

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PREGRADO EN BIOLOGÍA



Estudio del potencial insecticida y antifúngico de aceites esenciales de cuatro plantas aromáticas que crecen en Colombia.

Renán Sebastián León Alejo

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Bogotá-Colombia 2020

Estudio del potencial insecticida y antifúngico de aceites esenciales de cuatro plantas aromáticas que crecen en Colombia.

Renán Sebastián León Alejo

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Biólogo

Director (a): PhD, Química. Julieth Angélica Prieto
Rodríguez

Línea de Investigación: Química de Productos Naturales
Vegetales

Grupo de Investigación: Fitoquímica Pontificia
Universidad Javeriana

Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Bogotá-Colombia 2020

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la composición química mediante CG-EM de cuatro aceites esenciales (AEs) *Lavandula angustifolia*, *Mentha spicata*, *Laurus nobili* y *Petroselinum crispum*, y se evaluó su actividad fumigante sobre el insecto *Tribolium castaneum* y antifúngica sobre el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae*. El análisis cromatográfico de los AEs permitió identificar tentativamente un total de 100 compuestos, siendo los monoterpenos los componentes mayoritarios de los cuatro aceites. El aceite que presentó mayor actividad fumigante fue el de *L. angustifolia*, cuya CL₅₀ es inferior a 50 µL/L aire. El estudio de la curva de crecimiento del hongo *L. theobromae* permitió establecer que no hay diferencia significativa en el crecimiento y en la generación de estructuras reproductivas cuando se emplean los medios PDA y agar- malta. El aceite de *M. spicata* presentó la mayor actividad antifúngica (CL₅₀ 76.53 µL/L aire). Finalmente se puede concluir que tres de los cuatro AEs estudiados tienen potencial para el control de *T. castaneum*, mientras que solo dos tienen potencial antifúngico sobre *L. theobromae*, siendo el AE de *M. spicata* el que presentó una buena actividad sobre las dos plagas estudiadas.

Palabras clave: Aceites esenciales, *Lasiodiplodia theobromae*, *Tribolium castaneum*, Plaga, Actividad fumigante, Actividad antifúngica

INTRODUCCIÓN

Históricamente la agricultura ha tenido un papel fundamental para el desarrollo económico de las naciones (Perfetti, 2013). Países como Colombia tienen un potencial productivo agrícola importante, siendo un sector que genera grandes ingresos económicos para el país (Malagon 2002). Según cifras del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MinAgricultura) y del Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), para el año 2019 el producto interno bruto (PIB) de Colombia tuvo un crecimiento del 3,0%, en dónde el PIB aportado por el sector agropecuario creció un 2.6% respecto a 2018. El crecimiento del sector agro estuvo jalonado principalmente por los cultivos agrícolas, los cuales crecieron 3.4%. (DANE, 2019; MinAgricultura., 2020). Las principales limitantes que se tienen en los cultivos agrícolas en Colombia, que comprometen la seguridad alimentaria y que causan numerosas pérdidas económicas, están relacionadas con los daños causados por diversas enfermedades generadas

por virus, bacterias y hongos, así como por ataques de plagas de insectos a diferentes tipos de cultivos y productos de almacén (Prieto, et al 2010).

Particularmente, el cultivo del cacao es de alta importancia en la agricultura colombiana, encontrándose que para el año 2017 se tenía un área de siembra de 175 mil hectáreas, con una base de exportación de 11.498 toneladas (MADR 2018), siendo el 95% del cacao de exportación el considerado como fino y de aroma (ICCO, 2011 y 2015). Entre las enfermedades fúngicas que más daños causan en los cultivos de cacao se encuentran las causada por el hongo *Lasiodiplodia theobromae* (Sanches, et al, 2015; Suarez & Hernandez, 2010), enfermedad que puede conllevar a la pérdida de más del 40% al ocasionar la muerte de ramas o de plantas completas e inducir la necrosis de frutos del cultivo. *L. theobromae* es un saprófito que se presenta como endófito en tejidos sanos de la planta, convirtiéndose en patógeno cuando el hospedero está debilitado o estresado, razón por la cual se le considera como patógeno latente. La principal vía de ingreso de éste patógeno a las plantas es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos u otras causas naturales. La sintomatología causada por *L. theobromae* va desde pudrición de la raíz, gomosis, cáncer, tizón de la hoja, y en el fruto genera necrosis y pudrición (Picos, et al 2014).

Otros productos de elevada importancia en el sector agrícola en Colombia son los cereales, importancia que está relacionada con la alta extensión de tierra que se ha destinado a su producción y por ser productos base de la alimentación de los colombianos. Debido a la temporalidad que presentan los cultivos de cereales, los agricultores han implementado técnicas de almacenamiento de dichos productos, las cuales no siempre son eficientes y por lo tanto generan grandes pérdidas para la producción, especialmente por el ataque de insectos (García et al., 2003). Los cereales almacenados son atacados por diversas especies de insectos, uno de los principales *Tribolium castaneum*, pertenecientes al orden de los Coleópteros, y a la familia Tenebrionidae (Llanos, et al, 2008), es considerado como uno los más destructores de productos alimenticios almacenados, generando pérdidas que tanto a nivel nacional como a nivel mundial son en ocasiones incalculables (Vergara 1994). La manera por la cual este insecto infesta al grano, es introduciéndose en heridas ya existentes causadas por otro tipo de insectos o cultivos que han sido dañados durante su manejo (Pravani, et al 2016), por lo cual es considerado plaga secundaria ya que no infesta el grano cuando este está en óptimas condiciones (Prieto, 2012).

Debido a las afectaciones que causan diversos microorganismos e insectos en diferentes cultivos y productos almacenados, los agricultores se han visto obligados a protegerlos mediante el uso de

pesticidas convencionales, los cuales generalmente son altamente tóxicos para humanos y animales, y cuya aplicación indiscriminada ha ocasionado diversos problemas, como la acumulación de residuos tóxicos en los productos tratados, daños en la capa de ozono, contaminación ambiental y la resistencia desarrollada por las plagas ante estos plaguicidas, entre otros (Copping y Menn, 2000).

Teniendo en cuenta los inconvenientes generados por el uso continuo de pesticidas, se ha incrementado la necesidad de desarrollar nuevos agentes fitosanitarios que permitan controlar plagas que afectan a plantas y productos que son fuentes de alimento o de uso industrial. Entre las alternativas para el control de plagas se destaca el uso de aceites esenciales (AEs) como agentes fitosanitarios (Devine 2008 ; Miresmailli & Isman, 2014). Los AEs se derivan de las plantas denominadas aromáticas, las cuales, en el transcurso de la evolución, han desarrollado defensas de tipo químico para enfrentar toda clase de depredadores (Regnault, 1997; Sankarikutty 2003). Los AEs son mezclas de sustancias metabolitos secundarios volátiles en condiciones normales, entre los que se encuentran monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Ríos 2016). Los AEs se caracterizan por la baja toxicidad para mamíferos y otras especies, y gracias a sus propiedades físicas y la compleja composición química pueden afectar por varias vías a insectos y microorganismos (Prieto, 2012; Patiño, 2017; Cosimi 2009).

Teniendo en cuenta la potencialidad que tienen los AEs para encontrar nuevos pesticidas de origen natural, en la presente investigación se busca determinar el potencial insecticida y antifúngico de los aceites esenciales de cuatro plantas aromáticas: *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae), *Mentha spicata* (Lamiaceae), *Laurus nobilis* (Lauraceae) y *Petroselinum crispum* (Apiaceae). Sobre un insecto que afecta cereales almacenados *T. castaneum* y un hongo fitopatógeno asociado al cultivo del cacao *L. theobromae*, aprovechando que dichos aceites se obtienen con buenos rendimientos y que existen pocos o nulos reportes del uso de estas especies para el control de las plagas de interés.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de los Aceites esenciales (AEs):

Los cuatro aceites esenciales empleados en el este trabajo fueron adquiridos comercialmente a la empresa Suagá Organic Herbs. Según reporta el proveedor, los aceites fueron obtenidos de las partes aéreas de, *Lavandula angustifolia*, *Mentha spicata*, *Laurus nobilis* y *Petroselinum crispum*, empleando el método de arrastre con vapor de agua.

Caracterización química de los AEs

Preparación de muestras: Para el análisis de cada muestra, se tomaron 25 μL del AE y se llevaron a un volumen final de 1 mL con n-hexano. De igual manera, se preparó una solución estándar de hidrocarburos ($\text{C}_{10}\text{-C}_{33}$) tomando 25 μL de un estándar de 1000 ppm y llevando a 1 mL con n-hexano.

Análisis por GC-MS en columna apolar: La separación de los componentes de cada AE se realizó empleando un cromatógrafo de gases marca Shimadzu serie GC 2010 Plus acoplado a un detector selectivo de masas Shimadzu TQ 8040, equipado con un puerto de inyección Split/splitless (250 °C, relación de Split 20:1), un inyector automático Shimadzu AOC-20i. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una columna capilar con fase estacionaria apolar de 5% - fenil-poli(metilxilosano) (Zebron ZB-5plus de 30 m x 0.25 mm, D.I x 0.25 μm). El gas de arrastre fue helio (99.9995%) con una velocidad lineal de 25.5 cm/s y flujo constante de 1 mLmin⁻¹. La temperatura del horno fue programada de 40 °C (2 min) @ 5 °C/min hasta 125 °C (2 min), después @ 5°C/min hasta 160 °C (tres min), posteriormente @ 5°C/min hasta 220 (cuatro min) y por último @ 8°C/min hasta 280 (cuatro min). Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones (EI) con energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización, de la línea de transferencia y el cuadrupolo se mantuvieron a 250 °C, 270°C y 270°C respectivamente. Los espectros de masas y corrientes iónicas reconstruidas (TIC) fueron obtenidos por medio de barrido automático de frecuencia (full scan), en el rango de masas de 30-600 m/z, con una velocidad de barrido de radiofrecuencia 1666 scans⁻¹.

Determinación de la composición química de los AEs: Para determinar los componentes químicos de cada aceite, se observó el registro del tiempo de retención obtenido por el cromatógrafo, posteriormente calculando el índice de retención lineal (IR) de acuerdo con lo registrado en literatura (Van Den Dool & Krats, 1963) y con la serie homóloga de patrones de hidrocarburos, analizados bajo las mismas condiciones que los aceites, los (IR) calculados fueron comparados con los reportados en el libro web de química NIST, The Pherobase, Adams. Para el cálculo del índice de retención se utilizó la (Ecuación 1)

$$IR = 100n + 100 \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde: **n**: Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés; **t_{Rx}**: Tiempo de retención del compuesto de interés; **t_{Rn}**: tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés; **t_{RN}**: tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto de interés.

ENSAYO ACTIVIDAD INSECTICIDA

Pie de cría de los insectos: Se depositaron 15 insectos sin sexar de *T. castaneum*, proporcionados por el laboratorio de bioensayos del Grupo de Investigación de Fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ), en cajas herméticas que contenían una mezcla harina de trigo y levadura de cerveza (proporción 95:5). Los contenedores fueron mantenidos en una incubadora a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a una humedad relativa de $75\% \pm 5\%$.

Ensayo actividad fumigante: Se utilizó la metodología vial en vial (Pascual-Villalobos, et al. 2004). En un vial de 2 mL se insertó un disco de papel filtro de 2 cm de diámetro y se aplicaron 11 μL del AE para obtener la concentración más alta evaluada (500 $\mu\text{L}/\text{L}$ aire). Posteriormente en un vial de 22 mL de volumen se introdujeron 10 insectos sin sexar y el vial de 2mL que contenía el AE, finalmente se tapó el vial de 22 mL para mantener un ambiente cerrado y evitar la pérdida de los vapores. Como control positivo se empleó Nuvan 50 ®. El control negativo se montó de la misma manera, pero en este caso el papel filtro no contenía ninguna sustancia. La mortalidad de los insectos se determinó pasadas las 24 horas, considerando que el insecto está muerto cuando no presentaba movimiento en ninguna de sus extremidades o de sus antenas después de una estimulación. Se realizaron cinco réplicas para cada uno de los cuatro AEs y dos repeticiones del ensayo completo para tener resultados más precisos. El porcentaje de mortalidad fue estimado aplicando la fórmula de Aboot (Ecuación 2).

$$\%Mort. = \left(\frac{\%mortalidad\ AE - \%mortalidad\ control}{100 - \%mortalidad\ control} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Posteriormente se realizaron pruebas en concentraciones menores (50 – 350 $\mu\text{L}/\text{L}$ aire) para los AEs con los que se obtuvo una mortalidad superior al 50% a la máxima concentración evaluada. La concentración letal media (CL_{50}) fue estimada con el programa Graph Pad Prism y los resultados se reportaron con un intervalo de confianza del 95%.

ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Cepa fúngica: La cepa fúngica de *L. theobromae*, aislada de tallos de cacao, fue proporcionada por el laboratorio de bioensayos del Grupo de Investigación de Fitoquímica Universidad Javeriana (GIFUJ), la cual se utilizó para realizar el ensayo de curva de crecimiento y el ensayo de actividad antifúngica.

Curva de crecimiento *L. theobromae*: Se utilizaron dos medios de cultivo, PDA y Medio de malta Ascomycota- Agar Ceratocystis, preparados en 50 cajas de Petri de (90mm x 15mm), para cada medio. Discos de agar de 5 mm de diámetro con la cepa *L. theobromae* se colocaron en el centro de las cajas de Petri, para posteriormente almacenarlas en una incubadora a 25°C. Se monitoreo el crecimiento del hongo a las 19, 40, 62 y 139 horas, donde en cada uno de estos momentos se midió el diámetro de crecimiento del hongo, el tipo de coloración y la presencia de estructuras reproductivas, en este último caso realizando un conteo superficial de los picnidio presentes en el hongo. Se realizó una prueba t-student mediante el programa Past para determinar si los resultados obtenidos con los dos medios de cultivo presentaban diferencias significativas.

Ensayo actividad antifúngica *L. theobromae in vitro*: Se realizó el ensayo de actividad antifúngica empleando el método fumigante (Prieto et al 2010). En cajas de Petri (90mm x 15mm) que contenían PDA como medio de cultivo, se depositaron en el centro discos de 5 mm de agar cubiertos de la cepa *L. theobromae*, y alrededor del inóculo se ubicaron 3 discos de papel filtro (previamente esterilizados) a una distancia de 2 cm. Cada uno de los discos fue impregnado con 5 µL del AE para alcanzar la concentración más alta evaluada (182 µL/L aire). Las cajas se sellaron con vinipel inmediatamente después de agregar el AE evitando la pérdida de éste. Se realizó un control negativo para cada uno de los aceites en donde el papel filtro no estaba impregnado con ninguna sustancia. Posteriormente las cajas se almacenaron en la incubadora a 25°C durante 4 días. Se comparó el diámetro de crecimiento micelial del hongo control no tratado, con el del hongo tratado con los AEs para determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento (% InC) (Ecuación 3). Se realizaron cinco réplicas para cada uno de los AEs con su control respectivo, se realizaron dos repeticiones del ensayo completo para obtener datos más precisos.

$$\%InC = \frac{\text{diámetro crecimiento control} - \text{diámetro crecimineto tratamiento}}{\text{diámetro crecimiento control}} * 100$$

(Ecuación 3)

Posteriormente se realizaron pruebas en concentraciones menores (12– 122 µL/L aire) para los AEs en donde se presentó un porcentaje de inhibición mayor al 50%, para así obtener la concentración inhibitoria media (CI₅₀) estimada con el programa Graph Pad Prism y los resultados se reportaron con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química de los aceites esenciales

Se realizó el análisis de la composición química tentativa de los cuatro AEs correspondientes a *L. nobilis*, *L. angustifolia*, *P. crispum* y *M. spicata* mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en una columna apolar. La Tabla 1 presenta la composición de los AEs, sus índices de retención experimentales y el reportado en la literatura (Pherobase; NIST; Adams 2017), y las respectivas áreas representadas en porcentaje de cada compuesto determinado. Se logró una caracterización entre el 81 y 95% de la composición total de los aceites esenciales.

Tabla 1. Composición química de los aceites esenciales

#	Compuesto	Índice de retención DB-5		Área (%)			
		Experimental	Reportado	<i>L. nobilis</i>	<i>L. angustifolia</i>	<i>P. crispum</i>	<i>M. spicata</i>
1	Camfeno	950	953	0,08	0,50		
2	Sabineno	972	976	6,69	0,62	0,10	0,96
3	β -pineno	977	980	2,89	3,02	2,01	1,27
4	1-octen-3-ol	979	978		1,32		0,15
5	β -mircenol	989	991	1,09	1,95	5,52	4,19
6	3-octanol	996	994				0,53
7	α -felandreno	1005	1006	0,10	2,12	0,93	
8	p-cimeno	1023	1026	0,90	3,02	0,30	1,61
9	Limoneno	1030	1031				7,64
10	β -felandreno	1031	1031			13,26	
11	1,8-cineol	1032	1033	15,04	16,00		2,45
12	cis- β -ocimeno	1035	1040	0,26	0,23	0,36	2,64
13	γ -terpineno	1058	1062	0,84	0,08	0,28	3,60
14	2,3-epoxy-pinano	1073	1095				0,11
15	1-nonen-3-ol	1080	1078				0,08
16	α -terpinoleno	1085	1088	0,21	0,20		0,20
17	Isoterpinoleno	1086	1086			6,46	
18	2-nonanona	1089	1091	0,20			
19	1-metil-3-(1-metileténil)-benceno	1091	1082			5,75	
20	Linalool	1099	1098	16,60	2,41		0,83
21	2-metilbutanoato de 2-metilbutilo	1101	1103				0,03
22	Nonanal	1103	1101				0,06
23	Acetato de 1-octen-3-ilo	1106	1110				0,13
24	p-mentatrieno	1114	1119			8,06	
25	Dureno	1115	1114			5,89	

26	Fenchol	1120	1117		0,36		
27	Óxido de limoneno	1138	1139				0,09
28	Isothujol	1143	1133	0,11			
29	Isopinocarveol	1143	1137		0,58		
30	Alcanfor	1148	1143		6,19	0,07	0,11
31	Pinocarvona	1163	1162		0,16		
32	Lavandulol	1165	1162		0,28		
33	δ -terpineol	1171	1167	0,41			0,08
34	endo-Borneol	1173	1169	0,16	9,10	0,05	0,62
35	Terpinen-4-ol	1181	1177	0,16	1,02		0,23
36	p-acetiltolueno	1185	1183			0,28	
37	p-cimen-8-ol	1189	1183			0,45	0,04
38	α -terpineol	1196	1189	2,97	2,09		
39	Dihidro-carveol	1199	1193				1,93
40	Decanal	1204	1203	0,05			
41	p-menth-8-en-2-ona	1204	1200				0,07
42	piperitol	1209	1205		0,08		
43	cis-carveol	1218	1229		0,18		0,43
44	Verbenona	1220	1205			5,21	
45	trans-carveol	1220	1217				0,66
46	cis-geraniol	1222	1228	0,47			
47	Citronelol	1224	1228			0,04	
48	Formiato de bonilo	1227	1232		0,83		
49	cis-citral	1234	1240	0,03	0,09		
50	Cumaldehido	1240	1242		0,87		
51	Carvona	1241	1242	0,20		0,05	19,02
52	Acetato de linalilo	1244	1254	1,46			
53	β -citral	1263	1256	0,05	0,26	0,14	
54	Felandral	1276	1273		0,17	0,07	
55	Acetato de bornilo	1282	1285	0,06	0,53		0,06
56	p-cimen-7-ol	1290	1287		0,21		
57	Timol	1294	1290	7,00			14,60
58	Carvacrol	1301	1298	0,36		0,07	1,77
59	Acetato de δ -terpineol	1314	1313	1,02			0,12
60	Acetato de verbenol	1321	1330			3,37	
61	Piperitenona	1341	1342				0,16
62	Acetato de- α -terpenilo	1348	1352	12,65			2,47
63	Eugenol	1353	1356	1,92			
64	α -cubebeno	1354	1351		0,16		
65	Acetato de nerilo	1357	1365	0,24			
66	Óxido de piperitona	1362	1368				2,60
67	Acetato de geraniol	1376	1382	0,05	0,27		
68	α -copaeno	1379	1376	0,03		0,05	0,23

69	β -bourboneno	1386	1384	0,05	0,11		1,96
70	β -elemeno	1391	1391	0,88	0,19		1,08
71	Metileugenol	1398	1401	10,70			1,06
72	α -gurgujeno	1409	1410		0,82		0,43
73	Cariofileno	1423	1418	1,39	5,39		4,23
74	α -guaiano	1437	1438	0,11			0,09
75	(E)- β -fameseno	1452	1458				0,72
76	Humuleno	1458	1455	0,21	0,61		0,60
77	cis-muurolo-4(14),5-dieno	1465	1466		1,08		1,22
78	γ -muurolo	1477	1477				0,13
79	Germacreno D	1484	1480	0,13	0,73		4,40
80	Eudesma-4(14),11-diene	1491	1485	0,27	0,58		
81	Biciclogermacreno	1497	1496	0,86			1,35
82	α -farneseno	1503	1508				0,18
83	β -bisaboleno	1507	1509	0,51			2,30
84	α -alaskeno	1513	1512		7,32		
85	γ -cadineno	1513	1513				0,81
86	Miristicina	1519	1520			12,29	
87	trans-calameneno	1519	1521		1,94		0,57
88	α -cadineno	1535	1538		0,14		0,23
89	α -calacoreno	1539	1543		0,08		
90	Elemicina	1540	1540	1,47			0,12
91	β -elemol	1545	1549	0,09			0,05
92	Espatuleno	1576	1575	0,96			0,47
93	Óxido de Cariofileno	1581	1581	1,10	6,40		0,55
94	Viridiflorol	1596	1590				0,15
95	Epóxido de α -humuleno	1611	1608		0,19		0,03
96	Epicubeno	1617	1626		0,72		
97	τ -cadinol	1645	1640		3,85		
98	α -cadinol	1657	1653		0,86	10,02	0,54
99	Apiol	1673	1680				0,14
100	Shyobunol	1695	1689		0,48		
	Monoterpenos	-	-	55,34	51,79	58,37	66,30
	Sesquiterpenos	-	-	6,59	31,04	10,07	22,32
	Fenilpropanos	-	-	1,47	0	12,29	0,26
	Otros	-	-	25,72	2,95	0,35	6,30
	TOTAL	-	-	89,12	85,78	81,08	95,18

De los resultados obtenidos se observó que los monoterpenos constituyen entre 51 y 66 % de la composición total de los aceites, siendo los componentes mayoritarios, seguido de los sesquiterpenos con un 6 a 31%, y por último los fenilpropanos con un 0 a 12.29%, siendo los componentes minoritarios.

Dentro de los compuestos mayoritarios identificados para el aceite de *L. nobilis* se encontraron linalool (16,60%), 1,8-cineol (15,04%), acetato de- α -terpenilo (12,65%), metileugenol (10,70%) y timol (7,00%), coincidiendo con lo reportado por (Hassiotis & Dina 2011; Corato et al 2010). Para el aceite de *L. angustifolia* los compuestos mayoritarios encontrados fueron 1,8-cineol (16,00%), borneol (9.10%), α -alaskeno (7,32%) y óxido de cariofileno (6,40%), encontrándose que tres de estos compuestos han sido reportados para este aceite en estudios previos (Xiaotian et al 2020; Moussi 2017), siendo reportada por primera vez la presencia de α -alaskeno, hecho que puede deberse a la diferencia en la parte de la planta utilizada para la extracción del AE, ya que en el presente estudio se realizó la extracción de las partes aéreas de las plantas mientras que en el estudio realizado por Xiatian & Moussi el AE se extrajo de la parte floral de la planta. Los componentes mayoritarios determinados en *P. crispum* son myristicina (12.29%), α -cadinol (10.02%), 1,3,8,p-mentatrieno (8.06%) y verbenona (5.21%), comparando estos resultados con trabajos los obtenidos por (Ascrizzi 2018), se observan diferencias en la composición mayoritaria del aceites, pues los compuestos α -cadinol y verbenona no habían sido reportados como parte de la composición del AE, lo anterior puede atribuirse al método utilizado durante la extracción, la temporada en la que se cultivó, el origen geográfico o incluso al metabolismo adaptativo de la planta (Xiaotian et al 2020). El aceite de *M. spicata* contiene principalmente carvona (19.02%), timol (14.64%), limoneno (7.64%) y germacreno D (4.40%) composición que coincide con lo reportado por Ático et al 2020, con proporciones similares.

Ensayo actividad fumigante sobre *T. castaneum*

Se evaluó la actividad fumigante de los aceites esenciales de *L. nobilis*, *L. angustifolia*, *P. crispum* y *M. spicata* en diferentes concentraciones contra *T. castaneum*. La Figura 1 presenta el porcentaje de mortalidad de *T. castaneum* expuesto a la concentración de 500 μ L/L aire de los distintos aceites, observándose que con los AEs de *M. spicata*, *P. crispum* y *L. angustifolia* se logran las mayores mortalidades, superiores a 50%. *L. nobilis* no presentó un porcentaje de mortalidad superior al 50% siendo este el aceite menos activo.

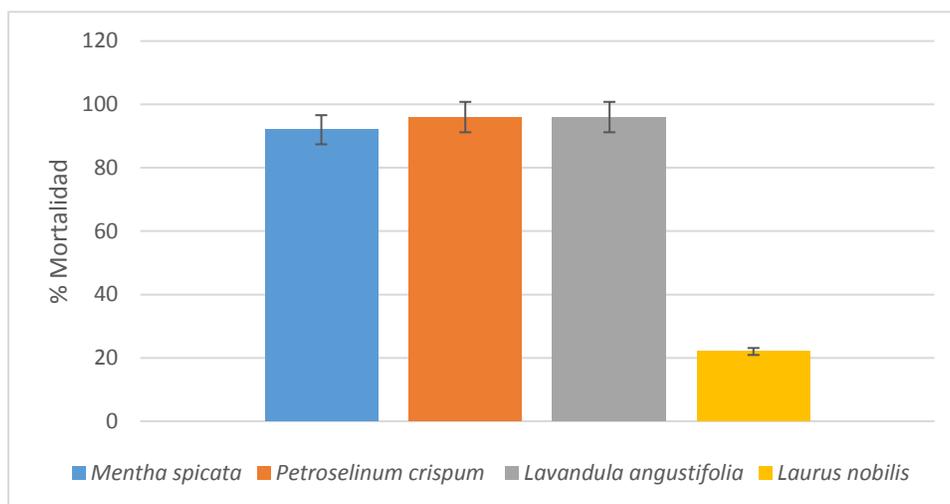


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de *T. castaneum* después de 24 horas de exposición a los diferentes AE a una concentración máxima de 500 µL/L aire

Para los tres aceites promisorios se determinó la CL_{50} , resultados que se presentan en la Tabla 2. Se observa que la actividad fumigante más alta fue la del AE de *L. angustifolia* que presentó una mortalidad del 100% en todas las concentraciones evaluadas, estos resultados también se pueden ver reflejados en estudios previos (Oviedo 2019) donde se observa que *L. angustifolia* presentó una actividad fumigante alta contra *T. castaneum* reportando una CL_{50} de 34.14 µL/L aire por lo que es necesario realizar pruebas del AE *L. angustifolia* en menores concentraciones ya que en el presente estudio no se le logró estimar la CL_{50} ya que en todas las concentraciones evaluadas presentó un porcentaje de mortalidad del 100%. *L. angustifolia* presentó compuesto mayoritarios como 1,8-cineol, borneol, α -alaskeno y óxido de cariofileno, de los cuales 1,8-cineol ha sido reportado en diversos estudios como el que presenta una alta toxicidad contra diversos ordenes de insectos entre ellos lepidópteros, coleópteros y homópteros (Geun et al 2015; Atia et al 2016).

M. spicata presentó una promisoriosa actividad fumigante (CL_{50} de 67.5 µL/L aire). Reportes previos indican que *M. spicata* ha tenido una buena actividad fumigante contra diversos tipos de insectos que afectan granos almacenado como *T. castaneum*, *Sitophilus oryzae*, *Acanthoscelides obtectus* en donde se reportó que sobre *T. castaneum* presentaba una CL_{50} de 35.6 µL/L aire (Kumar 2011). Para *M. spicata* el

compuesto mayoritario fue carvona, una cetona monotérmica monocíclica para la que se ha reportado que posee diversas propiedades repelentes e insecticidas en diversos insectos (Kumari et al 2011; Kedia et al 2014), esto se puede reflejar en su actividad insecticida, otros compuestos mayoritarios presentes en este AE son timol y limoneno, compuestos que también tienen propiedades insecticidas y fumigantes según Arias 2017 en el que presenta que estos compuestos pueden generar un bloqueo en los receptores de octopamina que es un neurotransmisor que presentan los artrópodos.

Tabla 2. Concentraciones letales (CL₅₀) de los aceites esenciales *M.spicata*, *P. crispum*, *L. angustifolia* (24 horas) sobre *T. castaneum*

Aceite esencial	CL ₅₀ (μL/L aire)	Intervalo confianza 95%	
<i>M. spicata</i>	67.15	50.75	88.86
<i>P. crispum</i>	202.5	146.8	279.3
<i>L. angustifolia</i>	< 50	ND	ND
Nuvan 50	2.72	2.48	3.12

El aceite de *P. crispum* presentó una actividad insecticida moderada con una CL₅₀ de 202,5 μL/L aire, contrastando estos resultados con los resultados reportados por (Azüero 2019) se encuentra que el AE mencionado presentó una actividad fumigante alta con una CL₅₀ mucho menor (26.58 μL/L aire), esto puede deberse a que los componente mayoritarios del presente estudio son diferentes a los que se presentan en los reportes previos, hecho que pudo generarse debido a que el material vegetal fue colectado en otra temporada ocasionando cambios en la composición del AE (Xiaotian et al 2020).

Curva de crecimiento de *L. theobromae*

Se realizó una curva de crecimiento de *L. theobromae* en dos tipos de medio de cultivo, PDA y malta Ascomycota- Agar Ceratocystis para observar si alguno de estos medios inducía a un crecimiento más rápido del hongo. La Figura 2 representa el crecimiento del hongo en los dos medios, en un transcurso de 139 horas, observándose que no hay una diferencia significativa en el crecimiento de *L. theobromae* entre estos dos medios presentando un P = 0.99. Durante el estudio también se siguió el cambio de

coloración en el transcurso de tiempo, registrando que la coloración del hongo cambio de blanco crema a gris claro en un periodo de 7 días, donde finalmente en un periodo más largo de tiempo el hongo se torna de color negro. Según observaciones de otras investigaciones el crecimiento observado para el hongo durante este ensayo es un crecimiento normal, ya que hay registros en donde se reporta un crecimiento y cambios de coloración muy similares en un transcurso de 5 a 7 días (Segura et al.,2015; Picos et al., 2014). Respecto al conteo de las estructuras reproductivas, se encontró que en el medio de PDA se produjeron 1.170 picnidios para 7 días de crecimiento, mientras que para el medio de malta se observaron 1.252 estructuras reproductivas. Si bien, hubo un aumento de las estructuras reproductivas en el medio de malta, los resultados del análisis estadístico indican que no hay una diferencia significativa en la producción de estructuras reproductivas en estos dos medios ya que se obtuvo un $P = 0.58$.

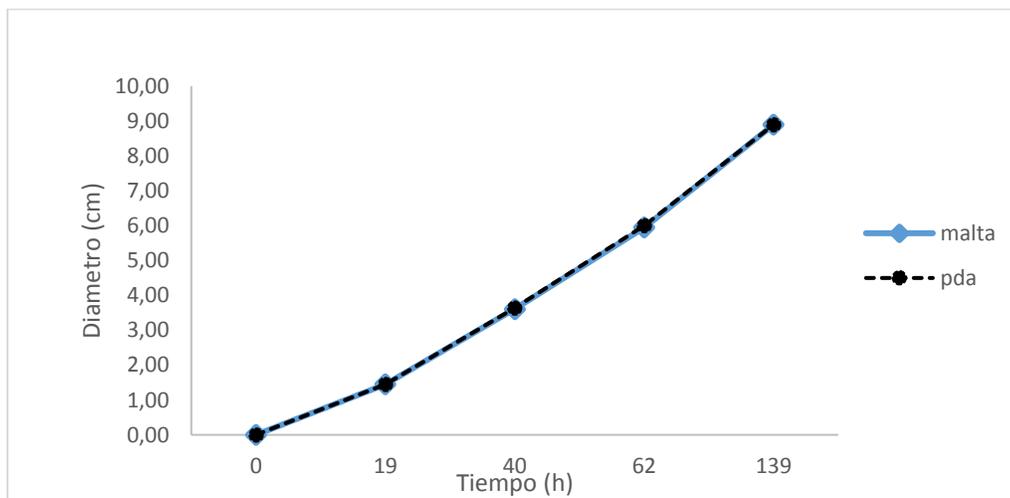


Figura 2. Crecimiento de *L. theobromae* en el medio PDA y en el Medio de malta Ascomycota- Agar Ceratocystis.

Ensayo actividad antifúngica

Se realizó el análisis de la actividad antifúngica de los cuatro aceites sobre *L. theobromae*. La Figura 3 muestra el porcentaje de inhibición de *L. theobromae* expuesto a una concentración de 182 $\mu\text{L/L}$ aire de los cuatro AEs, observando que dos de ellos tienen un porcentaje de inhibición elevado, siendo el aceite de *M. spicata* el que causó el mayor porcentaje de inhibición (100%), seguido de *L. nobilis* que presenta un porcentaje de inhibición superior al 70 %. Caso contrario se encontró que para los ensayos con *P. crispum* y *L. angustifolia* para los cuales no se obtiene una actividad antifúngica elevada, ya que el porcentaje de inhibición obtenido fue menor al 40 % a la máxima concentración.

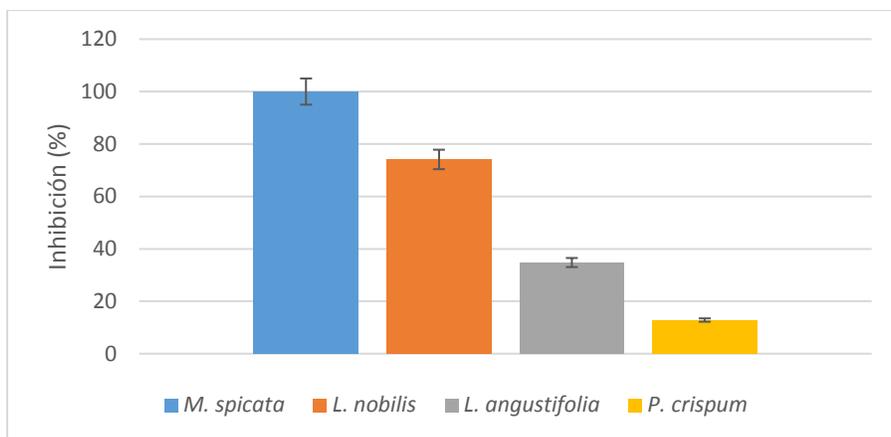


Figura 3. Porcentaje de inhibición de *L. theobromae* después de 4 días de exposición a los diferentes AE a una concentración de 182 $\mu\text{L/L}$ aire

Como se observa en la Figura 4 *L. theobromae* fue totalmente inhibida por el aceite de *M. spicata* en las concentraciones de 182 y 122 $\mu\text{L/L}$ aire y parcialmente en las concentración de 60.5 y 30 $\mu\text{L/L}$ aire. *L. nobilis* presentó una inhibición media en donde en la concentración más alta evaluada 15 $\mu\text{L/L}$ aire causó una inhibición buena, aunque no completa, mientras que para la concentración de 10 $\mu\text{L/L}$ aire presentó una inhibición parcial del hongo, en las otras concentraciones evaluadas este presentó una inhibición baja.

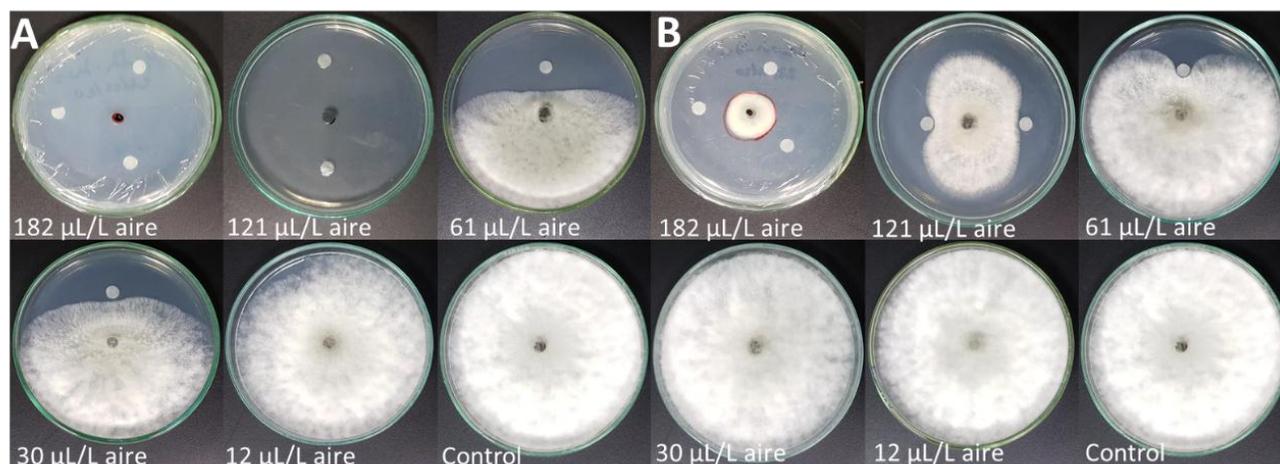


Figura 4. Registro fotográfico de los resultados del ensayo de actividad antifúngica son *L. theobromae*. (A) Aceite esencial *Mentha spicata* en concentraciones entre 12– 182 $\mu\text{L/L}$ aire. (B) Aceite esencial *Laurus nobilis* en concentraciones entre 12– 182 $\mu\text{L/L}$ aire.

En la Tabla 3 se presentan las CI_{50} de los dos AEs que presentaron una inhibición $> 50\%$. *M. spicata* fue el AE que presentó la actividad antifúngica más alta. No se encontraron reportes de actividad de este aceite sobre *L.theobromae* siendo este el primer reporte de actividad antifúngica sobre este fitopatógeno, sin embargo se ha reportado actividad antifúngica en diferentes tipos de hongos como *Aspergillus* reportados en diversos estudios (Kumar et al 2011), entre los compuestos que están presentes en *M. spicata* se destacan carvona, timol y limoneno, compuestos que tienen una gran actividad antifúngica, en donde además se encontró que puede generar un daño en la membrana plasmática del hongo ya que induce un deterioro en la biosíntesis de ergosterol (Kedia et al 2014). *L. nobilis* presentó una CI_{50} de 160.6 $\mu\text{L/L}$ aire observando que, aunque tuvo una alta inhibición en la concentración más alta evaluada en las demás concentraciones su inhibición fue baja, para este AE no se han reportado estudios sobre *L. theobromae* sin embargo hay reportes que indican que compuestos presentes en este AE como 1,8-cineol, linalol, α - terpenil y metileugenol presentan una buena actividad antifúngica presentada en diversos ordenes de hongos (Corato et al 2010; Hassiotis & Dina 2011; Rangel 2017). Teniendo en cuenta lo anterior en este estudio se reporta por primera vez la actividad antifúngica de los 4 AEs evaluados sobre *L. theobromae*.

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias (CI_{50}) de los aceites esenciales *M. spicata* y *L. nobilis* (4 días) sobre *L. theobromae*

Aceite esencial	CI_{50} ($\mu\text{L/L}$ aire)	Límite de confianza 95%	
<i>M. spicata</i>	76.53	68.98	84.90
<i>L. nobilis</i>	160.6	157.1	164.3

CONCLUSIONES

Se puede concluir que los cuatro AEs se componen principalmente de monoterpenos, y en general su composición química está de acuerdo con la quimiotaxonomía de los géneros a las que pertenecen las especies. De los cuatro AEs, *Lavándula angustifolia* presentó mayor potencial insecticida y podría considerarse como una alternativa para el control de *T. castaneum* frente a los insecticidas convencionales. En cuanto a los dos medios evaluados sobre *L. theobromae* se puede concluir que no

hay una diferencia entre los medios PDA y agar-malta para su crecimiento y para la generación de estructuras reproductivas. Respecto a la actividad antifúngica se encontró que dos de los cuatro AEs evaluado tienen un potencial antifúngico importante que corresponde a *M. spicata* y *L. nobilis* siendo este el primer reporte de la actividad antifúngica de los AEs evaluados. Finalmente se puede concluir que el AE de *M. spicata* presentó una buena actividad sobre las dos plagas estudiadas.

Agradecimientos

A Colciencias, la Pontificia Universidad Javeriana y la Universidad Nacional de Colombia por la financiación con recursos del Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de caldas a través del proyecto con contratos 382-2016 y código 12371250800. A la profesora Juliet Prieto Rodríguez, por su acompañamiento, asesoría y paciencia durante este proceso, a los integrantes del laboratorio de Bioensayos del Grupo de Investigación Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana por su apoyo en este proceso. A mi familia, y amigos por su apoyo incondicional durante todo el proceso de mi carrera, y a mi Abuelo el Sr Manuel Guillermo Alejo Guevara quien desde el principio me brindo su apoyo, colaboración y cariño incondicional, además de guiarme en este camino de aprendizaje.

BIBLIOGRAFIA

- Adams R.P (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. printed by Allured, ed. 4.1.
- Arias J, Silva G, Figueroa I, Ficher S, Robles I, Rodriguez J, Lagunes A (2017). Actividad Insecticida, repelente y antialimentaria del polvo y aceite esencial de frutos de schinus molle l. para el control de sitophilus zeamais (motschulsky). Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia,33(2):93-104.
- Ascrizzi R, Fraternali D, Flaminia G (2018). Photochemical response of parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) grown under red light: The effect on the essential oil composition and yield. Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology Volume 185, August 2018, Pages 185-191.
- Atico V, Santos G, Arruda C, Santos C, Santos A, Cost H, Lapa C, Coelho A, Teixeira V (2020). Effect of essential oils of *Mentha spicata* L. and *Melaleuca alternifolia* Cheel on the midgut of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae). Acta Histochemica. Volume 122, Issue 3.

- Attia S, Lognay G, Heuskin S, Hance T (2016). Insecticidal activity of *Lavandula angustifolia* Mill against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 4(1): 118-122.
- Azuero J (2019). Caracterización química de aceites esenciales comerciales y evaluación de su capacidad anti alimentaria y fumigante contra *Tribolium castaneum*. facultad de ciencias, pontificia universidad javeriana.
- Copping L.G, Menn J.J (2000). Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56, pp. 651-676.
- Corato U, Maccioni O, Trupo M, Sanzo G (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop Protection Volume 29, Issue 2, February 2010, Pages 142-147*.
- Cosimi S, Rossi E, Cion P.L, Canale, A (2009). Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products Research*, Volume 45, Issue 2, Pages 125-132.
- Dane (2019). En el segundo trimestre del año 2019 la economía Colombiana creció 3,0%.
- Devine G, Eza D, Ogusuku E, Furlong M (2008). Uso de Insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 25 (1): 74-100.
- García L, Burt A.J, Serratos A, Díaz Pontones D.M, Arnason J.T, Bergvinson D.J (2003). Defensas naturales en el grano de maíz al ataque de *sitophilus zeamais* (motsch, coleoptera: curculionidae): mecanismos y bases de la resistencia. *REB* 22(3): 138-145.
- Geun C, Trung T, Hyeok S, Choi B, Kwon M, Ahn J (2015). Toxicity of *Lavandula Angustifolia* Oil Constituents and Spray Formulations to Insecticide-Susceptible and Pyrethroid-Resistant *Plutella Xylostella* and Its Endoparasitoid *Cotesia Glomerata*. *Pest Manag Sci.*72(6):1202-10.
- Hassiotis C, Dina I (2011). The effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) on development of two mycorrhizal fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 65, Issue 4, Pages 628-634.
- ICCO (2015). Fine or Flavour Cocoa, International Cocoa Organization Web Site: <http://www.icco.org/aboutcocoa/fine-or-flavour-cocoa.html>, Consultado en enero 14 del 2020.
- Kumar A, Malika A (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms, *Food Control* Volume 22, Issue 11, Pages 1707-1714.
- Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*, Volume 34, Issue 1, Pages 802-817.
- Kedia A, Prakash B, Kumar P, Chanotiya C, Kishore N (2014). Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Volume 89, April 2014, Pages 29-36.
- Llanos C .A, Lopera Arango D, Mariluz Ceballos Giraldo (2008). Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Revista Colombiana de Entomología* 34 (1): 76-82.

- MADR (2018). Cifras sectoriales Cadena de Cacao. Sistema de Información de Gestión y Desempeño de Organizaciones de Cadena - SIOC. Bogotá.
- Malagón D (2002). Los suelos de Colombia, Revista de la academia de ciencias geográficas, 46, (135).
- Moussi M, Houda F, Haj A, Kaotar N, Mohammed T, Imane R & Farid H (2017). Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of Moroccan *Lavandula angustifolia* Mill. Journal of Essential Oil Bearing Plants Volume 20, 2017 - Issue 4
- Miniagricultura (2019). MinAgricultura resalta aumento del PIB agropecuario del 2.6% en el tercer trimestre, <https://www.minagricultura.gov.co/noticias/Paginas/MinAgricultura-resalta-aumento-del-PIB-agropecuario-del-2-6-en-el-tercer-trimestre.aspx>, Consultado en enero 25 del 2019.
- Miresmailli S, Isman M.B (2014). Insecticidas botánicos inspirados en interacciones químicas entre plantas y herbívoros. *Tendencias Plant Sci*, 19, pp. 29 – 35
- NIST: National Institute of Standards and Technology (<https://webbook.nist.gov/chemistry/>)
- Oviedo J (2019). Efectos insecticidas y bioquímicos de aceites esenciales obtenidos de plantas colombianas sobre el gorgojo rojo de la harina, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias.
- Patiño, W. (2017). Aceites esenciales como potenciales agentes fitosanitarios para el control de *Sitophilus zeamais*. Universidad Nacional de Colombia.
- Perfetti J. J, Balcázar A, Hernández A, Leibovich J (2013). Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia. Incoder, Finagro, Banco Agrario, Colombia.
- Picos-Muñoz P. A, García-Estrada R.S, León-Félix J, Sañudo Barajas A, Allende-Molar R (2014). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 54-74.
- Pranavi S, Prasad M.S.K, Lakshmipathi. V (2016). Complete study of life cycle of *tribolium castaneum* and its weight variations in the developing stages. *International journal of plant, animal and environmental sciences*, Volume 6, Issue 2.
- Prieto, J. (2012). Estudio fitoquímico de *Compsoeura capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus* sp. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/11391/>.
- Prieto J. A, Pabon L.C, Patino O.J, Delgado W A, Cuca L.E (2010). Constituyentes químicos, actividad insecticida y antifúngica de los aceites esenciales de hojas de dos especies colombianas del género *Ocotea* (LAURACEAE), Departamento de química, facultad de ciencias, universidad nacional, *Revista Colombiana de Química*, 39(2):199-209.
- Rangel L, Rosalen P, Silva G, Almeida I, Galbiattide F, Castellano L, Dias R (2017). Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, Volume 73, January 2017, Pages 179-185.
- Regnault, C. (1997). The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*, 2, 25–34.

- Ríos J. L (2016). Aceites Esenciales en Conservación. Sabor y Seguridad Alimentaria, pag 1-13, <https://doi.org/10.1016/C2012-0-06581-7>.
- Sánchez Cueva M, Aguilar J, Edison E, Ramírez M, Eduardo I (2015). Enfermedades del cacao. universidad técnica de Machala, Ecuador.
- Sankarikutty, Narayanan C. S (2003). Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). Academic Press, USA.
- Segura S, RodríguezM, Chico J (2015). Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas, 35(2): 47-52.
- Suárez J, Hernández A (2010). Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). Colombia. Corpoica. 90 p.
- The Pherobase Data of Pheromones and Semiochemicals. (<https://www.pherobase.com/>).
- Van Den Dool, H., & Dec. Kratz, P. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal of Chromatography A, 11(C):463–471.
- Vergara R (1994). Artrópodos plagas de los granos, semillas y derivados almacenados (Guías Talleres Prácticos Entomología Económica No. 8). Medellín: Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. 18 p.
- Villalobos P, Acosta B, Soler A (2014). toxicidad y repelencia de aceites esenciales en plagas de almacén del arroz. Bol. San. Plagas. 30,279-286.
- Xiaotian C, Lanyue, Chenyu Q, Zhiyun D, Peng X, Zhangmin X (2020). Chemical compositions of essential oil extracted from *Lavandula angustifolia* and its prevention of TPA-induced inflammation. Microchemical Journal Volume 153.