



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA Y/O ANTI
ALIMENTARIA DEL ACEITE ESENCIAL DE TZINSU *Tagetes minuta* EN
Drosophila melanogaster”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

CRISTIAN DAVID COFRE SANTO

RIOBAMBA – ECUADOR

2011

DEDICATORIA

A mis padres por darme la vida y ser templo de mi formación con sus sabias palabras los amo.

A mis hermanos (Emma, Luz María, Marcelino, Tinita, Fernando, Hugo, Ivan, Fabián) que han sido mi pilar y apoyo en todas mis metas y ser en la distancia en motivo de mi superación.

A mis sobrinos que son mi alegría y el motivo de seguir adelante.

A mis abuelitos que siempre los llevo en mi corazón

A mis amigos por su sinceridad y apoyo moral en momentos difíciles.

AGRADECIMIENTO

A dios por ser quien nunca me ha dejado y dejara en mi vida

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por su acogida y los conocimientos impartidos en sus aulas.

A la majestuosa y grande Escuela de Bioquímica de Farmacia por ser fuente de formación intelectuales filántropos y sabios en donde en donde el arte y la ciencia se funden y con ella también se imparte la experiencia la paz y el amor.

A la Dra. Cumanda Játiva por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis y ser la luz que me oriento y me apoyo incansablemente

A las Dras. Sandra Escobar y Janneth Jara Miembros del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

En especial a mi Glorita quien fue un pilar fundamental para el desarrollo del presente trabajo y siempre estar a mi lado.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “ **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA Y/O ANTI ALIMENTARIA DEL ACEITE ESENCIAL DE TZINSU *Tagetes minuta* EN *Drosophila melanogaster*** ”, de responsabilidad del señor egresado Cristian David Cofre Santo, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Yolanda Díaz
DECANA FAC. CIENCIAS

Dr. Luis Guevara
DIRECTOR DE ESCUELA

Dra. Cumanda Játiva
DIRECTORA DE TESIS

Dra. Sandra Escobar
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Tc. Carlos Rodríguez
DIRECTOR CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, (**Cristian David Cofre Santo**), soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

(CRISTIAN DAVID COFRE SANTO)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

mL	mililitros
L	Litros
g	Gramos
Kg	Kilogramo
°C	Grados Celsius
min	minuto
η	índice de refracción
M	molaridad
D	Densidad relativa
N_d^{25}	Índice de refracción a 25°C
t	Valor de la temperatura en (°C)
IA	Índice de acidez
C	concentración
V	volumen
IE	Índice de éteres
%IE	Porcentaje de éteres
V	Volumen
T1	<i>Tagetes minuta</i> (Tzinsu)
T2	<i>Tagetes pusilla</i> (Nachac)
A	Aceite esencial
R	Repetición
R1	Repetición 1
R2	Repetición 2
R3	Repetición 3
R4	Repetición 4
R5	Repetición 5
UE	Unidades Experimentales
C1	Concentración de aceite esencial al 0.5%
C2	Concentración de aceite esencial al 1.25%
C3	Concentración de aceite esencial al 2.5%
C4	Concentración de aceite esencial al 5%
CA	Control positivo (Campex)
CB	Control negativo Blanco o medio natural
DCA	Diseño completamente al azar
MIP	Manejo integrado de plagas

ÍNDICES

ÍNDICE DE ABREVIATURAS
ÍNDICE GENERAL
ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE CUADROS
ÍNDICE DE GRÁFICOS
ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE ANEXOS
INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I	1
1 MARCO TEÓRICO	1
1.1 INSECTICIDA	1
1.2 INSECTICIDAS VEGETALES	1
1.2.1 NATURALEZA DE LOS COMPUESTOS	2
1.2.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE INSECTICIDAS VEGETALES.	3
1.2.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS INSECTICIDAS VEGETALES	5
1.3 CRITERIOS A UTILIZAR DE VEGETALES CON PROPIEDADES INSECTIDAS.....	6
1.4 CUALIDADES EXIGIBLES A UN INSECTICIDA COMERCIAL.....	7
1.5 FUNDAMENTOS CIENTÍFICOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE INSECTICIDAS SELECTIVOS.....	8
1.5.1 SELECTIVIDAD POR DIFERENCIAS EN LA ABSORCIÓN A TRAVÉS DE LOS TEGUMENTOS.....	8
1.5.2 SELECTIVIDAD POR DIFERENCIAS EN EL METABOLISMO.	8
1.5.3 DIFERENCIAS POR FIJACIÓN.....	9
1.5.4 DIFERENCIAS DE PENETRACIÓN Y DE FIJACIÓN EN EL ÁREA DE ACCIÓN.....	9
1.6 IMPORTANCIA DEL GÉNERO <i>Tagetes</i>	9
1.6.1 DISTRIBUCIÓN	9
1.6.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA	10

1.7	TZINSU (<i>Tagetes minuta</i>)	11
1.7.1	BOTÁNICA.....	12
1.7.2	ETNOBOTÁNICA	12
1.7.3	AGRICULTURA.....	13
1.7.4	COMPUESTOS SECUNDARIOS	14
1.7.5	APLICACIONES.....	15
1.7.6	CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE.....	16
1.8	ACEITE ESENCIAL.....	16
1.8.1	ORIGEN	17
1.8.2	NOMENCLATURA.....	18
1.8.3	OBTENCIÓN	18
1.8.4	ESTRUCTURA QUÍMICA.....	20
1.8.5	PROPIEDADES	20
1.9	MOSCA DE LA FRUTAS <i>Drosophila melanogaster</i>	22
1.9.1	CICLO DE VIDA	23
CAPÍTULO II.....		26
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	26
2.1	LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO.	26
2.2	FACTORES DE ESTUDIO.....	26
2.3	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	26
2.3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
2.3.2	OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.	27
2.3.3	OBTENCIÓN DE LOS INSECTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA.....	27
2.3.4	OBTENCIÓN DE MATERIALES PARA LA ALIMENTACIÓN DE LOS INSECTOS.....	28

2.3.5	EQUIPOS.....	28
2.3.6	MATERIALES DE LABORATORIO	28
2.3.7	REACTIVOS	29
2.4	TÉCNICAS	29
2.4.1	OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE TZINSU (<i>Tagetes minuta</i>).....	29
2.4.2	TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Tagetes minuta</i>	30
2.4.3	DETERMINACIÓN DE LA PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS.....	34
2.5	PROPIEDADES FÍSICAS.	35
2.5.1	DENSIDAD RELATIVA	35
2.5.2	DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN.....	36
2.5.3	DETERMINACIÓN DE pH.....	38
2.5.4	DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD EN ALCOHOL	38
2.6	PROPIEDADES QUÍMICAS.....	39
2.6.1	ÍNDICE DE ACIDEZ.....	39
2.6.2	ÍNDICE DE ÉSTERES.....	40
2.6.3	PORCENTAJE DE ÉSTERES	41
2.7	METODOLOGÍA	42
2.7.1	FASE DE CAMPO	42
2.7.2	FASE DE LABORATORIO.....	42
2.7.3	MÉTODOS DE CRIANZA DE INSECTOS.....	43
2.7.4	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA	43
2.8	DETERMINACIÓN DE LA DL ₅₀	45
2.9	TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45
2.10	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
2.10.1	ANÁLISIS DE VARIANZA	46

2.10.2	PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS PRUEBA DE TUKEY AL 5% ..	47
2.10.3	COEFICIENTE DE VARIACIÓN	47
2.10.4	ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y CORRELACIÓN	47
CAPÍTULO III		48
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1	CUANTIFICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PRESENTES EN EL TZINSU <i>Tagetes minuta</i>	48
3.1.1	CUANTIFICACIÓN DE HOJAS Y TALLOS	48
3.1.2	CUANTIFICACIÓN DE FLORES	49
3.2	TAMIZAJE FITOQUÍMICO	49
3.2.1	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE TZINSU <i>Tagetes minuta</i> Y ZORRILLO <i>Tagetes zipaquirensis</i>	50
3.2.2	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DEL TZINSU (<i>Tagetes minuta</i>)	51
3.2.3	RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL POR HIDRODESTILACIÓN DE TZINSU <i>Tagetes minuta</i>	51
3.3	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DEL TZINSU (<i>Tagetes minuta</i>)	52
3.4	RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES DE ACEITE ESENCIAL DE TZINSU (<i>Tagetes minuta</i>)	52
3.5	CRIANZA DE INSECTOS ADULTOS DE LA MOSCA DE FRUTA <i>Drosophila melanogaster</i>	53
3.6	RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TZINSU (<i>Tagetes minuta</i>) Y ZORRILLO (<i>Tagetes zipaquirensis</i>) .	53
3.6.1	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TZINSU <i>T. minuta</i> Y ZORRILLO <i>T. zipaquirensis</i> SOBRE <i>Drosophila melanogaster</i>	54

3.7	ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>T. minuta</i> SOBRE <i>D. melanogaster</i> .	54
	CAPÍTULO IV	60
4	CONCLUSIONES	60
	CAPÍTULO V	61
5	RECOMENDACIONES	61
	CAPÍTULO VI	62
6	RESUMEN Y SUMMARY	62
	CAPÍTULO VII	64
7	BIBLIOGRAFÍA	64
	CAPÍTULO VIII	68
8	ANEXOS	68

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N. 1	Compuestos principales (%) de aceites esenciales de diferentes especies de <i>Tagetes</i>11
CUADRO N. 2	Vegetal elegido para la obtención del aceite esencial, lugar de procedencia.....27
CUADRO N. 3	Insecto plaga, lugar de procedencia y cultivo al que afecta.....27
CUADRO N. 4	Códigos y tratamientos realizados con los aceites esenciales de Tzinsu <i>T. minuta</i> y zorrillo <i>T. zipaquirensis</i> frente a <i>Drosophila melanogaster</i>46
CUADRO N.5	Volumen de aceite esencial por Kg de vegetal Tzinsu (<i>Tagetes minuta</i>).....45
CUADRO N. 6	Análisis organoléptico de los aceites esenciales (método hidrodestilación).....50
CUADRO N. 7	Características físicas del aceite esencial de <i>T. minuta</i>51
CUADRO N. 8	Rendimiento del aceite esencial de Tzinsu por hidrodestilación...51
CUADRO N. 9	Rendimiento del aceite esencial de Zorrillo por hidrodestilación..51
CUADRO N. 10	Aceite esencial <i>T. minuta</i> , características químicas (método hidrodestilación).....52
CUADRO N. 11	Compuestos del aceite esencial <i>T. minuta</i>52
CUADRO N. 12	Porcentaje medio de Mortalidad de <i>D. Melanogaster</i> al 1 día crítico de Análisis, frente a los aceites esenciales.....54
CUADRO N. 13	Análisis de varianza de la actividad insecticida del aceite esencial de <i>T. minuta</i> sobre <i>D. melanogaster</i> a las 3 horas críticas de análisis.....55
CUADRO N. 14	Prueba de Tukey al 5% de la actividad insecticida del aceite esencial de <i>T. minuta</i> frente a <i>D. melanogaster</i>56
CUADRO N. 15	Determinación de la dl_{50} del aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> frente a <i>Drosophila melanogaster</i> las 3 horas críticas del análisis.....57

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N.1	Datos transformados a valores Probit del porcentaje de mortalidad del aceite esencial del <i>T. minuta</i>	58
-----------	--	----

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N.1	Determinación de la actividad insecticida del aceite esencial de <i>T. minuta</i> aplicadas sobre insectos adultos de <i>D. melanogaster</i> a las 3 horas.....	56
GRÁFICO N.2	Curva dosis efecto del aceite esencial de <i>T. minuta</i> aplicadas sobre <i>D. melanogaster</i> a las 3 horas críticas frente a los dos controles.....	58
GRÁFICO N.3	Curva de regresión lineal para la dl_{50} del log de la dosis del aceite esencial de <i>Tzinsu</i> (<i>T. minuta</i>) contra los valores Probit aplicadas sobre <i>D. melanogaster</i> a las 3 horas críticas.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N. 1	<i>Tagetes minuta</i> , con base en especímenes de herbario en tex / Il. (a) hábito (b) de la cabeza (c) bajo la superficie de la hoja (d) flores ray (e) flores disco.....	12
FIGURA N. 2	<i>Tagetes minuta</i> comprado en un mercado en Chile. El material estaba doblado y envuelto con una cuerda de plástico mientras está fresco.....	14
FIGURA N. 3	Aceite esencial extraído de <i>Artemisia pallens</i>	16
FIGURA N. 4	Estructura molecular del isopreno, la unidad química de los terpenoides, compuesto principal de los aceites esenciales.....	20
FIGURA N. 5	Insecto adulto de la fruta <i>Drosophila melanogaster</i>	22
FIGURA N. 6	Ciclo biológico gusano de la fruta <i>D. melanogaster</i>	23

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N. 1	Equipo de obtención y cuantificación de aceites esenciales.....29
FOTOGRAFÍA N. 2	Reacción de Sudan III para identificación de aceites.....30
FOTOGRAFÍAS N.3	Determinación de índice de acidez.....39
FOTOGRAFÍA N. 4	Esterilización de materiales.....44
FOTOGRAFÍA N. 5	Elaboración del medio de cultivo.....44
FOTOGRAFÍA N. 6	Reparto de medios en frascos.....44
FOTOGRAFÍA N. 7	Distribución de insectos.....44
FOTOGRAFÍA N. 8	Pie de cría de <i>Drosophila melanogaster</i>45

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N.1	Actividad insecticida del aceite esencial de Tzinsu <i>Tagetes minuta</i> a las 3 horas de análisis.....	68
ANEXO N.2	Actividad insecticida del aceite esencial de Zorrillo <i>Tagetes zipaquirensis</i> a las 30 segundos de análisis.....	69
ANEXO N.3	Análisis de varianza de la actividad insecticida del aceite esencial de <i>T. zipaquirensis</i> sobre <i>D. melanogaster</i> a los 30 segundos criticas de análisis.....	69
ANEXO N.4	Compuestos presentes en el aceite esencial de la especie <i>Tagetes</i>	70
ANEXO N.5	Equivalencia entre valores "Probit" y porcentaje de población afectada.....	70

INTRODUCCIÓN

Los vegetales han evolucionado por más de 400 millones de años y para contrarrestar el ataque de los insectos han desarrollado mecanismos de protección, como la repelencia y la acción insecticida.

Después de la segunda guerra mundial los pocos vegetales que mostraron resultados efectivos, y alcanzaron a usarse masivamente, fueron reemplazados por los insecticidas sintéticos. Con la aparición en la década de los cuarenta de estos insecticidas sintéticos se pensó que los insecticidas vegetales desaparecerían para siempre pero problemas como la contaminación del ambiente, los residuos en los alimentos y la resistencia por parte de los insectos han hecho que hoy en día vuelvan a ser tomados en cuenta.

Sin lugar a dudas los fitoinsecticidas constituyen una muy interesante alternativa de control de insectos además de que sólo se han evaluado muy pocos vegetales de las 250.000 que existen en el planeta por lo que las perspectivas futuras son aun insospechadas.

La evolución de nuestro planeta como su historia geológica ha conferido a nuestro país Ecuador un alto nivel de biodiversidad en todo el planeta. Esta abundancia natural, es poca conocida por los propios ecuatorianos, subestimando así su valor real. Los escasos estudios botánicos que avanzan lentamente, en contraste con la deforestación que amenaza extinguir especies vegetales no conocidas por la ciencia así como el de su utilidad hace menester en realizar estudios sobre las bondades que presenta los vegetales para su mejor aprovechamiento.

Dada la riqueza de la flora del Ecuador, *Tagetes minuta* es un vegetal que crece en forma silvestre en el sector andino del país siendo utilizado actualmente como saborizantes de sopas por ciertas comunidades rurales, pero el aceite esencial aún no ha sido aplicado.

La composición química de *Tagetes minuta* indica la presencia de aceites esenciales. Los mismos que en otras localidades es utilizado como insecticida, razón por la cual en sectores como Guano y San Andrés aplican el cultivo del Tzinsu en forma de un cerco

que rodea a los cultivos para de esta forma ahuyentar a los insectos que causan daños en los cultivos.

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales y en el Laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Ciencias y tiene por objeto determinar la actividad insecticida y/o anti alimentaria del aceite esencial de Tzinsu *Tagetes minuta* en *Drosophila melanogaster*, extraer el aceite esencial mediante destilación por arrastre de vapor, determinar la actividad insecticida y/o anti alimentaria del aceite esencial mediante el suministro de concentraciones de 0.5%; 1.25%; 2.5%; 5% en la dieta de la *D. melanogaster* y evaluar la mortalidad en 3 horas, determinar la DL_{50} mediante un con la aplicación de un modelo experimental que es un diseño completamente al azar (DCA).

El género *Tagetes* (Asterácea) es originario de Sudamérica, pero actualmente posee una distribución cosmopolita y representa uno de los grupos más ricos en formas de angiospermas. *Tagetes spp*, es de importancia económica e incluye especies de plantas comestibles y ornamentales. Los extractos de este género se caracterizan por su actividad insecticida y nematocida, además de sus aplicaciones farmacéuticas, siendo *T. minuta*, *T. erecta*, *T. patula* y *T. terniflora* las especies mejores conocidas. *Tagetes minuta* es la especie que en la actualidad está siendo estudiada, puesto que sus extractos contienen principalmente (Z) – tagetona, (Z) – β – ocimeno, dihidrotagetona, (Z) – ocimeno y (E) – ocimeno.

Otro dato importante es analizar la actividad que presenta en el ciclo de desarrollo in vitro preparando medios de cultivo de la *Drosophila melanogaster* y determinando la dosis mínima inhibitoria la dosis media. Estableciéndose una DL_{50} para el aceite de Tzinsu (*Tagetes minuta*) de 0.71%, necesarios para matar el 50% de la población de insectos adultos de *D. melanogaster*

El aceite esencial de Tzinsu se aplicó en diferentes concentraciones a los medios de cultivo a fin de observar el comportamiento de la *Drosophila melanogaster*, que en número de 10 son colocados en cada frasco; teniendo como resultado la muerte de los insectos.

CAPÍTULO I

1 MARCO TEÓRICO

1.1 INSECTICIDA

Los insecticidas son considerados como toda sustancia química de origen natural o sintético que se emplea para controlar una plaga. Es aquella sustancia que ejerce su acción biocida debido a la naturaleza de su estructura química (22)

Los insecticidas son de origen químico o biológico que controlan los insectos. El control puede resultar de matar el insecto o de alguna manera impedir que tenga un comportamiento considerado como destructivo. Los insecticidas pueden ser naturales o hechos por humanos y son aplicados a las especies objetivo en multitud de formulaciones y sistemas de aplicación (aspersiones, cebos, difusión de liberación lenta, etc.). (20)

1.2 INSECTICIDAS VEGETALES

Los insecticidas de origen vegetal son de interés, por tratarse de insecticidas naturales, productos derivados de plantas. Históricamente los materiales vegetales han sido usados durante más tiempo que cualquier otro grupo, con excepción del azufre, tabaco, piretro, derris, heleboro, acacia, alcanfor, y trementina son algunos de los más importantes productos vegetales en uso antes que comenzara la búsqueda organizada de insecticidas

a comienzos de los años 1940s. El uso de insecticidas de origen vegetal llegó a su pico en EEUU en 1946, y desde entonces ha declinado de manera continua. Ahora el piretro es el único producto botánico clásico que tiene en un uso significativo. Algunos insecticidas más nuevos derivados de las plantas que han entrado en uso, denominados como florales o *productos químicos con aroma a plantas* e incluyen, entre otros, limoneno cinnamaldehído y eugenol. Además, está la azadiractina extraída del árbol de neem la cual es usada en invernaderos y en ornamentales. (21)(23)

1.2.1 NATURALEZA DE LOS COMPUESTOS

Las plantas son laboratorios naturales en donde se biosintetizan una gran cantidad de sustancias químicas y de hecho se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. El metabolismo primario de las plantas sintetiza compuestos esenciales y de presencia universal en todas las especies vegetales. Por el contrario, los productos finales del metabolismo secundario no son ni esenciales ni de presencia universal en las plantas. Entre estos metabolitos son comunes aquellos con funciones defensivas contra insectos, tales como alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, glicósidos, glucosinolatos, quinonas, taninos y terpenoides. Hay quienes sostienen que estos compuestos no tienen un papel definido, e incluso se les llega a catalogar como “basura metabólica”. Sin embargo otros autores indican que constituyen señales químicas importantes del ecosistema. (25)

Existe gran variación en cuanto a la concentración de compuestos secundarios que individuos de una población expresan. No hay patrón de máxima producción, ni órganos especiales de almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo lo común es que las mayores concentraciones de este tipo de compuestos se encuentren en flores y semillas. (4)

Plantas insecticidas son todas las plantas que han desarrollado sustancias, denominadas *aleloquímicos*, como mecanismo de defensa frente al ataque de insectos. Estos compuestos se han desarrollado a través de la evolución mediante la activación de vías metabólicas secundarias, en las que se han creado compuestos químicos que cumplen la

función de mensajeros o infoquímicos entre las mismas y diferentes especies y que regulan defensivamente la presencia de insectos fitófagos en las plantas en su constante búsqueda de refugio, de alimento y de sitios de oviposición óptimos. Posición

Estos compuestos aleloquímicos pueden actuar como atrayentes, estimulantes, repelentes o inhibidores de la alimentación o de la oviposición. La gran abundancia de estos compuestos en las plantas ofrece excelentes perspectivas para su extracción, identificación y uso como plaguicidas (6).

Es importante destacar que el efecto de tales sustancias no es tan agresivo ni fulminante como los insecticidas organosintéticos, pues éstos alteran el comportamiento y la fisiología al provocar repelencia, inhibición en el crecimiento, por lo que realmente deben ser llamados insectistáticos y no insecticidas en su mayoría. (6)

Cabe señalar que el uso de sustancias vegetales para el control de plagas no debe considerar la erradicación total del organismo-plaga, sino que debe procurar la restauración, preservación y la consolidación del balance de los ecosistemas. (6)

1.2.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE INSECTICIDAS VEGETALES.

La mayoría de las especies de plantas que se utilizan en la protección vegetal, exhiben un efecto insectistático más que insecticida. Es decir, inhiben el desarrollo normal de los insectos. Esto lo pueden hacer de varias maneras que a continuación se describen. (18)

1.2.2.1 Reguladores de crecimiento

Este efecto se puede manifestar de varias maneras. La primera son aquellas moléculas que inhiben la metamorfosis, es decir evitan que ésta se produzca en el momento y tiempo preciso.

Otros compuestos hacen que el insecto tenga una metamorfosis precoz, desarrollándose en una época que no le es favorable. Por último, también se ha visto que determinadas moléculas pueden alterar la función de las hormonas que regulan estos mecanismos de modo que se producen insectos con malformaciones, estériles o muertos. (18)

1.2.2.2 Inhibidores de la alimentación

La inhibición de la alimentación es quizás el modo de acción más estudiado de los compuestos vegetales como insecticidas. Inhibidor de la alimentación es aquel compuesto, que luego de una pequeña prueba, el insecto se deja de alimentar y muere por inanición. Muchos de los compuestos que muestran esta actividad pertenecen al grupo de los terpenos y se han aislado principalmente de plantas medicinales originarias de África y la India. (18)

1.2.2.3 Repelentes

El uso de plantas como repelentes es muy antiguo pero no se le ha brindado toda la atención necesaria para su desarrollo. Esta práctica se realiza básicamente con compuestos que tienen mal olor o efectos irritantes como son entre otros el ají y el ajo. Un claro ejemplo lo podemos observar en las prácticas realizadas por los indígenas de Guatemala y Costa Rica que suelen "pintar" o espolvorear con ají los recipientes en los que almacenan maíz y frejol para que no se "agorroje" y además espantar a los roedores. (18)

1.2.2.4 Confusores

Los compuestos químicos de una determinada planta constituyen una señal inequívoca para el insecto para poder encontrar su fuente de alimento. De hecho hay casos como el de la mariposa monarca, que se alimenta de una planta altamente venenosa, para otros

organismos, la cual identifica por la presencia de esta sustancia tóxica. Una forma de usar esta propiedad en el Manejo Integrado de Plagas (MIP) ha sido poniendo trampas ya sea con aspersiones de infusiones de plantas que le son más atractivas al insecto o de la misma planta pero en otras zonas de modo que el insecto tenga fuentes de estímulo y no sea capaz de reconocer la planta que nos interesa proteger. Otra opción es colocar trampas de recipientes que contengan extractos en agua de la planta de modo que los insectos "aterricen" en las trampas y no en el cultivo. (18)

1.2.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS INSECTICIDAS VEGETALES

1.2.3.1 Ventajas

1. Son conocidos por el agricultor ya que generalmente se encuentran en su mismo medio.
2. Muchas veces poseen otros usos como medicinales o repelentes de insectos caseros.
3. Su rápida degradación puede ser favorable pues disminuye el riesgo de residuos en los alimentos.
4. Algunos pueden ser usados poco tiempo antes de la cosecha
5. Varios actúan rápidamente inhibiendo la alimentación del insecto aunque a la larga no causen la muerte del insecto.
6. Debido a su acción estomacal y rápida degradación pueden ser más selectivos con insectos plaga y menos agresivos con los enemigos naturales
7. Muchos de estos compuestos no causan fitotoxicidad.
8. Desarrollan resistencia más lentamente que los insecticidas sintéticos. (18)(29)

1.2.3.2 Desventajas

1. No todos son insecticidas sino que muchos son insectistáticos lo que los hace tener una acción más lenta

2. Se degradan rápidamente por los rayos UV por lo que su efecto residual es bajo.
3. No todos los insecticidas vegetales son menos tóxicos que los sintéticos.
4. No se encuentran disponibles durante toda la temporada.
5. Los límites máximos de residuos no están establecidos
6. No hay registros oficiales que regulen su uso.
7. No todas las recomendaciones que manejan los agricultores han sido validadas con rigor científico.(18)

1.3 CRITERIOS A UTILIZAR DE VEGETALES CON PROPIEDADES INSECTIDAS.

Son muchas las publicaciones que hacen listados de plantas con propiedades insecticidas. Por ejemplo, ya en 1950, Heal *et al.* reportan aproximadamente 2 500 plantas de 247 familias con alguna propiedad insecticida o tóxica para insectos. Pero para usarlas, no basta con que una planta sea considerada como prometedora o con probadas propiedades insecticidas. Además se deben hacer análisis de riesgos al medio ambiente y a la salud.

Por ejemplo, no es conveniente recomendar el uso de plantas que estén en vías de extinción, que sean difíciles de encontrar o que su utilización implique alteraciones importantes a la densidad en que se encuentran en la naturaleza. Si el día de mañana se descubre que la madera del baoba mata insectos esto no quiere decir que los vamos a cortar. De esta forma y con la finalidad de obtener el máximo provecho de una planta con propiedades insecticidas, sin que ello implique un deterioro al ecosistema, se han enlistado las características que debe tener la planta insecticida ideal: (18)

1. Ser perenne.
2. Estar ampliamente distribuida y en grandes cantidades en la naturaleza, o bien que se pueda cultivar.
3. Usar órganos de la planta renovables como hojas, flores o frutos.
4. No ser destruida cada vez que se necesite recolectar material (evitar el uso de raíces y cortezas).
5. Requerir poco espacio, manejo, agua y fertilización.
6. Tener usos complementarios (como medicinales).

7. No tener un alto valor económico.
8. Ser efectiva a bajas dosis. (18) (5)

1.4 CUALIDADES EXIGIBLES A UN INSECTICIDA COMERCIAL.

Para que un insecticida alcance un uso amplio en la práctica agrícola debe reunir determinadas condiciones básicas, entre las que pueden destacarse como más importantes las siguientes:

- a. *Efectividad*: El insecticida ha de ser eficaz en la destrucción de la plaga contra la cual se aplica.
- b. *Selectividad*: debe destruir únicamente los insectos dañinos, sin perjudicar la flora y fauna beneficiosa.
- c. *Economía*: Tiene que producir unos beneficios que superen el gasto que supone su utilización.

Por regla general se considera que el uso de un plaguicida es recomendable cuando el gasto a realizar es inferior al 20% de incremento sobre la cosecha que se obtendría sin combatir la plaga. También se considera económico cuando, siendo efectivo, el costo del tratamiento representa un 5% del valor de la cosecha. Además, en todo caso debe resultar competitivo con respecto a los otros medios de lucha.

- d. *Seguridad*: no puede ser fitotóxico, ni constituir un peligro para la salud del hombre o de los animales domésticos.
- e. *Posibilidad de formulación*: el plaguicida deberá ser compatible con algunos de los posibles soportes y diluyentes, dando lugar a formulaciones estables y efectivas.
- f. *Estabilidad*: debe conservar su capacidad de acción durante un tiempo suficiente.

(32)

1.5 FUNDAMENTOS CIENTÍFICOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE INSECTICIDAS SELECTIVOS.

La selectividad de un producto para un insecto puede basarse en las características específicas de su penetración en los tejidos o de pauta metabólica dentro de su organismo. El ataque produce una lesión una "lesión bioquímica" que consiste, normalmente, en la inhibición de una enzima. Los síntomas de la intoxicación son consecuencia de una lesión bioquímica. El problema se centra en encontrar moléculas que tengan selectividad por alguna de las causas dichas. Se da el nombre de selectóforo al grupo químico funcional que confiere selectividad a un plaguicida. (32)(28)

1.5.1 SELECTIVIDAD POR DIFERENCIAS EN LA ABSORCIÓN A TRAVÉS DE LOS TEGUMENTOS.

Como la piel de los mamíferos y los tegumentos de los artrópodos presentan diferencias muy notables, puede esperarse que existan compuestos que no penetren a través de la piel y de determinados tipos de tegumentos, y en cambio penetren en otros. Desgraciadamente se poseen muy pocos datos sobre la relación entre estructura química y facilidad de penetración.

La diferencia o semejanza entre la polaridad del insecticida y la de los tejidos es fundamental para la capacidad de penetración. Es conocido que las moléculas con grupos muy polares o los iones no atraviesan las cutículas lipóideas. (32)

1.5.2 SELECTIVIDAD POR DIFERENCIAS EN EL METABOLISMO.

Las diferencias en el metabolismo entre mamíferos e insectos, e incluso entre las diferentes especies de insectos, pueden servir de base a la obtención de insecticidas altamente selectivos para determinadas especies que, a la vez, posean un nivel de toxicidad bajo para mamíferos. Los insecticidas se metabolizan en los tejidos específicos,

transformándose en productos generalmente inactivos; pero, en ocasiones, pueden dar productos de mayor toxicidad. (32)

1.5.3 DIFERENCIAS POR FIJACIÓN

El grado de desarrollo del sistema excretor y la capacidad de almacenamiento influyen en la toxicidad de los insecticidas.

También es importante la posibilidad de almacenamiento del compuesto tóxico en algunos tejidos, donde no ejerzan su acción tóxica. (32)

1.5.4 DIFERENCIAS DE PENETRACIÓN Y DE FIJACIÓN EN EL ÁREA DE ACCIÓN.

Determinadas barreras fisiológicas pueden retardar o impedir el acceso del producto a los tejidos sensibles. Por ejemplo, se comprobado que los insecticidas cargados positivamente no pueden atacar al sistema nervioso central de los mamíferos, ni al de los insectos, debido a que ambos poseen barreras protectoras que impiden el paso de los cationes. Si se llega a conocer los mecanismos de ataque de los insecticidas se podrá preparar compuestos con una selectividad prevista. (32)

1.6 IMPORTANCIA DEL GÉNERO *Tagetes*

1.6.1 DISTRIBUCIÓN

El género *Tagetes* es nativo de América, las especies silvestres ocurren desde Arizona y Nuevo México, suroeste de Estados Unidos a través de América Central hasta Argentina. (11)

1.6.1.1 Clasificación taxonómica

De acuerdo con Neher (1985), el género *Tagetes* pertenece a la familia Compositae, subfamilia Asterácea, tribu Helianthae y subtribu Tagetininae; en este género se reconocen los subgéneros *Lucida* y *Tagetes*. Este género cuenta con 56 especies, que incluyen plantas perennes y anuales; son conocidas como cempasuchitl o caléndulas. (12).

1.6.1.2 Descripción botánica

Son plantas herbáceas anuales o perennes, aromáticas al estrujarse: con hojas todas opuestas, por lo común pinnadas, con numerosas glándulas oleíferas traslúcidas cabezuelas solitarias o más o menos cimoso – corimbosas, involucre cilíndrico, fusiforme o angostamente campanulado, sus brácteas de tamaño subigual, unidas entre si hasta cerca de ápice y provista de dos hileras de glándulas oleíferas; receptáculo plano o convexo, desnudo; flores liguladas generalmente presentes, fértiles, con sus corolas amarillas, anaranjadas, rojizas o blancas; flores hermafroditas, corola con garganta infundibuliforme, anteras con las bases obtusas, ramas del estilo truncadas y peniciliadas en el ápice con anexos cónicos cortos; aquenios lineares o claviformes, vilano de tres a 10 escamas desiguales lineares, a veces más o menos unidas entre sí. (11)

1.6.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química del género *Tagetes* es diversa entre las especies. Algunos de los compuestos encontrados en los aceites pertenecen al grupo de carbohidratos, alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas, ésteres, carotenoides, flavonoides y tiofenos, entre otros (33). En el cuadro N. 1, se muestran los principales compuestos identificados (en porcentaje) de diferentes especies de *Tagetes*. La caracterización de aceites esenciales de las mismas especies, en los cuales las proporciones y compuestos son diferentes entre sí; se ha

documentado, y se atribuye a los factores externos y genética de las plantas, además del método de obtención del aceite que también influye en el producto final.

Cuadro N. 1 Compuestos principales (%) de aceites esenciales de diferentes especies de *Tagetes*

COMPUESTO/VEGETAL	<i>Tagetes aff. maxima</i>		<i>Tagetes erecta</i>		<i>T. filifolia</i>		<i>T. laxa</i>		<i>Tagetes lucida</i>		<i>Tagetes minuta</i>		<i>Tagetes multiflora</i>		<i>Tagetes patula</i>		<i>Tagetes tenuifolia</i>	
	Hoja	Flor	Flor	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Fruto	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	Hoja	Flor	
β-Cariofileno					2.1	9.4									18.2			
Dihidrotagetona	26.7		1						61.1								12.6	20.2
Dihidrotagetona+(E)-β-cimeno												15.5						
(E)-anetol				67														
(E)-Tagetona									9	58							9.8	
(E)-tagetona	22.4				33.2									17.2			41.6	24.7
Limoneno		7.6							8.8						13.4			
Metil Chavicol*(alilanisol y estrango)				30.3				93.8										
Metil eugenol								3.6										
Piperitenona			11															
Piperitona		52.4	28.5												22.6	14.6		
Terpinoleno		11.2																
(Z)-β-ocimeno					15.8						36.8	12.8		15			17	
(Z)-tagetona	31.2										17.1	47.3						
(Z)-tagetona					27.1													

FUENTE: ZYGADLO, J. ET.AL

La variabilidad en la composición de los aceites esenciales y su diversidad química es genéticamente determinada y estrictamente relacionada con las especies. El contenido y cantidad de compuestos de los aceites esenciales de *Tagetes* depende del lugar y sitio de crecimiento de la planta, de la etapa fenológica, de la parte de la cual se extrae el aceite, la composición del suelo y la fertilización mineral, entre otros, por lo que es común encontrar diferencias en el contenido del aceite entre los vegetales de la misma especie (24).

1.7 TZINSU (*Tagetes minuta*)

Planta herbácea que a veces alcanza 50 cm de alto, raíz típica, tallo delgado color café claro. Hojas compuestas opuestas, foliolos elípticos lanceolados de disposición verticilar, márgenes aserrados, con glándulas oleosas. Inflorescencia dispuesta en

umbelas, color verde vino, con olor penetrante, involucro formado por 10 brácteas soladas de color purpura que encierran 10 flores amarillas. Fruto un aquenio. (27) Fig. 1.



FIGURA N. 1 *Tagetes minuta*, CON BASE EN ESPECÍMENES DE HERBARIO EN TEX / LL. (A) HÁBITO (B) DE LA CABEZA (C) BAJO LA SUPERFICIE DE LA HOJA (D) FLORES RAY (E) FLORES DISCO. FUENTE: REINOSO L.

1.7.1 BOTÁNICA

1.7.1.1 Origen

Tagetes minuta es nativa de los pastizales templados y regiones montañosas del sur de Sudamérica, incluidos los países de Argentina, Chile, Bolivia, Ecuador, Perú, *T. minuta* se encuentra a menudo creciendo en las zonas de disturbios durante las etapas iniciales de sucesión. Esta afinidad por los sitios perturbados ha permitido a la especie para colonizar muchas áreas alrededor del mundo. Desde la época de la conquista española, se ha introducido en Europa, Asia, África, Madagascar. (3)

1.7.2 ETNOBOTÁNICA

Los nombres locales varían según la región, con mayor frecuencia en la literatura se encuentra como, *chinchilla*, *chiquilla*, *chilca*, *zuico*, *suico*, o el término *anisillo* español.

Para uso medicinal, un cocimiento de un puñado de planta seca en agua hirviendo durante 3 a 5 minutos se utiliza como remedio para el resfriado común, incluyendo superior e inferior de las inflamaciones del tracto respiratorio, y molestias del aparato digestivo; malestar estomacal, diarrea. La decocción se consume caliente, y puede ser endulzado al gusto individual. (30)

Tagetes minuta se utiliza como condimento en Chile y Argentina. Es popular en platos de arroz y como aromatizante en guisos. En el norte de Chile es *Suico* es tan apreciado que muchas personas activamente recoger las poblaciones silvestres para secar una cantidad suficiente para pasar el invierno sirviéndose como bebida caliente. (30)

Tagetes minuta se refiere a menudo como una mala hierba. Muchos de los agricultores de América Latina que no practican la agricultura industrializada dejan las plantas espontáneas de *Tagetes minuta* en sus campos. Este segundo cultivo es beneficioso en varias formas: el rápido crecimiento de *T. minuta* hace sombra a otras especies vegetales que pueden ser de menor utilidad para el agricultor, en segundo lugar, puede ser cosechada para uso personal, o para la venta en los mercados de la ciudad, y en tercer lugar, se ha informado a la ayuda en la retención de humedad en el campo. (30)

1.7.3 AGRICULTURA

1.7.3.1 General

Tagetes minuta crece rápidamente a partir de semillas sembradas directamente en el suelo una vez que el peligro de heladas haya pasado. La altura de la planta varía según las condiciones. (10) (30)

Tagetes minuta prospera en pleno sol. La competencia por la luz del sol puede dar lugar a plantas altas delgadas con una biomasa baja. Con una Biomasa superior se logra mediante el espaciamiento de las plantas 1 m de distancia, y la eliminación del meristemo

apical de 30 días para estimular la ramificación. Eliminación de meristemas se puede hacer mecánicamente. (30)

1.7.3.2 Cosecha

La Cosecha para su uso, como bebida o condimento se hace a mano cortando el tallo principal a nivel del suelo, ya que toda la parte aérea de la planta se considera útil. El material vegetal se dobla y se ata en manojos con cordeles, hierbas, o una rama flexible de *T. minuta* (Fig. 2.).



FIGURA N. 2 *Tagetes minuta* COMPRADO EN UN MERCADO EN CHILE. EL MATERIAL ESTABA DOBLADO Y ENVUELTO CON UNA CUERDA DE PLÁSTICO MIENTRAS ESTÁ FRESCO.
FUENTE: CHAMORRO E.

Los haces se cuelgan en un lugar seco, alejado de la luz solar directa, que se seque. Mano cosecha comercial es factible debido a las tasas de mano de obra de baja en los países sudamericanos. Dado que toda la planta se utiliza, la recolección mecánica podría ser una opción viable, y se utiliza en la producción de aceite esencial. (30)

1.7.4 COMPUESTOS SECUNDARIOS

El Tzinsu (*Tagetes minuta*) es rica en muchos compuestos secundarios, incluyendo compuestos acíclicos y bicíclicos, monoterpenos monocíclicos, sesquiterpenos, flavonoides, tiofenos, y los compuestos aromáticos. Hay pruebas de que los compuestos

secundarios en *Tagetes* son elementos de disuasión eficaz de numerosos organismos, incluyendo: los hongos, hongos patogénicos en seres humanos, bacterias en general, tremátodos, nematodos, y numerosas plagas de insectos a través de varios mecanismos diferentes. Muchas plantas que están relacionadas estrechamente con compuestos secundarios provenientes del metabolismo, han demostrado valor medicinal en humanos. Estudios in vivo en humanos de los compuestos secundarios de *T. minuta* no se han reportado, aunque las especies de *Tagetes* otros han demostrado médicamente seguro y eficaz. (10)(15)

La actividad Anti-microbiana es determinada por cinco compuestos secundarios en *Tagetes minuta*, beta-ocimeno, dihidrotagetona, tagetenona, (Z)-ocimenona, y (E) ocimenona. Cuando la prueba en 40 cepas de bacterias y hongos, el aceite esencial de *T. minuta* tuvo un efecto inhibitorio 100% en bacterias Gram positivas, un efecto inhibitor del 95% en bacterias Gram-negativas, y un efecto inhibitorio 100 % en los hongos.(10)

1.7.5 APLICACIONES.

Tiene uso como condimento en las comidas, como aliño, también medicinal para aliviar el dolor de estómago. (27)

El aceite esencial, se ha utilizado para dermatitis, las irregularidades menstruales, las varices, hemorroides, y conjuntivitis. También es empleado en cierto modo en perfumes herbáceos y florales. (3)(6)

En China las flores se utilizan para la tos ferina, los fríos, el cólico, las paperas, los ojos doloridos y la mastitis, y en la India las tapas florecientes se destilan para producir “genda de la esencia” un material del perfume. (3)

El aceite esencial es obtenido por la destilación de vapor de la hierba floreciente fresca y por la extracción solvente de la hierba floreciente. (3)

1.7.6 CARACTERÍSTICAS DEL ACEITE

El aceite posee características antihelmíntica, antiespasmódico, bactericida, carminativo, diaforético, emmenagoge, fungicida, estomacal. (10)

1.7.6.1 Composición del aceite esencial de *Tagetes minuta*

Seis componentes principales fueron identificados mediante el análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas. El aceite de hojas de plantas no florecidas contiene principalmente Dihidrotagetona, mientras que el aceite de hojas de plantas florecidas al igual que el aceite de flores es rico en β - ocimeno y tagetenona. La composición del aceite esencial de *Tagetes minuta*. Varía según las diferentes partes de la planta y de su estadio de crecimiento. (14)(25)

1.8 ACEITE ESENCIAL



FIGURA N. 3

ACEITE ESENCIAL EXTRAÍDO DE *Artemisia pallens*. UN SOLO ACEITE ESENCIAL PUEDE ESTAR COMPUESTO POR MUCHAS SUSTANCIAS QUÍMICAS COMPLEJAS.

FUENTE: http://www.es.wikipedia.org/Aceites_Esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, frutos, hierbas, especias, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Se

trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles por naturaleza (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio y virtudes curativas únicas. Proceden de plantas tan comunes como el perejil y tan exquisitas como el jazmín. Para que den lo mejor de sí, deben proceder de ingredientes naturales brutos y quedar lo más puro posible.

El término *esencias o aceites esenciales* se aplica a las sustancias sintéticas similares preparadas a partir del alquitrán de hulla, y a las sustancias semisintéticas preparadas a partir de los aceites naturales esenciales. El termino *aceites esenciales puros* se utiliza para resaltar la diferencia entre los aceites naturales y los sintéticos. (31)

1.8.1 ORIGEN

Las plantas elaboran los aceites esenciales con el fin de protegerse de las enfermedades, ahuyentar insectos depredadores o atraer insectos benéficos que contribuyen a la polinización.

Los aceites esenciales son característicos de los magnoliales, los laurales, los austrobaileyales, y los piperales, y también de algunas familias no emparentadas con estos órdenes, como *Myrtaceae*, *Rutaceae*, las familias de *Apiales*, *Lamiaceae*, *Verbenaceae* y *Asteraceae*.

Están presentes en distintas partes de la planta:

- en las flores (como en el caso de la lavanda, el jazmín y la rosa)
- en todo el árbol (como sucede con el *eucaliptus*)
- en las hojas (la citronela)
- en la madera (el sándalo)

- en la raíz (el vetiver)
- en la resina que exudan (el incienso, la mirra y el benjuí)
- en la cáscara de los frutos (el limón, la naranja y la bergamota)

Dentro de los tejidos vegetativos, se encuentran en células esféricas o diferentes cavidades o canales en el parénquima, y cuando dan el olor a las flores, se encuentran en las glándulas odoríferas, desde donde son liberados. (13)

1.8.2 NOMENCLATURA

Se denominan con el mismo nombre de la planta de origen: aceite esencial de lavanda, aceite esencial de limón, etc.

De algunas plantas se extrae más de un aceite esencial, en cuyo caso el nombre varía. Por ejemplo, de las flores del naranjo se extraen: por destilación, el nerolí o azahar; por destilación de los frutos recién formados, el *petit grain*, y de la cáscara o corteza de los frutos, el aceite esencial de naranjo. (31)

1.8.3 OBTENCIÓN

Los aceites esenciales se obtienen por uno de los métodos siguientes:

- Destilación en corriente de vapor
- Extracción con disolventes volátiles,
- *Expresión* a mano o a máquina. (aceite de limón)

- *Enfleurage*, proceso en el cual se utiliza grasa como disolvente.

Hoy los aceites esenciales sintéticos u obtenidos de fuentes naturales por cualquiera de esos cuatro métodos, se purifican normalmente por destilación al vacío. (13)

1.8.3.1 Destilación en corriente de vapor

Para extraerlos por arrastre de vapor, se debe contar con un equipo destilador de pequeñas dimensiones si se trata de una determinación experimental en laboratorio y de mayor tamaño si es una tarea a nivel industrial. (13)

Los destiladores constan de las siguientes partes: una fuente de calor que genera vapor, un recipiente para alojar la hierba, un colector del aceite esencial separado y un refrigerante para los vapores. (13)

El vapor de agua atraviesa la hierba colocada en el recipiente, extrae y arrastra el aceite esencial que tiene bajo punto de volatilización y lo lleva hasta el refrigerante, donde al enfriarse se condensa y se separa el agua del aceite por densidad. (31)(13)

Si el aceite es menos denso queda en la superficie y si es más denso que el agua, va al fondo. De esta manera es fácil separarlo. (31).

Si bien la composición química de los aceites es muy variada, todos ellos poseen varias propiedades físicas en común, por ejemplo: tienen alto índice de refracción, son ópticamente activos, etc. (31) (13)

Las destilaciones por arrastre de vapor duran entre 3, 4 o más horas, según la hierba que se trate, obteniéndose muy poca cantidad de esencia. Esto se debe a que el contenido en aceites de las plantas es bajo, y por ello hace falta destilar abundante cantidad de hierbas para obtener un volumen que justifique el gasto de destilación. Los rendimientos suelen ser menores al 1%, es decir destilando 100 Kg de hierba fresca, obtendremos menos de 1 Kg de aceite esencial. Esto no sólo obliga a optimizar la destilación, sino a contar con muchas toneladas de hierba a destilar, inclusive con muchas personas que provean de la hierba. (13)

En el laboratorio, pesamos con la balanza de precisión, la hierba colocada a destilar y medimos el volumen de aceite obtenido. Conociendo la densidad de dicho aceite, y utilizando la fórmula:

Densidad del aceite * volumen de aceite= masa del aceite obtenido (13)

1.8.4 ESTRUCTURA QUÍMICA

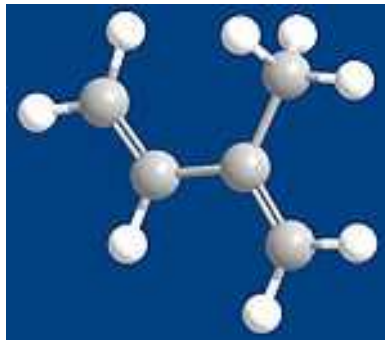


FIGURA N. 4

ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ISOPRENO, LA UNIDAD QUÍMICA DE LOS TERPENOIDES, COMPUESTO PRINCIPAL DE LOS ACEITES ESENCIALES.

FUENTE: http://www.es.wikipedia.org/Aceites_Esenciales

Están formados principalmente por terpenoides volátiles, formados por unidades de isopreno unidas en estructuras de 10 carbonos (monoterpenoides) y 15 carbonos (sesquiterpenoides). Las sustancias responsables del olor suelen poseer en su estructura química grupos funcionales característicos: aldehídos, cetonas, ésteres, etc.

Cada aceite lo integran por lo menos 100 compuestos químicos diferentes, clasificados como aldehídos, fenoles, óxidos, ésteres, cetonas, alcoholes y terpenos. También puede haber muchos compuestos aún por identificar. (31)

1.8.5 PROPIEDADES

Todos los aceites esenciales son antisépticos, pero cada uno tiene sus virtudes específicas, por ejemplo pueden ser analgésicos, fungicidas, diuréticos o expectorantes. La reunión de componentes de cada aceite también actúa conjuntamente para dar al

aceite una característica dominante. Puede ser como el de manzanilla, refrescante como el de pomelo, estimulante como el aromático de romero o calmante como el clavo. (13)

1.8.5.1 Propiedades físico - químicas de los aceites esenciales

Las propiedades físico-químicas de los aceites esenciales o esencias son muy diversas, puesto que el grupo engloba sustancias muy heterogéneas, de las que en la esencia de una planta, prácticamente puede encontrarse solo o más de 30 compuestos. (1)

El rendimiento de esencia obtenido de una planta varía de unas cuantas milésimas por ciento de peso vegetal hasta 1-3 %. La composición de una esencia puede cambiar con la época de la recolección, el lugar geográfico o pequeños cambios genéticos.

1.8.5.2 Propiedades físicas de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, muy raramente tienen color y su densidad es inferior a la del agua (la esencia de safrán o de clavo constituyen excepciones). Casi siempre dotadas de poder rotatorio, tienen un índice de refracción elevado. Solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, son liposolubles y muy poco soluble en agua, son arrastrable por el vapor de agua.

1.8.5.3 Inconvenientes de los aceites esenciales:

- Sabor bueno pero incompleto y mal distribuido.
- Se oxidan fácilmente.
- No contienen antioxidante natural.
- Se alteran fácilmente.
- Muy concentrados, por lo tanto difíciles de dosificar.

- No se dispersan fácilmente, sobre todo en los productos secos. (31)

1.8.5.4 Ventajas

- Higiénicos, exentos de bacterias, etc.
- Sabor suficientemente fuerte.
- Calidad del sabor conforme con la materia prima.
- No colorea el producto.
- Exento de enzimas y taninos.
- Estable si está bien almacenado.(31)

1.9 MOSCA DE LA FRUTAS *Drosophila melanogaster*

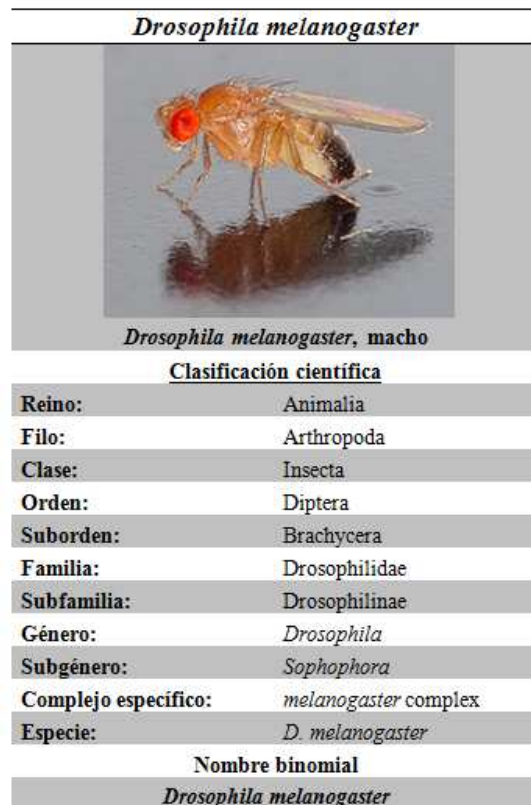


FIGURA N. 5

INSECTO ADULTO DE LA FRUTA *Drosophila melanogaster*

FUENTE: http://es.wikipedia.org/wiki/Drosophila_melanogaster

Mosca de la fruta, nombre común de dos familias de moscas verdaderas (con dos alas), cuyas larvas se alimentan de materia vegetal fresca o en descomposición.

Las larvas hacen túneles en la pulpa se entierran en el suelo a una profundidad de unos 3 cm, dañando los frutos disminuyendo su valor nutritivo y económico provocando pérdidas considerables tanto en las plantaciones como al momento de comercializarlas debido a su aspecto y a su presentación. (2) (17)

1.9.1 CICLO DE VIDA

Drosophila melanogaster por ser un organismo de metamorfosis completa, presenta: huevo, larva (tres estados), pupa e imago. El desarrollo completo de la mosca posee un tiempo de duración aproximado de nueve (27) días en condiciones ambientales óptimas (temperatura, pH y medio de cultivo adecuado). (17)

El desarrollo embrionario se produce dentro del huevo, originándose una larva que pasa por tres estadios (2 mudas), y varios tejidos de la larva están constituidos por células que contienen cromosomas politénicos.

Durante la fase de pupa se produce la metamorfosis, en la que se destruyen la mayor parte de las células de la larva y se forman las estructuras externas del adulto (imago), a partir de estructuras larvales denominadas "discos imaginales". (17)

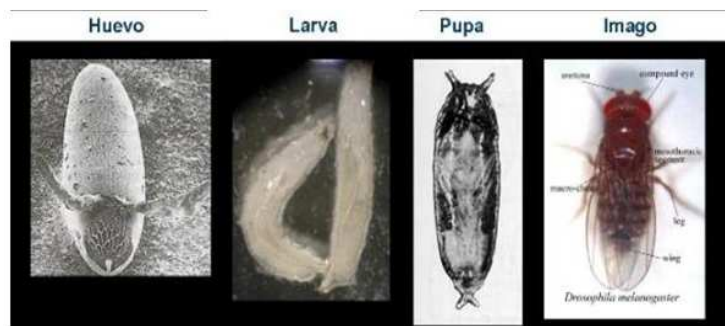


FIGURA N. 6 CICLO BIOLÓGICO GUSANO DE LA FRUTA *D. melanogaster*
FUENTE: ASHBURNER M.

Finalizada la metamorfosis, la pupa se abre por la parte superior y emerge el adulto. Pasadas 8 horas tras la eclosión de la pupa, las hembras adultas pueden ser fecundadas.

1.9.1.1 Huevo (0.5 mm.)

Las hembras adultas son capaces de poner huevos dos días después de emerger del estado de pupa, la puesta aumenta por día durante una semana hasta 50 o 75 huevecillos por día. Los ponen sobre la superficie del alimento. El huevo es ovoide, con dos pequeñas proyecciones que emergen de un extremo, éstas son aplanadas y la sirven al huevecillo para que no se hundan en el medio de cultivo. Los huevos se pueden ver a simple vista sobre la superficie del alimento. El desarrollo embrionario del huevo tarda aproximadamente 1 día a 25° C. La larva emerge del huevo. (2)

1.9.1.2 Larva (4-5 mm.)

Es blanca, segmentada y vermiforme. Tiene partes bucales de coloración negra (ganchos mandibulares) en una región cefálica estrecha, que penetran en el alimento comiendo vorazmente. No tiene ojos por lo que este animal es completamente ciego. Las larvas tampoco tienen apéndices y deben empujarse comiendo para desplazarse por su ambiente. Respiran por tráqueas y poseen un par de espiráculos visibles (poros aéreos) en los extremos anteriores y posteriores del cuerpo.

La fase larvaria en el ciclo de *Drosophila* es una de rápido comer y crecer. Consiste de tres subdivisiones llamadas estadios. El primero y segundo estadio terminan en mudas cada muda implica una eliminación completa de la piel y partes orales de la larva y es el mecanismo por medio del cual esta crece. El tercer estadio termina en la pupación. Inmediatamente antes de la pupación la larva deja de comer, se arrastra hacia una superficie relativamente seca, y se revierte sus espiráculos anteriores. La fase larvaria dura alrededor de 4 días a 25° C, es ese momento el tercer estadio y mide aproximadamente 4.5 mm de largo. (2)

1.9.1.3 Pupa (3mm.)

La pupa es considerada la fase re organizativa del ciclo de las mosca, durante el cual la mayoría de las estructuras larvarias son destruidas y las estructuras adultas se desarrollan a partir de tejidos embrionarios llamados anlagen (o también discos imaginables). Estos tejidos embrionarios han permanecido latentes en el animal desde su diferenciación en el huevo. El animal en pupa dentro de la última piel larvaria, la cuál es en un inicio suave y blanca pero gradualmente se endurece y adquiere un color más oscuro. Los cambios anteriores resultan en el desarrollo de un individuo con la forma corporal y las estructuras del adulto (imago). La fase de pupa tarda alrededor de 4 días a 25° centígrados, el adulto emerge del pupario. (2)

2.4.3.5. Adulto (2 mm.)

El adulto es considerado la fase reproductiva del ciclo. La mosca emerge o eclosiona del pupario forzando su salida por el extremo anterior del pupario. En un inicio, la mosca adulta es de forma elongada con las alas no expandidas. En una hora, las alas se expanden y el cuerpo gradualmente adquiere una forma de adulto más definitiva. En un inicio los adultos son de un color relativamente claro, dentro de las primeras pocas horas se obscurecen y adquieren el color característico. Los adultos de *D. melanogaster* pueden aparearse 6 horas después de haber emergido del pupario. El esperma es almacenado en las espermáticas y en los receptáculos ventrales de la hembra y es liberado gradualmente al oviducto a medida que se producen los huevos pasados por el oviducto a la vagina. La hembra empieza a depositar huevos aproximadamente a los 2 días de haber emergido, puede depositar hasta 50 a 75 huevos por días durante los primeros días. Después la producción de huevos disminuye. El promedio de vida de las moscas adultas es de 37 días a 25° C. (2)

CAPÍTULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO.

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fotoquímica de la Facultad de Ciencias y en el laboratorio del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en función a las diversas determinaciones y ensayos que se debieron realizar.

2.2 FACTORES DE ESTUDIO

Se consideraron como factores de estudio a los insectos o plagas de, *Drosophila melanogaster* y el comportamiento que éstos tuvieron frente a la composición de los aceites esenciales del Tzinsu *Tagetes minuta* y Zorrillo *Tagetes zipaquirensis*.

2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- *Drosophila melanogaster* ojos rojos cuerpos oscuros

2.3.2 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

Para la elección de la materia prima fue razonado el lugar de recolección en dependencia de su accesibilidad, disponibilidad, además se tomó en consideración el mayor porcentaje de principio activo que posee en cada una de sus partes, otro factor a considerar fue la temporada de recolección.

CUADRO N. 2 VEGETAL ELEGIDO PARA LA OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL, LUGAR DE PROCEDENCIA.

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	LUGAR DE PROCEDENCIA
TZINSU	<i>Tagetes minuta</i>	Provincia de Cotopaxi Cantón Latacunga

FUENTE: CRISTIAN COFRE

2.3.3 OBTENCIÓN DE LOS INSECTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA.

Para la realización de esta investigación se procedió a la obtención de la plaga que perjudica a los cultivos de frutas producidos en el Ecuador.

CUADRO N. 3 INSECTO PLAGA, LUGAR DE PROCEDENCIA Y CULTIVO AL QUE AFECTA.

INSECTO PLAGA	LUGAR DE PROCEDENCIA	CULTIVO AL QUE AFECTA
<i>Drosophila melanogaster</i>	Donado por el Departamento de Ciencia Biológicas de la facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH.	Cultivo de frutales en general

FUENTE: CRISTIAN COFRE

2.3.4 OBTENCIÓN DE MATERIALES PARA LA ALIMENTACIÓN DE LOS INSECTOS.

- Para la alimentación de *D. melanogaster* en la preparación de su medio de alimentación se utilizaron plátano maduro y guineo ceda, adquiridas en los mercados de la ciudad de Riobamba en perfecto estado.

2.3.5 EQUIPOS

- Balanza analítica (Boeco)
- Estufa de secado y esterilización (FANEM 315 SE)
- Refractómetro (WARSAWA)
- Reverbero Eléctrico
- Computadora Hp (Pavillo dv4)
- Balanza técnica (ELB 300)
- pH metro (JENWAY 430)
- Autoclave
- Refrigeradora
- Cámara Digital

2.3.6 MATERIALES DE LABORATORIO

- Dean star
- Refrigerante simple
- Soporte universal
- Pipetas volumétricas
- Pinzas universales
- Balón de reflujo de 250 mL
- Balón de Aforo de 50 mL
- Matraz
- Pera de succión
- Varilla de Agitación
- Tijeras
- Ollas
- Balón de reflujo de 1000 mL
- Mangueras
- Probetas
- Pipetas 1, 5, 10 mL
- Corchos
- Balones de aforados
- Vasos de precipitación
- Bureta de 50 mL
- Esponjas
- Pincel N. 0
- Papel indicadores de acidez
- Cuchillos

- Tarrinas plásticas
- Gradilla
- Mascarilla
- Cocina a Gas
- Guantes
- Papel Toalla

2.3.7 REACTIVOS

- Ácido Propiónico
- Hidróxido de Sodio 0.1 M
- Alcohol etílico neutro
- Fenolftaleína
- Reactivo de Sudan.
- Alcohol Etílico al 95%
- Hidróxido de Potasio 0.5%
- Ácido Clorhídrico 0.5 M
- Solución reguladora de pH

2.4 TÉCNICAS

2.4.1 OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE TZINSU (*Tagetes minuta*)

La cuantificación se realizó por un método de arrastre de vapor en el que se procede de la siguiente forma:



FOTOGRAFÍA N° 1

EQUIPO DE OBTENCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES.
FUENTE: CRISTIAN COFRE

Utilizando un aparato perfectamente limpio. Un balón de 500mL pesar 30g de planta previamente troceada e introducir 200mL de agua destilada y algunos fragmentos de porcelana porosa. Colocar en el aparato de Dean Star en el tubo graduado 2mL de tolueno y proceder a conectar un refrigerante con corriente de agua; posteriormente adaptar el balón al equipo. Calentar el líquido del balón hasta que se inicie la ebullición y proceder al arrastre de vapor hasta el momento en el que se evidencie una ausencia de líquido en el balón. Destilar durante al menos 2 horas. Detener la calefacción, dejar transcurrir al menos 10 minutos, leer el volumen del líquido recogido en el tubo graduado. Restar el volumen total del volumen de tolueno determinado anteriormente. La diferencia representa la cantidad de aceite esencial en la muestra. Calcular el resultado en mililitros por Kilogramo de droga.

$$\mathbf{V \text{ Aceite Esencial} = V \text{ Tolueno} - V \text{ Total}}$$

2.4.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes minuta*

2.4.2.1 Reacción para identificación de aceites y grasas

Ensayo de Sudan.- Para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de la extracción, se añade 1mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente. La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente. (16)



FOTOGRAFÍA N° 2

REACCIÓN DE SUDAN III PARA IDENTIFICACIÓN DE ACEITES
FUENTE: CRISTIAN COFRE

2.4.2.2 Reacciones para identificación de alcaloides

Ensayo de Dragendorff.- Para ello, si la alícuota del aceite está disuelta en un solvente orgánico, éste debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado. (Calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++). (16)

Ensayo de Mayer.- Se procede de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++). (16)

Ensayo de Wagner.- Se procede de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida, añadir 2 o 3 gotas de reactivo, clasificando los resultados de la misma forma. (16)

2.4.2.3 Reacción para identificación de Lactonas y Cumarinas

Ensayo de Baljet.- Para ello, si la alícuota del aceite no se encuentra en alcohol debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente. (16)

2.4.2.4 Reacción para identificación de triterpenos y esteroides

Ensayo de Liebermann - Buchard.- Para ello, si la alícuota del aceite no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de anhídrido y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se deja resbalar 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración. (16)

- 1.- Rosado - Azul muy rápido.
- 2.- Verde intenso - Visible aunque rápido
- 3.- Verde oscuro - Negro final de la reacción.

2.4.2.5 Reacción para identificación de catequinas

Ensayo de Catequinas.- Para ello se toma del aceite una gota con la ayuda de un capilar se aplica la solución sobre papel filtro sobre la mancha aplique una solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV indica un ensayo positivo. (16)

2.4.2.6 Reacción para identificación de resinas

Ensayo de Resinas.- Para detectar este tipo de compuestos, se adiciona a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada, la aparición de un precipitado indica un ensayo positivo. (16)

2.4.2.7 Reacción para identificación de saponinas

Ensayo de Espuma.- El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

2.4.2.8 Reacción para identificación de compuestos fenólicos

Ensayo de Cloruro Férrico.- Si el aceite de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Cloruro de sodio al 0,9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. (16)

A una alícuota del extracto se le añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- 1.- Desarrollo de una coloración rojo – vino compuestos fenólicos en general.
- 2.- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- 3.- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalactónicos. (16)

2.4.2.9 Reacción para identificación de aminoácidos

Ensayo de Ninhidrina.- Se toma una alícuota del aceite en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2% de Ninhidrina en agua. La mezcla se calienta de 5 a 10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo. (16)

2.4.2.10 Reacción para identificación de quinonas

Ensayo de Borntrager.- Si la alícuota del aceite no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en la reacción. Si la fase alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++). (16)

2.4.2.11 Reacción para identificación de flavonoides

Ensayo de Shinoda.- Si la alícuota del aceite se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. (16)

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo: intensos en todos los casos.

2.4.2.12 Reacción para identificación de antocianidina

Ensayo de Antocianidina.- Se calientan 2 mL del aceite por 3 min. Con 1 mL de HCl (c). Se agita y se deja separar las 2 fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo. (16)

2.4.3 DETERMINACIÓN DE LA PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS

2.4.3.1 Color

Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación de capas. Se informa los resultados.

2.4.3.2 Olor

Se toma un tira de papel secante aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

2.4.3.3 Apariencia

Análisis del aspecto externo.

2.4.3.4 Sabor

Apreciar determinadamente la sensación que ciertas sustancias producen en el órgano del gusto.

2.5 PROPIEDADES FÍSICAS.

2.5.1 DENSIDAD RELATIVA

Se entiende por densidad relativa a la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

$$D(25^{\circ}C) \frac{M1 - M}{M2 - M}$$

Donde:

M1: Peso de picnómetro con la muestra (g)

M2: Peso del picnómetro con agua (g)

M: Peso del picnómetro vacío (g)

2.5.1.1 Procedimiento

Primeramente se pesó el picnómetro vacío y seco a 25 °C y se llenó con la porción de ensayo, se mantuvo a temperatura de 25 °C (+/- 1 °C) durante 15 min. Y se ajustó el líquido al nivel empleado, con una tira de papel se extrajo el exceso y secó exteriormente el picnómetro.

Se pesó cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repitió la operación con el agua destilada a 25 °C, y después se limpió el picnómetro.

2.5.2 DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Esta relación viene dada por la ecuación siguiente:

$$\eta = \frac{\text{Sen } i}{\text{Sen } r}$$

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente.

2.5.2.1 Procedimiento

Se colocó sobre el prisma de medición un gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparecen en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claros y oscuros.

Después se realizó el ajuste del refractómetro. Se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfocó hacia la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma indicó la temperatura de entrada del prisma de medición y se procedió de igual manera que el agua.

2.5.2.2 Expresión de resultados

Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas; dos o más lecturas no difieren en más de 0.002.

Las determinaciones no se efectuaron a la temperatura de referencia y se empleó la fórmula siguiente:

$$N_d^{25} = N_d^t + 0.00044(t - 25)$$

N_d^{25} = Índice de refracción a 25°C

N_d^t = Valor leído en la escala del refractómetro a la temperatura t

t = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044 = Factor de corrección por grado Celsius

2.5.3 DETERMINACIÓN DE pH

El pH es un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menos acidez de una solución en función de los iones hidrógeno. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$\text{pH} = -\log a[\text{H}^+]$$

$$a[\text{H}^+] = \text{Actividad de los iones hidrógeno}$$

En la práctica, la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea digital o analógico.

Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo. (26)

2.5.3.1 Procedimiento

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango que se realizó la determinación. Posteriormente se determinó el valor del pH de la muestra. Los resultados dieron apreciando hasta la decima.

2.5.4 DETERMINACIÓN DE SOLUBILIDAD EN ALCOHOL

Se dice que el aceite esencial es soluble en número de volúmenes (20 como máximo) de alcohol etílico de determinada graduación, si el volumen mínimo de alcohol adicionado para obtener una solución límpida es el número de veces el volumen de aceite esencial.

2.5.4.1 Procedimiento

Se mide con pipeta 1 mL de aceite esencial previamente enfriado a 20°C, el cual se lleva una probeta de 25 mL, por medio de una bureta se añade el alcohol de la graduación a ensayar gota a gota el aceite, agitando con frecuencia.

Cuando se obtiene una solución límpida, se registra el volumen consumido.

2.6 PROPIEDADES QUÍMICAS

En los aceites esenciales pueden realizarse determinaciones cuantitativas de grupos y componentes que corresponden a una misma función, atribuyendo en porcentaje de los mismos al componente en particular que presente mayor porción.

2.6.1 ÍNDICE DE ACIDEZ

Se peso exactamente 2g del aceite a ensayar. Se añade alcohol etílico al 95% (neutralizado) un volumen igual en mg a 5 veces al peso de la muestra y 5 gotas de fenolftaleína. Se agitó hasta total disolución y se valoró con solución alcohólica de KOH 0.1 M



FOTOGRAFÍAS N.3

DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE ACIDEZ
FUENTE: CRISTIAN COFRE

El índice de acidez se calcula por la fórmula siguiente:

$$IA = \frac{56.1 * V * C}{g}$$

Donde

V= mL de KOH mol/L consumidos

C= Concentración en equivalentes de KOH expresados en mg

56.1= mili equivalentes de KOH expresados en mg

g= Peso de la muestra en gramos

2.6.2 ÍNDICE DE ÉSTERES

Se pesó exactamente de 2 a 5 g de la muestra en el frasco de saponificación, se añade alcohol etílico al 95%, un volumen igual a 5 veces el peso de la muestra y tres gotas de solución indicadora de fenolftaleína, neutralizando después los ácidos con solución acuosa de NaOH 0.1mol/mL, se añade 10 mL de solución alcohólica de KOH 0.5 mol/L medidos exactamente y algunos fragmentos de plato poroso y se ajusta al condensador de reflujo al frasco de saponificación, reflujiendo en baño María durante 1 hora. Se deja enfriar y se añade al condensador 10 mL de alcohol etílico neutro. Se desmonta el condensador, se añade 5 gotas de solución indicadora de fenolftaleína y se valora con exceso de álcali con HCl 0.5 mol/mL. Paralelamente con el ensayo de la muestra se realiza un ensayo en blanco.

El índice de ésteres se calcula por la fórmula siguiente, teniendo en cuenta el índice de acidez:

$$IE = \frac{56.1 * (V_A - V_B) * N}{g}$$

Donde

56.1= mili equivalentes de KOH expresados en mg

V_A = mL de KOH 0.1 mol/L consumidos

V_B = mL de KOH 0.1 mol/L consumido en el ensayo de blanco

N = Concentración de la solución de NaOH 0.1 Eq/L

g = Peso de la muestra en gramos

2.6.3 PORCENTAJE DE ÉSTERES

Se determina mediante la siguiente ecuación.

$$\%IE = \frac{56.1 * (V_A - V_B) * N}{10g}$$

Donde

56.1= mili equivalentes de KOH expresados en mg

V_A = mL de KOH 0.1 mol/L consumidos

V_B = mL de KOH 0.1 mol/L consumido en el ensayo de blanco

N = Concentración de la solución de NaOH 0.1 Eq/L

10g= Peso de la muestra en gramos

2.7 METODOLOGÍA

2.7.1 FASE DE CAMPO

Se realizó la recolección del material vegetal de los campos de la Latacunga provincia del Cotopaxi, se recolectó las partes teóricamente con una mayor concentración del principio activo como son las flores, hojas y el tallo. El material recolectado se hizo bultos debidamente etiquetados y se trasladado al Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias.

Además se realizó la obtención y el cuidado de insectos adultos para la producción del pie de cría de Laboratorio.

2.7.2 FASE DE LABORATORIO

En la fase de laboratorio se realizó el siguiente procedimiento para la determinación de la actividad insecticida de los aceites esenciales de Tzinsu, *Tagetes minuta* y Zorrillo, *Tagetes zipaquirensis*

- Crianza de los insectos plaga
- Obtención de los insectos adultos de *D. melanogaster*.
- Ensayo de la actividad insecticida.
- Determinación de la DL₅₀.

También se debió realizar un tratamiento estadístico de los datos.

- Análisis de varianza.
- Separación de medias utilizando la prueba de Tukey al 5%.
- Análisis de regresión y correlación para la determinación de la DL₅₀ de los extractos con actividad insecticida.

2.7.3 MÉTODOS DE CRIANZA DE INSECTOS

2.7.3.1 Crianza de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*

1. Se realizó la captura de los adultos de la mosca, los mismos que se colocaron en frascos de vidrio que contenían el siguiente medio que servirá para alimentarlas y desarrollar sus crías.
2. Para 1 litro de medio se utilizó 250g de maduro, 250 g guineo ceda, 500 mL de agua destilada, 250 g de levadura seca y desactivada y 3 - 4 mL de ácido propiónico

Preparación:

1. Para preparar el medio los materiales son esterilizados, se pesa los ingredientes, para luego proceder a licuar el maduro y el guineo con 200 mL de agua y luego añadir el ácido propiónico.
2. Luego en un recipiente mezclar Bacto agar o su similar gelatina sin sabor, con 300 mL de agua y llevar esta mezcla a ebullición.
3. Una vez disuelta la gelatina se agrega la mezcla licuada anteriormente, y se bate constantemente evitando que se quemé hasta que adquiera una coloración café.
4. Colocar el medio en los frascos esterilizados y esperar que se solidifique.
5. Aquí ya se puede colocar los adultos de la mosca para que inicien su reproducción. Se puede identificar las moscas según su aparato reproductor, para adormecerlos se introduce los frascos a un congelador por unos minutos para luego sacarlos sobre una superficie de hielo e identificarlos.

2.7.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA

- Una vez obtenidos los aceites esenciales de *Tzinsu T. minuta* y *Zorrillo T. zipaquirensis* procedemos a realizar pruebas preliminares en insecto adulto de *D. melanogaster*, para comprobar la eficacia de los aceites a diferentes concentraciones.

- Los aceites se administran en las dietas de cada uno de los insectos.
- Después se procedió a colocar 7 moscas adultas hembras y 3 mosca adultos machos.
- Se registra la mortalidad, comparado con el control negativo (tratamiento con agua) y un control positivo con un insecticida comercial (Campex).



FOTOGRAFÍA N. 4 ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES
FUENTE: CRISTIAN COFRE



FOTOGRAFÍA N. 5 ELABORACION DEL MEDIO DE CULTIVO
FUENTE: CRISTIAN COFRE



FOTOGRAFÍA N. 6 REPARTO DE MEDIOS EN FRASCOS
FUENTE: CRISTIAN COFRE



FOTOGRAFÍA N. 7 DISTRIBUCIÓN DE INSECTOS
FUENTE: CRISTIAN COFRE



FOTOGRAFÍA N. 8 PIE DE CRÍA DE *Drosophila melanogaster*
FUENTE: CRISTIAN COFRE

2.8 DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀

La Dosis Letal 50 es una medida estadística que determina la capacidad que tienen los aceites esenciales de inhibir el crecimiento y/o eliminar la plaga en sus fases de madurez o reproducción y se calcula por medio de la curva de regresión lineal.

Para determinar la DL₅₀ de vegetales que muestran actividad insecticida se utilizó las distintas concentraciones al 0.5; 1.25; 2.5; 5% de aceites esenciales suministradas en la dieta de las moscas. Se estableció el número de adultos muertos. Mediante regresión lineal se determinó la concentración capaz de inhibir el crecimiento y/o reproducción y eliminar a los insectos en estado reproductivo.

2.9 TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó 5 tratamientos de aceite esencial de *Tzinsu T. minuta* y 5 tratamientos de aceite esencial de Zorrillo *T. zipaquirensis* con 5 repeticiones en cada tratamiento para la determinación de la actividad insecticida de los aceites esenciales de los vegetales y además se realizaron pruebas en blanco y con un insecticida comercial para destacar la crianza normal del insecto, *Drosophila melanogaster*.

CUADRO N. 4 CÓDIGOS Y TRATAMIENTOS REALIZADOS CON LOS ACEITES ESENCIALES DE TINSU *T. minuta* Y ZORRILLO *T. zipaquirensis* FRENTE A *Drosophila melanogaster*. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS Y DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH OCTUBRE 2010

TRATAMIENTOS		CONTROL POSITIVO	MEDIO NATURAL
T1C1R1	T2C1R1	CAR1	CBR1
T1C1R2	T2C1R2	CAR2	CBR2
T1C1R3	T2C1R3	CAR3	CBR3
T1C1R4	T2C1R4	CAR4	CBR4
T1C1R5	T2C1R5	CAR5	CBR5
T1C2R1	T2C2R1		
T1C2R2	T2C2R2		
T1C2R3	T2C2R3		
T1C2R4	T2C2R4		
T1C2R5	T2C2R5		
T1C3R1	T2C3R1		
T1C3R2	T2C3R2		
T1C3R3	T2C3R3		
T1C3R4	T2C3R4		
T1C3R5	T2C3R5		
T1C4R1	T2C4R1		
T1C4R2	T2C4R2		
T1C4R3	T2C4R3		
T1C4R4	T2C4R4		
T1C4R5	T2C4R5		
2A x 4C x 5R = 40 UE			

FUENTE: CRISTIAN COFRE

2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se tabularon y se determinaron las medias de las distintas lecturas para realizar el análisis de varianza, separación de medias y análisis de regresión y correlación.

2.10.1 ANÁLISIS DE VARIANZA

Es un procedimiento estadístico que sirve para medir la variación total de las observaciones, la que se divide para sus componentes, quedando el residuo como error

experimental. Este análisis indica la relación entre una variable dependiente (actividad insecticida) y los factores independientes (concentraciones aceites esenciales) aceite esencial *T. minuta*, *T. zipaquirensis*

El análisis de varianza es un método para comparar dos o más medias de las observaciones o de los tratamientos, permite medir la variación de las respuestas numéricas como valores de evaluación de diferentes variables nominales. En esta investigación de análisis de varianza permitió establecer la relación entre una variable dependiente (actividad insecticida) y un factor independiente (concentración de aceites esenciales) (8)

2.10.2 PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS PRUEBA DE TUKEY AL 5%

La prueba de Tukey al 5% es un procedimiento empleada para determinar las diferencias existentes entre las medias de los tratamientos realizados. (19)(8)

2.10.3 COEFICIENTE DE VARIACIÓN

Indica el nivel de confianza que se puede tener en los datos, un valor bajo indica que el ensayo ha sido bien planificado y ha tenido un buen manejo, en tanto que un valor alto puede ser indicador en ciertos casos de lo contrario. (19)(8)

2.10.4 ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y CORRELACIÓN

La DL_{50} se realizó con la curva de regresión ajustada de las concentraciones más activa del aceite esencial frente a la mortalidad de *Drosophila melanogaster*.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CUANTIFICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PRESENTES EN EL TZINSU *Tagetes minuta*.

3.1.1 CUANTIFICACIÓN DE HOJAS Y TALLOS

En base al método de cuantificación por arrastre de vapor se tiene:

Masa Muestra = 30g de hojas y tallos

Volumen de tolueno = 2.0 mL

Volumen del Producto Final = 2.32 mL

V Aceite Esencial_H = V Total - V Tolueno

V Aceite Esencial_H = 2.32 mL - 2ml

V Aceite Esencial_H = 0.32 mL

$$\frac{0.32 \text{ mL de aceite esencial}}{30 \text{ g hojas y tallos}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} = 10.67 \frac{\text{mL de aceite esencial}}{\text{Kg hojas y tallos}}$$

3.1.2 CUANTIFICACIÓN DE FLORES

En base al método de cuantificación por arrastre de vapor se tiene:

Masa Muestra = 30 g flores

Volumen de tolueno = 2.0 mL

Volumen del Producto Final = 2.73 mL

V Aceite Esencial_H = V Total – V Tolueno

V Aceite Esencial_H = 2.52 mL - 2mL

V Aceite Esencial_H = 0.52 mL

$$\frac{0.52 \text{ mL de aceite esencial}}{30 \text{ g de flores}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} = 17.33 \frac{\text{mL de aceite esencial}}{\text{Kg de flores}}$$

Cuadro N.5 Volumen de aceite esencial por Kg de vegetal Tzinsu (*Tagetes minuta*)

HOJAS Y TALLOS	FLORES
10.67 mL	17.33mL

FUENTE: CRISTIAN COFRE

3.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

En la tabla de los principales grupos fitoquímicos o metabolitos secundarios investigados en el extracto de Tzinsu, se han analizado cualitativamente mediante pruebas de reacción de coloración y de precipitación permitiendo una identificación rápida por medio de reacciones sensibles y reproducibles.

TABLA N.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE TZINSU (*Tagetes minuta*)

ENSAYOS	RESULTADO
SUDAN III	+++
DRAGENDORF	Opalescencia + Turbidez +
MAYER	Opalescencia + Turbidez +
WAGNER	Opalescencia + Turbidez + Precipitado +
BALJET	-
LIBERMAN – BUCHARD	Triterpenos y/o Esteroides +
CATEQUINAS	+
RESINAS	-
SAPONINAS	+
FeCl ₃	Taninos pirocatecolicos (verde intenso)
NINHIDRINA	-
BÖRNTRAGER	+
SHINODA	+
ANTOCIANIDINAS	+

+++ MUY EVIDENTE ++ EVIDENTE + POCO EVIDENTE - NEGATIVO
 Fuente: Cristian Cofre

3.2.1 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE TZINSU *Tagetes minuta* Y ZORRILLO *Tagetes zipaquirensis*

CUADRO N.6 ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DE LOS ACEITES ESENCIALES (MÉTODO HIDRODESTILACIÓN)

CARACTERÍSTICAS	ACEITE ESENCIAL TZINSU	ACEITE ESENCIAL ZORRILLO
COLOR	Amarillo Intenso	Amarillo rojizo
OLOR	Aromático picante	Aromático picante fuerte
SABOR	Amargo mentolado	Amargo mentolado picante
ASPECTO	Transparente	Trasparente

Fuente: Cristian Cofre

El análisis organoléptico de los aceites defiere en todas las características excepto el color siendo las más notables en el olor y sabor.

3.2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DEL TZINSU (*Tagetes minuta*)

Cuadro N.7 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. minuta*

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS	ACEITE ESENCIAL <i>T. minuta</i>
pH	3.42
DENSIDAD g/mL	0.85
INDICE DE REFRACCIÓN	1.487
SOLUBILIDAD EN ETANOL DE 96° V. (mL)	1:6.7

Fuente: Cristian Cofre

El pH del aceite esencial de Tzinsu obtenido por hidrodestilación es literalmente ácido.

3.2.3 RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL POR HIDRODESTILACIÓN DE TZINSU *Tagetes minuta*

Cuadro N. 8 Rendimiento del aceite esencial de Tzinsu por hidrodestilación

MUESTRA	ACEITE ESENCIAL	RENDIMIENTO
20 Kg de Vegetal	73.51 g	0.36 %

Fuente: Cristian Cofre

Cuadro N. 9 Rendimiento del aceite esencial de Zorrillo por hidrodestilación

MUESTRA	ACEITE ESENCIAL	RENDIMIENTO
17 Kg de Vegetal	26.81 g	0.16 %

Fuente: Cristian Cofre

3.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DEL TZINSU (*Tagetes minuta*)

Cuadro N. 10 aceite esencial *T. minuta*, características químicas (Método Hidrodestilación)

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	ACEITE ESENCIAL TZINSU <i>Tagetes minuta</i>
Índice de acidez (mg NaOH 0.1N)	4.76
Índice de éster (mg KOH 0.1N)	49.09
% Ésteres	4.91%

Fuente: Cristian Cofre

3.4 RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES DE ACEITE ESENCIAL DE TZINSU (*Tagetes minuta*)

Cuadro N. 11 Compuestos del aceite esencial *T. minuta*.

COMPUESTO	NOMBRE DEL COMPUESTO
1	trans – Tagetona
2	trans – Ocimeno
3	2,2- dimetil- ácido isopropánico ciclo pentil éster
4	Eucaliptol

Fuente: Coba Santamaría Pablo coordinador del CIVABI Universidad Politécnica Salesiana.

Conforme la teoría enmarcada se corroboró la presencia mediante la cromatografía de gases la presencia de la trans - Tagetona, trans - Ocimeno que son los componentes que dan la actividad insecticida al aceite esencial, seguidamente también se tienen al 2,2-dimetil- ácido isopropánico ciclo pentil éster y Eucaliptol en menores proporciones. Según los resultados otorgados por el Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) de la Universidad Politécnica Salesiana en donde se analizó el respectivo análisis cromatográfico.

3.5 CRIANZA DE INSECTOS ADULTOS DE LA MOSCA DE FRUTA *Drosophila melanogaster*

Para realizar los ensayos de actividad insecticida y/o anti alimentaria es necesario disponer de insectos en estado adulto.

El Departamento de Ciencias Biológicas de la facultad de Recursos Naturales facilitó un número pequeño de moscas adultas en oviposición, las cuales se las alimentaron con un medio de cultivo a base de guineo y maduro que se hallaban colocados en frascos de vidrio.

En este medio se colocó 7 moscas hembras y 3 moscos machos, esperando un tiempo de 21 días para tener un número suficiente, para la posterior evaluación de la actividad insecticida.

Se prepararon los bloques para el ensayo utilizando 7 moscas hembras y 3 moscos machos en estado adulto, así como se inoculó en la dieta las distintas concentraciones de aceite esencial, observando a las 3 horas la actividad insecticida para *Tagetes minuta* y de 30 segundos la actividad insecticida de *Tagetes zipaquirensis*, obteniendo los siguientes resultados.

3.6 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TZINSU (*Tagetes minuta*) Y ZORRILLO (*Tagetes zipaquirensis*)

Para la determinación de la actividad insecticida y/o anti alimentaria se incorporo los aceites esenciales por separado con diferentes concentraciones para cada tratamiento en la dieta de la mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*) y se evaluó la mortalidad y efectos causados.

3.6.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE TZINSU *T. minuta* Y ZORRILLO *T. zipaquirensis* SOBRE *Drosophila melanogaster*.

Al realizar el porcentaje de mortalidad de la *D. melanogaster* se logró establecer que el aceite esencial de *T. zipaquirensis* al 5% de concentración presentó un 98.00 % de mortalidad, siendo este valor significativamente alto puesto que corresponde a un conjunto de datos tomados a los 30 segundos después de haber levantado el ensayo, en comparación al porcentaje de mortalidad del 100.00% que presentó el tratamiento con una concentración de aceite esencial al 5% de un conjunto de datos que tomó a las 3 horas después de haber levantado el ensayo. Siendo el aceite esencial de *T. zipaquirensis* al 5% mucho más efectivo que el aceite esencial de *T. minuta*

CUADRO N. 12 PORCENTAJE MEDIO DE MORTALIDAD DE *D. melanogaster* AL 1 DÍA CRÍTICO DE ANÁLISIS, FRENTE A LOS ACEITES ESENCIALES. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA OCTUBRE DEL 2010.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	ACEITE ESENCIAL <i>T. minuta</i>	CÓDIGO	ACEITE ESENCIAL <i>T. zipaquirensis</i>
T1	T1C1	30.00%	T2C1	12.00%
T2	T1C2	82.00%	T2C2	44.00%
T3	T1C3	96.00%	T2C3	76.00%
T4	T1C4	100.00%	T2C4	98.00%
T5	C _B	0.00%	C _B	0%
T6	C _A	100.00%	C _A	100%

Fuente: Cristian Cofre

3.7 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. minuta* SOBRE *D. melanogaster*.

En el análisis de varianza correspondiente a las 3 horas presentado en el Cuadro N.13 se determinó que existe diferencia notable en el tratamiento T1 y T2, y poca diferencia en los tratamiento T3 y T4 que existe en los tratamientos, así como también se determinó el

coeficiente de variación que es del 7.45% indicándonos que el experimento esta correctamente ejecutado, este valor es considerando como permisible, al tener como limite tolerable el 30% de coeficiente de variación.

CUADRO N. 13 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. minuta* SOBRE *D. melanogaster* A LAS 3 HORAS CRÍTICAS DE ANÁLISIS. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA OCTUBRE DEL 2010.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F. CALCULADA	F. TABULAR 5% - 1%
Total	29	460.80			
Tratamientos	5	454.80	90.96	363.84	2.62 – 3.90
Error	24	6	0.25		

Coeficiente de Variación = 7.35 %

FUENTE: CRISTIAN COFRE

Al comparar el valor factor calculado con el factor tabular tenemos que es ampliamente superado por el valor F. calculado para los niveles 5 y 1% indicando que el comportamiento de la *Drosophila melanogaster* en relación a la concentración del aceite es diferente. El valor de la media cuadrática de los tratamientos (90.96) es mayor que la media cuadrática del error (0.25) declarando los resultados del experimento como significativos, otorgando así que los tratamientos pertenecen a poblaciones uniformes.

3.7.1.1 Prueba de Tukey al 5% para la determinar la actividad insecticida del aceite esencial de *T. minuta* sobre *Drosophila melanogaster*.

Alrededor de la prueba de Tukey al 5% presentado en el Gráfico N.1 se establece una comparación neta entre los 6 tratamientos aplicados a las moscas adultas de *D. melanogaster* a las 3 horas críticas de análisis del cual se deriva 4 niveles o rangos ordenados acorde a su medida de mortalidad obtenida.

En el Cuadro N. 14 tenemos 4 rangos, donde el tratamiento con blanco tiene una mortalidad del 0.00 mientras que en el tratamiento T1 presenta un mortalidad del 3.00 existiendo una diferencia estadística con en tratamiento T2 que presenta una mortalidad de 8.20, mas no existe tal diferencia con el T3 que indica una mortalidad de 9.60. Compartiendo el primer rango o nivel casi sin presentar diferencia estadística se encuentra los T4 y T6 que es el tratamiento con el control positivos que es Campex, desde los tratamientos con Campex y el T2, T3 tenemos que fueron calificados como tratamientos capaces de matar los adulto de *D. melanogaster* a las 3 horas críticas del análisis

CUADRO N. 14 PRUEBA DE TUKEY AL 5% DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. minuta* FRENTE A *D. melanogaster*. LABORATORIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA. OCTUBRE 2010.

TRATAMIENTOS	RANGOS	MORTALIDAD
CAMPEX	A	10.00
T4	A	10.00
T3	AB	9.60
T2	B	8.20
T1	C	3.00
BLANCO	D	0.00

FUENTE: CRISTIAN COFRE

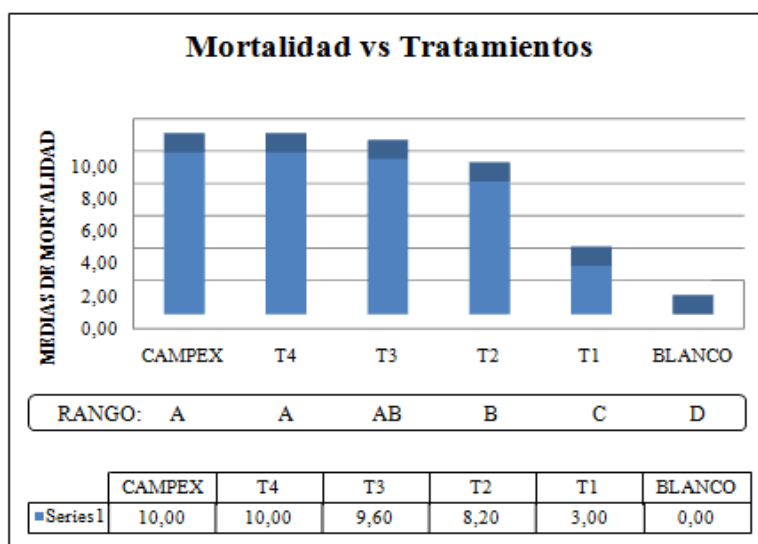


GRÁFICO N.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. minuta* APLICADAS SOBRE INSECTOS ADULTOS DE *D. melanogaster* A LAS 3 HORAS DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS FACULTAD DE RECURSOS NATURALES ESPOCH, RIOBAMBA OCTUBRE 2010.

FUENTE: CRISTIAN COFRE

En el gráfico N.1 se establece cómo mejores tratamientos al T4 con y al T3 por su alta mortalidad presentada en los tratamientos, junto con el insecticida control Campex.

3.7.1.2 Determinación de DL₅₀ de los tratamientos más efectivos sobre *Drosophila melanogaster*

De los tratamientos que se realizaron del aceite esencial de Tzinsu a sus diferentes concentraciones se procedió a indagar la concentración idónea capaz de matar al 50% de los insectos adulto de *D. melanogaster* partiendo del Cuadro N. 15

CUADRO N. 15 DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀ DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes minuta* FRENTE A *Drosophila melanogaster* LAS 3 HORAS CRÍTICAS DEL ANÁLISIS. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA OCTUBRE 2010

CÓDIGO	CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL <i>T. minuta</i>	PORCENTAJE DE MORTALIDAD
T1C1	0.50%	30.00%
T1C2	1.25%	82.00%
T1C3	2.50%	96.00%
T1C4	5.00%	100.00%
C _B		0.00%
C _A		100.00%

Fuente: Cristian Cofre

Al representar el Gráfico N. 2 de la relación dosis - respuesta, genera una curva parabólica que presenta dificultades en la construcción de un modelo lineal, por lo que las tablas de Probit son de utilidad para transformar el porcentaje de mortalidad a unidades Probit, obteniendo una ecuación de la forma.

$$Y = a + bx$$

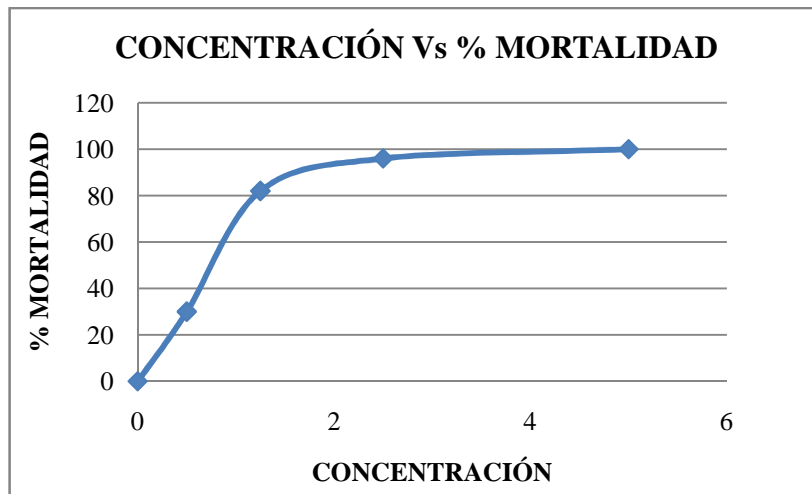


GRÁFICO N.2

CURVA DOSIS EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. minuta* APLICADAS SOBRE *D. melanogaster* A LAS 3 HORAS CRÍTICAS FRENTE A LOS DOS CONTROLES. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA OCTUBRE 2010
FUENTE: CRISTIAN COFRE

En la Tabla N.1 se representa la transformación de las dosis logaritmos y del porcentaje de mortalidad a valores Probit según tabla de transformación.

Tabla N.1 DATOS TRANSFORMADOS A VALORES PROBIT DEL PORCENTAJE DE MORTALIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DEL *T. minuta*.

CONCENTRACIÓN (%)	LOGARITMO DOSIS	MORTALIDAD (%)	PROBIT
0.50	0.6989	30.00	4.48
1.25	1.0969	82.00	5.92
2.50	1.3979	96.00	6.75
5.00	1.6990	100.00	8.09

Fuente: Cristian Cofre

La Gráfica N.3 describe la linealidad así como la ecuación antes mencionada que se obtiene por regresión lineal entre el logaritmo de la dosis (X) y los valores Probit (Y).

$$y = 3,5281x + 1,9945$$

$$R^2 = 0,9935$$

Por lo determinado en la ecuación se establece un valor de DL_{50} *D. melanogaster* frente al aceite de Tzinsu a las 3 horas y corresponde al 0.71% de concentración del aceite esencial necesarios para matar el 50% de insectos adultos de *D. melanogaster*

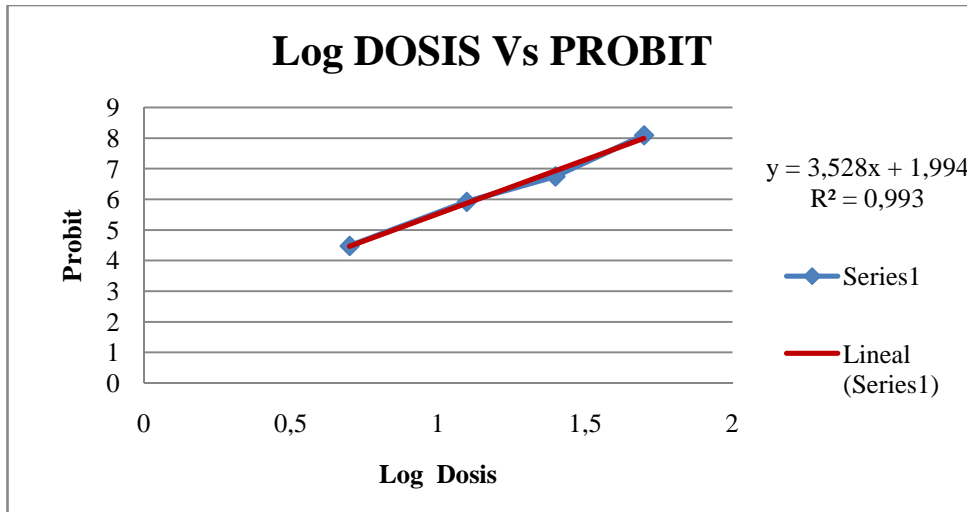


GRÁFICO N.3 CURVA DE REGRESIÓN LINEAL PARA LA DL_{50} DEL LOG DE LA DOSIS DEL ACEITE ESENCIAL DE TZINSU (*T. minuta*) CONTRA LOS VALORES PROBIT. APLICADAS SOBRE *D. melanogaster* A LAS 3 HORAS CRITICAS. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA OCTUBRE 2010

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de Tzinsu, *Tagetes minuta* tiene efecto insecticida por contacto, dado que los insectos de *Drosophila melanogaster* mueren a las 3 horas de ser colocado en el medio que contiene dicho aceite, comprobándose que la hipótesis es positiva.
2. El aceite de Tzinsu *T. minuta* se obtiene por arrastre de vapor de agua dando un rendimiento de 0.36%, con pH de 3.32, densidad 0.85 g/ml índice de refracción de 1.487 y solubilidad de 1:6,7 de volúmenes en Etanol al 96%. El tamizaje fitoquímico determina la presencia de, flavonoides (Shinoda, positivo), aceites y grasas (Sudan III, positivo), saponinas (Espuma positivo), esteroides (Libermann-Buchard, positivo), quinonas (Borntrager, positivo), catequinas (Verde carmelita a luz UV positivo).
3. Se determino la actividad insecticida. Adicionar al medio de cultivo de reproducción concentraciones de 0.5; 1.25; 2.5; 5.0% de aceite esencial, obteniendo como resultado la muerte del 100% de *Drosophila melanogaster* ojos rojos cuerpos oscuros en la concentración más alta, en el lapso de 3 horas, concluyendo un efecto es insecticida y descartando un efecto anti alimentario del aceite.
4. Se utilizó como insecticida control positivo Campex, control negativo medio de cultivo natural, y un aceite de *Tagetes zipaquirensis* para establecer las respectivas comparaciones aplicando los parámetros de contajes de muertes en las diferentes concentraciones y tiempo de vida de *Drosophila melanogaster*
5. El Diseño Completamente al Azar (DCA). Estableció un experimento muy homogéneo, el material de investigación no presento variaciones, el análisis de varianza de los tratamientos y repeticiones dio un coeficiente de variación (C.V) de 7.35% indica que el ensayo ha sido bien planificado y que ha tenido un buen manejo siendo el límite de C.V 30 %. De acuerdo a la regresión lineal se determino la DL₅₀ de 0.76% del aceite esencial necesarios para matar el 50% de *D. melanogaster*, con un nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO V

5 RECOMENDACIONES

1. Dada la efectividad insecticida del aceite de *Tagetes minuta* se sugiere aplicar en productos para el control biológico de vegetales.
2. Comprobado el efecto insecticida de *Tagetes zipaquirensis* se sugiere realizar un estudio programado de extracción, tamizaje fitoquímica y efecto insecticida primero in vitro y posterior in vivo.

CAPÍTULO VI

6 RESUMEN Y SUMMARY

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo. Extraer el aceite esencial de Tzinsu *Tagetes minuta* mediante destilación por arrastre de vapor de agua, comprobar su actividad insecticida y/o anti alimentaria en la mosca de fruta *Drosophila melanogaster* ojos rojos cuerpos oscuros, determinar la dosis efectiva mínima con aplicación de un diseño Completamente al azar (DCA) en cultivos in vitro de *Drosophila melanogaster*.

La actividad insecticida y/o anti alimentaria se determino a través del aceite esencial del Tzinsu extraído por arrastre de vapor de agua con un rendimiento de 0.36%, pH 3.32, densidad 0.85 g/ml, índice de refracción de 1.487 y la solubilidad de 1:6.7 volúmenes de alcohol al 96%. Extraído el aceite se suministro en concentraciones de 0.5, 1.25, 2.5, y 5 % del aceite esencial en la dieta básica de *Drosophila melanogaster*, a fin de evaluar la mortalidad, como también la disminución del alimento suministrado para determinar un efecto anti alimentario.

Luego se determino los tratamientos más adecuados mediante la prueba de Tukey al 5% y la Dosis letal media (DL_{50}) se determino mediante el análisis de regresión lineal.

Las moscas adultos de *Drosophila melanogaster* analizadas a las 3 horas con las respectivas concentraciones de aceite esencial presento que la concentración de 5.0 % mata el 100% de insectos adultos debido a la acción de la trans Tagetona y trans Ocimeno en el aceite. Que se determinaron mediante el análisis de cromatografía de gases. Estableciéndose una DL_{50} de.71% necesarios para matar el 50% de insectos adultos de *D. melanogaster*

Estableciéndose que el aceite esencial de Tzinsu presenta una actividad insecticida más no anti alimentaria. Propiciando de este modo un estudio sobre la factibilidad de utilización de bio insecticidas.

SUMMARY

The purpose of this investigation was threefold: to extract Tzinsu (*Tagetes minuta*) essential oil by means of water vapor dragging distillation. To verify the insecticide and anti feeding activity over fruit fly (red eyes and dark body) *Drosophila melanogaster*. To determine the minimum effective dosis randomly applied on *Drosophila melanogaster* vitro cultivations.

Both the insecticide and the anti feeding activity were determined by Tzinsu essential oil which was extracted by means of water vapor dragging distillation considering the following data: Yield 0.36%; density 0.85 g/ml; refraction 1.487; solubility 1:6.7; alcohol volume 96%.

Once the essential oil was extracted the following *Drosophila melanogaster* percentage concentrations were supplied: 0.5%; 1.25%; 2.5% and 5% which served to evaluate mortality as well as food diminishing for obtaining an anti feeding effect.

An appropriate 5% treatment was established by using Turkey's Test; the lethal dosis mean (DL_{50}) was obtained by linear regression analysis. The tested adult flies (*Drosophila melanogaster*) after three hours time observation together with the respective essential oil 5% concentrations showed that such concentrations killed 100% of flies because the oil contained Tegetone and Trans Ocimeno, these elements were found through gas chromatography analysis which also established a 71% of DL_{50} , the necessary amount to kill 50% of *Drosophila melanogaster* adult insects.

This way, it was established that the Tzinsu essential oil presents insecticide activity rather than anti feeding one; therefore, the study provides a feasibility oon using bio insecticides.

CAPÍTULO VII

7 BIBLIOGRAFÍA

1. **ACEITES ESENCIALES**

http://www.es.wikipedia.org/Aceites_Esenciales

2010-02-14

2. **ACEITES ESENCIALES**

<http://www.members.tripod.com/aromaticas/Aceites.html>

2010-02-14

3. **ACEITE ESENCIAL DE TAGETES**

<http://spanish.alibaba.com/product-tp/tagette-essential-oil-101253320.html>

2010-02-14

4. **ALONSO, J.** (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. Rosario-Argentina, Corpus. pp. 259, 260, 261, 262, 263.

5. **ARENAS L.** (1984). Extractos Acuosa y Polvos Vegetales con Propiedades Insecticidas: una alternativa por explotar. Tesis, Biólogo, México. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de México. pp. 12, 15

6. **ARBAIZA, A.** (2002). Guía Práctica y Manejo de Plagas en 26 Cultivos. Chiclayo-Perú, Castillo. pp. 480-482, 571,572.

7. **ASHBURNER M.** *Drosophila melanogaster*

<http://www.diclib.com/cgi-bin/d1.cgi>

2010-09-26

8. **BARRAGAN R.** (1997). Principios de Diseño Experimental. pp 10-21 (Documento)

9. **BRUNETON, J.** (1995). Farmacognosia, fotoquímica, plantas Medicinales. Inglaterra, Intercept. pp. 199
10. **CHAMORRO E.** (2008) Et. al. Chemical composition of Essential Oil from *Tagetes minuta*: Leaves and flowers. Journal of the Argentine Chemical Society Argentina. V.96, pp 80 – 86.
11. **CALDERÓN G. y J. RZEDOWSKI.** 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. 2ª ed. México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 1406 p.
12. **CAMARILLO G.** Actividad Biológica de Extractos de *Tagetes filifolia*
http://www.cm.colpos.mx/2010/images/tesis_entomologia/tesis_gabriela.pdf
2010-26-09
13. **COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE TAGETES MINUTA**
<http://www.scielo.org.ar/scielo>.
2010-02-14
14. **CUMARACAZ B.** (1995) Árboles de los Bosques Interandinos del Norte del Ecuador, pp 5-9 (Documento)
15. **DOMÍNGUEZ, P.** (1998). Protección Natural de Plantas Contra Plagas: metabolitos secundarios. En primer Simposio Internacional y IV Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. Acapulco, Guerrero, México. Noviembre 12 - 14. (Memorias). Acapulco, Rondon. pp. 4,5,18
16. **DOMINGUEZ, X.** (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. México. Limusa. pp. 73.

17. **DROSOPHILA MELANOGASTER**

http://es.wikipedia.org/wiki/Drosophila_melanogaster

2010-09-29

18. **ESPINOZA, C.** (2008). Evaluación de la Actividad Insecticida del Extracto Canela (*Cinnamomun zeylanicum*) Frente a Tres Tipos de Plagas que Afectan los Cultivos. Tesis Doctor Bioquímico Farmacéutico, Riobamba Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. pp. 4-16

19. **GONZALES G.** (1985). Métodos Estadísticos y Principios de Diseño Experimental. 2ª ed. Quito-Ecuador, Universidad Central del Ecuador. pp. 181-198

20. **INSECTICIDAS**

<http://ipmwordl.umn.edu/cancelado/Spchapters/GSilvaSp.htm>

2010-09-09

21. **INSECTICIDAS BOTÁNICOS**

<http://www.raaa.org/ib.html>

2010-09-09

22. **INTRODUCCIÓN A LOS INSECTICIDAS**

http://www.entomotropica.org/v18_2/1802b0004.html

2010-09-09

23. **IZA, SILVIA.** (2008). Evaluación De La Actividad Insecticida De Clavo De Olor (*Syzygium aromaticum*) Frente A Tres Plagas Que Afectan Los Cultivos. Tesis Bioquímica Farmacéutica, Riobamba. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. pp. 3

24. **MAROTTI, M.** et.al. (1993). Rendimiento y Caracterización de Aceites Esenciales de Diferentes Especies de *Tagetes*. Journal of Esesential oil Research. Argentina. V. 16. pp. 440 – 444,
25. **MARTÍNEZ, S.** (1983). Búsqueda de Plantas Medicinales con Propiedades Insecticidas Contra el Gusano Cogollero del Maíz. Tesis de Ingeniero Agrónomo, Chapingo – México. Escuela Ingeniería Agronómica. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de México. pp. 18
26. **OROZCO, E.** (2008). Actividad Antimicrobiana in Vitro de Aceite Esencial del Jengibre. Tesis Doctor Bioquímico Farmacéutico, Riobamba Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. pp. 32, 85-90
27. **REINOSO, L.** (2009). Especies Botánicas de Latacunga: descripción y usos. Latacunga. p. 16 (Documento)
28. **RODWAY, A.** (1980). Hierbas y Especies Cultivo y Utilización de las Plantas más Interesantes Producidas por la Naturaleza. Barcelona-España, Parramón. pp. 50-52.
29. **ROOT, W.** (1983). Guía Ilustrada de Hierbas y Especies. Barcelona-España, Blume. pp. 50, 51, 106, 109.
30. **TAGETES MINUTA**
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1993/v2-649.html>
1997-09-18
31. **TUN, F.** et. al. (2000). Ovicida Activity of Essential Oils from five Plants Against two Stored-product Insects. Journal of Stored Products Research (Argentina). V. 2 pp. 161-168.
32. **YUFERA P.** (1981). Productos para el Campo y Propiedades de los Alimentos: plaguicidas y fitorreguladores. 3ª ed. Madrid- España. V. 1, pp. 2-11
33. **ZYGADLO, J.** et.al. (1993) Composition of the inflorescence oils of some *Tagetes* species from Argentina. Journal of Essential Oil Research. Argentina. V. 5, pp. 670 – 681,

CAPÍTULO VIII

8 ANEXOS

ANEXO N.1

ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACIETE ESENCIAL DE TZINSU *Tagetes minuta* A LAS 3 HORAS DE ANÁLISIS. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS FAC. RECURSOS NATURALES. ESPOCH. ACTUBRE 2010

TRATAMIENTOS <i>Tagetes minuta</i>	NUMERO DE INSECTOS MUERTOS
T1C1R1	3
T1C1R2	4
T1C1R3	2
T1C1R4	3
T1C1R5	3
T1C2R1	9
T1C2R2	9
T1C2R3	8
T1C2R4	7
T1C2R5	8
T1C3R1	10
T1C3R2	10
T1C3R3	9
T1C3R4	9
T1C3R5	10
T1C4R1	10
T1C4R2	10
T1C4R3	10
T1C4R4	10
T1C4R5	10
CA	0
CB	10

FUENTE: CRISTIAN COFRE

ANEXO N.2

ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACIETE ESENCIAL DE ZORRILLO *Tagetes zipaquirensis* A LAS 30 SEGUNDOS DE ANÁLISIS. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS FAC. RECURSOS NATURALES. ESPOCH. ACTUBRE 2010

TRATAMIENTOS <i>Tagetes zipaquirensis</i>	NUMERO DE INSECTOS MUERTOS
T2C1R1	2
T2C1R2	1
T2C1R3	2
T2C1R4	1
T2C1R5	0
T2C2R1	3
T2C2R2	4
T2C2R3	5
T2C2R4	6
T2C2R5	4
T2C3R1	8
T2C3R2	9
T2C3R3	6
T2C3R4	8
T2C3R5	7
T2C4R1	10
T2C4R2	10
T2C4R3	10
T2C4R4	10
T2C4R5	10
CA	0
CB	10

FUENTE: CRISTIAN COFRE

ANEXO N.3

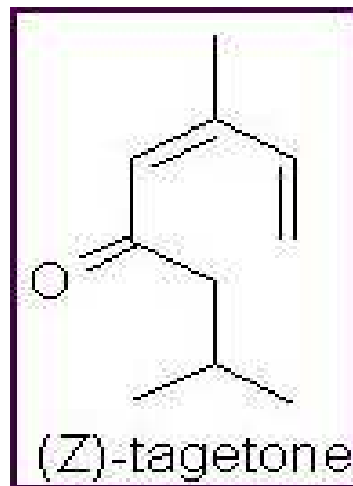
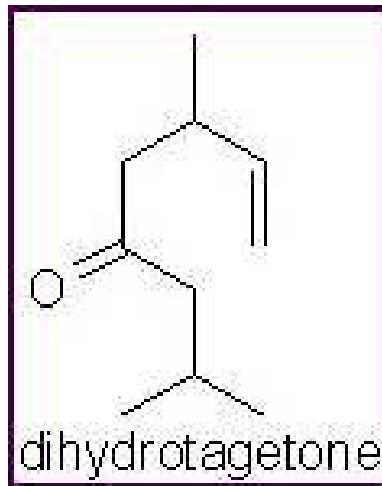
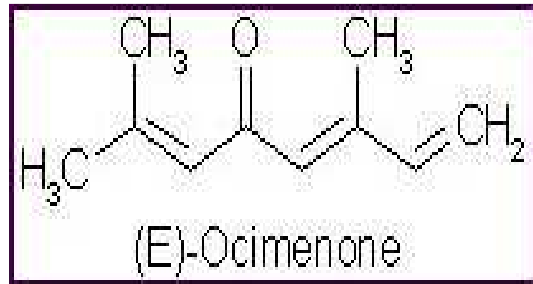
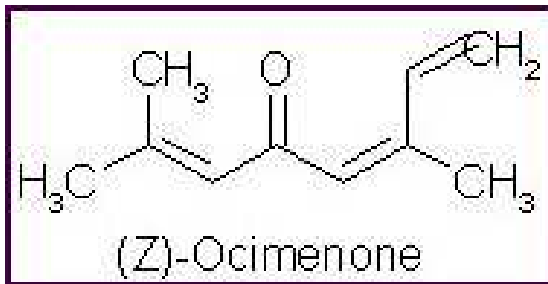
ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL DE *T. zipaquirensis* SOBRE *D. melanogaster* A LOS 30 SEGUNDOS CRITICAS DE ANÁLISIS. DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. FACULTAD DE RECURSOS NATURALES. ESPOCH. RIOBAMBA OCTUBRE DEL 2010.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRÁTICA	F. CALCULADA	F. TABULAR 5% - 1%
Total	29	479.50			
Tratamientos	5	465.50	93.10	160.50	2.62 – 3.90
Error	24	14	0.58		

Coefficiente de Variación = 14.03 %

FUENTE: CRISTIAN COFRE

ANEXO N.4 COMPUESTOS PRESENTES EN EL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE Tagetes



ANEXO N.5 EQUIVALENCIA ENTRE VALORES "PROBIT" Y PORCENTAJE DE POBLACIÓN AFECTADA

Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%	Pr	%
0	0	3,72	10	4,16	20	4,48	30	4,75	40	5,00	50	5,25	60	5,52	70	5,84	80	6,28	90	7,33	99,0
2,67	1	3,77	11	4,19	21	4,50	31	4,77	41	5,03	51	5,28	61	5,55	71	5,88	81	6,34	91	7,37	99,1
2,95	2	3,82	12	4,23	22	4,53	32	4,80	42	5,05	52	5,31	62	5,58	72	5,92	82	6,41	92	7,41	99,2
3,12	3	3,87	13	4,26	23	4,56	33	4,82	43	5,08	53	5,33	63	5,61	73	5,96	83	6,48	93	7,46	99,3
3,25	4	3,92	14	4,29	24	4,59	34	4,85	44	5,10	54	5,36	64	5,64	74	5,99	84	6,55	94	7,51	99,4
3,36	5	3,96	15	4,33	25	4,61	35	4,87	45	5,13	55	5,39	65	5,67	75	6,04	85	6,64	95	7,58	99,5
3,45	6	4,01	16	4,36	26	4,64	36	4,90	46	5,15	56	5,41	66	5,71	76	6,08	86	6,75	96	7,65	99,6
3,52	7	4,05	17	4,39	27	4,67	37	4,92	47	5,18	57	5,44	67	5,74	77	6,13	87	6,88	97	7,75	99,7
3,59	8	4,08	18	4,42	28	4,69	38	4,95	48	5,20	58	5,47	68	5,77	78	6,18	88	7,05	98	7,88	99,8
3,66	9	4,12	19	4,45	29	4,72	39	4,97	49	5,23	59	5,50	69	5,81	79	6,23	89	7,33	99	8,09	99,9