla: 1.3% de las recolectas sólo con anetol, 7.7% de las recolectas sólo con alilanol y 91% de recolectas con mezcla. En las recolectas con mezcla de anetol y alilanol, la proporción de estos compuestos químicos fue variable.

Sánchez *et al.* (2017) estudió a *Tagetes filifolia* Lag., provenientes de Junín, encontrando en la marcha fitoquímica fenoles en cantidades abundantes tanto en el extracto en agua destilada como en el extracto en alcohol etílico, además este último tuvo cantidades moderadas de quinonas. Por otro lado, el extracto en alcohol etílico fue el que presentó el mayor porcentaje de captación de radicales libres (91.26 %) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, similares resultados se encontró con el extracto etéreo (88.94 %) y el extracto en

agua destilada (75.58 %). Llegando a la conclusión que los principales componentes químicos fueron fenoles y quinonas.

De Feo *et al.* (1998) obtuvieron por hidrodestilación el aceite esencial de las partes aéreas de *T. filifolia* del departamento de Cusco con un rendimiento del 0.47 % (v/m) relacionado con el peso seco. Por análisis por GC-MS se identificaron 57 compuestos, que representan el 99.2 % del aceite. Los fenilpropanoides constituyen la gran mayoría del aceite, con (Z)-anetol (68.2 %) y estragol (13.7 %) como constituyentes principales.

Ruiz *et al.* (2010) determinaron las composiciones químicas de los aceites esenciales de las partes aéreas de *T. filifolia* ("Anís serrano"), *Tagetes elliptica* Sm. ("Chincho") y *Tagetes minuta* L. ("Huacatay") del Perú, mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas. Los principales constituyentes de los aceites esenciales fueron: (E)-anetol (88.2 %) y metil chavicol (10.9 %) para *T. filifolia*; *trans*-ocimenona (51.7 %), *cis*-tagetona (17.7 %) y *cis*-ocimenona (7.7 %) para *T. minuta*; y 6,7-epoximirceno (31,9 %), dihidrotagetona (22,0 %), *trans*-ocimenona (12,0 %) y *cis*-tagetona (8,0 %) para *T. elliptica*. El aceite esencial de *T. minuta* exhibió el mayor antioxidante *in vitro* (EC₅₀ = 0,8 mg/mL), en comparación con *T. elliptica* (EC₅₀ = 3,4 mg/mL) y *T. filifolia* (EC₅₀ = 20,2 mg/mL), prueba DPPH. Se realizaron pruebas contra larvas del tercer estadio de *Aedes aegypti*, considerado un vector importante del dengue y la fiebre amarilla. El aceite esencial de *T. filifolia* mostró la actividad larvicida más fuerte (LC₅₀ = 47.7 ppm), en comparación con *T. minuta* (LC₅₀ = 52.3 ppm) y *T. elliptica* (LC₅₀ = 111.0 ppm). Concluyéndose que el aceite esencial de *Tagetes filifolia* podría considerarse como una alternativa natural a los larvicidas químicos para el control de *Aedes aegypti*.

Olmedo *et al.* (2015) evaluaron la toxicidad aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag (Asterales: Asteraceae) y sus compuestos principales contra *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae), encontrándose que el aceite esencial y el (E) -anetol fueron los más tóxicos a las 24 h contra los insectos adultos (CL 50 = 2.4 y 2.6 µL / mL de agua, respectivamente). Estos hallazgos sugieren que los fenilpropanoides podrían actuar no solo en la actividad AChE sino que también desencadenan el estrés oxidativo; así los cambios en los productos de la peroxidación lipídica se evidenciaron por un aumento en el contenido de malondialdehído; *in vitro* el AE mostró una inhibición de la acetilcolinesterasa (54 y 63%, respectivamente a 5 mM) en los los adultos de *T. castaneum*. también se informó inhibición con (E) -anetol y estragol.

Camarillo *et al.* (2009) reportaron que los extractos acuosos y turbios de las diferentes estructuras de *T. filifolia* no causaron efecto insecticida ni repelente significativo. En cambio, los aceites y el (*E*)-anetol mostraron un efecto repelente, tóxico e inhibitorio de la oviposición en adultos y de crecimiento en ninfas de *T. vaporariorum*. Como repelente sobresalió el aceite de flor, aunque su actividad y persistencia se relaciona positivamente con la concentración. El (*E*)-anetol fue más tóxico y efectivo para inhibir la oviposición, pero se requieren concentraciones mínimas de 40 mg/mL para lograr una acción efectiva y en contraste, a concentraciones menores a 3,5 mg/mL estimulan la oviposición (hormoligosis). El aceite foliar fue el más contundente para inhibir el crecimiento ninfal y disminuir su viabilidad. Ninguno de los extractos afectó la duración del ciclo biológico de las moscas. Los extractos de *T. filifolia* representan una alternativa para el manejo de moscas blancas, pero su efectividad depende en gran medida de la concentración, estructuras, formulación y oportunidad de las aplicaciones en campo.

Baldeón (2011) evaluó la actividad insecticida de los aceites esenciales de Tzinsu (*T. minuta*), Quichia (*T. terniflora*) y Zorrillo (*T. zipaquirensis*) sobre la larva del gusano blanco de la papa (*Premnotrypes vorax*), para obtener un bioinsecticida. Los aceites fueron extraídos del vegetal fresco por arrastre de vapor de agua y se preparó diluciones a concentraciones de 0,2 %; 0,4 %; 0,6 %; 0,8 %; 1.0 % aplicándolos en las dietas de la larva para determinar la mortalidad de éstas; tomando como referencia al blanco (papa: *Solanum tuberosum*) y al control insecticida (papa más Carbofuran), indicando que los aceites esenciales tienen efecto insecticida por contacto e inhibición de la alimentación pero a diferente tiempo; pudiendo ser aprovechado este conocimiento para la industrialización de un nuevo plaguicida que preserve el medio ambiente.

El tarragón mexicano (*T. lucida*) tiene amplias aplicaciones en América Latina debido a sus propiedades plaguicidas y nematocidas. Por ejemplo, la combustión de la planta se utiliza artesanalmente en las zonas rurales de México para la fumigación de casas y corrales infestados con pulgas, y para ahuyentar moscas y mosquitos, *Culex sp.*, *Aedes sp.*, *Anopheles sp.* (Diptera: Culicidae) (Villavicencio *et al.*, 2010). De hecho, la actividad repelente contra mosquitos es la más importante, y la de mayor estudio, por ejemplo, el 5E-ocimenoneno a 40 ppm es efectivo contra larvas de *A. aegypti* en 24 h, y las fracciones de etil acetato con éter de petróleo fueron tóxicas (LD₅₀) en contra de larvas de *A. stephensi* (entre concentraciones de 43 y 58 ppm). De la misma forma, la actividad nematocida del AE de las raíces de *Tagetes* es considerable frente a *M. javanica*, *M.*

arenaria, *Heterodera rostochiensis*, *Ditylenchus dipsaci*, y *Anguina tritici*. Los compuestos que mayor repercusión tienen en las propiedades insecticidas, repelentes, nematocidas, y farmacológicas de *Tagetes lucida*, son terpenoides, flavonoides, alcaloides, poliacetilenos y ácidos grasos, de los cuales, los compuestos que contienen los tieniles (α -tienil) y terpenos (linalool, el más importante, estragol, metileugenol, β -ocimeno, limoneno, cariofileno, piperitona y piperitoneno) han sido los más profundamente investigados (Vasudevan *et al.*, 1997).

Olivero *et al.*, (2009) evaluaron la actividad repelente de tres AEs y un repelente comercial frente a la especie *Tribolium castaneum* Herbst, una de las principales plagas de cereales y productos almacenados. Los AE mostraron actividad repelente y la magnitud del efecto fue dependiente de la concentración utilizada. Los AE con mayor repelencia fueron los de *Lippia organoides* y *Citrus sinensis*, mientras que con menor actividad fue el de *Cymbopogon nardus*. Demostrando así que los AEs son una fuente importante de repelentes, por lo que podrían ser usados para el control biológico de insectos.

Otras especies de plantas muestran un potencial importante como repelentes naturales, habiendo presentado actividad repelente frente a insectos, estudiando de estos sus aceites esenciales o extractos con diferentes disolventes; así Nayive *et al.* (2016) evaluaron la actividad repelente y citotóxica del extracto etanólico obtenido de *Palicourea guianensis* del departamento del Chocó, frente al escarabajo rojo de la harina *Tribolium castaneum*, considerado una de las principales plagas de los granos almacenados. Los ensayos de la actividad repelente fueron realizados por el método de área de preferencia y para evaluar el efecto insecticida por el método de impregnación de papel. En sus resultados: el extracto mostró buena actividad repelente contra *T. castaneum*, este efecto fue dependiente de la concentración utilizada, pero no reportó toxicidad frente a la especie *T. castaneum*.

Muthee *et al.* (2016) realizaron una revisión de la actividad repelente de *Tagetes minuta* contra tres especies de mosquitos: *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles Stephensi*. La prueba de repelente empleó la técnica "human-bait", El AE de *Tagetes minuta* obtuvo una proporción de 86.4, 84.2 y 75.0 % de protección contra *A. stephensi*, *C. quinquefasciatus*, y *A. aegypti*, respectivamente después de un período de estudio de 6 horas. Sus constituyentes principales fueron (*Z*)-tagetona, (*E*)- β -ocimeno y se encontró

que la dihidrotagetona tiene buena actividad repelente contra *Triatoma infestans* (el insecto vector de la enfermedad de Chagas).

Jaramillo (2014) determinó la composición química del aceite esencial de varias especies de *Piperáceas* (*Piper dilatatum*, *Piper aduncum*, *Piper divaricatum*, *Piper sp*, *Piper sanctifelicis*) y la actividad repelente de ellos contra el gorgojo de granos almacenados *Tribolium castaneum* Herbst. Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación, la identificación de los componentes volátiles se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y para la evaluación de la actividad repelente se empleó el método de área de preferencia. Los compuestos mayoritarios encontrados en *Piper dilatatum* fueron el apiol 89,0% y trans-cariofileno (3,5%); en *Piper divaricatum*, eugenol (37,5%) y metil eugenol (36,3%); *Piper sp*, gurjuneno (o guaieno) (24,9%) y elemol (14,2%); *Piper sanctifelicis*, 3-careno (35,3%) y limoneno (27,1%); *Piper aduncum*, dilapiol (48,2%) y 1,8 cineol (11,4%). Los porcentajes de repelencia de los aceites esenciales a una concentración de 1 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, con exposición de 2 horas fueron: *Piper aduncum* (99%), *Piper sp* (96%), *Piper dilatatum* (82%), *Piper divaricatum* (76%), *Piper santifelicis* (33%).

Souto *et al.* (2012), señala que las plantas de pimienta en el género *Piper* son comunes en la Amazonía brasileña y muchas producen compuestos con actividad biológica contra plagas de insectos. Evaluó el efecto insecticida de los aceites esenciales de *Piper aduncum*, *Piper marginatum* (quimiotipos A y B), *Piper divaricatum* y *Piper callosum* contra los trabajadores de la hormiga de fuego *Solenopsis saevissima* (Smith), así como su composición química por Cromatografía de gases -espectrometría de masas. Se obtuvo la menor concentración letal media (CL50) en 48 h con el aceite de *P. aduncum* (58,4 mg / L), seguido por los aceites de *P. marginatum* tipo A (122,4 mg / L) y B (167,0 mg / L), *P. divaricatum* (301,7 mg / L) y *P. callosum* (312,6 mg / L). Los principales constituyentes químicos fueron dillapiole; P-mentha-1 (7), 8-dieno; 3,4-metilendioxiopropiofenona; (E) - β -ocimeno; Isoosmorhizol;(E) -anetol; isoosmorhizol; (Z) -anetol; Metileugenol; eugenol; safrole; metileugenol y β -pineno (6,2%). Estos constituyentes químicos han sido previamente conocidos por poseer propiedades insecticidas.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

Las plagas constituyen la principal limitante de la producción agrícola. Cada año, una tercera parte de la producción de alimentos se destruye, por plagas en cultivos y en productos almacenados, por lo cual se hace imprescindible el estudio de nuevas vías para su control (Medina, 2001). Este se ha basado, tradicionalmente, en el uso de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales han producido, como efecto secundario, problemas de desequilibrio ambiental, salud humana y el surgimiento de poblaciones de plagas más agresivas (FAO, 2002). Son responsables además de resistencia a insecticidas por parte de los insectos (Bourguet et al., 2000) y la pérdida de predadores naturales y polinizadores (Freemark, 1995), que han visto alterado su ciclo de vida a causa de estos productos. En humanos, existe referencia de una alta incidencia de enfermedades y diversos cuadros clínicos por intoxicación, al encontrarse elevados niveles de pesticidas en la población (Waterhouse, 1996; Ramírez, 2001). La mayor parte de la producción y exportación de muchos productos alimenticios, entre ellos granos, está orientada a la certificación como producto orgánico (libre de plaguicidas), pero la gran demanda que algunos de ellos tienen generan grandes producciones que fomenta el desarrollo de su cultivo de manera convencional (con plaguicidas), más aún en territorios, en donde puede sucumbir a las plagas; por lo que el uso de insecticidas químicos dificulta la exportación de productos. Esta situación genera que los mercados internacionales, intensifiquen sus medidas de inspección y control sanitario ante la posible presencia de lotes de alimentos con residuos de plaguicidas no autorizados y que exceden los límites máximos permisibles establecidos por las Autoridades Sanitarias. Existiendo un reducido número

de plaguicidas oficialmente registrados y autorizados para el control de plagas en el cultivo y almacenamiento de granos que genera problemas en las exportaciones; por lo que se tiene la necesidad de ampliar la gama de plaguicidas oficialmente registrados; especialmente los de origen biológico; pudiendo posibilitar la exportación el uso de insecticidas orgánicos (Gestión, 2014). Estos problemas han llevado a la búsqueda de alternativas de control incluidas en el desarrollo de agrosistemas sostenibles, basados en un manejo integrado del cultivo sin alterar el equilibrio del sistema (Bunch, 1997). Una de estas alternativas es el uso de extractos vegetales que actúan como biocontroladores, debido a la presencia de metabolitos secundarios (Cuttler y Schmutters, 1999; Ducrot, 2005).

El maíz (*Zea mays* L.) es un producto agrícola de gran importancia económica y social, siendo utilizado principalmente en la alimentación humana, animal y a nivel industrial (FAO, 2003). *Pagiocerus frontalis* (Fabricius) conocido por los agricultores como “gorgojo barrenador andino de los granos del maíz” o “gorgojo del maíz”, es considerada como una plaga clave en el Cusco, donde se le considera un recurso alimentario de gran importancia y es un cultivo tradicional. Las infecciones en el grano del maíz inician desde el campo en las mazorcas maduras y en los granos mal cubiertos por las brácteas. El daño, continúa en lugares del secado del maíz y finalmente se hace más fuerte en el almacén. Los adultos realizan el daño al ingresar al interior del grano, y junto con la larva se alimentan del almidón. Los granos dañados se encuentran contaminados de excrementos y restos de exuvias y de los insectos muertos, presentando un olor desagradable (Ministerio del Ambiente MINAM, 2015) siendo este maíz no apto ya para el consumo humano, llegando a perderse.

Para el control de estas plagas es común la utilización de insecticidas de síntesis química como productos fosforados, clorinados, carbamatos y piretroides; los cuales son altamente contaminantes y tóxicos, dañan no sólo nuestra salud, sino también el medio ambiente (Aldana, 1994).

El uso continuo de insecticidas contamina el medio ambiente, crean problemas de salud en humanos asociados principalmente con riesgos de intoxicación, presencia de residuos de insecticidas en alimentos, etc., (García, 2014), lo que hace necesario la búsqueda de alternativas con la finalidad de proteger a los cultivos de las plagas sin provocar daño al ambiente y a humanos, búsqueda de nuevos insecticidas y repelentes amigables y

efectivos (Camarillo, 2009). El almacenamiento de algunos granos, tal es caso del maíz, requiere del uso de insecticidas con el fin de garantizar su preservación evitar el daño por plagas como el gorgojo *Pagiocerus frontalis* (Aldana 1994).

Los aceites esenciales, que son metabolitos secundarios presentes en las plantas podrían ser una alternativa al uso de insecticidas sintéticos. El desarrollo de plaguicidas a partir de aceites esenciales, muestran más ventajas, entre ellos, en su eficacia, baja toxicidad y su disponibilidad (Sánchez, 2011).

Nuevos plaguicidas, basados en estos aceites podrían constituir un punto de partida para el desarrollo futuro de productos comercialmente competitivos como alternativa orgánica y ecológica; por lo que se evaluó la ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE PAMPA ANÍS (*Tagetes filifolia* Lag.) SOBRE EL GORGOJO DEL MAÍZ (*Pagiocerus frontalis*), y poder constituir una alternativa de solución como un recurso ecosostenible en el control de plagas en la conservación del maíz.

2.2 Enunciados del problema

- ¿Presentará actividad insecticida el aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.) sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*)?

2.3 Justificación

El aumento de la producción agrícola ha generado la búsqueda de nuevas técnicas que permitan desarrollar un buen manejo de los granos almacenados y otros productos agrícolas que garanticen el uso de estos recursos para las generaciones futuras y a su vez ayuden al mantenimiento de la buena salud en los humanos (Olivero-Verbel et al., 2009). Los daños que ocasionan los insectos y otras plagas de los granos, en productos alimenticios son en ocasiones incalculables. De acuerdo con lo reportado por Silva et al. (2006), las pérdidas generadas por estos organismos antes de la cosecha y en el almacenamiento, oscila entre 20 y 80 % del total anual producido, sobre todo porque afectan la calidad y el valor comercial del producto (Saini y Rodriguez, 2004; Vergara, 1994). Para su control por lo general se utilizan compuestos químicos (Bourguet et al., 2000; FAO, 2002) conocidos como plaguicidas. Sin embargo, su uso indiscriminado ha

generado un problema de contaminación por sus efectos negativos irreversibles en la mayoría de los ecosistemas, causando problemas toxicológicos en animales, plantas y ser humano. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, aumenta su persistencia lo cual trae como consecuencia el surgimiento de nuevas generaciones resistentes a los plaguicidas (Riebeiro et al., 2003; Limoe et al., 2007; Rosegrant et al., 2007; Céspedes y Alarcón, 2011).

A partir de la necesidad por encontrar nuevas alternativas naturales para el control de insectos plagas y reemplazar así los pesticidas sintéticos, aparecen los compuestos bioactivos presentes en las plantas ofreciendo seguridad al medio ambiente y una opción agronómica eficiente (Calderón et al., 2001; Gonzáles et al., 2002). Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas importantes contra insectos (Ducrot, 2005; Céspedes y Alarcón, 2011); entre los más importantes están terpenos, lignanos, alcaloides, esteroides, sesquiterpenos, aldehídos y ácidos grasos (Dixon, 2001; Ducrot, 2005; Vázquez et al., 2007). Hasta la fecha son pocos los estudios donde se ha evaluado la actividad repelente e insecticida de los extractos obtenidos de plantas endémicas.

El maíz, para los agricultores de la Sierra, constituye una parte importante de su alimentación por lo cual almacena una cantidad apreciable de su producción. Además, parte de este maíz es utilizado como semilla en el siguiente ciclo de cultivo.

El gorgojo *Pagocerus frontalis*, se encuentra distribuido en todas las áreas maiceras del valle Sagrado en el Cusco donde puede producir hasta el daño total del grano, en condiciones de una alta población de la plaga. Desde la madurez fisiológica del grano hasta su almacenamiento deben aplicarse varias medidas para evitar que el gorgojo encuentre el grano.

Los metabolitos secundarios de origen vegetal constituyen una importante línea de investigación en el control integrado de plagas y vectores, así los resultados de la presente investigación serán un aporte al conocimiento científico de los aceites esenciales como insecticida para insectos que depredan granos durante su almacenamiento y es importante diseñar sustancias con escasa toxicidad al ser humano y al ambiente. Una alternativa podría ser *T. filifolia*, ante la posibilidad de ampliar el uso actual de esta planta como un recurso ecosostenible y posibilitar su empleo en el control de plagas en la conservación del maíz, por lo que este trabajo tiene como objetivo extraer el aceite esencial y demostrar

el efecto insecticida sobre *Pagiocerus frontalis* “gorgojo del maíz” en condiciones de laboratorio.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad insecticida del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.) sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*).

2.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el rendimiento de obtención del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.), por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger.
2. Caracterizar las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial.
3. Determinar el perfil del espectro UV-Vis y espectro IR del aceite esencial.
4. Determinar la composición química del aceite esencial por cromatografía de gases-espectrometría de masas.
5. Determinar la concentración letal media sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*).

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

El aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.) presenta actividad insecticida sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*).

2.5.2 Hipótesis específicas

1. El rendimiento de obtención del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.), por el método hidrodestilación con trampa de Clevenger será bajo.
2. La caracterización de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial serán semejantes a las especies de su familia.
3. El perfil del espectro UV-Vis y espectro IR del aceite esencial, serán semejanes a las especies de su familia.

4. La composición química del aceite esencial por cromatografía de gases-espectrometría de masas, serán semejantes a los reportados en esta especie.
5. La concentración letal media sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*) se da en concentraciones menores y presenta buena actividad insecticida.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

Laboratorio de Fitoquímica- Escuela Profesional de Química- UNSAAC, laboratorios que se encuentran equipados con material y equipos requeridos para el presente trabajo de investigación.

Laboratorio de Farmacodinamia y Toxicología – Escuela Profesional de Farmacia – UNSAAC.

3.2 Población

La población está conformada por la Especie vegetal *Tagetes filifolia* Lag, del departamento del Cusco.

3.3 Muestra

La muestra estaba conformada por 5 kg de *T. filifolia* en floración.

3.4 Método de investigación

Diseño de muestreo: La muestra fue colectada en el Departamento del Cusco, en la etapa de floración de la especie. Se realizó aplicando la técnica de muestreo no probabilístico.

Tipo de investigación: El tipo de estudio es Descriptivo – Experimental.

Se describe las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y la composición química de los aceites esenciales. Es experimental – correlacional, orientado a demostrar la actividad insecticida (CL₅₀) del AE, mediante la correlación de la variable independiente con la variable dependiente.

Descripción de variables

Variables del estudio descriptivo

- Rendimiento de obtención del AE por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger.
- Características organolépticas y fisicoquímicas del AE.
- Perfil del espectro UV-Vis y del espectro IR del AE.
- Composición química del AE.

Variables del estudio experimental

Variable independiente: Concentración del AE.

Definición conceptual. Se define como la cantidad de AE necesario para 100 mL de dilución.

Definición operacional

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Expresión final: Porcentaje dilución (g de AE/100 mL de dilución).

Variable dependiente: Concentración letal media de Pampa Anís (*T. filifolia*) sobre Gorgojo del maíz (*P. frontalis*)

La mortalidad medida en el tiempo para la obtención de la CL₅₀.

Definición conceptual. Concentración letal 50 es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50 % de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado. Determinándose éste podemos

determinar la actividad insecticida, definida como la capacidad inherente de una sustancia de origen sintético o natural o incluso organismos vivos para el control de insectos. Un insecticida es un compuesto químico utilizado para matar insectos. El origen etimológico de la palabra insecticida deriva del latín y significa literalmente matar insectos.

Definición operacional

Naturaleza: Cuantitativa.

Forma de medición: Directa.

Escala de medición: Razón.

Expresión final: Concentración letal media (CL₅₀).

Variables intervinientes:

Del gorgojo *Pagiocerus frontalis*:

Controladas: alimentación, adaptación, tiempo del efecto insecticida

No controladas: peso, sexo, edad.

- **De la especie vegetal Pampa Anís (*T. filifolia*):**

Se tomó en cuenta el lugar de recolección, estadio de crecimiento, parte recolectada.

- **Diseño de la investigación: Actividad insecticida**

Para determinar la CL₅₀ del AE sobre *P. frontalis* se siguió el diseño de Post Prueba y Grupo control de la siguiente manera:

Tabla 2

Diseño de la investigación

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
6G ₁	X ₁	O ₁
6G ₂	X ₂	O ₂
:	:	:
6G ₉	X ₉	O ₉
6G ₁₀	X ₁₀	O ₁₀
6G ₁₁	---	O ₁₁

Donde:

6G₁, 6G₂,..., 6G₁₀, 6G₁₁: .grupos cada uno de 20 gorgojos de *Pagiocerus frontalis*, con 6 repeticiones.

X₁, X₂,..., X₉: Son las diferentes concentraciones del AE de *Tagetes filifolia* Lag. (0,1; 0,5; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10%)

X₁₀: Concentración del insecticida patrón.

---: Solución blanco.

O₁, O₂,..., O₉, O₁₀, O₁₁: Observación y reporte de la muerte de *Pagiocerus frontalis*, determinada con CL50

3.4.1 Materiales

Material botánico : Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.)

Material biológico : Gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*)

Patrón : Insecticida comercial: Gastión 3 g/tab (fosfuro de aluminio)

Materiales de campo

- Cuaderno de campo
- Etanol al 96 %
- Cámara
- Tijeras
- Plumón indeleble

- Bolsas de papel Kraft
- Etiquetas de camp

Materiales y equipos de laboratorio

- Baguetas
- Embudos
- Frasco ámbar 10 mL
- Potes de 200 mL
- Pipetas de 2-10 mL
- Tubos de ensayo
- Pipetas Pasteur
- Papel filtro
- Papel indicador
- Matraz de 100 y 500 mL
- Probetas de 100 mL
- Balón 2000 mL
- Trampa de Clevenger
- Termómetro
- Alcoholímetro
- Vasos de precipitados.
- Matraces de 50 y 100 mL
- Goteros
- Picnómetro
- Bureta
- Lupa
- Termómetro
- Higrómetro

Equipos

- Espectrofotómetro UV-Visible PG Instrument Ltd.
- Cromatógrafo de gases THERMO con columna capilar HP-5MS
- Polarímetro marca Rudolph Research Analytical
- Espectrómetro IR

- Refractómetro ABBE SCHMIDT
- Vortez BENCHMARK
- Equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger
- Balanza electrónica
- Micropipeta automática
- Baño de agua
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.001g OHAUS
- Equipo destilador de agua

Reactivos

- Ácido clorhídrico conc.
- Ácido clorhídrico 0,0958 N
- Agua destilada
- Etanol al 40, 70, 96 %
- Etanol absoluto Q.P.
- Éter etílico
- Cloroformo
- Hexano
- Heptano
- Indicador fenolftaleína al 0,1% m/v
- Metanol Q.P.
- Sulfato de sodio anhidro
- Solución estándar de KOH 0, 0136
- Solución etanólica de KOH 0,1 N
- Tween 80

3.5 Descripción detallada de métodos por objetivos específicos

3.5.1 Determinación del rendimiento de obtención del aceite esencial

A. Colección de muestras vegetales

La muestra fue colectada en la Comunidad de Occopa, distrito de Santiago, Departamento del Cusco, (altitud 3952.92 m.s.n.m), parte aérea de la planta en la etapa de floración, partes de plantas en buen estado, alejado de viviendas y carreteras. En el mes de abril del 2018. Una vez colectada se procedió a la selección y limpieza de la planta. Posteriormente se secó en un ambiente sombreado, protegido del sol a temperatura ambiente.

B. Obtención de aceites esenciales por hidrodestilación con trampa de clevenger

La hidrodestilación es la forma más habitual de obtención de los AE, se basa en las propiedades de volatilidad y de ser arrastrables en corriente de vapor de agua que poseen.

Para esto se montó el equipo de hidrodestilación con trampa de Clevenger, que se muestra en el Anexo fotográfico N°4, con los siguientes pasos:

- Colocar en un balón de 2 L, 70 g de la planta seca de *Tagetes filifolia* cortada en trozos pequeños de aproximadamente 2 cm, parte aérea (flores, tallos y hojas) agregamos agua destilada hasta cubrir la muestra de la planta.
- Someterla a calefacción para extraer el aceite, para lo cual se montó el balón en una canastilla de calentamiento. Colocar con cuidado la trampa de Clevenger, y sostener con pinzas la boca que lleva el refrigerante. Colocar las mangueras al refrigerante. Conectar la canastilla y comenzar a calentar cuidadosamente hasta ebullición.
- Asegurándonos que el reflujo es el adecuado, sometida a calefacción, se arrastró los componentes volátiles del material vegetal hacia una trampa fría (codo de destilación con refrigerante) donde se condensan. Debido a la diferencia de densidad con respecto al agua y a su insolubilidad en la misma, sobrenadaron en ella. El aceite irá separándose en la bureta de la trampa.

- Se suspenderá el refluo cuando se considere que ha sido suficiente y ya no se observe extracción del aceite. Cada muestra fue sometida a 3 h de hidrodestilación.

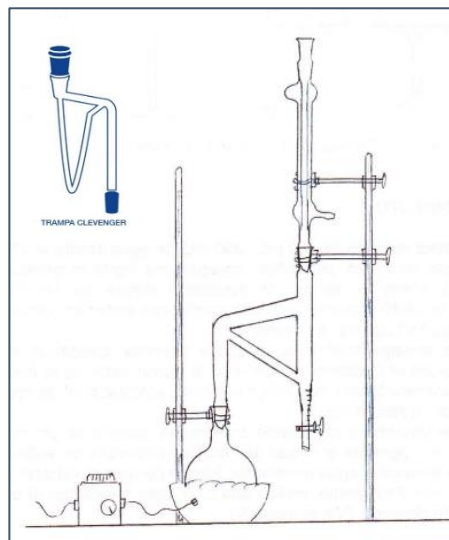


Figura 15. Hidrodestilación con trampa de Clevenger

Fuente: Del Valle y Delgado (2015)

Preparación de la muestra

La preparación de la muestra es el último paso, el AE se decantó, se eliminó todo rastro de agua, deshidratándolo con sulfato de sodio anhidro, se adicionó el 10 del peso del AE, se agitó vigorosamente y luego se filtró y vertió en un vial de vidrio de color ámbar; se conservó a 4 °C.

C. Determinación del rendimiento del aceite esencial

El rendimiento del AE (% v/m) se determinó mediante la expresión:

$$P = (V/M) * 100$$

Dónde: V es el volumen final del AE y M la masa de la planta.

3.5.2 Caracterización de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial

A. Características organolépticas

Estado y Color. Se tomó un tubo de ensayo bien limpio y seco hasta las tres cuartas partes con la muestra y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación de capas, se informaron los resultados. Se realizó un análisis visual del aspecto externo.

Olor. Se tomó una tira de papel secante aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se olió y determina si correspondió con las características del producto.

Sabor. Se apreció la sensación que ciertas sustancias producen en el órgano del gusto.

B. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

Para determinar las principales propiedades fisicoquímicas del AE de *Tagetes filifolia* Lag. se utilizaron métodos y técnicas estandarizadas.

a. 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 AE y los disolventes.

Método: Solubilidad en diferentes disolventes.

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

Procedimiento: A 0,2 mL de AE en diferentes tubos se adicionó 1 mL de disolvente y luego se repitió de la misma manera con los demás disolventes, cada uno por triplicado, a condiciones ambientales.

Técnica: Norma INDECOPI 319.084 (Chavez, 2002)

Tabla 3

Disolventes para las pruebas de solubilidad

Agua destilada	Cloroformo
Metanol	Acetona
Etanol al 40 %	Éter etílico
Etanol al 60 %	Acetato de etilo
Etanol al 70 %	Tween 80
Etanol al 90 %	
Etanol absoluto	

Fuente: Elaboración según la información recopilada (Dominguez, 1973).

b. Densidad relativa:Método: PicnómetroFundamento: Es la relación que existe entre la masa de un volumen del AE y la masa de un volumen igual de agua destilada a la temperatura de 20 °C como referencia.

Con la siguiente fórmula:

$$d = \frac{P_2 - P}{P_1 - P}$$

Donde:

d = Densidad

P = Masa en gramos del picnómetro vacío.

P1 = Masa en gramos del picnómetro lleno con agua destilada.

P2 = Masa en gramos del picnómetro lleno con AE.

Procedimiento: Se pesó el picnómetro vacío, limpio y seco, luego se determinó la masa del picnómetro, para lo cual se llenó con agua destilada, evitando la formación de burbujas de aire. Se sumergió en un baño de agua a 20 °C. Cuando alcanzó la temperatura deseada, se enrazó la rama capilar del picnómetro con agua destilada a la misma temperatura y se tapó, se extrajo del baño de agua, limpió y se secó para determinar su masa. El picnómetro se vació y lavo con etanol, se secó y

posteriormente se llenó con el AE, y se procedió de igual forma que para el agua destilada y se determinó su masa.

Técnica: Norma INDECOPI 319.081

c. Índice de refracción:

Método: Refractómetro ABBE

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

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 AE, se esperó a que se establezca la temperatura y se determinó la lectura en el refractómetro de Abbe.

Técnica: Norma INDECOPI 319.075 (Olsen, 1990).

d. Rotación óptica:

Método: 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 α , que forman los planos de polarización del haz emergente en la sustancia, denominado ángulo de rotación óptica (Millar, 2003).

Procedimiento: Para la determinación de la rotación óptica se preparó una solución de AE al 1 % en etanol absoluto. 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 AE a 20 °C, luego se hizo la lectura de la rotación óptica en el polarímetro.

e. Índice de acidez:

Método: 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 se expresa como el número de mg de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos libres contenidos en 1 g de AE. Se calculó según la siguiente fórmula (Lock, 1994):

$$\text{IA} = \frac{56.1 \times V \times N}{M}$$

Donde:

V = mL de KOH gastados

N= Normalidad de KOH 0,00089

56.1= Meq de KOH en mg

M= Muestra en gramos

Procedimiento: En un matraz Erlenmeyer de 100 mL se pesaron 0.3 g de AE, se agregó un volumen de 5 mL de etanol neutralizado, se agregaron dos gotas de indicador fenolftaleína al 0.1 %, luego se tituló con solución estándar de KOH 0.00089 N hasta el cambio de viraje de color rosado.

Técnica: Norma INDECOPI 319,085 (Olsen, 1990).

f. Índice de saponificación

Método: Volumétrico

Fundamento: El índice de saponificación es la medida de ácidos grasos esterificados que existen en una muestra, luego de una saponificación, titulando los ácidos grasos

libres. El índice de saponificación representa los mg de KOH necesarios para la saponificación de 1 g de grasa. Se determina con la siguiente fórmula (Chávez, 2002):

$$IS = \frac{56.1 \times N (V-V')}{M}$$

Donde:

V = Volumen en mL de HCl en el blanco

V'= Volumen en mL de HCl en la muestra

N= Normalidad de HCl 0,099 N

56.1= Meq de KOH en mg

M= Muestra en g

Procedimiento: En un balón de vidrio de 250 mL, se pesaron 0.5 gramos de AE, se agregaron 15 mL de solución etanólica de KOH 0.1 N, luego de reflujar por 30 min, se enfrió y añadió tres gotas de indicador fonolftaleína al 0.1 %, se tituló con la solución estándar de HCl 0.099 N hasta el cambio de viraje de color. Se realizó la titulación en blanco, con una muestra de AE sin hidrolizar.

3.5.3 Determinación del perfil del espectro UV-Vis y espectro IR del aceite esencial

Determinación del espectro UV-Vis

Para el análisis espectral de la muestra, el espectrofotómetro UV-Vis se calibró con etanol absoluto en un rango de longitudes de onda entre 190 y 600 nm. Se preparó la solución de AE, disolviendo 2 µL de muestra a 10 mL con etanol absoluto, de esta solución se hizo una dilución, 0,1 mL a 2,5 mL con etanol absoluto. La solución se colocó en las cubetas del instrumento y se determinó el perfil espectroscópico.

Determinación del espectro IR

Se utilizó un espectrometro IR con transformadas de Fourier (FTIR) con dispositivo ATR (Reflectancia total atenuada), El accesorio ATR funciona midiendo los cambios que ocurren en un haz IR reflejado internamente cuando el haz entra en contacto con

una muestra. Un haz IR se dirige a un cristal ópticamente denso con un alto índice de refracción en cierto ángulo. Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal hacia la muestra mantenida en contacto con el cristal.

En las regiones del espectro IR donde la muestra absorbe energía, la onda evanescente se atenuará. El haz atenuado regresa al cristal, luego sale del extremo opuesto del cristal y se dirige al detector en el espectrómetro IR. El detector registra el haz IR atenuado como una señal de interferograma, que luego puede usarse para generar un espectro IR.

Los espectros IR fueron determinados directamente en el AE puro, el cual fue aplicado en forma líquida en el aditamento ATR del espectrómetro FTIR Nicolet iS10, en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} , con resolución espectral menor o igual a 0.4 cm^{-1} .

3.5.4 Determinación de la composición química del aceite esencial por cromatografía de gases–espectrometría de masas

La determinación de la composición del AE se realizó por GC-MS.

Metodología: Para el análisis, en un frasco se diluyó el AE con *n*-heptano, en una proporción de 100 μL de AE con 700 μL de disolvente. La dilución se inyectó al cromatógrafo de gas.

El análisis se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

Cromatógrafo: THERMO Trace 1310

Espectrómetro de Masas: THERMO ISQ QD

Columna capilar: HP-5MS (Polimetilsiloxano 19091S–133) (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Temperatura del horno: Inicial 60° C, Final 240 °C

Tiempo de análisis: 52 min

Tipo de gas: Helio

Flujo: 1 mL/min

Volumen de inyección: 1 μ L

La identificación se basó en la comparación de las señales del espectro de masas de cada componente con los datos compilados en la librería NIST 11 y con base de datos de librería MAINLIB.

3.5.5 Determinación de la concentración letal media sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*)

La actividad insecticida del AE fué evaluada, determinándose la mortalidad de los gorgojos, hallando el porcentaje de mortalidad CL₅₀ y CL₉₀.

A. Colección y adecuación de los insectos *pagiocerus frontalis*

Se utilizaron insectos adultos, los cuales se obtuvieron y colectaron de maíz infestado con gorgojo de los campos de cosecha y secado de maíz, libre de tratamiento con insecticidas de los agricultores del Distrito de San Salvador- departamento de Cusco, se seleccionó a los gorgojos mediante observaciones de las características externas de la especie.

Crianza de gorgojos: los insectos fueron criados, adaptados y se reprodujeron a las condiciones de laboratorio, en un recipiente de tecnopor, al cual se le hizo dos pequeñas ventanas con tela de organza, con sus respectiva tapa, para evitar que los gorgojos escapen, ver Anexo fotográfico N° 11; como alimento se utilizó maíz blanco de Urubamba, en mazorca y desgranado, libre de insecticidas. La temperatura de crianza de los gorgojos estuvo en un rango de 14 a 16 °C, con una humedad de 60 a 65%.

B. Determinación de la concentración letal media

La actividad insecticida del AE sobre la especie *Pagiocerus frontalis* fué evaluada determinándose la CL₅₀. Mediante el método de impregnación de papel, de acuerdo con lo reportado por Taponjoui et al. (2005). Condiciones del laboratorio fueron: temperatura 15 a 16 °C, humedad relativa de 60 a 65 %.

Concentraciones del AE: se evaluaron las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10 % v/v del AE. Fueron emulsificados con 0.5 mL de Tween 80, aforados en cada caso a 25 mL de suspensión.

Metodología: Para la evaluación, 1 mL de estas concentraciones fueron aplicadas en papel filtro (8 cm de diámetro). Cada papel filtro se colocó dentro de un recipiente de polietileno cilíndrico descartable de 200 mL, de 8 cm de diámetro. Se liberaron 20 insectos adultos de *Pagiocerus frontalis*, y se taparon los recipientes inmediatamente herméticamente.

Blanco: disolución de tween 80 al 2% v/v.

Patrón: el insecticida Fosfuro de Aluminio, con el nombre comercial Gastión a la concentración de 0.0072 g/200 mL, volumen del recipiente. Para la aplicación del patrón se usó un equipo de protección personal, como barbijos, guantes, lentes y mandil; por ser este producto muy tóxico.

El número de insectos muertos se registraron a las 2, 4, 8, 16, 48 y 72 h de exposición. Asimismo, para cada tratamiento (concentración de AE, blanco y patrón) se llevaron a cabo seis repeticiones o réplicas. Con los resultados obtenidos se evaluó la mortalidad de los gorgojos, el porcentaje de mortalidad, la CL₅₀ y CL₉₀.

PORCENTAJE DE MORTALIDAD: El porcentaje de mortalidad o tasa de mortalidad, se determina para hallar con estos datos la CL₅₀, este fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación publicada por Abbott (1925):

$$Mortalidad (\%) = \frac{100 (\% \text{ muertos tratados} - \% \text{ muertos control})}{100 - \% \text{ muertos control}}$$

CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA: Las concentraciones letales medias CL₅₀ y CL₉₀ se determinaron por el método Probit con regresión lineal. El procedimiento Probit permite encontrar estimadores m-verosímiles de parámetros de regresión y de tasas naturales (por ejemplo, tasas de mortalidad) de respuesta para ensayos biológicos cuantales, analizando porcentajes de efecto vs. dosis dentro del marco de la regresión.

El principal objetivo 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 CL_{50} por concentración letal media. Consiste básicamente en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los fenómenos físicos peligrosos; da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición.

El análisis Probit se realizó con el programa estadístico SPSS 22. En la Tabla 4 se resumen las condiciones del desarrollo para determinar el efecto insecticida.

Tabla 4

Condiciones para determinar el efecto insecticida

Parámetro	Condición
Tipo de ensayo	Insecticida por el método de impregnación de papel
Concentración del AE	0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10 %, AE con 0.5 ml de Tween 80 aforado con agua a 25 mL
<i>Pagiocerus frontalis</i>	20 insectos adultos, vivos y sanos
Blanco	Disolución de Tween 80 al 2% V/V
Patrón	Insecticida comercial: Fosfuro de Aluminio (Gastión), 0.0072 g/recipiente
Temperatura	15 a 16 °C
Humedad	60 a 65 %
Recipientes	Envases de polietileno cilíndrico de 200 mL y 8 cm de diámetro
Número de repeticiones	6 por cada concentración
Duración de la prueba	2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas de registro de insectos muertos

DISEÑO ESTADÍSTICO: El experimento se realizó con 6 réplicas empleando un diseño completamente al azar, teniendo como fuentes de variación: aceite esencial (*T. filifolia*), volumen de aceite con con nueve niveles (0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10 %) y tiempo de exposición con 7 niveles (2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas).

Las variables respuestas fueron:

- Porcentaje de mortalidad, determinada por el programa estadístico IBM SPSS 22.

- Concentración letal 50 (CL_{50}), concentración letal 90 (CL_{90}), y se determinó la ecuación logarítmica mediante el diagrama de dispersión, Las concentraciones letales medias CL_{50} y CL_{90} se determinaron por el método Probit con regresión lineal, Para el cálculo de la concentración letal media (CL_{50}) y sus respectivos límites de confianza al 95% fue utilizado el método Probit, para lo cual se preparó una base de datos con los resultados de la mortalidad de los gorgojos hallada en cada una de las dosis evaluadas del AE. El análisis Probit, es un tipo particular de regresión lineal, con el objetivo de conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de tóxico) y una variable dependiente (la respuesta=mortalidad) para una especie y una exposición determinada. Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades Probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual podemos interpolar el 50% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta (CL_{50}). (Alonso, 2013).Consiste básicamente en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre una población a los fenómenos físicos peligrosos; da una relación entre la función de probabilidad y una determinada carga de exposición. El análisis Probit se realizó con el programa estadístico IBM SPSS 22.
- Se hizo un análisis de varianza y una comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$) para determinar diferencias significativas de cada concentración utilizada, empleando el paquete estadístico IBM SPSS22.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación del rendimiento de obtención del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.) por el método de hidrodestilación con trampa de Clevenger

Tabla 5

Porcentaje de extracción del AE de Tagetes filifolia Lag.

Especie	Masa de planta (g)	Volumen (mL)	Rendimiento (% v/m)	Promedio (% v/m)
Muestra 1	70	0.48	0.68	
Muestra 2	70	0.45	0.64	0.64
Muestra 3	70	0.42	0.60	

Análisis y Discusión: En la Tabla 5 se observa el porcentaje de rendimiento de extracción del aceite esencial de la especie en estudio en planta seca, obtenido por hidrodestilación con trampa de Clevenger, el cuál fue de 0.64 % (v/m) relacionado con el peso seco de la planta.

De Feo *et al.*, (1998) informó un rendimiento de 0.47 % (v/m) relacionado con el peso seco. Huillca (2015) reportó un 0.2606 % de rendimiento del AE en planta fresca. Los resultados obtenidos en el presente estudio, al compararlos en la extracción en planta seca, concuerdan con De Feo *et al.*,(1998), siendo un poco más alto el rendimiento de la presente tesis. Esto puede deberse al uso de la trampa de Clevenger, que permite no tener pérdidas en el procedimiento, por ser un sistema cerrado.

La presencia, rendimiento y composición de los metabolitos secundarios en plantas, como en los AEs pueden verse afectados de varias maneras, dependiendo éste de: parte de la planta a extraer, de la etapa de crecimiento, métodos de secado, procesos de extracción, tiempo de extracción, estas pueden estar relacionados con las características propias de la muestra vegetal, de la composición del suelo, clima, localización geográfica, entre otras características; mostrándose una variación notable del rendimiento de extracción, incluso para la misma especie en diferentes puntos geográficos. Estos también son determinantes en la composición y proporción en los AEs.

4.2 Caracterización de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial

A. Características organolépticas

Tabla 6

Características organolépticas del AE de Tagetes filifolia Lag.

Estado y Color	Olor	Sabor
Líquido, ligeramente amarillo verdoso	<i>Sui generis</i>	Dulce a anís

B. Pruebas De Solubilidad

Tabla 7

Pruebas de solubilidad del AE de Tagetes filifolia Lag.

Disolvente	Solubilidad
Agua destilada	-
Etanol al 40 %	+
Etanol al 60 %	+
Etanol al 70 %	+
Etanol al 90 %	++
Metanol	+++
Etanol absoluto	+++
Acetona	+++
Acetato de etilo	+++
Cloroformo	+++
Hexano	+++
Éter etílico	+++

++++ = Muy soluble + = Muy poco soluble

+++ = Soluble - = Insoluble

Análisis y Discusión: En la Tabla 6 se observan las propiedades organolépticas del AE, el cual es un líquido ligeramente amarillo verdoso; el olor es *sui generis* un olor a anís y un sabor dulce también a anís. Estas propiedades son características de la presencia de los metabolitos anetol y chavicol, reportados por GC-MS; estos dos metabolitos aportan el olor y sabor característicos de esta especie. Estas características son propias del AE debido a su composición química.

En la Tabla 7, la prueba de solubilidad establece el disolvente para el AE y establece el tipo de moléculas presentes (compuestos polares o apolares en mayor o menor cantidad), predicción de la polaridad de sus componentes. Dichos resultados en la Tabla 6, evidencia una buena solubilidad del AE en disolventes apolares orgánicos como éter etílico, cloroformo, hexano, acetato de etilo y en alcohol de alto grado; lo que da un

indicio que en el AE estarían presentes compuestos apolares. Se aprecia que el AE es insoluble en agua, es poco soluble en los disolventes polares, como son etanol al 40, 60, y 70 %; por lo que se deduce que posiblemente el AE contiene componentes de carácter apolar y ligeramente polares.

C. Caracterización físicoquímica

Tabla 8

Características físicoquímicas del AE de Tagetes filifolia Lag.

pH	Densidad (g/mL)	Índice de refracción	Índice de acidez	Índice de saponificación	Rotación óptica (grados)
5.64	0.9870	1.5600	0.82	21.64	- 0.092

Análisis y Discusión: Como se observa en la Tabla 8, el AE presentó un índice de refracción es de 1.5600 y la densidad es 0.9870 g/mL; estos valores son similares a los reportados por Huillca (2015), que determinó una densidad de 0.9629 g/mL y el índice de refracción de 1.5560 para esta especie.

Los AEs con valores de densidad superior a 0.9 g/mL y el índice de refracción con valores mayores o iguales a 1.47 tienen en su composición cantidades importantes de compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos (Dominguez, 1979). Con los valores obtenidos, indicaría la presencia de estos compuestos en el AE. Estos resultados se confirman con la determinación de la composición química del AE de *Tagetes filifolia* Lag.

Ortuño (2006) señaló que la mayoría de los AEs, al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos, tienen una densidad menor que el agua, pero hay algunos AEs con densidad mayor, como los de almendras amargas, mostaza, canela, perejil o clavo de olor.

Los componentes del AE de *T. filifolia* indujo una rotación óptica levógira. La mayoría de los aceites esenciales al ser sometidos a una luz polarizada poseen la propiedad de rotar el plano de polarización a la derecha (dextrógiro) o izquierda (levógiro). El conocimiento de este dato es importante como criterio de pureza y control de calidad del

AE; la rotación óptica viene determinada por la estructura molecular de cada sustancia y cada sustancia ópticamente activa tiene su propia rotación específica.

El índice de acidez determinado fue de 0.82 mg/g. Tiene consecuencia directa sobre el contenido de ácidos grasos libres provenientes de la hidrólisis de los glicéridos. Si los valores son superiores a dos indicaría que el aceite fue alterado y sus ácidos grasos libres fueron hidrolizados.

4.3 Determinación del perfil del espectro UV-Vis y del espectro IR del aceite esencial

El espectro UV-Vis del AE muestra características para obtener una información sobre su posible composición y asumir la ausencia o presencia de compuestos cromóforos.

El espectro UV del aceite esencial en el rango de 190 a 600 nm se muestra en la Figura 16.

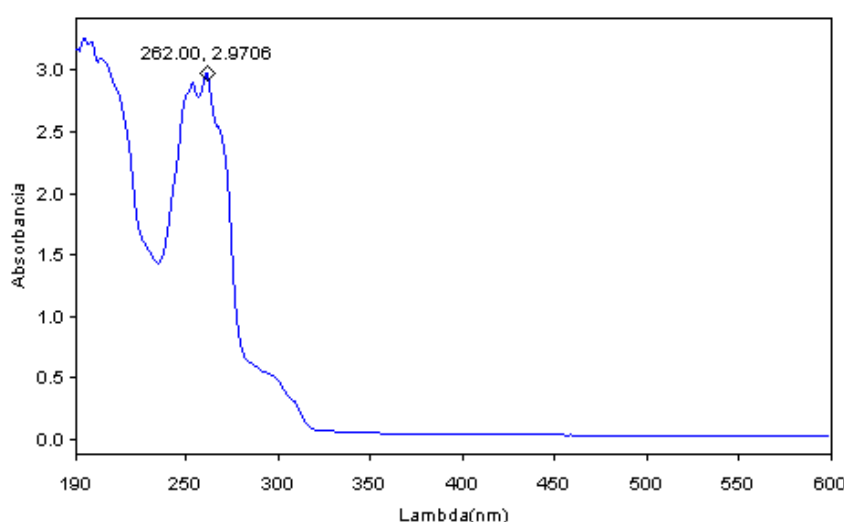


Figura 16. Espectro UV-Vis de aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag.

Análisis y Discusión: En el espectro UV del AE de *T. filifolia* se observa un máximo absorción a 262 nm, valor que se encuentra entre 250 y 270 nm esto es un indicador de la presencia de hidrocarburos aromáticos. Esta característica nos permite acercarnos a su composición aproximada. (Dominguez, 1973; Lock, 1994); los máximos de absorción serían muy cercanos a la absorción de sus componentes mayoritarios, por consiguiente, en la composición del AE de *T. filifolia*, se encontrarían compuestos aromáticos; lo que es corroborado con la determinación de la composición química por GC.

Espectro IR del aceite esencial

Es una técnica analítica instrumental que permite conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de un compuesto. Esta información se obtiene a partir del espectro de absorción de dicho compuesto al haberlo sometido a la acción de la radiación infrarroja en el espectrofotómetro. La región del espectro IR normal queda comprendida entre $2.5 \mu\text{m}$ a $25 \mu\text{m}$, medido en unidades de longitud de onda, que corresponde a 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , respectivamente si se expresa en número de onda (que es el inverso de la longitud de onda, cm^{-1}). En el siguiente gráfico se observa el IR del AE de *T. filifolia*.

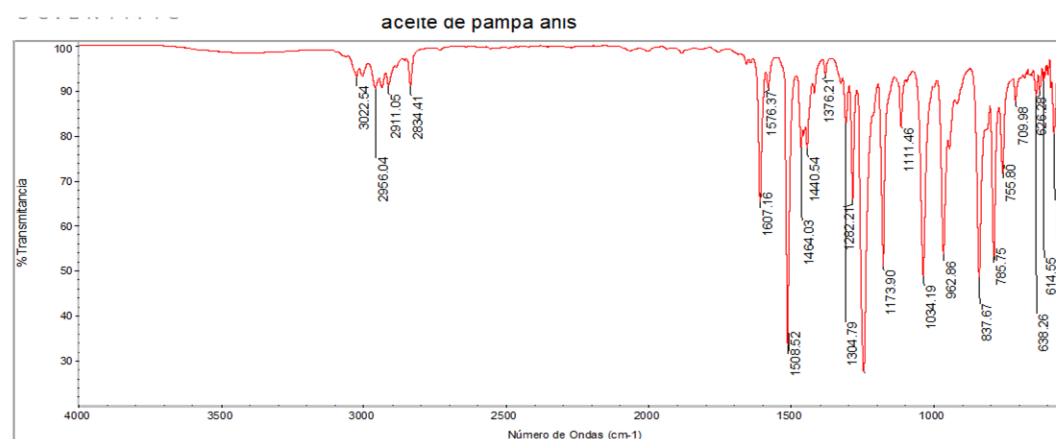


Figura 17. Espectro FTIR- ATR del AE de *Tagetes filifolia* Lag.

Análisis y Discusión: Los espectros FTIR- ATR del AE de *T. filifolia* tienen características de absorción C-O entre 1300 y 1000 (banda característica para éteres), aromáticos entre 1600 y 1475 (absorción C=C) y entre 3000 y 3100 (absorción =C-H), que indican la presencia de estos grupos funcionales propios de una posible estructura de un éter como son los fenilpropanos como el anetol y estragol (Pavia *et al.*, 2008). Componentes que se corroborarían con lo determinado en el espectro UV-Vis y en el GC.

ACEITE DE PAMPA ANIS

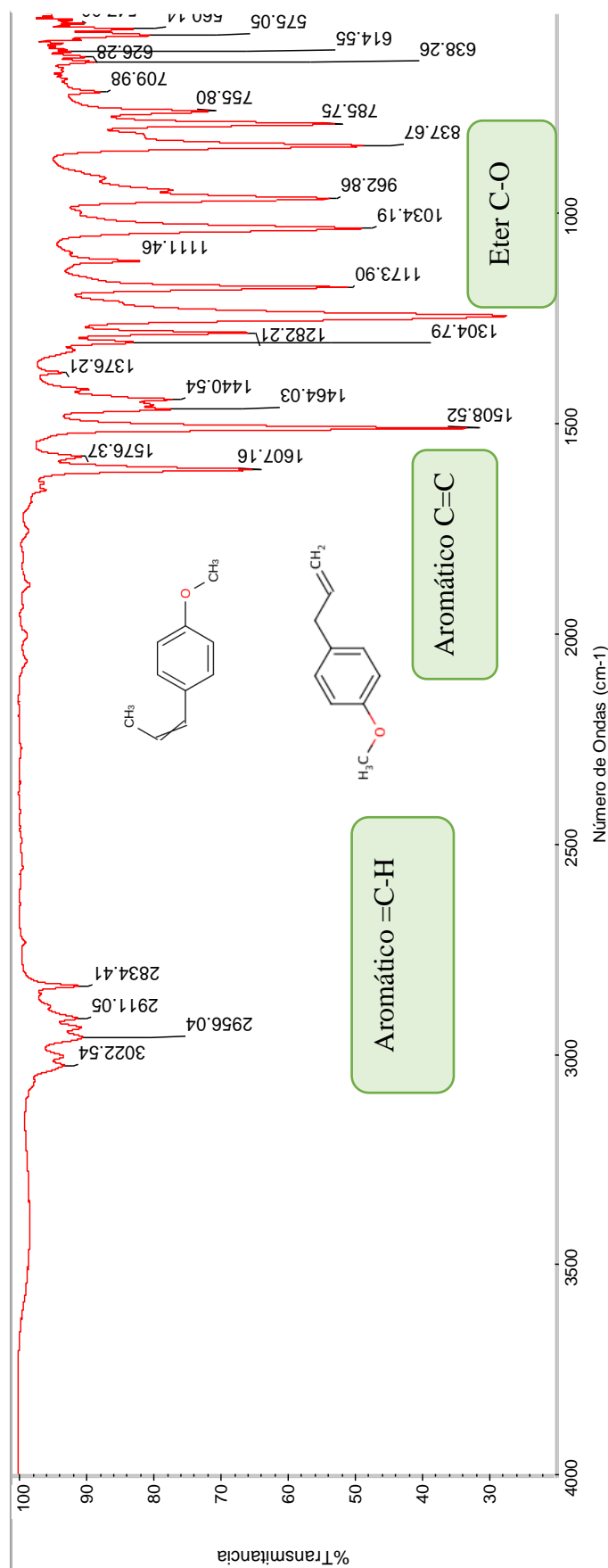


Figura 18. Espectro FTIR- ATR del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag. Número de onda de absorción de grupos funcionales de compuestos aromáticos cíclicos y éteres

4.4 Determinación de la composición química del aceite esencial por cromatografía de gases-espectrometría de masas

El AE se caracterizó mediante GC-MS. Esto incluyó la identificación de los componentes y su cuantificación mediante la determinación de la abundancia relativa o contenido porcentual relativo. La composición química del aceite esencial se muestra en la Tabla 9. Esta tabla muestra la composición porcentual del AE de *Tagetes filifolia* Lag. de las partes aéreas de la planta, toda la composición determinada hace un 99.5 %, del cual los 5 componentes mayoritarios representan el 98.46 %. Los componentes que se encuentran en pequeñas cantidades se les considera traza los que representan < 0.05 % de la composición

Tabla 9

Composición del AE de Tagetes filifolia Lag.

Pico No.	TR (min)	Composición (%)	Compuesto
1	4.85	0	(E)-2-hexenal
2	6.35	0.02	anisole
3	6.86	0	α -thujene
4	7.63	0.01	benzaldehyde
5	7.97	0	sabinene
6	8.28	0	6-methyl-5-hepten-2-one
7	8.84	0.01	octanal
8	8.88	0	(E)-3-hexenyl acetate
9	8.98	0.01	α -phellandrene
10	9.56	0	p-cymene
11	9.72	0	limonene
12	9.89	0	(Z)- β -ocimene
13	10.15	0	phenylacetaldehyde
14	10.42	0.01	dihydrotagetone
15	10.66	0	γ -terpinene
16	11.76	0.01	unknown
17	12.05	0	linalool
18	12.19	0	nonanal
19	13.59 t	0	(E)-tagetone
20	13.72	0.01	camphor
21	14.00 t	0	trans-menthone
22	14.09	0	(E)-2-nonenal
23	14.33	0	isomenthone (cis-menthone)
24	14.85	0	terpinen-4-ol
25	14.97	0	naphthalene
26	15.47	12.83	methyl chavicol (Estragol)
27	15.68	0	decanal
28	16.16 t	0	β -cyclocitral
29	16.38 t	0	β -citronellol
30	16.79 t	0	thymol methyl ether
31	16.82 t	0	pulegone
32	17.36	0.13	p-anisaldehyde
33	17.26	0	(Z)-anethole
34	18.66	84.79	(E)-anethole (Anetol)
35	19.44 t	0.01	(E,Z)-2,4-decadienal
36	19.58	0	(Z)-3-hexenyl tiglate
37	20.16	0	piperitenone
38	21.61	0.05	modheph-2-ene
39	21.82	0.01	α -isocomene
40	22.04	0.21	methyl eugenol
41	22.49	0.24	2,5-dimethoxy-p-cymene
42	23.96 t	0	(E)-isoeugenol
43	23.88 t	0	α -humulene
44	23.55	0.03	geranyl acetone
45	24.42	0.04	unknown MW 220
46	24.66	0.39	germacrene D
47	24.56 t	0.01	β -(E)-ionone
48	24.97	0.19	anisyl acetone
49	25.11	0.1	bicyclogermacrene
50	25.29	0.05	(E,E)- α -farnesene
51	25.43	0.03	β -bisabolene
52	25.75	0.04	δ -cadinene
53	26.96 t	0	(Z)-nerolidol
54	27.94	0.01	p-methoxymandelic acid
55	27.48	0	spathulenol
56	29.32	0.01	epi- α -cadinol
57	29.69	0.01	α -muurolol (delta-cadinol)
58	30.27	0.05	unknown MW 218
59	31.90	0.21	nootkatone
60	34.47	0	(Z)-phytol

*TR= tiempo de retención.

Traza (tr) < 0.05 %

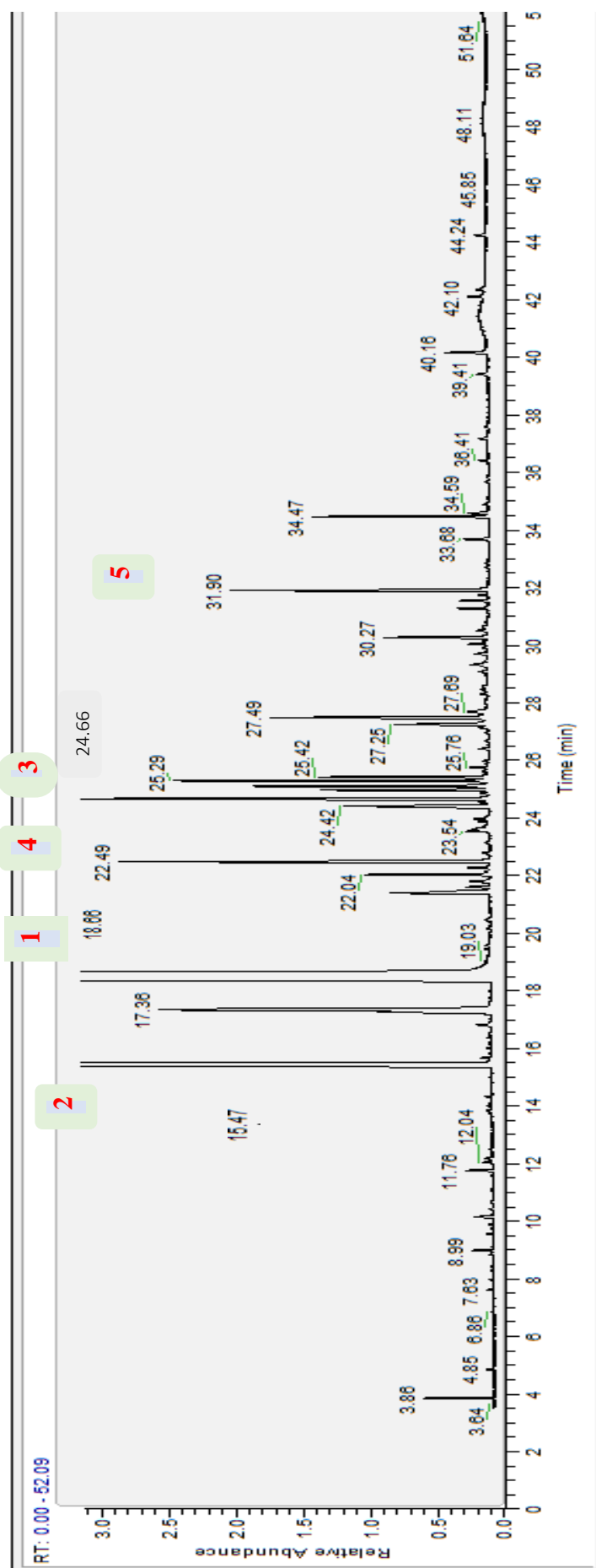
Tabla 10

Compuestos mayoritarios del AE de *Tagetes filifolia* Lag.

N°	TR (min)	COMPOSICIÓN (%)	COMPUESTO	FÓRMULA DE LOS 5 COMPUESTOS MAYORITARIOS
1	18.66	84.79	(E)-anethole (Anetol)	<p><i>trans</i>-anethole</p>
2	15.47	12.83	Methyl chavicol (Estragol)	<p>Estragole</p>
3	24.36	0.39	Germacrene D	
4	22.49	0.24	2,5-dimethoxy-p-cymene	
5	31.90	0.21	Nootkatone	

*RT= tiempo de retención.

Se puede observar los 5 componentes mayoritarios en la composición del AE de *T. filifolia*, los dos primeros componentes (E)-anetol y Estragol son compuestos fenilpropanos, éteres insaturados; Germacrene es un sesquiterpeno. (NCBI); 2,5-dimethoxy-p-cymene es un componente en los AE de la familia Asteraceae y Nootkatone es un sesquiterpeno y una cetona. Estos compuestos reportan propiedades antifúngicas, antibacterianas e insecticidas.



pampaanis#1 RT: 3.50 AV: 1 NL: 1.58E8

Figura 19. Perfil cromatográfico de GC del AE de *Tagetes filifolia* Lag. Enumerados los cinco componentes mayoritarios: **1.** (E)-anetol con un área de 84.79 % , **2.** Estragol (metil chavicol) con un área de 12.83 % , **3.** Germacrene D (0.39 %), **4.** 2,5-dimethoxy-p-cymene (0,24 %) y **5.** Nootkatone (0.21 %)

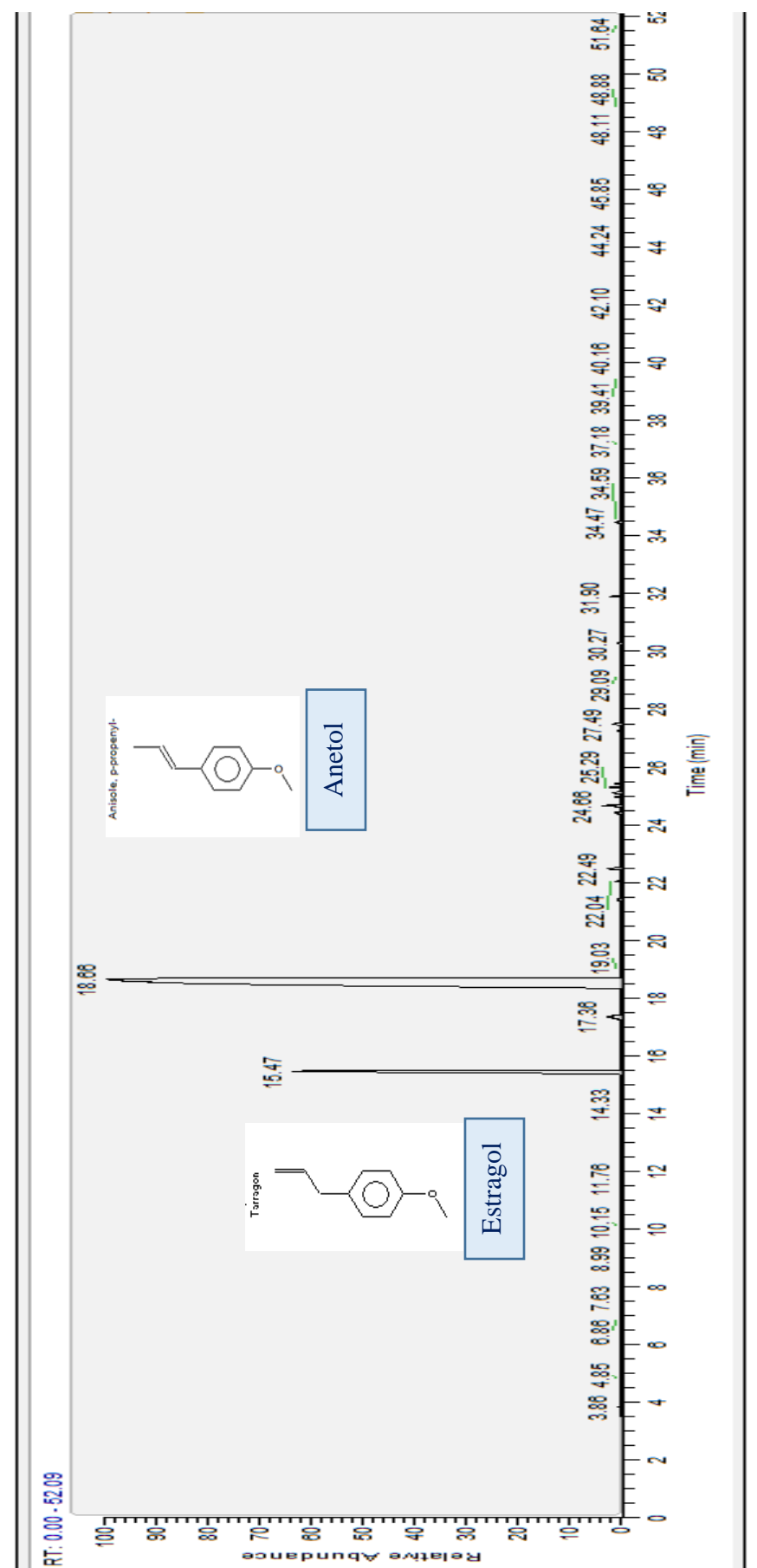


Figura 20. Perfil cromatográfico de GC del Aceite Esencial de *Tagetes filifolia* Lag. Componentes mayoritarios

Análisis y Discusión: Las Tablas 9 y 10, así como las Figuras 19 y 20 muestran la composición química determinada por CG-EM en base al tiempo de retención del AE de *Tagetes filifolia*. las concentraciones menores a 0.05 % se consideran como trazas. Los componentes mayoritarios principales encontrados son fenilpropanos: (*E*)-anetol con un área de 84.79 % y estragol (metil chavicol) con un área de 12.83 %, como compuestos mayoritarios y principales. En menores cantidades: germacrene D (0.39 %), 2,5-dimethoxy-p-cymene (0,24 %) y nootkatone (0.21 %). Representando el 98.46 % de la composición del aceite esencial. Otros estudios publicados revelan similares resultados estableciendo que estos dos son los componentes mayoritarios de *T. filifolia*.

De Feo *et al.* (1998) estudiaron al AE de *T. filifolia* recolectada en Sacsayhuaman-Cusco, encontrando por GC-MS, los mismos componentes mayoritarios y principales del AE, fenilpropanoides: (*Z*)-anetol (68.2 %) y estragol (13.7 %).

Olmedo *et al.* (2015) reportaron como los principales componentes de AE de *T. filifolia* al (*E*)-anetol (74.6 %) y estragol, seguido de (*E*)-isoeugenol y aldehído anísico.

Según Gupta y Vasudeva (2012), los aceites esenciales de las partes aéreas de *Tagetes filifolia*, mostraron altas cantidades de (*E*)-anetol (76.9–87.5 %) y metilchavicol (10.7–19.3 %), además de cantidades variables de (*Z*)-anetol (tr–68.2 %) y cantidades menores de isomentona (4.5 %), mentona (4,0 %), 1,8-cineol (1.5 %), pulegona (1.1 %), germacreno D (1%), biciclogermacreno (1 %), (*E,E*)- α -farneseno (0.8 %), aldehído de comino (0.7 %) y espatulenol (0.5 %).

En Argentina, según Gleiser *et al.* (2011), el aceite esencial de *T. lucida* se caracterizó por solo dos moléculas: (*E*)-anetol (74.5 %) y metilchavicol (23.7 %). Esta composición química no es característica de las especies de *Tagetes*, y está cerca del quimiotipo específico de *T. lucida*, rica en (*E*)-anetol.

Se señala que en la familia Asteraceae la presencia de anetol es infrecuente, estudios en el género *Tagetes*, con centro de diversidad en México, de las especies *T. filifolia* y *T. mandonii* se encontró que contienen anetol. En *T. mandonii*, 12.7 % corresponde a fenilpropanoides y sólo 9.2 % corresponde a (*Z*)-anetol (Senatore y Feo, 1999), composición muy pobre comparada con la de *T. filifolia*, donde los fenilpropanoides abundan, siendo anetol (33 a 68 %) y alilanisol (13 a 61 %), componentes mayoritarios (De Feo *et al.*, 1998; Vila, 2000; Serrato *et al.*, 2005).

Otros estudios señalan que los compuestos químicos anetol y alilanol, del grupo fenilpropanoides, constituyen la mayor parte del aceite esencial de *T. filifolia* (Zygaldo *et al.*, 1993; Feo *et al.*, 1998; Vita *et al.*, 2000 en Serrato, 2008). El anetol produce diferentes efectos biológicos como repelente, insecticida, fungicida, nematocida y bactericida y es un ingrediente activo del aceite esencial obtenido de las familias botánicas Lamiaceae y Apiaceae, especialmente de especies de los géneros *Timbra*, *Saturea*, *Origanum*, *Corydothymus*, *Pimpinella* y *Foeniculum*, las que contienen configuraciones químicas (*Z*)-anetol y (*E*)-anetol (Tuzun y Yegen, 2000 en Serrato, 2008)

La composición del AE de *T. filifolia*, varía y es afectada y asociada con muchos factores como: el hábitad de origen, parte de la planta a extraer, etapa de crecimiento, métodos de secado, procesos de extracción, tiempo de extracción, estas pueden estar relacionados con las características propias de la muestra vegetal. Figueiredo *et al.* (2008) señalaron que los factores que determinan la variabilidad química y el rendimiento de los aceites esenciales en cada especie, o en una misma especie de una planta, están determinados por: variaciones fisiológicas; condiciones ambientales; variaciones geográficas; factores genéticos y evolución; condiciones políticas/sociales; y necesidades de mano de obra. Así se observa en estudios algunas diferencias: el número de sus compuestos reconocidos varía de 33 (Vila *et al.*, 2000) a 57 (De Feo *et al.*, 1998); se ha encontrado tanto (*Z*)-anetol (Feo *et al.*, 1998) como (*E*)-anetol (Zygaldo *et al.*, 1993; Vila *et al.*, 2000). La cantidad de estragol (alilanol o metil chavicol) y de anetol en la composición total del AE fue 61.2 % y 33.1 %, respectivamente (Vila *et al.*, 2000), a 21 % y 79 % (Serrato *et al.*, 2005), o 13.7 % y 68.3 %, respectivamente (De Feo *et al.*, 1998). Esta variabilidad en la composición química del AE de *T. filifolia* se puede deber a diferencias ambientales entre los lugares de origen del material analizado, ya que esta especie se distribuye en forma silvestre desde el sur de EE.UU. hasta Argentina (Neher, 1965). En México, la especie se localiza en altitudes de 600 a 2600 m en diferentes climas y suelos (Neher, 1965; Turner, 1996; Villarreal, 2004). Esta relación químico-ambiental también se ha encontrado en *Artemisia* (Putievsky *et al.*, 1992) y en *Mentha* (Chou y Zhou, 1998).

El germacreno es un hidrocarburo orgánico volátil, específicamente, sesquiterpeno. Germacrenos se producen típicamente en un número de especies de plantas y presentan propiedades antimicrobianas e insecticidas.

Encontrándose los dos componentes mayoritarios en el AE de *T. filifolia*, se buscó información de las propiedades de éstos en bases de datos de moléculas químicas como es PubChem que es un Identificador de la base de datos de moléculas químicas y sus actividades en ensayos biológicos, sistema operado y mantenido por el National Center for Biotechnology Information (NCBI), parte de la National Library of Medicine, parte a su vez de los National Institutes of Health estadounidenses, y en la base European Bioinformatics Institute, datos que se observan en al Tabla 11. Características que coinciden con nuestro aceite, ya que contiene a estos dos componentes como mayoritarios.

Tabla 11

Compuestos mayoritarios del AE de *Tagetes filifolia* Lag.

PROPIEDAD	Anisol	Estragol
	<p>Nombre IUPAC: 1-metoxi-4-benceno</p>	<p>(E)- Nombre IUPAC: 1-alil-4-metoxibenceno</p>
Sinónimos	<p><i>trans</i>-Anetol, (E) - anethole, <i>p</i>-Propenil-anisol, <i>p</i>-Anetol, <i>trans</i>-Anís alcanfor; <i>trans</i> -1-metoxi-4-benceno; 1-Metoxi-4-(1-propenil)benceno</p> <p>El anetol es un compuesto aromático al que se debe el sabor distintivo a regaliz del anís, el hinojo y el anís estrellado. Químicamente es un éter insaturado aromático. derivado del fenilpropeno</p>	<p>Tarragón, Methyl chavicol, Metil chavicol, 4-Alilanol, <i>p</i>-Alilanol, Estragón, Anisol-1-alil-4-metoxibenceno</p> <p>El estragol es un éter aromático. Es un isómero de anetol, que difiere con respecto a la ubicación del doble enlace. Es un fenilpropeno, un compuesto orgánico natural. Su estructura química se compone de un benceno sustituido en el anillo con un grupo metoxi y un grupo propenilo. Es un componente de varios árboles y plantas, incluyendo la trementina (aceite de pino), anís, hinojo, laurel, estragón y albahaca.</p>
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₂ O	C ₁₀ H ₁₂ O
Índice refracción	de 1.5590 a 1.5630	1.5195 a 25 °C
Punto ebullición	de 234.5 °C	216 grados C a 764 mm Hg
Densidad	0,9878 g/cm a 20 °C	0.965 g /cm a 25 ° C
Masa molar	148.2 g/mol	148.20 g/mol
Solubilidad	Soluble en solventes orgánicos, cloroformo, eter, aceite de parafina, acetato de etilo, acetona etanol. Insoluble en agua.	Muy soluble en etanol, cloroformo.
Forma/Color	Cristales blancos o líquido incoloro, a veces amarillo pálido.	Líquido incoloro a amarillo claro
Olor	Anís dulce. Olor de Aceite	Olor que recuerda al anís con un sabor dulce correspondiente (diferente del anetol)
Sabor	Dulce	Sabor dulce que recuerda al anís (que difiere del anetol)
Estabilidad/Vida útil	Estable, pero es un compuesto combustible. Incompatible con agentes oxidantes fuertes.	Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.

Fuente: PubChem CID (P662). (2019). European Bioinformatics Institute [GB]. ChEMBL 470671. Y 7703 en https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL470671/

4.5 Determinación de la concentración letal media sobre el gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*)

Estos resultados confirman la actividad insecticida de *Tagetes filifolia* sobre *Pagiocerus frontalis*; Se determinó la CL₅₀ (concentraciones capaces de matar el 50 % de los insectos), para hallar esta primero determinamos el porcentaje de mortalidad. Además, fue calculada la CL₉₀; los resultados se muestran a continuación.

Porcentaje de mortalidad

Tabla 12

Porcentaje de mortalidad de P. frontalis expuestos a diferentes concentraciones del aceite esencial de T. filifolia, durante las horas de control

Concentración del AE (% v/v)	Mortalidad (%)						
	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h
Blanco	0	0	0	0	0	0	0
0.10	0	0	0	0	0	0	0
0.50	6.7	20.8	40.8	56.7	65.8	75.8	85.8
1	32.5	50.0	72.5	85.8	90.8	100.0	100.0
2	72.5	91.7	94.2	96.7	100.0	100.0	100.0
3	83.3	94.2	98.3	100.0	100.0	100.0	100.0
4	85.8	95.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
5	90.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
6	90.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
10	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Patrón FAI 0,0072 g	84.2	95.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

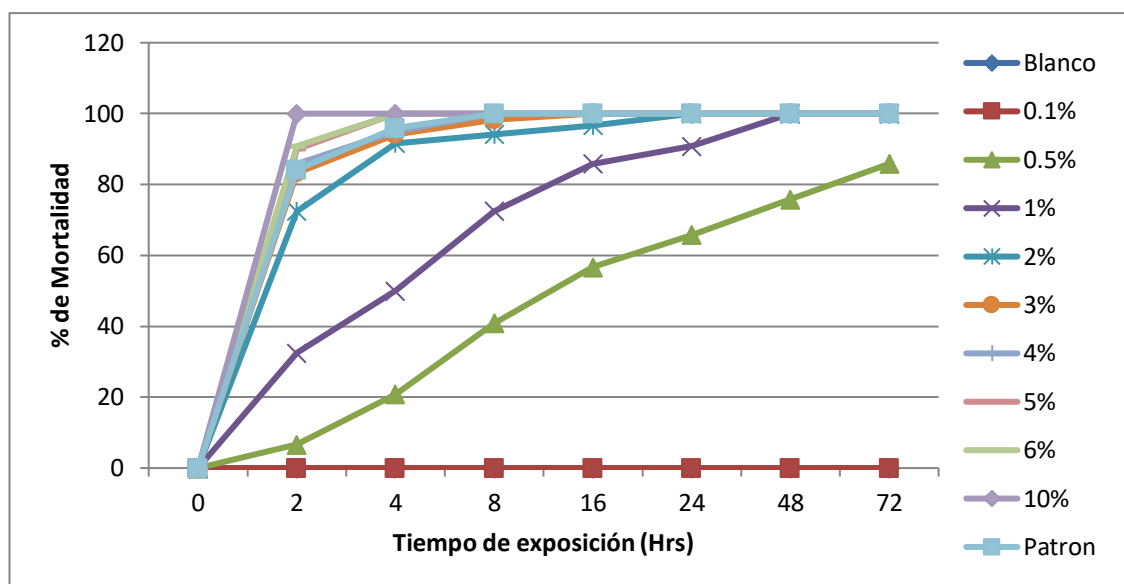


Figura 21. Porcentaje de mortalidad de *Pagiocerus frontalis* vs. tiempo de exposición al AE de *Tagetes filifolia* Lag.

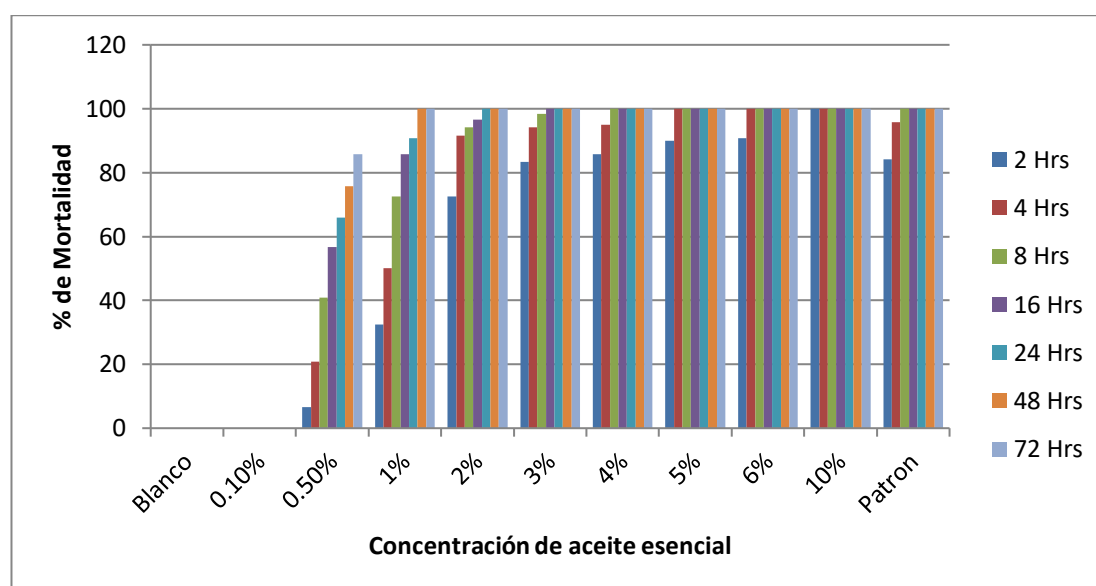


Figura 22. Porcentaje de mortalidad de *Pagiocerus frontalis* vs. concentración del AE de *Tagetes filifolia* Lag.

Análisis y Discusión: En la Tabla 12 se observa el porcentaje de mortalidad ocurrida por efecto insecticida del AE de *T. filifolia* a diferentes concentraciones sobre insectos adultos de *P. frontalis*. Se obtuvo una alta mortalidad a partir de la concentración del 2 % del AE, muriendo más de la mitad dentro de las dos primeras horas y una mortalidad total al 10 % de concentración. Asimismo, la mortalidad fue total a las 4 h en las concentraciones de 5, 6 y 10 %. La concentración más baja de 0.1% no presentó muertes dentro de las 72 h

de observación, en el grupo blanco o control no se observaron mortalidad durante las 72 horas. El patrón fosforo de aluminio produce la muerte del 100 % de los gorgojos a las 8 h de exposición, su efecto es parecido al efecto del aceite a una concentración del 4%.

En las Figuras 21 y 22 se pueden observar como al aumentar el tiempo de exposición de los gorgojos al aceite esencial, aumenta el porcentaje de muertes, las concentraciones a partir del 2 % para arriba muestran un comportamiento similar. Las concentraciones de 0,5 y 1 % muestran bajos porcentajes de mortalidad. También se puede apreciar que el porcentaje de mortalidad es directamente proporcional a la concentración del AE, se produce mayor porcentaje de mortalidad a mayor concentración del aceite esencial.

Aragón (2016) reportó el porcentaje de mortalidad vs. la concentración de *Tagetes multiflora* sobre *P. frontalis* y halló que a la concentración del 5 % del AE produce una mortalidad de 100% a las 24 h de exposición; en nuestra investigación la concentración al 2 % produce una mortalidad del 100 % a las 24 h de exposición; por lo que puede concluirse que el AE de *Tagetes filifolia* actúa mejor sobre *Pagiocerus frontalis*.

Carrillo *et al.* (2009) reportaron el efecto del AE de *Tagetes filifolia* sobre la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* indicando que causaron alta mortalidad (69 %) y repelencia de adultos (70 %), inhibición de la oviposición (90 %), obtuyéndose mayor efecto con el aceite floral sobre adultos de la mosca blanca.

Concentración letal CL₅₀

Tabla 13

CL₅₀ del AE de *T. filifolia* y límites de confianza inferior y superior para *P. frontalis* durante las 2 y 72 h

Tiempo (h)	CL ₅₀ (% v/v)	Límites de confianza al 95 %	
		Límite inferior	Límite superior
2	1.484	1.227	1.734
4	0.925	0.726	1.114
8	0.627	0.509	0.746
16	0.479	0.400	0.560
24	0.421	0.356	0.485
48	0.388	0.253	0.441
72	0.324	0.240	0.377

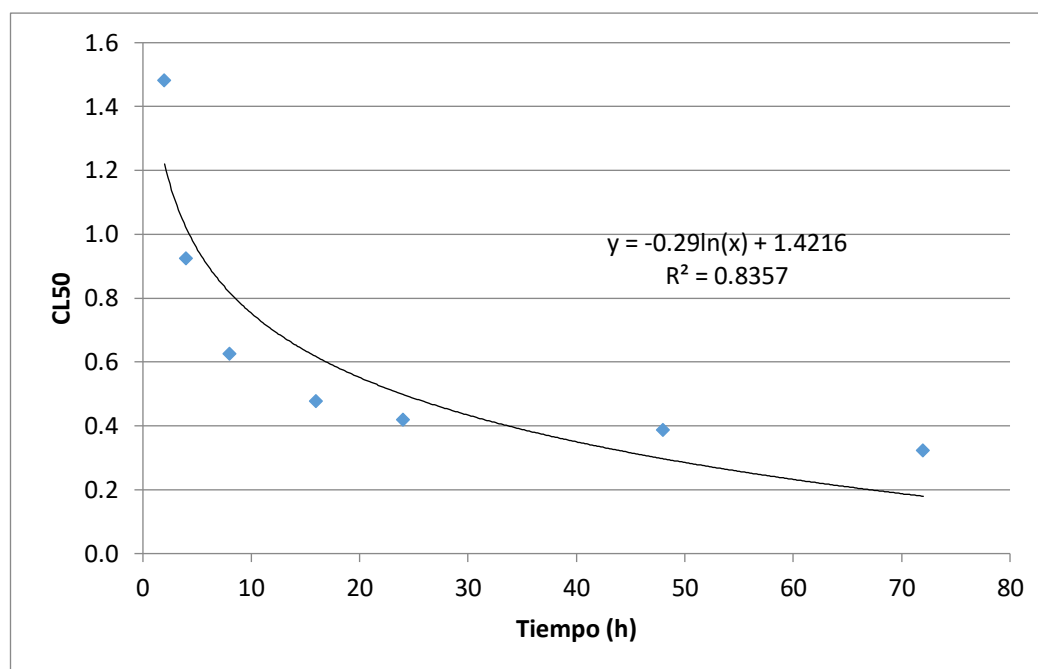


Figura 23. CL₅₀ durante el tiempo de exposición de 2 y 72 h del AE de *Tagetes filifolia* Lag. sobre *Pagiocerus frontalis* al 95 % de intervalo de confianza

Análisis y Discusión: En la Tabla 13 y Figura 23 se aprecian la CL₅₀ en los diferentes tiempos de exposición. De estos datos se puede deducir que a mayor tiempo de exposición se tienen menores valores de la CL₅₀, existiendo una relación inversa. La mayor CL₅₀ que es 1.484 % v/v de aceite esencial se presenta a las 2 h de exposición, a medida que transcurre el tiempo disminuye la CL₅₀, obteniendo la menor CL₅₀ a las 72 h con un valor de 0.324 % v/v. Estos resultados se dan con 95 % de límites de confianza, con límites inferiores y superiores en cada hora de observación. Los límites de confianza en la línea de correlación concentración-Probit muestran márgenes estrechos, lo que denota la confiabilidad en las determinaciones.

Se determinó una ecuación logarítmica mediante el diagrama de dispersión para dos variables dependientes de los tiempos controlados y las CL₅₀ utilizadas para la prueba: $y = -0.29\ln(x) + 1.4216$; $R^2 = 0.8357$ (CL₅₀ vs. tiempo).

Con este análisis es posible conocer cuánta concentración es necesaria para matar a la mitad de la población en estudio, y cuál es la concentración del aceite esencial de *T. filifolia* que tiende a ser más tóxica para *P. frontalis*.

Olmedo *et al.* (2015) relizaron el estudio del AE de *T. filifolia* y de sus componentes principales anetol y estragol; determinando que el AE es tóxico contra el escarabajo de la

harina, *Tribolium castaneum*. La toxicidad del AE (LC₅₀: 2.0 µL/mL agua, a las 72h) fue mayor que el estragol (CL₅₀: 5.6 µL/mL de agua, a las 72 h). El (*E*)-anetol era más tóxico que el estragol tanto a los 24 como a los 72 h de tratamiento (LC₅₀: 2.6 y 2.2 µL/mL de agua). Los resultados de la presente tesis en relación con la toxicidad del AE de *T. filifolia* sobre *P. frontalis* (CL₅₀: 3.24 µL/mL) es cercano a los valores sobre *Tribolium castaneum*.

Carrillo *et al.* (2009) reportaron que el AE de *Tagetes filifolia* sobre la mosca blanca *Trialeurodes vappriorum* a las 24 h de exposición presento una CL₅₀ de 9.99 mg/mL planta entera y el aceite floral de 6.59 mg/mL., también probó el (*E*)-anetol y este mostro una CL₅₀-24 de 1.74, casi casi cuatro veces menor al aceite floral.

Aragón (2016) informó CL₅₀ de 4.04 % v/v a 24 h de exposición del AE de *Tagetes multiflora* Kunth sobre *P. frontalis* y CL₅₀ de 1.76 % v/v a 8 h de exposición del AE de *Eucaliptus globulus* Labill. Comparado con los resultados de la tesis se puede determinar que el AE de *T. filifolia* tiene mejor efecto insecticida sobre *P. frontalis*.

Algunas especies del género *Tagetes* han probado ser efectivos contra bacterias, hongos, nematodos, ácaros, e insectos como dípteros, gorgojos de granos almacenados, pulgones, entre otros. Lo anterior se debe a que los extractos con principios activos como el (*E*)-anetol, alilanol, β-cariofileno y tagetona han demostrado ser tóxicos, repelentes e inhibidores de la reproducción y crecimiento (Camarillo *et al.*, 2009).

La actividad insecticida se debe al efecto de sus componentes mayoritarios como son el anetol y estragol también podría ser el resultado del sinergismo de dos o más de sus componentes. Los resultados permiten establecer como potencial insecticida al AE de *T. filifolia* al 95 % de confianza, la mortalidad aumentó con el incremento de las concentraciones del AE.

Concentración letal CL₉₀

Tabla 14

CL₉₀ del AE de T. filifolia y límites de confianza inferior y superior para P. frontalis durante las 2 y 72 h

Tiempo (h)	CL ₉₀	Límites de confianza al 95 %	
		Límite Inferior	Límite superior
2	4.403	3.904	5.011
4	2.302	2.005	2.638
8	1.547	1.328	1.820
16	1.130	0.971	1.342
24	0.871	0.758	1.029
48	0.594	0.540	0.763
72	0.524	0.469	0.599

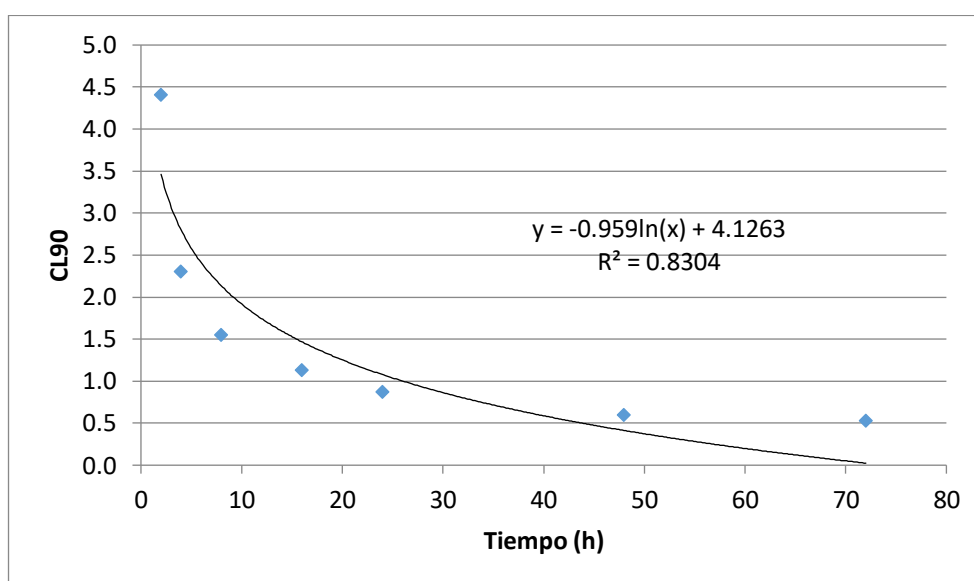


Figura 24. CL₉₀ durante el tiempo de exposición de 2 y 72 h del AE de *T. filifolia* sobre *P. frontalis* al 95 % de intervalo de confianza

Análisis y Discusión: En la Tabla 14 y Figura 24 se observan el modelo de análisis Probit que se usó para determinar el CL₅₀ y CL₉₀ en diferentes momentos del experimento. Como

el experimento se realizó con seis réplicas, se usó la mortalidad promedio para cada concentración. A las 24 h, la mortalidad fue del 100 % con el AE con una concentración del 2 % v/v.

Se observó una correlación positiva entre la concentración de AEs y la mortalidad. También hubo una correlación positiva entre el tiempo de la exposición y la mortalidad. Una exposición más larga a la misma concentración de AE causó una mayor mortalidad. A concentraciones más altas (3-10 %), los insectos adultos se debilitaron tan pronto como se introdujo el aceite esencial en el recipiente de experimentación. Se quedaron en la base del recipiente, se volvieron menos móviles, algunos de ellos murieron de inmediato. En el experimento de control positivo donde se utilizó fosforo de aluminio, se observó que algunas larvas podrían sobrevivir incluso después de 4 h de exposición, lo que no fue el caso con *T. filifolia*. El AE de *T. filifolia* parece ser más tóxico según los resultados de este estudio.

La mayor CL₉₀ que es 4,403 % v/v de AE se presenta a las 2 h de exposición, a medida que transcurre el tiempo disminuye la CL₉₀, obteniendo la menor CL₉₀ a las 72 h con un valor de 0,524 % v/v. Estos resultados se dan con 95 % de límites de confianza, y con límites inferiores y superiores en cada hora de observación. (Tabla 14).

Se determinó una ecuación logarítmica con el diagrama de dispersión para dos variables dependientes de los tiempos controlados y las CL₉₀ utilizadas para la prueba: $y = -0.959 \ln(x) + 4.1263$; $R^2 = 0.8304$ (CL₉₀ vs. tiempo) (Figura 24).

4.6 CL₅₀ y CL₉₀ de la actividad insecticida del AE de *T. filifolia* sobre *P. frontalis*, hasta 72 horas de exposición.

Tabla 15

*CL₅₀ y CL₉₀ de la actividad insecticida del AE de *T. filifolia* sobre *P. frontalis*, hasta 72 horas de exposición*

Límites de confianza							
	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Concentración de aceite esencial (% v/v)			Límites de confianza al 95% para log(Concentración de aceite esencial (% v/v))		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	0.01	0.07	0.04	0.11	-1.14	-1.35	-0.97
	0.02	0.09	0.06	0.13	-1.03	-1.23	-0.87
	0.03	0.11	0.07	0.16	-0.96	-1.15	-0.81
	0.04	0.12	0.08	0.17	-0.91	-1.09	-0.76
	0.05	0.14	0.09	0.19	-0.87	-1.04	-0.72
	0.06	0.15	0.10	0.20	-0.83	-1.00	-0.69
	0.07	0.16	0.11	0.22	-0.80	-0.97	-0.66
	0.08	0.17	0.12	0.23	-0.77	-0.94	-0.64
	0.09	0.18	0.12	0.24	-0.75	-0.91	-0.61
	0.10	0.19	0.13	0.26	-0.72	-0.88	-0.59
	0.15	0.24	0.17	0.31	-0.62	-0.77	-0.51
	0.20	0.28	0.21	0.37	-0.55	-0.69	-0.43
	0.25	0.33	0.24	0.42	-0.48	-0.61	-0.37
	0.30	0.38	0.28	0.48	-0.42	-0.55	-0.32
	0.35	0.43	0.33	0.54	-0.37	-0.48	-0.27
	0.40	0.48	0.37	0.60	-0.31	-0.43	-0.22
	0.45	0.54	0.43	0.67	-0.26	-0.37	-0.17
	0.50 (CL50)	0.61	0.48	0.75	-0.21	-0.32	-0.13
	0.55	0.68	0.55	0.83	-0.16	-0.26	-0.08
	0.60	0.77	0.62	0.93	-0.11	-0.21	-0.03
0.65	0.87	0.71	1.05	-0.06	-0.15	0.02	
0.70	0.99	0.81	1.18	-0.01	-0.09	0.07	
0.75	1.13	0.93	1.35	0.05	-0.03	0.13	
0.80	1.32	1.09	1.57	0.12	0.04	0.20	
0.85	1.57	1.31	1.88	0.20	0.12	0.27	
0.90 (CL90)	1.96	1.65	2.36	0.29	0.22	0.37	
0.91	2.07	1.74	2.50	0.32	0.24	0.40	
0.92	2.20	1.84	2.65	0.34	0.26	0.42	
0.93	2.35	1.96	2.84	0.37	0.29	0.45	
0.94	2.52	2.10	3.06	0.40	0.32	0.49	
0.95	2.74	2.28	3.34	0.44	0.36	0.52	
0.96	3.01	2.50	3.70	0.48	0.40	0.57	
0.97	3.39	2.81	4.20	0.53	0.45	0.62	
0.98	3.97	3.26	4.98	0.60	0.51	0.70	
0.99	5.09	4.12	6.54	0.71	0.61	0.82	

Interpretación: En la Tabla 15 se observan los resultados de la CL₅₀ y CL₉₀ durante los tiempos de 2, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas de exposición, a las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 10 % de AE (Ver anexo N °4). La CL₅₀ fue 0.61 % y la CL₉₀ de 1.96 % (v/v) de AE al 95 % de límites de confianza, con límites inferiores y superiores en cada concentración. Los límites de confianza de correlación concentración-Probit muestran márgenes estrechos, lo que denota la confiabilidad en las determinaciones.

4.7 Comparación del efecto insecticida de las concentraciones del AE.

Se comparo el efecto insecticida hallando la media del porcentaje de mortalidad de todas las concentraciones del aceite esencial hasta las 72 horas de exposición; cada concentración con 6 repeticiones. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 16.

Tabla 16

Resultados descriptivos del efecto insecticida de T. filifolia en porcentaje de mortlidad, hasta las 72 horas de exposición de las diferentes concentraciones del AE

Concentración del AE (% v/v)	N	Media Mortalidad (%)	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					0.1	6		
0.5	6	50.4	6.1	2.5	43.9	56.8	42.1	59.3
1	6	76.0	3.9	1.6	71.8	80.1	71.4	82.1
2	6	93.6	3.1	1.3	90.4	96.8	87.9	97.1
3	6	96.6	1.1	0.4	95.4	97.7	95.7	97.9
4	6	97.3	1.5	0.6	95.6	98.9	95.7	99.3
5	6	98.6	0.9	0.4	97.7	99.5	97.9	100.0
6	6	98.7	0.8	0.3	97.9	99.6	97.9	100.0
10	6	100.0	0.0	0.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Total	5	79.0	32.3	4.4	70.2	87.8	0.0	100.0
	4							

Interpretación: En la Tabla 16 se observan los resultados descriptivos de las medias del porcentaje de mortalidad de *P. frontalis* por efecto del AE de *T. filifolia*, donde las medias

del % de mortalidad con mayor efecto fueron de 98.6, 98.7 y 100 % a las concentraciones de 5, 6 y 10 % respectivamente (v/v) del AE, y la de menor actividad fue de 50.3 % a una concentración de 0,5% de AE; al 0.1 % no hay efecto insecticida. El menor error estándar de la media del % de mortalidad se dio a las concentraciones de 5 y 6 % de AE. Y no existe error al 10 % de AE, ya que a esta concentración se produce la muerte de todos los gorgojos a las 2 horas, primera hora de control. Se distingue que los porcentajes de mortalidad entre los puntos mayor y menor son concentraciones dependientes.

Tabla 17

Análisis de varianza (ANOVA), del efecto insecticida del AE T. filifolia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	54830.5	8	6853.8	912.6	0.00
Dentro de grupos	338.0	45	7.5		
Total	55168.5	53			

Leyenda:

GL = Grados de libertad

F = distribución de Fisher

Sig. = significancia

Sig. = > 0.05, no existe diferencia significativa entre dos % de mortalidad.

Sig. = ≤ 0.05, existe diferencia significativa entre dos % de mortalidad.

Interpretación: La Tabla 17 muestra el análisis de varianza de los resultados de la actividad insecticida del AE, se aprecia que se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la media de los porcentajes de mortalidad a favor del AE de *T. filifolia*, siendo el valor de la significancia 0.00 (< 0,05), se observa que el valor de significancia es de 0.00, valor que está por debajo de 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias (Hipótesis nula), es decir existen diferencias significativas de grupos entre los % de mortalidad por el AE, lo que significa que presenta diferente actividad insecticida en sus diferentes concentraciones.

A continuación se aplica la prueba de Tukey, comparando las concentraciones de AE con las que se evaluó el efecto insecticida con la media del porcentaje de mortalidad hasta las 72 horas de exposición; cada concentración con 6 repeticiones. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 18:

Tabla 18

Prueba de Tukey para el efecto insecticida del AE T. filifolia

Concentración de AE (% v/v)	N	HSD Tukey ^a				
		Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
0.1	6	0.0				
0.5	6		50.4			
1	6			76.0		
2	6				93.6	
3	6				96.6	96.6
4	6				97.3	97.3
5	6				98.6	98.6
6	6				98.7	98.7
10	6					100.0
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.05	0.44

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Interpretación: la Tabla 18 muestra en función de la prueba de Tukey las medias del porcentaje de mortalidad, que pueden ser consideradas similares, existiendo 5 subgrupos, los que nos indica que las concentraciones que forman cada sub grupo tienen un comportamiento similar en cuanto al efecto insecticida. Observamos también las concentraciones con mayor y menor actividad insecticida.

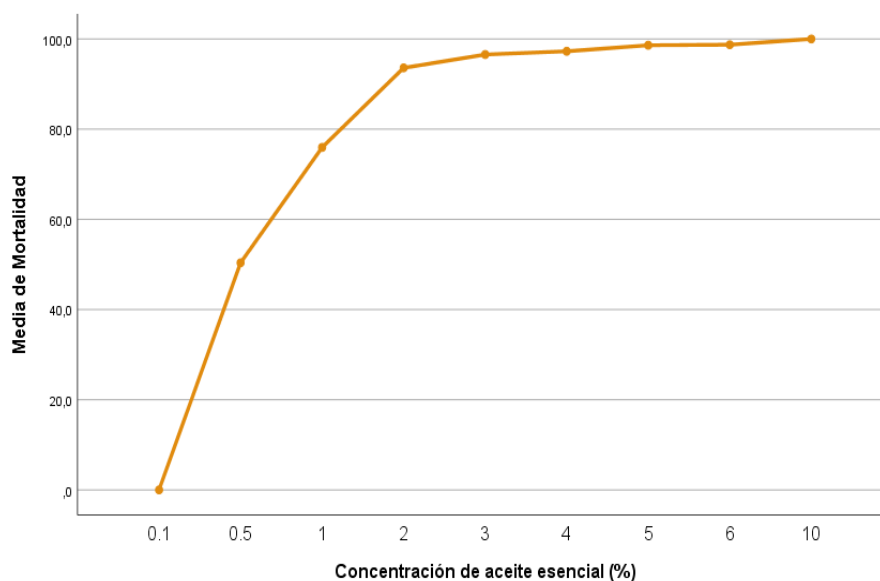


Figura 25. Efecto insecticida de *T. filifolia* – media del % de mortlidad versus concentración del AE, hasta las 72 horas de exposición

Interpretación: la figura 25 muestra en efecto insecticida, media del porcentaje de mortalidad a las diferentes concentraciones del AE de *T. filifolia* sobre *P. frontalis*; podemos observar que el porcentaje de mortalidad es directamente proporcional a la concentración del aceite, a partir del 3 % de concentración del AE el incremento ya es poco, y se esta matando ya al 100 % de los gorgojos del maíz a concentraciones elevadas.

Análisis y Discusión: Los AEs de plantas aromáticas se reconocen como una alternativa a los insecticidas sintéticos contra plaga de insectos en alimentos almacenados (Rajashekar et al., 2012; Regnault *et al.*, 2012).

En cuanto al mecanismo exacto de acción insecticida de los aceites esenciales no está totalmente dilucidado; sin embargo, estudios in vitro indican que éste se daría mediante la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa, o receptores de octamina (Enan, 2001; Picollo *et al.*, 2008).

Olmedo *et al.* (2015) evidenciaron el efecto inhibitor in vitro de fenilpropenos como anetol y estragol sobre la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) de insectos adultos de *Tribolium castaneum*, escarabajo harinero, fueron examinado a 1 mM y 5 mM. (*E*)-anetol y estragol mostraron inhibición similar en las dos concentraciones probadas. La inhibición máxima fue observada a 5 mM (54-63 %).

Determinaron también la relación entre la acción insecticida del AE de *Tagetes filifolia* y la generación de estrés oxidativo en *T. castaneum*.; evidenciando cambios en los productos de peroxidación lipídica por un incremento en el contenido de malondialdehído. Por otro lado, se sabe que la actividad de muchos terpenos y fenilpropanoides es directamente relacionado con su capacidad para inhibir la enzima acetilcolinesterasa y la generación de estrés oxidativo. La actividad insecticida del AE y anetol en 24 h podría indicar que el sistema nervioso central (AChE, octopamina, receptor GABA, etc.) es uno de sus posibles objetivos (Olmedo *et al.*, 2015).

Resultados similares fueron informado por Prakash (2015) quien reveló la toxicidad del AE de *Rosmarinus officinalis* contra *Sitophilus oryzae* y *Oryzaephilus surinamensis*, podría estar asociado con el desequilibrio oxidativo (actividad de enzimas antioxidantes aumentada) y inhibición de la actividad de AChE.

López *et al.* (2008) informaron que el anetol y estragol pueden tener una acción insecticida sinérgica cuando se presentan juntos como parte del AE. El alto contenido de (*E*)-anetol en el AE podría ser el responsable de su bioactividad.

Los insecticidas naturales o sintéticos tienen diferentes modos de acción; evidencia creciente de sus efectos secundarios sugieren que perturban homeostasis celular al generar radicales libres intermedios que desencadenan la peroxidación lipídica (Bakkali *et al.*, 2008; Aslanturk *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Leelaja y Rajini, 2012; Prakash, 2015).

Entre las especies de *Tagetes*, particularmente *T. filifolia* (Asteraceae) mostró diferente grado en su actividad insecticida entre diferentes grupos de insectos (Camarillo *et al.*, 2009; López y col. 2011).

El desarrollo de insecticidas naturales sería una ayuda para disminuir el impacto negativo de insecticidas sintéticos debido a su baja toxicidad, ellos no generan el desarrollo de resistentes poblaciones de insectos y son seguros para el medio ambiente a pesar de su alto costo relativo y dosis elevadas en comparación con pesticidas sintéticos. Las AE de plantas son fácilmente biodegradables y no han descrito resistencia. Con unas pocas excepciones, su toxicidad en mamíferos es baja y la persistencia ambiental es corta (Regnault *et al.*, 2012).

En conclusión, los resultados del presente estudio mostraron que los adultos de *Pagiocerus frontalis* son susceptibles a la acción del AE de *T. filifolia*, así como otras investigaciones sugieren la posible utilización del aceite esencial de *Tagetes filifolia* como una alternativa a los insecticidas sintéticos y un potencial insecticida para su utilización en granos almacenados; como alternativa viable para aumentar la letalidad y efectividad de los insecticidas disponibles actualmente.

CONCLUSIONES

- El rendimiento de obtención del aceite esencial de Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag). fue de 0.64 % v/m, determinado por el método hidrodestilación con trampa de Clevenger.
- El aceite esencial de *Tagetes filifolia* es un líquido ligeramente amarillo verdoso, con olor *sui generis* y de sabor dulce a anís. Sus características fisicoquímicas evidencian una buena solubilidad en disolventes apolares orgánicos, como éter etílico, cloroformo, hexano, acetato de etilo y en alcohol de alto grado, mientras es poco soluble en los disolventes polares como son etanol al 40, 60 y 70 %, y es insoluble en agua. El aceite esencial posee pH de 5.8, densidad de 0.987, índice de refracción de 1,560, índice de acidez de 0,81, índice de saponificación de 21,64 y rotación óptica de -0,092.
- En el espectro UV-Vis del aceite esencial de *T. filifolia* se observa un máximo absorción entre 250 y 270 nm, indicador de la presencia de hidrocarburos aromáticos. El espectro IR muestra características de absorción C-O entre 1300 y 1000 (banda característica para éteres), aromáticos entre 1600 y 1475 (absorción C=C) y entre 3000 y 3100 (absorción =C-H), que indican la presencia de estos grupos funcionales propios de una posible estructura de un éter como son los fenilpropanos como el anetol y el estragol.
- La composición química del aceite esencial de *T. filifolia* mostró la presencia de compuestos de fenilpropanos: (E)-anetol con un área de 84.79 % y estragol (metil chavicol) con un área de 12.83 %, como compuestos mayoritarios y principales. En menores cantidades: germacrene D (0.39 %), 2,5-dimethoxy-p-cymene (0,24 %) y nootkatone (0.21 %). Representando el 98.46 % de la composición del aceite esencial.

- El aceite esencial de *T. filifolia* Lag.) presenta un buen efecto insecticida sobre los insectos adultos del gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*) con una CL₅₀ de 1.484 % de aceite esencial a 2 h de exposición, con el 72 % de mortalidad. Una CL₅₀ de 0.324% a 72 h de exposición, con el 100 % de mortalidad. Un 100 % de mortalidad al 4 % a 8 h, y un 100 % a partir del 5 % a 4 h de exposición. La CL₅₀ de 2 a 72 h. sobre *P. frontalis* fue 0.61 % (v/v) y la CL₉₀ fue 1.96 % (v/v) (P< 0.05). Responsables de esta actividad posiblemente los metabolitos mayoritarios encontrados *p*-propenil-anisol, y estragol.

RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de efecto insecticida y repelencia para otras especies de insectos.
- Probar mezclas de aceites esenciales, para determinar si existe sinergismo en los efectos repelentes o insecticidas.
- Realizar estudios del efecto insecticida con los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Tagetes filifolia*, para determinar cual de ellos es el responsable del efecto insecticida sobre *Pagiocerus frontalis*.
- Promover investigaciones durante el almacenamiento de maiz y reemplazar a otros insecticidas dañinos.
- Determinar el mecanismo de la acción insecticida del aceite esencial.
- Luego de las pruebas se sugiere formular un bioinsecticida, un repelente y aplicar el aceite en el almacenamiento de maíz.

BIBLIOGRAFÍA

- Aldana, A.M. (1994). *Eficiencia de la deltrametrina en polvo (k-obiol) en el control de los gorgojos del maíz. Sitophilus oryzae (L.) y Pagiocerus frontalis (Ff.) en la zona maicera de caqueza (cundinamarca)*. Agron Colomb Vol 11, nim 1; 20-33 Agron Colomb Vol 11, nim 1 (1994); 20-33 2357-3732 0120-9965 [Internet]. 2011;(1):20–33. Available from: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/21285>.
- Alonso, F.A. (2013). *Cálculo de las concentraciones letales 50 (CL50) a 96 horas para la toxicidad del nitrito en dos especies de invertebrados de agua dulce (Eulimno gammarustoletanus y Polycelisfelina)*. Facultad de Biología, Universidad de Alcalá.
- Arenas, I., López, J. (2004). *Espectrofotometría de Absorción*. Ed. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca Mor. México. 2004.
- Avalos, A., y Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas. Reduca* (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-1 Metabolismo secundario de plantas45, 2009. ISSN: 1989-3620
- Baldeón, X. (2011). *Actividad Insecticida de los Aceites Esenciales de Tagetes minuta, Tagetes terniflora y Tagetes zipaquirensis sobre Premnotrypes vorax. Riobamba Ecuador: Escuela Superior politécnica de Chimborazo*. Tesis Bioquímico Farmacéutico.

- Bandoni A. (2003). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. Buenos Aires, Ed. de la U.N.L.P.
- Batish, D., Singh, H., Setia N., Kaur, S. and Kohli, R. (2006). Chemical composition and phytotoxicity of volatile essential oils from intact and fallen leaves of *Eucalyptus citriodora*. *Z. Naturforsch.* 61: 465-471.
- Bolívar, M. (2007). Manejo de granos en almacenamiento, causas de deterioro y prevención. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* Vol. 15 (Supl. 1).
- Bohrmann, H. and Youngken, H. (1968). *Esdragole, the main compound in the volatile oil of Tagetes filifolia (Compositae)*. *Phytochemistry.* 7(8):1415-6.
- Burt, S. (2004). Essential oils: *Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review*. *Int. J. Food. Microbiol.* 94: 223-253.
- Camarillo, R., Ortega A., Laura D., Serrato C., Miguel A. y Rodríguez., H. (2009). Actividad biológica de *Tagetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 177-184. Retrieved July 30, 2019, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-882009000200012&lng=en&tlng=es.
- Cano, M. (1988). *Diagnóstico y Posibilidades de la Industria de Aceites Esenciales en el Perú*. Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Facultad de Industrias Alimentarias. Lima, Perú
- 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.
- Cataños, E. (2015). *Blog de Enseñanza y divulgación de la ciencia*. <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/tag/detectores/>.

- Catalan, W. (2012). *Guía técnica del “Manejo Integrado De Plagas En El Cultivo De Maíz Amiláceo Blanco”* Calca –Acomayo- Cusco.UNALM. Oficina Académica de Extensión y Protección Social.
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado W. y Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. *Agronomía Colombiana*, vol. 26, núm. 1, pp. 97-105
- Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilación De Aceites Esenciales: Modelado Y Caracterización*.Universidad Nacional de Colombia. Tesis doctoral. Valladolid, pp. 6.
- Chavez, F. (2002). *Investigación de los parámetros para la obtención del aceite esencial de la Satureja boliviana y sus características físicas, químicas y biológicas*. UNAS Arequipa Perú.
- Choi, W., Parl B., Lee Y., Jang D., Yoon H. and Lee, S. (2006). *Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against Lycoriella mali adults*. Crop Prot. 25: 398-401.
- Chou, G. y Zhou R. (1998). *The variation and chemotypes of the essential oil components in wild Mentha haplocalyx Briq. in China*. J. Plant Resour. Environ. 7(3): 13–18.
- Cuttler, P. y Schmutteres, H. (1999). *Natural pesticides from the Neem seed and other plants*. J. Ethnopharmacology 333, 11-19
- De Feo, V., Della, G., Urrunaga, S., Urrunaga, R. and Senatore, F. (1998). Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. *Flavour And Fragrance Journal*.*Flavour Fragr. J.*, 13, 145±147.
- Devine, G., Eza D., Oigusuku E. y Furlong, M. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25(1), 74-100. Recuperado en 29 de julio de 2019, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342008000100011&lng=es&tlng=es.

- Díaz M. (2000). *Aseguramiento y Control de Calidad de Bioensayos*. Colombia.
- Dominguez X. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Editorial Limusa. México.p.281.
- Ducrot, P. (2005). *Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants*. pp. 47–58. En: Regnault, R.C., B.J.J. Philogene y C. Vincent (Eds.). *Biopesticides of plant origin*. Lavoiser and Intercept, Ltd., Paris and Andover. 313 p.
- Eisenreich, W., Rohdich F. and Bacher, A. (2001). *Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids*. *Trends Plant Sci.* 6(2): 78-84. Doi: 10.1016/S1360-1385(00)01812-4
- Enan, E., Beigler M. and Kende, A. (1998). *Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches: effect on octopamine receptors*. En: *Proceedings of the International Symposium on Plant Protection*. Gent, Bélgica.
- Enan, E. (2001). *Insecticidal activity of essential oils: octopaminergicities of action*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* Bélgica. 130: 325-337.
- FAO. (1985). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Insectos que dañan granos y productos almacenados*. Programa de Prevención de Pérdidas de Alimentos Postcosecha FAO. Santiago, Chile.
- FAO. (1986). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides*. Roma; 28. 6.
- FAO. (2008). Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Conservación y Protección de los Granos Almacenados*. Depósitos de Documentos de la FAO, Departamento de Agricultura. Santiago, Chile.
- Farmagro S.A. (2018). Ficha Técnica Gastion. Número de regisgtro PQUA N° 430 – SENASA. Recuperado en 29 de julio de 2019, de <http://www.farmagro.com.pe/p/gastion/>.
- Figueiredo, C., Barroso J., Pedro L. and Scheffer, C. (2008). *Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils*. *Flavour Fragr J.* 2008; 23 :213-226.

- Franzak C., Cleveland, D. and Stampoulos, D. (2004). *Fumigant toxicity of three essential oils on. Ohio, USA*. 901-939.
- García, S., Espinosa C. y Bergvinson, D. (2007). *Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control*. Mexico, D.F.: CIMMYT.
- García, V., Soto, G. y Bacca, T. (2014). Efecto insecticida de productos alternativos en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Rev Colomb Entomol.*40(2): 143-147.
- Gestión Redacción, Economía (2014). EE.UU. amplía lista de plaguicidas para favorecer importación de quinua peruana. 3 sept. En <https://gestion.pe/economia/ee-uu-amplia-lista-plaguicidas-favorecer-importacion-quinua-peruana-70411-noticia/?ref=gesr>.
- Gleiser, R., Bonino M. and Zygodlo, J. (2011). *Repellence of essential oils of aromatic plants growing in Argentina against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*. *Parasitol. Res.* 108: 69-78.
- Golob, P., Moss, C., Dales, M., Fidgen, A., Evans, J. and Gudrups, I. (1999). *The use of spices and medicinal as bioactive protectants for grains*. *FAO Agric. Serv. Bull.* 137: 221-236.
- Gómez, L. y Aguilera, A. (1982). *Biología de Pagiocerus frontalis (Fab.) (Coleoptera: Scolytidae)*. En la I REGION DE CHILE, (Vol 6). IDESIA (CHILE).
- González, P. (1984). *Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales*, Universidad de La Salle, Bogotá, Capítulo VI.
- Gupta, P. y Vasudeva, N. (2012). *A potential ornamental plant drug*. *Hamdard Med.* 55: 45-59.
- Hill, D. (1990). *Pests of stored products and their control*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. 274.
- Isman, M. (2006). Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.

- Jaramillo, B., Duarte, E., Pino, N. (2014). *Evaluación de la actividad repelente de aceites esenciales de plantas Piperáceas del departamento de Chocó*, Colombia Grupo de Investigaciones Agroquímicas, Programa de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia. Grupo de Productos Naturales, Universidad Tecnológica del Chocó, Quibdó, Chocó, Colombia.
- Kotyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N. and Shaaya, E. (2002). Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest Manag. Sci.* 58: 1101-1106
- Langenheim, J. (1994). *Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles*. *J. Chem. Ecol.* 20: 1223-1280
- Lokc, O. (1994). *Investigación fitoquímica*. Lima Perú: Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- López, S., López M., Aragón, M., Tereschuk, M., Slanis, A., Feresin, G., Zydaglon, J. and Tapia, A. (2011). *Composition and anti-insect activity of essential oils from Tagetes L especies (Asteraceae, Helenieae) on Ceratitis capotata Wiedemann and Triatoma intestans Klug*. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5286-5292.
- Mathal, A. y Bhanu, M. (2010). *Acute aluminium phosphide poisoning: Can we predict mortality?* *Ind. J. Anaesth.* 54(4): 302-307.
- Martinez, A. (2003) *Aceites Esenciales*, Facultad Química Farmacéutica Medellín.
- Marvaldi, A. and Morrene, J. (1998). *Immature stages of Rhyparonotus altarensis (Olliff) (Coleoptera: Curculionidae: Molylinae), with comments on larval characters in anchonini and molytinae*.
- McQuate, G., Keum, Y., Charmaine, S., Li, Q. and Eric, B. (2004). *Active ingredients in cade oil that synergize attractiveness of α -ionol to male Bactrocera latifrons (Diptera: Tephritidae)*. *J. Econ. Entomol.* 97 (3): 862-870.
- Ministerio del Ambiente (MINAM). Servicio de Consultoría para el análisis sobre organismos y suelo del maíz. (2016). <http://genesperu.minan.gob.pe/wp->

content/uploads/2016/09/Maiz6-An%C3%A1lisis-sobre-organismos-y-microorganismos-del-aire-y-suelo-206. Pdf.

- Millar, D., Sangines, M. and Torres M. (2003). *Química de Alimentos*. Manual de Laboratorio. 1ra Ed. San Jose Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Muthee, M., Wanzala, G., Wagacha, J. and Dossaji, S. (2016). *Bioactive properties of Tagetes minuta L. (Asteraceae) essential oils: A review*. Am. J. Essent. Oils Nat. Prod. 4(2): 27-36.
- Mueller D. (1990). *Fumigation*. En Malli A. (Editor), Handbook of Pest Control. Franzak and Foster Co., Cleveland, Ohio, USA.901-939.
- Nath, M., Bhattacharya, I., Tuck A. (2011) *Mechanisms of phosphide toxicity*. J Toxicol; ID: 494169, 9.
- Nayive, C. (2016). *Evaluation of total extracts as repellent for the control of Tribolium castaneum* Valencia aneum Herbst, 1799 (Coleoptera: Tenebrionidae). Rev. Biodivers. Neotrop. ISSN 2027-8918 e-ISSN 2256-5426 enero -julio; 6 (1): 22-6 DOI: 10.18636/bioneotropical. v6i1.124.
- Nayive C. and Valencia, A. *Actividad repelente y citotóxica del extracto etanólico de Palicourea guianensis frente a Tribolium castaneum, Herbst*.
- Neher, R. (1965). *Monograph of the genus Tagetes* (Compositae). Ph. D. Dissertation. Indiana University. Bloomington, Indiana, USA. 306 p.
- Nerio, L., Olivero, J., Stashenko, E. (2009). *Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera)*. J. Stored Prod. Res. 45: 212- 214.
- Oerke, E. (2006). *Crop losses to pests*. J. Agr. Sci. 144: 31-43
- Olivero, J., Caballero, K., Jaramillo B., and Stashenko, E. (2009). *Actividad repelente de los aceites esenciales de Lippia organoides, Citrus sinensis y Cymbopogon nardus cultivadas en Colombia frente a Tribolium castaneum, Herbst*.
- Olmedo, R., Herrera, J., Lucini, E., Zunino, M., Pizzolitto, R., Dambolena, J. y Zygadlo, J. (2015). *Aceite esencial de Tagetes filifolia contra Tribolium castaneum y su*

relación con la actividad acetilcolinesterasa y peroxidación de lípidos. AgriScientia, 32(2): 113-121. <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v32.n2.16562>.

- Olsen, E. (1990). *Métodos ópticos de análisis*. 1ra Ed. Barcelona España. Reverte.
- Ortega, S. (1999). *Biología del barrenador del maíz *Pageocerus frontalis* Fabr.* Tesis Ingeniero Agrónomo UNCP Huancayo. 31-33p.
- Ortuño, M. (2006). *Manual Práctico de Aceites Esenciales, Aromas y Perfumes*. 1ra Edición. Editorial Aiyana España. ISBN 8493452211.
- Padin, S., Ringuelet, J. y Dal, G. (2000). *Aceites esenciales para el control de insectos en granos almacenados*. Anales de SAIPA. Sociedad Argentina para la Investigación de Productos Aromáticos. IX Congreso Nacional de Recursos Naturales y Medicinales. XVI: 13-19.
- Pavia, D., Lampman, G., and Vyvyan, J. (2008). *Introducción to spectroscopy*. https://www.academia.edu/38100358/INTRODUCTION_TO_SPECTROSCOPY
- Pérez, J., Flinn, P., Campbell, J., Hagstrum, D. and Throne, J. E. (2004). *Detection of stored grain insect infestation in wheat transported in railroad hopper-cars*. J. Econ. Entomol. 97: 1474-1483.
- Piccolo, M., Toloza, A., Mougabure, C. Zygadlo, J. and Zerba, E. (2008). *Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids*. Fitoterapia 79:271 -278.
- Pino, N. y Valencia, C. (2016). Evaluación de extractos totales como repelente para el control de *Tribolium castaneum* Herbst, 1799 (Coleoptera: Tenebrionidae). Rev. Biodivers. Neotrop. ISSN 2027-8918 enero-julio; 6 (1): 22-6.
- PubChem CID. Identificador de la base de datos de moléculas químicas y sus actividades en ensayos biológicos. National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, National Institutes of Health estadounidenses. En <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8815#section=Experimental-Properties&fullscreen=true>

- Putievsky, E., Ravid, N., Dudai, I., Katzir, D., Carmeli, A. and Eshel, A. (1992). *Variations in the essential oil of Artemisia judaica L. chemotypes related to phenological and environmental factors*. Flav. Fragr. J. 7 (5): 253–257.
- Rajashekar, Y., Bakthavatsalam, N. and Shivanandappa, T. (2012). *Botanicals as Grain Protectants*. Psyche (New York), article 646740.
- Rajendran, S. and Sriranjini V. (2008). *Plant products as fumigants for stored product insect control*. J. Stored Prod. Res. 44: 126-135.
- Rees, D. (2004). *Insects of Stored Products*. CSIRO. Australia. 181.
- Regnault, R., Vincent, C. and Arnason, J. (2012). *Essential oils in insect control: Low-risk products in a high-stakes world*. Annual review entomology, 57: 405-424.
- Repeto, M. (1997). *Toxicología fundamental* 3ra Ed. Editorial Científico Medica Barcelona-España.
- Ristiano, J. and Thomas, W. (1997). *Agriculture, methyl bromide, and the ozone hole, can we fill the gaps?* Plant Disease. 81: 964-977.
- Roersch, C. (1994). *Plantas medicinales del Sur Andino del Perú*. Koelts Scientific Books Königstein. Vol. 2
- Ruiz, C., Cachay M., Domínguez, M., Velásquez, C., Espinoza, G., Ventosilla, P. and Rojas, R. (2009). *Chemical composition, antioxidant and Mosquito larvicidal activities of essential oils from Tagetes filifolia, Tagetes minuta and Tagetes elliptica from Perú*. UPCH, 2010. Thieme. Planta Médica.
- Salehi, B., Valussi M., Bezerra, M., Pereyra J., Melo, H., Vitalin S., Antolak H., Sharifi M., Cirone N., Yousaf, Z., Martorell M., Iriti M., Carradori S. and Sharifi, S. (2018). Review *Tagetes spp.* Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules* 2018, MDPI Journal 23, 2847; doi: 10.3390/molecules23112847.
- Sánchez, Y., Pino, O. y Lazo, F. (2011). *Actividad promisorio de aceites esenciales de especies pertenecientes a la tribu Pipereae frente a A Artemia salina y*

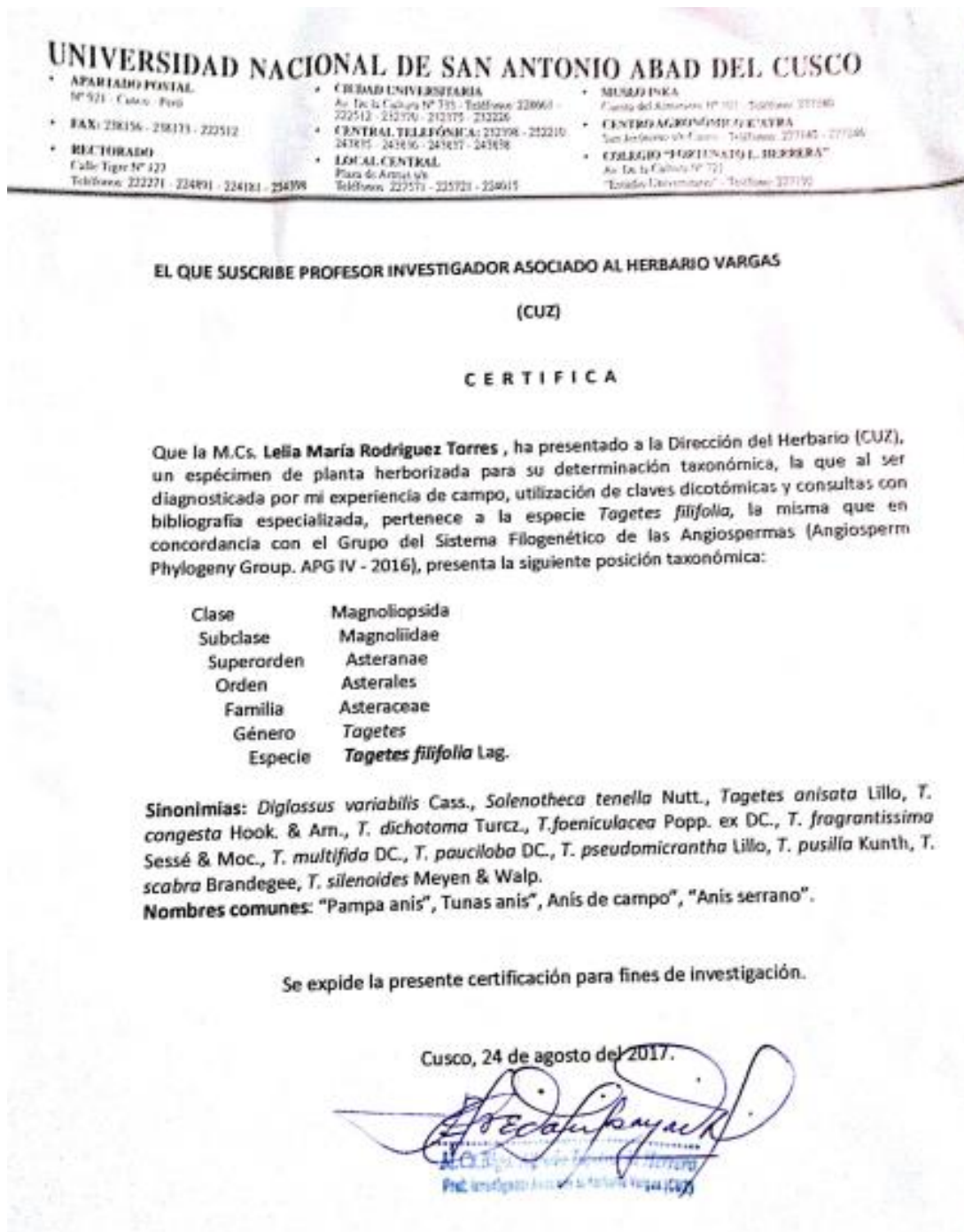
- Xanthomonas*. Rev Protección Veg [Internet]. 2011;26(1):45–51. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20113222037.html%5Cnhttp>
- Sánchez, R., Ruiz, A, Ruiz, C., Ruiz, G., Sairitupac, D., Aguirre, L., Salazar, A. y Loja, B. (2017). *Actividad antioxidante y marcha fitoquímica de los capítulos de Tagetes filifolia Lag. “pacha anís”* Horiz Med 2017; 17(1): 18-24.
- Serrato, M., Díaz F. y Barajas, J. (2008). *Composición del aceite esencial en germoplasma de Tagetes filifolia Lag. de la región centro-sur de México. Agrociencia, 42(3), 277-285*. Recuperado en 12 de diciembre de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-1952008000300003&lng=es&tlng=es.
- Serrato–Cruz, M.A., Díaz–Cedillo, F. and Barajas,–Pérez, J.S. (2005). *Seasonal influence on phenology and essential oil content of Tagetes filifolia Lag*. Annalen der Meteorologie 41 (1): 82–85
- Serrato, M. y Barajas J. (2006). Poblaciones silvestres de *Tagetes filifolia* Lag. en el centro sur de México. *Rev. Fitotec. Mex.* (Número Especial 2): 1–11.
- Shaaya, E. and Rafaeli, A. (2007). Essential oils as biorational insecticides-potency and mode of action. En: Ishaaya I., Naven R., Horowitz, R. (Eds.), *Insecticides Design Using Advanced Technologies*. Springer, Berlin, Alemania. 249-261.
- Silva, G., Orrego, O., Hepp, R., Tapia, M. (2005). *Pesquisar plantas com propriedades inseticidas para o controle de Sitophilus zeamais em milho armazenado*. Pesq. Agropec. Bras. 40 (1): 11-17.
- Solis, L., Pino, J. y Solis, J. (2018). *Plantas y Aceites esenciales como insecticidas. Una alternativa de manejo ecológico*. Cusco-Perú: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Souto, R, Harada, A., Andrade E. and Maia J. (2012) *Insecticidal activity of Piper essential oils from the Amazon against the fire ant Solenopsis saevissima (Smith) (Hymenoptera: Formicidae)*. Neotrop Entomol 41: 510-517.

- Stashenko, E. (1996). En: Memorias del IV Congreso Nacional de Fitoquímica, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga, febrero de 1996, pp. 29-53.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Universidad Industrial de Santander-CENIVAM. División de publicaciones UIS. Bucaramanga –Santander.
- Stefanazzi, N. (2010). *Essential oils, an alternative tool for integrated handling of stored-grain pests*. Universidad Nacional del Sur [Argentina]. Tesis doctoral en Biología.
- Tapondjou, A., Alder C., Fontem D., Bouda H. and Reichmut, C. (2005). *Bioactivities of cymol and esssential oils of Cupressus sempervirens and Eucaluptus saligna against Sitophillus zeamais Motschulsky and Tribolium confusum du Val*. J. Stored Prod. Res.41: 91-102.
- Turner, B. (1996). The Comps of Mexico–A systematic account of the family Asteraceae, Vol. 6, Tageteae and Anthemideae. *Phytol. Memoirs* 10: 1–93.
- UNODC.Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito. Problemática ambiental y la utilización de agroquímicos en la producción de coca. Informe analítico; Octubre 2010 [Internet]. Vienna, Austria: UNODC; 2010 [citado 18 oct 2013]. Disponible en: http://www.unodc.org/documents/peruandecuador//Informes/InformesAnaliticos/Informe_Analitico_Agroquimicos.pdf
- Vila, R., Iglesias J., Canigueral, S. and Ciccio, J. (2000). *Essential oil of Tagetes filifolia from Costa Rica*. Ing. Ciencia Quím. 19 (1): 13–14.
- Villar, A. (1999). *Farmacognosia General*. Madrid España: Ed. Síntesis S.A.
- Villarreal, J. (2003). *Familia Compositae. Tribu Tageteae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Fascículo 113. Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro, Michoacán. México. 85 p.
- Villavicencio, M., Pérez, B., Gordillo, A. (2010). *Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo*, México. Polibotánica. 30: 193-238
- Wahab, A., Zaheer, M., Wahab, S. and Khan, R. (2008). *Acute aluminium phosphide poisoning: an update*. H Kong J Emerg Med; 15:152-5.

- Wendt, E. et Schulz, F. *Studies on the biology and ecology of Pagiocerus frontalis (Fabricius) (Coleoptera: Scolytidae) infesting stored maize in Ecuador*, Technical University Berlín, Department of Phytomedicine, Berlín, FRG.
- Wille, T. y Juan, E. (1952). — *Entomología Agrícola del Perú*, 2da. Edición de la Junta de Sanidad Vegetal. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú.
- Zygadlo, J., Lamarque, A., Maestri, D., Guzmán, C. and Grosso, N. (1993). *Composition of the inflorescence oils of some Tagetes species from Argentina*. J. Essential Oil Res. 5 (6): 679-682.
- Zygadlo, J., Guzman, C. and Grosso, N. (1994). *Propiedades antifúngicas de los aceites foliares de Tagetes minuta L. y T. filifolia Lag.* J. Essent. Oil Res. 6(6): 617-621.

ANEXOS

Anexo 1. Certificación Del Herbario Vargas – Identificación De Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.)



Anexo 2. Identificación Del Gorgojo Del Maíz (*Pagiocerus frontalis*)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA

INFORME DE IDENTIFICACIÓN**Material identificado:**

Orden: Coleóptera
Suborden: Polyphaga
Superfamily: Curculionoidea
Familia: Curculionidae
Subfamilia: Scolytinae
Tribu: Hylesinini: Bothrosternina
Género: *Pagiocerus*
Especie: *Pagiocerus frontalis* (Fabricius, 1801)

Observaciones:

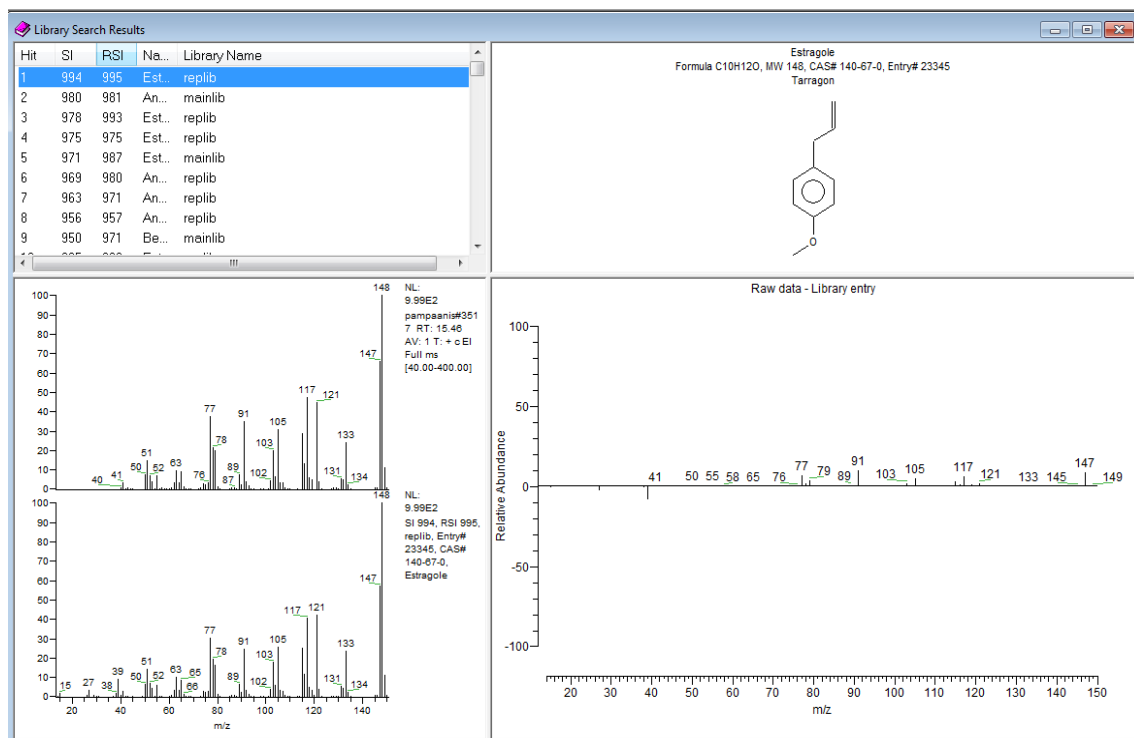
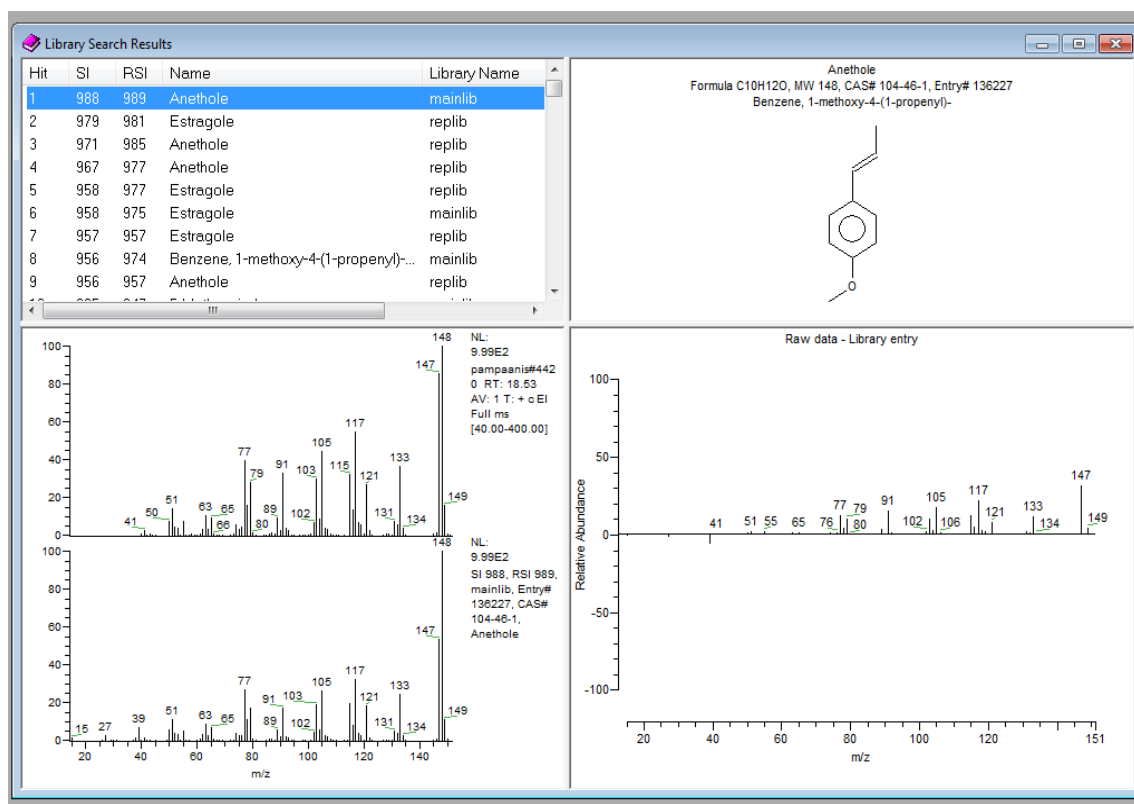
El material identificado ha sido traído por la MCs. LELIA MARÍA RODRIGUEZ TORRES, para su identificación como parte de un proyecto de investigación.

Cusco, 17 de abril, 2019



Erick Válor Landa
CBP. 1114

Anexo 3. Espectroscopia de masas de los principales componentes del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag.



Anexo 4. Determinación De La Actividad Insecticida - Conteo De Gorgojos Muertos
(*Pagisocerus frontalis*)

ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Tagetes filifolia</i>									
Concen- tración del	Repeti- ciones	Mortalidad (número de insectos muertos de 20)							
		2 h	4 h	8 h	16 h	24h	48 h	72 h	
0,1%	A	0	0	0	0	0	0	0	
	B	0	0	0	0	0	0	0	
	C	0	0	0	0	0	0	0	
	D	0	0	0	0	0	0	0	
	E	0	0	0	0	0	0	0	
	F	0	0	0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	% mortalidad
0,5%	A	2	6	8	12	13	18	19	
	B	2	4	8	10	13	14	17	
	C	1	3	7	10	12	12	14	
	D	3	5	10	13	15	18	19	
	E	0	4	9	12	13	14	15	
	F	0	3	7	11	13	15	19	
			1.33	4.17	8.17	11.33	13.17	15.17	17.17
		6.67	20.83	40.83	56.67	65.83	75.83	85.83	% mortalidad
1%	A	5	10	12	17	19	20		
	B	8	9	14	17	19	20		
	C	8	12	17	19	19	20		
	D	5	8	14	16	17	20		
	E	7	9	14	16	17	20		
	F	6	12	16	18	18	20		
			6.5	10	14.5	17.17	18.17	20	
		32.5	50	72.5	85.83	90.83	100	0	% mortalidad
2%	A	12	16	17	18	20			
	B	14	19	19	19	20			
	C	14	19	20	20	20			
	D	15	19	19	19	20			
	E	16	20	20	20	20			
	F	16	17	18	20	20			
			14.5	18.33	18.83	19.33	20		
		72.5	91.67	94.17	96.67	100			% mortalidad
3%	A	16	18	20	20				
	B	17	18	19	20				
	C	16	19	19	20				
	D	18	19	20	20				
	E	16	19	20	20				
	F	17	20	20	20				
			16.67	18.83	19.67	20			
		83.33	94.17	98.33	100				% mortalidad
4%	A	16	18	20					
	B	16	18	20					
	C	18	19	20					
	D	16	19	20					
	E	19	20	20					
	F	18	20	20					
			17.17	19	20				
		85.83	95	100					% mortalidad

5%	A	17	20						
	B	19	20						
	C	17	20						
	D	20	20						
	E	17	20						
	F	18	20						
			18	20					
		90	100						%mortalidad
6%	A	19	20						
	B	17	20						
	C	18	20						
	D	18	20						
	E	17	20						
	F	20	20						
			18.17	20					
		90.83	100						%mortalidad
10%	A	20							
	B	20							
	C	20							
	D	20							
	E	20							
	F	20							
			20						
		100							%mortalidad

BLANCO	A	0	0	0	0	0	0	0	
	B	0	0	0	0	0	0	0	
	C	0	0	0	0	0	0	0	
	D	0	0	0	0	0	0	0	
	E	0	0	0	0	0	0	0	
	F	0	0	0	0	0	0	0	
			0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	%mortalidad
PATRÓN SULFUR DE ALUM (0.0072)	A	17	20	20					
	B	17	19	20					
	C	16	18	20					
	D	18	20	20					
	E	17	19	20					
	F	16	19	20					
			16.83	19.17	20				
		84.17	95.83	100					%mortalidad

Anexo 5. Datos Para La Determinación De La CL₅₀ Y CL₉₀ Mediante Probit En Las Diferentes Horas De Exposición

Tabla. CL₅₀ del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag y límites de confianza inferior y superior para *Pagiocerus frontalis* entre las 2 y 72 horas.

Tiempo (Hrs)	CL ₅₀	Límites de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
2	1.484	1.227	1.734
4	0.925	0.726	1.114
8	0.627	0.509	0.746
16	0.479	0.400	0.560
24	0.421	0.356	0.485
48	0.388	0.253	0.441
72	0.324	0.240	0.377

Tabla. CL₉₀ del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag y límites de confianza inferior y superior para *Pagiocerus frontalis* entre las 2 y 72 horas.

Tiempo (Hrs)	CL ₉₀	Límites de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
2	4.403	3.904	5.011
4	2.302	2.005	2.638
8	1.547	1.328	1.820
16	1.130	0.971	1.342
24	0.871	0.758	1.029
48	0.594	0.540	0.763
72	0.524	0.469	0.599

PROBIT: CL50 Y 90 A LAS 2HRS

Límites de confianza							
	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Concentración de aceite esencial (%)			Límites de confianza al 95% para log(Concentración de aceite esencial (%))a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	.206	.127	.297	-.686	-.895	-.527
	,020	.260	.167	.365	-.585	-.778	-.438
	,030	.301	.197	.415	-.522	-.705	-.382
	,040	.336	.224	.458	-.474	-.649	-.339
	,050	.367	.249	.496	-.435	-.604	-.305
	,060	.397	.272	.531	-.402	-.566	-.275
	,070	.424	.293	.563	-.372	-.532	-.249
	,080	.450	.314	.594	-.346	-.502	-.226
	,090	.476	.335	.624	-.323	-.475	-.205
	,100	.500	.355	.652	-.301	-.450	-.186
	,150	.616	.451	.785	-.211	-.346	-.105
	,200	.727	.545	.909	-.139	-.264	-.041
	,250	.837	.641	1.032	-.077	-.193	.014
	,300	.951	.741	1.158	-.022	-.130	.064
	,350	1.070	.848	1.288	.029	-.072	.110
	,400	1.197	.963	1.425	.078	-.016	.154
	,450	1.334	1.088	1.573	.125	.037	.197
	,500	1.484	1.227	1.734	.171	.089	.239
	,550	1.651	1.382	1.913	.218	.141	.282
	,600	1.840	1.559	2.115	.265	.193	.325
,650	2.058	1.764	2.349	.313	.247	.371	
,700	2.316	2.007	2.628	.365	.302	.420	
,750	2.630	2.301	2.971	.420	.362	.473	
,800	3.031	2.673	3.416	.482	.427	.534	
,850	3.576	3.170	4.036	.553	.501	.606	
,900	4.403	3.904	5.011	.644	.591	.700	
,910	4.630	4.101	5.285	.666	.613	.723	
,920	4.890	4.324	5.602	.689	.636	.748	
,930	5.192	4.582	5.976	.715	.661	.776	
,940	5.552	4.885	6.426	.744	.689	.808	
,950	5.993	5.252	6.986	.778	.720	.844	
,960	6.556	5.715	7.711	.817	.757	.887	
,970	7.322	6.333	8.716	.865	.802	.940	
,980	8.479	7.250	10.271	.928	.860	1.012	
,990	10.686	8.952	13.337	1.029	.952	1.125	

PROBIT: CL50 Y 90 A LAS 4HRS

Límites de confianza							
	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Concentración de aceite esencial (%)			Límites de confianza al 95% para log(Concentración de aceite esencial (%))a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	.177	.102	.263	-.753	-.991	-.581
	,020	.215	.129	.310	-.668	-.890	-.508
	,030	.243	.149	.345	-.615	-.826	-.462
	,040	.266	.167	.374	-.575	-.778	-.427
	,050	.287	.182	.399	-.542	-.739	-.399
	,060	.306	.197	.422	-.514	-.706	-.375
	,070	.324	.210	.443	-.490	-.677	-.353
	,080	.340	.223	.463	-.468	-.651	-.334
	,090	.356	.236	.482	-.448	-.627	-.317
	,100	.372	.248	.500	-.430	-.606	-.301
	,150	.442	.305	.582	-.354	-.516	-.235
	,200	.508	.359	.657	-.294	-.444	-.183
	,250	.572	.414	.729	-.242	-.383	-.137
	,300	.637	.469	.800	-.196	-.329	-.097
	,350	.703	.527	.873	-.153	-.278	-.059
	,400	.772	.589	.949	-.112	-.230	-.023
	,450	.846	.655	1.029	-.073	-.184	.012
	.500	.925	.726	1.114	-.034	-.139	.047
	,550	1.011	.806	1.208	.005	-.094	.082
	,600	1.108	.895	1.311	.044	-.048	.118
	,650	1.217	.996	1.428	.085	-.002	.155
	,700	1.343	1.115	1.565	.128	.047	.194
	,750	1.495	1.257	1.729	.175	.099	.238
	,800	1.683	1.435	1.935	.226	.157	.287
	,850	1.934	1.668	2.214	.286	.222	.345
	.900	2.302	2.005	2.638	.362	.302	.421
	,910	2.401	2.094	2.754	.380	.321	.440
	,920	2.514	2.195	2.888	.400	.341	.461
	,930	2.643	2.309	3.044	.422	.363	.483
	,940	2.796	2.443	3.230	.447	.388	.509
	,950	2.981	2.603	3.460	.474	.415	.539
	,960	3.214	2.801	3.754	.507	.447	.574
	,970	3.526	3.061	4.156	.547	.486	.619
	,980	3.988	3.438	4.767	.601	.536	.678
	,990	4.841	4.112	5.941	.685	.614	.774

PROBIT: CL50 Y 90 A LAS 8HRS

Límites de confianza							
	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Concentración de aceite esencial (%)			Límites de confianza al 95% para log(Concentración de aceite esencial (%))a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	.010	.122	.077	.172	-.914	-1.114	-.765
	.020	.148	.096	.204	-.831	-1.016	-.691
	.030	.167	.111	.227	-.778	-.954	-.645
	.040	.183	.124	.246	-.738	-.908	-.610
	.050	.197	.135	.262	-.706	-.870	-.581
	.060	.210	.145	.278	-.678	-.838	-.557
	.070	.222	.155	.292	-.654	-.810	-.535
	.080	.233	.164	.305	-.632	-.785	-.516
	.090	.244	.173	.317	-.613	-.762	-.498
	.100	.254	.182	.329	-.595	-.741	-.482
	.150	.302	.222	.384	-.520	-.654	-.416
	.200	.347	.260	.434	-.460	-.586	-.362
	.250	.390	.297	.483	-.409	-.527	-.316
	.300	.434	.335	.532	-.363	-.474	-.274
	.350	.478	.375	.581	-.320	-.426	-.236
	.400	.525	.417	.633	-.280	-.380	-.199
	.450	.574	.461	.687	-.241	-.336	-.163
	.500	.627	.509	.746	-.203	-.293	-.127
	.550	.685	.562	.811	-.164	-.250	-.091
	.600	.750	.621	.883	-.125	-.207	-.054
	.650	.823	.687	.964	-.085	-.163	-.016
	.700	.908	.764	1.060	-.042	-.117	.025
	.750	1.009	.856	1.176	.004	-.068	.070
	.800	1.135	.969	1.322	.055	-.014	.121
	.850	1.302	1.116	1.520	.115	.048	.182
	.900	1.547	1.328	1.820	.190	.123	.260
	.910	1.613	1.384	1.902	.208	.141	.279
	.920	1.688	1.447	1.996	.227	.161	.300
	.930	1.774	1.520	2.105	.249	.182	.323
	.940	1.876	1.604	2.235	.273	.205	.349
	.950	1.999	1.705	2.394	.301	.232	.379
	.960	2.154	1.831	2.598	.333	.263	.415
	.970	2.360	1.997	2.874	.373	.300	.459
	.980	2.666	2.238	3.292	.426	.350	.517
	.990	3.231	2.671	4.087	.509	.427	.611

PROBIT: CL50 Y 90 A LAS 16HRS

Límites de confianza							
	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Concentración de aceite esencial (%)			Límites de confianza al 95% para log(Concentración de aceite esencial (%))a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	.101	.067	.138	-.996	-1.176	-.861
	,020	.121	.083	.162	-.916	-1.083	-.791
	,030	.136	.095	.179	-.866	-1.024	-.747
	,040	.149	.105	.193	-.828	-.980	-.714
	,050	.159	.114	.206	-.797	-.944	-.686
	,060	.169	.122	.217	-.771	-.913	-.663
	,070	.179	.130	.228	-.748	-.887	-.643
	,080	.187	.137	.237	-.728	-.863	-.624
	,090	.195	.144	.247	-.709	-.841	-.608
	,100	.203	.151	.256	-.692	-.821	-.592
	,150	.240	.183	.296	-.621	-.739	-.529
	,200	.273	.212	.333	-.564	-.673	-.478
	,250	.305	.241	.368	-.515	-.618	-.434
	,300	.337	.270	.404	-.472	-.568	-.394
	,350	.370	.300	.440	-.431	-.523	-.357
	,400	.405	.332	.478	-.393	-.479	-.321
	,450	.441	.365	.517	-.356	-.438	-.286
	,500	.479	.400	.560	-.319	-.398	-.252
	,550	.521	.439	.607	-.283	-.358	-.217
	,600	.568	.481	.660	-.246	-.318	-.181
,650	.620	.529	.719	-.207	-.276	-.143	
,700	.681	.584	.789	-.167	-.234	-.103	
,750	.753	.648	.874	-.123	-.189	-.059	
,800	.842	.726	.981	-.075	-.139	-.008	
,850	.959	.827	1.125	-.018	-.082	.051	
,900	1.130	.971	1.342	.053	-.013	.128	
,910	1.176	1.008	1.402	.070	.004	.147	
,920	1.228	1.050	1.470	.089	.021	.167	
,930	1.287	1.099	1.548	.110	.041	.190	
,940	1.357	1.155	1.642	.133	.063	.215	
,950	1.441	1.222	1.756	.159	.087	.244	
,960	1.547	1.305	1.901	.189	.116	.279	
,970	1.688	1.415	2.097	.227	.151	.322	
,980	1.895	1.573	2.392	.278	.197	.379	
,990	2.274	1.856	2.947	.357	.269	.469	

PROBIT: CL50 Y 90 A LAS 24HRS

Límites de confianza							
	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Concentración de aceite esencial (%)			Límites de confianza al 95% para log(Concentración de aceite esencial (%))a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	.113	.073	.153	-.948	-1.137	-.817
	,020	.132	.088	.174	-.881	-1.055	-.759
	,030	.145	.099	.189	-.838	-1.003	-.723
	,040	.156	.109	.202	-.806	-.963	-.696
	,050	.166	.117	.212	-.780	-.932	-.673
	,060	.175	.125	.222	-.758	-.905	-.654
	,070	.183	.132	.230	-.738	-.881	-.637
	,080	.190	.138	.239	-.721	-.860	-.622
	,090	.197	.144	.246	-.705	-.841	-.609
	,100	.204	.150	.253	-.691	-.823	-.596
	,150	.234	.178	.286	-.630	-.750	-.544
	,200	.262	.203	.315	-.582	-.692	-.502
	,250	.288	.227	.343	-.541	-.643	-.465
	,300	.313	.252	.369	-.504	-.599	-.432
	,350	.339	.276	.397	-.470	-.559	-.402
	,400	.365	.301	.425	-.438	-.521	-.372
	,450	.392	.328	.454	-.406	-.485	-.343
	.500	.421	.356	.485	-.375	-.449	-.314
	,550	.453	.385	.519	-.344	-.414	-.285
	,600	.487	.418	.556	-.313	-.379	-.255
	,650	.524	.453	.599	-.280	-.344	-.223
	,700	.567	.494	.648	-.246	-.307	-.188
	,750	.618	.540	.707	-.209	-.268	-.150
	,800	.679	.595	.781	-.168	-.226	-.107
	,850	.758	.664	.881	-.120	-.178	-.055
	.900	.871	.758	1.029	-.060	-.120	.012
	,910	.901	.783	1.069	-.045	-.106	.029
	,920	.934	.810	1.114	-.029	-.092	.047
	,930	.973	.841	1.167	-.012	-.075	.067
	,940	1.017	.876	1.229	.007	-.058	.089
	,950	1.070	.918	1.304	.030	-.037	.115
	,960	1.137	.969	1.399	.056	-.014	.146
	,970	1.223	1.035	1.526	.088	.015	.184
	,980	1.349	1.130	1.715	.130	.053	.234
	,990	1.575	1.294	2.064	.197	.112	.315

PROBIT: CL50 Y 90 A LAS 48HRS

Límites de confianza							
	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Concentración de aceite esencial (%)			Límites de confianza al 95% para log(Concentración de aceite esencial (%))a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	.179	.039	.267	-.746	-1.408	-.574
	,020	.196	.049	.283	-.707	-1.312	-.549
	,030	.208	.056	.293	-.682	-1.251	-.533
	,040	.217	.062	.301	-.663	-1.206	-.521
	,050	.225	.068	.308	-.648	-1.169	-.511
	,060	.232	.073	.314	-.635	-1.137	-.503
	,070	.238	.078	.319	-.624	-1.110	-.496
	,080	.243	.082	.324	-.614	-1.085	-.489
	,090	.249	.087	.329	-.604	-1.062	-.483
	,100	.254	.091	.333	-.596	-1.042	-.478
	,150	.275	.111	.351	-.560	-.956	-.455
	,200	.293	.129	.366	-.532	-.888	-.437
	,250	.310	.148	.379	-.508	-.830	-.421
	,300	.326	.167	.392	-.487	-.777	-.407
	,350	.342	.187	.404	-.467	-.729	-.394
	,400	.357	.207	.416	-.448	-.684	-.381
	,450	.372	.229	.428	-.429	-.640	-.368
	,500	.388	.253	.441	-.411	-.597	-.356
	,550	.405	.279	.454	-.393	-.554	-.343
	,600	.422	.308	.469	-.375	-.511	-.329
	,650	.441	.340	.486	-.355	-.468	-.314
	,700	.462	.376	.506	-.335	-.424	-.296
	,750	.486	.416	.533	-.314	-.381	-.273
	,800	.513	.458	.574	-.290	-.339	-.241
	,850	.548	.499	.643	-.262	-.302	-.192
	,900	.594	.540	.763	-.226	-.268	-.117
	,910	.606	.549	.797	-.218	-.261	-.098
	,920	.619	.558	.837	-.208	-.253	-.077
	,930	.634	.568	.883	-.198	-.245	-.054
	,940	.650	.580	.939	-.187	-.237	-.027
	,950	.670	.592	1.007	-.174	-.228	.003
	,960	.694	.607	1.095	-.159	-.217	.039
	,970	.725	.625	1.213	-.140	-.204	.084
	,980	.768	.650	1.392	-.115	-.187	.144
	,990	.840	.690	1.730	-.076	-.161	.238

PROBIT: CL50 Y 90 A LAS 72HRS

Límites de confianza							
	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Concentración de aceite esencial (%)			Límites de confianza al 95% para log(Concentración de aceite esencial (%))a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	.136	.059	.197	-.867	-1.230	-.705
	,020	.150	.069	.213	-.823	-1.158	-.673
	,030	.160	.077	.223	-.795	-1.112	-.652
	,040	.168	.084	.231	-.774	-1.078	-.637
	,050	.175	.089	.238	-.756	-1.050	-.624
	,060	.181	.094	.244	-.742	-1.026	-.613
	,070	.187	.099	.249	-.729	-1.005	-.604
	,080	.192	.103	.254	-.717	-.986	-.595
	,090	.196	.107	.258	-.707	-.970	-.588
	,100	.201	.111	.263	-.697	-.954	-.581
	,150	.220	.129	.281	-.657	-.889	-.551
	,200	.237	.145	.297	-.626	-.838	-.528
	,250	.252	.161	.311	-.599	-.794	-.507
	,300	.267	.176	.324	-.574	-.755	-.489
	,350	.281	.191	.337	-.552	-.719	-.472
	,400	.295	.207	.350	-.530	-.685	-.455
	,450	.309	.223	.364	-.509	-.652	-.439
	,500	.324	.240	.377	-.489	-.620	-.423
	,550	.340	.258	.392	-.469	-.588	-.407
	,600	.357	.278	.407	-.448	-.556	-.390
	,650	.375	.300	.424	-.426	-.523	-.372
	,700	.395	.324	.444	-.404	-.489	-.353
	,750	.418	.352	.467	-.379	-.454	-.331
	,800	.444	.384	.496	-.352	-.416	-.304
	,850	.478	.422	.536	-.320	-.375	-.270
	,900	.524	.469	.599	-.281	-.329	-.222
	,910	.536	.480	.617	-.271	-.319	-.210
	,920	.549	.492	.637	-.261	-.308	-.196
	,930	.564	.505	.661	-.249	-.297	-.180
	,940	.580	.519	.689	-.236	-.285	-.162
	,950	.600	.535	.723	-.222	-.272	-.141
	,960	.625	.554	.767	-.204	-.256	-.115
	,970	.656	.578	.825	-.183	-.238	-.083
	,980	.700	.609	.912	-.155	-.215	-.040
	,990	.775	.661	1.070	-.111	-.180	.029

Anexo 6. Datos Para La Determinación De La CL₅₀ Y CL₉₀ Mediante Probit Hasta Las 72 Horas De Exposición

Concentración de aceite esencial (% v/v)	Muertos						Total (Vivos)
	Número de repeticiones						
	1	2	3	4	5	6	
0.1	0	0	0	0	0	0	20
0.5	10	9	8	11	9	8	20
1	14	15	16	13	14	15	20
2	17	19	19	19	19	19	20
3	19	19	19	20	19	20	20
4	19	19	20	19	20	20	20
5	20	20	20	20	20	20	20
6	20	20	20	20	20	20	20
10	20	20	20	20	20	20	20

Anexo 7. Fotográfico

PLANTA Y EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Fotografía N°1: a.-Planta fresca Pampa Anís (*Tagetes filifolia* Lag.) b.-. Planta seca



Fotografía N°2: *Tagetes filifolia* Lag. característica de la flor



Fotografía N°3: Lugar de recolección de la planta



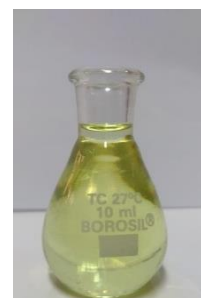
Fotografía N°4: Extracción del aceite esencial- Hidrodestilación con trampa de



Fotografía N°5: Extacción del aceite esencial- Hidrodestilación con trampa de Clevenger



Fotografía N°6: Aceite esencial – *Tagetes filifolia* Lag.



Gorgojo del maíz (*Pagiocerus frontalis*)

Fotografía N°7: *P. frontalis* en etapa adulta. Se observa emergiendo del grano de maíz, y otro listo para volar con sus alas abiertas



Fotografía N°8: Infestando maíz blanco almacenado



Fotografía N°9: Valler Sagrado – Cusco. Lugar de cultivo de maíz blanco. Siembra y



Fotografía N°10: Secado de maíz en San Salvador- Lugar de recolección de *P. frontalis*



Fotografía N°11: Crianza de *P. frontalis*



Fotografía N°12: Etapa adulta de *P. frontalis*

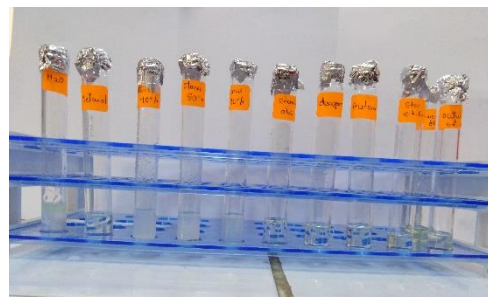


Determinación de las Propiedades Físicoquímicas del Aceite Esencial de *Tagetes filifolia* Lag.

Fotografía N°13: Solubilidad



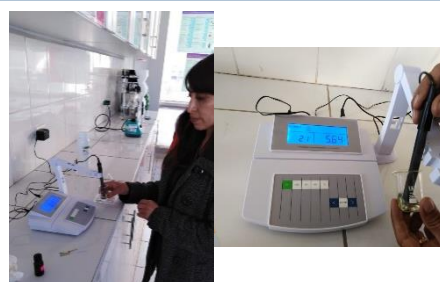
Fotografía N°14: Resultados de la prueba de solubilidad



Fotografía N°15: pH – Determinación en papel de pH



Fotografía N°16: pH – Determinación en equipo potenciométrico



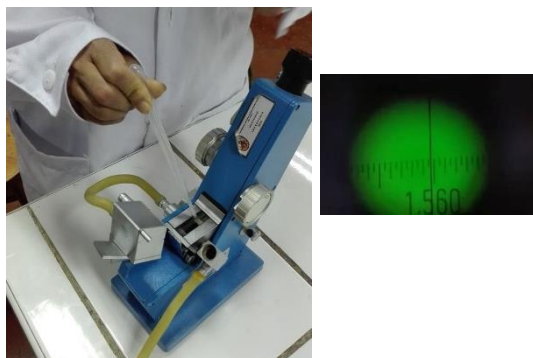
Fotografía N°17: Densidad-Pesando el picnómetro con el aceite esencial



Fotografía N°18: Picnómetro con aceite esencial



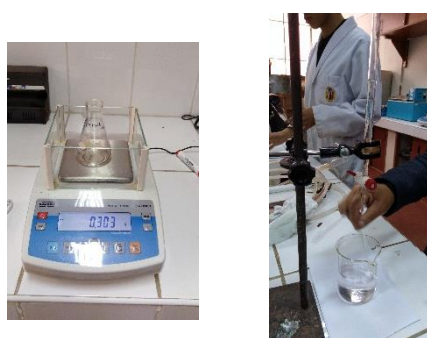
Fotografía N°19: Índice de refracción



Fotografía N°20: Rotación óptica



Fotografía N°21: Índice de acidez



Fotografía N°22: Índice de saponificación



Fotografía N°23: Muestra de aceite esencial y reactivos para la determinación del índice de saponificación



Fotografía N°24: Reflujo del aceite esencial con solución etanólica de



Determinación de la Composición Química del Aceite Esencial

Fotografía N°25 Cromatografía de gases.

a.- Preparación de la muestra. b.- Equipo Cromatógrafo de Gases con



Fotografía N°26: Espectro UV-Vis. **a.- Preparación de la muestra. b.- Equipo**



Fotografía N°27: Espectrometro Infrarrojo con Transformadas de Fourier FTIR–ATR. Dispositivo ATR (Reflectancia total atenuada) del FTIR



DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀) SOBRE EL GORGOJO DEL MAÍZ (*Pagiocerus frontalis*)

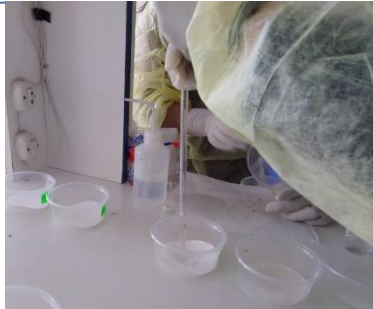
Fotografía N°28: Preparación de las concentraciones del aceite esencial



Fotografía N°29: Preparación de los materiales



Fotografía N°30: Aplicación de las diferentes concentraciones de aceite esencial



Fotografía N°31: Determinando la actividad insecticida



Fotografía N°32: Contabilizando los gorgojos muertos de *P. frontalis*



Fotografía N°33: Contando los gorgojos muertos con ayuda de una lupa



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL INSECTICIDA PATRÓN Y RESULTADOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL AE.

Fotografía N°34: Prueba con el patrón



Fotografía N°35: Preparación y aplicación del patrón



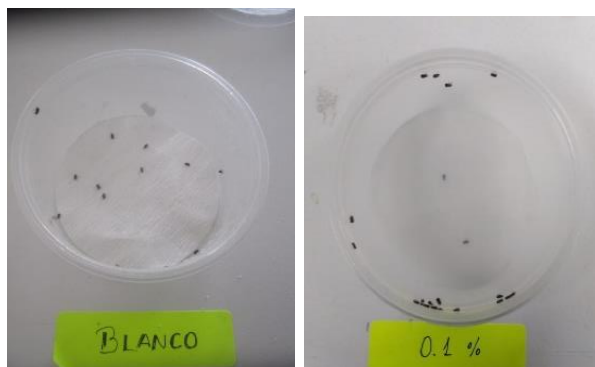
Fotografía N°36: Actividad insecticida del aceite esencial de *Tagetes filifolia*. Al 10 %. Todos los gorgojos se encuentran muertos



Fotografía N°37: Actividad insecticida del aceite esencial de *Tagetes filifolia*. Al 5 %. Todos los gorgojos se encuentran muertos



Fotografía N°38: Blanco y al 1 %. De concentración de AE. Gorgojos vivos.



Fotografía N°39: Actividad insecticida del Patrón: fosforo de aluminio

