

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA**



**SCREENING FITOQUÍMICO E INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES
DE TRES PLANTAS ANISADAS DE EL SALVADOR**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

Br. FRANCISCA GUADALUPE PINEDA SORTO

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS

DIRECTORES:

Dr. ALEX ADONAI OSORIO LANDAVERDE

Dr. GUILLERMO DÍAZ Crespín

CIUDAD UNIVERSITARIA, 18 DE MAYO DE 2021

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE QUÍMICA**



**SCREENING FITOQUÍMICO E INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES
DE TRES PLANTAS ANISADAS DE EL SALVADOR**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**PRESENTADA POR:
Br. FRANCISCA GUADALUPE PINEDA SORTO**

TRIBUNAL EVALUADOR:

Licda. MARÍA TRINIDAD TRIGUEROS DE CASTRO

MSc. NOHEMY ELIZABETH VENTURA CENTENO

CIUDAD UNIVERSITARIA, 18 DE MAYO DE 2021

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

AUTORIDADES:

MSc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO
RECTOR

MSc. FRANCISCO ANTONIO ALARCÓN SANDOVAL
SECRETARIO GENERAL

Lic. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN
FISCAL GENERAL

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

Lic. MAURICIO HERNÁN LOVO CÓRDOVA
DECANO

Lic. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA
SECRETARIO

Lic. NELSON MAURICIO COTO MENDOZA
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE QUÍMICA

"Tienes que ser muy rápido para mantenerte en el mismo lugar. Pero si quieres llegar a otra parte, debes ir dos veces más rápido."

Lewis Carroll.

Agradecimientos

A Dios padre celestial que ha sido mi protector en todo momento, me ha guiado, iluminado y dado la salud y fuerzas para trabajar, estudiar y salir adelante, a él le debo este logro. A mi mami Lucía que siempre ha orado por mi bienestar junto con mi papi Osmín Pineda.

*A la Universidad de El Salvador, por darme los medios y recursos necesarios para mi formación profesional. De manera muy especial quiero extender mis agradecimientos a mis asesores de tesis, al **Dr. Alex Adonai Osorio Landaverde** y al **Dr. Guillermo Díaz Crespín**. Por todo su apoyo en todo el proceso de investigación. Ellos han sido parte importante para poder llegar a una de mis metas de vida. A los miembros del tribunal calificador: MSc. Nohemy Elizabeth Ventura Centeno y Licda. María Trinidad Trigueros de Castro, por sus comentarios y sugerencias para el documento escrito ¡GRACIAS!*

*El camino no ha sido nada fácil, pero agradezco enormemente a quienes me motivaron a estudiar una carrera cuando parecía imposible hacerlo por medios propios: mi hermana **Flor María Pineda Sorto**, siempre tendré presente las veces que me impulsó a no darme por vencida y a aprovechar cada oportunidad académica y laboral que Dios puso en mi camino, al igual que René Gómez quien siempre me apoyo en el duro trayecto ¡GRACIAS!*

*Las verdaderas amistades son difíciles de encontrar, pero quien encuentra una, encuentra un tesoro. Mis niñas, compañeras, hermanas y grandes amigas; mi gran bendición en la vida, un obsequio que encontré en la FMO, **Karen Esmeralda Vásquez** y **Bethis Carolina Márquez**, siempre agradeceré todo su apoyo en este trayecto.*

Así mismo, agradezco a los compañeros con quienes finalicé la carrera y con quienes compartimos muchas experiencias académicas y laborales y que de una u otra forma me brindaron su apoyo con su buen compañerismo y amistad, de igual manera, a los maestros de la Escuela de Química que fueron parte de mi formación académica.

Finalmente, quiero extender mis agradecimientos a mi cuñado José Trejo, quien recolectó una de las plantas (material vegetal) para este proyecto de investigación. A mi tía Lourdes Pineda vda. De Mineros, quien siempre abrió las puertas de su casa mientras estuve en el proceso final del proyecto de investigación.

Contenido

Resumen.....	1
1.0 Introducción	3
2.0 Objetivos.....	6
3.0 Marco Teórico.....	8
3.1. Aceites esenciales	8
3.2 Terpenos.....	9
3.3 Compuestos aromáticos y su roll.	14
3.4 Selección del material vegetal	16
3.4.1 Recolección.....	17
3.5 Extracción y fraccionamiento de los metabolitos de la fuente vegetal.....	17
3.5.1 Destilación por arrastre de vapor	17
3.5.2 Extracción con disolventes	18
3.5.3 Maceración o extracción alcohólica.....	19
3.5.4 Extracción por fluidos supercríticos	19
3.5.5 Extracción por microondas	20
3.6 Medicina ancestral de El Salvador.....	22
3.7 Descripción general de las plantas analizadas: <i>Piper auritum</i> Kunth, <i>Piper marginatum</i> Jacq., y <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	23
3.7.1 Generalidades del Género Piper.....	23
3.7.1.1 Actividad insecticida del Género Piper: Fitoquímica	24
3.7.1.2 <i>Piper auritum</i> Kunth.....	27
3.7.1.2.1 Hábitat.....	27
3.7.1.2.2 Usos medicinales.	28
3.7.1.2.3 Fitoquímica y actividad insecticida.	28
3.7.1.3 Descripción de <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	30
3.7.1.3.2 Usos tradicionales	31
3.7.1.3.3 Fitoquímica y actividad insecticida de <i>Piper marginatum</i> Jacq.....	32
3.7.2 Generalidades de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	33
3.7.2.1 Descripción botánica de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	34

3.7.2.2 Usos tradicionales del Anisillo (<i>Tagetes filifolia</i> Lag.)	35
3.7.2.3 Fitoquímica y actividad insecticida de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	35
3.8 Generalidades de Cromatografía.....	36
3.8.1 Generalidades de Cromatografía en capa fina analítica y preparativa (CCF y CCFP).36	
3.8.1.1 Cromatografía en capa fina (CCF).....	37
3.8.1.2 Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP).	38
3.8.2 Cromatografía en columna (CC).....	38
3.8.3 Cromatografía de gases.....	38
3.8.4 Cromatografía de gases con espectrometría de masas.	40
4.0 Metodología	42
4.1 Tipo de Estudio	42
4.2 Investigación Bibliográfica.....	42
4.3 Investigación de Laboratorio	42
4.4 Recolección del Material Vegetal.....	42
4.5 Extracción de Los Aceites Esenciales.....	43
4.5.1 Secado del material vegetal	43
4.5.2 Maceración.....	44
4.5.3 Filtración	44
4.5.4 Destilación a presión reducida.....	45
4.5.5 Secado.....	45
4.6 Separación y Obtención de Compuestos de Los Aceites Esenciales, por Cromatografía en Capa Fina Analítica y Preparativa	46
4.6.1 Separación de compuestos por cromatografía en capa fina analítica y su visualización	46
4.6.2 Obtención de compuestos por cromatografía en capa fina preparativa	47
4.7 Esquemas de la Metodología	49
4.7.1 Esquema del procedimiento experimental para la planta <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	49
4.7.2 Esquema del procedimiento experimental para la planta <i>Piper marginatum</i> Jacq.	50
4.7.3 Esquema del procedimiento experimental para la planta <i>Piper auritum</i> Kunth.	51
4.8 Identificación de Compuestos de Los Aceites Esenciales por Espectroscopía de Infrarrojo (Ir) y Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ¹ H).....	52

4.8.1 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	52
4.8.2 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ¹ H).	52
4.9 Actividad Insecticida	53
4.9.1 Selección de insectos para ensayos.....	53
4.9.2 Recolección de insectos para ensayos.....	54
4.9.3 Ensayos de actividad insecticida de los aceites esenciales	55
4.9.4 Preparación de disoluciones de aceite esencial para evaluar actividad insecticida.	56
5.0 Resultados y Discusión.....	62
5.1 Aislamiento de compuestos mayoritarios	62
5.2 Identificación de compuestos mayoritarios aislados.....	62
5.2.1 Compuesto 1	62
5.2.2 Compuesto 2 (p.a.1).....	63
5.2.3 Compuesto 3 (p.a.2).....	64
5.2.4 Compuesto 4.	68
5.3 Evaluación de la actividad insecticida de los aceites esenciales de las tres plantas anisadas.	71
5.4 Evaluación estadística de la actividad insecticida de los aceites esenciales de las tres plantas anisadas.	76
5.4.1 Estudio del efecto de la concentración del aceite esencial sobre los insectos evaluados.	76
5.4.2 Evaluación de la eficiencia insecticida de los aceites esenciales aislados.....	78
6.0 Conclusiones.	84
7.0 Recomendaciones	86
8.0 Referencias Bibliográficas.	88
8.1 Bibliografía	88
9.0 Anexos	104
9.1 Constancia de identificación de: <i>Tagetes Filifolia</i> Lag., <i>Piper auritum</i> Kunth y <i>Piper marginatum</i> Jacq.	104
9.2 Constancia de identificación de insectos: <i>Sitophilus zeamais</i> y <i>Kaloterms flavicollis</i> . .	105

Tabla de Figuras

Figura 1. Unidad de Isopreno.....	9
Figura 2. Biosíntesis del 2-metil-3-buten-2-ol.....	9
Figura 3. Estructuras químicas de algunos monoterpenos de aceites esenciales.....	10
Figura 4. Biosíntesis de geraniol, citronelol, nerol, acetato de linalilo a partir del geranil pirofosfato	11
Figura 5. Biosíntesis de algunos sesquiterpenos.....	12
Figura 6. Estructuras químicas de algunos sesquiterpenos de aceites esenciales.	13
Figura 7. Estructuras químicas de algunos derivados fenilpropánicos de aceites esenciales.	14
Figura 8. Estructuras químicas de algunos derivados fenilpropánicos de aceites esenciales.	16
Figura 9. Esquema de destilación por arrastre de vapor	18
Figura 10. Esquema de extracción con fluidos supercríticos.....	20
Figura 11. Esquema de extracción con fluidos supercríticos.....	21
Figura 12. Estructura de metabolitos con actividad insecticida obtenidos del género Piper.....	26
Figura 13. Planta de Piper auritum Kunth.	28
Figura 14. Hojas de Piper auritum Kunth.	29
Figura 15. Aceite esencial de Piper auritum Kunth.	30
Figura 16. Piper marginatum Jacq.	31
Figura 17. Aceite esencial de Piper marginatum Jacq.	32
Figura 18. Tagetes filifolia Lag.	34
Figura 19. Aceite esencial de Tagetes filifolia Lag.	36
Figura 20. Esquemas de cromatografía en capa fina	37

Figura 21. Esquema de Cromatografía de gases.....	39
Figura 22. Zonas geográficas de recolección del material vegetal.	43
Figura 23. Material vegetal de <i>Tagetes filifolia</i> Lag. Colectado.	43
Figura 24. Maceración de material vegetal.....	44
Figura 25. Filtración del aceite extraído	44
Figura 26. Eliminación del solvente de extracción a presión reducida.....	45
Figura 27. Eliminación de agua del aceite con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).....	46
Figura 28. Separación por cromatografía en capa fina analítica y visualización de compuestos.	47
Figura 29. Esquema de cromatografía en capa fina preparativa, elución con ciclohexano/ AcOEt 85:15%).....	48
Figura 30. Obtención de compuestos de interés por cromatografía en capa fina preparativa.	48
Figura 31. Esquema de extracción del aceite esencial y de obtención de compuestos por cromatografía en capa fina preparativa de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	49
Figura 32. Esquema de extracción del aceite esencial y de obtención de compuesto por cromatografía en capa fina preparativa de <i>Piper marginatum</i> Jacq.	50
Figura 33. Esquema de extracción del aceite esencial y de obtención de compuesto por cromatografía en capa fina preparativa de <i>Piper auritum</i> Kunth.	51
Figura 34. Equipo de Infrarojo Thermo Scientific Nicolet y Unidad de Reflectancia Total Atenuada (ATR de ZnSe).....	52
Figura 35. Zonas geográficas de recolección de los insectos utilizados en ensayos.	54
Figura 36. Preparación de las disoluciones de aceites esenciales para el ensayo de actividad insecticida.	57
Figura 37. Evaluación de actividad insecticida de los aceites esenciales, en Gorgojo del maíz (<i>Sitophilus zeamais</i>).....	58
Figura 38. Espectro infrarrojo de compuesto 1 aislado de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.....	63

Figura 39. Espectro infrarrojo de compuesto 2, obtenido de <i>Piper auritum</i> Kunth.	64
Figura 40. Espectro infrarrojo de compuesto 3, aislado de <i>Piper auritum</i> Kunth.....	65
Figura 41. Espectro ¹ H RMN (CDCl ₃ , 600 MHz) de compuesto 3, aislado de <i>Piper auritum</i> Kunth.	66
Figura 42. Sistemas spín de tipo ABX para protones: (A): protones aromáticos y (B): protones de vinilo terminal.....	67
Figura 43. Algunos ejemplos de biosíntesis de fenilpropanoides.....	67
Figura 44. Espectro infrarrojo de compuesto 4, obtenido de <i>Piper marginatum</i> Jacq.	68
Figura 45. Espectro ¹ H RMN (CDCl ₃ 600 MHz) de compuesto 4, aislado de <i>Piper marginatum</i> Jacq.	69
Figura 46. Sistema de spin AMX de protones aromáticos para el compuesto 4.	70
Figura 47. Evaluación de la actividad insecticida de <i>P. auritum</i> Kunth sobre <i>S. zeamais</i> , <i>D. frontalis</i> y <i>K. flavicollis</i>	74
Figura 48. Evaluación de la actividad insecticida de <i>P. marginatum</i> Jacq sobre <i>S. zeamais</i> , <i>D. frontalis</i> y <i>K. flavicollis</i>	75
Figura 49. Actividad insecticida de T.f sobre tres insectos.	80
Figura 50. Actividad insecticida de P.a. sobre tres insectos.	81
Figura 51. Actividad insecticida de P.m. sobre tres insectos.....	82
Figura 52. A: Las galerías en forma de "S" llenas de aserrín caracterizan los ataques del gorgojo del pino <i>Dendroctonus frontalis</i> . B: Galerías bajo la corteza de pino en forma de "Y" o "H" que están vacías de aserrín (indican ataques de los gorgojos descortezador.....	106

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de terpenos	10
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Piper auritum</i> Kunth.	27
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Piper marginatum</i> Jacq.	30
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	34
Tabla 5. Separación de compuestos por cromatografía en capa fina analítica	46
Tabla 6. Screening de la actividad insecticida de los aceites esenciales extraídos	56
Tabla 7. Concentraciones de las disoluciones de cada aceite esencial.	57
Tabla 8. Evaluación de la actividad insecticida de <i>Tagetes filifolia</i> Lag sobre <i>S. zeamais</i> , <i>K. flavicollis</i> y <i>D. frontalis</i>	58
Tabla 9. Evaluación de la actividad insecticida de <i>Piper auritum</i> Kunth sobre <i>S. zeamais</i> , <i>K. flavicollis</i> y <i>D. frontalis</i>	59
Tabla 10. Evaluación de la actividad insecticida de <i>Piper marginatum</i> Jacq. Sobre <i>Dendroctonus frontalis</i> <i>S. zeamais</i> , <i>K. flavicollis</i> y <i>D. frontalis</i>	60
Tabla 11. Resultados de la evaluación de la actividad insecticida de los aceites esenciales extraídos	72
Tabla 12. Evaluación de la actividad insecticida de <i>T. filifolia</i> Lag sobre <i>S. zeamais</i> , <i>D. frontalis</i> y <i>K. flavicollis</i>	72
Tabla 13. Evaluación de la actividad insecticida de <i>P. auritum</i> Kunth sobre <i>S. zeamais</i> , <i>K. flavicollis</i> y <i>D. frontalis</i>	73
Tabla 14. Evaluación de la actividad insecticida de <i>P. marginatum</i> Jacq sobre <i>S. zeamais</i> , <i>K. flavicollis</i> y <i>D. frontalis</i>	75
Tabla 15. Análisis ANOVA para el efecto insecticida de <i>T. filifolia</i> sobre <i>S. zeamais</i>	77
Tabla 16. Resumen del estudio ANOVA del efecto de T.f sobre los insectos.	77
Tabla 17. Resumen del estudio ANOVA del efecto de P.a sobre los insectos.	78
Tabla 18. Resumen del estudio ANOVA del efecto de P.m sobre los insectos.	78
Tabla 19. Resumen de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para T.f sobre tres especies de insectos.	79

Tabla 20. Resumen de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para P.a. sobre tres especies de insectos. 80

Tabla 21. Resumen de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para P.m. sobre tres especies de insectos. 81

Resumen

El presente trabajo trata sobre la extracción de aceites esenciales de tres plantas anisadas de la flora salvadoreña: *Tagetes filifolia* Lag, *Piper auritum* Kunth y *Piper marginatum* Jacq. con el método de extracción con disolventes orgánicos. Se realizó el aislamiento de los metabolitos secundarios mayoritarios de los tres aceites esenciales, utilizando técnicas cromatográficas, para este proceso de aislamiento se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina preparativa (CCP) pero para poder identificar el solvente o mezcla de solventes fue necesario realizar previo a CCP, repetidas cromatografías en capa fina analítica para establecer la fase móvil más adecuada con base a la separación de los compuestos que se visualizaron en una lámpara UV.

Se logró aislar cuatro compuestos para los cuales fue necesario realizar análisis espectroscópicos como: Infrarrojo (IR) y de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ^1H (RMN ^1H). El análisis IR se realizó en el laboratorio de Química Orgánica de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, mientras que los análisis de RMN ^1H se realizaron en el Laboratorio de investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica (UCR).

El procesamiento y el análisis de los espectros de RMN, se efectuaron apoyándose del software MestrenovaLITE. Al mismo tiempo, se hizo uso de simuladores: NMR Predict. y Spectra Database for Organic Compounds. Para la representación de las moléculas se utilizó el software ChemBiodraw Ultra 13.0. Además de las tablas de RMN y de grupos funcionales para IR que proporciona la bibliografía.

Como punto final se presenta la evaluación biológica de los aceites esenciales como un experimento que abre las puertas a más investigaciones siendo un análisis previo. Los bioensayos realizados con los aceites esenciales sobre tres especies de insectos: *Dendroctonus frontalis*, *Sitophilus zeamais* y *Kaloterme flavicollis*; están orientados en mostrar la actividad biológica que los aceites esenciales de las tres plantas anisadas en estudio, poseen como agentes insecticidas.



INTRODUCCIÓN

1.0 Introducción

El uso de los aceites esenciales extraídos de plantas aromáticas se hace desde la antigüedad en la medicina tradicional, y hasta la fecha, se ha expandido con el paso de los años por su amplio espectro farmacológico.

Es así que, el estudio de los aceites esenciales, utilizados como materias primas básicas para la industria de fragancias y sabores, se ha transformado en una de las áreas de investigación y desarrollo importante en muchos países; ya que estas sustancias son consideradas como material de desecho del metabolismo de las plantas; pero gracias a los estudios sobre ellos se reconoce su importancia biológica.

Los aceites esenciales, son mezclas de sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, son fracciones líquidas volátiles con aromas característicos, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en las industrias: cosmética (perfumes y aromatizantes); alimentos (condimentos y saborizantes), farmacéutica, agricultura (insecticidas) entre otros; y que generalmente son obtenidos por destilación con arrastre de vapor de agua (Albarracín Montoya & Gallo Palma, 2003)

En el presente, la investigación en productos naturales con actividad biológica, está desarrollando estudios enfocados en la agricultura, es por ello, que el presente trabajo presenta una compilación de información científica y técnica documental, que hace un razonamiento detallado, para conocer de las investigaciones ejecutadas, sobre los compuestos fitoquímicos que contienen los extractos vegetales con actividad biológica experimentados contra las enfermedades y plagas, ensayados con técnicas bioquímicas in vitro e in vivo con resultados sorprendentes. (Soletto, 2016)

La estructura química de los aceites esenciales, comprenden una mezcla de hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres o éteres. Los componentes más activos en estas mezclas son los terpenoides (principalmente monoterpenos y sesquiterpenos, aunque diterpenos también pueden estar presentes) y fenilpropanoides. (Ortiz, Posada, & Noguera, 2014)

Los principales métodos de extracción de estos aceites son: métodos directos (compresión, raspado, lesiones mecánicas de la corteza, destilación (hidrodestilación), extracción (con solventes volátiles o con fluidos supercríticos), enfleurage (adsorción sólido-líquido y/o sólido-gas), headspace (purga y trampa). (Stashenko, Plantas aromáticas y aceites esenciales., 1995).

En el desarrollo de esta investigación se empleó el método de extracción por solventes, mediante macerado con ciclohexano a temperatura ambiente. Una vez obtenido el aceite esencial, se procede a identificar sus componentes mayoritarios, para establecer su identidad química. Para lograr este objetivo se emplearon diversas técnicas cromatográficas, tales como, cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés), preparativa y de exclusión de tamaño; logrando aislar y purificar cuatro metabolitos mayoritarios, los cuales fueron elucidados mediante espectroscopia infrarrojo (FT-IR) y de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H).

Además, se evaluó la actividad biológica de los aceites obtenidos, ya que se ha demostrado el uso y aplicación para el control de plagas. (Soletto, 2016). Dicho estudio se realizó, evaluando el efecto de los aceites esenciales sobre dos especies de gorgojo y una de termita, expresando los resultados de manera cualitativa.

El presente trabajo da continuidad a estudios previos realizados en los laboratorios de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática sobre tres plantas anisadas: “hoja santa” (*Piper auritum* Kunth) (Kunth, 2016), “Santa María” (*Piper marginatum* Jacq.) (Jacquin, 2016), “anisillo” (*Tagetes filifolia* Lag). (Lagasca y Segura, 2016), sobre las cuales, hasta la fecha en El Salvador, no se reportaban estudios fitoquímicos, que confirmen su capacidad de ejercer una actividad biológica como insecticidas naturales.



OBJETIVOS

2.0 Objetivos

Objetivo General

Extraer los aceites esenciales para realizar análisis fitoquímico de tres plantas anisadas de la flora salvadoreña, así como evaluar su actividad insecticida.

Objetivos Específicos

1. Extraer los aceites esenciales de tres plantas medicinales de la flora salvadoreña, por el método de extracción con disolventes.
2. Aislar los metabolitos secundarios mayoritarios, de los aceites esenciales de: *Piper auritum* Kunth, *Piper marginatum* Jacq. y *Tagetes filifolia* Lag. por cromatografía en capa fina.
3. Identificar los metabolitos secundarios mayoritarios de los aceites de: *Piper auritum* Kunth, *Piper marginatum* Jacq. y *Tagetes filifolia* Lag. por Espectroscopia de Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ¹H).
4. Evaluar la actividad insecticida de los aceites esenciales.



MARCO TEÓRICO

3.0 Marco Teórico

3.1. Aceites esenciales

Son llamados así los constituyentes odoríferos o “esencias” de una planta. El termino aceite, probablemente se origina del hecho, de que el aroma de una planta está en glándulas o entre células de forma líquida, el cual, al igual que los aceites grasos son inmiscibles con el agua. Miembros en diversas familias botánicas son ricas en esencias, como: pináceas (pino); lauráceas (canela, laurel, sazafrán); apiáceas (apio, comino, perejil, anís); rutáceas (limón, naranja lima, mandarina); lamiáceas (lavanda, romero, timol); verbenáceas (orégano); mirtáceas (eucalipto, clavo); piperáceas (pimienta, matico) y asteráceas.

Estas esencias, se encuentran en diferentes partes de la planta; por ejemplo, en coníferas en todos los tejidos; en rosa en pétalos; en comino en semillas; en clavo de olor en brote o yema; en lima en corteza del fruto; en menta, en pelos glandulares de ramas y hojas; en *Costus*, en raíces. Las esencias se producen en glándulas especiales formadas por células secretoras que forman una bolsa donde se acumula el aceite esencial; el cual es precursor no volátil, con frecuencia glicósido, la descomposición es enzimática o en medio ácido diluido; esto se observa en almendras amargas, pimienta negra, vainilla. El rendimiento de esencia obtenido de una planta varía de milésimas por ciento del peso vegetal, hasta 1-3%. Algunas plantas tienen aceite esencial que difiere en composición, por ejemplo, la canela, el aceite esencial de las hojas contiene eugenol, de la corteza cinamaldehído y de la raíz, alcanfor.

Respecto al papel biológico desempeñado por las esencias en los vegetales, se ha especulado mucho; para algunos, actúan como hormonas en la polinización para atraer insectos; regulan transpiración; son productos de desecho metabólico. Los aceites esenciales se emplean en perfumería, alimentos, médica o fuentes de materias primas, v. gr. el citronelal, repelente de mosquitos; mentol calmante de dolores de muela y de garganta; el 1,8-cineol del eucalipto expectorante y antiséptico; los de anís, menta y canela carminativos y soporíferas; el de pino es desinfectante y desodorante; los de valeriana y de lavanda con efectos sedativos. Cada uno de los componentes aislados puede también tener una aplicación como el citral obtenido del zacate limón se ha usado para sintetizar vitamina A; el eugenol de clavo de olor es analgésico dental y se utiliza además en la producción de vainillina.

Al ser mezclas de compuestos orgánicos, los aceites esenciales están constituidos por dos tipos de familias de compuestos: **Terpenos y Compuestos aromáticos**. Los compuestos aromáticos se biosintetizan a través de la ruta del shikimato, se verá más adelante; ahora el centro es describir a los terpenos; que se biosintetizan a partir del isopentil pirofosfato (IPP), molécula de 5 carbonos C₅ (hemiterpenos) y por polimerización de esta estructura base, se producen las cadenas carbonadas que darán origen los diferentes terpenos. Hace más de un siglo se determinó que los hidrocarburos alifáticos que constituyen a los aceites esenciales tienen unidades C₁₀, C₁₅ y C₂₀. Normalmente los terpenos C₁₀ tienen fórmula molecular C₁₀H₁₆ (monoterpenos). Los terpenos C₁₀, se componen por dos unidades de **ISOPRENO (C₅H₈)**. Similarmente los terpenos C₁₅ (sesquiterpenos) y C₂₀ (diterpenos) derivan de tres y cuatro unidades de isopreno respectivamente. Aquellos terpenos que contienen oxígeno se llaman terpenoides.

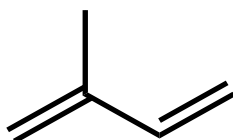


Figura 1. Unidad de Isopreno

3.2 Terpenos

Los terpenos derivan biosintéticamente del equivalente biológico del isopreno: **E1 Dimetilalilpirofosfato (DMAPP)**.

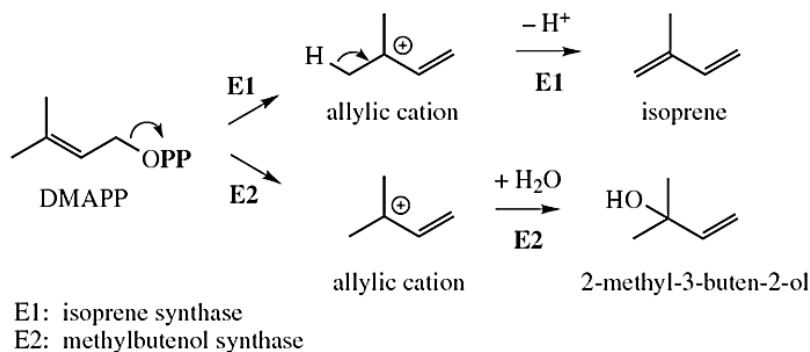


Figura 2. Biosíntesis del 2-metil-3-buten-2-ol

Los terpenos C₁₀, C₁₅ y C₂₀ se clasifican como monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos respectivamente. Los sesquiterpenos y diterpenos, tienen puntos de ebullición más altos que los monoterpenos, usualmente arriba de 250 °C.

Tabla 1. Clasificación de terpenos

Esqueleto	Subgrupo	Ejemplos
C ₁₀	Monoterpenos Lineales monocíclicos bicíclicos	Mirceno, linalol, geraniol, limoneno, carvona, mentol, alcanfor, tujona, α-pineno.
C ₁₅	Sesquiterpenos Lineales monocíclicos bicíclicos tricíclicos.	Farnesenos, ácido abcísico, α-vetivona, poligodial, pachulol.
C ₂₀	Diterpenos Lineales monocíclicos bicíclicos Tricíclicos macrocíclicos	Fitol, vitamina A, ácido abiético, giberelinas, neocembreno.
C ₃₀	Triterpenos	Escualeno, lupeol, bevirimat, β-amirina, ácido oleanólico, colesterol.
C ₄₀	Tetraterpenos	β-caroteno, licopeno, luteína, capsantina.

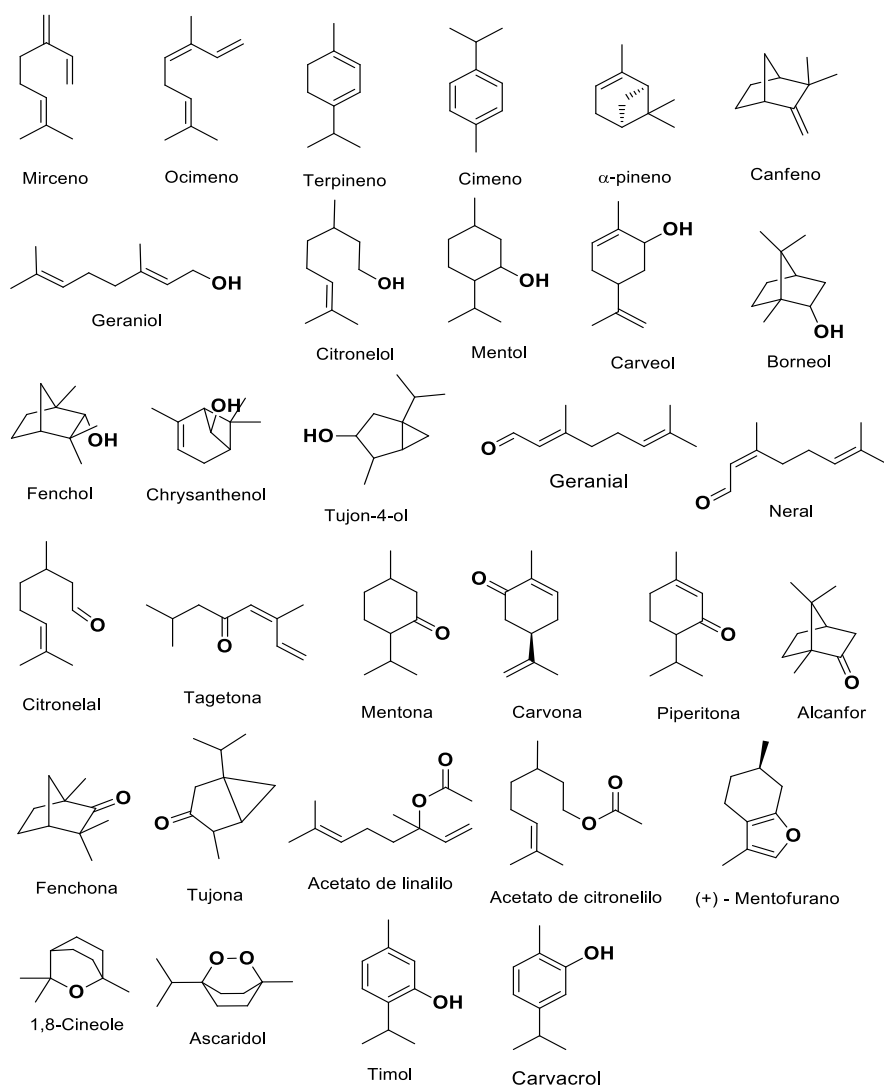


Figura 3. Estructuras químicas de algunos monoterpenos de aceites esenciales.

Los monoterenos y los sesquiterpenos son biosintetizados a partir de DMAPP, mediante reacciones estereoespecíficas de adición electrofílica, para formar el **Pirofosfato de Geranilo** (GPP), precursor de muchos constituyentes de las esencias, tales como geraniol, citronelol, nerol, acetato de linalilo, etc

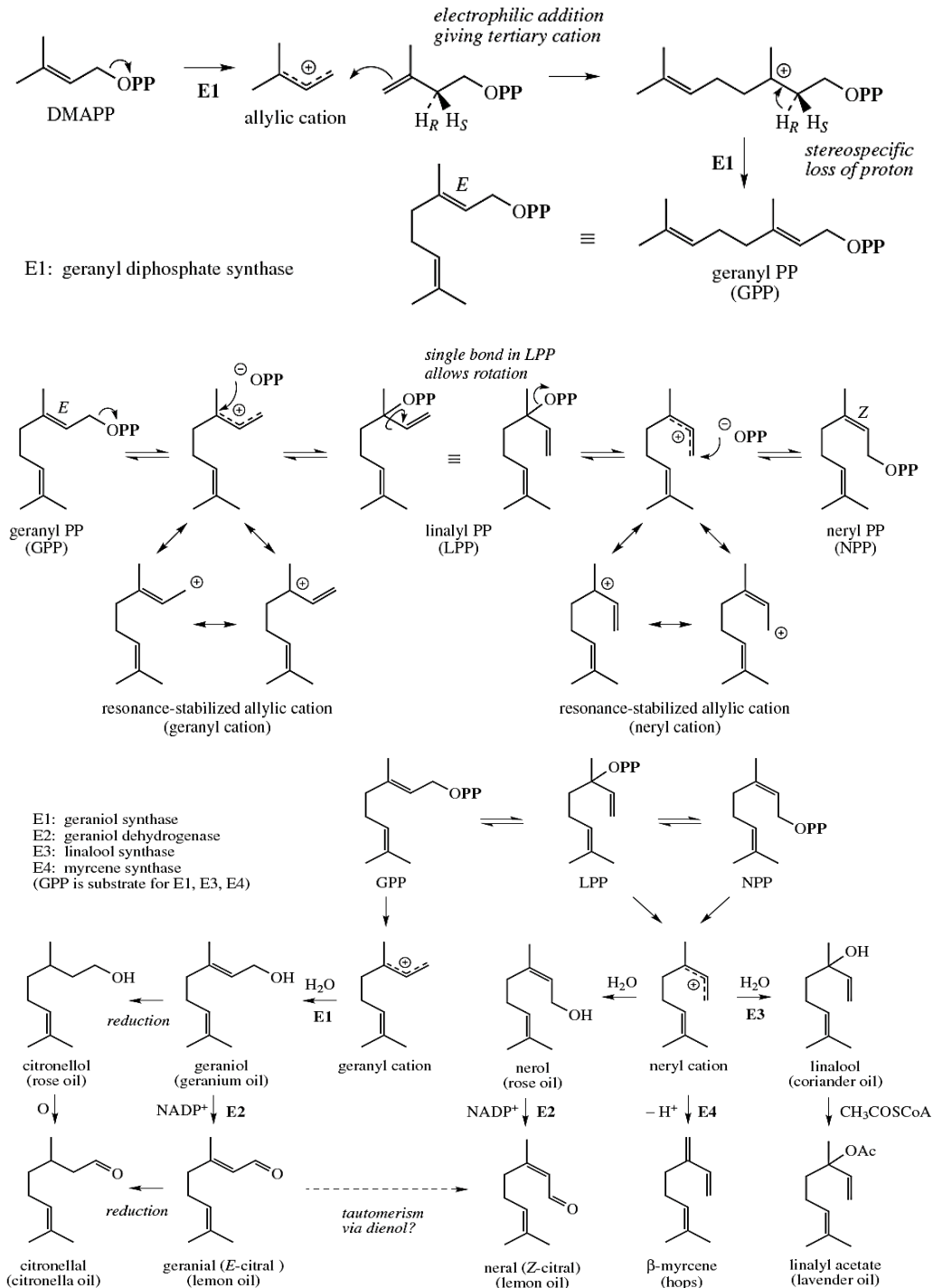


Figura 4. Biosíntesis de geraniol, citronelol, nerol, acetato de linalilo a partir del geranil pirofosfato

Así también, el **Pirofosfato de Farnesilo** (FPP) es el precursor químico para la biosíntesis de sesquiterpenos como guayacol, cariofileno y cedrol (Figura 4, 5). (Dewick, 2002), (Muñoz Acevedo, 2007).

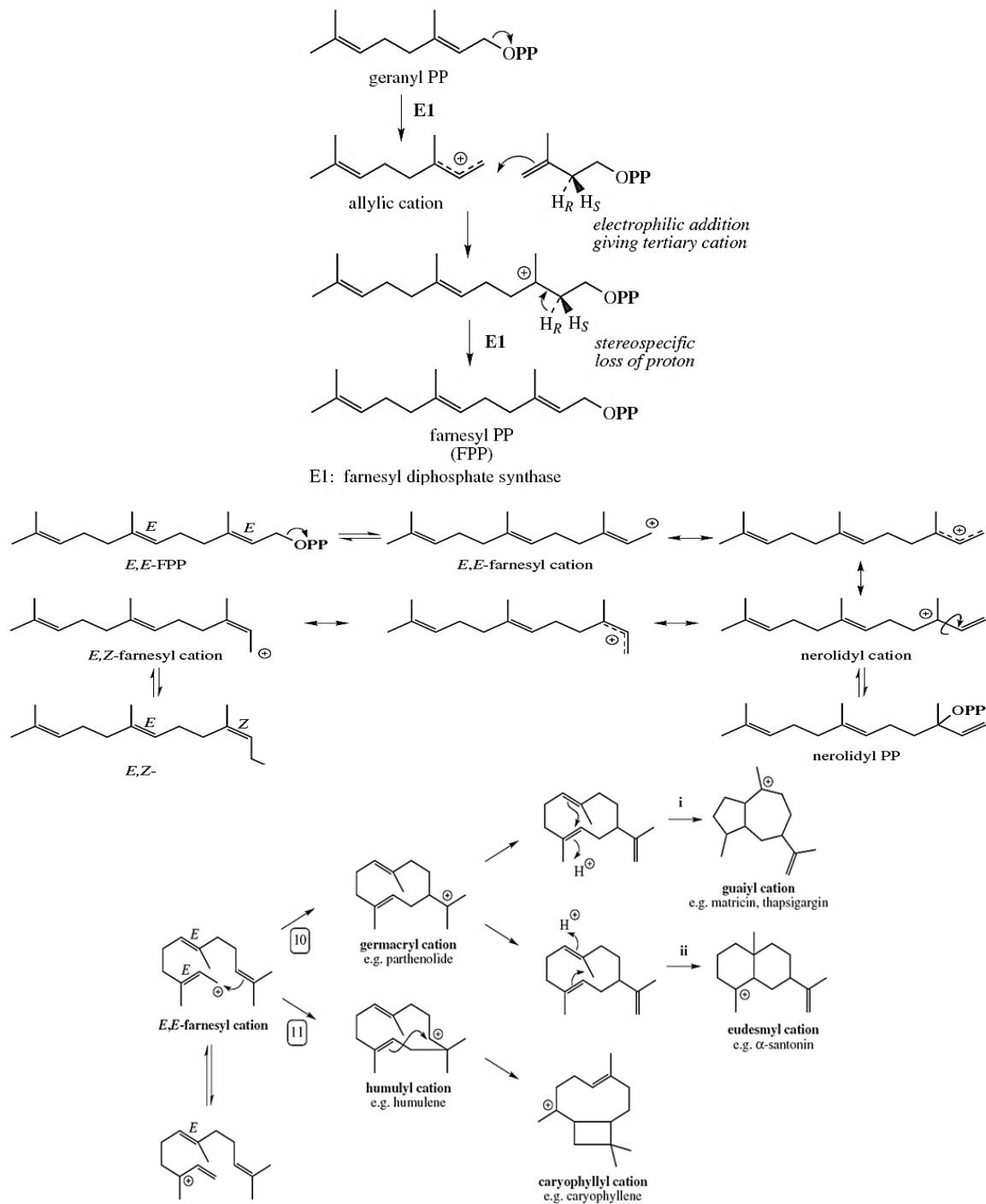


Figura 5. Biosíntesis de algunos sesquiterpenos

Los sesquiterpenos se forman a partir del montaje de tres unidades de isopreno (C15). La extensión de la cadena aumenta el número de ciclaciones lo que permite una gran variedad de estructuras. La estructura y función de los sesquiterpenos son similares a las de los monoterpenos. (Nemeth, 2005), (da Silva M. H., 1999), (Sumathykuty M. A., 1999), (Vila R. S.-R., 2010), (Sabine, 1975), (Buchbauer G. J., 1993), (Yan J. C., 2005), (Golding B. T., 1982), (Fidyt K. F., 2016), (Demirci B. H., 2003)

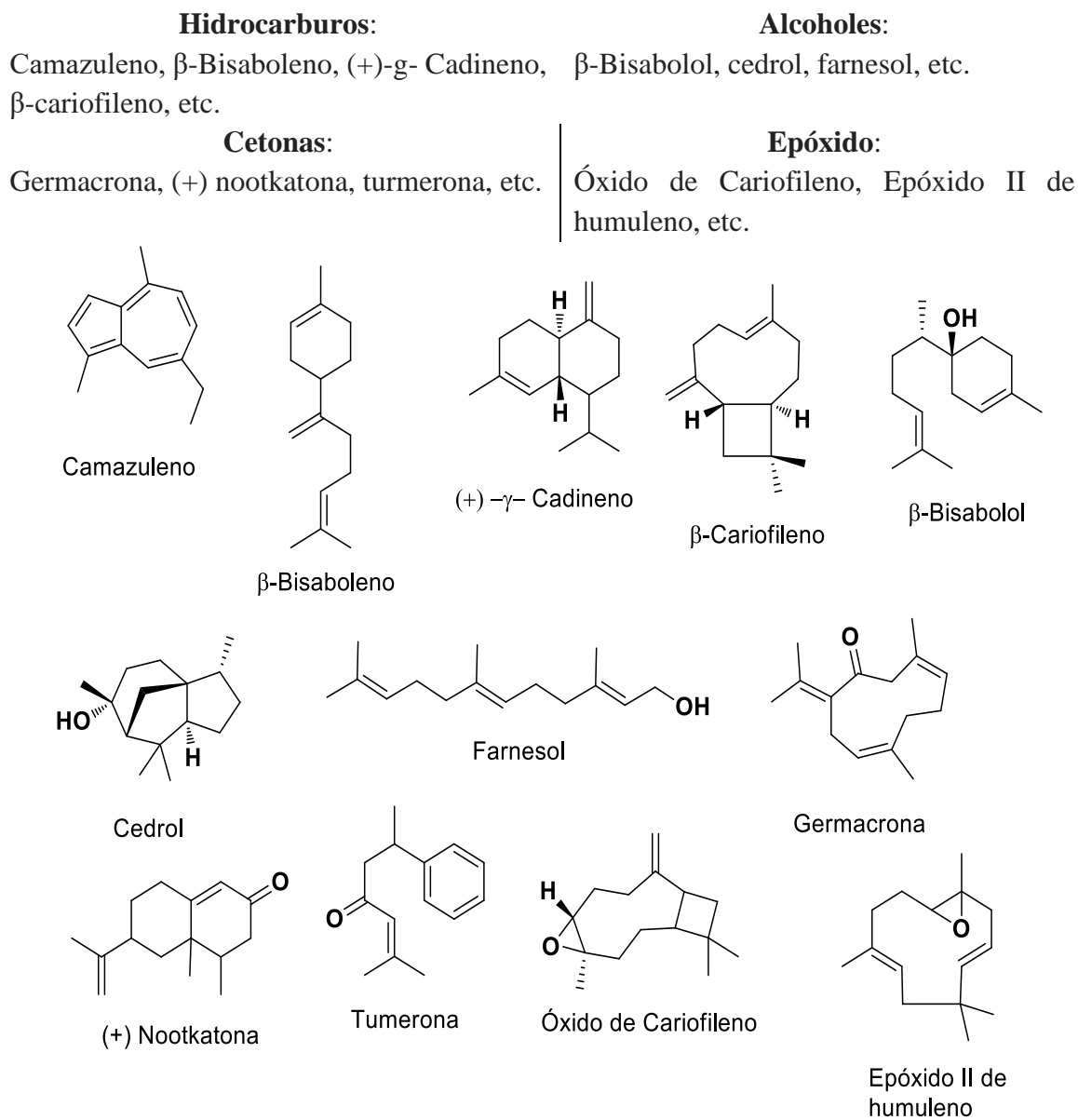


Figura 6. Estructuras químicas de algunos sesquiterpenos de aceites esenciales.

3.3 Compuestos aromáticos y su roll.

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas y pueden contener unos 20 a 60 compuestos a diferentes concentraciones, con dos o tres componentes principales en concentraciones bastante altas en comparación con otros componentes presentes en trazas; estos componentes principales determinan propiedades biológicas de los aceites esenciales.

Así mismo, la acción de repelencia de algunos compuestos como: eugenol, isoeugenol, metileugenol, safrol, isosafrol, a-pineno, limoneno, cineol y p-cimeno) sobre ninfas de *Periplaneta americana* investigadas por Ngoh et al. (1998). Demostraron que los derivados del benceno (es decir, eugenol, metil-eugenol, isoeugenol, safrol e isosafrol) son mejores tóxicos y repelentes a los insectos que los monoterpenos (limoneno, cineol y p-cimeno). (SendiI & and Ebadollahi, 2013).

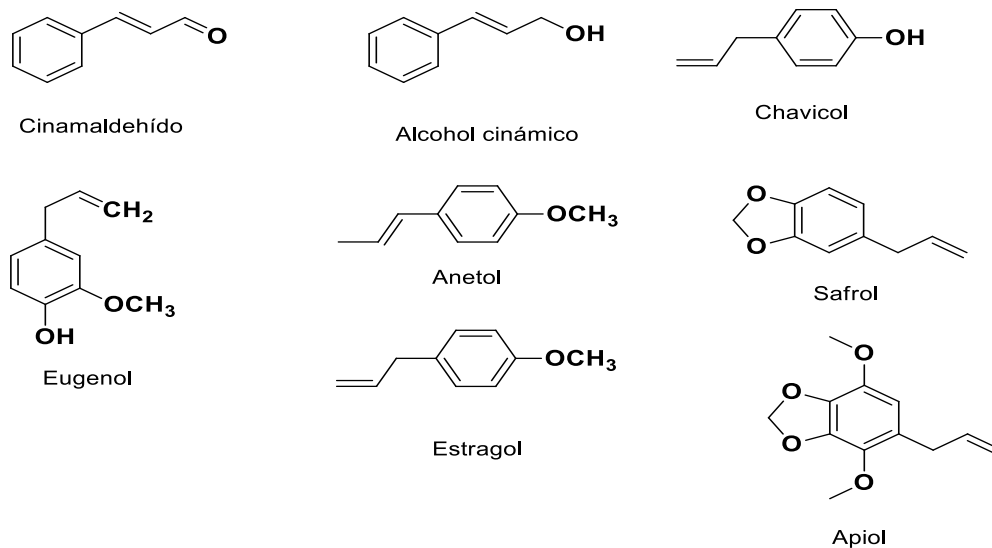
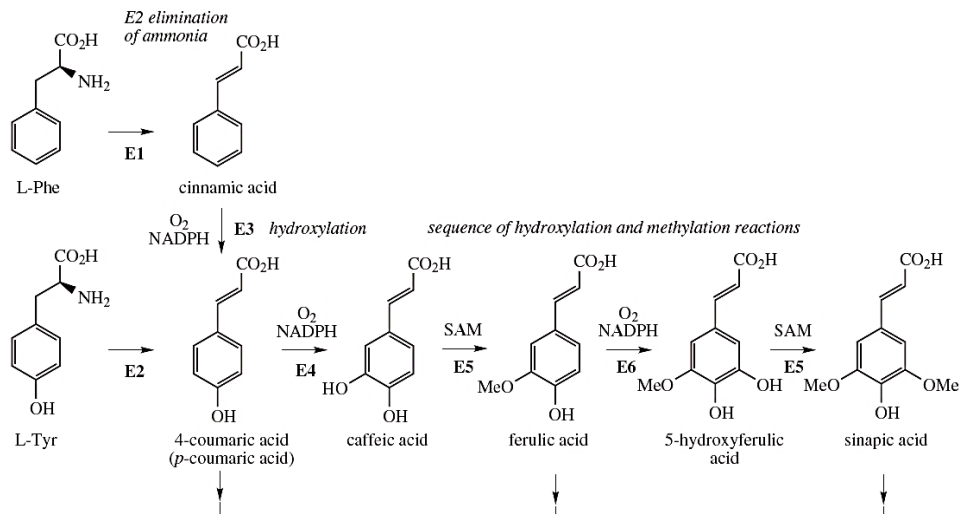


Figura 7. Estructuras químicas de algunos derivados fenilpropánicos de aceites esenciales.

Los metabolitos secundarios (m.s.) nitrogenados incluyen: alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La variedad estructural dentro de un mismo grupo de m.s. está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999).

Esta variabilidad genera perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre miembros de una población y entre diferentes órganos de la planta, y es parte de la estrategia de adaptación de las plantas. Se sabe que para microorganismos patógenos o para insectos y vertebrados herbívoros, es más difícil infectar o alimentarse de plantas que individualmente contienen mezclas diferentes de metabolitos secundarios, que de una población con una mezcla homogénea de los mismos (Castellanos & Espinosa García, 1997). Los precursores de la biosíntesis de m.s. se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato.

Fenilpropanoides: Estos compuestos se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos y se sintetizan a partir de un precursor común, el ácido cinámico, derivado de la fenilalanina por la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa. (Sepúlveda Jiménez, 2003)



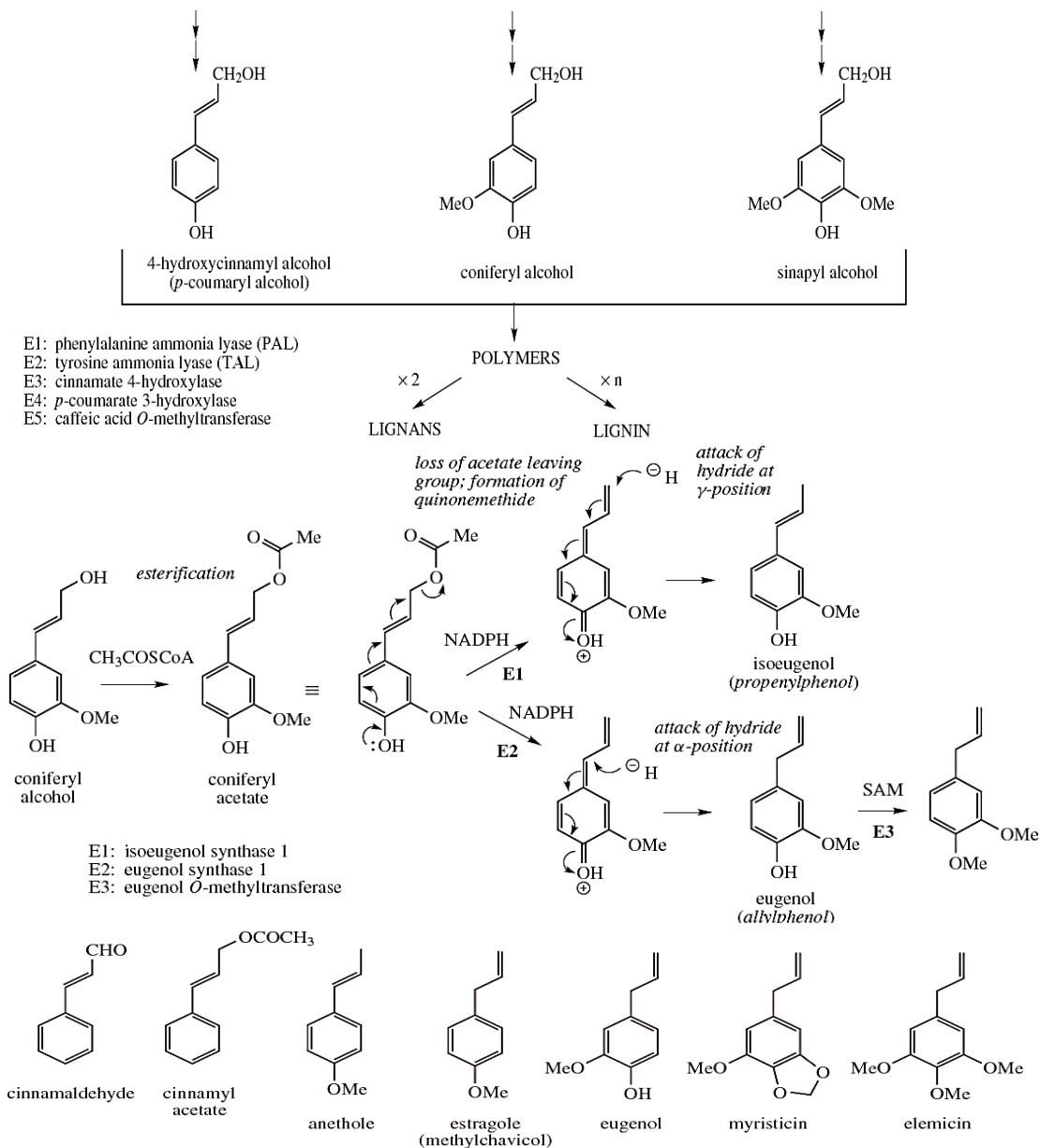


Figura 8. Estructuras químicas de algunos derivados fenilpropánicos de aceites esenciales.

3.4 Selección del material vegetal

La selección del material depende del interés y objetivos que persiga el estudio, como se detalla a continuación:

a) Por el interés particular: se tiene información etnobotánica de que una especie vegetal se emplea en el tratamiento de ciertas enfermedades. Se localiza la especie, se comprueba su clasificación botánica, se la ubica en la literatura química (el nombre de la planta, al género

al cual pertenece o a géneros y especies relacionados). Ello informa sobre los posibles constituyentes químicos lo que permitirá planificar el fraccionamiento, la purificación, y las pruebas biológicas tanto de los extractos como de los compuestos puros. (Díaz L. M., 2007)

b) Por el interés dirigido a un tipo de compuesto químico: por ejemplo, alcaloides con cierto esqueleto particular. Se localiza una familia botánica, un género o una especie de acuerdo a la información bibliográfica. Posteriormente se procede a la etapa de extracción y purificación. (Díaz L. M.)

c) Por el interés en una determinada actividad biológica: se buscan familias, géneros o especies citadas con esa actividad. Se recolectan cantidades pequeñas (10-50 g) de material. Se hacen extractos alcohólicos, hidro-alcohólicos o acuosos (directamente o provenientes del extracto alcohólico llevado a sequedad) y se comprueba en ellos esa actividad. (Díaz L. M.)

3.4.1 Recolección

La recolección se debe realizar con la ayuda de un botánico, quien además de identificar el material, guardará una muestra testigo en el Herbario, para futuras comprobaciones. Para cada órgano de la especie existe un momento adecuado para recolección. Las hierbas son utilizadas en su totalidad, en el caso de plantas leñosas se secciona en diferentes partes: flores, frutos, semillas, hojas, corteza, tallo, raíces, etc., lo que permitirá programar estrategias de extracción. (Díaz L. M., 2007)

3.5 Extracción y fraccionamiento de los metabolitos de la fuente vegetal

3.5.1 Destilación por arrastre de vapor

En la destilación por arrastre de vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por éste y otros "no volátiles". Lo anterior se logra por inyección de vapor de agua directa en el seno de la mezcla, llamándose "vapor de arrastre", pero su función no es la de "arrastrar" el componente volátil, sino condensarse formando otra fase inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. En este caso se tendrá la presencia de dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no

estuviera presente. Es decir, cada uno de ellos ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia. La condición más importante para que este tipo de destilación pueda ser aplicado es que tanto el componente volátil como una impureza sean insolubles en agua, ya que el producto destilado (volátil) formará dos fases al condensarse, lo cual permitirá fácilmente la separación del producto y el agua. Este es un método sencillo y de bajo costo, su inconveniente son los largos periodos de tiempo con bajos rendimientos en comparación con otros métodos. (Peredo Luna, Palou García, & López Malo, 2009)

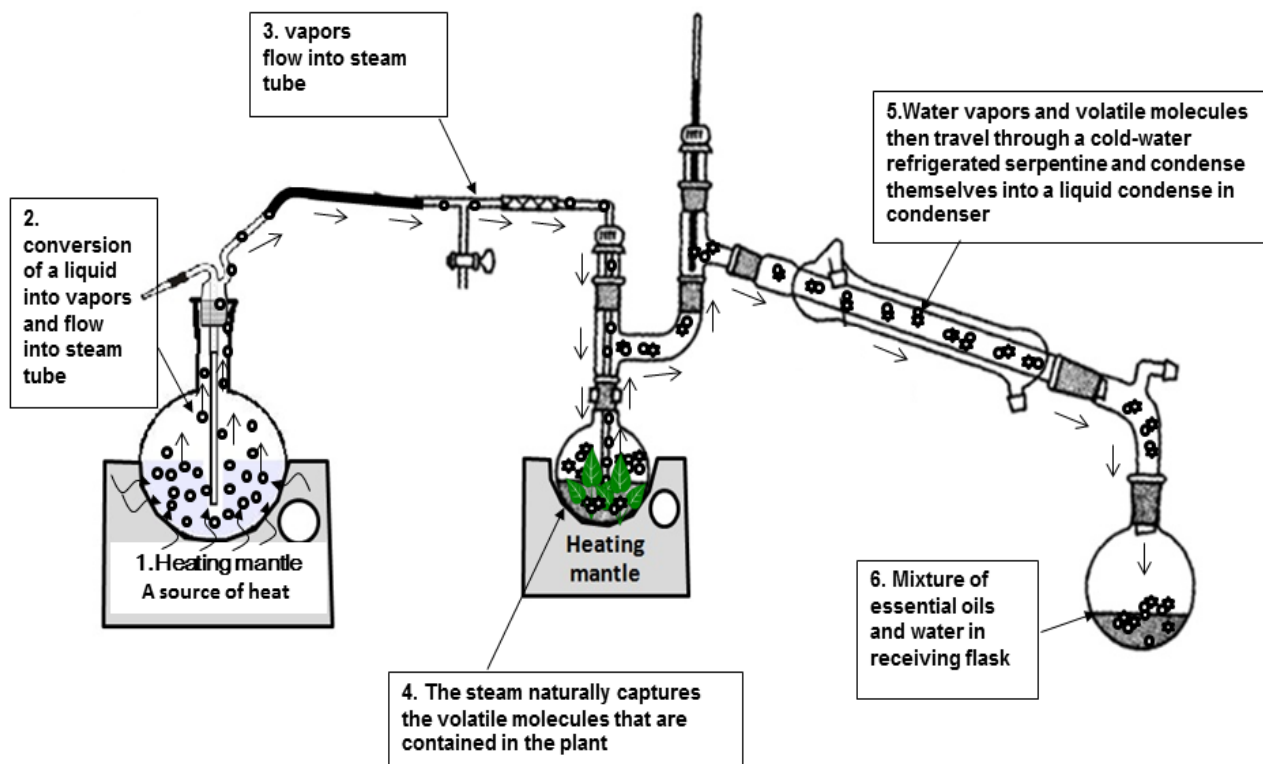


Figura 9. Esquema de destilación por arrastre de vapor
 Figura tomada de: <http://elife-news.blogspot.com/2019/05/steam-distillation-process-and-setting.html>

3.5.2 Extracción con disolventes

En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra molida y seca o parcialmente seca se pone en contacto con disolventes orgánicos como: alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia, y extraen sustancias como grasas y ceras, obteniendo al final una oleoresina o un extracto impuro. Se usa a escala de laboratorio porque a nivel

industrial es costoso por el precio de los disolventes, ya que se obtienen esencias contaminadas con otras sustancias; y el riesgo de explosión e incendio de disolventes orgánicos volátiles.

Algunos disolventes utilizados en este método tienen restricciones por los residuos máximos que pueden dejar cuando los aceites esenciales son la materia prima en industrias de perfumes o alimentos. Disolventes derivados del petróleo: éter dietílico, ciclohexano, hexano, acetato de metilo, propanol, etc., son tóxicos al inhalarlos y al contacto con la piel, y dependiendo del tiempo de exposición será la gravedad de los efectos. Extractos obtenidos con este tipo de disolventes suelen ser más oscuros, ya que arrastran algunos pigmentos, su solubilidad en alcohol diluido es menor y se recuperan muchos compuestos de tipo aromático. El disolvente con el aceite esencial se filtra y se evapora a presión atmosférica y/o a vacío. Los restos de disolvente deben separarse a temperatura baja. (Peredo Luna, Palou García, & López Malo, 2009)

En este tipo de procedimientos se obtienen masas viscosas, según la materia prima, que contienen el aceite esencial, grandes cantidades de ceras, resinas y pigmentos, que se eliminan realizando extracciones con alcohol, enfriando a -13°C , filtrando y evaporando el alcohol. Los métodos más usados a nivel de laboratorio son extracción por reflujo con equipo Soxhlet. (Peredo Luna, Palou García, & López Malo, 2009)

3.5.3 Maceración o extracción alcohólica

Es otro tipo de extracción por disolventes, usada en laboratorio, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por periodos de tiempo definidos. Los aceites esenciales se recuperan evaporando el alcohol o el solvente utilizado, en rotavapores. (Díaz, 2007)

3.5.4 Extracción por fluidos supercríticos

La extracción por fluidos supercríticos es una operación unitaria que explota el poder disolvente de fluidos supercríticos en condiciones por encima de su temperatura y presión críticas. Es posible obtener extractos libres de disolvente usando fluidos supercríticos y la extracción es más rápida que con la utilización de disolventes orgánicos convencionales. Estas ventajas son debidas a la alta volatilidad de los fluidos supercríticos (gases en

condiciones ambientales normales) y a las propiedades de transporte mejoradas (alta difusividad y baja viscosidad). Usando dióxido de carbono, en particular, el tratamiento es a temperatura moderada y es posible lograr una alta selectividad de microcomponentes valiosos en productos naturales. La selectividad del CO₂, también es apropiada para la extracción de aceites esenciales, pigmentos, carotenoides antioxidantes, antimicrobianos y sustancias relacionadas, que son usadas como ingredientes para alimentos, medicinas y productos de perfumería y que son obtenidas de especias, hierbas y otros materiales biológicos. (Valle, Mena, & Budinich, 2008).

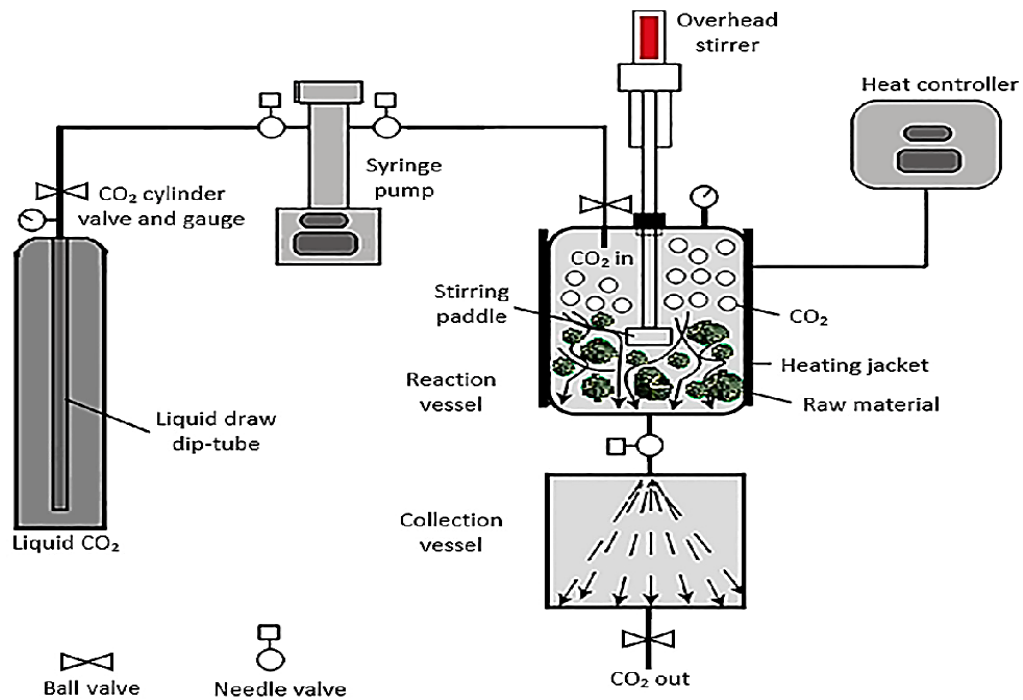


Figura 10. Esquema de extracción con fluidos supercríticos.

Figura tomada de: <https://d3i71xapurhd42.cloudfront.net/a4e9f6a47759158470a0314f07884ee869ea6a35/5->

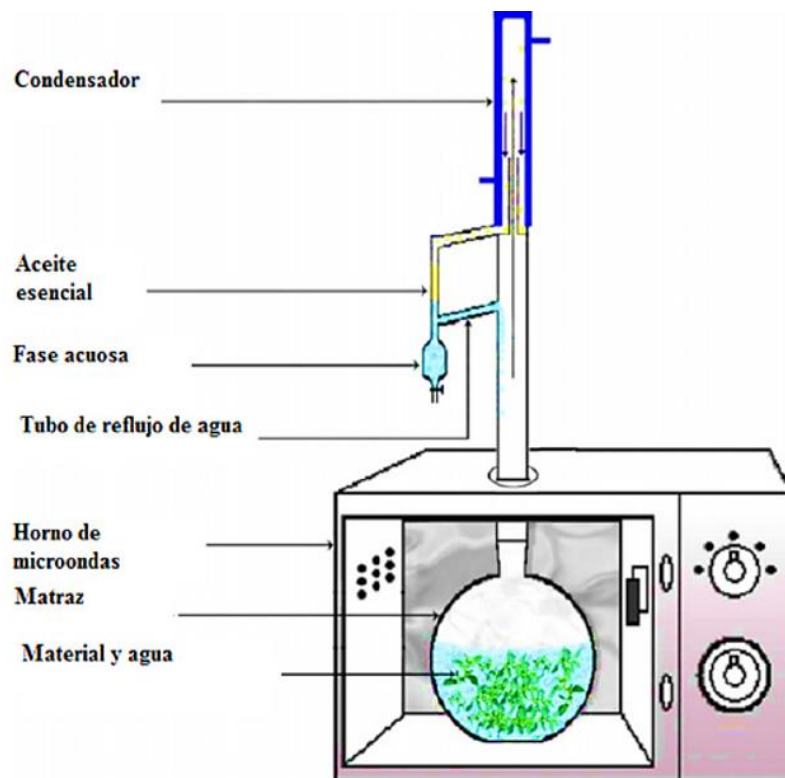
3.5.5 Extracción por microondas

El uso de microondas es otra alternativa para la extracción de aceites esenciales. Esta técnica puede utilizarse asistiendo un método convencional como la hidro-distilación o adaptando un equipo para establecerlo como un método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente. (Kimbaris, Siatis, Daferera, & Tarántilis). La extracción por microondas sin disolvente, solvent free microwave extraction (SFME) por sus siglas en

inglés, combina calentamiento por microondas y destilación seca. No se necesita agregar ningún disolvente o agua si se emplea material fresco.

En caso de que el material esté seco, éste se rehidrata remojándolo en agua y drenando el exceso antes de la extracción. Los equipos para llevar a cabo esta técnica se pueden adaptar modificando un horno de microondas convencional, haciendo un orificio en la parte superior que conecte un matraz de fondo plano con un aparato de refrigeración (un condensador conectado a un tubo de separación por gravedad, por el que pasa una corriente de agua fría), sellando la conexión con el horno para evitar la fuga de microondas. (Bayramoglu & Shain). De igual forma, la hidro-destilación asistida con microondas adapta un aparato de destilación a un horno de microondas.

La extracción por microondas ofrece beneficios como una reducción considerable del tiempo y del consumo de energía. Este método puede realizarse a gran escala con reactores de microondas, pero se requieren altos niveles de seguridad. (Kimbaris, Siatis, Daferera, & Tarántilis, 2006) y (Bayramoglu & Shain, 2008)



*Figura 11. Esquema de extracción con fluidos supercríticos
Figura tomada de: (Golmakani, 2008)*

3.6 Medicina ancestral de El Salvador

La medicina natural forma parte de la esencia del hombre mismo, es una forma de curación que proporciona la naturaleza para lograr revertir los procesos de una enfermedad, para acelerar o expulsar toxinas que la provocan. Para ello se ha utilizado el agua, el sol, el aire y las plantas.

En El Salvador, se ha despertado mucho interés por conocer los métodos naturales de curación, más que todo debido al problemas del creciente aumento de los precios de los medicamentos, así como por algunos efectos adversos experimentados por personas con tratamiento de medicina de patente. Así a través de los años, los conocimientos y las experiencias han sido transmitidos de generación en generación, permitiendo al hombre llegar a identificar las plantas según su utilidad en comestibles, maderables, ornamentales, industriales, medicinales, cosméticas, tóxicas, repelentes, insecticidas, etc.

Para que una planta pueda ser utilizada con fines medicinales (curativos o paliativos), es preciso que proporcione algún beneficio al organismo; es decir, que posea sustancias con propiedades curativas de reconocida eficacia, ya sea por el conocimiento empírico o científico; en la mayoría de los casos se agrupan, según los referidos con mayor frecuencia, siendo estos: digestivos, antisépticos, diuréticos, antitusivos, antiinflamatorios, laxantes, entre otros.

Es conveniente señalar que cada especie suele presentar diversas propiedades, porque suele albergar varios principios activos (Alonso De La Paz, 1999); (Díaz H. , 2004) establece que las propiedades y efectos terapéuticos que producen en el organismo dependen de los principios activos y de la dosis utilizada, por lo que se clasifican como:

- Adelgazantes, con principios activos que favorecen la eliminación de grasa.
- Analgésicos, alivian o suprimen el dolor, similares a los anestésicos.
- Antibióticos, destruyen y contrarrestan la proliferación de microorganismos.
- Antidiabéticos, estimulan la función del páncreas y la secreción de insulina, actúan de manera eficaz contra el exceso de glucosa (azúcar) en la sangre.
- Cefálicos, alivian o disminuye el dolor de cabeza de origen nervioso y al mismo tiempo como sedante y antiespasmódico.
- Diuréticos, estimulan y excitan la secreción de orina.

- Laxantes, actúan en el aparato digestivo regulando suavemente las funciones intestinales.
- Odontálgicos, alivian el dolor de muelas y dientes.

Cada parte de la planta juega un papel importante en el tratamiento curativo, sean estas: flores, hojas, tallos, raíces, semillas, corteza, cogollos o brotes; también las preparaciones (jugos, infusiones, polvos, cataplasmas, inhalaciones, extractos, jarabes, aceites, ungüentos, compresas, pastas, entre otros). (Elías Molina & Suárez Palacios, 2007).

3.7 Descripción general de las plantas analizadas: *Piper auritum* Kunth, *Piper marginatum* Jacq., y *Tagetes filifolia* Lag.

3.7.1 Generalidades del Género Piper.

Piper, es un género de plantas magnoliopsidas de la familia Piperaceae, que según el APG II (2003) existen 10 géneros y 3600 especies. Son arbustos o trepadoras, aromáticos. Las ramas tienen prófilos caedizos, generalmente adnatos al peciolo. Hojas alternas, pubescentes, simples, margen entero y limbo con conspicua nerviación lateral, en general de implantación basal o parcialmente pinnada. Flores en inflorescencia espiciforme, más o menos larga o incluso sub-globulares, en general opuestas a las hojas y más raro agrupada en aparentes umbelas axilares; flores, sésiles que carecen de perianto, mayoría unisexuales dioicas, o más raro monoicas o bisexuales, con brácteas pequeñas peltadas; androceo 2-6 estambres con anteras biloculares de 2-4 lóbulos y gineceo, supero, 2-4 estigmas sésiles o de estilo corto. Fruto drupa uniseminada obovoide a globosa, sésil o no, frecuente roja o amarilla, con pico corto y usualmente glabro. (Boza, 1985).

Las especies de *Piper*, sus metabolitos secundarios han mostrado efectos biológicos sobre la salud humana, ya que son ricas en aceites esenciales en frutos, semillas, hojas, ramas, raíces y tallos. Algunas especies de *Piper* tienen perfiles químicos simples, mientras que otras, como *Piper nigrum*, *Piper betle* y *Piper auritum*, contienen conjuntos muy diversos de metabolitos secundarios. En la medicina tradicional, las especies de *Piper* se han utilizado en todo el mundo para tratar varias enfermedades como: urológicos, afecciones de la piel, hígado y estómago, para la cicatrización de heridas y como agentes antipiréticos y antiinflamatorios.

(Salehi, Amiruddin Zakaria, Gyawali, & al., 2019). Sus aceites esenciales en particular inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en hombre, plantas y animales, siendo particularmente útiles como antivirales, antimicóticos y antibacterianos. (Delgado, 2007). Los metabolitos secundarios encontrados en extractos, de diferentes partes de estas plantas, muestran actividad antifúngica, estimulante, bactericida, citotóxica e insecticida. (Benítez, 2007), (Wadt, 2004), (Delgado, 2007).

3.7.1.1 Actividad insecticida del Género Piper: Fitoquímica

Las especies de *Piper* producen metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas. Los aceites esenciales extraídos de diferentes órganos de muchas muestras están constituidos por hidrocarburos monoterpenos (Ej., α -pineno, Mirceno, limoneno, α -terpineno, *p*-cimeno), monoterpenoides oxigenados (Ej., 1,8-cineol, linalol, terpineno). 4-olborneol, alcanfor), hidrocarburos sesquiterpénicos (Ej., B-cariofileno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, α -cubebeno), sesquiterpenoides oxigenados (Ej., Espatulanol, (*E*)-nerolidol, óxido de cariofileno, α -cadinol, *epi* - α -bisabolol) y fenilpropanoides (Ej., safrol, dilapiole, miristicina, elemicina, (*Z*)-asarona, eugenol).

Según literatura, algunas especies tropicales de *Piper* presentan altos rendimientos de aceites esenciales; los cuales, y sus principales componentes volátiles, puede variar según región geográfica y factores ambientales, están condicionado principalmente a sus diferentes quimiotipos. (Da Silva, da Trindade, Sabrina Alves, P.L., & S. Maia, 2017).

Su antiguo origen, amplia distribución y adaptabilidad han hecho que las especies de la familia Piperaceae sean reconocidas como uno de los grupos de plantas tropicales más utilizado tradicionalmente por diversas comunidades como insecticidas, fitomedicamentos y fuente de especias. Sus importantes y recurrentes usos motivaron el interés de investigadores en productos naturales, por lo que han sido objeto de múltiples investigaciones fitoquímicas para determinar los principios responsables de las acciones observadas por años. (Ávila Murillo, 2014)

En la familia destacan especies de *Piper* (*P. nigrum*) con frutos aromáticos y picantes utilizadas como condimento, y otras como insecticidas y en medicina natural. (Ávila, Delgado, & Cuca, 2018). Los insecticidas naturales a partir de extractos vegetales son una buena alternativa para control de insectos; y, solo se han evaluado pocas plantas como fuente natural que ofrece el planeta, por lo que las perspectivas futuras en investigación, son mayores. Por la necesidad de encontrar nuevas alternativas naturales para control de insectos plagas y reemplazar pesticidas sintéticos, aparecen insecticidas botánicos más seguros para el ambiente y eficiente opción agronómica. (Céspedes & J.S. Calderón, 2000).

Especies de *Piper* contienen diversos tipos de metabolitos: amidas, flavonoides, kavapirona, lignanos, neolignanos, piperolidos, propenilfenoles y terpenos. (Parmar, y otros, 1997), comenta “que la actividad biocida de *Piper* (insecticida, fungicida y bactericida) radica en la toxicidad de los metabolitos secundarios (flavonoides, terpenos, cumarinas, compuestos fenólicos, saponinas y esteroides); y se atribuye a 22 alcaloides, a las piperamidas”. En este sentido, (Parra, 2011) “expresa que muchas sustancias obtenidas de especies de *Piper*, se han utilizado como insecticidas, especias y fito-medicamentos”. Diversos estudios determinan que sus propiedades se deben a los constituyentes químicos (alcaloides, terpenos, fenoles, entre otros), los cuales permiten que tengan actividad biológica insecticida, fungicida y herbicida (Celis, Mendoza, Pachón, Delgado, & Cuca, 2008).

Otro factor a considerar sobre el uso de aceites esenciales como controladores de plaga es la persistencia ambiental. Se ha comprobado que muchos metabolitos secundarios se degradan rápido bajo la luz solar plena, ejemplo: exposición de piperina pura a lámpara ultravioleta (UV), ésta se degradó rápidamente con una vida media de aproximadamente 40 minutos. (Scott I. M.-V., 2004)

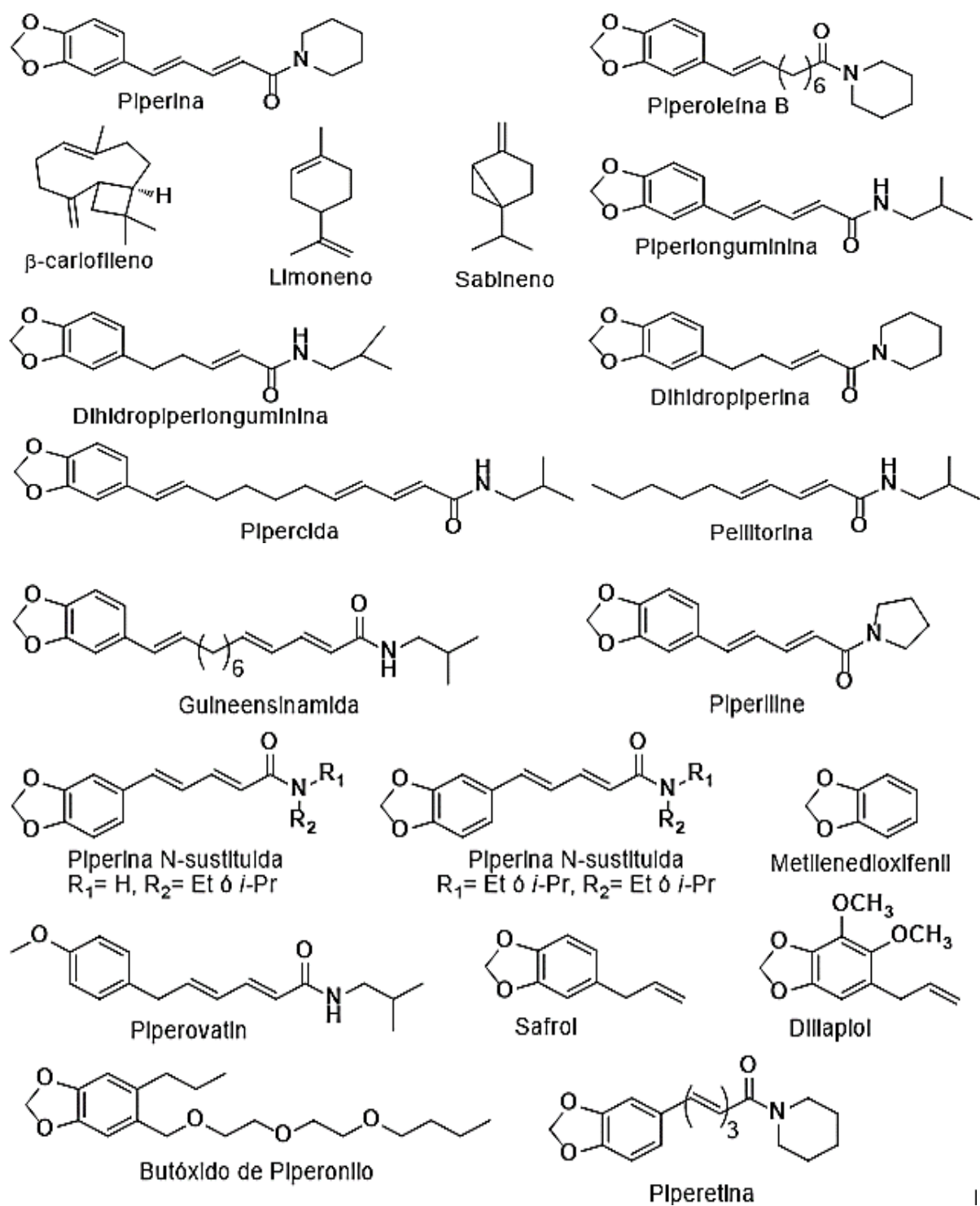


Figura 12. Estructura de metabolitos con actividad insecticida obtenidos del género *Piper*.

Las especies del género *Piper* estudiadas en esta investigación fueron *Piper auritum* Kunth y *Piper marginatum* Jacq; de las cuales a continuación, se presenta un resumen de sus características.

3.7.1.2 *Piper auritum* Kunth.

Especie con origen en Mesoamérica y sur de Suramérica. Ramificado de hasta 5 m de altura, con aroma similar a anís. El sabor es más fuerte en vástagos y venas jóvenes de hojas. (Agüero Cabrera, 2008) (Flores Licea, 2009). Hojas alternas, aovado-elípticas, base asimétrica, de hasta 32 cm de largo y 16 cm de ancho. Tallo con nudos engrosados. Inflorescencia en espiga, algo curvada, opuesta a hoja. Flor color crema, diminuta, sin periantio. Fruto baya pequeño verde oscuro (Agüero Cabrera, 2008).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de Piper auritum Kunth.

Reino: Plantae
Phylum: Magnoliophita
Clase: Magnoliopsida
Orden: Piperales
Familia: Piperaceae
Género: <i>Piper</i>
Especie: <i>auritum</i>
Nombre científico: <i>Piper auritum</i> Kunth.
Sinonimias: <i>Artanthe aurita</i> (Kunth) Miq.; <i>Artanthe seemanniana</i> Miq.; <i>Piper alstonii</i> Trel.; <i>P. auritilaminum</i> Trel.; <i>P. auritilimum</i> Trel.; <i>P. heraldi</i> Trel.; <i>P. perlongipes</i> Trel.; <i>Schilleria aurita</i> (Kunth) Kunth. Tomado de: http://tropical.theferns.info/view_tropical.php?id=Piper+auritum . Consultado 21 de enero de 2021.
Nombres comunes: En El Salvador “hoja santa”, “anisillo”, “hierba santa”, en otras partes del mundo “caisimón de anís”, “pimienta sagrada”, “pimienta espigada”, “planta de la cerveza de raíz”, “acuyo”, “acoyo”, “cordoncillo blanco”, “tlanepa”, “hoja de anís”, “momo”, y “x-mak-ulam” en lengua maya.

Fuente: (Cronquist, 1988)

3.7.1.2.1 Hábitat.

Esta planta prefiere lugares sombreados y húmedos, aunque puede crecer expuesto al sol; habita en climas cálido semi cálido y semi seco desde 0- 2000 m.s.n.m. Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos en vegetación de bosques tropicales caducifolio, perennifolio y bosque mixto de pino-encino, y en terreno semi seco. (Hernández Reyes, 2016).



Figura 13. Planta de *Piper auritum* Kunth.

Imagen tomada de: <http://caterpillars.myspecies.info/taxonomy/term/17523>

3.7.1.2.2 Usos medicinales.

Las personas que conocen los beneficios de esta planta, la llevan a sus hogares, no requiere muchos cuidados y crece fácil en cualquier patio (Flores Licea, 2009). El aceite esencial extraído de hojas y tallos tiene olor penetrante y color amarillo claro. (Sánchez, Pino, Correa, Najarro, & Iglesia, 2009). Utilizado en culinaria y medicina tradicional como: diurético, fiebre, erisipela, gota y angina; gonorrea y cólicos, y cataplasma para heridas; estimulante repulsivo y digestivo, las hojas se han utilizado en medicina tradicional como sedante; para aliviar dolor de cabeza y estómago; hay informe de actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antifúngica. (Monzonte, García, Montalvo, Scull, & Miranda, 2010).

3.7.1.2.3 Fitoquímica y actividad insecticida.

Estudios sobre la composición química de varios aceites esenciales del género *Piper*, siendo los principales fenilpropanoides serie (C6C3), monoterpenoides y sesquiterpenoides (8, 9, 15). (Sánchez, Pino, Correa, Najarro, & Iglesia, 2009). Un estudio realizado con varias especies de *Piper*, para la evaluar actividad biológica, solo el aceite de *P. auritum*, reveló mayormente su riqueza estructural con fenilpropanoides en un 88,5%, además, mostró actividad insecticida frente a *Leishmania* spp. *Gaitero*.

Los aceites ricos en fenilpropanoides y sesquiterpenos, mostraron alta actividad insecticida y acaricida. (Da Silva, da Trindade, Sabrina Alves, P.L., & S. Maia, 2017). En *P. auritum* se han identificado como **nonanal**, **miristicina** y **safrol** (de mayor concentración) con alrededor

de 90%. (García, 2007). Del género *Piper*, a nivel mundial se ha investigado como fuente potencial de compuestos bioactivos susceptibles de ser utilizados en el control de plagas agrícolas con excelentes resultados. (Soletto Rodríguez, 2016)



Figura 14. Hojas de *Piper auritum* Kunth.

Otras investigaciones manifiestan que *P. auritum* K., ha sido evaluado con éxito sobre la polilla “barrenador de la caña de azúcar” (*Diatraea saccharali*); por la fitoquímica del género *Piper* con diversos compuestos como alcaloides, fenilpropanoides, lignanos, neolignanos, terpenos, flavonoides, entre otros (Parmar, y otros, 1997) muchos de los cuales ayudan a insecticidas naturales y sintéticos, ejemplo, el fenilpropanoides. (Bernard C. H.-V., 1995), (Soberón, 2006).

(García Ríos, Leyva, Martínez M, & Stashenko, 2007), mencionan que el género *Piper*, de amplia distribución en el Trópico, reúne más de 1000 especies; género que posee, lignanos, sesquiterpenos, fenilpropanoides y monoterpenos (borneol, alcanfor, cineol, eugenol, safrol) y una amplia variedad de componentes bencénicos.

(García 2007) estudió la composición de la especie *auritum*, e identificó componentes mayoritarios a: Metileugenol, Safrol y Miristicina. Cabe mencionar que investigaciones del aceite esencial de *P. auritum* (Gufta & Arias, 1985), (Pineda M., Vizcaíno P., García P, & Gil G, 2012) y (Monzonte 2010), revelan la presencia de safrol como componente principal (aproximadamente 70%), (64,54 / 56,88%) y (87%) respectivamente.



Figura 15. Aceite esencial de Piper auritum Kunth.

3.7.1.3 Descripción de *Piper marginatum* Jacq.

Arbustos o pequeño árbol de 1,5 a 5 m de altura, ramas glabras. Hojas de 8.5-17 x 6-14 cm, con pecíolo alado, y hoja acorazonada, ambos característica para una rápida identificación. laxamente ramificado, todas las partes de la planta poseen fragancia de anís, tallos y ramas verde pálido; entrenudos de 1,5-6 cm de longitud y 1,5-4 mm de diámetro. *Especie* neotropical, de amplia distribución, nativa en Mesoamérica, hasta Brasil.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de Piper marginatum Jacq.

Reino: Plantae
Phylum: Tracheophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Piperales
Familia: Piperaceae
Género: <i>Piper</i>
Especie: <i>marginatum</i> Jacq.
Nombre científico: <i>Piper marginatum</i> Jacq.,
Nombres comunes: “Santa María”, “malvavisco”, “Aniceto”, “anisillo”, “corazón de la Virgen”, “cordoncillo” e “hinojo”; “cura-dientes”. (Sequeda Castañeda, Célis, Gutiérrez, & Gamboa, 2015).

Fuente: *Piper marginatum* Jacq. <https://www.gbif.org/species/3086325>



Figura 16. Piper marginatum Jacq.

3.7.1.3.1 Generalidades de Piper marginatum Jacq.

Especie utilizada por curanderos indígenas en Centro y Suramérica, y las Antillas por reputadas propiedades medicinales para aliviar dolencias gastrointestinales en decocción o infusión por sus efectos tónicos, diuréticos y carminativos. Las propiedades beneficiosas se atribuyen a la presencia de varios fito-químicos en estudios centrados en el aceite esencial, en el que se han identificado monoterpenoides, sesquiterpenoides y fenilpro-panoides de estructura química variada. La investigación bio-guiada puede producir moléculas biológicamente relevantes útiles en medicina o agricultura. (Gúzman, 2016).

3.7.1.3.2 Usos tradicionales

Se conoce con el nombre popular de cura-dientes, ya que presenta una actividad medicinal contra las caries dentales, el tallo se macera y se aplica tópicamente, como una pasta de dientes contra las caries dentales. La planta se usa comúnmente en la medicina popular como un tónico con acción antiespasmódica, para tratar la inflamación, las mordeduras de serpientes, la cicatrización de heridas, las patologías relacionadas con la bilis o el hígado, y prevenir las caries dentales. (Sequeda Castañeda, et. al. 2015). El aceite esencial de esta especie es alternativa prometedora y poco explorada en muchos países de Latinoamérica como fuente antimicrobiana y su futura aplicación requiere del desarrollo de investigaciones

básicas sobre la química y la actividad biológica de estos compuestos que permitan establecer sus potencialidades, específicamente para el control de enfermedades microbianas de interés agrícola.



Figura 17. Aceite esencial de Piper marginatum Jacq.

3.7.1.3.3 Fitoquímica y actividad insecticida de *Piper marginatum* Jacq.

Estudio de (Sequeda et al. 2015) del aceite esencial de inflorescencia de *P. marginatum* presentó fuerte actividad contra larvas del mosquito *Aedes aegypti* y otras especies de *Piper* podrían ofrecer componentes botánicos, que pueden contribuir biológicamente con su actividad insecticidas ya que dentro del mismo estudio se obtuvo un resultado de mortalidad efectiva del 34% en Coleópteros a exposición por inmersión del aceite esencial. Principales componentes del aceite son anetol, metileugenol, metilisoegenol, a-pineno y b-pineno. Su componente predominante es trans-anetol (80.5%). Este compuesto se utiliza como agente aromatizante en bebidas, dulces, pastelería, goma para mascar y en dulces.

En busca de productos menos tóxicos, biodegradables y seguros para el medio ambiente, *P. marginatum*, puede aportar componentes que contribuyan con la actividad biológica como insecticidas botánicos. (Moraes, G. da Silva, da Silva, & Ramos, 2014). El aceite de *P. marginatum* está constituido en un 99,9 % por compuestos oxigenados y se le puede atribuir la actividad biológica a componentes fundamentales: el notosmirnol, con dos grupos alcohólicos y el fenilpropanoide safrol, al que le atribuyen propiedades antimicrobianas. (Sánchez, Correa, Abreu, Martínez, & Duarte, 2011).

Según (Parmar & Subhash C. Jain, 1997) la especie *P. marginatum* muestra una fitoquímica distinta con la presencia de metabolitos secundarios específicos, que no se encuentran en

otras especies de *Piper*. Por ejemplo, *P. marginatum* es la única especie de *Piper* que contiene anetol, estragol, éter metílico de isoeugenol, los ácidos fenilalcanoides 3-farnesil-4-hidroxibenzoico y 3-farnesil-4-metoxibenzoico y los glucósidos marginatósido y vitexina (Parmar et al., 1997). Ninguna otra especie de *Piper* ha mostrado la presencia de estos marcadores quimiotaxo-nómicos. Investigaciones de (Harada, Andrade, Maia, & Souto, 2012) en *P. marginatum* identifican fenilpropanoides (safrol, isosafrol, eugenol, isoeugenol y/o metil-eugenol), entre otros, y demostraron ser tóxicos y/o repelentes para especies de diferentes órdenes de insectos.

Dos clases de compuestos químicos predominantes: Los fenilpropanoides y sesquiterpenos. Es relevante desde una perspectiva ecológica, considerando que los fenilpropanoides están asociados con la reacción química de las plantas inducida por abióticos. (Sequeda et al. 2015).

3.7.2 Generalidades de *Tagetes filifolia* Lag.

Nativa de Centro y Suramérica, hierba de amplia distribución en lugares perturbados y abiertos, o en pastizales cuya dispersión va desde México hasta Argentina; en el Perú se encuentra en Amazonas, Ancash, Cajamarca, Cusco, Huánuco, La Libertad y Lambayeque (Rodríguez Torres, 2019). Crece entre el zacate, en bajíos y laderas. Se encuentra desde junio, florece a partir de julio. (Dzib Zumárraga & Martínez, 2018).

Tagetes filifolia, de la familia Asteraceae, se han identificado con actividad insecticida y/o larvicida por su composición química y farmacológica. (Muñoz V. & Stachenco, 2014). Es originaria de América y su cultivo se extiende a países de África, Asia y Europa. (Salehi, y otros, 2018). Durante los últimos 20 años, en esta familia se han identificado algunas especies del género *Tagetes*, como fuentes promisorias de compuestos con propiedades plaguicidas. (Serrato-Cruz & Díaz-Cedillo, 2008), (Serrato, Ortega, & Carrillo R., 2009).

El género *Tagetes*, es muy rico en especies con aceites esenciales, hierba extendida en México, valles andinos de Perú, Bolivia, Colombia y Ecuador, entre 3300-3800 m.s.n.m. los nombres comunes indican similitud entre el sabor de esta planta y de anís. De hecho, las partes aéreas secas de *T. filifolia* se usa como agente culinario. (De Feo, Della Porta, Urrunaga Soria, Urrunaga Soria, & Senatore, 1998). *Tagetes*, incluye especies con

propiedades medicinales y sus aceites tienen actividad insecticida, en particular *T. filifolia* (Asteraceae). Estudios realizados por (Serrato-Cruz & Díaz-Cedillo, 2008), (Camarillo, Ortega, & Serrato, 2009) con esta especie muestran resultados satisfactorios del potencial biológico de su actividad insecticida entre diferentes grupos de insectos.



Figura 18. *Tagetes filifolia* Lag.

3.7.2.1 Descripción botánica de *Tagetes filifolia* Lag.

Hierba de 10 a 30 cm hasta 50 cm de alto, con fuerte olor a anís (*Pimpinella anisum*). Hojas opuestas o a veces las superiores alternas, hasta de 3 cm de largo, divididas en segmentos muy delgados que a su vez pueden estar subdivididos, pueden parecer a agujas de un pino; a veces con pelillos. Flores amarillas, muy chiquitas, cada una tiene abajo como un casquillo de bala, verde y delgado; su uso principal es carminativa. (Rodríguez 2019).

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Tagetes filifolia* Lag.

Reino: Vegetal
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Género: <i>Tagetes</i>
Especie: <i>filifolia</i>
Nombre científico: <i>Tagetes filifolia</i> Lag.
Nombres comunes en español que indican similitud del sabor de esta planta con anís: “pampa anís”, “anis k’ita”, “anis-anís”, “anis silvestre”, “atún anicillo”, “cirucumin”, “flor de Santa María”, “hierba anís”, “pericón”, “periquillo”, “manzanilla”, “anisillo”, “anis serrano”, “tuna anís”, “anis de la sierra”, “anis camarón”, “supiquehua”, “sacha-anís”, “allpa anís”, “anis del campo”, “tomillo”. (Bonilla R., Lozano R., Arroyo A., & Beltran S., 2008).

Fuente: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-filifolia/fichas/ficha.htm> y <https://www.tropicos.org/name/50145628>

3.7.2.2 Usos tradicionales del Anisillo (*Tagetes filifolia* Lag.)

Conocida por su olor aromático y agradable; se utiliza por lo general en infusiones para el dolor de estómago, cólicos y empacho. También es muy usado en la sierra peruana para tratar la diarrea producida por frío, en flatulencias y para el mal aliento mastican las hojas en ayunas. Las partes aéreas se usan como saborizante alimenticio, y la infusión de sus partes aéreas como diurético, antiespasmódico, antiinflamatorio, antihemorrágico. (Dzib Zumárraga & Martínez, 2018). Para aliviar el dolor de estómago y diarrea con sangre (disentería con sangre): se toma el cocimiento de la planta entera; también se da a las personas que padecen ataques.

El uso de aceites esenciales de plantas aromáticas es opción para controlar insectos, hongos y nematodos que dañan cultivos. El aceite esencial de *T. filifolia* Lag., tiene amplio potencial contra nemátodos e insectos biotransmisores de virus. (Serrato Cruz, Cedillo, & Barajas Pérez, 2007). Estos aceites con importante potencial como agentes químicos en los comportamientos de los insectos. Este estudio destaca la variabilidad química de los aceites esenciales como una fuente de variación de las propiedades anti-insectos. (López, y otros, 2011).

3.7.2.3 Fitoquímica y actividad insecticida de *Tagetes filifolia* Lag.

Los aceites esenciales de *T. filifolia* Lag., con potencial para controlar insectos biotransmisores de virus en plantas; sus compuestos químicos anetol y alilanisol, del grupo fenilpropanoides, son la mayor parte de dicho aceite esencial. Los bajos costos de producción de este aceite y su origen orgánico representan una opción económica y ecológica importante comparada con productos insecticidas de origen sintético, que además de ser fuente de contaminación ambiental y de daño a la salud humana, provocan altos costos de los sistemas de producción agrícolas. (Serrato-Cruz et, al, 2008), (Camarillo, et, al. 2009).

Según algunos estudios el aceite esencial de esta planta presenta una composición muy sencilla de cinco compuestos principales, el componente mayoritario del aceite se ha identificado como trans-anetol en un (92.15%). (Figuroa Soliz, Estevez Martini, & Giménez Turba, 1995). *T. filifolia* Lag., se caracteriza por los fenilpropanoides reconocidos

metilcavicol y trans-anetol como componentes principales a quienes se les adjudica que ejercen actividad insecticida según bioensayos tópicos. (López, et al., 2011).

El aceite esencial de *T. filifolia* es una importante fuente natural de anetol y alilanol, pero se desconoce la variabilidad en la composición de su aceite esencial en función del origen geográfico. El conocimiento de la composición del aceite esencial de *T. filifolia* es fundamental para poder utilizarlo en la agricultura mexicana, especialmente para su uso en el control de insectos plaga (Serrato C., 2003)



Figura 19. Aceite esencial de Tagetes filifolia Lag.

3.8 Generalidades de Cromatografía.

Dependiendo de la naturaleza del compuesto o compuestos a aislar, en numerosas ocasiones a la extracción inicial o después de una extracción líquido-líquido, le sigue una separación basada en métodos cromatográficos. La cromatografía supone, en esencia, la distribución de un compuesto entre una fase móvil (disolvente) y una fase estacionaria (soporte). (Rubinson, 2001)

3.8.1 Generalidades de Cromatografía en capa fina analítica y preparativa (CCF y CCFP).

La Cromatografía es definida como una técnica por la cual los componentes de una mezcla son separados en un proceso de migración diferencial dinámico dentro de un sistema, debido a la influencia de dos efectos contrapuestos los cuales son **retención y desplazamiento**.

Retención: es el efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.

Desplazamiento: es el efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico.

La mezcla a separar, se deposita sobre la fase estacionaria, luego una fase móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico, da lugar a la separación de la mezcla original. El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil, recibe el nombre de **elusión**. (Rubinson, 2001)

3.8.1.1 Cromatografía en capa fina (CCF).

Es una técnica cualitativa que se utiliza con los siguientes fines: Monitoreo de una reacción, identificación de un compuesto, determinación de los componentes de una mezcla, comprobación de la pureza de un compuesto, determinación del disolvente apropiado para llevar a cabo una separación mediante cromatografía preparativa y análisis de las fracciones recogidas en una cromatografía en columna. La fase estacionaria (adsorbente) se encuentra depositada, formando una capa fina de espesor uniforme (0.1 - 0.2 mm), sobre una placa de vidrio, plástico, o una lámina metálica. (Rubinson, 2001)

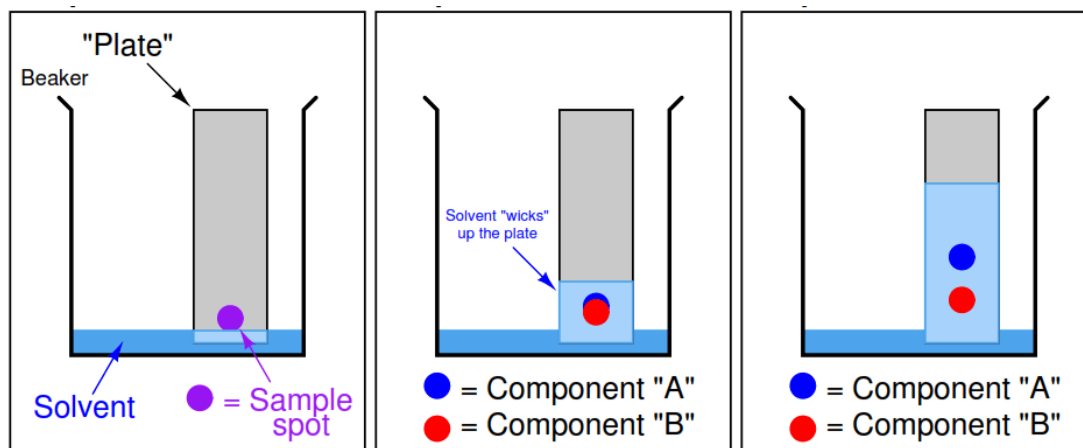


Figura 20. Esquemas de cromatografía en capa fina
Imagen tomada de: <https://instrumentationtools.com/thin-layer-chromatography-manual-method/>

3.8.1.2 Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP).

Se emplea en la separación de componentes de una mezcla con el fin no solo de identificarlos, sino de cuantificarlos mediante su recuperación a partir de la placa o cromatofolio. A diferencia de la cromatografía de capa fina analítica, la cromatografía preparativa se utiliza para la separación y aislamiento de los componentes de mezclas en cantidades comprendidas entre 100 y 200 mg. Este tipo de cromatografía, se lleva a cabo en placas de gel de sílice de 1-2 mm de espesor sobre un soporte de vidrio de 20x20 cm.

En ambos casos la mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, esta se saca de la cubeta, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas. Si el compuesto es activo a la luz ultravioleta, se visualiza bajo una lámpara de luz ultravioleta. (Rubinson, 2001).

3.8.2 Cromatografía en columna (CC).

Uno de los métodos más utilizados es la cromatografía en columna (CC), en la que se introduce en una columna de vidrio un sólido adsorbente (fase estacionaria) normalmente gel de sílice, se añade la muestra a separar y se deja circular el eluyente (fase móvil) que, en la mayor parte de los casos consiste en una mezcla de dos disolventes de distinta polaridad. Los componentes se separan según la distinta retención en la fase estacionaria, lo que a su vez viene determinado por la polaridad del compuesto: los más polares quedan más retenidos y serán eluidos más tarde de la columna, recogándose por tanto en las últimas fracciones. (Rubinson, 2001)

3.8.3 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada principalmente en fenómenos de partición entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, nitrógeno) y una fase estacionaria constituida por un líquido muy viscoso retenido en el interior de una columna cromatográfica. La columna se coloca en un horno con temperatura regulable y programable,

lo que nos permite influir de forma decisiva en la separación de los componentes de la mezcla. El cromatógrafo se completa con un sistema de inyección, que nos permite introducir la muestra en la columna y un detector que muestra las diferentes sustancias a medida que van saliendo de la columna, una vez separadas. Las columnas cromatográficas utilizadas actualmente son de tipo capilar: están constituidas por un tubo de cuarzo flexible de diámetro muy pequeño (normalmente 0.25 mm) y muy largo (15, 25, 60 m, hasta 200 m); proporcionan alta resolución y permiten separar las mezclas multicomponentes de sustancias de diversa polaridad y/o peso molecular (monoterpenos, sesquiterpenos, etc.). Para la identificación de los componentes del aceite esencial mediante CG se ha utilizado frecuentemente la comparación de sus tiempos de retención (tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición del pico cromatográfico) con los de los patrones. Sin embargo, los tiempos de retención están fuertemente influenciados por numerosas variables, como la técnica de inyección, las variaciones de temperatura o flujo de los gases, es diseño de equipo, etc. Por este motivo ha sido necesario la introducción de parámetros relativos como son los tiempos de retención relativos y los índices de retención. La identificación de los componentes del aceite se realiza a través de comparación de los índices de retención de las sustancias patrones en dos fases estacionarias, polar y apolar, con los índices obtenidos para los componentes del aceite esencial. (Scoog, Holler, & Nieman, 2001)

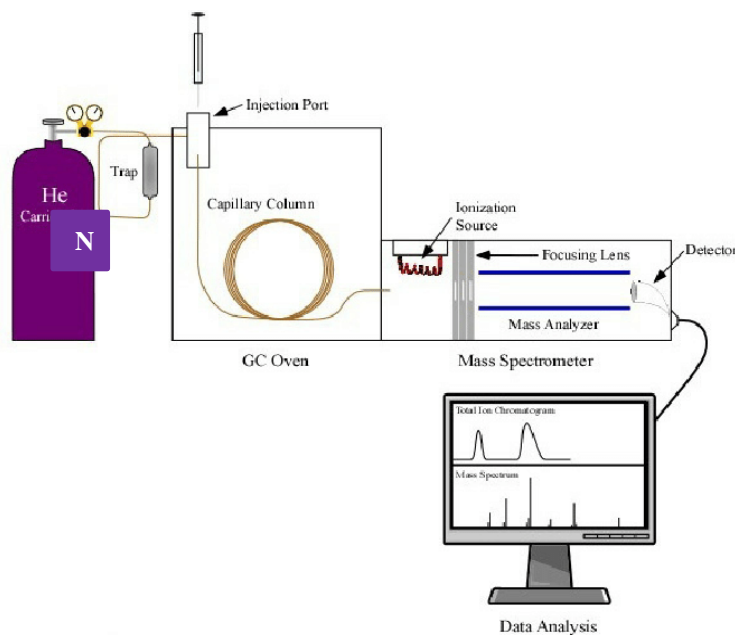


Figura 21. Esquema de Cromatografía de gases.

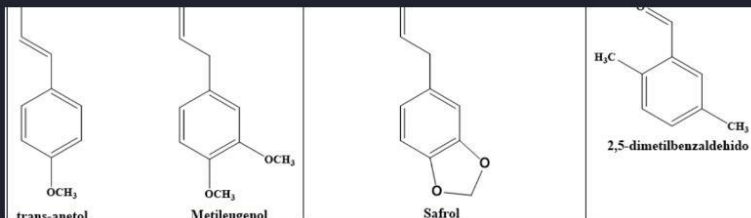
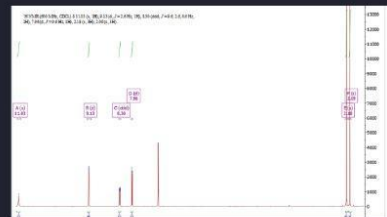
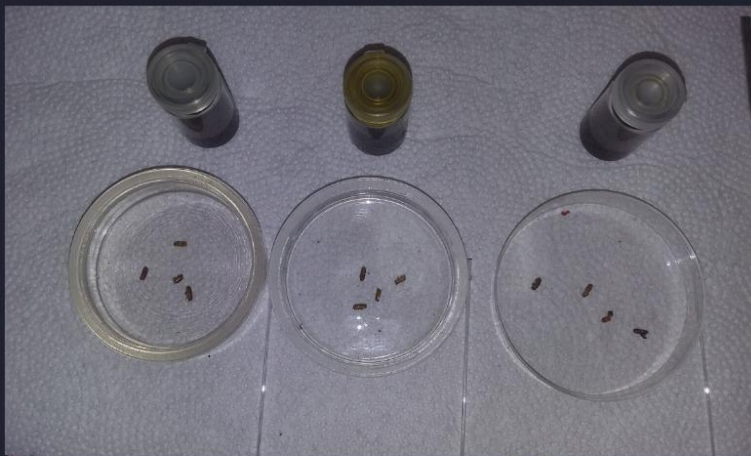
Imagen tomada de: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-of-a-GC-MS-system_fig1_221927526

3.8.4 Cromatografía de gases con espectrometría de masas.

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado que uno de los métodos más eficientes para el estudio de la composición de los aceites esenciales es la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). Es un método muy adecuado para la identificación debido a que los componentes del aceite son compuestos volátiles y de bajo peso molecular. La esencia se inyecta directamente en el cromatógrafo, sin ningún tratamiento previo, lo cual elimina posibles modificaciones en la composición de la muestra o en la estructura de sus constituyentes debidas a pre tratamiento. No se eliminan las alteraciones debidas a la temperatura de análisis, que puede afectar componentes termosensibles. En el cromatógrafo, los componentes de la esencia se separan, tras lo cual penetran en el espectrómetro de masas, que permite registrar el correspondiente espectro de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite esencial se identifican gracias a los diferentes patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas. La CG-EM permite realizar en una sola operación, para una muestra del orden de 1 μL , un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran componentes. Cuando se dispone de sustancia patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra.

Es posible determinar índices de retención en el CG-EM, pero estos pueden no ser comparables con los bibliográficos, que generalmente se han obtenido con cromatógrafos no acoplados a un espectrómetro. (Scoog, Holler, & Nieman, 2001)

CAPITULO IV



METODOLOGÍA

4.0 Metodología

4.1 Tipo de Estudio

Con base en los objetivos planteados y luego ejecutados, utilizando técnicas de laboratorio, esta investigación se clasifica como experimental, donde el trabajo de campo ha sido involucrado para la obtención de los recursos naturales, como objeto clave y primario para llevar a cabo las metodologías experimentales expuestas.

4.2 Investigación Bibliográfica

Para sustentar la investigación, fue fundamental la consulta de publicaciones científicas, sitios web del área, tesis y libros de texto en formato digital y en papel sobre química orgánica, química de productos naturales, espectroscopia y cromatografía.

4.3 Investigación de Laboratorio

Los procedimientos experimentales, se realizaron en los siguientes laboratorios:

- Laboratorio de investigación de la Escuela de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador.
- Laboratorio de investigación en Productos Naturales (CIPRONA), Universidad de Costa Rica (UCR).
- Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA).
- Laboratorio del Herbario de la Asociación Jardín Botánico La Laguna.

4.4 Recolección del Material Vegetal

Las partes aéreas de *Piper auritum* Kunth, fueron recolectada en el Jardín Botánico del Plan de la Laguna, en febrero de 2017; las partes aéreas *Piper marginatum* Jacq. Fueron recolectadas en el bosque del balneario “Los Chorros” en el departamento de La Libertad, en marzo de 2017 y las partes aéreas de *Tagetes filifolia* Lag, fueron colectadas en “Quebrada Abajo”, Caserío Valle Grande, cantón Carrizal, Villa de San Simón Departamento de Morazán, en junio de 2017. El screening fitoquímico, la evaluación de la actividad insecticida, los análisis cromatográficos y espectroscopía de IR, se realizaron en el laboratorio de investigación de la Escuela de Química.

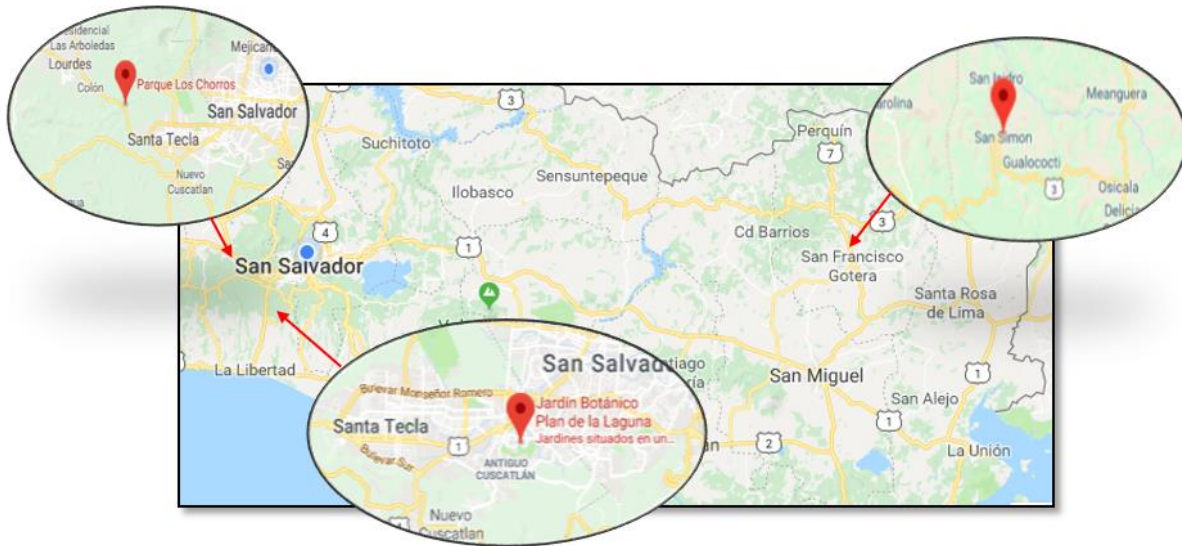


Figura 22. Zonas geográficas de recolección del material vegetal.

El material vegetal fue identificado y certificado por el Licenciado **Dagoberto Rodríguez Delcid**, Curador-Botánico de la Asociación Jardín Botánico La Laguna. (Anexo 1)

4.5 Extracción de Los Aceites Esenciales

4.5.1 Secado del material vegetal

Las hojas y el tallo de las tres especies se colocaron sobre papel periódico a la sombra durante 24 horas a fin de secarse a temperatura ambiente y posteriormente, se cortaron en trozos para darles el correspondiente tratamiento a cada una.



Figura 23. Material vegetal de Tagetes filifolia L. Colectado.

4.5.2 Maceración

El material vegetal fragmentado se pone en contacto con suficiente volumen de disolvente ciclohexano, en un recipiente cerrado y a temperatura ambiente por una semana ó hasta agotamiento.



Figura 24. Maceración de material vegetal

4.5.3 Filtración

Posterior a la maceración la mezcla es filtrada sobre algodón y sulfato de sodio anhidro, el material insoluble es lavado con el mismo disolvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto a presión reducida.



Figura 25. Filtración del aceite extraído

4.5.4 Destilación a presión reducida

La eliminación del disolvente orgánico volátil de la mezcla, se efectúa convenientemente usando un rotaevaporador o rotavapor, que es un sistema de separación de disolvente con la muestra extraída, a través de la destilación del disolvente mediante la aplicación de calor, agitación y de vacío, pasando así el disolvente a otro depósito y dejando solo la muestra en el depósito inicial. Operativamente, un matraz que contiene la mezcla de muestra y disolvente se sumerge parcialmente en un baño de agua a una temperatura constante entre 60-80 °C, manteniendo también, agitación y vacío constante.



Figura 26. Eliminación del solvente de extracción a presión reducida

4.5.5 Secado.

La muestra de aceite sin disolvente es nuevamente filtrada a través de sulfato de sodio anhidro con el fin de eliminar algún remanente de agua, luego se colecta en un vial previamente pesado y se guarda en refrigeración.



Figura 27. Eliminación de agua del aceite con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)

4.6 Separación y Obtención de Compuestos de Los Aceites Esenciales, por Cromatografía en Capa Fina Analítica y Preparativa

4.6.1 Separación de compuestos por cromatografía en capa fina analítica y su visualización

Se tomó una muestra de aceite esencial seco y se aplicó sobre cromatofolios o placas ALUGRAM Sílica gel 60 con indicador fluorescente, de 20 x 20 cm y 0.2 mm de espesor, se eluyó con mezclas de disolventes: Ciclohexano-acetato de etilo (85/15%), tolueno-acetona (95/5%) y benceno/acetona (95.5%), ver tabla N°5. Se visualizaron los compuestos bajo una lámpara ultravioleta, y luego se aplicó revelador de óleum con atomizador, luego calentamiento de la placa para obtener manchas coloreadas de los compuestos de interés.

Tabla 4. Separación de compuestos por cromatografía en capa fina analítica

Aceites esenciales	Fase móvil	Proporciones %	Rf de los compuestos separados
<i>Tagetes filifolia</i> Lag.	Ciclohexano/AcOEt	85:15	0.7
<i>Piper marginatum</i> Jacq.	Tolueno/ Acetona	95:5	0.45
<i>Piper auritum</i> Kunth (pa 1)	Benceno/ Acetona	95:5	0.9
(pa 2)			0.8

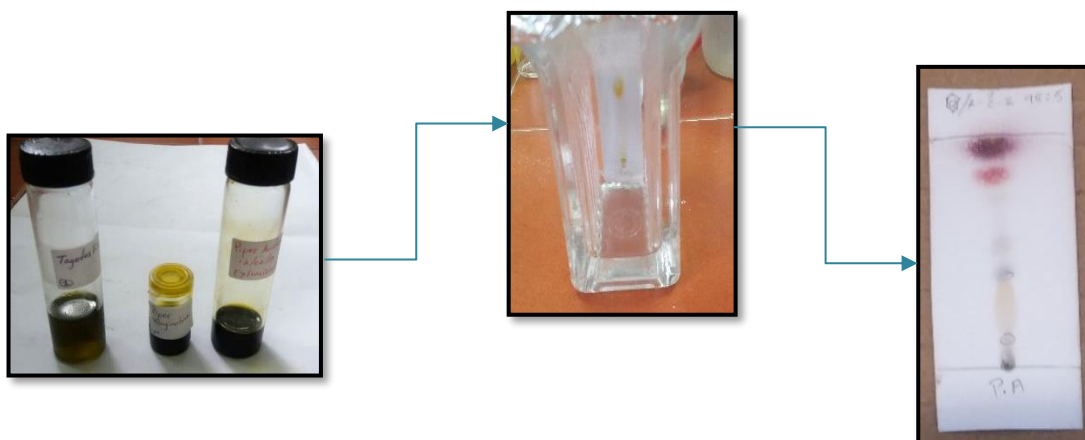


Figura 28. Separación por cromatografía en capa fina analítica y visualización de compuestos

4.6.2 Obtención de compuestos por cromatografía en capa fina preparativa

La obtención o aislamiento de los compuestos, se realizó por cromatografía en capa fina preparativa, utilizando las mezclas de disolventes ya descritas para cromatografía en capa fina analítica. El procedimiento seguido es el siguiente: Se aplicó 10 mg de aceite con una pipeta Pasteur con punta de algodón a lo largo de la línea base de un cromatofolio ALUGRAM Sílica gel 60, 20x20 cm, luego se colocó dentro de la cámara de vidrio con fase móvil y se eluyó hasta cerca del borde superior (**figura 29, a y b**). Se reveló bajo luz ultravioleta (**figura 29, c**), observando bandas coloreadas, correspondientes a los compuestos del aceite. Las bandas coloreadas mejor resueltas y cuantitativas, se marcaron y se rasparon con espátula, pasando esta sílica impregnada, a un embudo con filtro de arena y vidrio fritado (figura 30, a), se filtró y se lavó sucesivas veces con acetato de etilo concentrado, recogiendo los lavados en un balón limpio y tarado (figura 30), Se obtuvo los rendimientos de aceite esencial y rendimientos de compuestos de los aceites esenciales respectivamente; Compuesto 1: 10.41% y 0.27%

Compuesto 2: 9.46% y 0.29%

Compuesto 3: 9.46% y 0.22%

Compuesto 4: 8.25% y 0.323%

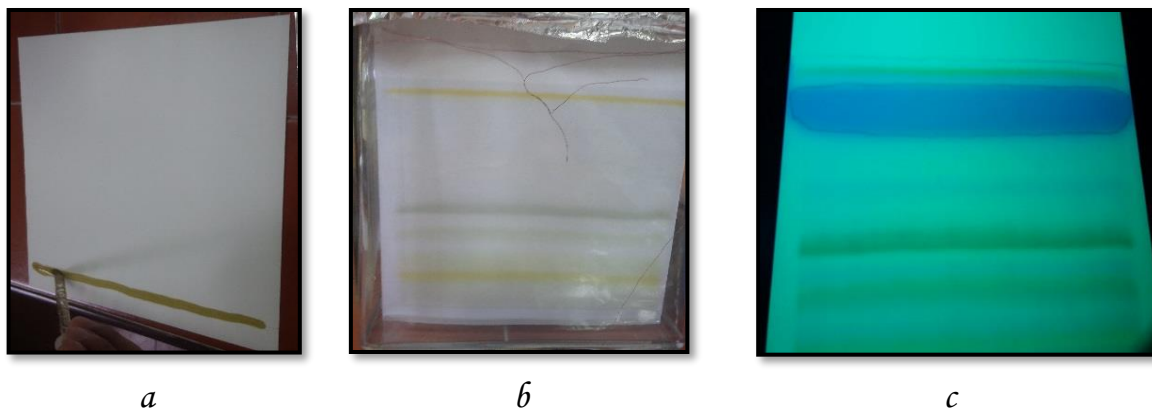


Figura 29. Esquema de cromatografía en capa fina preparativa, elución con ciclohexano/AcOEt 85:15%.

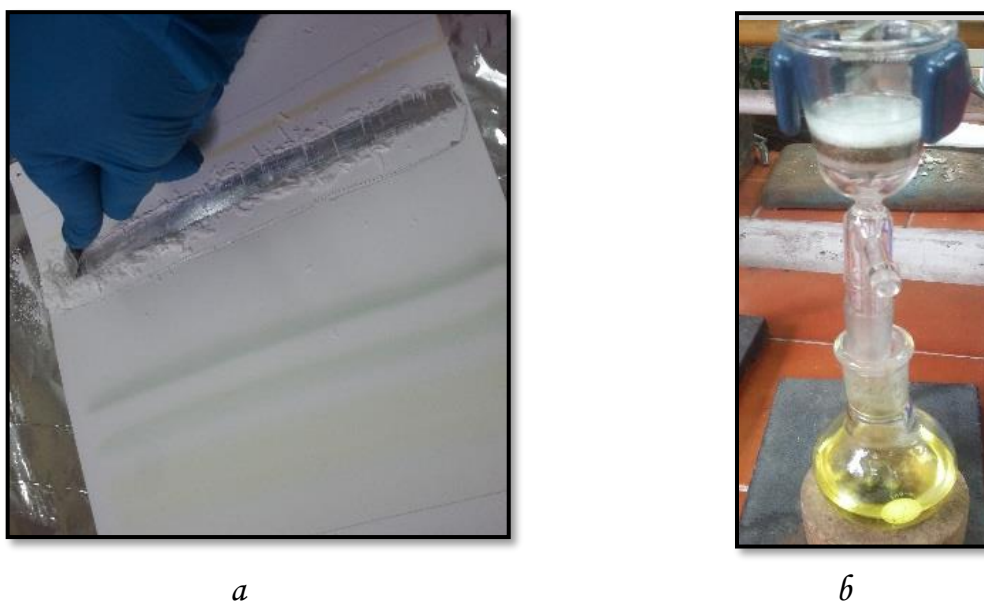


Figura 30. Obtención de compuestos de interés por cromatografía en capa fina preparativa.

4.7 Esquemas de la Metodología

4.7.1 Esquema del procedimiento experimental para la planta *Tagetes filifolia* Lag.

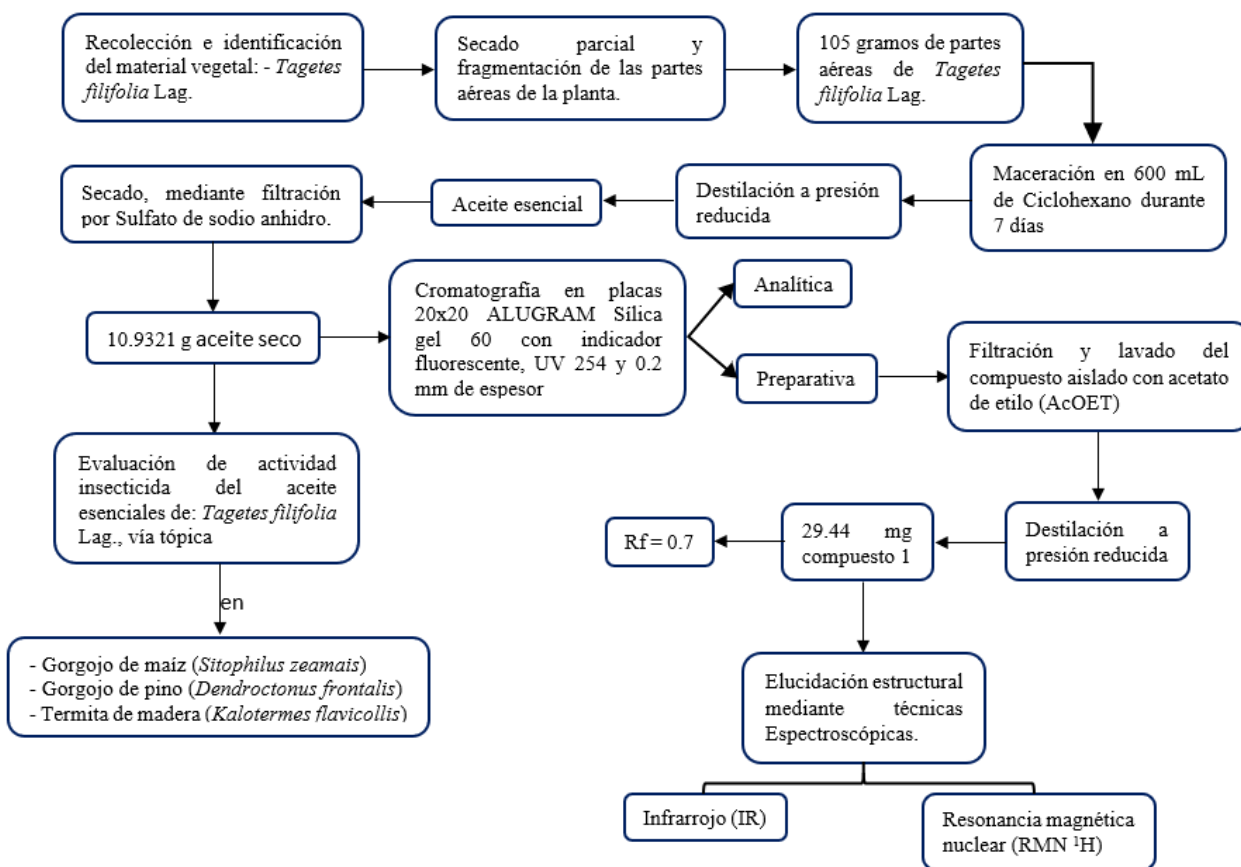


Figura 31. Esquema de extracción del aceite esencial y de obtención de compuestos por cromatografía en capa fina preparativa de *Tagetes filifolia* Lag.

4.7.2 Esquema del procedimiento experimental para la planta *Piper marginatum* Jacq.

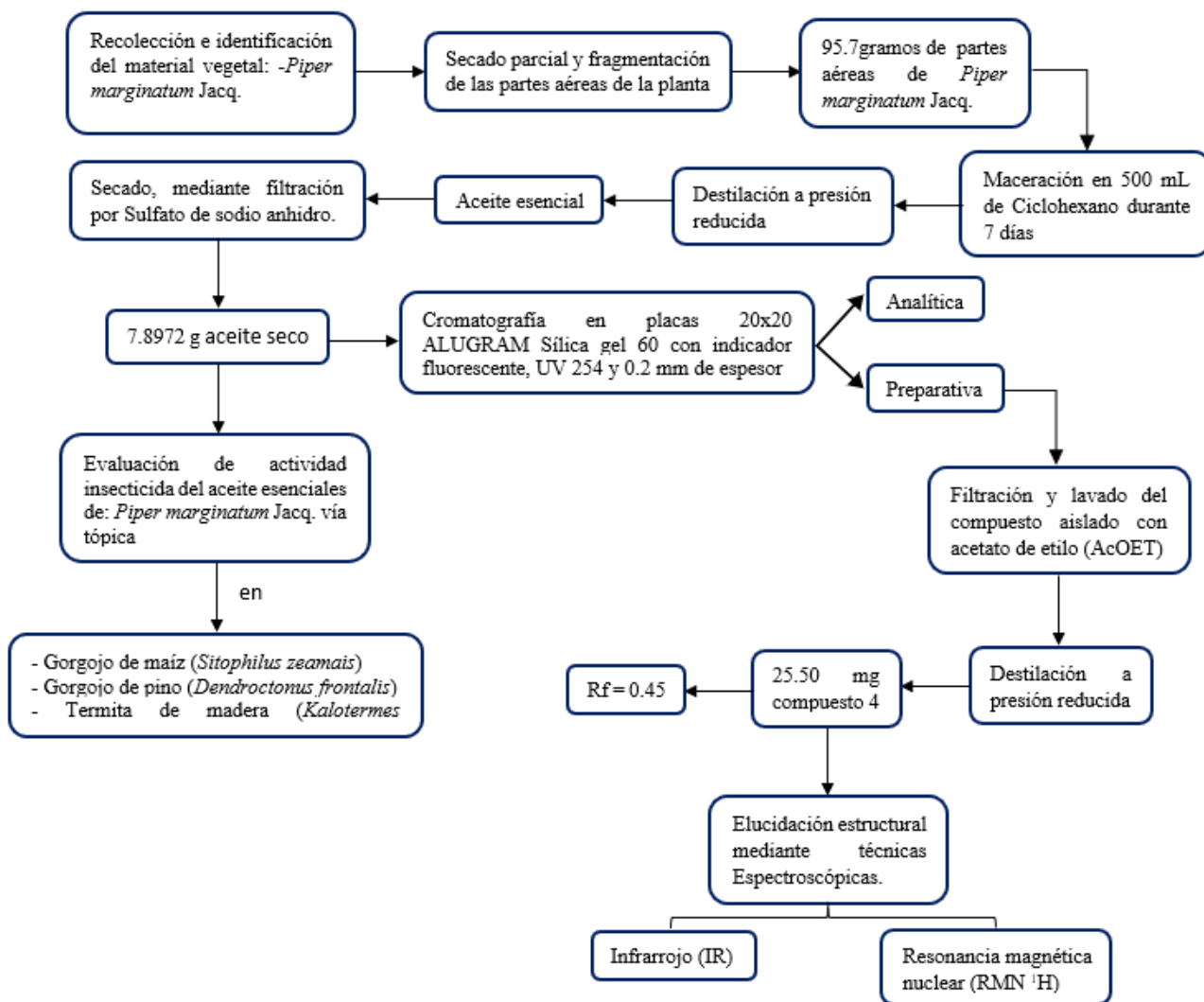


Figura 32. Esquema de extracción del aceite esencial y de obtención de compuesto por cromatografía en capa fina preparativa de *Piper marginatum* Jacq.

4.7.3 Esquema del procedimiento experimental para la planta *Piper auritum* Kunth.

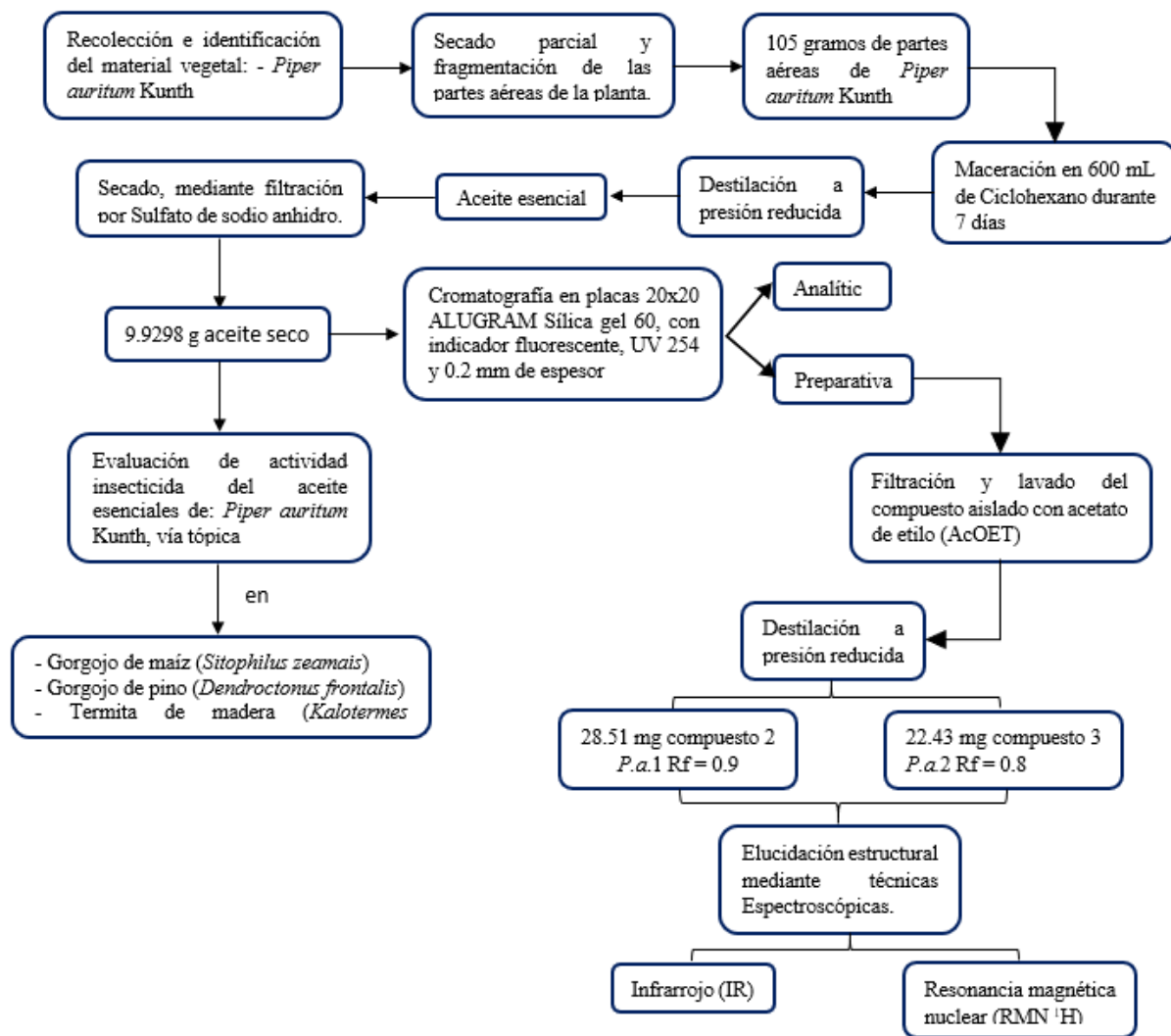


Figura 33. Esquema de extracción del aceite esencial y de obtención de compuesto por cromatografía en capa fina preparativa de *Piper auritum* Kunth.

4.8 Identificación de Compuestos de Los Aceites Esenciales por Espectroscopía de Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H)

4.8.1 Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo (IR) de los compuestos aislados, se realizaron en un equipo Thermo Scientific Nicolet iS5 y unidad de Reflectancia Total Atenuada (iD7 ATR de ZnSe).

Se realizó un barrido de fondo o background, seguidamente se colocó una gota de compuesto puro sobre el cristal de Seleniuro de Zinc (ZnSe), para cubrir el cristal con el compuesto a analizar y procurando que queden en estrecho contacto muestra-cristal, luego se obtuvo el espectro y mostro bandas características de grupos funcionales correspondientes a compuestos fenilpropanoides. La identificación se efectuó mediante la revisión de las bandas de IR características para los compuestos obtenidos.



Figura 34. Equipo de Infrarrojo Thermo Scientific Nicolet y Unidad de Reflectancia Total Atenuada (ATR de ZnSe).

4.8.2 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron realizados en un equipo marca Varian-Mercury 400 BB, 600MHz con sonda para los núcleos de ^1H . Los productos se disolvieron en Cloroformo Deuterado (CDCl_3) con estándar interno de tetrametilsilano (TMS). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm a lo largo de la escala y las constantes de

acoplamiento (J) en Hz. Se examinaron los desplazamientos químicos, los desdoblamientos de las señales, así como las constantes de acoplamiento para cada espectro de RMN ^1H .

El procesamiento y el análisis de los espectros de RMN, se efectuaron apoyándose del software MestrenovaLITE. Al mismo tiempo, se hizo uso de simuladores: NMR Predict. y Spectra Database for Organic Compounds. Para la representación de las moléculas se utilizó el software ChemBiodraw Ultra 13.0.

4.9 Actividad Insecticida

Los aceites y sus componentes han sido considerados agentes naturales contra las plagas de insectos. Los aceites esenciales son renovables, no persistentes en el medio ambiente y relativamente seguro para organismos no objetivo y humanos. (Sendi & Ebadollahi, 2013)

Aunque la actividad biológica de los aceites esenciales ha sido confirmada en muchos estudios, los datos recogidos en esas investigaciones muestran una gran variabilidad. Las causas de ese comportamiento parecen ser las diferencias en la composición del aceite esencial debido a factores genéticos y ambientales y es por eso que resulta de interés la identificación de los principales constituyentes responsables de la actividad del aceite estudiado. (Sánchez, Pino, Correa, Najarro, & Iglesia, 2009). La eficacia de los aceites esenciales varía de acuerdo con el perfil fitoquímico del extracto de la planta y el objetivo entomológico, (Sendi & Ebadollahi, 2013) por ejemplo: antimicrobiano, pesticida, herbicida, insecticida, bactericida, e. o., dentro de esta investigación y según referencia bibliográfica, para las tres plantas anisadas en estudio, la actividad biológica de interés es insecticida.

4.9.1 Selección de insectos para ensayos

Siguiendo los objetivos de este trabajo, se realizó la evaluación de la actividad insecticida de los aceites esenciales obtenidos, empleando tres especies de insectos con alto impacto en la agricultura y los recursos forestales de nuestro país:

- 1- Gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*).
- 2- Gorgojo Descortezador del Pino (*Dendroctonus frontalis*).
- 3- Termita de madera seca. *Kaloterme flavicollis*.

4.9.2 Recolección de insectos para ensayos

En junio de 2018 un agro servicio ubicado en el centro de Ciudad Barrios, San Miguel donó una gran cantidad de semilla de maíz infectado con gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*), los cuales se almacenaron en las bolsas de maíz, hasta sus ensayos.

En julio de 2017 la ADESCO FVI de la comunidad de Arambala, Morazán, proporcionó cortezas de pino infectadas con gorgojos descortezadores del pino (*Dendroctonus frontalis*), que afectan las plantaciones de pino en toda lo zona fronteriza entre Morazán y Honduras, para lo cual los asesores de este trabajo viajaron hasta el lugar a recolectar las cortezas de pino infectadas con gorgojos descortezadores.

Así también, en Julio de 2018, el asesor principal del trabajo, recolecto termitas (*Kalotermes flavicollis*) en la zona de sitio del Niño, San Juan Opico.

Todos los insectos se encontraron en estado adulto y fueron trasladados al laboratorio de la Escuela de Química para realizar la actividad insecticida. Otra parte de los insectos se llevó al Laboratorio de Parasitología Vegetal del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), para su identificación, clasificación y extensión de la certificación respectiva. Este servicio fue gentilmente realizado por el entomólogo Dr. Mario Ernesto Parada Jaco (anexo 2).

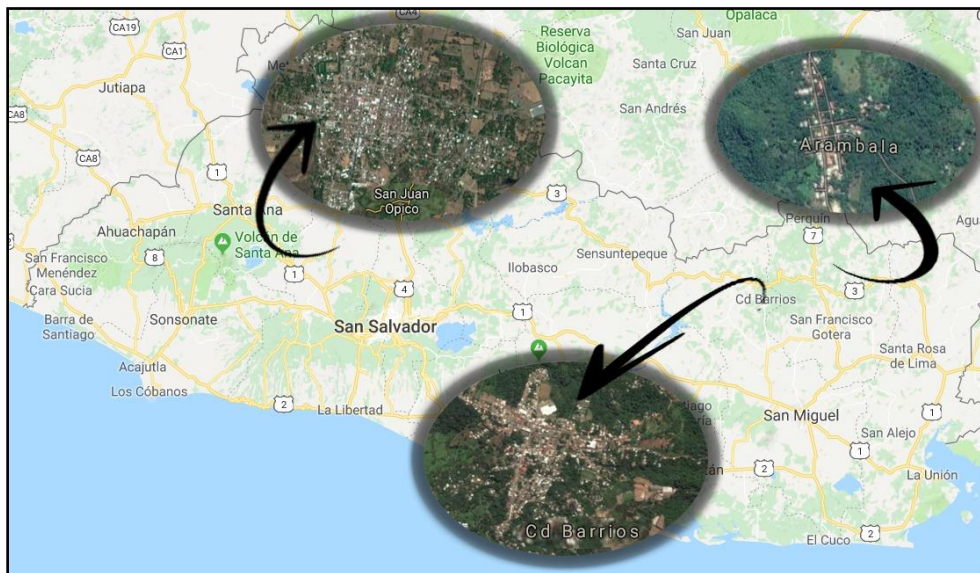


Figura 35. Zonas geográficas de recolección de los insectos utilizados en ensayos.

4.9.3 Ensayos de actividad insecticida de los aceites esenciales




Para llevar a cabo la actividad insecticida se utilizaron tres cajas de Petri de vidrio; colocando diez insectos de cada especie en su respectiva caja de Petri. A cada insecto se le aplicó 0.5 μ L de aceite esencial sobre el pronoto (espalda), con ayuda de una micropipeta de capacidad 0.5 – 10 μ L.

La aplicación tópica de los aceites esenciales de *Piper auritum* Kunth, *Piper marginatum* Jacq. y *Tagetes filifolia* Lag. a las tres especies de insectos, se realizó empleando las metodologías descritas por (Castillo-Sánchez, Jiménez-Osornio, & Delgado-Herrera, 2012) y (Arias, y otros, 2017) con ligeras modificaciones, dadas las condiciones y recursos disponibles en laboratorio.

Al tener actividad positiva para los tres aceites sobre los insectos evaluados, se diseñó un experimento a diferentes concentraciones, empleando para el experimento diez insectos por concentración, el cual se detalla en el siguiente apartado.

Primero se realizó una prueba preliminar para evaluar la capacidad insecticida de cada uno de los aceites extraídos. Para ello se utilizaron dos cajas de Petri, colocando 3 insectos en cada una. La primera caja serviría de control y en la otra se realizó la evaluación, empleado 0.5 μ L de aceite esencial con una concentración de aproximada de 23.0 mg/ml, en la **tabla 6** se resumen la metodología empleada para cada insecto.

Tabla 5. Screening de la actividad insecticida de los aceites esenciales extraídos

Insecto evaluado	0.5 μ L de aceite esencial	Concentración (mg/ml)	Insectos por caja	Insectos de Control	Repeticiones
 <i>Sitophilus zeamais</i>	<i>Tagetes filifolia</i> Lag	23.0	3	3	2
	<i>Piper auritum</i> Kunth		3	3	2
	<i>Piper marginatum</i> Jacq		3	3	2
 <i>Kaloterme flavicollis</i>	<i>Tagetes filifolia</i> Lag	23.0	3	3	2
	<i>Piper auritum</i> Kunth		3	3	2
	<i>Piper marginatum</i> Jacq		3	3	2
 <i>Dendroctonus frontalis</i>	<i>Tagetes filifolia</i> Lag	23.0	3	3	2
	<i>Piper auritum</i> Kunth		3	3	2
	<i>Piper marginatum</i> Jacq		3	3	2

4.9.4 Preparación de disoluciones de aceite esencial para evaluar actividad insecticida.

Las disoluciones de aceites esenciales se prepararon a diferentes concentraciones, a continuación, se detalla el procedimiento: El aceite esencial obtenido de *Tagetes filifolia* se disolvió con etanol, a continuación se tomó una alícuota de la disolución y se colocó al interior de un balón volumétrico de 50 ml (previamente pesado); se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente hasta sequedad, a continuación se pesó obteniéndose un valor de 1.1552 g de aceite esencial; luego, se disolvió nuevamente en etanol hasta aforar el balón, para dar una concentración de 0.0231 g/ml (C_1) de aceite esencial. Los pesos se diseñaron de tal manera que, existiera una diferencia en las concentraciones de 0.05 unidades entre las diluciones, y todos se obtuvieron de la misma forma que la descrita anteriormente. El proceso se repitió para las otras dos muestras de extracto esencial,

en la figura 36 se resumen el procedimiento para la preparación de la disolución más concentrada de cada uno de los aceites empleados en el estudio.

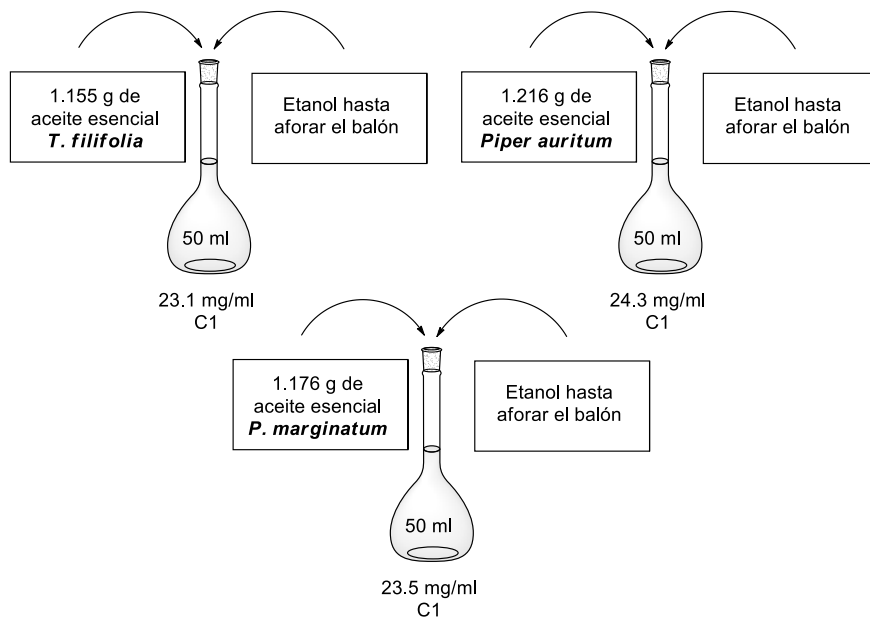


Figura 36. Preparación de las disoluciones de aceites esenciales para el ensayo de actividad insecticida.

En la tabla 7 se presentan los pesos utilizados de cada aceite para la preparación de cinco concentraciones.

Una vez preparadas las concentraciones se dispuso en diferentes cajas de Petri los insectos a evaluar, en la figura 37 se muestran el material utilizado en estudio del *Sitophilus Zeamais* (gorgojo del maíz), el procedimiento que se diseñó fue el siguiente: Se utilizaron 60 insectos distribuidos en seis cajas de Petri, identificadas como concentración (C₁) a la (C₅) y control.

Tabla 6. Concentraciones de las disoluciones de cada aceite esencial.

	<i>T. filifolia</i> (g)	mg/ml	<i>P. auritum</i>	mg/ml	<i>P. marginatum</i>	mg/ml
C ₁	1.1552	23.1	1. 216	24.3	1.17623	23.5
C ₂	1.0974	21.9	1. 167	23.3	1.1238	22.5
C ₃	1.0426	20.9	1.109	22.2	1.0724	21.4
C ₄	0.9904	19.8	1.054	21.1	1.0221 g	20.4
C ₅	0.9409	18.8	1.001	20.0	0. 969g	19.4

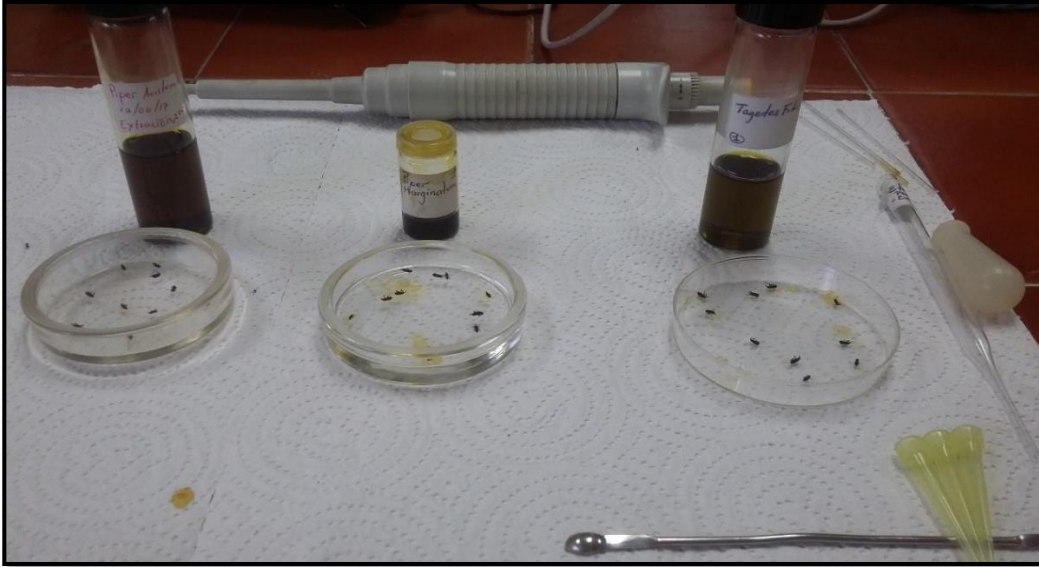



Figura 37. Evaluación de actividad insecticida de los aceites esenciales, en Gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*).

Sobre el lomo de cada insecto se aplicó un volumen 0.5 μ L de aceite esencial de cada una de las concentraciones a evaluar. Para determinar el efecto del disolvente sobre los insectos, a los individuos de control se les aplicó 0.5 μ L de etanol. El ensayo se desarrolló por espacio de 24 horas y por triplicado. En la tabla 8, 9 y 10 se resumen el procedimiento empleado con los tres aceites esenciales aislados, sobre los insectos utilizados.

Tabla 7. Evaluación de la actividad insecticida de *Tagetes filifolia* Lag sobre *S. zeamais*, *K. flavicollis* y *D. frontalis*.

		Dosis (mg/ml)	Insectos/caja
 <i>S. zeamais</i>	C ₁	23.1	10
	C ₂	21.9	10
	C ₃	20.9	10
	C ₄	19.8	10
	C ₅	18.8	10
	Control	etanol	10
	C ₁	23.1	10
	C ₂	21.9	10
	C ₃	20.9	10









 <i>K. flavicollis</i>	C ₄	19.8	10
	C ₅	18.8	10
	Control	etanol	10
 <i>D. frontalis</i>	C ₁	23.1	10
	C ₂	21.9	10
	C ₃	20.9	10
	C ₄	19.8	10
	C ₅	18.8	10
	Control	etanol	10

Tabla 8. Evaluación de la actividad insecticida de *Piper auritum* Kunth sobre *S. zeamais*, *K. flavicollis* y *D. frontalis*.

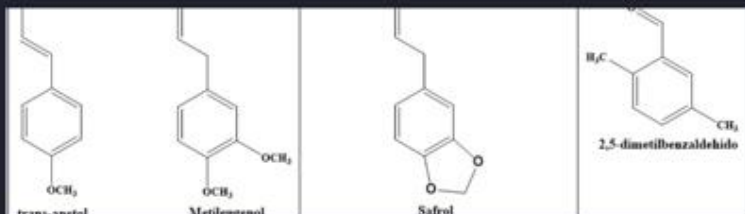
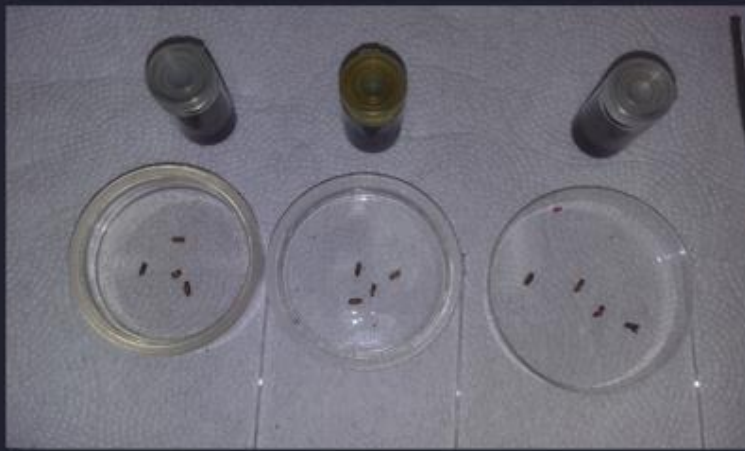
		Dosis (mg/ml)	Insectos/caja
 <i>S. zeamais</i>	C ₁	24.3	10
	C ₂	23.3	10
	C ₃	22.2	10
	C ₄	21.1	10
	C ₅	20.0	10
	Control	etanol	10
 <i>K. flavicollis</i>	C ₁	24.3	10
	C ₂	23.3	10
	C ₃	22.2	10
	C ₄	21.1	10
	C ₅	20.0	10
	Control	etanol	10
 <i>D. frontalis</i>	C ₁	24.3	10
	C ₂	23.3	10
	C ₃	22.2	10
	C ₄	21.1	10

	C ₅	20.0	10
	Control	etanol	10

Tabla 9. Evaluación de la actividad insecticida de *Piper marginatum* Jacq. Sobre *Dendroctonus frontalis* S. zeamais, *K. flavicollis* y *D. frontalis*

		Dosis (mg/ml)	Insectos/caja
 <p><i>S. zeamais</i></p>	C ₁	23.5	10
	C ₂	22.5	10
	C ₃	21.4	10
	C ₄	20.4	10
	C ₅	19.4	10
	Control	etanol	10
 <p><i>K. flavicollis</i></p>	C ₁	23.5	10
	C ₂	22.5	10
	C ₃	21.4	10
	C ₄	20.4	10
	C ₅	19.4	10
	Control	etanol	10
 <p><i>D. frontalis</i></p>	C ₁	23.5	10
	C ₂	22.5	10
	C ₃	21.4	10
	C ₄	20.4	10
	C ₅	19.4	10
	Control	etanol	10

CAPITULO V



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.0 Resultados y Discusión

Con base, en la metodología descrita en el Capítulo IV, apartado 4.8, de los tres aceites esenciales obtenidos, se aislaron e identificaron cuatro compuestos pertenecientes a la serie **fenilpropanoides**, cuyo proceso de identificación, se presenta en este capítulo.

5.1 Aislamiento de compuestos mayoritarios

Con la finalidad de aislar los metabolitos secundarios mayoritarios, presentes en los aceites esenciales obtenidos, se realizaron repetidos ensayos de separación por cromatografía en capa fina analítica formulando varias mezclas de disolventes, logrando determinar que las mezclas o fases móviles más efectivas para este fin, son las mezclas de: Ciclohexano-Acetato de etilo (85/15%), Tolueno-Acetona (95/5%) y Benceno-Acetona (95:5%), obteniéndose un total de **4 compuestos**.

5.2 Identificación de compuestos mayoritarios aislados.

Mediante el estudio minucioso de sus espectros de IR y RMN ^1H , así como la comparación de los datos con los existentes en la bibliografía química para esta clase de compuestos, se determinó que sus estructuras corresponden a los compuestos: **Trans-anetol, Safrol, metileugenol y 2,5-dimetilbenzaldehido**.

A continuación, pasamos a describir la determinación estructural de estos compuestos.

5.2.1 Compuesto 1

El **compuesto 1** aislado del aceite esencial de *Tagetes filifolia* como líquido color amarillo, con un peso de 29.44 mg, porcentaje de rendimiento de 0.27% y un R_f de 0.7 utilizando la mezcla de disolventes Ciclohexano/AcOEt (85:15%). Su espectro de infrarrojo presenta las siguientes bandas. En primer lugar, presenta bandas de características de enlaces C-H de tipo sp^3 y sp^2 en torno a $3150-3050\text{ cm}^{-1}$. Entre 2100 y 1700 cm^{-1} se observan *sobretonos* correspondientes a un anillo aromático. El pico a 1500 cm^{-1} , es debido a la vibración C=C; y la banda a 840 cm^{-1} indica un anillo aromático p-disustituido. En la región de la huella dactilar a 1250 cm^{-1} , se observa la vibración C-O-C que corresponde a un éter aromático. Con base en estos datos y por comparación

con los datos encontrados en la bibliografía química, (Sicker, 2009), el espectro de infrarrojo del **compuesto 1** se corresponde con el de **trans-anetol**.

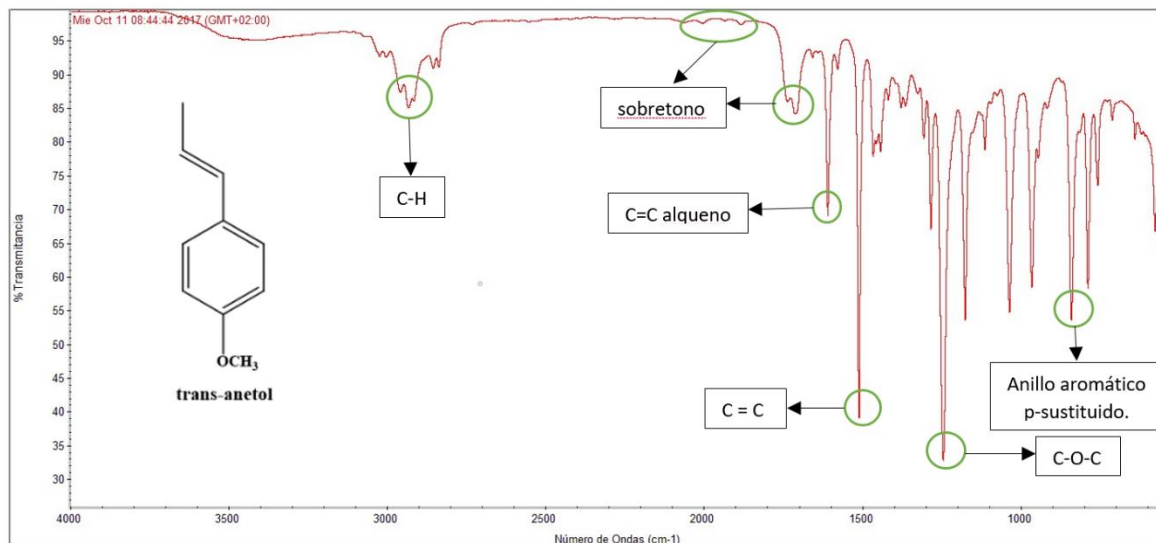


Figura 38. Espectro infrarrojo de compuesto 1 aislado de *Tagetes filifolia* Lag.

5.2.2 Compuesto 2 (p.a.1)

El **compuesto 2** aislado del aceite esencial de *Piper auritum* como líquido color verde-amarillo, con un peso de 28.51 mg, porcentaje de rendimiento de 0.29% y un *R_f* de 0.9 utilizando la mezcla de disolventes Benceno-Acetona (95/5%). Su espectro de infrarrojo presenta las siguientes bandas. El espectro muestra bandas características de enlaces C-H de tipo sp³ y sp² en torno a 2900-2800 cm⁻¹. Para el anillo aromático, se observan sobretonos entre 1800 y 1638 cm⁻¹. Y el pico a 1500 cm⁻¹, es debido a la vibración C=C del anillo; y la banda a 806-774.87 cm⁻¹ indica un anillo aromático trisustituido, confirmándolo con la señal a 1735. En la región de 1250-1040 cm⁻¹, se observa un estiramiento de tipo C-O-C característico de grupo metilen-dioxi. La información descrita se confrontó con los datos de la bibliografía química, (Kalsi, 2004), (Martínez, 2003), que indica que el espectro infrarrojo del compuesto 2, corresponde a **Safrol**. Así mismo, en (Pino, Marbot, Fuentes, Payo, & Chao, 2005), (Gufta & Arias, 1985), se determinó que el safrol es uno de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Piper auritum*, el cual, a su vez es un derivado biosintético del metileugenol, según (Dewick, 2001).

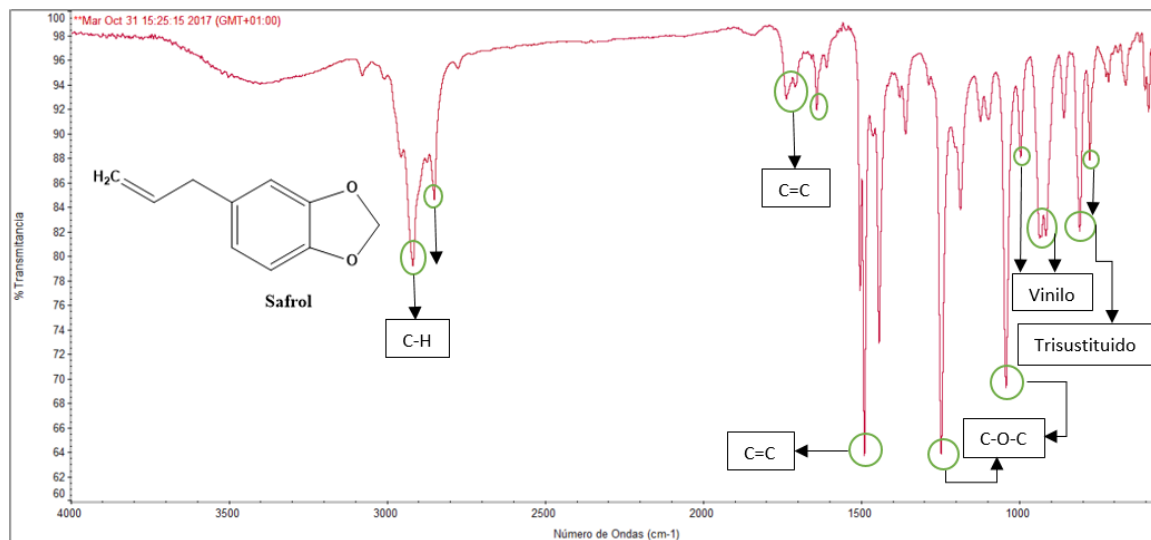


Figura 39. Espectro infrarrojo de compuesto 2, obtenido de *Piper auritum* Kunth.

5.2.3 Compuesto 3 (p.a.2)

El **compuesto 3** aislado del aceite esencial de *Piper auritum*, como líquido color verde-amarillo, con un peso de 22.43 mg, porcentaje de rendimiento de 0.22% y un R_f de 0.8 utilizando la mezcla de disolventes Benceno-Acetona (95/5%). Su espectro de infrarrojo presenta las siguientes bandas. Se observan bandas de características de enlaces C-H de tipo sp^3 y sp^2 en torno a $3130-2900\text{ cm}^{-1}$. Entre 2100 y 1800 cm^{-1} , se observan sobretonos correspondientes a un anillo aromático. El pico a 1500 cm^{-1} , es debido a la vibración C=C; y la banda a $860-730\text{ cm}^{-1}$ indica un anillo aromático trisustituido. En la región de la huella dactilar a 1250 cm^{-1} , se observa la vibración C-O-C que corresponde a un éter aromático. Basándonos en esta información y los datos consultados en la bibliografía química, (Riyanto, Sastrohamidjojo, & Fariyatun., 2016), (Badertscher, 2009), se determinó que el espectro infrarrojo del **compuesto 3**, corresponde a **metileugenol**. Para confirmarlo pasamos a la descripción basada en su espectro de RMN ^1H .

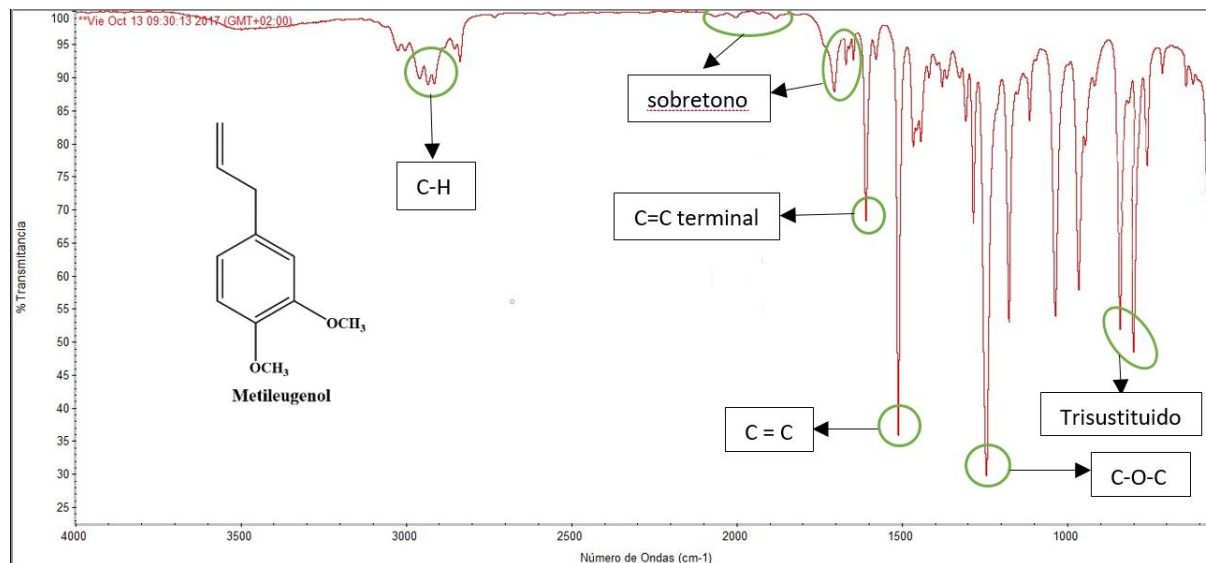


Figura 40. Espectro infrarrojo de compuesto 3, aislado de *Piper auritum* Kunth.

El espectro RMN ¹H del compuesto 3 (Figura 41), en el segmento de δ 6.72 a 6.81 ppm, se observan dos señales, ambas correspondientes a un sistema spín de tipo ABX de protones aromáticos donde la señal de campo más bajo (δ 6.81 ppm) integra para un protón y la de campo más alto (δ 6.72 ppm) integra para dos protones. A continuación, se observa otro sistema de spín tipo ABX formado por tres protones de doble enlace terminal, para las señales que se encuentran a: δ 5.96 ppm (dt, $J= 16.8, 10.0, 6.7$ Hz, 1H) y 5.07 (ddt, $J= 10.8, 8.9, 1.8$ Hz, 2H). Por otra parte, a δ 3.87 ppm se observa un doblete que integra para seis protones y que, dada su forma y desplazamiento químico, corresponde a dos grupos metoxilo. Finalmente, a δ 3.34 ppm se observa un doblete ($J= 6.7$ Hz.) que integra para dos protones de un metileno en posición vecinal a un protón vinílico.

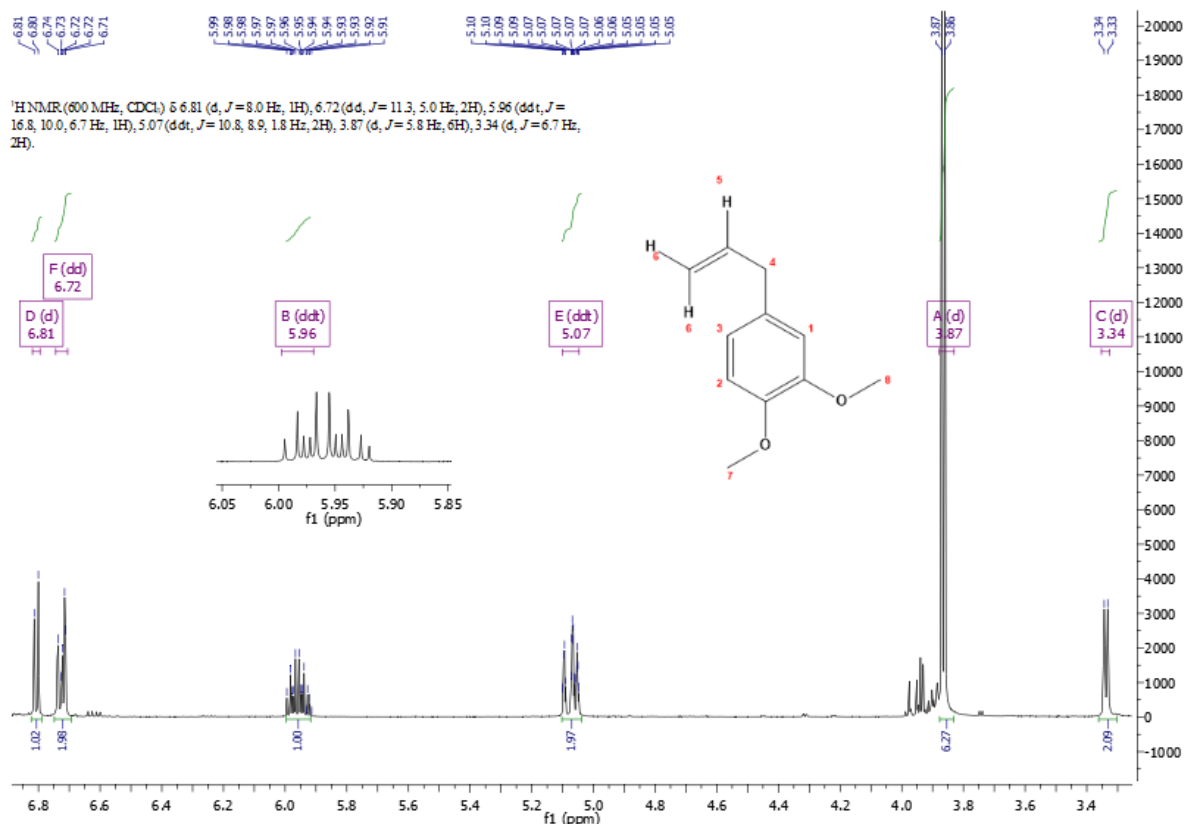


Figura 41. Espectro ¹H RMN (CDCl₃, 600 MHz) de compuesto 3, aislado de *Piper auritum* Kunth.

Datos de NMR ¹H (600 MHz, CDCl₃), compuesto 3: δ 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J* = 11.3, 5.0 Hz, 2H), 5.96 (ddt, *J* = 16.8, 10.0, 6.7 Hz, 1H), 5.07 (ddt, *J* = 10.8, 8.9, 1.8 Hz, 2H), 3.87 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H), 3.34 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H).

Con base, en los datos de protón que se han descrito, puede determinarse que la molécula posee; un sistema de anillo aromático trisustituido, dos de ellos correspondientes a grupos metoxilo (-OCH₃) y el tercero es una cadena insaturada de tipo -CH₂-CH=CH₂ que incluye dos protones vinílicos terminal, un grupo metileno de cadena alifática y un protón vinílico vecinal a ambos grupos de protones. En cuanto a la posición de los tres sustituyentes, se concluye que el **grupo propileno** se encuentra en posición *para* respecto a un grupo metoxilo; y en posición *meta* respecto al otro grupo metoxilo. Esto deja a los dos grupos metoxilo en posiciones *orto* entre sí.

Esta información es confirmada al revisar las constantes de acoplamiento de dos protones unidos al anillo aromático, que indican que estos se encuentran en posición *orto* entre sí (*J* = 11.3 Hz), y

el tercer protón se encuentra en posición *meta* y *para* respecto a los protones anteriores ($J = 8.0, 5.0$ Hz).

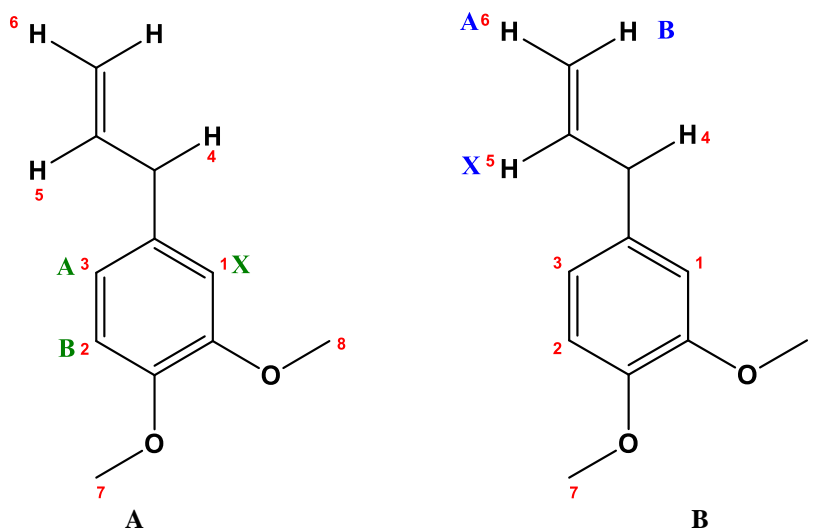


Figura 42. Sistemas spín de tipo *ABX* para protones: (A): protones aromáticos y (B): protones de vinilo terminal.

La posición de los tres sustituyentes del metileugenol se fundamenta en la biosíntesis de fenilpropanoides derivados de los fenilpropanoides: **ácido *p*-cumárico**, **ácido caféico** y **ácido ferúlico**, todos con un precursor común que es la L-tirosina. (ver figura 43).

De acuerdo a los datos del espectro de infrarrojo y RMN ^1H , se confirma la identificación del compuesto 2 como **metileugenol**, del cual ya había sido identificado del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth. (Rodríguez, y otros, 2013).

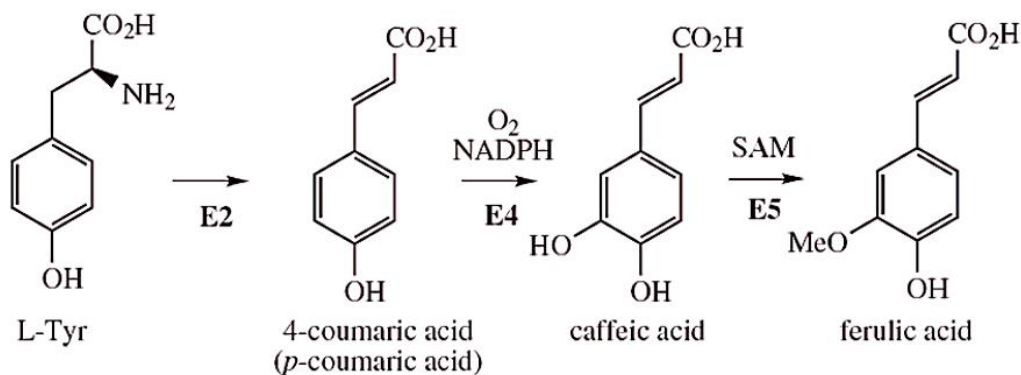


Figura 43. Algunos ejemplos de biosíntesis de fenilpropanoides.

5.2.4 Compuesto 4.

El **compuesto 4**, aislado del aceite esencial de *Piper marginatum* como líquido color verde claro, con un peso de 25.50 mg, porcentaje de rendimiento de rendimiento de 0.32% y un R_f de 0.45 utilizando la mezcla de disolventes Tolueno-Acetona (95/5%). En su espectro de infrarrojo presenta las siguientes bandas. En primer lugar, el espectro muestra bandas características de enlaces C-H de tipo sp^3 y sp^2 en torno a $2900-2848\text{ cm}^{-1}$, la primera puede ser de metilo. Para el anillo aromático, se observan sobretonos entre 2000 y 1800 cm^{-1} . A 1730 cm^{-1} muestra una señal intensa, debida a la vibración del enlace C=O correspondiente a un carbonilo de aldehído. El pico a 1457 cm^{-1} , corresponde a la vibración C=C de anillo aromático. La señal a 1806 cm^{-1} indica la presencia de un anillo aromático trisustituido. Para la identificación completa de la estructura del compuesto 4, pasaremos a su descripción basada en el espectro de RMN ^1H .

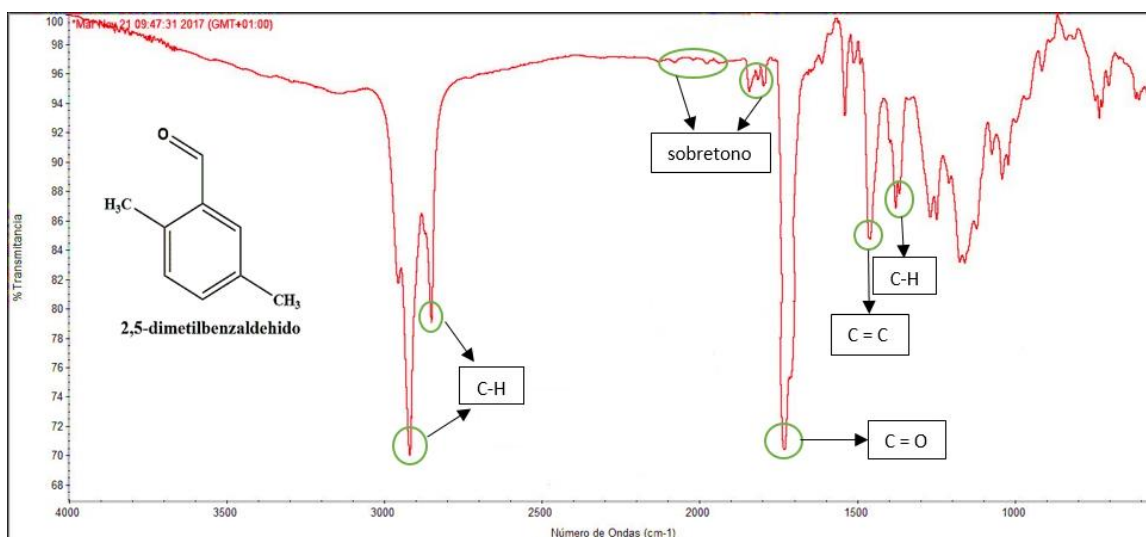


Figura 44. Espectro infrarrojo de compuesto 4, obtenido de *Piper marginatum* Jacq.

El espectro RMN ^1H del compuesto 4 (Figura 45), presenta a δ 11.03 ppm (s, 1H), un singlete, el cual es característico de un protón de aldehído. A continuación, en la región de δ 9.13 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), δ 8.30 (ddd, $J = 9.6, 2.6$ Hz, 1H) y δ 7.96 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), se observa un sistema spín de tipo AMX típico para 3 protones aromáticos, cuyos desplazamiento químico y dadas sus constantes de acoplamiento, dos de los protones se encuentran en posición *orto* entre sí (δ 8.30 (ddd, $J = 9.6, 2.6$ Hz, 1H), δ 7.96 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H)); y el tercer protón de éste sistema, se encuentra

en posición *meta* referente a uno de los dos protones (δ 9.13 (d, $J= 2.6$ Hz, 1H), 8.30 (ddd, $J= 9.6$, 2.6 Hz, 1H)). Finalmente, a δ 2.18 (s, 3H), 2.09 (s, 3H) se observan dos singuletes que integran para 3 protones cada uno indicando la presencia de dos grupos metilo.

Datos de NMR ^1H (600 MHz, CDCl_3), compuesto 4: δ 11.03 (s, 1H), 9.13 (d, $J= 2.6$ Hz, 1H), 8.30 (ddd, $J= 9.6$, 2.6, 0.6 Hz, 1H), 7.96 (d, $J= 9.6$ Hz, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.09 (s, 3H).

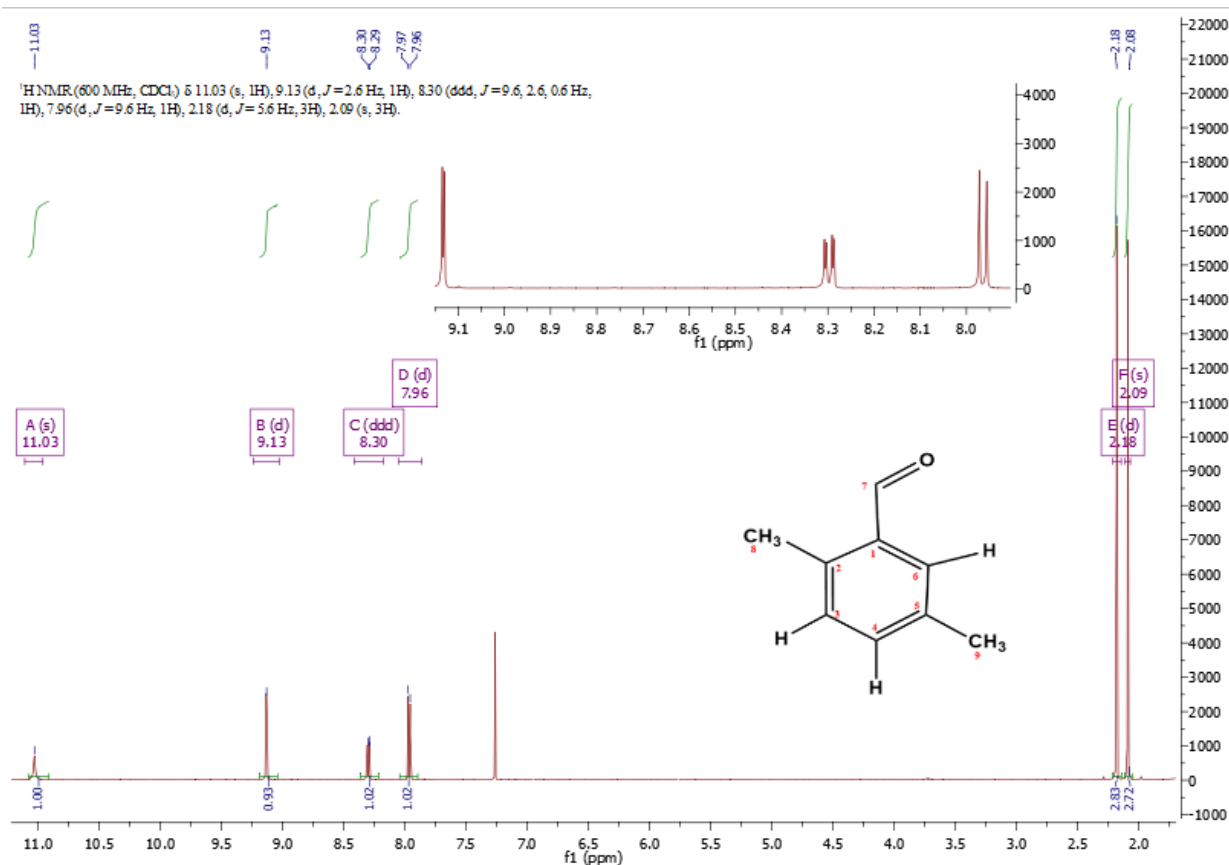


Figura 45. Figura 45. Espectro $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 600 MHz) de compuesto 4, aislado de *Piper marginatum* Jacq.

Con base, en los datos de protón que se han descrito, puede determinarse que el compuesto 4 posee un sistema de anillo aromático trisustituido, dos de ellos correspondientes a grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y el tercero es grupo aldehído. La asignación de la posición de los tres sustituyentes del anillo, queda establecida por las constantes de acoplamiento del sistema spin AMX de los tres protones aromáticos; en primer lugar, el protón 4 posee dos acoplamiento spin-spin con los protones 3 y 6, por un lado, acoplamiento en *orto* ($J= 9.6$) con el protón 3 y luego, acoplamiento *meta* con el protón 6. La simulación con el programa ACDChemketch para un compuesto derivado del

benzaldehído con dos grupos metilos, uno en posición 2 y otro en posición 5, se obtuvo un espectro de ^1H RMN simulado, cuyas señales coinciden con los desplazamientos químicos de las señales del espectro experimental del compuesto 4.

Con base en esta información y la descrita en la bibliografía química (Venkoji, 1984), se identificó al compuesto 4 como **2,5-dimetilbenzaldehido**.

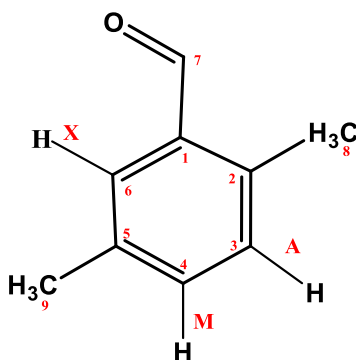


Figura 46. Sistema de spin AMX de protones aromáticos para el compuesto 4.

5.3 Evaluación de la actividad insecticida de los aceites esenciales de las tres plantas anisadas.

En la literatura se encuentran investigadores como (Muñoz V. & Stachenco, 2014) y (Arias P, y otros, 2017), que han desarrollado estudios de bioensayos con aceites esenciales en especies (insectos) en estado tanto, larvario y adulto; los resultados de evaluación biológica afirman, que ésta, depende de los componentes mayoritarios presentes. Así mismo, estos autores señalan la necesidad ambiental que representan los aceites esenciales extraídos de plantas pertenecientes a familias taxonómicas promisorias de diferentes orígenes del mundo para realizar ensayos de tipo: anti-alimentarios, repelente, larvicida e insecticida con insectos en estado adulto en vista de los pocos análisis reportados. (Andrade Ochoa, Sánchez-Torres, Nevárez-Moorillón, Camacho, & Noguera Torres, 2017)

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en los ensayos preliminares de evaluación biológica de esta investigación, los datos que revela la actividad insecticida que poseen los aceites esenciales de las especies de planta en estudio; el procedimiento se sigue tal como se describe en el apartado 4.9.3. Los resultados obtenidos en la evaluación preliminar de la actividad insecticida, dieron información que evidencia a los aceites esenciales son “promisores biológicos en el ataque insecto-plaga” como lo menciona (López Belchi, 2008).

El ensayo preliminar demostró que a una concentración de 23 mg/ml de cada uno de los extractos obtenidos, se lograba mortalidad de los tres insectos evaluados, los resultados se presentan en la tabla 11. Tal como se describe en el apartado 4.9.4, con los resultados positivos del ensayo preliminar, se procedió a evaluar el efecto de la concertación sobre los insectos.

En las tablas 12, 13 y 14 se muestran los resultados de los ensayos de *Tagetes filifolia* Lag, *Piper auritum* Kunth y *Piper marginatum* Jacq respectivamente sobre *S. zeamais*, *K. flavicollis* y *D. frontalis*. En las tablas se muestran el número de insectos muertos en cada repetición, así como la media y desviación estándar.

Tabla 11. Resultados de la evaluación de la actividad insecticida de los aceites esenciales extraídos




Insecto evaluado	0.5 μ L de aceite esencial	Concentración (mg/ml)	Resultado
 <i>Sitophilus zeamais</i>	<i>Tagetes filifolia</i> Lag	23.0	+
	<i>Piper auritum</i> Kunth		+
	<i>Piper marginatum</i> Jacq		+
 <i>Dendroctonus frontalis</i>	<i>Tagetes filifolia</i> Lag	23.0	+
	<i>Piper auritum</i> Kunth		+
	<i>Piper marginatum</i> Jacq		+
 <i>Kaloterme flavicollis</i>	<i>Tagetes filifolia</i> Lag	23.0	+
	<i>Piper auritum</i> Kunth		+
	<i>Piper marginatum</i> Jacq		+

Tabla 12. Evaluación de la actividad insecticida de *T. filifolia* Lag sobre *S. zeamais*, *D. frontalis* y *K. flavicollis*.

		[mg/ml]	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	$\bar{x} \pm s$
<i>S. zeamais</i>	C ₁	23.1	8	9	8	8.3 \pm 0.6
	C ₂	21.9	8	8	9	8.3 \pm 0.6
	C ₃	20.9	8	7	9	8.0 \pm 1.0
	C ₄	19.8	7	7	8	7.3 \pm 0.6
	C ₅	18.8	7	6	7	6.7 \pm 0.6
<i>D. frontalis</i>	C ₁	23.1	8	8	7	7.7 \pm 0.6
	C ₂	21.9	7	6	8	7.0 \pm 1.0
	C ₃	20.9	7	7	7	7.0 \pm 0.0
	C ₄	19.8	7	6	7	6.7 \pm 0.6
	C ₅	18.8	5	7	5	5.7 \pm 1.2
<i>K. flavicollis</i>	C ₁	23.1	9	9	10	9.3 \pm 0.6
	C ₂	21.9	9	8	9	8.7 \pm 0.6
	C ₃	20.9	8	8	9	8.3 \pm 0.6
	C ₄	19.8	7	7	7	7.0 \pm 0.0
	C ₅	18.8	7	7	5	6.3 \pm 1.2

Al evaluar los resultados del aceite esencial de *Tagetes filifolia* Lag (tabla 12), se observa que es letal en las cinco concentraciones de estudio sobre las tres especies de insectos evaluadas, en la figura 47 se grafican los resultados obtenidos.

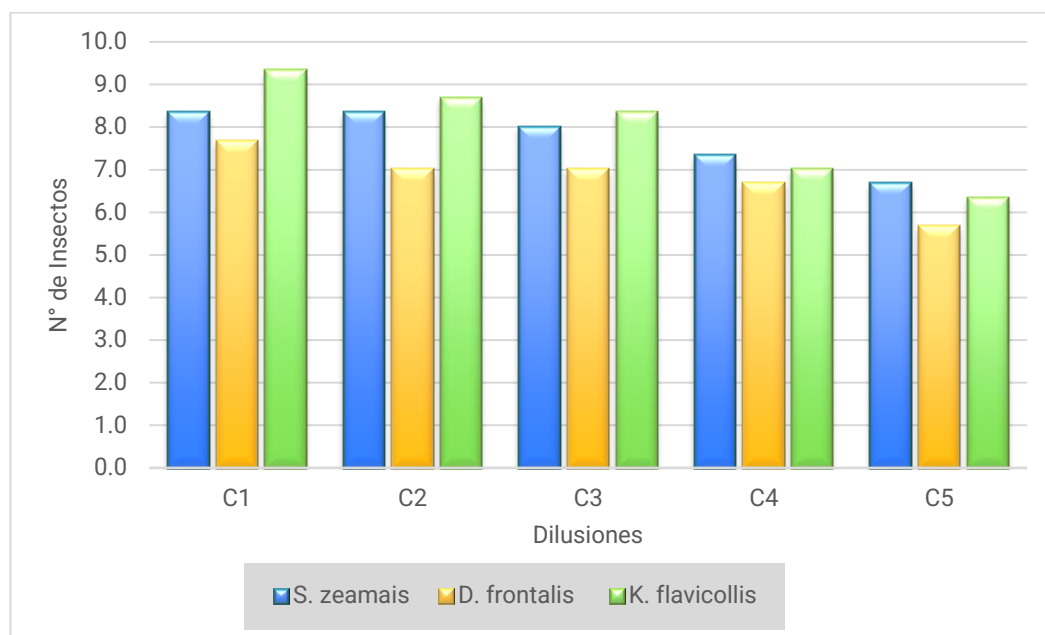


Figura 47. Evaluación de la actividad insecticida de *T. filifolia* Lag sobre *S. zeamais*, *D. frontalis* y *K. flavicollis*.

Por otro lado, los resultados de *Piper auritum* Kunth (tabla 13), muestran que los tres aceites esenciales estudiados presentan una excelente actividad insecticida sobre los tres insectos.

Tabla 13. Evaluación de la actividad insecticida de *P. auritum* Kunth sobre *S. zeamais*, *K. flavicollis* y *D. frontalis*.

		[mg/ml]	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	$\bar{x} \pm s$
<i>S. zeamais</i>	C ₁	24.3	7	5	8	6.7 ± 1.5
	C ₂	23.3	8	8	7	7.7 ± 0.6
	C ₃	22.2	7	8	6	7.0 ± 1.0
	C ₄	21.1	8	8	9	8.3 ± 0.6
	C ₅	20.0	8	9	8	8.3 ± 0.6
<i>D. frontalis</i>	C ₁	24.3	7	8	7	7.3 ± 0.6
	C ₂	23.3	6	6	5	5.7 ± 0.6
	C ₃	22.2	6	5	7	6.0 ± 1.0
	C ₄	21.1	4	4	4	4.0 ± 0.0
	C ₅	20.0	4	4	5	4.3 ± 0.6
	C ₁	24.3	8	8	8	8.0 ± 0.0

<i>K. flavicollis</i>	C ₂	23.3	8	8	7	7.7 ± 0.6
	C ₃	22.2	7	6	7	6.7 ± 0.6
	C ₄	21.1	7	7	7	7.0 ± 0.0
	C ₅	20.0	6	5	6	5.7 ± 0.6

Sin embargo, hay una disminución de la mortalidad sobre *D. frontalis* en la concentración 21.1 mg/ml (C₄), por debajo de la mitad de individuos evaluados, en la figura 48 se aprecia el descenso en la actividad insecticida a dicha concentración.

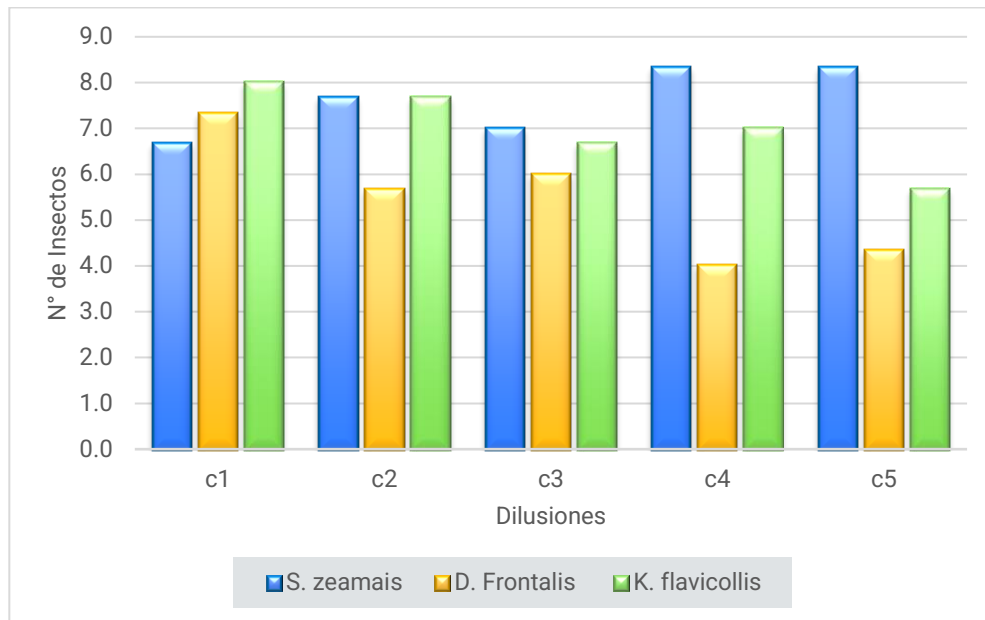


Figura 47. Evaluación de la actividad insecticida de *P. auritum* Kunth sobre *S. zeamais*, *D. frontalis* y *K. flavicollis*.

Finalmente, el estudio del extracto esencial de *P.m* se resumen en la tabla 13. En ella se muestran una excelente actividad sobre los tres insectos. Sin embargo, resalta el efecto sobre la termita (*K. flavicollis*), ya que muestra una mayor actividad sobre ella, matando en todas las concentraciones más de la mitad de insectos evaluados.

En la figura 49 se puede apreciar el efecto del aceite esencial sobre los tres grupos de insectos. Destaca que los insectos con recubrimiento en las alas parecen resistir más el efecto del extracto esencial de *P. marginatum*, pero la termita *K. flavicollis* que carece de dicha defensa, les resulta letal hasta en la concentración más baja.

Tabla 14. Evaluación de la actividad insecticida de *P. marginatum* Jacq sobre *S. zeamais*, *K. flavicollis* y *D. frontalis*.

		[mg/ml]	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	$\bar{x} \pm s$
<i>S. zeamais</i>	C ₁	23.5	7	5	8	6.7 ± 1.5
	C ₂	22.5	7	7	8	7.3 ± 0.6
	C ₃	21.4	6	5	6	5.7 ± 0.6
	C ₄	20.4	5	4	7	5.3 ± 1.5
	C ₅	19.4	4	4	6	4.7 ± 1.2
<i>D. frontalis</i>	C ₁	23.5	7	5	8	6.7 ± 1.5
	C ₂	22.5	5	5	6	5.3 ± 0.6
	C ₃	21.4	6	5	5	5.3 ± 0.6
	C ₄	20.4	4	3	4	3.7 ± 0.6
	C ₅	19.4	4	4	5	4.3 ± 0.6
<i>K. flavicollis</i>	C ₁	23.5	8	8	9	8.3 ± 0.6
	C ₂	22.5	8	10	8	8.7 ± 1.2
	C ₃	21.4	7	7	6	6.7 ± 0.6
	C ₄	20.4	7	6	7	6.7 ± 0.6
	C ₅	19.4	5	5	6	5.3 ± 0.6

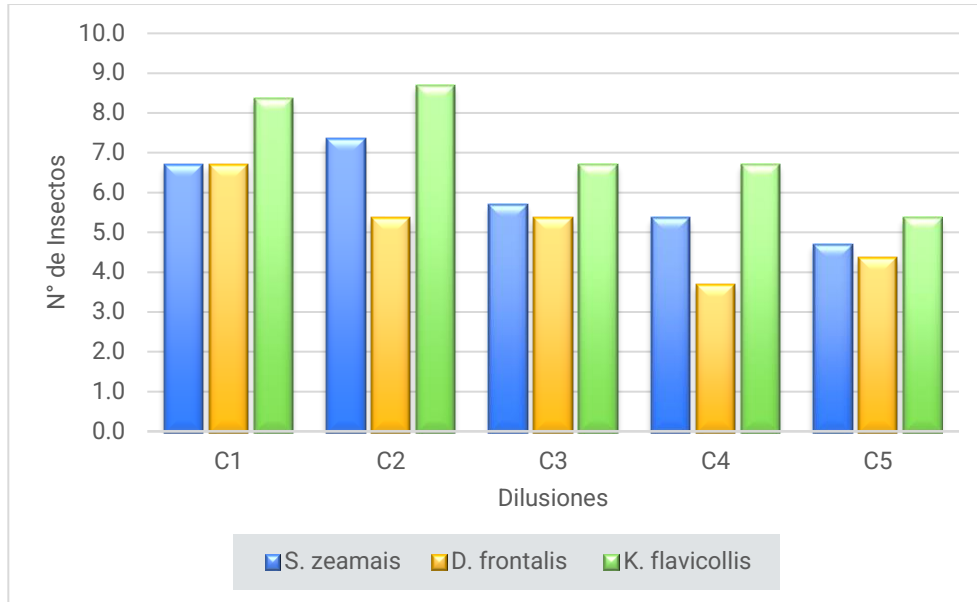


Figura 48. Evaluación de la actividad insecticida de *P. marginatum* Jacq sobre *S. zeamais*, *D. frontalis* y *K. flavicollis*.

5.4 Evaluación estadística de la actividad insecticida de los aceites esenciales de las tres plantas anisadas.

A partir de los datos obtenidos con los bioensayos realizados con los aceites esenciales en los diferentes grupos de insectos, podemos hacernos ciertas preguntas: ¿existe alguna diferencia significativa en cuanto a la evaluación insecticida entre grupos de insectos? ¿existe diferencia significativa en cuanto a la evaluación insecticida entre cada aceite esencial con los tres grupos de insecto? Es decir ¿cuál aceite esencial resulta más efectivo sobre los grupos de insectos?

El análisis ANOVA nos sirve para responder a esas preguntas comparando variables cuantitativas en función de los grupos partiendo de las varianzas obtenidas en los bioensayos.

5.4.1 Estudio del efecto de la concentración del aceite esencial sobre los insectos evaluados.

En el siguiente apartado se realiza un estudio estadístico de los resultados obtenido en la evaluación de la actividad insecticida de tres aceites esenciales sobre tres especies de insectos. En nuestro caso, se realiza una comparación de una variable cuantitativa en más de dos grupos, por lo cual se realizó un análisis de varianza.

Al estudiar los datos de las tablas 12, 13 y 14 se observa que el número de especímenes muertos son similares en la mayoría, por lo que a través un estudio ANOVA se determinó si existen diferencias estadísticas significativas entre las variables de estudio.

Para el estudio ANOVA se estableció un nivel de significancia de 0.05. Los resultados del estadístico se resumen en la tabla 15, obtenido empleando la hoja de cálculo de Excel y la función Análisis de varianza de un factor.

A continuación, se describe el tratamiento estadístico para determinar si hay diferencia significativa en la actividad insecticida de *T. filifolia* entre las concentraciones usadas en el estudio

Tabla 15. Análisis ANOVA para el efecto insecticida de *T. filifolia* sobre *S. zeamais*.

	Suma de cuadrados	gl	Muestra cuadrática	F _{cal}	Significancia	F _{crítico}
Intergrupos	6.27	4	1.57	3.4	0.0548	3.5
Intragrupos	4.67	10	0.47			
Total	10.93	14				

Ya que $F_{0.05(4,10)} = 3.5$ y $F_{cal} = 3.4$. Por lo tanto, $F_{cal} < F_{0.05(4,10)}$, lo que indica que no hay diferencia significativa entre el efecto insecticida y la contracción de aceite esencial de *T. filifolia* sobre *S. zeamais*. De esta forma se ha realizado el análisis de las demás muestras.

A continuación, en la tabla 16 se resume el valor de F_{cal} y $F_{crítico}$ resultado del estudio ANOVA de *T. filifolia* sobre los insectos evaluados.

Tabla 16. Resumen del estudio ANOVA del efecto de *T.f* sobre los insectos.

Insecto	F _{cal}	Significancia	F _{crítico}	Evaluación	Análisis
<i>S. zeamais</i>	3.4	0.0548	3.5	$F_{cal} < F_{0.05(4,10)}$	No hay diferencias
<i>D. frontalis</i>	2.7	0.0949	3.5	$F_{cal} < F_{0.05(4,10)}$	No hay diferencias
<i>K. flavicollis</i>	9.8	0.0017	3.5	$F_{cal} > F_{0.05(4,10)}$	Si hay diferencias

El estadístico ANOVA indica que ninguna de las concentraciones de *T. f.* utilizadas sobre *S. z* y *D. f.* permite diferenciar su efecto sobre la mortalidad; sin embargo, si hay diferencia para el caso de *Kf* en el cual si se aprecia una disminución del efecto correlacionado con la concentración.

Una posible explicación a estos resultados podría estar en la anatomía de *S. zeamais* y *D. frontalis*, ambos coleópteros y por lo tanto poseen élitro (alas endurecidas) que recubren las alas y sirve como protección, dicha característica morfológica está ausente en la termita. Aun así, del estudio realizado sobre ambos insectos podemos rescatar que la concentración de partida para continuar el estudio del efecto de la concentración sobre ellos, debería ser igual o mayor 20 mg/ml desde esa concentración de las diluciones.

El estudio ANOVA realizado para *P. a.*, se realizó de la misma forma que el caso anterior de *T. f.*, en la tabla 17 se resumen los valores de F obtenidos.

Tabla 17. Resumen del estudio ANOVA del efecto de *P.a* sobre los insectos.

Insecto	F_{cal}	Significancia	F_{crítico}	Evaluación	Análisis
<i>S. zeamais</i>	2.0	0.1705	3.5	$F_{cal} < F_{0.05(4,10)}$	No hay diferencias
<i>D. frontalis</i>	13.5	0.0004	3.5	$F_{cal} > F_{0.05(4,10)}$	Si hay diferencias
<i>K. flavivollis</i>	12.5	0.0006	3.5	$F_{cal} > F_{0.05(4,10)}$	Si hay diferencias

El valor de F_{cal} para el ensayo con *S. z.*, indica que nuevamente las concentraciones en este caso de *P. a.* no permite diferenciar su efecto sobre la mortalidad ya que presentan en todos los casos un comportamiento similar: sin embargo, para *D.f* y *K. f* si se aprecia una variación correlacionado con la concentración.

En la tabla 18 se recogen los valores de F obtenidos del estudio ANOVA realizado para el ensayo con *P. m.*, el procedimiento aplicado es el mismo que el caso anterior.

Tabla 18. Resumen del estudio ANOVA del efecto de *P.m* sobre los insectos.

Insecto	F_{cal}	Significancia	F_{crítico}	Evaluación	Análisis
<i>S. zeamais</i>	2.5	0.1048	3.5	$F_{cal} < F_{0.05(4,10)}$	No hay diferencias
<i>D. frontalis</i>	5.3	0.0147	3.5	$F_{cal} > F_{0.05(4,10)}$	Si hay diferencias
<i>K. flavivollis</i>	10.5	0.0013	3.5	$F_{cal} > F_{0.05(4,10)}$	Si hay diferencias

Según los valores de F_{cal} , de nuevo el *S.z* no presenta diferencias significativas entre sus valores, pero si lo hay sobre el efecto causado en *D.f* y *K. f*.

5.4.2 Evaluación de la eficiencia insecticida de los aceites esenciales aislados

A continuación, se realiza un estudio ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo, para determinar la eficiencia del aceite esencial como agente insecticida ya que no es claro sobre cuál insecto es más letal. Por lo tanto, se evaluó si el número de insectos muertos por ensayo, se ve afectada por el tipo de insecto (factor 1), por las concentraciones empleadas (factor 2) o por la interacción entre ellas. El análisis estadístico se realizó en Excel, empleando la herramienta Análisis de datos, análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo y un nivel de significancia de 5% ($\alpha = 0.05$).

Para el caso de *T.f.*, los resultados indica que para el factor 1 (insectos) $F_{\text{cal}} > F_{0.05(2,30)}$, el factor 2 (concentraciones) $F_{\text{cal}} > F_{0.05(4,30)}$, y que la interacción entre ambos factores su $F_{\text{cal}} < F_{0.05(8,30)}$, tal como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Resumen de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para T.f sobre tres especies de insectos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F_{cal}	p	F_{crítico}
Insectos	10.97	2	10.74	0.000303	3.32
Concentraciones	27.91	4	13.65	1.88×10^{-6}	2.69
Interacción	3.02	8	0.74	0.6567	2.27
Dentro del grupo	15.33	30			
TOTAL	57.23	44			

Por lo tanto, el tipo de insecto y la concentración si influyen en la actividad insecticida, sin embargo, la interacción entre ellos no presenta un efecto observable.

Lo anterior nos genera otra pregunta, ¿Cómo varían estos factores en los resultados?, la respuesta la obtenemos mediante un análisis de regresión en el caso de *T.f.* la actividad insecticida aumenta conforme la concentración, habiendo mayor correlación entre las variables para *D.f.* ver figura 50, en la cual se observa el comportamiento de las muestras y su correspondiente ecuación de línea recta y su regresión lineal.

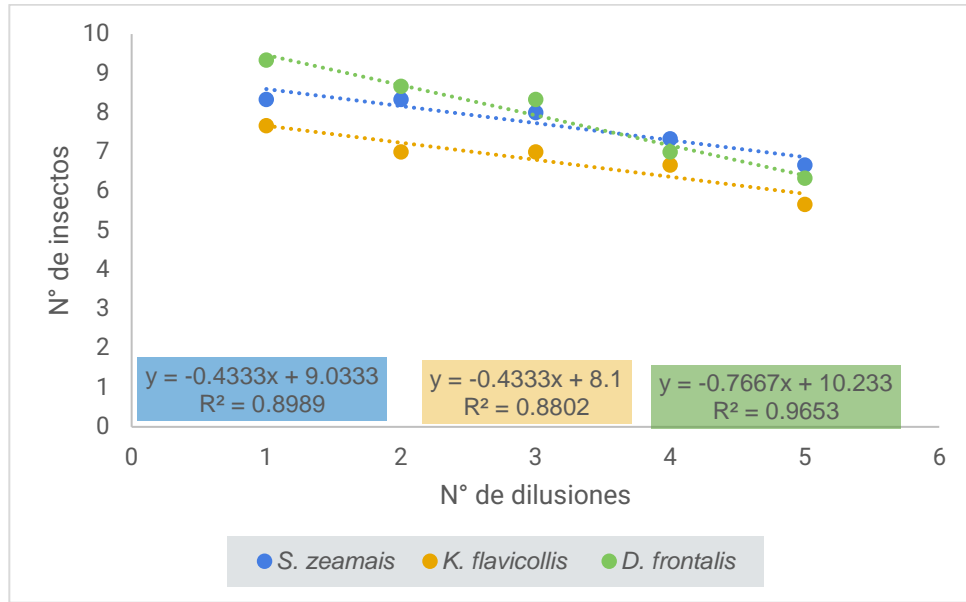


Figura 49. Actividad insecticida de *T.f* sobre tres insectos.

La pendiente de la ecuación mide la sensibilidad o efectividad insecticida de los aceites esenciales sobre cada insecto. En el caso de *T.f* resulta más efectivo en *K.f*. posiblemente por los aspectos morfológicos ya mencionados.

El mismo tratamiento se realizó a los de *P.a* y *P. m.* y en las tablas 20 y 21, respectivamente se recogen los resultados.

En el estudio de *P.a* tenemos que para el factor 1 (insectos) $F_{cal} > F_{0.05(2,30)}$, el factor 2 (concentraciones) $F_{cal} > F_{0.05(4,30)}$, y que la interacción entre ambos factores su $F_{cal} > F_{0.05(8,30)}$, tal como se muestra en la tabla 20.

Tabla 20. Resumen de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para *P.a.* sobre tres especies de insectos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F_{cal}	p	$F_{crítico}$
Insectos	36.31	2	37.14	7.66×10^{-9}	3.32
Concentraciones	8.31	4	4.25	0.0076	2.69
Interacción	30.36	8	7.76	1.35×10^{-5}	2.27
Dentro del grupo	14.67	30			
TOTAL	89.64	44			

Lo que indica que tanto el insecto, la concentración y la interacción entre ambos factores tienen efecto sobre la actividad insecticida; sin embargo, al observar el gráfico de regresión lineal, figura 51, podemos observar un comportamiento anómalo en los resultados sobre *S. zeamais*, los cuales afectan el estudio comparativo.

Aun así, los resultados muestran que nuevamente la actividad insecticida efectiva sobre *K.f* y *D. f.* en este caso, indica mayor efectividad sobre *K.f*.

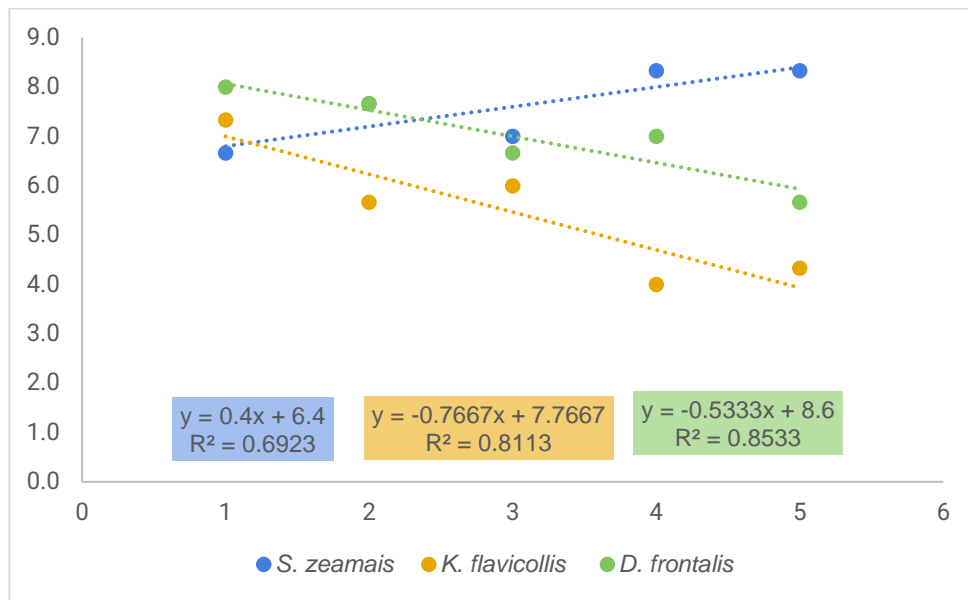


Figura 50. Actividad insecticida de *P.a.* sobre tres insectos.

En el caso de *P.m.* los resultados de ANOVA indican que para el factor 1 (insectos) $F_{cal} > F_{0.05(2,30)}$, el factor 2 (concentraciones) $F_{cal} > F_{0.05(4,30)}$, y que la interacción entre ambos factores su $F_{cal} > F_{0.05(8,30)}$, tal como se muestra en la tabla 21.

Tabla 21. Resumen de análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo para *P.m.* sobre tres especies de insectos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	F_{cal}	p	$F_{crítico}$
Insectos	32.31	2	18.64	5.47×10^{-6}	3.32
Concentraciones	43.47	4	12.54	4.11×10^{-6}	2.69
Interacción	8.13	8	1.17	0.35	2.27
Dentro del grupo	26	30			
TOTAL	109.91	44			

Con los valores de F comparados podemos decir que el tipo de insecto y la concentración si influyen en la actividad insecticida de *P.m*; sin embargo, la interacción entre ellos no presenta un efecto observable. En la Figura 52, al comparar las pendientes de las respectivas ecuaciones, destaca que la efectividad insecticida es mayor para *K. f*. Pero la correlación entre las variables es mejor para *D.f*.

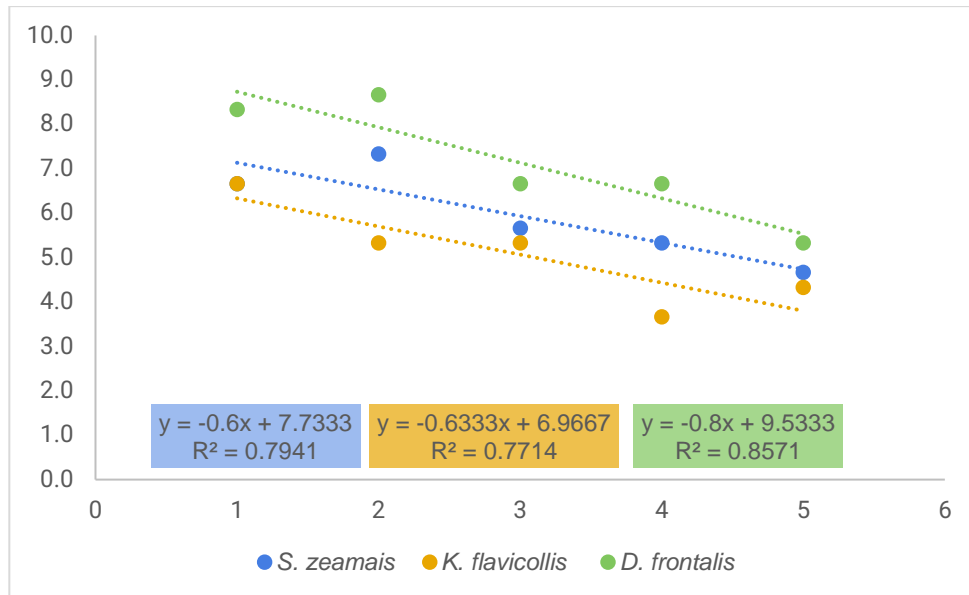
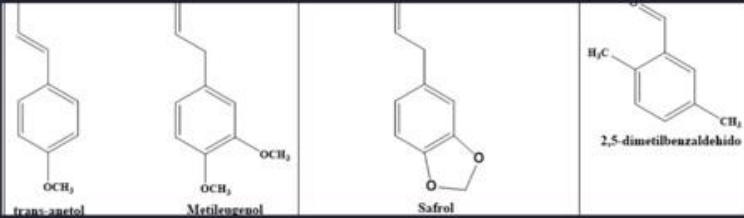


Figura 51. Actividad insecticida de *P.m.* sobre tres insectos.

La correlación observada entre las variables, mortalidad de insectos y concentración son directamente proporcionales y nos indican que la relación entre los datos es aceptable.

CAPITULO VI



CONCLUSIONES

6.0 Conclusiones.

1. Se extrajeron los aceites esenciales de tres plantas aromáticas: *Tagetes filifolia*, *Piper auritum* y *Piper marginatum*. Los rendimientos de aceite respecto al material de partida fueron: 10.41%, 9.46% y 8.25% respectivamente.
2. Por el método de cromatografía de capa fina preparativa (PLC) de los aceites esenciales, se identificó y separó cuantitativamente, un total de cuatro compuestos de tipo fenilpropanoides: *Tagetes filifolia*, compuesto 1 (peso: 29.44 mg, Rf 0.7), *Piper auritum* compuesto 2 (peso: 28.51 mg, Rf 0.9); compuesto 3 (peso: 22.43 mg, Rf 0.8) y *Piper marginatum*, compuesto 4 (peso: 25.5 mg, Rf 0.45).
3. Mediante métodos de espectroscopia de Infrarrojo (IR) y de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H), se determinó las estructuras de cuatro compuestos naturales de los aceites esenciales: Compuesto 1, trans-anetol; compuesto 2, Safrol; compuesto 3, metil-eugenol y compuesto 4, 2,5-dimetilbenzaldehido. La determinación estructural se describe en el apartado de resultados y discusión de resultados.
4. A partir de la evaluación biológica realizada se logró evidenciar que los aceites esenciales de las tres plantas anisadas presentan actividad insecticida. Esto se refleja en términos cuantitativos; ya que, según el análisis de varianza realizado, se demostró el efecto sobre las tres especies de insecto evaluados. Dichos resultados son congruentes con los metabolitos secundarios aislados en este estudio, ya que estos tienen confirmada actividad insecticida. Por otra parte, los datos de ANOVA confirman el efecto diferenciado según el aceite esencial empleado y la especie de insecto evaluada. Siendo en la mayoría de los casos más efectiva sobre la termita *Kaloterme flavicollis*, por carecer de alas protectoras.
5. La regresión lineal de cada aceite esencial confirma la efectividad del aceite esencial es directamente proporcional a la concentración ya que, aumenta a medida aumenta la concentración observándose ese patrón (efectividad insecticida), para los tres aceites esenciales la correlación es más precisa para *Dendroctonus frontalis* (D.f.).

CAPITULO VII



RECOMENDACIONES

7.0 Recomendaciones

- Utilizar técnicas de laboratorio verdes en el proceso de extracción de aceites esenciales de las partes de material vegetal aéreo.

- Dar seguimiento al aislamiento y elucidación de metabolitos secundarios de las plantas anisadas que se encuentren en mayor o menor proporción.

- Considerar llevar a cabo evaluaciones biológicas con compuestos puros y con ello establecer parámetros amplios para mayor número de bioensayos

- Obtener un CL50 que permita establecer la dosis preliminar efectiva a partir de bioensayos con compuestos aislados

- Ampliar el estudio de otras especies de la flora salvadoreña que permitan enriquecer el área de productos naturales con material vegetal nativo con nuevas moléculas de interés en la búsqueda de propuestas que solventen problemas ambientales y de salud humana.

CAPITULO VIII



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8.0 Referencias Bibliográficas.

8.1 Bibliografía

- Agüero Cabrera, M. (2008). Determinación de la efectividad del caisimón de anís *Piper auritum* Kunth en variantes de secado contra *Sitophilus oryzae* (L.) . Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- Aizpurua-Olaizola, O. S. (2016). Evolution of the cannabinoid and terpene content during the growth of *Cannabis sativa* plants from different chemotypes. *Journal of natural products* , 79(2), 324-331.
- Albarracín Montoya, G. C., & Gallo Palma, S. G. (Diciembre de 2003). Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando *Piper aduncum* (Cordoncillo) procedente de la zona cafetera. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Colombia.
- Alonso De La Paz, F. J. (1999). Todas las hierbas medicinales. . ACATA. Madrid.
- Alonso, M. J.-N. (1992). Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas plantas con pulegona: *Mentha pulegium* L. *Mentha cervina* (L.) Fresen. . *Botanica complutensis*, (17), 79-86.
- Ambiente, M. d. (7 de Febrero de 2017). *Científicos Alemanes apoyarán en el combate de la plaga del gorgojo descortezador de pino*. Obtenido de Portal de Transparencia: <https://www.marn.gob.sv/cientificos-alemanes-apoyaran-en-el-combate-de-la-plaga-del-gorgojo-descortezador-de-pino/>
- Araújo, J. P. (2012). Estudio químico da Lavanda luisieri. Doctoral dissertation.
- Arias P, J., Silva A, G., Figueroa C, I., Fischer G, S., Robles-Bermúdez, A., Rodríguez-Maciél, J. C., & Lagunes-Tejeda, A. (2017). Actividad Insecticida, Repelente y Antialimentaria del Polvo y Aceite Esencial de Frutos *Schinus molle* L. para el control de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* , ISSN 0719-3890.
- Ávila, M., Delgado, W., & Cuca, L. (2018). *Plantas de la Familia Poperaceae del Sumaz Medio y Bajo Occidental*. Universidad de Cundinamarca.

- Baier, A. H. (1992). Control of *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) in *Phaseolus vulgaris* L. seed stored on small farms—I. Evaluation of damage. *Journal of Stored Products Research*, 28(4), 289-293.
- Bakkali, F. A. (2008). Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- Bayramoglu, B., & Shain, S. y. (2008). Solvent-free Microwave extraction of essential oil From . *Journal of Food Engineering* , 88:535-540.
- Becerra Palma, M. E. (2014). *Costumbres y prácticas que utilizan los agentes de la medicina ancestral y su relación en la salud de los moradores, en la parroquia Chinga recinto Chigüe de la provincia de Esmeraldas*. Obtenido de <https://repositorio.pucese.edu.ec/handle/123456789/304>
- Benítez, N. P. (2007). Actividad in vitro anti-candida y anti-aspergillus de aceites esenciales de plantas de la familia piperaceae. *Scientia et Technica*, 1(33), 247-249.
- Bernard, C. B. (1989). Effect of lignans and other secondary metabolites of the Asteraceae on the mono-oxygenase activity of the European corn borer. *Phytochemistry*., 28(5), 1373-1377.).
- Bernard, C. H.-V. (1995). Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. *J. Chem. Ecol.*, 21(6):801-814.
- Billings, R., & Espino Mendoza, J. (2005). *El Gorgojo Descortezador del Pino (Dendroctonus frontalis) en Centroamérica. Cómo Reconocer, Prevenir y Controlar Plagas*. Corporación Hondureña de Desarrollo Forestal.
- Boland, D. J. (1991). Eucalyptus leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing.
- Bonilla R., P., Lozano R., N., Arroyo A., J., & Beltran S., H. (2008). Efecto sobre la gravidez, la Prolactina y hormonas sexuales en ratas del subextracto metanólico de hojas de *Tagetes Filifolia* Lag. "Anisillo". *Ciencia e Investigación, Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM: ISSN 1561-0861*.
- Boza, H. S. (1985). Problemática de *Piper aduncum* L. sl en Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional.* , 51-54.).

- Braca, A. S. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia.*, 79(2), 123-125.)
- Breitmaier, E. (2006). Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. *John Wiley & Sons.*
- Buchbauer, G. J. (1993). Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82(6), 660-664.
- Camarillo, G., Ortega, L. D., & Serrato, M. A. (2009). Actividad Biológica de *Tegetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35 (2): 177-184.
- Castellanos, I., & Espinosa García, F. (1997). Plant Secondary Metabolite diversity as a resistance trait against Insects: a test With *Sitophilus granarius* (Coleoptera Curculionidae) and seed Secondary Metabolites. *Biochemical Systematic and Ecology*, 25:591-602.
- Cavalli, J. F. (2004). Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochemical Analysis*, 15(5), 275-279.
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Delgado, W., & Cuca, L. (2008). *Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae*. Vol. 26 no.1 Bogotá: Una revisión. Agron. Colombiana.
- Céspedes, C., & J.S. Calderón, L. L. (2000). Growth effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *J. Agr. Food Chem.*, 48: 1903-1908.
- Chalchat, J. C. (2008). Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chemistry.*, 110(2), 501-503.
- CRC Press. Scott, I. M.-V. (2005). Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp extracts. *Journal of agricultural and food chemistry.*, 53(6), 1907-1913.
- Cronquist, A. (1988). The Evolution and Classification of Flowering. *Botanical Garden*, pp. 551-560.

- Croteau, R. K. (2000). Natural products (secondary metabolites). . *Biochemistry and molecular biology of plants* , 24, 1250-1319.
- Da Silva, J., da Trindade, R., Sabrina Alves, N., P.L., F., & S. Maia, J. y. (2017). Aceites Esenciales de Especies de Gaitero Neotropicales y sus Actividades Biológicas. *Int J Mol Sci. Doi:10.3390/ijms18122571*, 18, 2571.
- Da Silva, M. H. (1999). The essential oils of *Lantana camara* L. occurring in North Brazil. *Flavour and fragrance journal*, 14(4), 208-210.
- Daíse L. L., A. D. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69: 1732.
- De Carvalho, C. C. (2006). Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry* , 95(3), 413-422.
- De Feo, V., Della Porta, G., Urrunaga Soria, E., Urrunaga Soria, R., & Senatore, F. (1998). Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. *Flavour and Fragrance Journal*, 145-147.
- De Paula, V. F. (2000). D. & Picanco, MC Synthesis and insecticidal activity of new amide derivatives of piperine. *Pest Manag. Sci.*, 56, 168-174.
- Debboun, M. F. (2006). Insect repellents: principles, methods, and uses.
- Delgado, W. A. (2007). COMPOSICIÓN “N QUÃ MICA del aceite esencial de los frutos de *Piper hispidum* Kunth. *Revista Productos Naturales.*, 1(1), 5-8.
- Demirci, B. H. (2003). Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(2), 116-121.
- Dev, S. &. (1997). Insecticides of natural origin Harwood Academic Publishers Amsterdam. p.365.
- Dewick, P. M. (2002). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. *John Wiley & Sons*.
- Díaz, H. (2004). Así curan las plantas. Guía Médica Natural. 1ª Edición. Mundo, Cultural. Bogotá, Colombia. 72 pp.

- Díaz, L. M. (Noviembre de 2007). Estudio de los metabolitos secundarios aislados de *Maytenus segoviarum* y *Cassine xylocarpa*. <http://ri.ues.edu.sv/8760/2/19200923.pdf>. Universidad de EL Salvador: 29:39.
- Dzib Zumárraga, W., & Martínez, A. (16 de 11 de 2018). *Flora Medicinal Indígena de México*. Obtenido de Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora/flora_principal.php?l=l&po=po&clave_region=clave_region
- E., E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp. Biochem Physiol C*, 130:325–337.
- EE., E. (2005). Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. . *Arch Insect Biochem Physiol*, 56:161–171.
- Elías Molina, R., & Suárez Palacios, J. (2007). “Etnofarmacopea del municipio La Laguna, departamento de . *Universidad de El Salvador, San Salvador*, p. 2.
- Enan, E. (2001). Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* , 130(3), 325-337.
- Fidy, K. F. (2016). β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer medicine*, , 5(10), 3007-3017. .
- Figueroa Soliz, N., Estevez Martini, T., & Giménez Turba, A. (1995). Propiedades antibacterianas, antimicóticas e insecticidas de aceites esenciales de especies vegetales aromáticas nativas. *Biofarbo*, 51-62.
- Flores Licea, M. (2009). Usos medicinales de la hoja santa o *Piper auritum* Kunth. . *TlahuiEdu Ac*, ITIS-TSN: 504403.
- Flores Quisbert, E. (2007). Metabolitos Secundarios Bioactivos de Especies del Género *Piper* de la Flora Boliviana. *Dialnet*, 387.
- García Ríos, A., Leyva, M., Martínez M, J., & Stashenko, E. (2007). Determinación de la Composición Química y Actividad Antioxidante in Vitro del Aceite Esencial de *Piper Auritum* Kunth (Piperaceae) Difundida en La Costa Colombiana . *Scientia et Technica*, ISSN 0122-1701 .

- García, A. y. (2007). Determinación de la Composición química y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Piperaceae) difundida en la Costa Colombiana . Universidad Tecnológica de Pereira .
- Gbewonyo, W. S. (1993). Structure-activity relationships of insecticidal amides from *Piper guineense* root. *Pesticide science.*, 37(1), 57-66.
- Gersdoeff, W. &. (1957). Comparative Effects of Piperettine in Pyrethrum and Allethrin Mixtures as House Fly Sprays. *Journal of Economic Entomology*, 50(2), 164-6.
- Golding, B. T. (1982). Turmerones: isolation from turmeric and their structure determination. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications.*, (6), 363-364.
- Golmakani, M. R. (2008). Comparison of Microwave-assisted Hydrodistillation with the traditional Hydrodistillation Method in the Extraction of essential oil from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry* , 109:925-930.
- Gráfica, L. P. (8 de Febrero de 2017). *Científicos alemanes apoyarán al MARN y al MAG*. Obtenido de <https://www.laprensagrafica.com/elsalvador/Cientificos-alemanes-apoyaran-al-MARN-y-al-MAG-20170208-0094.html>
- Gufta, M., & Arias, T. D. (1985). Safrole, The Main Component Of The Essential Oil From *Piper Auritum* Of Panama. *Journal of Natural Products*, Vol. 48, No. 2, pp. 330-343.
- Gúzman, J. (2016). Folk medicine, phytochemistry and pharmacological application of *Piper marginatum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.03.014> .
- Harada, A. Y., Andrade, E., Maia, J., & Souto, R. (2012). Activity of *Piper* Essential Oils from the Amazon Against the Fire Ant *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) *Neotrop Entomol* . DOI: 10.1007 / s13744-012-0080-6.
- Hernández Reyes, E. (2016). *Evaluación de extractos de Daphne gnidium, Ruta Chalepensis, Piper auritum; para el control de Mosquita Blanca (Bemisia tabaci Gennadius) en Manzano en Huachichil, Arteaga, Coahuila, México*. Saltillo, Coahuila, México.: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro .

- Hodgson, E. &. (1999). Interactions of piperonyl butoxide with cytochrome. . *In Piperonyl butoxide and Academic Press.*, P450. and (pp. 41-II).
- Humana Press. MacKinnon, S. C.-M. (1997). Botanicals from the Piperaceae and Meliaceae of the American neotropics. . *Phytochemistry*.
- Hwang, Y. S. (1985). Isolation and identification of mosquito repellents in *Artemisia vulgaris*. *Journal of Chemical Ecology*, 11(9), 1297-1306.
- Isman. (1997). Neem and other botanical insecticides: barriers to commercialization. *Phytoparasitica*, 25:339–344.
- Isman, M. B. (1999). Neem and related natural products. In *Biopesticides: use and delivery. Biopesticides: Use and Delivery* , (pp. 139-153).
- Jacquin, N. (2 de Junio de 2016). *Trópicos.org*. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/25001136?langid=66>
- Jensen, H. R. (2006). The effect of a synergistic concentration of a *Piper nigrum* extract used in conjunction with pyrethrum upon gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Insect molecular biology.*, 15(3), 329-339.
- Joshi, M. M. (2001). The Future Role of Pesticides in US . *Agriculture, Board of Agriculture and Natural Resources and Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences.* , 137(3), 373-375.
- Kar, S. G. (2018). Essential Oils: Biological Activity Beyond Aromatherapy. *Natural Product Sciences*, 24(3), 139-147.
- Kéita, S. M. (2000). Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae). *Journal of stored products Research*, 36(4), 355-364.
- Kimbaris, A., Siatis, N., Daferera, D., & Tarántilis, P. P. (2006). Comparison of Distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2004.12.001>, 13:54-60.
- Kunth, K. (2 de Junio de 2016). *Trópicos.org*. Obtenido de <http://www.tropicos.org/Name/25002010?langid=66>

- Lagasca y Segura, M. (2 de Junio de 2016). *Trópicos.org*. Obtenido de Missouri Botanical Garden, St. Louis.: <http://www.tropicos.org/Name/2711482?langid=66>
- López Belchi, M. (2008). *Toxicidad Volatil de Monoterpenoides y Mecanismos Bioquímicos en Insectos Plaga de Arroz Almacenados*. Murcia .
- López, S., López, M., Aragón, L., Tereschuk, M., Slanis, A., Feresin, G., . . . Tapia, A. (2011). Composición y actividad anti-insecto de aceites esenciales de especies de *Tagetes L.* (Asteraceae, Helenieae) en *Ceratitis capitata* Wiedemann y *Triatoma infestans* Klug. *Agricultural and food Chemistry*, 5286–5292.
- Lydon, J. &. (1989). The potential of pesticides from plants. *Herbs, spices, and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture, and pharmacology (USA)*.
- Mahmoud, S. S. (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8915-8920.
- Mbata GN, O. O. (1995). Insecticidal action of preparation from the brown pepper, *Piper guineense* Schum, seeds to *Callosobruchus maculatus* (Fabricius). *Discov Innov.* , 7:139–142.
- McFerren, M. A. (2002). In vitro neuropharmacological evaluation of piperovatine, an isobutylamide from *Piper piscatorum* (Piperaceae). *Journal of ethnopharmacology.*, 83(3), 201-207.
- Miyakado, M. N. (1980). Insecticidal joint action of pipericide and co-occurring compounds isolated from *Piper nigrum L.* *Agricultural and Biological Chemistry.*, 44(7), 1701-1703.
- Miyazawa M, W. H. (1997). Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a p-menthane skeleton. *J Agric Food Chem*, 45:677–679.
- Mizrain, H. Q.; Gómez, L.; Chable, C.; Rojas, E.; Medrano, P.; González, R.; and Ávila, D. (10 de Octubre de 2016). *Tamizaje fitoquímico*. Obtenido de https://www.academia.edu/25502053/TAMIZAJE_FITOQUIMICO?auto=download
- Monzonte, L., García, M., Montalvo, A. M., Scull, R., & Miranda, M. M. (2010). Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memórias de Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 168-173.

- Moraes, M., G. da Silva, T., da Silva, R., & Ramos, C. (2014). Circadian variation of essential oil from *Piper marginatum* Jacq. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y Aromáticas*, 270-277.
- Muñoz Acevedo, A. C. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et technica*, 13(33).
- Muñoz V., J., & Stachenco, O. D. (2014). Actividad insecticida del aceites esenciales nativas contra *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 198-202.
- Murray B. Isman, C. M. (2006). *Naturally Occurring Bioactive Compounds. Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization*. Elsevier B.V. All rights reserved.
- Najdoska, M. B. (2010). TLC and GC-MS analyses of essential oil isolated from Macedonian . *Foeniculi fructus. Macedonian pharmaceutical bulletin*, 56(1, 2), 29-36.
- Nemeth, E. (2005). Essential oil composition of species in the genus *Achillea*. *Journal of essential oil research*, 17(5), 501-512.
- Nerio, L. S.-V. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource technology*, 101(1), 372-378.
- Okorie, T. G. (1992). Effects of extracts and suspensions of the black pepper *Piper guineense* on the immature stages of *Aedes aegypti* (Linn)(Diptera: Culicidae) and associated aquatic organisms. *Discovery and Innovation*, 4(3), 59-63.
- Ortiz, D., Posada, S., & Noguera, R. (2014). *Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes*. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Ricardo_Rosero_Noguera/publication/287240114_Effect_of_plant_secondary_metabolites_on_methane_enteric_emission_in_ruminants/links/575c030108ae9a9c9556feb7/Effect-of-plant-secondary-metabolites-on-methane-enteric-emissi
- Parmar, V. S., Subhash, C. J., Bisht, K., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., . . . Boll., C. O. (1997). Phytochemistry of the genus *Piper*. . *Phytochem*, 46 (4), 597-673.

- Parra, J. (2011). *Contribución al estudio fitoquímico de la parte aérea de Piper cf. cumanense Kunth (piperaceae)*. Bogotá D.C. : Universidad Nacional De Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química.
- Pascual-Villalobos MJ, B.-A. M. (2003). Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus*. *Biochem System Ecol*, 31:673–679.
- Peana, A. T. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(8), 721-726.
- Perakis, C. L. (2005). Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *Journal of Food Engineering.*, 71(4), 386-393.)
- Peredo Luna, H., Palou García, E., & López Malo, A. (2009). Aceites esenciales: Métodos de extracción. *Universidad de las Américas Puebla, México*, 24-31.
- Pérez C., A. A., & JL., C. (2001). *Adsmia aegiceras*: antimicrobial activity and chemical study. *Phytopharmacol*, 8(5):389-94.
- Pérez C., A. C. (1993). Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol. J Phytopharmacol*, 39:119-28.
- Pérez, C. J. (1999). The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): Chemical composition and antimicrobial activity test. *J. Ethnopharmacol. J Phytochem*, 66:91-6.
- Pessoa, L. M. (2002). Anthelmintic activity of essential oil of *Ocimum gratissimum* Linn. and eugenol against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology.*, 109(1-2), 59-63.
- Pichersky, E. N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, 311(5762), 808-811.
- Pineda M., R., Vizcaíno P., S., García P, C., & Gil G, J. y. (2012). Composición Química y Actividad Antifúngica de *Piper Auritum* Kunth y *Piper Holtonii* C. Dc. Contra Hongos Fitopatógenos. *Revista Chilena de Investigación Agropecuaria*, doi.org/10.4067/S0718-58392012000400008.
- Robacker, D. C. (1977). Neral and geranial: components of the sex pheromone of the parasitic wasp, *Itopectis conquisitor*. *Journal of Chemical Ecology*, 3(5), 563-577.

- Rodríguez Torres, L. (2019). *Actividad Insecticida del Aceite Especial de Pampa Anís (Tagetes filifolia Lag.) Sobre el Gorgojo del Maíz (Pagiocerus frontalis)*. Universidad Nacional del Antiplano, Puno, Perú: Tesis doctoral.
- Rubinson, K. R. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Edición en Español, Pearson Educación.
- Ryan MF, B. O. (1988). Plant–insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *J Chem Ecol*, 14:1965–1975.
- Sabine, J. R. (1975). Exposure to an environment containing the aromatic red cedar, *Juniperus virginiana*: procarcinogenic, enzyme-inducing and insecticidal effects. *Toxicology*, 5(2), 221-235.
- Sabine, J. R. (1975). Exposure to an environment containing the aromatic red cedar, *Juniperus virginiana*: procarcinogenic, enzyme-inducing and insecticidal effects. . *Toxicology* , 5(2), 221-235.
- Sajjadi, S. E. (2006). Analysis of the essential oils of two cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.*, 14(3), 128-130.
- Salehi, B., Amiruddin Zakaria, Z., Gyawali, R., & al., e. (2019). Piper Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications. *Moléculas (MDPI)*, DOI: 10,3390 / moléculas24071364.
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F., Pereira Carneiro, J. N., Alves Borges Leal, A. L., Melo Coutinho, H. D., . . . an. (2018). *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules (MDPI)*, 23: (11) 2847 doi: 10,3390 / moléculas23112847.
- Salgueiro LR, V. R. (1997). Variability of essential oils of *Thymus caespititius* from Portugal. *Phytochemistry*, 45:307–311.
- Sánchez, Y., Correa, T., Abreu, Y., Martínez, B., & Duarte, Y. (2011). Caracterización Química y Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de *Piper marginatum* Jacq. *Protección Vegetal* vol. 26, 170-176.
- Sánchez, Y., Correa, T., Abreu, Y., Martínez, B., Duarte, Y., & Pino, O. (2012). Efecto del Aceite Esencial de *Piper marginatum* Jacq. y sus Componentes sobre *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DAWSON. *Protección Vegetal*, 39-44.

- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, M. T., Najarro, E., & Iglesia, A. (Abril de 2009). Estudio Químico y Microbiológico del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (Caisimón de Anís). *Revista de Protección Vegetal* ISSN 2224-4697, http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100006.
- Santos, F. A. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, 14(4), 240-244.
- Scoog, D., Holler, F., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid, España: McGraw-Hill.
- Scott, I. M. (2008). A review of *Piper* spp.(Piperaceae) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. . *Phytochemistry Review.*, 7(1), 65.).
- Scott, I. M.-V. (2004). Efficacy of *Piper* (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. *Journal of Economic Entomology.*, 97(4), 1390-1403.
- Scott, I. M.-V. (2005). Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp extracts. *Journal of agricultural and food chemistry.*, 53(6), 1907-1913.
- Scott, I. M.-V. (2007). Efficacy of *Piper nigrum* (Piperaceae) extract for control of insect defoliators of forest and ornamental trees. *The Canadian Entomologist.*, 139(4), 513-522.
- Sendi, J., & Ebadollahi, A. (2013). Actividades biológicas de aceites esenciales sobre insectos. *Progreso reciente en Plantas Medicinales.*, 129-150.
- Sendi, J., & Ebadollahi, A. (2013). Biological Activities of Essential Oils on Insects. *Essential Oils II*, vol 37: 130-143.
- Sepúlveda Jiménez, G. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21:355-363.
- Sequeda Castañeda, L., Célis, C., Gutiérrez, S., & Gamboa, F. (2015). *Piper marginatum* Jacq. (PIPERACEAE): Therapeutic, Botanical Insecticidal and Phytosanitary USES. *PharmacologyOnline*, 136-145.
- Serrato C., M. A. (2003). Aspectos del cultivo de dos especies de *Tagetes* productoras de aceites esenciales. *Rev. Naturaleza y Desarrollo* , 1 (1): 15–22.

- Serrato Cruz, M.; Cedillo, F. & Barajas Pérez, J. (2007). Composition of essential oil in germplasm of *Tagetes filifolia* Lag. from central–south region of Mexico. *Agrociencia*, ISSN 1405-3195.
- Serrato, M. A.; Ortega, D. L. & Carrillo R., G. (2009). Usos de algunas especies de *Tagetes*: Revisión bibliográfica. *Revista Mexicana de Entomología* , ISSN 0120-0488.
- Serrato-Cruz, M. A. & Díaz-Cedillo, F. y.-P. (2008). Composition of Essential oil in Germoplasm of *Tagetes filifolia* Lag. *Agrociencia*, 42: 277-285.
- Sighamony, S. A. (1986). Efficacy of certain indigenous plant products as grain protectants against *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhizopertha dominica* (F.). *Journal of Stored Products Research.*, 22(1), 21-23.
- Sighamony, S. A. (1986). Efficacy of certain indigenous plant products as grain protectants against *Sitophilus oryzae* (L.) and *Rhizopertha dominica* (F.). *Journal of Stored Products Research.*, 22(1), 21-23 .
- Singh, G. M. (2004). Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 84(14), 1878-1884).
- Soberón, G. R. (2006). Acción biocida de plantas de *Piper tuberculatum* Jacq. sobre *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera, Pyralidae). *Revista Peruana de Biología*, ISSN 1727-9933.
- Soletto Rodríguez, H. (2016). Estado del arte en el uso potencial de extractos vegetales del género *Piper* para el control de plagas. *Trabajo de grado*. Calí, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Stashenko, E. (1995). *Plantas aromáticas y aceites esenciales*. Bucaramanga (Colombia): Universidad Industrial de Santander. Grupo de fitoquímica, escuela de química.
- Suárez Rosales, K. S. (2015). Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible” Tamizaje fitoquímico, aislamiento de metabolitos secundarios y actividad biológica de *Mansoa Alliacea*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Sumathykuty, M. A. (1999). Essential oil constituents of some *Piper* species. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(5), 279-282.

- Therapeutics, A. J. (4 de Febrero de 2017). *Phytochemical screening*. Obtenido de <http://www.imedpub.com/scholarly/phytochemical-screening-journals-articles-ppts-list.php>
- Thompson, D. P. (1989). Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. . *Mycologia*, 81(1), 151-153.
- Tung, Y. T. (2008). Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource technology*, 99(9), 3908-3913.
- Valle, J. M., Mena, C., & Budinich, a. M. (Julio - Septiembre de 2008). Extraction of Garlic with supercritical. Santiago , Chile: ISSN 0104-6632.
- Vázquez Luna, A., Pérez Flores, L., & Díaz Sobac, R. (2017). Biomoléculas con actividad insecticida: Una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (SOMENTA)*, 306-313.
- Venkoji, P. (1984). The infrared and Raman spectra of 2,4- and 2,5-dimethylbenzaldehydes. *Acad. Sci. (chem. Sci)*, 105-109.
- Vila, R. S.-R. (2010). Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampanensis*, a new source of α -bisabolol. *Bioresource Technology*, 101(7), 2510-2514.
- Villalta, I. (2007). Reflexiones sobre la Medicina Natural en El Salvador, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer. *Artículo aparecido en la Revista SOMOS durante Febrero–Junio*, Pp. 1-2.
- Wadt, L. H. (2004). Genetic diversity of " Pimenta Longa" genotypes (Piper spp., Piperaceae) of the Embrapa Acre germplasm collection. *Genetics and Molecular Biology.*, 27(1), 74-82.
- Wink, M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and Biotechnology of Secondary Metabolites. pp. 1-17.
- Yan, J. C. (2005). Preparative isolation and purification of germacrone and curdione from the essential oil of the rhizomes of *Curcuma wenyujin* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 1070(1-2), 207-210.

Yan, J. C. (2005). Preparative isolation and purification of germacrone and curdione from the essential oil of the rhizomes of *Curcuma wenyujin* by high-speed counter-current chromatography. . *Journal of Chromatography A*, 1070(1-2), 207-210.




CAPITULO IX

ANEXOS

9.0 Anexos

9.1 Constancia de identificación de: *Tagetes Filifolia* Lag., *Piper auritum* Kunth y *Piper marginatum* Jacq.



Asociación Jardín Botánico La Laguna

Antiguo Cuscatlán, 16 de febrero de 2018

Dr. Alex Adonai Osorio
Facultad de Ciencias Naturales y Matemática
Escuela de Química
Universidad de El Salvador

Estimado Dr. Osorio, aprovecho la oportunidad para desearle muchos éxitos, en las labores que realiza.

Por otra parte, mencionarle que la estudiante universitaria Francisca Guadalupe Pineda Sorto, ha hecho acto de presencia a nuestra institución, solicitando identificación taxonómica para 3 muestras botánicas; para ser utilizadas para el trabajo de tesis de grado denominado "Screening Fitoquímico e Insecticida de los aceites esenciales de 3 plantas anisadas de El Salvador; dichas especies detallan de la siguiente manera.

#	Nombre científico	Familia
1	<i>Tagetes filifolia</i> Lag.	Asteraceae
2	<i>Piper auritum</i> Kunth in Humb.	Piperaceae
3	<i>Piper marginatum</i> Jacq.	Piperaceae

Por tanto, se extiende la presente nota, para el uso investigativo.

Atte.


Lic. Dagoberto Rodríguez Bretón
Curador-Botánico
Herbario LAGU



Urbanización Industrial Plan de La Laguna, Antiguo Cuscatlán La Libertad, Tel. (503) 2243 - 7970 / 2243 - 7968
Email: jardinbotanico@jardinbotanico.org.sv Sitio Web: www.jardinbotanico.org.sv

9.2 Constancia de identificación de insectos: *Sitophilus zeamais* y *Kaloterme flavicollis*.


"Enrique Álvarez Córdova"
LABORATORIO DE PARASITOLOGIA VEGETAL
TEL: 23 02-02 00 EXT. 272

San Andrés, viernes 30 de noviembre de 2018

IDENTIFICACIÓN:

Solicitante: **Dr. Alex Adoná Osorio.**

Fecha de consulta: **23-11-18**

Fecha de envío de recomendación: **30-11-18**

TIPO DE ANALISIS: **ENTOMOLOGIA FITOPATOLOGIA NEMATOLOGIA**

DIAGNOSTICO:

- 1. Adultos de gorgojo del maíz**
Orden: Coleoptera
Familia: Curculionidae
Nombre científico: *Sitophilus zeamais* (Morschulsky)
- 2. Obrera termita**
Orden Isoptera
Familia: Kalotermitidae
Nombre científico: *Kaloterme flavicollis* (Fabricius)

Utilizar equipo protector para la aplicación de productos químicos.

NOTA: ESTE INFORME DE ANALISIS SE BASA EN UNA MUESTRA RECIBIDA EN EL LABORATORIO, EL PROCESO DE MUESTREO HA SIDO RESPONSABILIDAD DEL INTERESADO Y EL LABORATORIO SE COMPROMETE A ENTREGAR EL RESULTADO EN UN PERIODO MÁXIMO DE UNA SEMANA.

Técnico responsable: **Dr. Mario Parada Jaco**




En 2017, el gobierno de Salvador Sánchez Cerén trajo al país a un grupo de investigadores alemanes a dar sus aportes sobre el tema del ataque del gorgojo descortezador del pino (*Dendroctonus frontalis*). “Dentro de las actividades realizadas se convocó a técnicos del MARN, académicos Personal técnico del Ministerio de Agricultura y Ganadería y del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, así como autoridades de instancias relacionadas con el tema forestal, participaron en la capacitación que forma parte de la continuidad de los esfuerzos del gobierno para contrarrestar el insecto”. Los expertos capacitarán y compartirán sus experiencias en la lucha contra el gorgojo descortezador de pinos. (Gráfica, 2017), (Ambiente, 2017).

Dentro de la capacitación se orientó a la identificación de la especie de gorgojo según se observe el daño (grietas, canales y oviposición) en la corteza de pino.



A

B

Figura 52. A: Las galerías en forma de "S" llenas de aserrín caracterizan los ataques del gorgojo del pino *Dendroctonus frontalis*. B: Galerías bajo la corteza de pino en forma de "Y" o "H" que están vacías de aserrín (indican ataques de los gorgojos descortezador).

Imagen tomada de: <https://www.barkbeetles.org/centralamerica/0605s.html>