



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
ESCUELA INGENIERÍA QUÍMICA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DEL ACEITE DE *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry EN EL CONTROL DE ADULTOS DE *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Díptera: Tephritidae)**

Ing. Viky C. Mujica  
Asesor Metodológico

Prof. Doménico Pavone  
Tutor Académico  
(FACYT)

**Autores:**

Br. Carol González  
Br. Grennys Pereira

Valencia, Enero 2007

## RESUMEN

La evaluación de la actividad insecticida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en el control de una población de adultos de *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae), una importante plaga en cultivos de mango, fue estudiado en el presente trabajo. En la obtención del aceite esencial mediante técnicas de extracción adecuadas se seleccionaron procesos convencionales que usan como solvente el agua, entre ellos la hidrodestilación y el arrastre con vapor de agua; los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al rendimiento. De hecho, el proceso por hidrodestilación resultó más apropiado en la extracción de aceite de clavo de olor al obtener un mayor rendimiento con  $(5,16 \pm 0,01) \%$ ; en contraste con el proceso por arrastre con vapor de agua, cuyo rendimiento fue de  $(0,57 \pm 0,01) \%$ . Por otra parte, se evaluó el potencial de atracción del aceite hacia una población de adultos de la especie *A. obliqua* al compararlo con productos atrayentes comerciales; quedando demostrado que el aceite esencial no posee poder atrayente hacia la especie en estudio. También, se evaluó la actividad insecticida del aceite de clavo de olor sobre una población de adultos de la mencionada especie y se concluyó que el extracto en solución en solvente apropiado posee efecto tóxico sobre estos insectos. Se realizó el análisis Probit en la determinación de la dosis letal que mata al 50% de la población o  $DL_{50}$  cuyo valor fue  $7,87 \%v/v$  en 24 horas. A pesar de la toxicidad de *S. aromaticum* sobre las moscas adultas de *A. obliqua*, es necesario realizar el análisis del aceite por cromatografía de gases y espectrometría de masas a fin de determinar la composición de sus componentes más importantes y comparar con los aceites obtenidos por otros procesos de extracción; asimismo, llevar los bioensayos en condiciones de campo que permitan recabar mayor información en la definitiva incorporación de este aceite en programas de Manejo Integrado de Plagas.

**Palabra clave:** Clavo de olor, extracción, hidrodestilación, arrastre con vapor húmedo, *Mangifera indica*.

## SUMMARY

The evaluation of the insecticide activity of the oil of clove buds (*Syzygium aromaticum*) in the control of an adult population of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae), an important plague in mango cultivation, was studied in the present work. In the obtaining of the essential oil by techniques of extraction conventional processes were selected that use like solvent the water, among them the hidrodistillation and the drag with water steam; which presented statistically significant differences with respect to the yield. In fact, the process by hidrodistillation was more appropriate in the extraction from oil of clove buds when obtaining a greater yield with  $(5, 16 \pm 0, 01) \%$ ; in contrast to the process by drag with water steam, whose yield was of  $(0, 57 \pm 0, 01) \%$ . On the other hand, the potential of attraction of the oil was evaluated toward an adult population of the specie *A. obliqua* when comparing it with commercial attractive products; being demonstrated that the essential oil does not have to be able attractive towards the specie in study. Also, the insecticide activity was evaluated of the oil of clove buds on a population of adults of the mentioned specie and it concluded that the extract in reliable solution in appropriate solvent has toxic effect on these insects. The Probit analysis was made in the determination of the lethal dose that it kills 50% of the population or  $DL_{50}$  whose value was  $7, 87 \%v/v$  in 24 hours. In spite of the toxicity of *S. aromaticum* on the adult flies of *A. obliqua*, is necessary to make the analysis of the oil by gases chromatography and spectrometry of masses in order to determine the composition of its components more important and to compare with oils obtained by other processes of extraction; also, to take the bioensayos in conditions of field that allow to obtain greater information in the definitive incorporation of this oil in programs of Integrated Handling of Plagues.

**Key word:** clove buds, extraction, hidrodistillation, drag with water steam, *Mangifera indica*.





## ÍNDICE GENERAL

	pp.
Índice de tablas	viii
Índice de figuras	ix
Resumen	x
Introducción	1
Capítulo I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. Descripción del problema	3
1.2. Situación actual	5
1.3. Situación deseada	6
1.4. Objetivos	6
1.4.1. Objetivo general	6
1.4.2. Objetivos específicos	6
1.5. Justificación	7
1.6. Limitaciones	8
Capítulo II MARCO TEÓRICO	9
2.1. Antecedentes	9
2.2. Fundamentos teóricos	14
Capítulo III MARCO METODOLÓGICO	24
3.1. Establecimiento de las variables relevantes que afectan al proceso de extracción del aceite	24
3.2. Evaluación de las técnicas experimentales en la extracción del aceite esencial	28
3.3. Evaluación del potencial de atracción del aceite esencial hacia la población de adultos de <i>A. obliqua</i>	29



---

3.4. Evaluación del efecto insecticida del aceite esencial sobre una población de adultos de <i>A. obliqua</i>	33
81Capítulo IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Conclusiones	55
Recomendaciones	56
Referencias bibliográficas	57
Apéndice A Método operatorio del proceso de extracción con agua de aceites esenciales	64
Apéndice B	
B.1. Cálculos más relevantes involucrados en los procesos de extracción de <i>S. aromaticum</i>	70
B.2. Cálculos más relevantes involucrados en los bioensayos de potencial de atracción y susceptibilidad sobre una población de adultos de <i>A. obliqua</i>	73
Apéndice C	
C.1. Datos obtenidos en los procesos de extracción de <i>s. aromaticum</i>	77
C.2. Datos obtenidos en los bioensayos de la actividad insecticida del aceite de clavo sobre moscas adultas de <i>a. obliqua</i>	81
Anexos	85



---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tablas</b>	<b>pp.</b>
3.1 Características de los procesos de extracción de aceite de clavo	25
4.1 Aspectos relevantes en la obtención de aceite de clavo de olor	38
4.2 Rendimiento de aceite de <i>S. aromaticum</i> en el proceso de extracción	43
4.3 Características del destilado durante los procesos de destilación de <i>S. aromaticum</i>	43
4.4 Dosificación de agua precalentada durante los procesos de extracción de <i>S. aromaticum</i>	43
4.5a Mortalidad a las 24h de moscas adultas de <i>A. obliqua</i> susceptibles a las concentraciones de aceite esencial por aplicación tópica	51
4.5b Mortalidad a las 48h de moscas adultas de <i>A. obliqua</i> susceptibles a las concentraciones de aceite esencial por aplicación tópica	51
4.6 Características del análisis Probit a las 24 h y 48 h para la población total de las moscas adultas de la generación F <sub>2</sub>	53



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		pp.
2.1	Clavo de olor ( <i>S. aromaticum</i> )	18
2.2	Estructuras químicas de componentes presentes en el aceite de <i>S. aromaticum</i>	19
2.3	Morfología general de la hembra adulto de <i>A. obliqua</i>	19
2.4	Mango infestado con larvas de <i>A. obliqua</i>	20
2.5	Ciclo biológico del género <i>Anastrepha</i>	21
3.1	Equipo de destilación de aceites esenciales a escala de laboratorio	26
3.2	Secuencia metodológica en la fundación de la generación filial F <sub>0</sub>	30
3.3	Secuencia metodológica en la fundación de las generaciones filiales F <sub>1</sub> y F <sub>2</sub>	31
3.4	Unidad experimental de la prueba de potencial de atracción	32
3.5	Secuencia metodológica de la prueba de susceptibilidad al aceite esencial por aplicación tópica	35
4.1	Diagrama de Ishikawa para el proceso de extracción de aceite esencial de clavo de olor con agua	40
4.2	Prueba de significancia con $p=0,00007$ al 95% de confianza para los rendimientos de los métodos de extracción de aceite de clavo de olor	45
4.3	Masa acumulada de aceite de <i>S. aromaticum</i> obtenido durante los procesos de hidrodestilación (h) y arrastre con vapor de agua (vh)	46
4.4	Rendimiento acumulado del proceso de extracción de aceite esencial de <i>S. aromaticum</i> obtenido por hidrodestilación (h) y arrastre con vapor agua (vh)	47
4.5	Efecto de atracción de hembras (♀), machos (♂) y de población total (♂+♀) de moscas adultas de <i>A. obliqua</i> a las formulaciones de PedGo Plus <sup>®</sup> , FAGRO-UCV-10 <sup>®</sup> , Eugrenca y testigo	49
4.6	Representación de la DEN para la población total de <i>A. obliqua</i> en función del logaritmo decimal de las diferentes concentraciones de Eugrenca	53





## INTRODUCCIÓN

El presente estudio trata la extracción del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) con la condición de operación y la evaluación de la actividad insecticida de éste sobre la población de adultos de *Anastrepha obliqua*, como uno de los insectos plaga más importante del fruto de mango. Se plantean como objetivos fundamentales el establecimiento de las variables que afectan al proceso de extracción del aceite de *S. aromaticum*, con la apreciación de las técnicas experimentales y la selección de la más apropiada para su extracción; así como, la evaluación del potencial de atracción y el efecto insecticida sobre los adultos de la especie *A. obliqua*.

La extracción de aceites esenciales a partir de plantas aromáticas se realiza por medio de métodos difusionales, donde la separación se alcanza por difusión de uno o varios componentes, cuando al menos dos fases se ponen en contacto. El método más empleado a escala de laboratorio y a nivel industrial es la destilación con agua, cuyo principio es llevar a estado de ebullición una fase acuosa en presencia del material vegetal aromático, de manera tal que los vapores generados puedan ser condensados y recolectados.

La metodología de la investigación actual se realiza en dos fases experimentales: la primera, se inicia con la identificación y selección de las variables que afectan al proceso de extracción de aceite de clavo de olor, bajo las condiciones de operación adecuadas en su obtención; luego, la selección del procedimiento experimental más apropiado de las técnicas empleadas, con base en los rendimientos obtenidos y sustentado en el análisis estadístico. En la segunda fase, se evalúan las propiedades insecticidas del aceite sobre moscas adultas de *A. obliqua*, mediante la realización de ensayos de potencial de atracción y de efecto tóxico por aplicación tópica. En éste último ensayo, se realiza un análisis Probit a fin de determinar la dosis que mata al 50% de la población.

Los capítulos están en el siguiente orden y se encuentran relacionados a: Capítulo I: Planteamiento del problema, donde se describe el problema, la situación actual, la situación deseada y las limitaciones existentes en la realización de la investigación; Capítulo II: Marco teórico, que presenta los antecedentes y fundamentos

teóricos relacionados al proceso de extracción de aceites esenciales, específicamente de clavo de olor, así como de la actividad insecticida sobre *A. obliqua* como un insecto plaga del mango y su importancia económica; Capítulo III: Marco metodológico, se relatan las secuencias metodológicas en la obtención de datos y respuestas confiables, asimismo de las herramientas estadísticas que aplican en el procesamiento adecuado de la información obtenida. Finalmente, Capítulo IV: Resultados y discusión, donde se presentan los resultados junto a la discusión de los mismos. Además se establecen las conclusiones más relevantes y se realizan recomendaciones respecto a los objetivos establecidos.

En Venezuela la producción de aceites esenciales es casi inexistente en comparación con otros países, aún cuando se encuentran procesos de extracción sujetos a rediseños y optimizaciones ante la existencia y desarrollo de nuevas tecnologías destinadas a la obtención de extractos provenientes de especies naturales. Por otra parte, el País es exportador del fruto de mango y sus cultivos son atacados por la especie *A. obliqua*, cuyas larvas causan graves daños al fruto inhabilitándolo para el consumo y por ende surge la necesidad de enriquecer los métodos en el control de esta plaga. Por todo lo expuesto, este trabajo aporta conocimientos al ámbito de los procesos de extracción de aceites esenciales y contribuye al enriquecimiento de las técnicas empleadas en el control de insectos plaga, específicamente la especie *A. obliqua*.



## CAPÍTULO I

### I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En ésta sección se dará a conocer el problema en estudio mediante su descripción detallada y la formulación del mismo, así como la exposición de la situación actual, la situación deseada y el alcance de ésta; además se presentarán las razones que justifican la investigación y los aspectos que la limitan.

#### 1.1.- DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Las especias son conocidas desde hace siglos por sus propiedades aromáticas y han sido empleadas como condimento en alimentos (Marcano y Hasegawa, 1991); asimismo, los aceites esenciales procedentes de éstas son usados en la fabricación de productos farmacéuticos, cosméticos, insecticidas, antioxidantes y fungicidas, entre otros (Della Porta *et al.*, 1998; Philip, 1997; Marcano y Hasegawa, 1991). En Venezuela, se importa gran parte de los aceites aromáticos, utilizándose a escala comercial, tales como: limón (*Citrus limonum*), naranja (*Citrus sinensis*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), menta (*Mentha arvensis* y *Mentha spicata*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) (Urbáez, 2003; Moyler, 1991).

De las plantas anteriormente nombradas, *S. aromaticum* produce un aceite con propiedades antiséptica, anestésica, desinfectante, cicatrizante, antiinflamatoria, aromatizante, antimicrobial, esterilizante, insecticida y antiespasmódico (Della Porta *et al.*, 1998; Carrero, 1996; Myint *et al.*, 1996; Metcalf y Flint, 1978). Dicho aceite posee en su composición un elevado porcentaje de eugenol que oscila entre 60 y 95% (Della Porta *et al.*, 1998; Marcano y Hasegawa, 1991), otorgándole gran potencial atractivo y económico por la variedad de propiedades que se le atribuye. Este aceite se obtiene comúnmente a partir de las hojas del árbol o de los botones de la flor por



modalidades de la técnica de destilación con agua, con un rendimiento en aceite del 10 al 20% en comparación con otros aceites esenciales (limón, piña, menta, entre otros) que no superan el 1%; (Marín y Ojeda, 2005; Dellacassa *et al.*, 2004b; Guillén y Hernández, 2003; Marcano y Hasegawa, 1991; Moyler, 1991).

Como ya se mencionó, el aceite de *S. aromaticum* posee muchas propiedades que pueden ser aprovechadas desde el punto de vista económico, una de las que podría tener mayor impacto corresponde a la evaluación de la propiedad insecticida del aceite, ya que complementaría a las técnicas empleadas en el control de algunas plagas que afectan a los cultivos agrícolas, repercutiendo positivamente en el rendimiento de los mismos al mejorar las condiciones fitosanitarias del fruto.

Así, han sido estudiados los atributos tóxicos del extracto de clavo de olor y eugenol puro sobre diversos insectos considerados plaga: *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isóptera: Rhynotermitidae) (Park y Shin, 2005); *Attagenus unicolor japonicus* (Coleóptera: Dermestidae) (Mi-Kyeong *et al.*, 2004); *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae) (Yang *et al.*, 2003); *Periplaneta americana* (Orthoptera: Blattidae) (Enan, 2001); *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) (El Hag *et al.*, 1999). Análogamente, han sido estudiadas las propiedades atrayentes del metileugenol en otras especies, a saber: *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) (Hee y Tan, 2006) y *Bactrocera papayae* (Diptera: Tephritidae) (Hee y Tan, 2004).

De los insectos mencionados anteriormente, la familia Tephritidae es de gran importancia desde el punto de vista económico, ya que causa graves daños a cultivos de gran potencial económico, como el mango y otros frutales; siendo el género *Anastrepha* uno de los que origina mayores problemas en países tropicales y subtropicales (Caraballo, 2001). Venezuela no escapa a esta problemática, puesto que el fruto de mango es atacado principalmente por *Anastrepha obliqua* (Macquart) (Diptera: Tephritidae) (mosca del mango) y *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Diptera: Tephritidae) (mosca del mediterráneo); responsables del deterioro fitosanitario de sus cultivares, debido a la presencia de larvas en los frutos que lo inutilizan, descartándolos para su posterior consumo (Luque, 2005; Galán, 1999; Varela, 1994).



Venezuela es uno de los principales países exportadores del fruto de mango, de hecho, para el año 2004 contaba con cultivares de 4.540 hectáreas, una producción de 65.147 toneladas y un rendimiento de 14.350 Kg/hectárea; siendo Aragua y Guárico los estados de mayor producción (Dirección de Estadística del Ministerio de Agricultura y Tierra, 2004). En atención a lo expuesto, se requiere de la aplicación de métodos de control para evitar la presencia de insectos plaga, como *A. obliqua*, en cultivos de mango a fin de obtener productos aptos para el consumo y la exportación. Si bien los insecticidas químicos son una alternativa, estos pueden causar graves daños desde el punto de vista de salud pública y ambiental; por ende, se requiere implementar alternativas más amigables con el ambiente y que tengan un bajo impacto en la salud humana (Galán, 1999). De allí la necesidad de desarrollar insecticidas basados en productos naturales como método alternativo, que puedan ejercer un control eficiente sobre el insecto. El eugenol, uno de los principales componentes del aceite de clavo de olor, es considerado de riesgo mínimo respecto a los insecticidas sintéticos (Russ, 2005; Aguilar, 2001; Metcalf y Flint, 1978).

El aceite de *S. aromaticum* posee un elevado porcentaje de eugenol, responsable de las múltiples propiedades del mismo (Della Porta *et al.*, 1998; Marcano y Hasegawa, 1991); de allí que se perfila como candidato para ser utilizado en el control de *A. obliqua*. Sin embargo, se requiere determinar dos aspectos fundamentales: (a) la selección de la técnica de extracción más apropiada en la obtención de altos rendimientos del extracto y (b) la evaluación de su actividad insecticida sobre adultos de *A. obliqua*.

## 1.2.- SITUACIÓN ACTUAL

En Venezuela se importa la mayoría de los aceites aromáticos que se utilizan a escala comercial, entre ellos el clavo de olor; asimismo, los costos asociados a los procesos de extracción elevan el valor comercial de estos aceites y en efecto de los productos que se elaboran a partir de los mismos.

En otros países se han realizado investigaciones que sustentan la propiedad insecticida del aceite esencial de clavo de olor sobre diversos insectos diferentes a la



mosca, así como de la capacidad de atracción de sus componentes hacia la familia Tephritidae. Por otra parte, en Venezuela se han llevado a cabo estudios relacionados con el efecto tóxico de insecticidas sintéticos sobre la mosca del mango; sin embargo, no existen investigaciones en el país que caractericen la actividad insecticida del aceite de *S. aromaticum* sobre los adultos de *A. obliqua*.

### **1.3.- SITUACIÓN DESEADA**

Obtener el aceite de clavo de olor mediante la metodología adecuada con la determinación de las condiciones de operación apropiadas en su extracción, empleando procesos convencionales de bajo costo y eficientes; todo ello, en el establecimiento de la técnica apropiada en la obtención del aceite.

Asimismo, evaluar la actividad insecticida de *S. aromaticum* sobre la población de adultos de la especie *A. obliqua*, para obtener un producto natural como alternativa en las técnicas empleadas en el manejo integrado de ésta plaga, que atacan y causan graves daños a los cultivos de mango.

### **1.4- OBJETIVOS**

#### **1.4.1. Objetivo General**

Evaluar la actividad insecticida del aceite de *S. aromaticum* extraído por método convencional en el control de adultos de *A. obliqua*, con el fin de introducirlo a las técnicas empleadas en el manejo integrado de plagas.

#### **1.4.2.- Objetivos Específicos**

1. Establecer las variables relevantes que afectan al proceso de extracción del aceite de *S. aromaticum*, a fin de determinar las condiciones de operación adecuadas.



2. Evaluar las técnicas experimentales en la extracción del aceite esencial, para la selección de la apropiada con base en los rendimientos obtenidos.
3. Evaluar el potencial de atracción del aceite esencial hacia los adultos de *A. obliqua*, con el propósito de enriquecer las técnicas de control de la especie.
4. Evaluar el efecto insecticida del aceite esencial sobre una población de adultos de *A. obliqua*, con la finalidad de uso como producto natural en el control de la especie.

### 1.5.- JUSTIFICACIÓN

En Venezuela, la producción de especies como fuente de aceites esenciales es casi inexistente en comparación con otros países comerciantes de este rubro, como Madagascar y las Islas Malucas que producen grandes cantidades de clavo de olor. Por otra parte, el país es un importante exportador del fruto de mango y no escapa de los problemas que acarrearán las larvas de la mosca en estos cultivos. Por ello, se precisa la aplicación de métodos integrados en el control de plagas que ocasionen un bajo impacto ambiental, para obtener un producto de excelente calidad y apto para la exportación. Por todo lo expuesto, se propone la utilización de un insecticida natural a partir del aceite esencial de clavo de olor, para su posible uso en el control de la población de adultos de *A. obliqua*.

En lo que respecta al valor teórico, el estudio actual aporta conocimientos al ámbito de los procesos de extracción de aceites esenciales y contribuye asimismo, al enriquecimiento de las técnicas empleadas en el control de insectos plaga, específicamente la especie *A. obliqua*. De modo que sirve de cimiento a estudios posteriores, tanto en la evaluación de los factores que intervienen y afectan al proceso de extracción del aceite de *S. aromaticum* empleando técnicas convencionales; así como en la evaluación de la actividad insecticida del aceite como una alternativa en los métodos integrados de control de la población de adultos de insectos plaga.

### 1.6. LIMITACIONES





---

La limitación principal que presenta esta investigación es la falta de equipos y accesorios de mayor tecnología, tanto en la realización de las extracciones como en la caracterización e identificación de los componentes del aceite. Se requiere de un cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas para la identificación y cuantificación de los componentes presentes en el aceite.

Otro restrictivo corresponde al levantamiento y mantenimiento de las crías de la población de moscas de *A. obliqua*, destinadas a los bioensayos de potencial de atracción y de actividad insecticida, relacionadas directamente con la recolección de frutos de mango la cual está sujeta a la temporada de fructificación.



## CAPÍTULO II

### II. MARCO TEÓRICO

A continuación, se hace referencia a trabajos de investigación orientados a la factibilidad técnica-económica de los procesos de extracción de los aceites esenciales y su factibilidad de uso; también estudios que evalúan el comportamiento de insectos adultos ante un compuesto con actividad tóxica o atrayente. Asimismo, se muestran los cimientos teóricos que sustentan el presente trabajo de grado.

#### 2.1- ANTECEDENTES

Recientemente, se realizó el estudio de la susceptibilidad de una población adulta de *Anastrepha obliqua* (Macquart), Diptera: Tephritidae, a las aplicaciones tópicas del insecticida Malatión® (Contreras, 2005); cuyo objetivo principal se cimentó en caracterizar la susceptibilidad de una población de *A. obliqua* a las aplicaciones tópicas de éste insecticida, a través de bioensayos de laboratorio en generaciones sucesivas. Los valores de mortalidad para las dosis letales 50 y 95 para hembras más machos fueron de 8,62 ppm y 31,25 ppm, respectivamente; como promedio de resultados de tres generaciones de insectos. En el presente trabajo se pretende de forma análoga establecer una colonia de adultos de *A. obliqua*, utilizando larvas de la especie procedentes de plantaciones de mango no tratadas con insecticidas. Se pretende deducir los niveles de concentración de susceptibilidad al aceite de clavo de olor a través de bioensayos por aplicación tópica. Cabe destacar, en este antecedente implícitamente cuantificaron y caracterizaron valores de Knock-Down (KD) a 2 °C para adultos de *A. obliqua* existentes en el laboratorio, que en la investigación actual no se pretende realizar.

---

El desarrollo de un bioinsecticida a partir de la azadiractina presente en el aceite de neem (*Azadirachta indica*) fue realizado por Montañez (2005); cuyos objetivos fundamentales fueron extraer el aceite mediante prensado al frío, determinar su propiedad insecticida sobre *Aedes aegypti* y desarrollar un producto repelente bajo una presentación en crema. Se concluyó que los extractos aceitosos de *A. indica* pueden ser utilizados como componentes activos de productos repelentes e insecticidas, específicamente sobre adultos de *A. aegypti*, siendo la formulación más efectiva en repeler a los insectos aquella con 20% de aceite de neem, 2% de aceite de sésamo (*Sesamum indicum* L.), 5% de aceite de jazmín (*Jasmine officinale*) y 73% de crema base. La semejanza fundamental con ésta investigación es la evaluación de la propiedad insecticida del aceite esencial obtenido sobre un insecto objeto; en contraste, en este antecedente se caracterizó y se comprobó la estabilidad del aceite de neem en el tiempo, así como también, se empleó la técnica de prensado al frío que difiere del fundamento de los procesos de destilación que se estudian en el presente trabajo.

La comparación de aceites esenciales de botones de clavo extraído con dióxido de carbono supercrítico y otros tres métodos de extracción tradicionales (*Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods*) fue realizado por Wenqiang, Shufen, Ruixiang, Shaokun y Can (2005). En este estudio se compararon los aceites esenciales de los botones de clavo obtenidos por SFE, hidrodestilación, destilación al vapor y extracción por Soxhlet, basados en los análisis de cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas. Los resultados arrojaron que en las diversas técnicas la composición del aceite extraído fue similar, mientras que la concentración de los compuestos identificados fue diferente; la SFE a la presión de 10 MPa y temperatura de 50 °C, fue considerado como el proceso óptimo entre los cuatro procesos para obtener el aceite de clavo con alta calidad, donde se obtuvo un rendimiento en aceite esencial de 19,56% con un contenido máximo de eugenol de 58,77%. Análogamente, en la presente investigación se comparan técnicas de destilación en la obtención y evaluación del aceite de clavo de olor fundamentado en los rendimientos del mismo, aunque se prescinde de las extracciones con SFE y por Soxhlet.

---

En cuanto al efecto de los aceites aromáticos sobre insectos, se llevó a cabo un estudio de la evaluación del efecto de aceites esenciales de lavanda (*Lavandula officinalis* Chaix) y laurel (*Laurelia sempervirens*) sobre el ácaro *Varroa destructor* Anderson & Truemann (Acari: Varroidae), causante de daños en abejas melíferas, (Neira, Heinsohn, Carrillo, Báez y Fuentealba; 2004). Se realizaron cuatro tratamientos: aceite esencial de lavanda (30%), aceite esencial de laurel (30%), controles con acetona pura y con agua destilada; aplicada en jaulas con 15 abejas, cada una parasitada con un ácaro. El efecto de los aceites esenciales de lavanda y laurel en la conducta de *V. destructor* son de atracción, repelencia o toxicidad, ya que ambos aceites esenciales removieron el 100% de los ácaros, cifra significativamente mayor al registrado en los controles con acetona y agua destilada. La afinidad con el presente estudio es la evaluación del impacto biocida del aceite esencial obtenido, sobre organismos de comprobado efecto perjudicial.

La evaluación del rendimiento de tres procesos de extracción diferentes para la obtención de esencia de piña (*Ananas comosus*) (Guillén y Hernández, 2003); consistió en evaluar el rendimiento de los procesos por extracción supercrítica, solvente y destilación por arrastre con vapor, a escala de laboratorio en la obtención de dicho aceite. Se obtuvo 0,2465% de rendimiento en el método de extracción con solvente a presión reducida, que estuvo por encima del proceso con CO<sub>2</sub> supercrítico con 0,2115%; descartaron la extracción por arrastre con vapor en vista de la descomposición de los compuestos del aroma. La esencia de piña se mantuvo estable químicamente por ambos métodos en estudio y el componente presente en mayor proporción en la esencia fue el acetato de etilo. En este antecedente desarrollaron tres tipos diferentes de productos cosméticos a partir de la esencia de piña, versionadas según tipo de uso y presentación; el producto pretendido en este estudio posee características insecticidas, del que requiere una metodología cónsona en el desarrollo de un biocida.

Asimismo, la factibilidad técnica para la extracción de aceite esencial de orégano empleando CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico fue evaluada por Urbáez (2003); su estudio residió en estimar la factibilidad de producir aceite de orégano en el país y comparar la extracción supercrítica con otro proceso convencional para establecer donde se

---

presentan menores costos, sustentado en un mayor rendimiento y calidad del aceite esencial. Concluyó que la extracción del aceite de orégano en el país es tecnológicamente factible por SFE, el rendimiento por extracción supercrítica fue de 0,678% y estuvo por debajo del obtenido mediante destilación por arrastre con vapor con 2,575%; sin embargo, el primer método resultó ser más selectivo en la obtención de timol y carvacol. Se tiene en común con la presente investigación, la comparación del proceso de extracción del aceite esencial con base en el mayor rendimiento, además de desarrollar un producto benéfico a partir de la esencia extraída; la diferencia radica en la estimación de la factibilidad de producción del aceite esencial de orégano en el país, que no es objeto de estudio en la investigación actual.

En este marco, se realizó el aislamiento del aceite esencial de clavo de olor y anís estrellado por extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (*Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO<sub>2</sub> extraction*) (Della Porta, Taddeo, D' Urso, y Reverchon; 1998). En este trabajo, el objetivo fue analizar los aceites esenciales de clavo de olor y anís estrellado aislados por extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico, conectado a un mecanismo de separación fraccional; así como analizar por cromatografía de gases y espectrometría de masas varias porciones obtenidas, a diferentes condiciones de extracción y fraccionamiento, para identificar las mejores condiciones de operación en la separación del aceite esencial. Determinaron que entre las variables que afectan al proceso está el tiempo de extracción, que marca una diferencia considerable en la composición del aceite volátil. En el caso del aceite de clavo, el porcentaje de eugenol fue relativamente alto (60%) y de acetato de eugenol menor (15%); reconocidos como los componentes principales; además de indicar algunas ceras con valores inferiores al 5%. En el presente trabajo la extracción se lleva a cabo con métodos convencionales de destilación, a diferencia del antecedente de la que se apoya en la tecnología SFE y completando su aislamiento mediante el uso de separadores que funcionan por presurización.

Análogamente, Reverchon y Marrone (1997) evaluaron la extracción supercrítica del aceite esencial de botón de clavo: aislamiento y modelaje matemático (*Supercritical fluid extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling*). Realizaron la extracción del aceite esencial de botón de clavo con CO<sub>2</sub> supercrítico e

---

identificaron que el mejor modelo para los datos experimentales de la extracción a diferentes flujos de CO<sub>2</sub> y lechos, es la de condición de equilibrio; modelaje matemático basado en la integración diferencial de balance de masa, a 90 bar y 50 °C. Destacan que el rendimiento más alto obtenido fue de 20,7 % por peso de material cargado al extractor, afirmando la ausencia de diferencias distintivas con la destilación al vapor en términos de rendimiento de aceite. La analogía con esta investigación radica en la extracción de aceite de botón de clavo de olor y en el análisis del efecto de un conjunto de variables sobre el rendimiento del proceso. La diferencia reside principalmente en que el antecedente incluye el modelaje de la transferencia de masa en el proceso; además, en las técnicas aplicadas en la obtención del aceite, pues en la presente se emplean métodos convencionales.

En lo que respecta a la actividad insecticida, se realizó la evaluación de extractos de plantas para el control de *Anastrepha obliqua* (Macquart) Diptera: Tephritidae, en mango *Manglífera indica* L., (Lugo, 1996). En esta investigación se evaluaron los efectos tóxicos y repelentes de trece extractos de hojas y flores frescas de variedad de especias vegetales diluidos en etanol, usando como controles tratamientos con agua y etanol; todos aplicados sobre *A. obliqua*. Se presentó una metodología para la evaluación de la toxicidad y repelencia de los extractos vegetales en el control de la mosca: se rociaron 12-14 mL de cada extracto en frutos de mango previamente tratados a  $(46 \pm 3)$  °C durante 60 min.; luego de enfriados y secados se colocaron en jaulas de experimentación durante 8 horas con 8 parejas de *A. obliqua*, que se alimentaron con azúcar y proteína de maíz hidrolizada. Después de un periodo de incubación de 10 días se cuantificó el número de larvas por fruto; se determinó el número de moscas muertas por jaula a las 8h y 24 h. Se determinó que los extractos con mejores efectos repelentes fueron *Blumea viscosa* con un registro de infestación de 0% en cada uno de los frutos y *Chenopodium ambrosioides* con 6%. Ninguno de los extractos probados ejerció efecto insecticida. Este antecedente presenta similitud con la investigación actual en la metodología empleada en la evaluación de la toxicidad del aceite en el control de *A. obliqua*; mientras que diverge de la presente en que la susceptibilidad al aceite se pretende realizar por aplicación tópica y no por asperjado.

---

## 2.2.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.2.1.- Aceites esenciales

Son sustancias volátiles de mezclas complejas que poseen componentes terpénicos de diferentes estructuras que aportan los aromas característicos a los vegetales (Dellacassa *et al.*, 2004a, Marcano y Hasegawa, 1991). Según el reglamento técnico MERCOSUR de aditivos aromatizantes y saborizantes (1993), los aceites esenciales pueden presentarse aisladamente o mezclados entre sí y se obtienen generalmente mediante procesos físicos o químicos de destilación (Dellacassa *et al.*, 2004a, 2004b; Moyler, 1991). En su mayoría son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos; por lo general, no son oleosos al tacto y se encuentran en células especializadas de las plantas, por tanto son extraídos de las hojas, semillas, tallos, raíces, flores y cortezas de las plantas (Philip, 2004; Leal, 1997).

Los aceites aromáticos están formados principalmente por terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanos, raramente cumarinas y ácidos orgánicos (Marcano y Hasegawa, 1991); agrupándose en cinco clases dependiendo de su estructura química en: alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas y fenoles. También se les clasifica de acuerdo a su consistencia, basado en la viscosidad y volatilidad del aceite, en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas; según su origen en naturales, artificiales y sintéticas, según su fuente de obtención. Conforme a esta clasificación, el aceite esencial de clavo de olor es de acuerdo al componente mayoritario un derivado fenólico, de consistencia fluida y de origen natural.

La industria farmacéutica los emplean para obtener drogas en la prevención y cura de diversas afecciones en el aparato digestivo, respiratorio, nervioso y circulatorio; en la industria alimenticia para conseguir saborizantes y aromatizantes característicos y en la cosmética se aplican a los perfumes y productos de uso personal: cremas, acondicionadores, champú, entre otros. En la industria textil y de pinturas se utilizan en la elaboración de enmascaradores de olores; en la industria petroquímica y minera se utilizan esencias derivadas de ellas como vehículos de flotación y lubricantes; la industria agroquímica utiliza aceites esenciales en la elaboración de bioinsecticidas (Philip, 2004).

---

### 2.2.2.- Proceso de extracción de aceites esenciales

La extracción de aceites esenciales a partir de plantas aromáticas se realiza por medio de métodos difusionales, donde la separación se alcanza debido a la transferencia por difusión de uno o varios componentes cuando dos fases se ponen en contacto. El método más empleado a escala de laboratorio y a nivel industrial es la destilación con agua, cuyo principio es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa en presencia del material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. Los procesos de extracción se pueden dividir de acuerdo al solvente utilizado en dos categorías, una es la extracción con agua: infusión, hidrodestilación, destilación por arrastre con vapor de agua, destilación agua/vapor; y la otra es la extracción con solventes orgánicos: maceración, lixiviación, por Soxhlet y por fluido supercrítico (Dellacassa *et al.*, 2004b). En general, la selección del método de extracción está determinado tanto por la cantidad como por el tipo o características del aceite: punto de ebullición de los componentes, estabilidad a temperaturas elevadas, entre otros; asimismo por el órgano vegetal del cual se va a extraer.

Las principales técnicas empleadas en la obtención de aceites esenciales son:

a) *Hidrodestilación*: Esta técnica se utiliza cuando los aceites a extraer se alteran por ebullición. La materia vegetal molida o triturada se encuentra en contacto directo con el agua; esta debe estar presente dentro de la cámara de destilación de manera que sea suficiente y permanente para llevar a cabo todo el proceso, a fin de evitar el sobrecalentamiento o carbonización del material vegetal, y por ende la formación de olores desagradables en el producto final (Dellacassa *et al.*, 2004b). Esta técnica consiste en calentar el material junto con el agua hasta que el material volátil de agua y aceite esencial se destile, luego se condensa en la cámara refrigerante; el aceite, que es parcialmente miscible en el agua, es posteriormente separado y el tiempo total de destilación es función de los componentes presentes en él. (Dellacassa *et al.*, 2004b; Ochoa, 1998; Moyler, 1991).

Con esta técnica algunos componentes como los ésteres son sensibles a la hidrólisis, mientras que otros son susceptibles de polimerización como los hidrocarburos



---

monoterpénicos acíclicos o los aldehídos. Además, los compuestos oxigenados tienden a ser parcialmente solubles en el agua de destilación, hecho por el cual es imposible la remoción completa de estos compuestos, tal como sucede con los fenoles. También la temperatura empleada provoca que algunos compuestos presentes en las plantas se degraden y se pierdan (Dellacassa *et al.*, 2004b; Ochoa, 1998).

*b) Destilación por arrastre con vapor seco:* Esta técnica se emplea cuando los aceites esenciales contenidos en la materia vegetal, seca o fresca, se alteran por ebullición por presentar características termolábiles (Moyler, 1991). Es el procedimiento más sencillo y seguro, basado en que la mayor parte de las porciones aromáticas pueden ser arrastradas por el vapor de agua; la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. El vapor de agua es inyectado dentro de la cámara de destilación por medio de serpentinas a presiones más elevadas que la atmosférica y atraviesa la materia vegetal que se encuentra sobre una plancha perforada que permite que cualquier agua condensada drene del equipo (Dellacassa *et al.*, 2004b; Moyler, 1991). Esta técnica se efectúa generalmente a bajas presiones para no deteriorar los constituyentes del aceite esencial por efecto de la temperatura muy elevada; sin embargo, es necesario para cierto tipo de esencias como es el caso de vetiver (*Vetiveria zizanoides*), que operen con presiones de 1 a 2 bar (Dellacassa *et al.*, 2004b). Con esta técnica se logra un alto rendimiento y pureza del aceite obtenido, además no requiere tecnología sofisticada.

*c) Destilación por arrastre con vapor de agua (vapor húmedo):* En este caso el vapor de agua es generado dentro de la propia cámara de destilación y el material vegetal se encuentra suspendido sobre una rejilla a cierta distancia del fondo de la cámara, impidiendo el contacto con el agua. Este sistema reduce la capacidad neta de carga de la materia vegetal dentro del extractor pero mejora la calidad del aceite obtenido (Dellacassa *et al.*, 2004b). Esta técnica se emplea cuando los aceites esenciales contenidos en la materia vegetal se alteran por ebullición.

*e) Otras técnicas para la extracción de aceites esenciales:* Se han desarrollado otras posibilidades tecnológicas para la obtención de aceites esenciales en función de una mejora del rendimiento, la calidad del producto, usos especiales o como

---

consecuencia de la búsqueda de soluciones tecnológicas al proceso de extracción de diferentes tipos de materiales vegetales. Entre ellos se encuentran: ultrasonidos en el proceso extractivo de hidrodestilación, extracción por solventes orgánicos, extracción por microondas y con fluidos en estado supercrítico (Dellacassa *et al.*, 2004b; Moyler, 1991).

Los aceites esenciales obtenidos mediante destilación con agua normalmente presentan aromas más fuertes y un color más oscuro con respecto a los producidos por otros métodos; por lo tanto, la calidad del mismo es menor empleando la destilación, pero sus propiedades medicinales se conservan (Dellacassa *et al.*, 2004b; Moyler, 1991). Los costos asociados para la fabricación del equipo de destilación son más bajos en comparación con las tecnologías recientes, dada que su operación sólo requiere de servicios de energía eléctrica y de vapor, aire u otros (Dellacassa *et al.*, 2004b).

En general, para la extracción de aceites esenciales se emplea la fragmentación de la materia vegetal mediante un proceso mecánico donde se reducen las sustancias sólidas a partículas, a objeto de aumentar la superficie de contacto entre el material con el solvente, facilitando una mayor disolución de sus principios activos. Con la reducción del tamaño de las partículas se exponen muchas moléculas del aceite ante el solvente, incrementando la tasa de propagación de vaporización y destilación de los aceites esenciales (Thomas y Schumann, 1992; citado en FAO, 1995). De esta forma el aceite esencial varía en rendimiento así como en composición, bajo las consideraciones del lugar geográfico y variedad genética de la cual proviene la materia vegetal (Marcano y Hasegawa, 1991).

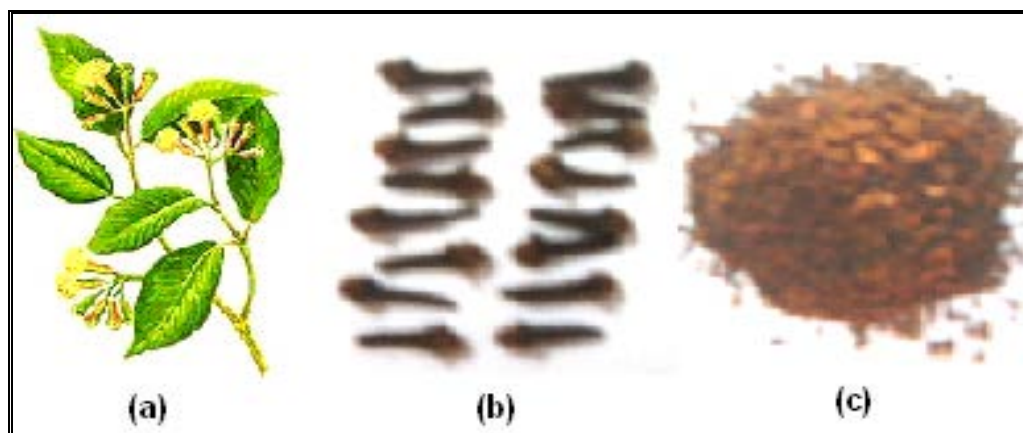
Los diversos procesos de extracción predeterminan las características del aceite a extraer; con base en el rendimiento, la calidad y el uso.

### **2.3.3.- Clavo de olor**

El calificativo del clavo de olor (Figura 2.1) procede del latín *clavus*, ya que el capullo seco o botón sin abrir recuerda esta forma. Proviene de ambientes tropicales y marítimos como Madagascar, Islas Molucas, Zanzíbar y el Caribe; presentando la siguiente clasificación taxonómica: reino *Plantae*, subreino *Tracheobionta*,

---

superdivisión *Spermatophyta*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Rosidae*, orden *Myrtales*, familia *Myrtaceae*, género *Syzygium*, especie *S. aromaticum* (L.) Merr. & Perry. Su principal uso está en el arte culinario como especia y condimento en platos dulces y salados proporcionando aroma y sabor a los alimentos (Velez, 1982; Arpide, s.f.).

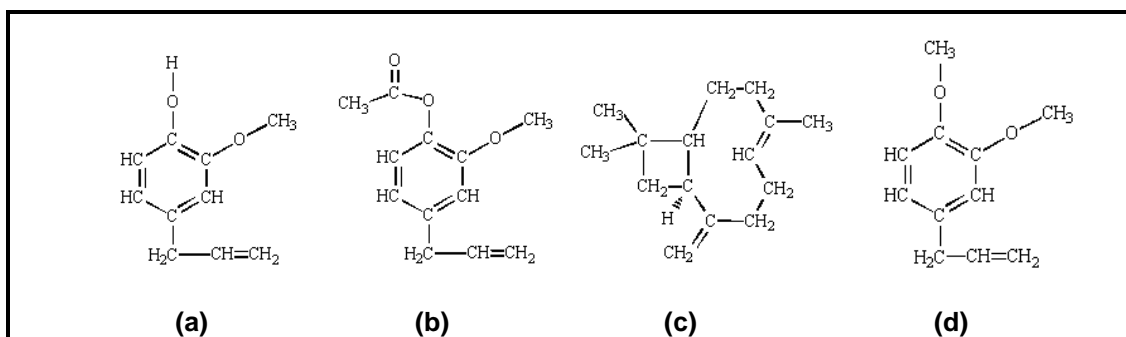


**Figura 2.1.** Clavo de olor (*S. aromaticum*): (a) Flores del árbol, (b) Botones, (c) Clavo molido. Fuente: Arpide, s.f.; ilustración original

#### 2.3.4.- Eugenol

El eugenol es un derivado fenólico encontrado en el aceite de clavo denominado en el sistema IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) como 2-metoxi-4-(2-propenil) fenol; alcanzando valores de concentración en el aceite desde 60 hasta 95 % (Della Porta *et al.*, 1998; Marcano y Hasegawa, 1991). Asimismo, el aceite presenta trazas de metileugenol con porcentajes por debajo de 0,01% (Della Porta *et al.*, 1998). Entre sus propiedades físicas se encuentran: punto de ebullición en 253°C, densidad igual a 1.067 g/cm<sup>3</sup>, poco soluble en agua y soluble en alcohol. Es de consistencia líquida y aceitosa, de color amarillo claro, con aroma característico de clavo (González, 2002).

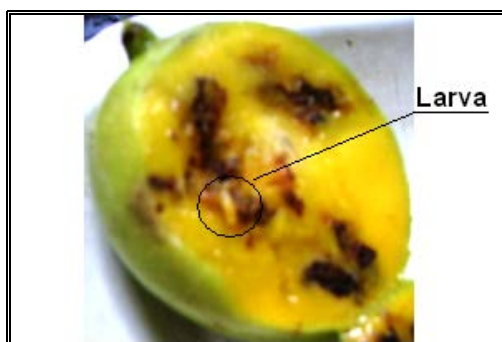
Además del eugenol, en el aceite de clavo de olor se encuentra acetato de eugenol y cariofileno, en proporciones significativas, y metileugenol en trazas (Della Porta *et al.*, 1998); las estructuras químicas de estos componentes se muestran en la figura 2.2.



**Figura 2.2.** Estructuras químicas de los componentes presentes en el aceite de *S. aromaticum*: (a) Eugenol, (b) Acetato de Eugenol, (c) Cariofileno, (d) Metileugenol. Fuente: Metcalf y Flint, 1978

### 2.3.5.- Mosca de la fruta como insecto plaga

Es un insecto perteneciente al orden Diptera de la Familia Tephritidae, de la cual su género *Anastrepha* es considerado como el de mayor importancia económica, debido a sus hábitos fitófagos (figura 2.3) y la magnitud del daño que causan sus larvas en frutos de plantas cultivadas en los países tropicales y subtropicales del continente americano (Caraballo, 2001).



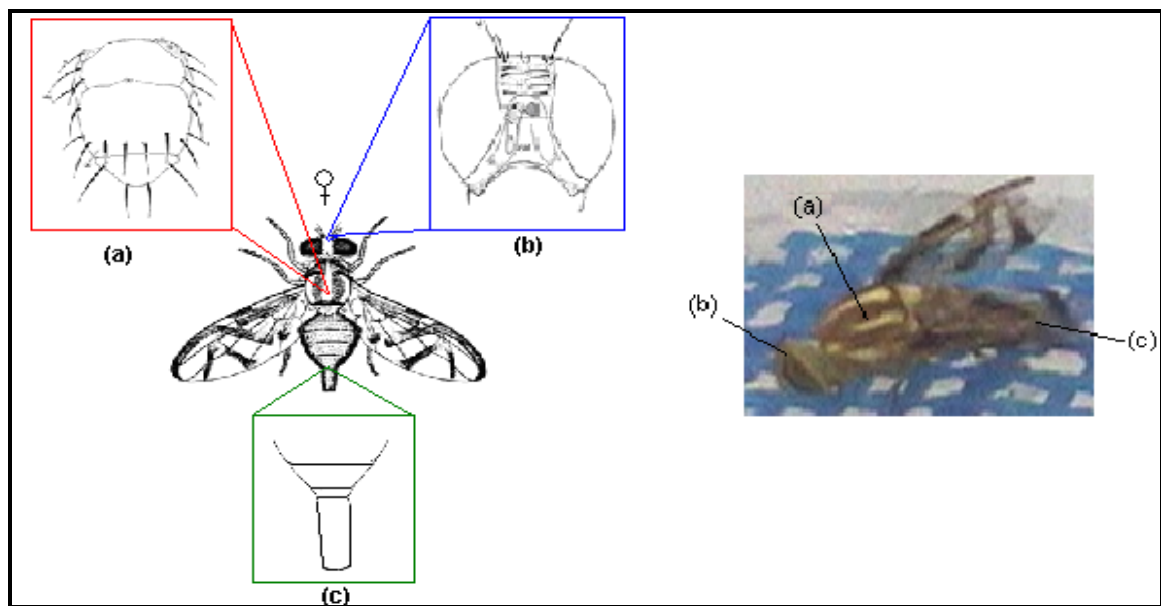
**Figura 2.3.** Mango con larvas por infestación de la población silvestre de *A. obliqua*. Ilustración original

En el país, según Caraballo (2001), los frutos hospederos de la especie *A. obliqua* son principalmente mango (*Mangífera indica*) y jobo (*Spondias mombin*); aunque es posible que se desarrolle en frutos de ciruela (*Prunus salicina*), guayaba (*Psidium guajava*), semeruco (*Malpighia glabra*), pomarosa (*Syzygium jambos*) y pomagás (*Syzygium malaccense*).

En la identificación de un adulto mosca (figura 2.4), descrita por Boscan de Martínez (1992), se consideran los siguientes caracteres morfológicos básicos: Color,

---

tórax, alas y envoltura del ovipositor. Esta se caracteriza por presentar color amarillento, tamaño medio, mesonoto color amarillo castaño y vellosidades del tórax color marrón oscuro. En cuanto al ciclo biológico del género *Anastrepha*, corresponde cuatro etapas fundamentales: huevos, larvas, pupas y adultos (Luque, 2005).



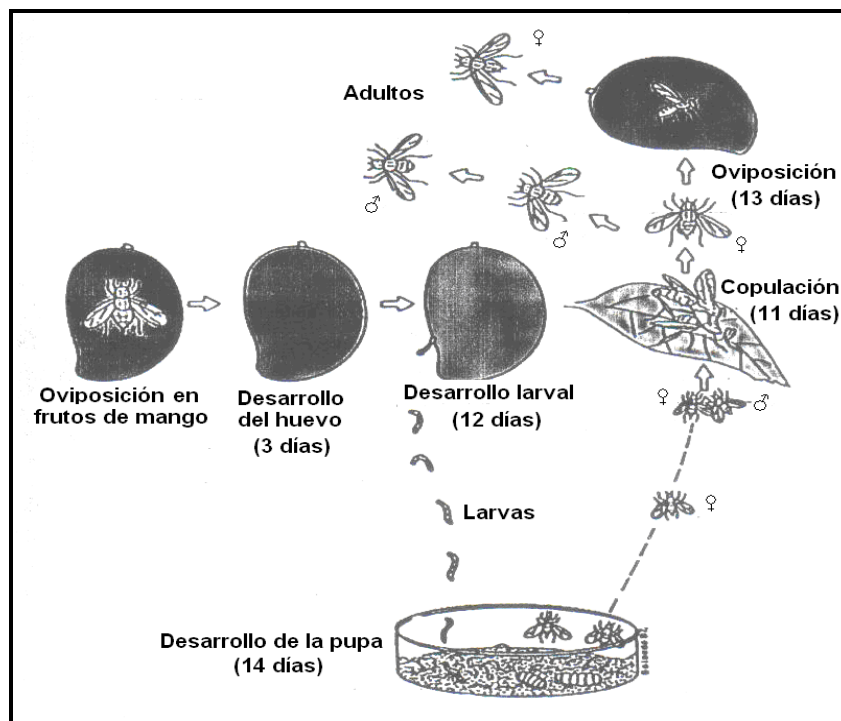
**Figura 2.4.** Morfología general de la hembra adulta de *A. obliqua*: (a) Tórax (mesonoto), (b) Cabeza, (c) Abdomen. Fuente: Caraballo, 2001

### 2.3.6.- Ciclo biológico del género *Anastrepha*

Todas las especies del género *Anastrepha* presentan un ciclo biológico muy similar (Aluja, 1994 citado en Luque, 2005), mostrado en la figura 2.5. Las hembras fecundadas procuran las frutas más o menos próximas a la maduración fisiológica, en donde hacen una perforación con el ovipositor a nivel del epicarpio, depositando sus *huevos* en grupo de 3 a 7. En frutos de guayaba y mango la postura se observa en el mesocarpio superior del fruto asociadas con una mancha oscura.

Las *larvas*, que emergen pocos días tras la puesta, se alimentan de la pulpa del fruto hasta completar tres etapas o instar de desarrollo en la misma y producen galerías o túneles (figura 2.3); que facilita la oxidación y maduración prematura del fruto originando pudrición en el mismo, resultando inservible para su consumo (Luque, 2005; Galán, 1999; Boscan de Martínez, 1992). La maduración de la larva incita al abandono

del fruto, ésta se entierra en el suelo a pocos centímetros de profundidad, donde se transforma en *pupa*; después de algún tiempo, el *adulto* emerge movilizándose entre el sustrato de pupación. Las moscas recién emergidas buscan un refugio (hojas secas caídas, troncos, entre otros), donde permanecen estáticas y se secan al extender las alas. Una vez las moscas secas, se activan y vuelan a la parte superior de algún árbol, donde buscan alimento en frutos maduros que presenten heridas (incluso que estén tirados sobre el suelo). Luego de alcanzada su madurez sexual (10-12 días), las moscas se aparean y el ciclo se repite.



**Figura 2.5.** Ciclo biológico del género *Anastrepha*. Fuente: González, 1998 citado en Contreras, 2005

### 2.3.7.- Importancia económica del mango

El mango es uno de los frutos tropicales más consumidos en el mundo, gracias a su atractivo color, agradable sabor y aroma; además posee un alto contenido de minerales y vitaminas (Varela, 1994). A partir de este fruto, se elaboran productos de gran demanda como néctar, mermeladas, productos desecados, helados, jaleas, entre otros.

A nivel mundial, el mango ocupa el tercer lugar en producción e importación de frutos tropicales, sólo superado por el plátano y la piña; y el quinto respecto de todos los

---

frutos (Galán, 1999). En Venezuela existen áreas con condiciones agroecológicas que se adecuan para la producción de mango con fines de exportación, predominando mangos Haden, Tommy Atkins y Kent (Luque, 2005); de las cuales destacan las ciudades de San Carlos (Edo. Cojedes), Acarigua y Guanare (Edo. Portuguesa), Barquisimeto (Edo. Lara) y en forma generalizada los estados Trujillo, Zulia, Mérida, Aragua y Carabobo. De acuerdo a los reportes del Ministerio de Agricultura y Tierras (MAT), para el 2004, los estados con mayor producción de mango fueron Aragua y Guárico con cultivos de 1.099 y 1.525 hectáreas, respectivamente; mientras que a nivel nacional la superficie cosechada fue de 4.540 hectáreas con una producción de 65.147 toneladas y un rendimiento de 14.350 kg/hectárea.

Por último, los países importadores de mango tienen serias exigencias de tipo fitosanitario para la entrada de frutas procedentes de Venezuela y otros países, debido a las resoluciones tomadas desde 1986 por Animal and Plant Health Inspection Service del United States Department of Agriculture (APHIS/USDA), esto debido a la existencia de algunas especies de moscas que atacan a la fruta, tales como *A. obliqua* y *Ceratitis capitata* (Varela, 1994). Estas restricciones fitosanitarias son consideradas para evitar la entrada del insecto en regiones donde el mismo no se encuentra presente, así se hace necesario tomar medidas de control para disminuir las poblaciones de estos insectos en plantaciones de mango.

### **2.3.8.- Manejo integrado de las plagas**

El Manejo Integrado de Plagas (MIP) se basa en la aplicación armónica de una serie de técnicas tomando en cuenta factores de tipo económico, ecológico y social, tendientes a disminuir las poblaciones de organismos plaga por debajo del nivel de daño económico (Clavijo, 1983). Los métodos de MIP pueden aplicarse bajo la integración de técnicas de control cultural, físico, mecánico, natural, biológico (clásico), etológico o químico con extractos naturales o sus sintéticos (Labrador y Katiyar, 1977 citado en Aguilar, 2001; Suquilanda, 2001).

Los productos químicos sintéticos están produciendo efectos adversos sobre el ambiente y es así, que ha surgido la necesidad de utilizar técnicas amigables con el



---

ambiente, dentro de los cuales, el uso de productos naturales tienen la ventaja de ser biodegradables y de bajo impacto ecológico. El método de control con productos naturales recurre a los componentes activos presentes en los extractos de determinadas plantas con propiedades insecticidas, nematocidas, acaricidas y/o fungicidas, que en acción sola o combinada tienen la propiedad de no poseer poderes residuales prolongados (Suquilanda, 2001).

Las técnicas empleadas en todo programa de MIP se fundamentan en el muestreo y trapeo, que permite estimar los riesgos y proporcionan la información necesaria para diseñar las estrategias de control (Luque, 2005; Aluja, 1993 citado en Aguilar, 2001). Con el muestreo es posible detectar, ubicar geográficamente y monitorear las poblaciones del insecto, por medio de la recolección de frutos y materiales; mientras que con el trapeo se detecta la presencia de una plaga y se vigila su población (Luque, 2005). En este sentido, para las especies del género *Anastrepha* el trapeo está basado únicamente en la utilización de atrayentes alimenticios, ya que no ha sido posible desarrollar un atrayente sexual de mayor eficacia; siendo el tipo de trampa Mc Phail, con la proteína hidrolizada como atrayente, el método más efectivo para el estudio de poblaciones de este género. Estos atrayentes se han empleado como sustancias químicas que sirven para atraer a los insectos por medio del estímulo olfativo dentro de los que destaca, según Luque (2005):

a) Atrayentes naturales: Son sustancias muy aromáticas con acción sobre machos; como los aceites esenciales o sus constituyentes.

b) Cebos tóxicos: Son mezclas de una sustancia atrayente con un insecticida, orientados a controlar insectos adultos.





## CAPÍTULO III

### III. MARCO METODOLÓGICO

De acuerdo a los objetivos establecidos, la estrategia en este trabajo especial de grado es de tipo experimental y con un nivel de profundidad de tipo evaluativa. La metodología a emplear para cumplir con cada objetivo se desarrolla en el presente capítulo, tanto en el área de la extracción de aceites esenciales como en la evaluación de la actividad atrayente e insecticida del aceite de clavo de olor sobre una población adulta de *A. obliqua*.

#### 3.1.- ESTABLECIMIENTO DE LAS VARIABLES RELEVANTES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE

##### 3.1.1.- Descripción del equipo de extracción de aceite esencial y su principio de funcionamiento.

La extracción del aceite esencial de clavo de olor se obtiene a partir de los capullos secos sin abrir de su flor por medio de métodos difusionales, que es el fundamento de la destilación con agua, empleada en esta investigación bajo la orientación de las personas expertas del Laboratorio de Aceites Esenciales ubicado en el Centro de Investigaciones Químicas (CIQ). En virtud de seleccionar el proceso de extracción más idóneo en la obtención de aceite de clavo de olor, se realizó un análisis descriptivo de los procesos que tradicionalmente son señalados en la obtención de *S. aromaticum*, a saber en la siguiente tabla comparativa. En general, existen diversas técnicas de extracción de aceites esenciales, pero las propiedades y características del extracto las predetermina la técnica empleada. A los fines de este trabajo, se seleccionaron los



procesos de extracción que emplean como solvente agua, las razones de la selección se indican en el capítulo IV de la presente investigación.

**Tabla 3.1.** Características de los procesos de extracción de aceite de clavo.

<b>PROCESOS</b> <b>ASPECTOS</b>	<b>POR ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA</b>	<b>HIDRODESTILACIÓN</b>	<b>POR SOLVENTES</b>	<b>FLUÍDO EN ESTADO CRÍTICO</b>
<b>Materia vegetal</b>	Fresca o seca. Reducida a fragmentos.	Fresca o seca. Molida, triturada o entera.	Seca y molida.	Cortado en trozos pequeños, licuado o molido.
<b>Uso de solventes</b>	Agua, es de fácil acceso y bajo costo.	Agua, es de fácil acceso y bajo costo.	Solventes orgánicos: Alcohol, cloroformo, entre otros. Solventes de costo elevado.	Líquidos supercríticos: Dióxido de carbono, etileno, propileno, etano, entre otros.
<b>Fundamento básico del proceso</b>	La materia vegetal en la cámara es sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia arrastrada es condensada, recolectada y separada de la fase acuosa.	Se introduce en la cámara la materia vegetal junto con el agua y se calienta hasta que el material volátil destile; luego, se condensan en la cámara refrigerante.	La materia vegetal se pone en contacto con los solventes que solubilizan y extraen la esencia; también, se obtienen otras sustancias (grasas y ceras) que hacen de la esencia una sustancia impura.	La materia vegetal se empaca en la cámara, circulando a través de ella un fluido en estado crítico; las esencias son solubilizadas y arrastradas. El solvente se elimina por descompresión y se obtiene una esencia pura.
<b>Nivel de aplicación</b>	Uso a nivel industrial debido a sus altos rendimientos, la esencia se obtiene en un estado elevado de pureza. No requiere de tecnología sofisticada, aunado a los bajos costos tanto del solvente como del equipo.	Uso a nivel industrial debido a sus altos rendimientos respecto de la destilación por arrastre con vapor de agua. La esencia se obtiene en un estado elevado de pureza. No requiere de tecnología sofisticada, aunado a los bajos costos tanto del solvente como del equipo.	Uso a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes. Su rendimiento supera a la de los procesos de extracción que emplean agua como solvente. Requiere de métodos de purificación de las esencias.	Uso a escala de laboratorio, la tecnología es costosa para ser aplicada a nivel industrial. Se obtienen altos rendimientos, respecto otros procesos. Requiere de métodos de purificación. En ciertos rangos de temperatura y presión aparecen ceras y productos indeseados (ácidos grasos).



El proceso de extracción comienza con la etapa de *ebullición*, donde se requiere del suministro de calor al tanque o cámara, dentro del cual se coloca la materia vegetal de interés en presencia del agua en un sistema por carga. Sigue el *ajuste de temperatura*, que cuenta con la columna de condensación permitiendo la destilación de los vapores que salen de la cámara, al intercambiar el calor con el refrigerante que circula a lo largo del condensador. Entre estas etapas, se encuentra una trampa de vapor tipo Clevenger, donde se recolecta el destilado. Seguidamente, se lleva a cabo la etapa de *separación*, que se sustenta en las diferencias de densidades de las sustancias cuando se decanta la fase orgánica y descarta la fase acuosa; finalmente, se cumple con la *purificación* del aceite, al desecar la fase de interés con sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) en la eliminación de restos del solvente.

El condensador representa el equipo fundamental del proceso de extracción, a este se le identifican sus características principales según su posición, tipo de material y tipo de relleno. El equipo de extracción se representa en la figura 3.1, está integrado por: plancha de calentamiento, tanque de acero inoxidable, trampa tipo Clevenger, condensador tipo serpentín colocado verticalmente, y baño térmico.

Adicionalmente, se cuenta con materiales de vidrio y equipos necesarios en el manejo y medición tanto del destilado como del aceite extraído; algunos de ellos: cilindro graduado, vaso de precipitado, balanza, cronómetro y termómetro de mercurio.



**Figura 3.1.** Equipo de extracción de aceites esenciales a escala de laboratorio (CIQ). Ilustración original



### 3.1.2.- Identificación y selección de las variables que afectan al proceso

La identificación y selección de las variables que afectan al proceso de destilación con agua se obtiene a partir del análisis del diagrama de Ishikawa, desarrollado en el capítulo IV de este trabajo; donde se seleccionan aquellas variables que están sujetas a manipulación y por ende se consideran de influencia relevante en el proceso, mientras que las variables no escogidas se tratan adecuadamente para reducir el impacto sobre la respuesta principal de interés o rendimiento.

El clavo de olor procedente de Madagascar se suministra por la distribuidora Casa del Condimento ubicada en Maracay, Estado Aragua. La materia se somete a una preparación previa a la extracción al fragmentarse en un mortero y tamizarse haciendo uso de 2 cestas de mallas metálicas, la primera de 43 orificios/cm<sup>2</sup> (2mm) y la siguiente de 81 orificios/cm<sup>2</sup> (1mm); a fin de obtener un rango de tamaño de partícula de 1-2 mm que facilite el contacto entre los cuerpos soluto y solvente, al mismo tiempo que evite el empalme o la aglomeración en algunas de las partes del equipo, especialmente de sus conductos.

Un aspecto importante de las fases experimentales corresponde a la forma en que se registran los datos y las observaciones del proceso realizado. Para ello, se diseñan y elaboran de forma organizada los instrumentos de recolección de datos, de manera que ofrezcan una clara visión del trabajo y queden sujetas a un procesamiento adecuado. A esta actividad le continúa la extracción del aceite aromático, que comienza con la puesta en marcha del método operatorio descrito en el apéndice A. Es importante señalar que al aceite obtenido se le coloca algunos cristales de butilhidroxitolueno (BHT), a fin de evitar reacciones de oxidación en presencia del aire y con ello la alteración del componente activo del aceite.

Finalmente, con la ejecución de corridas preliminares y con el análisis del comportamiento de las variables que afectan al proceso de extracción, se determinan las condiciones de operación adecuadas en la obtención del aceite esencial de *S. aromaticum*.



## 3.2.- EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

### 3.2.1.- Extracción del aceite de clavo de olor

En el proceso de extracción la materia vegetal es tratada previamente, de modo que se lleva a un tamaño de partícula de 1-2 mm, empelando fragmentado y tamizado; seguidamente éste material tratado se alimenta al sistema en cantidades de 20g aproximadamente, para el conjunto de experimentos establecidos con cinco repeticiones para cada técnica de extracción. El método operatorio, que se indica en el apéndice A, se realiza bajo las condiciones de operación determinadas en el objetivo anterior; dicho método está sustentado en la experiencia propuesta por Pavia y otros (1982, pp. 140-141) y se lleva a cabo en el montaje del equipo de extracción mostrado en la figura 3.1. Cabe destacar que durante el proceso se exime del uso de solventes químicos, que alteren o degraden las características del aceite extraído.

### 3.2.2.- Rendimiento del proceso de extracción de *S. aromaticum*

La masa de aceite esencial extraído se determina cada media hora durante los 120 min de extracción del proceso, para cada una de las técnicas empleadas; a fin de obtener los datos de la cantidad de aceite obtenido que permita la estimación del rendimiento acumulado en dichos intervalos, en el sistema por carga. Luego, se compara el rendimiento experimental con el bibliográfico y se determina la relación entre ellos.

Posteriormente, se analizan los rendimientos de las técnicas empleadas en la obtención de aceite esencial de *S. aromaticum*, según las representaciones gráficas del acumulado de la masa de aceite y el rendimiento respecto al tiempo de extracción. Finalmente, se identifica la técnica apropiada en la extracción con base en los rendimientos obtenidos, seleccionando aquella que aporte mayor cantidad de aceite de clavo de olor.



### 3.3.- EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE ATRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL HACIA LA POBLACIÓN DE ADULTOS DE *A. obliqua*

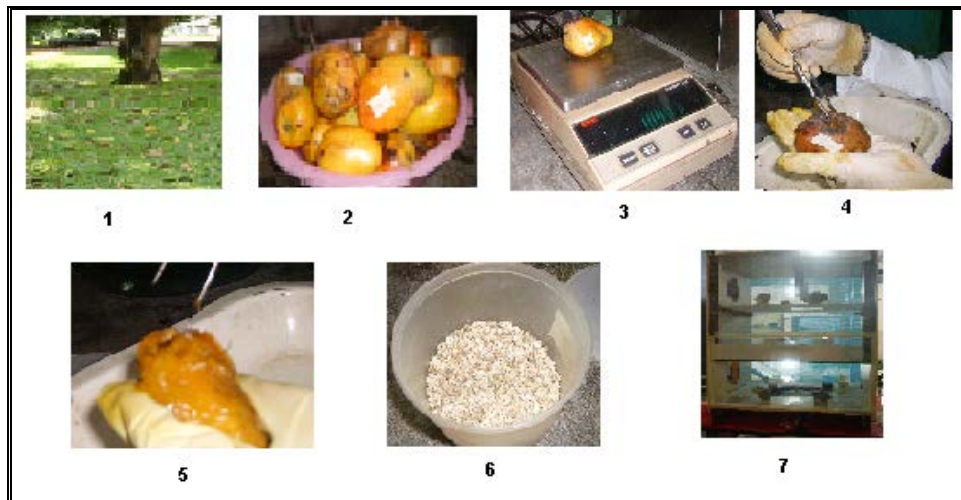
#### 3.3.1.- Fundación de la colonia de generación filial $F_0$ de *A. obliqua*

La evaluación de las propiedades atrayentes e insecticidas del aceite de *S. aromaticum* se realiza en una generación de moscas adultas de *A. obliqua*, para ello es necesario el levantamiento de las colonias sucesivas de la especie, que se denotan en orden creciente:  $F_0$  (origen silvestre),  $F_1$  y  $F_2$  (fundadas en el laboratorio). Esta tarea, se realiza en el Laboratorio de Bioensayos para Moscas de la Fruta (LAMOFRU) del Departamento de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo la supervisión y orientación de personal calificado. En lo que respecta a la fase experimental relacionada a la evaluación de las propiedades atrayentes e insecticidas de sustancias en insectos plaga, esta tiene implícita actividades relacionadas a la química y biotecnología. Por otra parte, este trabajo cuenta con la asistencia de profesionales de las ciencias básicas e ingenieriles, con experiencia en las áreas de estudio.

El levantamiento de las colonias de *A. obliqua* se inicia con jornadas de muestreo de frutos infestados por la especie que permitan su ubicación geográfica; además está sujeto a la temporada y variedad de mangos, recolectando suficientes unidades del fruto. Inclusive, el muestreo se realiza a efectos de establecer y mantener las colonias fundadas. Cabe destacar, que la colecta se lleva a cabo durante el período de fructificación en el huerto de mango aledaño al LAMOFRU, seleccionando aquellos frutos ubicados en el suelo que presenten características de maduración fisiológica tardía, ausente de laceraciones y que muestren señales de infestación; estas características se cumplen en el levantamiento de la generación  $F_0$ .

La fundación de las colonias se realiza de acuerdo a la estrategia descrita por González (1995 citado en Contreras, 2005), cuya secuencia metodológica se muestra en la figura 3.2. De este modo, cada mango recolectado se lava, seca, numera y pesa; luego se procede a cortar y extraer las larvas de  $F_0$  en la estimación del índice de infestación del fruto. Inmediatamente, las larvas se introducen a un envase con sustrato de vermiculita ligeramente húmeda, donde estas se transforman en pupas en un

período de 12 a 14 días; el recipiente se tapa y se coloca en oscuridad, realizando inspecciones interdiarias de las condiciones en que se encuentran las pupas en dicho sustrato, asperjando agua de ser necesario. Culminado ese período, se coloca el envase con el sustrato dentro de la jaula de cría, allí tiene lugar la emergencia o nacimiento de las moscas adultas al transcurrir de 10 a 12 días adicionales.



**Figura 3.2.** Secuencia metodológica en la fundación de la generación filial  $F_0$ : (1) Huerto de mango; (2) Lavado y numeración del fruto; (3) Pesada de frutos, (4) Corte del mango; (5) Extracción de larvas; (6) Sustrato de Vermiculita húmeda; (7) Jaula de cría. (LAMOFRU). Ilustraciones originales

### 3.3.2.- Fundación de las colonias de generaciones filiales $F_1$ y $F_2$ de *A. obliqua*

La colecta de frutos en el levantamiento de las generaciones  $F_1$  y  $F_2$  se realiza de manera análoga a la sección de fundación de la colonia  $F_0$ , sólo que en esta oportunidad se consideran los mangos verdes o de maduración temprana, ubicados en las 2/3 partes de altura de los árboles.

Los frutos colectados se lavan, secan y pesan; seguidamente, según la metodología descrita por Contreras (2005), se someten a tratamiento hidrotérmico durante 20 min a  $46,5 \pm 0,5$  °C aproximadamente, a fin de eliminar los huevos o larvas de infestación natural en el fruto. Finalizada esta actividad, se exponen a temperatura



ambiente para la disipación del calor y luego se someten a infestación en forma inducida o forzada por un período de 48 h, colocándolos en las jaulas de crías contentivas de las moscas adultas de la generación anterior (figura 3.3).

Al término de la infestación forzada, se dispone de una cava de anime con aserrín de 1 a 2 cm de espesor en el fondo y sobre su superficie se coloca una rejilla de plástico, donde se ubican los mangos infestados para el crecimiento de las larvas; cuyo tiempo de crecimiento coincide con la maduración del fruto, al cabo de 12 a 15 días. Posterior a este período, se tratan de acuerdo a la metodología señalada en la figura 3.2. de la fundación de la colonia  $F_0$  a partir de la extracción de las larvas, para el levantamiento de las colonias  $F_1$  y  $F_2$ .



**Figura 3.3.** Secuencia metodológica en la fundación de las generaciones filiales  $F_1$  y  $F_2$ : (1) Frutos en el árbol; (2) Mangos recolectados; (3) Lavado y numeración; (4) Pesada; (5) Baño térmico con agua a 46,5 °C; (6) Hidrotratamiento por 20 min; (7) Infestación forzada; (8) Crecimiento de larvas. (LAMOFRU). Ilustraciones originales

### 3.3.3.- Efecto atrayente del aceite esencial hacia moscas adultas de *A. obliqua*

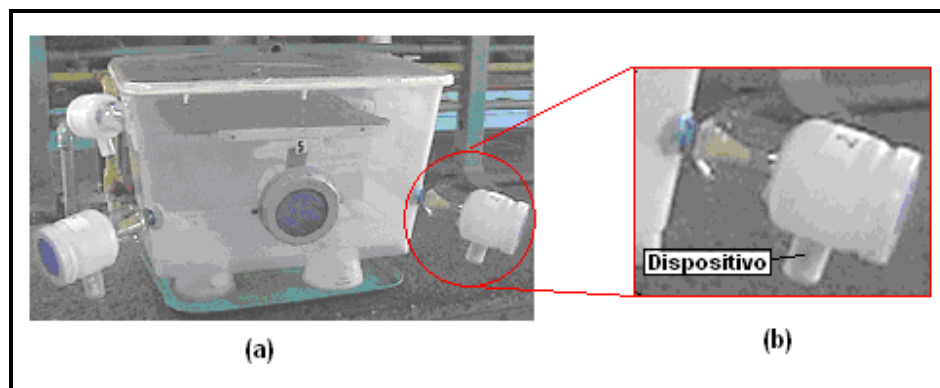
En la realización del bioensayo de potencial de atracción hacia la población de adultos de *A. obliqua* se aplican cuatro tratamientos, bajo la metodología propuesta por el personal técnico de LAMOFRU. Es necesario señalar que en este trabajo el aceite de



clavo de olor en solución se denomina Eugrenca; esta se prepara a una concentración del 5% y se compara con diversos productos comerciales y semicomerciales de comprobadas propiedades atrayentes sobre la especie, como son las soluciones de FAGRO-UCV-10<sup>®</sup> al 5% y PedGo Plus<sup>®</sup> al 9%, y el control de agua potable.

La solución de Eugrenca se prepara al 5 %v/v a partir del aceite obtenido en la técnica de extracción seleccionada, diluyendo con acetona AnalaR<sup>®</sup> 99,5% de alta pureza; cuyo solvente posee inocuidad comprobada sobre *A. obliqua*. Por otra parte, la preparación de la solución de FAGRO-UCV-10<sup>®</sup> al 5% se obtiene diluyendo Comprosol (solución atrayente formulada a partir del zumo de maíz fermentado) en agua. Análogamente, la formulación de PedGo Plus<sup>®</sup> al 9% en agua se dispone con 15 días previo al ensayo, para permitir la fermentación necesaria del producto e inducir a la propiedad atrayente.

La unidad experimental de la prueba de potencial de atracción la constituye una celda rectangular, provista de cuatro microceldas elaboradas con material plástico, dispuestas en las esquinas, como se indica en la figura 3.4.



**Figura 3.4.** Unidad experimental de la prueba de potencial de atracción: (a) Celda; (b) Microcelda. Diseño y construcción: Eutimio González (LAMOFRU). Ilustración original

En el ensayo se utilizan las cuatro soluciones preparadas, las cuales se disponen de forma aleatoria, en cumplimiento con el diseño completamente aleatorizado, colocando 2 mL de una solución por microcelda; de este modo se realiza la distribución



de los tratamientos en las cuatro réplicas de la unidad experimental. Es así como se realiza el bioensayo dentro de un laboratorio a la temperatura de 25 °C, con humedad relativa de 70% y fotoperíodo. Cabe destacar que en esta prueba se dispuso de la generación F<sub>2</sub>, para un total de 240 insectos distribuidos equitativamente en las cuatro celdas y en partes iguales respecto al sexo; esto es, 60 insectos por cada unidad, con 30 hembras (H, ♀) y 30 machos (M, ♂).

### **3.3.4.- Porcentaje de adultos atraídos hacia las diferentes formulaciones**

Las celdas de potencial de atracción se inspeccionan transcurridas las 12 y 24 h, con la finalidad de realizar *in situ* el conteo de las moscas atraídas hacia las diferentes formulaciones, en función de las categorías de hembras (H), machos (M) y población total (H+M). Una vez finalizado el ensayo, los resultados se tratan mediante modelos de análisis completamente al azar; con el propósito de establecer la significancia entre los tratamientos y comparar entre sí las soluciones, según el efecto atrayente alcanzado.

Asimismo, se estima el porcentaje de atracción de las moscas por sexo y población total; luego, con estos datos se elabora una gráfica para el análisis del efecto atrayente hacia *A. obliqua*, para cada formulación estudiada. Además, se emplea un programa estadístico, como el Statistix versión 8.0 (Copyright 1985-2003, Analytical Software); con el fin de estimar las posibles discrepancias que resulten entre las distintas formulaciones.

## **3.4.- EVALUACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA DEL ACEITE ESENCIAL SOBRE UNA POBLACIÓN DE ADULTOS DE *A. obliqua***

### **3.4.1.- Formulaciones de aceite de clavo de olor**

En la evaluación de la toxicidad de insecticidas generalmente se emplean insectos como las moscas, esto en razón de su relativa facilidad de crianza en condiciones



artificiales y la gran variabilidad genética que estas especies poseen (Saume, 1992). Asimismo, en la estimación del efecto tóxico de sustancias, el método más empleado es la aplicación tópica, donde el componente activo se disuelve en el solvente apropiado y es colocado en el mesonoto del insecto mediante microinyectoras, capaces de suministrar volúmenes del orden de microlitros. Es importante destacar que el mesonoto es el órgano donde concurren las terminaciones nerviosas del insecto.

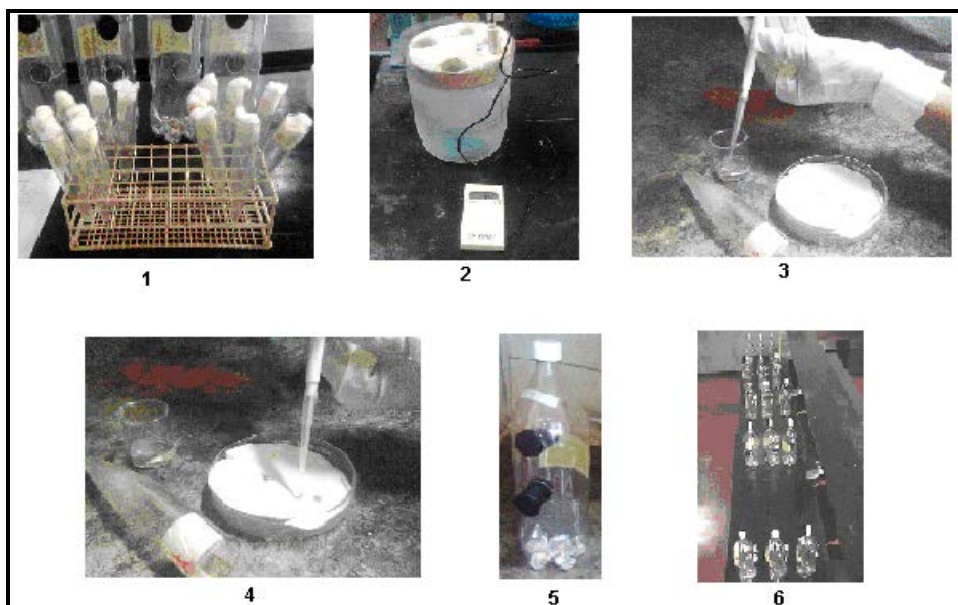
La evaluación de la actividad insecticida comienza con la realización de un conjunto de bioensayos preliminares, según Saume (1992), donde se aplica el producto puro a fin de confirmar la propiedad insecticida. Luego, se evalúa un amplio rango de concentraciones en la estimación y selección de los intervalos que produzcan el efecto deseado; es decir, donde se observen mortalidades insectiles y se ubique la formulación que elimine a la mitad de la población, denominada como la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>). En este sentido, para los bioensayos preliminares el rango de concentración abarca un máximo de 16% v/v (160.000 ppm) y un mínimo de 0,5% v/v (5.000 ppm); con base en estos resultados se preparan las soluciones de Eugrenca definitivas a distintas concentraciones. Por otra parte, es necesario la utilización de un tratamiento testigo, que en este trabajo es una solución de acetona 99,5% más butilhidroxitolueno (BHT); esto con el fin de que la mortalidad observada no sea adjudicada a ninguno de estos componentes.

#### **3.4.2.- Prueba de susceptibilidad sobre moscas adultas de *A. obliqua***

Se realizan los bioensayos del efecto insecticida por aplicación tópica en la deducción de las tendencias de mortalidad de la población de adultos de *A. obliqua* en función de la concentración del aceite esencial de clavo de olor; según la sistemática indicada por Contreras (2005). Para ello, se manejan cuatro tratamientos correspondientes a las soluciones de Eugrenca a diferentes concentraciones y un testigo; además, estos se replican 3 veces.

En la realización de los bioensayos, se disponen de moscas adultas de *A. obliqua* de la generación filial F<sub>2</sub>, que se seleccionan en atención de 12 a 15 días de edad;

estas se distribuyen en cantidades equivalentes respecto del sexo para los 5 tratamientos y sus réplicas, o lo que es lo mismo, la distribución de 10 H y 10 M por jaula. Par ello, los insectos se inmovilizan por hipotermia a 2 °C durante 10 min; y finalmente realizar la aplicación tópica de la solución a cada mosca. Detalladamente, esta aplicación consiste en colocar 2  $\mu$ L de la respectiva solución, haciendo uso de la micropipeta, sobre el mesonoto de la mosca ubicado en el tórax. Una vez que se aplican las respectivas dosis, los 20 insectos se introducen a sus correspondientes jaulas de prueba de susceptibilidad; según la secuencia metodológica que se muestra en la figura 3.5. Transcurridas 24 y 48 horas se realiza el conteo de la mortalidad de las moscas, en función de las categorías de H, M y H+M.



**Figura 3.5.** Secuencia metodológica de la prueba de susceptibilidad al aceite esencial por aplicación tópica: (1) Moscas seleccionadas por sexo; (2) Inmovilización por hipotermia a 2 °C; (3) Medición de 2  $\mu$ L de solución; (4) Aplicación en el mesonoto del insecto; (5) Jaula de prueba, (6) Tratamientos replicados del bioensayo. Diseño y construcción de Jaulas: Eutimio González (LAMOFRU). Ilustración original

### 3.4.3.- Niveles de susceptibilidad en las moscas

Se realiza el conteo de las moscas muertas correspondientes a las 24 y 48 horas. Luego en atención de estos resultados y junto a las distintas concentraciones de



Eugrenca, se realiza un análisis Probit; de manera que se obtenga la representación gráfica de la respuesta de mortalidad de la población insectil en función del logaritmo decimal de las dosis del compuesto tóxico, tal que permita identificar gráficamente la dosis letal 50. Cabe destacar que el análisis Probit es un método importante y muy utilizado en la evaluación de la susceptibilidad de insectos ante compuestos tóxicos; de hecho es empleado por la Organización Mundial de la Salud (Saume, 1992) en el estudio del efecto toxico de insecticidas sobre poblaciones de mosquitos.

#### **3.4.4.- Selección de la dosis letal de la solución insecticida**

La estimación de las dosis letales se realiza a partir del análisis Probit, empleando el programa SPSS versión 7.5.2S (versión estándar, copyright (c) SPSSinc., 1989-1997), donde el comportamiento de la mortalidad se transforma a Desviación Equivalente Normal (DEN) en representación de las unidades Probit; mientras que las dosis letales se expresan en logaritmo decimal. De modo que, para estimar la dosis letal 50 ( $DL_{50}$ ) se considera el valor del Probit 5 de la población total o lo que es lo mismo a DEN igual a cero; seguidamente, se intercepta con dicho valor las rectas que relacionan la DEN con el logaritmo de las concentraciones para los tiempos evaluados. De esta manera, a partir de dicho intercepto, se estima la  $DL_{50}$ .

Finalmente, se analiza el comportamiento de la mortalidad en la población de adultos de *A. obliqua* en los tiempos evaluados, ante las distintas soluciones de Eugrenca. Luego, se selecciona la  $DL_{50}$  de la solución insecticida, es decir, la dosis que mata el 50% de la población de adultos; en la propuesta de un producto natural como alternativa en el control de la especie.



## CAPÍTULO IV

### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta investigación son reflejados en el presente capítulo, así como la discusión de cada objetivo establecido, referidos a los procesos de extracción del aceite y de las pruebas de potencial atrayente y efecto insecticida.

#### **4.1.- ESTABLECIMIENTO DE LAS VARIABLES RELEVANTES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE *S. aromaticum***

Uno de los objetivos planteados en este trabajo es determinar las variables relevantes que perturban al proceso de extracción de *S. aromaticum*, sobre la base de la selección de aquellas técnicas que garanticen un aceite puro; es decir, un aceite libre de restos de sustancias que lo alteren, degraden o afecten la factibilidad de su uso pretendido en este trabajo, en la formulación de productos insecticidas naturales.

Dentro de esta perspectiva, se descartaron las técnicas que emplean solventes orgánicos a fin de evitar la presencia de trazas de estos en el aceite; dado que la inocuidad de los solventes orgánicos recomendados para la extracción y purificación son de acción desconocida sobre la especie *A. obliqua*, aún cuando estos solventes ofrecen una mejor separación y por ende un mejor rendimiento en los procesos de extracción. Una excepción de las técnicas que emplean solventes de las que el aceite obtenido es puro, corresponde a la extracción empleando fluidos supercríticos; el cual no fue objeto de estudio en este trabajo dado a que la accesibilidad del equipo estuvo fuera del alcance del investigador, por presentar fallas técnicas o no estar disponible. Asimismo, Wenqiang y otros (2005) afirman que la extracción de aceite de clavo de olor por diversos procesos, con solventes orgánicos y agua, presentan algunos componentes similares. Es por ello, que en la extracción de *S. aromaticum* se utilizaron



dos métodos de destilación empleando como solvente agua, a saber: destilación por arrastre con vapor de agua (vapor húmedo) e hidrodestilación; que son ampliamente conocidas y aplicadas en la extracción de aceites esenciales a nivel industrial (Moyler, 1991). El proceso de extracción por destilación con agua presenta como una de sus ventajas, los bajos costos asociados en la fabricación y montaje del equipo en comparación con tecnologías recientes, es el caso del proceso de extracción con fluidos supercríticos (EFS) de costo elevado. Así en la tabla 4.1., se describen los aspectos comparativos entre los procesos de extracción, conducentes a la selección de aquellos procesos que empleen como solvente agua; dado que estos refuerzan la propiedad anestésica requerida a los fines del producto insecticida.

**Tabla 4.1.** Comparación de los procesos comúnmente indicados en la obtención de *S. aromaticum*.

<b>PROCESOS</b> <b>ASPECTOS</b>	<b>DESTILACIÓN POR ARRASTRE CON VAPOR DE AGUA</b>	<b>HIDRODESTILACIÓN</b>	<b>POR FLUIDOS EN ESTADO CRÍTICO</b>
<b>Aceite volátil extraído</b>	Su aroma es fuerte, su aceite es medicinal: antibacterial, antihongos, antioxidante.	Su aroma es fuerte, su aceite es medicinal: antibacterial, antihongos, antioxidante.	Su aroma es dulce y ligeramente floral, su aceite es perfumado y poco medicinal.
<b>Alteraciones químicas y/o físicas</b>	Se hidroliza el acetato de eugenol transformándose en eugenol y ácido acético. Algunos de los compuestos de fragancia se solubilizan en agua.	Se hidroliza el acetato de eugenol transformándose en eugenol y ácido acético. Algunos de los compuestos de fragancia se solubilizan en agua.	Ninguna.
<b>Productos indeseados</b>	Induce a la degradación térmica de los ácidos fenolcarbónicos.	Induce a la degradación térmica de los ácidos fenolcarbónicos.	El CO <sub>2</sub> supercrítico se comporta como un solvente lipofílico originando ceras y grasas.
<b>Costos</b>	Relativo costo económico: fácil montaje del sistema. Solvente de fácil acceso y bajo costo.	Relativo costo económico: fácil montaje del sistema. Solvente de fácil acceso y bajo costo.	Costo muy elevado de adquisición de los equipos y operacionales. Uso obligado de separadores.
<b>Uso industrial</b>	Sus extractos se destinan al desarrollo de insecticidas, fungicidas, anestésico.	Sus extractos se destinan al desarrollo de insecticidas, fungicidas y anestésico.	Sus extractos están destinados al desarrollo de perfumes y cosméticos.





En la destilación con agua se obtienen extractos oleosos que poseen aromas más fuertes y colores más oscuros, además se conservan las propiedades medicinales respecto a los obtenidos por EFS y Soxhlet (Wenqiang *et al.*, 2005; Dellacassa *et al.*, 2004b; Della Porta *et al.*, 1998). Por otro lado, la destilación en comparación con las técnicas de extracción antes citadas aporta aceites de menor calidad que los producidos por estos métodos (Wenqiang *et al.*, 2005; Urbáez, 2003).

Por otra parte, con la intención de evaluar cualitativamente las variables incidentes en el rendimiento del proceso de extracción de aceite de clavo de olor que empleen las técnicas de destilación con agua, se aplicó el diagrama de Ishikawa o de *causa-efecto*, representado en la figura 4.1. Posteriormente las variables fueron cuantificadas, como más adelante se muestra en este capítulo.

En la figura 4.1 se evidencia la influencia de multivariantes en la extracción de aceites esenciales por destilación con agua, categorizadas según las 6M, esto es: mano de obra, método, materiales, mediciones, medio ambiente y maquinaria. En cuanto a *mano de obra* las variables tales como calidad de supervisión, condiciones de trabajo e inexperiencia, tuvieron poca o ninguna incidencia en la realización de las extracciones, dadas las condiciones apropiadas de trabajo y de desempeño del experimentador en todo momento, de modo que se minimizaron los errores en el proceso. Con esta finalidad se planificó los instrumentos de recolección de datos y más aún, la ejecución de cada corrida experimental de las extracciones, inherentes al *método*. En este orden de ideas, los factores del *medio ambiente* escaparon del dominio del investigador, al quedar con efecto uniforme sobre el proceso; de esta manera, en la categoría de *maquinaria*, se encontró el funcionamiento adecuado de los equipos que evitó perturbaciones en el sistema y por ende, sobre el rendimiento.

En lo que se refiere a variables manipulables, de carácter relevante o influyente en el proceso, se encuentran las relacionadas con las categorías de *materiales* y *mediciones* del diagrama citado. Dentro de este marco, destacaron las siguientes variables: contacto con el solvente, contenido de agua, procedencia y tratamiento como el tamaño de partícula, referidas a la materia vegetal en la categoría de *materiales*. Mientras que las que pertenecen al sistema, bajo la condición de *mediciones*, están las



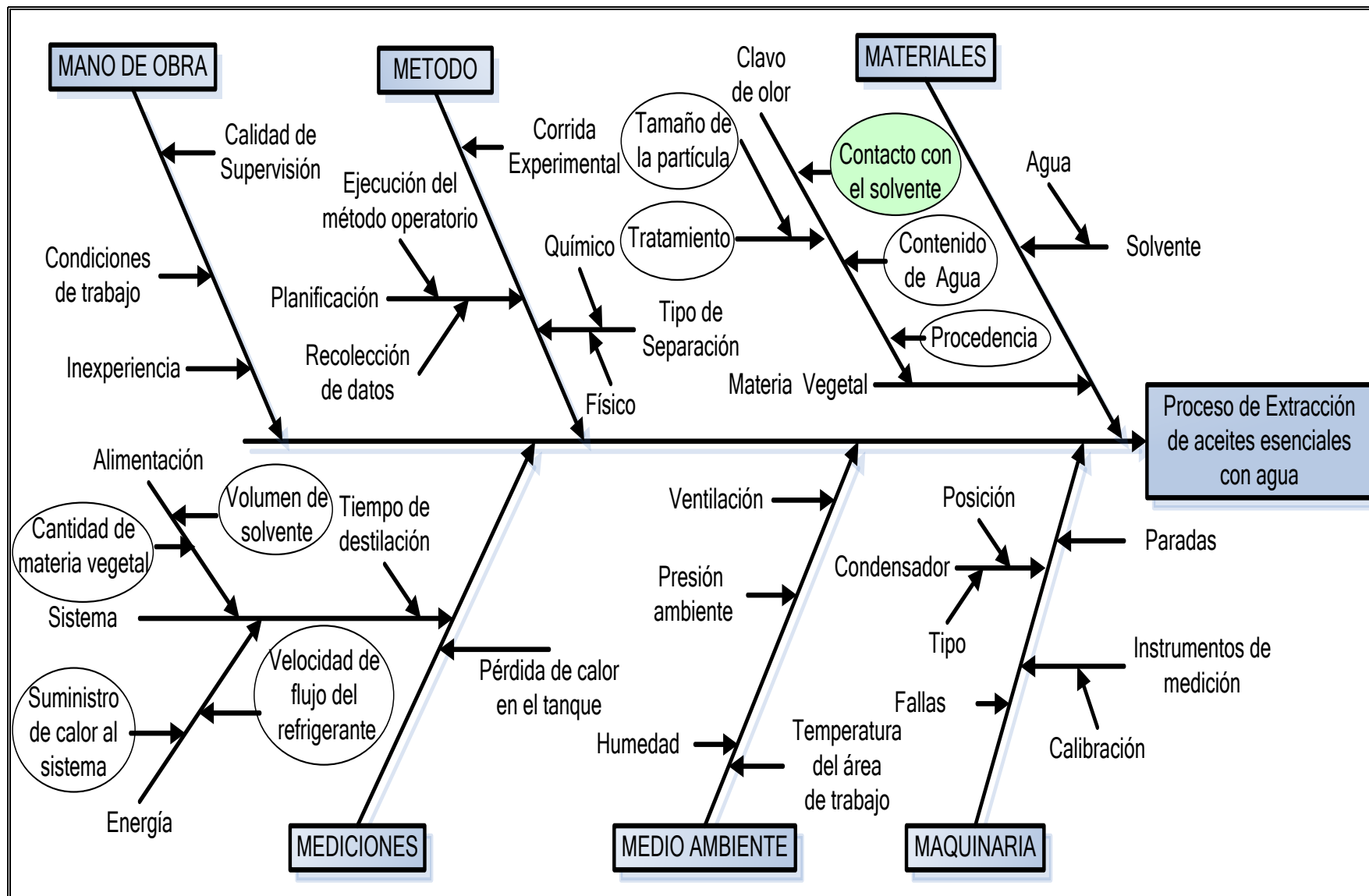


Figura 4.1. Diagrama de Ishikawa para el proceso de extracción de aceite esencial de clavo de olor con agua

referentes a energía tal como la velocidad de flujo del refrigerante y el suministro de calor, así como las correspondientes a la alimentación: el volumen de solvente y la cantidad de materia vegetal.

Dada que la variable *tipo de contacto* entre la materia vegetal y el solvente, permitió establecer técnicas de extracción distintas, hidrodestilación (contacto directo con fase líquida) y arrastre con vapor de agua o húmedo (sin contacto con fase líquida); se seleccionó como la variable de interés en el análisis de la obtención del aceite deseado, al realizarse un conjunto de extracciones preliminares variando el contacto entre el clavo de olor y el agua. Hay que resaltar que las variables manipulables sin seleccionar, permitieron mediante su operación complementar la caracterización y el análisis de las técnicas de extracción estudiadas; permitiendo la recolección de datos confiables en los ensayos preliminares para el establecimiento de las condiciones de operación adecuadas en la obtención de *S. aromaticum*.

En los procesos de extracción, específicamente las etapas de separación y purificación presentan especial importancia dado que contribuye a altos rendimientos o bien, a mayores cantidades del aceite deseado; es por ello, que se reconsideró en la etapa de separación el uso de un agente químico, como el cloruro de sodio (NaCl), con el fin de romper la emulsión presente en el destilado y con ello facilitar la separación de las fases, acuosa y orgánica. Cabe destacar, que se prefirió el NaCl debido a que es una sal accesible, de bajo costo y de alta solubilidad en medio acuoso que facilita la separación de las fases; además los posibles restos de este permanecen en la fase descartada.

En general, los procesos se caracterizaron en función de las variables inherentes al destilado, masa de aceite extraído y agua dosificada de modo que la respuesta del proceso fue estimada bajo las condiciones de operación, donde algunas de las variables influyentes se mantuvieron uniformes durante el proceso, como el tamaño de partícula del clavo, el volumen de solvente, suministro de calor al sistema, entre otros.

De hecho, la tabla 4.2. muestra los valores de masa de aceite y el rendimiento de los procesos estudiados, donde la hidrodestilación prevaleció sobre la técnica de arrastre con vapor de agua en cuanto a la cantidad de aceite obtenido y por ende en

rendimiento, tanto para los experimentos donde se usó NaCl como los que carecieron de este. Esta divergencia entre los procesos en cuanto al rendimiento, se debe a que se obtuvo un destilado más emulsionado en el proceso de arrastre con vapor húmedo, que dificultó la separación y en consecuencia, la masa de aceite obtenida fue menor; esto como respuesta al proceso de difusión entre los componentes presentes en la materia vegetal y el vapor de agua.

Por otra parte, el volumen de destilado y con este el caudal, indicados en la tabla 4.3., fueron mayores por hidrodestilación que por arrastre con vapor húmedo ya que en esta última la materia vegetal estuvo suspendida en una rejilla dentro del tanque, lo que de forma inevitable provocó que el vapor de agua en su ascenso chocara con esta y parte del vapor condensara dentro de la propia cámara. Cabe destacar que se obtuvo un aceite parcialmente miscible con el agua, lo que provocó la emulsión en el destilado; esto debido posiblemente, a la presencia de compuestos oxigenados que tienden a ser parcialmente solubles en este solvente, dificultando la remoción completa del aceite (Dellacassa *et al.*, 2004b; Ochoa, 1998).

Otro de los aspectos considerados en este trabajo está sujeto a las características de un proceso por carga, para garantizar que la materia vegetal ceda su capacidad máxima en componentes volátiles se recurrió a la adición de agua durante el proceso de extracción. Para ello, el agua se dosificó a la cámara con el fin de mantener el nivel inicial de solvente, evitando que la materia vegetal se degradara por sequedad, impidiendo con ello la obtención de compuestos indeseados. Además, el agua se precalentó a objeto de reducir el tiempo de restablecimiento del equilibrio del perfil de temperaturas del proceso. La adición de solvente al sistema se realizó en cada técnica, reemplazando al volumen de destilado recolectado cada 30 minutos durante el proceso, tal como se reporta en la tabla 4.4. Con base en estos resultados, se estableció que el agua dosificada al sistema fuera cada media hora durante el proceso en cantidades de 120 mL.

**Tabla 4.2.** Rendimiento de aceite de *S. aromaticum* en el proceso de extracción

Proceso de extracción °	Experimento	Masa de aceite esencial	Rendimiento
		( $m_a \pm 0,002$ ) g	( $R_{exp} \pm 0,01$ )%
Destilación por arrastre con vapor de agua	1	0,492	2,48
	2*	0,677	3,40*
Hidrodestilación	3	1,064	5,29
	4*	1,365	6,87*

\* Experimentos tratados con agente separador

° Realizado con tiempo de destilación de 120 min

**Tabla 4.3.** Características del destilado durante los procesos de obtención de *S. aromaticum*

Proceso de extracción °	Volumen de destilado total ( $V_{DT} \pm 0,5$ ) mL	Temperatura promedio del destilado ( $\bar{T}_D \pm 0,5$ ) °C	Caudal promedio de destilado ( $\bar{Q}_D \pm 0,6$ ) mL/min
Destilación por arrastre con vapor de agua	563,0	66,9	3,1
Hidrodestilación	704,5	67,0	4,1

° Realizado con tiempo de destilación de 120 min

**Tabla 4.4.** Dosificación de agua precalentada durante los procesos de extracción de *S. aromaticum*

Proceso de extracción °	Temperatura en el tanque ( $\bar{T}_T \pm 1$ ) °C	Volumen destilado en 30 min ( $V_{D30} \pm 0,5$ ) mL	Valores promedios del dosificado de agua	
			Volumen ( $\bar{V}_A \pm 15$ ) mL	Temperatura ( $\bar{T}_A \pm 0,5$ ) °C
Destilación por arrastre con vapor de agua	96	93,8	104	79,1
Hidrodestilación	96	117,4	120	70,7

° Realizado con tiempo de destilación de 120 min

En cuanto al aceite de *S. aromaticum* obtenido, este presentó coloración amarilla en ambas técnicas, observación que coincide con lo reportado por Della Porta y otros (1998). Es necesario señalar que sólo en aquellos experimentos donde se usó NaCl, el aceite mostró un color más oscuro durante el proceso de separación de las fases orgánica y acuosa, esto probablemente por una reacción de oxidación de algunos de sus componentes en presencia del aire. En vista del cambio de la coloración del aceite, se descartó la utilización del NaCl pues se podría estar en presencia de alguna alteración no deseada del compuesto activo en el aceite de clavo de olor.

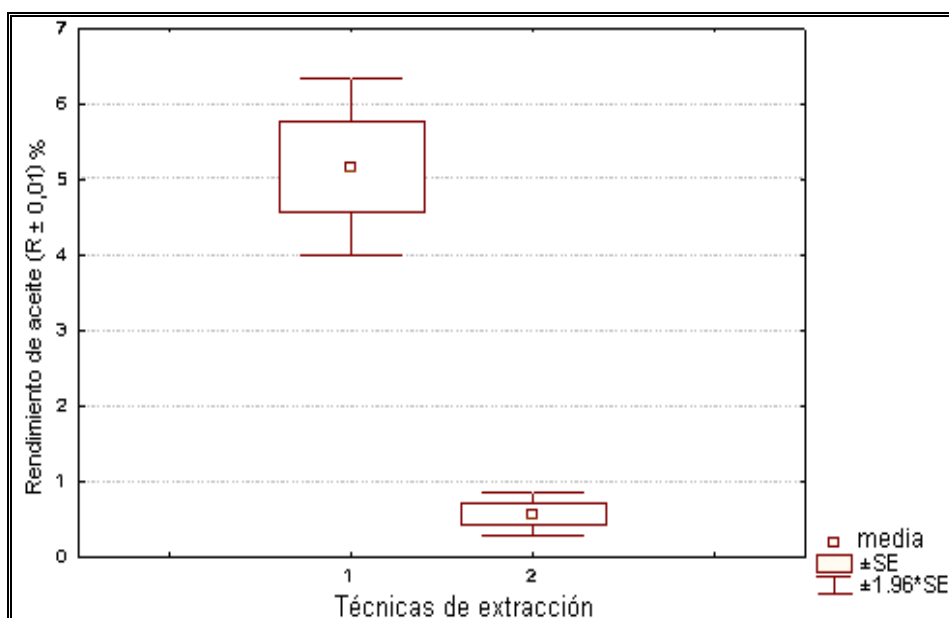
En fin, de las multivariantes sólo se seleccionó el *tipo de contacto* de la materia vegetal con el solvente como la de interés en la obtención de aceite de *S. aromaticum* y el análisis del rendimiento, ya que el resto de las variables se mantuvieron inalterables durante los procesos de extracción, bajo las siguientes condiciones: la materia vegetal a un tamaño de partícula de 1-2 mm, para facilitar el contacto cuerpo-solvente y evitar el posible apelmazamiento de la materia al ser trabajada bajo tamaños muy pequeños; la cantidad de clavo de olor empleada fue de 20 g, que facilita la transferencia por difusión, tuvo origen conocido (Madagascar) y no fue intercambiada por otra especie similar en las extracciones realizadas; el volumen de agua inicial fue de 1000 mL, en función de la capacidad del tanque y se dosificó agua precalentada al sistema cada 30 min, a fin de mantener el nivel inicial del solvente; la velocidad de flujo del refrigerante se mantuvo constante mediante la apertura al 100% de la válvula del baño térmico; finalmente, los procesos se realizaron bajo presión ambiente ( $P_{amb} = 709,12$  mmHg).

#### **4.2.- EVALUACIÓN DE LAS TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL**

Los procesos se evaluaron bajo las condiciones de operación previamente establecidas para la extracción del aceite esencial de clavo de olor, obteniéndose un rendimiento promedio de  $(5,16 \pm 0,01)$  % en la técnica por hidrodestilación, cuyo resultado estuvo por debajo del rendimiento bibliográfico mínimo de 10 % reportado para el clavo de olor con esta técnica (Marín y Ojeda, 2005; Marcano y Hasegawa, 1991). Lo mismo ocurrió en el caso del proceso por arrastre con vapor de agua, donde se obtuvo un rendimiento

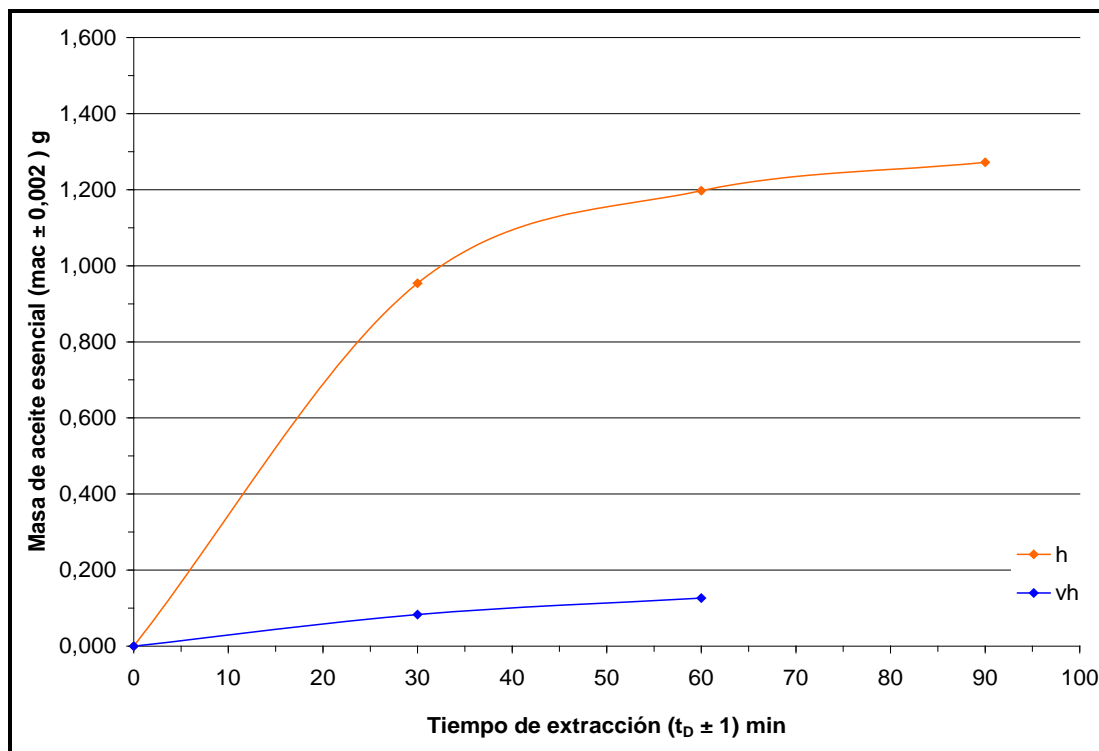
promedio de  $(0,57 \pm 0,01)$  %. En este marco, el rendimiento obtenido experimentalmente por hidrodestilación tuvo una relación ( $\alpha$ ) de 0,52 con respecto del 10% bibliográfico y para la destilación con vapor húmedo la relación fue de 0,06; con ello se establece que el proceso de hidrodestilación alcanzó en un 52% el rendimiento mínimo reportado en fuentes bibliográficas, así como el proceso por arrastre con vapor de agua alcanzó apenas un 6% de este valor. Sin embargo, debe señalarse que en las fuentes bibliográficas no se precisó bajo qué condiciones fue llevado a cabo el proceso de extracción y purificación del aceite, siendo así, no se podría afirmar acerca de las diferencias entre los rendimientos reportados bibliográficamente y del obtenido experimentalmente.

Como ya se mencionó, el proceso que presentó mayor rendimiento corresponde a la hidrodestilación, con base en este resultado dicha técnica se seleccionó como la más apropiada en la obtención del aceite de *S. aromaticum*. Es importante señalar que el criterio de selección está sustentado en la diferencia significativa de los rendimientos entre los procesos evaluados, demostrado al aplicar la prueba *t* de Student robusta. Además, en la figura 4.2. se observa que los límites de confianza de los rendimientos no se superponen, indicando que los procesos son estadísticamente diferentes entre sí.

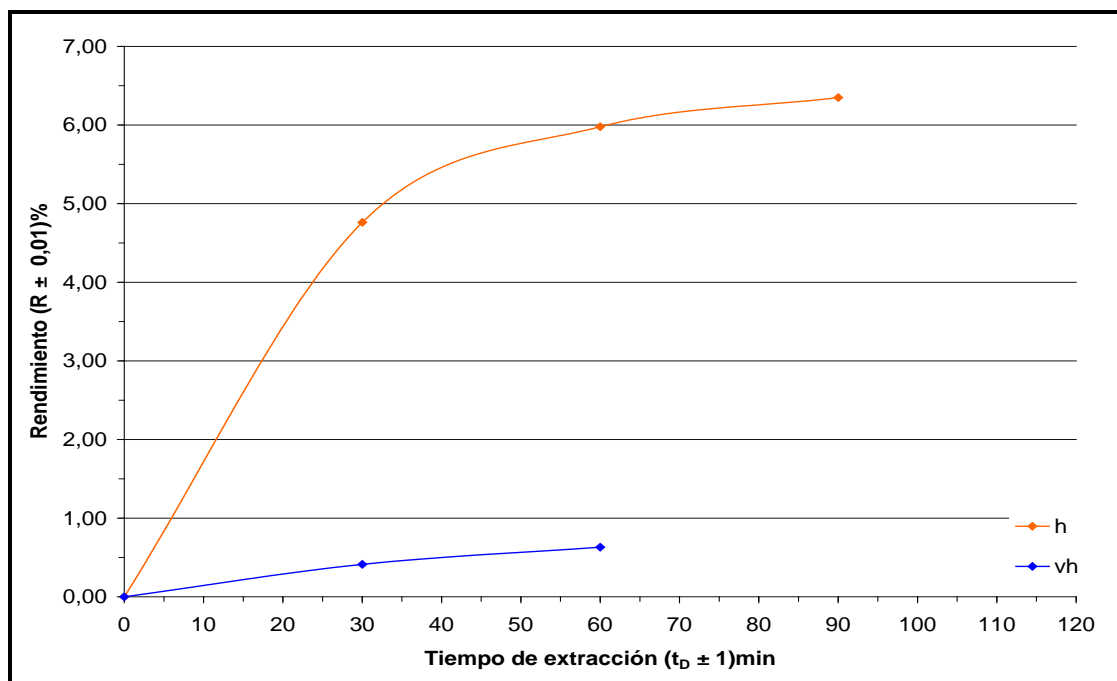


**Figura 4.2.** Prueba de significancia con  $p=0,00007$  al 95% de confianza para los rendimientos de los métodos de extracción de aceite de clavo de olor: (1) hidrodestilación, (2) arrastre con vapor de agua

Se ha reportado que los componentes volátiles presentes en el clavo de olor se alteran por ebullición durante el proceso de extracción, dadas sus características termolábiles (Moyler, 1991). Es por ello que la materia vegetal en contacto directo con el agua conllevó a una mayor difusión entre ésta y el solvente, evidenciado por la mayor cantidad de aceite extraído en el proceso de hidrodestilación, como se aprecia en la figura 4.3. En general, los rendimientos aumentaron en el tiempo asintóticamente, de acuerdo a la figura 4.4, como era de esperarse por tratarse de procesos de extracción por carga (Reverchon y Marrone, 1997) donde la capacidad de la materia vegetal está limitada, debido a que ésta no es renovada continuamente agotándose la fuente de los componentes de clavo de olor durante la extracción. Asimismo, se obtuvieron mayores cantidades de aceite al alcanzar 30 min de los procesos de extracción, como se observa en la figura 4.3, a partir de dicho tiempo la masa extraída es cada vez menor, razón por la cual se tiene tendencia casi constante a partir de los 90 min.



**Figura 4.3.** Masa acumulada de aceite de *S. aromaticum* obtenido durante los procesos de hidrodestilación (h) y arrastre con vapor de agua (vh)



**Figura 4.4.** Rendimiento acumulado del proceso de extracción de aceite esencial de *S. aromaticum* obtenido por hidrodestilación (h) y arrastre con vapor agua (vh)

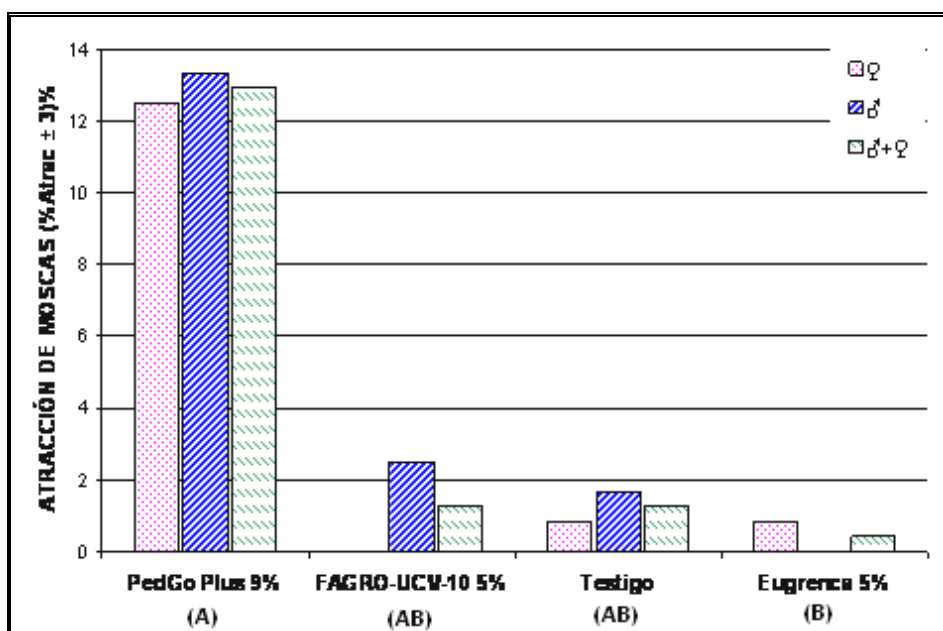
En definitiva, la evaluación de las técnicas experimentales en la extracción del aceite esencial de *S. aromaticum* bajo las condiciones de operación establecidas, arrojó que se obtiene mayor rendimiento por la técnica de hidrodestilación; con base a este criterio, quedó en efecto seleccionada como la más adecuada en la obtención del aceite esencial de clavo de olor.

#### 4.3.- EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE ATRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL HACIA LA POBLACIÓN DE ADULTOS DE *A. obliqua*

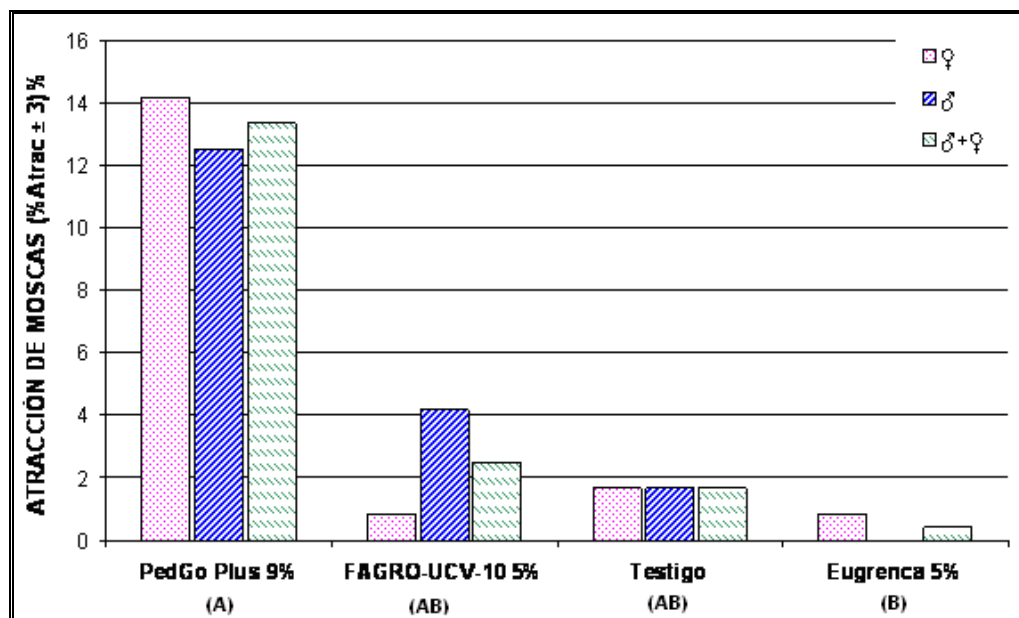
Una de las principales técnicas utilizadas en el control de moscas del mango son las trampas atrayentes, donde se colocan cebos con la capacidad de producir sustancias volátiles que atraen a los insectos hacia las trampas, de donde luego no pueden salir. Es por ello que una de las propiedades evaluadas en el extracto aceitoso del clavo de olor fue su posible capacidad atrayente sobre la especie *A. obliqua*, con el fin de indagar en una nueva molécula a ser considerada como una alternativa en las actividades de trampeo.



Por estas razones, en la evaluación del potencial de atracción del extracto de *S. aromaticum* sobre moscas adultas de *A. obliqua* se aplicaron cuatro tratamientos: FAGRO-UCV-10<sup>®</sup> 5%, PedGo Plus<sup>®</sup> 9%, Eugrenca 5% y agua. Los datos obtenidos en estos ensayos evidencian que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados, según la prueba de Kruskal-Wallis, donde se obtuvieron valores de  $p < 0,05$  (hembras  $p=0,0030$ , machos  $p=0,0000$  y total  $p=0,0002$ ). El porcentaje de atracción de los adultos de *A. obliqua* se muestra en las figuras 4.5a y 4.5b a las 12h y 24h, respectivamente; donde se observa que el tratamiento con PedGo Plus<sup>®</sup> posee el mayor efecto atrayente sobre las moscas, seguido por FAGRO-UCV-10<sup>®</sup>, Eugrenca y el testigo. Los resultados obtenidos indican que desde el punto de vista estadístico PedGo Plus<sup>®</sup> (A) es similar a FAGRO-UCV-10<sup>®</sup> (AB) y al testigo (AB), y a su vez estos últimos son similares a Eugrenca (B); siendo PedGo Plus<sup>®</sup> y Eugrenca significativamente distintos entre sí.



(a)



(b)

**Figura 4.5.** Efecto de atracción de hembras (♀), machos (♂) y de población total (♂+♀) de moscas adultas de *A. obliqua* a las formulaciones de PedGo Plus<sup>®</sup>, FAGRO-UCV-10<sup>®</sup>, Eugrenca y testigo, en intervalos de: (a) 12 horas, (b) 24 horas

De acuerdo a los datos obtenidos en los ensayos de atracción, la evidencia indica que es poco probable que el aceite de clavo obtenido pueda ser utilizado como atrayente en trampas para el control de *A. obliqua*. Se ha reportado que el metileugenol, un compuesto presente en el aceite de *S. aromaticum*, posee un efecto atrayente sobre algunas especies de la familia Tephritidae, específicamente para los machos de la mosca oriental de la fruta *Bactrocera dorsalis* (Luque G., 2005; Galán S., 1999; Metcalf y Flint, 1978). Sabiendo que el metileugenol es la sustancia que proporciona efecto atrayente, es probable que la ausencia o baja concentración de dicho componente (no comprobada) en el aceite obtenido, sea la razón por la que se observó ningún efecto poder atrayente sobre *A. obliqua*, en este trabajo. Es factible que el calentamiento de la material vegetal haya afectado las propiedades biológicas del metileugenol o su presencia en el aceite, pudiendo encontrarse en cantidades muy bajas.

El hecho de carecer de datos acerca de la concentración del metileugenol en el aceite de *S. aromaticum*, dificulta comprobar esta posibilidad. También hay que tomar en cuenta que se desconoce el efecto del metileugenol sobre *A. obliqua*, ya que el

insecto referenciado por Luque G. (2005) y Metcalf y Flint (1978), si bien pertenece a la misma Familia, su género es distinto al utilizado en este trabajo. Obviamente es necesario realizar ensayos para conocer el efecto del metileugenol sobre *A. obliqua* y determinar la composición química del extracto aceitoso, para poder corroborar estas hipótesis.

#### **4.4.- EVALUACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA DE *S. aromaticum* SOBRE *A. obliqua***

El otro efecto biológico del aceite que se probó en el presente trabajo fue la actividad insecticida sobre las moscas adultas de *A. obliqua*. En este caso, se utilizaron varias concentraciones del aceite (Eugrenca) diluidas en acetona y un tratamiento control.

Se realizaron varios ensayos preliminares con el objeto de conocer a grandes rasgos el intervalo de concentraciones en las que se debían realizar los tratamientos, para obtener la dosis que es letal a la mitad de la población (Dosis letal 50, DL<sub>50</sub>). En el tratamiento del aceite sin diluir, los insectos murieron inmediatamente luego de su aplicación y para la solución de menor concentración (5000 ppm; 0,5 %v/v) se evidenció la ausencia de toxicidad sobre las moscas (datos no mostrados). Con base en estos resultados se prepararon un conjunto de soluciones de aceite en el intervalo de concentraciones entre 10.100 ppm (1,01 %v/v) y 160.000 ppm (16,00 %v/v). Los efectos de mortalidad obtenidos en estos ensayos para 24 y 48 horas se muestran en las tablas 4.5a y 4.5b, respectivamente; donde es evidente que a medida que aumenta la concentración del aceite, aumenta también la mortalidad observada, cuya tendencia fue similar a la obtenida por Contreras (2005) en la evaluación de la susceptibilidad de *A. obliqua* ante el insecticida Malatión®.

**Tabla 4.5a Mortalidad a las 24h de moscas adultas de *A. obliqua* susceptibles a las concentraciones de aceite esencial por aplicación tópica**

Concentración (% v/v)	Mortalidad promedio			% Mortalidad promedio*		
	♀	♂	♀ + ♂	♀	♂	♀ + ♂
0,00	1	1	1	0	0	0
1,01	0	1	1	0	4	5
5,60	4	3	6	32	21	27
11,20	6	8	14	57	82	70
16,00	10	9	19	96	89	93

\*Valores porcentuales de mortalidad corregidos mediante la fórmula de ABBOTT. Fuente: Saume, 1992

**Tabla 4.5b. Mortalidad a las 48h de moscas adultas de *A. obliqua* susceptibles a las concentraciones de aceite esencial por aplicación tópica**

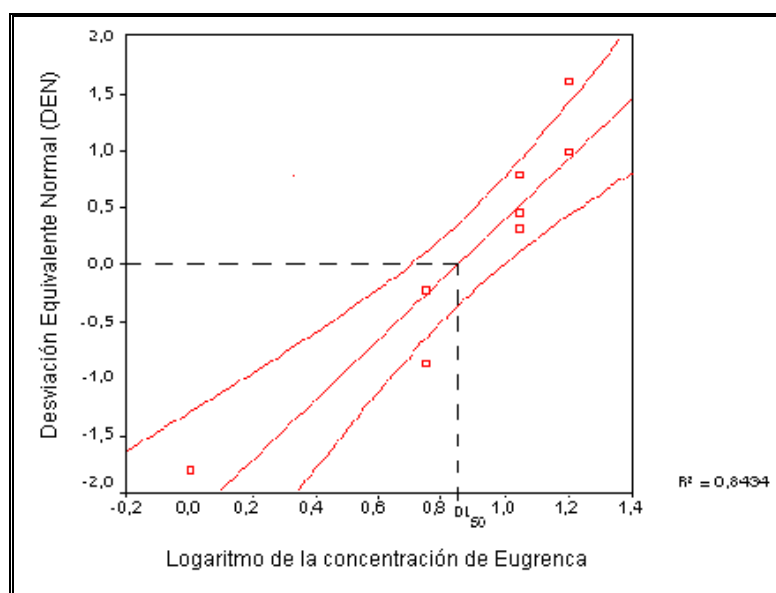
Concentración (% v/v)	Mortalidad promedio			% Mortalidad promedio*		
	♀	♂	♀ + ♂	♀	♂	♀ + ♂
0,00	1	1	1	0	0	0
1,01	0	1	1	0	4	5
5,60	4	4	8	32	36	34
11,20	6	8	15	61	82	71
16,00	10	9	19	96	93	95

\*Valores porcentuales de mortalidad corregidos mediante la fórmula de ABBOTT. Fuente: Saume, 1992

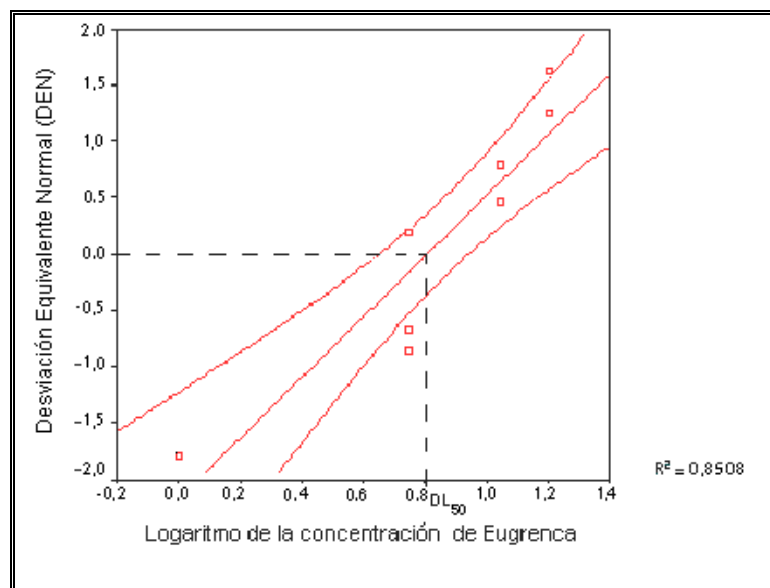
A los resultados de mortalidad obtenidos se les realizó un análisis Probit en el cálculo de la  $DL_{50}$  para la población total (H+M), que se reportan en la tabla 4.6. Las figuras 4.6a y 4.6b relacionan las unidades Probit de mortalidad, expresadas como Desviación Equivalente Normal (DEN), con el logaritmo decimal de la concentración de Eugrenca; donde se obtiene para cada recta una ecuación de regresión que la representa y se demostró que se ajustan adecuadamente para un nivel de confianza del 95%, dado que se cumple que el valor calculado de chi cuadrado ( $X^2_{CAL}$ ) es menor que

el chi cuadrado bibliográfico ( $X^2_B = 16,9$ ). A partir de las pendientes de estas rectas se pueden obtener conclusiones acerca de la susceptibilidad del insecto al aceite (Saume, 1992); en este sentido, la pendiente a las 24h fue similar a la pendiente obtenida a las 48h, siendo esta última ligeramente menor, según los resultados mostrados en la tabla 4.6. Este resultado permitió establecer que el efecto insecticida de Eugrenca ocurre totalmente durante las primeras 24 horas.

La  $DL_{50}$  se obtuvo a partir de la intersección del valor cero de la Desviación Equivalente Normal (DEN), ajustado a Probit 5, con cada una de las rectas de las figuras 4.6a y 4.6b, correspondientes a la población total para las 24 y 48 horas, respectivamente. Con base en estos resultados, se concluyó que la dosis de Eugrenca capaz de matar a la mitad de la población de *A. obliqua* bajo las condiciones de estudio fue de 78.713 ppm (7,87 %v/v) para las 24 horas, como se confirma en la figura 4.6a y la tabla 4.6; mientras que a las 48 horas fue de 72.365 ppm (7,24 %v/v), según lo evidenciado en la figura 4.6b y la tabla 4.6. La prueba de Hartley o  $FMáx$  confirmó que existe diferencia no significativa respecto de la mortalidad del insecto cuando se comparan a las 24 y 48h; esto es, se cumple que para la población total de adultos de *A. obliqua*, el valor calculado de  $FMáx$  ( $FMáx_{cal} = 1,02$ ) es menor que el bibliográfico ( $FMáx_B = 2,07$ ), para un nivel de confianza de 95%.



(a)



(b)

**Figura 4.6.** Representación de la DEN para la población total de *A. obliqua* en función del logaritmo decimal de las diferentes concentraciones de Eugrencia, en intervalos de: (a) 24 horas, (b) 48 horas

**Tabla 4.6.** Características del análisis Probit a las 24 h y 48 h para la población total de las moscas adultas de la generación F<sub>2</sub>

24 h			48 h		
Ecuación	DL <sub>50</sub> (% v/v)	X <sup>2</sup> <sub>CAL</sub> *	Ecuación	DL <sub>50</sub> (% v/v)	X <sup>2</sup> <sub>CAL</sub> *
y = 4,27505x -3,83063	7,87	9,703	y =3,99302x -3,43211	7,24	12,301

\* Valor comparado con chi cuadrado bibliográfico (X<sup>2</sup><sub>B</sub> = 16,9) para 9 grados de libertad

La dosis letal 50 y 95 reportada para el insecticida Malatión<sup>®</sup> sobre *A. obliqua* es de 8,62 y 31,5 ppm, respectivamente (Contreras, 2005), siendo notoriamente inferiores a los obtenidos en el presente trabajo (DL<sub>50</sub> = 78.713 ppm). Es importante señalar que el Malatión<sup>®</sup> es un insecticida de origen químico sintético, perteneciente al grupo de los organofosforados con susceptibilidad comprobada sobre la especie en estudio y especialmente diseñado para cumplir esta función; mientras que el extracto obtenido en la investigación actual es un conjunto de componentes químicos de origen natural, algunos de los cuales poseen actividad insecticida. En el aceite de clavo de olor, el eugenol es uno de los componentes a los que se le ha atribuido esta propiedad,

específicamente sobre la cucaracha *Periplaneta americana* (Enan, 2001). Sin embargo, se desconoce su concentración en el producto formulado en este trabajo. Así, si bien se encontró que el aceite presentó efecto tóxico sobre *A. obliqua*, resulta importante determinar cual es su composición y las moléculas involucradas en esta propiedad sobre las moscas. Una vez obtenidas estas moléculas de forma aislada sería posible obtener un producto comercial con base en estas sustancias, y de cuyo DL<sub>50</sub> sería mucho más bajo que el obtenido para el extracto.

Si bien es preciso realizar las pruebas de toxicidad del aceite de clavo de olor en animales (mamíferos) y humanos, es muy probable que por su origen de ocurrencia natural, su impacto negativo sobre el ambiente y seres vivos sea muy bajo; esto es especialmente cierto si se compara con insecticidas sintéticos, como el Malatión<sup>®</sup>. Así, existe una ventaja de tipo ecológico y de seguridad en salud pública en la utilización de este tipo de productos. Sin embargo, como ya se mencionó, es necesario ajustar las concentraciones de los componentes activos y realizar las pruebas de campo que confirmen el efecto insecticida en condiciones naturales. En este sentido, la aplicación de un control etológico utilizando cebos tóxicos: atrayente mezclado con aceite esencial o una segunda forma, dieta carboproteica mezclado con dicho aceite; conducen a determinar la concentración del aceite que causa la muerte al insecto por ingestión.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar A., J. J. (2001). *Evaluación de trampas y formaciones atrayentes para la captura de Anastrepha obliqua (Macquart) en un huerto de mango*. [Trabajo de Grado, No Publicado]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
2. Arpide, J. L. (s.f.). *Clavo de olor. Noticias a la carta 15 (2)*. [Revista en línea]. Disponible: <http://www.afuegolento.com/noticias/15/firmas/arpide/517/>. [Consulta: 2005, Noviembre 18].
3. Boscan de Martínez, N. (Julio-Diciembre 1992). *Manejo Integrado de las Moscas de las Frutas: Identificación, Biología y detención del insecto*. [Revista en línea], 41. FONAIAP. Disponible: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd41/texto/moscas.htm>. [Consulta: 2006, Septiembre 03].
4. Caraballo, J. (Diciembre, 2001). *Diagnosis y clave pictórica para las especies del género Anastrepha schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) de importancia económica en Venezuela*. [Documento]. Entomotrópica 16 (3),157-164. Boletín de Entomología Venezuela.
5. Carrero, J. H. (1996). *Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales*. Ediciones MUNDI PRENSA. Madrid, España.
6. Clavijo A., S. (1983). *Fundamentos del manejo de plagas*. Ediciones Arauco. Universidad Central de Venezuela (UCV). Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela.
7. Clevett, K. J. (1973). *Handbook of process stream analysis*. Editorial ELLIS HORWOOD LIMITED. E.E.U.U.
8. Contreras D., Y. (2005). *Susceptibilidad de una población adulta de Anastrepha obliqua (Macquart), Diptera: Tephritidae, a las aplicaciones tópicas del insecticida malatión*. [Trabajo de Grado]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ingeniería. Escuela de Agronomía.
9. Dellacassa B., E., Lorenzo, D. y Paz, D. (Noviembre, 2004a). *Caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales*. [Documento en línea]. Fondo de



- Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Serie 11. Uruguay. Pp. 159-167. Disponible:<http://www.mgap.gub.uy/BibliotecasdelMGAP/BibliotecaCentral/Boletines/B8Publicaciones/arom%C3%A1ticas.pdf>. Consulta: [2006, Mayo 16].
10. Dellacassa B., E., Lorenzo, D. y Paz, D. (Noviembre, 2004b). *Procesos de extracción aplicados a la obtención de productos aromáticos de origen vegetal*. [Documento en línea]. Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas. Serie 11. Uruguay. Pp. 153-158. Disponible: <http://www.mgap.gub.uy/BibliotecasdelMGAP/BibliotecaCentral/Boletines/B8Publicaciones/arom%C3%A1ticas.pdf>. Consulta: [2006, Mayo 16]
  11. Della Porta, G., Taddeo, R., D' Urso, E. y Reverchon, E. (Marzo, 1998). *Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO<sub>2</sub> extraction*. *Academic Press*. [Resumen]. Universidad de Salerno. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Italia. Pp. 454-460.
  12. Dirección de Estadística del Ministerio de Agricultura y Tierras. (2004).
  13. El Hag, E., El Nadi, A. y Zaitoon, A. (1999). *Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on Culex pipiens larvae (Diptera: Culicidae)*. [Resumen]. *Phytotherapy Research* 13 (5) 388 – 392. Colegio de agricultura y medicina veterinaria, Universidad King Saud, Gassim Branco. Buraydah, Saudi Arabia [Consulta: 2006, Abril 29].
  14. Enan, E. (Noviembre, 2001). *Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action*. [Resumen]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 130 (3) 325-337. Universidad Vanderbilt, escuela de medicina, departamento de Bioquímica. Nashville, USA. [Consulta: 2006, Abril 29].
  15. Evorg, M. (s.f.). *Control de plagas animales: Control natural e insecticidas de cuarta generación*. [Documento en línea]. Disponible: <http://www.herbotecnia.com.ar/c-articu-002.html>. [Consulta: 2006, Marzo 27].

16. FAO (La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (1995). *Essential oil*. [Publicación en línea]. Non-wood forest products from conifers. Capítulo 7. Forestry Department. Disponible: [http://www.fao.org/documents/show\\_cdr.asp?url\\_file=/docrep/x0453e/x0453e00.htm](http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/x0453e/x0453e00.htm) . [Consulta: 2006, Febrero 02].
17. Farrera P., R. (Septiembre-Diciembre, 2004). *Acerca de los plaguicidas y su uso en la agricultura*. [Revista en línea], 6. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela (CENIAP). Disponible: [http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/farrera\\_r/arti/farrera\\_r.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n6/arti/farrera_r/arti/farrera_r.htm). [Consulta: 2006, Septiembre 17].
18. Galán S., V. (1999). *El cultivo del mango*. Ediciones MUNDI-PRENSA. Madrid, España. Pp.54-67.
19. Guillén, C. y Hernández, A. (2003). *Evaluación del rendimiento de tres procesos de extracción diferentes para la obtención de esencia de piña (Ananas comosus)*. [Trabajo de Grado]. Universidad de Carabobo, Facultad de Ingeniería. Valencia, Venezuela.
20. González E., R. (Mayo-Agosto, 2002). *Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas*. [Revista en línea], 2. Revista cubana ESTAMATOL. Volumen 39. Departamento de Investigaciones Biológicas, Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. Ciudad de la Habana. Disponible: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/est/vol39\\_2\\_02/Est05202.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/est/vol39_2_02/Est05202.htm) [Consulta: 2005, Noviembre 02].
21. Hee, A. y Tan, K. (Noviembre, 2004). *Male sex pheromonal components derived from methyl eugenol in the hemolymph of the fruit fly Bactrocera papayae*. [Resumen]. *J Chem Ecol* 30 (11), 2127-38. Universidad Sains Malasia. Escuela de ciencias biológicas. Penang, Malasia. [Consulta: 2006, Junio 15].
22. Hee, A. y Tan, K. (Agosto, 2006). *Transport of methyl eugenol-derived sex pheromonal components in the male fruit fly, Bactrocera dorsalis*. [Resumen]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 143 (4), 422-428. Universidad Sains Malasia. Escuela de ciencias biológicas. Penang, Malasia. [Consulta: 2006, Junio 15].

23. Kuehl, R. O. (2003). *Diseño de Experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. Traducido del libro *Desing of experiments* por González Osuna Marcia. (2a ed.). Editorial THOMSON LEARNING. Distrito Federal, México.
24. Leal, F. (1997). *Especias: cultivos promisorios para Venezuela*. *Revista de la Facultad de Agronomía* (23), 125-148. [Revista en línea]. Maracay, Venezuela. Disponible: [http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagro/v23\\_2/v232m001.html](http://www.redpav-fpolar.info.ve/fagro/v23_2/v232m001.html). [Consulta: 2005, Noviembre 18].
25. Lide, D. R. (1995-1196). *CRC Handbook of chemistry and physics*. (76th ed.). Editorial ADVISORY BOARD.
26. Lugo, X. (1996). *Evaluación de extractos de plantas para el control de *Anastrepha obliqua* (Macquart) Diptera: Tephritidae, en mango *Manglífera indica* L.* [Trabajo de Grado]. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela.
27. Luque G., L. E. (2005). *Evaluación de formulaciones atrayentes para *Anastrepha obliqua* (Macquart), Diptera: Tephritidae, y efecto de la fenología del cultivo de mango "Handen" sobre las capturas*. [Trabajo de Grado]. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela.
28. Marcano, D. y Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica orgánica*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Pp. 184-187.
29. Marín, J. y Ojeda, M. (2005). *Desarrollo de un proceso de extracción del aceite esencial de clavel de la india (*Tabernaemontana divaricata*) con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico para la producción de fragancias*. [Trabajo de Grado]. Universidad de Carabobo, Facultad de Ingeniería. Valencia, Venezuela. Pp. 13-18.
30. Metcalf, C. L. y Flint, W. P. (1978). *Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control*. (4a ed.). Traducido de *Destructive and useful insects* por Ing. Agr. Blackaller V. Alonso. Editorial CONTINENTAL. México.
31. Mi-Kyeong, H., Soon-Il, K. y Young-Joon, A. (2004). *Insecticidal and antifeedant activities of medicinal plant extracts against *attagenus unicolor japonicus**

- (Coleoptera: Dermestidae). [Resumen]. *Journal of Stored Products Research* 42 (1) 15-22. [Consulta: 2006, Abril 29].
32. Montañez P., L. E. (2005). *Desarrollo de un bioinsecticida a partir de la Azadiractina presente en el aceite de neem*. [Trabajo de Grado]. Universidad de Carabobo, Facultad de Ingeniería. Valencia, Venezuela.
  33. Moyler, D. (Enero, 1991). *Natural ingredients for flavours and fragrances*. [Documento]. *Chemistry and Industry*. Pp.11-13.
  34. Myint, S., Wan Daub, W. R., Mohamad, A. B. y Kadhum, A. A. (1996). *Gas chromatographic of eugenol in etanol extract of cloves*. *J Chromatographic B* (679) 193-195.
  35. Neira C., M., Heinsohn P., P., Carrillo Ll., R., Báez M., A. y Fuentealba A., J. (Julio-Septiembre, 2004). *Efecto de aceites esenciales de lavanda y laurel sobre el ácaro Varroa destructor Anderson & Truemann (Acari: Varroidae)*. [Documento]. *Agricultura Técnica* 64 (3), 238-244. [Consulta: 2006, Mayo 11].
  36. Ochoa O., A. M. (julio, 1998). *Aceites esenciales*. [Revista en línea]. El aroma de la naturaleza, ciencia al día. Agencia AUPEC. Disponible: <http://aupec.univalle.edu.co/informes/julio98/aceites.html>. [Consulta: 2005, Noviembre 02].
  37. Park, I. y Shin, S. (Junio, 2005). *Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (Allium sativum) and clove bud (Eugenia caryophyllata) oils against the Japanese termite (Reticulitermes speratus Kolbe)*. [Resumen]. *J Agric Food Chem* 53 (11), 4388-4392. Instituto de investigación forestal Korea. Seoul, República de Korea. [Consulta: 2006, Abril 29].
  38. Pavia, D. L., Lampman, G. M. y Kriz Jr. G. S. (1982). *Introduction to organic laboratory techniques*. (2a ed.). Editorial SAUNDERS. E.E.U.U.
  39. Philip, D. (Noviembre, 2004). *Estructura de la industria de productos aromáticos: aceites esenciales*. [Documento en línea]. Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas, Serie 11. Uruguay. Pp. 30-33. Disponible:

- <http://www.mgap.gub.uy/BibliotecasdelMGAP/BibliotecaCentral/Boletines/B8Publicaciones/arom%C3%A1ticas.pdf>. [Consulta: 2006, Mayo 16].
40. Reverchon, E. y Marrone, C. (1997). *Supercritical fluid extraction of clove bud essential oil: isolation and mathematical modeling*. *Chemical Engineering Science*. [Documento]. (20) 3421-3428. Universidad de Salerno, Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Italia.
  41. Russ, K. (2005). *Less Toxic Insecticides*. Home & garden information center. Clemson University. [Documento en línea]. Disponible: <http://hgic.clemson.edu/factsheets/HGIC2770.htm>. [Consulta: 2006, Marzo 20].
  42. Saume, F. (1992). *Introducción a la química y toxicología de insecticidas*. Editorial Industria Gráfica Integral. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Venezuela.
  43. SPSS (1989-1997). Copyright (c), versión 7.5.2S.
  44. STATISTIX. (1985-2003). Analytical Software, versión 8.0.
  45. Suquilanda V., M. B. (Junio, 2001). *Alternativas orgánicas en floricultura*. [Revista en línea], 6. Revista Cultivos Controlados. Volumen 3. Disponible: [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/organicos\\_ecuador/flores\\_organicas.htm](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/productos%20para%20invertir/organicos/organicos_ecuador/flores_organicas.htm) . [Consulta: 2006, Marzo 20].
  46. Urbáez, V. (2003). *Factibilidad técnica para la extracción de aceite esencial de orégano empleando CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico*. [Trabajo de Grado]. Universidad de Carabobo, Facultad de Ingeniería. Valencia, Venezuela.
  47. Varela, L. F., (1994). *Variables tecnológicas involucradas en la producción de mango (Manglífera indica L.) para exportación en el estado Aragua*. [Trabajo de Grado]. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.
  48. Vélez S., F. (1982). *Plantas medicinales de Venezuela*. INAGRO. Caracas, Venezuela.
  49. Ware, G. W. y Whitacre, D. M. (2004). *Introducción a los insecticidas (4ª edición)*. [Documento en línea]. (6a. ed.). Ohio, EE.U.U. Disponible: <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/spchapters/w&winsectsp.htm>. [Consulta: 2003, Febrero 23].

50. Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Shaokun, T. y Can, Q. (2005). *Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods*. [Resumen]. *Food Chemistry* 101(4), 1558-1564. [Consulta: 2006, noviembre 7].
51. Yang, Y., Lee, S., Lee, W., Choi, D. y Ahn, Y. (Agosto, 2003). *Ovicidal and aduticidal effects of Eugenia caryophyllata bud and leaf oil compounds on Pediculus capitis*. [Resumen]. *Agric Food Chem* 51 (17) 4884-4888. Universidad Chonbuk National. Chonju, Republic of Korea. [Consulta: 2006, Abril 29].

# **ANEXOS**

**Tabla A.1. Prueba *t* para la técnica de extracción por hidrodestilación y por arrastre con vapor húmedo**

Parámetros	Hidrodestilación	Vapor Húmedo
Media	1,0336	0,1146
Varianza	0,0706	0,0044
Observaciones	5	5
Grados de libertad	4	4
F	16,0706	
Estadístico <i>t</i>	7,5038	
Desviación estándar	0,2657	0,0663

**Tabla A.2. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis del programa Statistix 8.0 aplicada en los tratamientos atrayentes**

TRATAMIENTO	GRUPOS HOMOGÉNEOS	TAMAÑO DE LA MUESTRA
PedGo Plus®	A	8
FAGRO-UCV-10®	AB	8
Agua potable	AB	8
Eugrenca	B	8
<b>Total</b>	-	32
Kruskal-Wallis Statistic	15,3254	

**Tabla A.3. Prueba de Hartley aplicada a la mortalidad de la población total de *A. obliqua* para los intervalos de tiempo (24h y 48h)**

Tiempo (h)	Varianzas ( $S^2$ )
24	1,916
48	1,958
<b>FMáx<sub>cal</sub></b>	1,021



**Tabla A.4.a Análisis Probit del programa SPSS 7.5.2S para la población total (Hembras + Machos) a las 24 horas**

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

DATA Information

12 unweighted cases accepted.  
 2 cases rejected because of missing data.  
 3 cases are in the control group.  
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Natural Response rate to be estimated

The number of subjects in the CONTROL group 60,0  
 The number of responses in the CONTROL group 4,0

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 17 iterations.  
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
TTO	4,27505	0,64421	6,63610
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-3,83063	0,64950	-5,89786

Estimate of Natural Response Rate = 0,051093 with S.E. = 0,02886  
 Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 9,703 DF = 9 P = 0,375

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

-----

Covariance(below) and Correlation(above) Matrices of Parameter Estimates

	TTO	NAT RESP
TTO	0,41501	0,20873
NAT RESP	0,00388	0,00083

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Observed and Expected Frequencies

TTO	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Prob
0,00	20,0	0,0	1,023	-1,023	0,05116
0,00	20,0	2,0	1,023	0,977	0,05116
0,00	20,0	1,0	1,023	-0,023	0,05116

0,75	20,0	5,0	6,026	-1,026	0,30128
0,75	20,0	5,0	6,026	-1,026	0,30128
0,75	20,0	9,0	6,026	2,974	0,30128
1,05	20,0	14,0	15,136	-1,136	0,75680
1,05	20,0	16,0	15,136	0,864	0,75680
1,05	20,0	13,0	15,136	-2,136	0,75680
1,20	20,0	17,0	18,218	-1,218	0,91089
1,20	20,0	19,0	18,218	0,782	0,91089
1,20	20,0	20,0	18,218	1,782	0,91089

\* \* \* \* \* P R O B I T     A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

Confidence Limits for Effective TTO

Prob	TTO	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0,01	2,24841	1,19172	3,20243
0,02	2,60400	1,46495	3,59377
0,03	2,85823	1,66957	3,86736
0,04	3,06572	1,84186	4,08740
0,05	3,24555	1,99483	4,27604
0,06	3,40690	2,13482	4,44382
0,07	3,55495	2,26546	4,59668
0,08	3,69298	2,38904	4,73830
0,09	3,82315	2,50713	4,87118
0,10	3,94702	2,62085	4,99704
0,15	4,50409	3,14714	5,55741
0,20	5,00237	3,63621	6,05326
0,25	5,47357	4,11190	6,52016
0,30	5,93443	4,58708	6,97736
0,35	6,39605	5,07032	7,43835
0,40	6,86724	5,56820	7,91478
0,45	7,35614	6,08634	8,41864
0,50	7,87126	6,62993	8,96387
0,55	8,42245	7,20414	9,56817
0,60	9,02207	7,81468	10,25520
0,65	9,68672	8,46902	11,05769
0,70	10,44022	9,17880	12,02252
0,75	11,31925	9,96449	13,22067
0,80	12,38547	10,86425	14,76967
0,85	13,75568	11,95387	16,89318
0,90	15,69708	13,40724	20,11472
0,91	16,20569	13,77485	20,99475
0,92	16,77692	14,18239	21,99950
0,93	17,42828	14,64088	23,16551
0,94	18,18569	15,16649	24,54742
0,95	19,08978	15,78439	26,23209
0,96	20,20955	16,53697	28,36929
0,97	21,67658	17,50420	31,24982
0,98	23,79292	18,86732	35,55710
0,99	27,55579	21,21341	43,62590

**Tabla A.4.b Resultado del análisis Probit del programa SPSS 7.5.2S para la población total (Hembras + Machos) a las 48 horas**

\* \* \* \* \* P R O B I T    A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

DATA Information

12 unweighted cases accepted.  
 0 cases rejected because of missing data.  
 3 cases are in the control group.  
 0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

Natural Response rate to be estimated

The number of subjects in the CONTROL group    60,0  
 The number of responses in the CONTROL group    4,0

\* \* \* \* \* P R O B I T    A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

Parameter estimates converged after 16 iterations.  
 Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
TTO	3,99302	0,63171	6,32096
	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-3,43211	0,62670	-5,47650

Estimate of Natural Response Rate = 0,050829 with S.E. = 0,02896  
 Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 12,301 DF = 9 P = 0,197

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

Covariance(below) and Correlation(above) Matrices of Parameter Estimates

	TTO	NAT RESP
TTO	0,39906	0,18641
NAT RESP	0,00341	0,00084

\* \* \* \* \* P R O B I T    A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

Observed and Expected Frequencies

	Number of	Observed	Expected	Residual	Prob
TTO	Subjects	Responses	Responses		
0,00	20,0	0,0	1,023	-1,023	0,05113
0,00	20,0	2,0	1,023	0,977	0,05113

0,00	20,0	1,0	1,023	-0,023	0,05113
0,75	20,0	5,0	7,249	-2,249	0,36245
0,75	20,0	6,0	7,249	-1,249	0,36245
0,75	20,0	12,0	7,249	4,751	0,36245
1,05	20,0	14,0	15,740	-1,740	0,78701
1,05	20,0	16,0	15,740	0,260	0,78701
1,05	20,0	14,0	15,740	-1,740	0,78701
1,20	20,0	18,0	18,398	-0,398	0,91988
1,20	20,0	19,0	18,398	0,602	0,91988
1,20	20,0	20,0	18,398	1,602	0,91988

\* \* \* \* \* P R O B I T     A N A L Y S I S \* \* \* \* \*

Confidence Limits for Effective TTO

Prob	TTO	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
0,01	1,89201	0,90335	2,81644
0,02	2,21407	1,13238	3,18147
0,03	2,44628	1,30666	3,43796
0,04	2,63688	1,45503	3,64494
0,05	2,80281	1,58790	3,82285
0,06	2,95225	1,71037	3,98143
0,07	3,08982	1,82537	4,12616
0,08	3,21843	1,93477	4,26047
0,09	3,34004	2,03983	4,38665
0,10	3,45604	2,14147	4,50634
0,15	3,98075	2,61740	5,04079
0,20	4,45403	3,06712	5,51562
0,25	4,90466	3,51075	5,96407
0,30	5,34807	3,95958	6,40421
0,35	5,79466	4,42152	6,84882
0,40	6,25286	4,90297	7,30907
0,45	6,73063	5,40971	7,79659
0,50	7,23646	5,94726	8,32526
0,55	7,78030	6,52111	8,91310
0,60	8,37478	7,13708	9,58490
0,65	9,03701	7,80214	10,37597
0,70	9,79164	8,52671	11,33790
0,75	10,67685	9,32962	12,54941
0,80	11,75707	10,24795	14,14057
0,85	13,15490	11,35833	16,35858
0,90	15,15214	12,83962	19,78526
0,91	15,67837	13,21479	20,73201
0,92	16,27077	13,63107	21,81791
0,93	16,94801	14,09988	23,08432
0,94	17,73777	14,63802	24,59342
0,95	18,68351	15,27167	26,44437
0,96	19,85924	16,04495	28,80904
0,97	21,40654	17,04134	32,02311
0,98	23,65162	18,45037	36,88131
0,99	27,67768	20,88827	46,12868



---

**APÉNDICE A**

**MÉTODO OPERATORIO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN CON AGUA DE**

**ACEITES ESENCIALES**



## ARRANQUE POR HIDRODESTILACIÓN

1. Triturar la materia vegetal y tamizarla hasta obtener un rango de tamaño de partícula de 1-2 mm.
2. Pesar 20 g de la materia vegetal.
3. Verter en el tanque un 1L de agua.
4. Sumergir la material vegetal en el agua, distribuida al azar.
5. Colocar el tanque sobre la plancha de calentamiento y ajustarle la tapa.
6. Conectar a la tapa del tanque el conducto para la dosificación de agua, con tapón al extremo libre del conducto, y el termómetro.
7. Conectar el condensador serpentín a la trampa tipo Clevenger; a su vez conectar este al orificio de la tapa del tanque.
8. Colocar la chaqueta a la trampa de vapor justo a la salida de vapor del tanque.
9. Encender el baño térmico y hacer circular el refrigerante por el condensador, abriendo completamente la válvula de paso de refrigerante.
10. Suministrar calor al sistema, encendiendo la plancha de calentamiento y colocando el interruptor en la posición 9, e inmediatamente accionar el cronómetro.
11. Calentar 500 mL de agua en un matraz Erlenmeyer hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 50 ° C.

## ARRANQUE POR DESTILACIÓN CON VAPOR DE AGUA

1. Triturar la materia vegetal y tamizarla hasta obtener un rango de tamaño de partícula de 1-2 mm.
2. Pesar 20 g de la materia vegetal.
3. Verter en el tanque un 1L de agua.
4. Colocar la material vegetal esparcida sobre guata, en una cesta metálica, cuyo diámetro coincide con el del tanque, colocando la cesta dentro del tanque a cierta distancia del nivel del agua. *Ver recomendaciones.*
5. Colocar el tanque sobre la plancha de calentamiento y ajustarle la tapa. *Ver normas de seguridad.*



6. Conectar a la tapa del tanque el conducto para la dosificación de agua, con tapón al extremo libre del conducto, y el termómetro.
7. Conectar el condensador serpentín a la trampa tipo Clevenger; a su vez conectar este al orificio de la tapa del tanque.
8. Colocar la chaqueta a la trampa de vapor justo a la salida de vapor del tanque.
9. Encender el baño térmico y hacer circular el refrigerante por el condensador, abriendo completamente la válvula de paso de refrigerante.
10. Suministrar calor al sistema, encendiendo la plancha de calentamiento y colocando el interruptor en la posición 9, e inmediatamente accionar el cronómetro.
11. Calentar 500 mL de agua en un matraz Erlenmeyer hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 50 ° C.

### **PROCESO DE DESTILACIÓN (AMBAS TÉCNICAS)**

12. Registrar la temperatura en el tanque inmediatamente cuando cae la primera gota de destilado, seguidamente colocar el interruptor de la plancha de calentamiento en la posición establecida previamente.
13. Registrar el tiempo transcurrido desde el encendido de la plancha de calentamiento hasta la caída de la primera gota de destilado.
14. Fijar un volumen de destilado en el Clevenger, de modo que no sobrepase la capacidad de este. *Ver normas de seguridad.*
15. Recolectar el destilado una vez alcanzada la capacidad establecida previamente, abriendo la válvula de la trampa. *Ver normas de seguridad.*
16. Registrar inmediatamente el tiempo de recolección del destilado, el volumen y la temperatura del mismo.
17. Acumular el destilado en un vaso de precipitado, previamente identificado y enumerado.
18. Repetir los pasos del 16 al 18 durante 30 minutos del proceso.
19. Verter el contenido del vaso de precipitado a un embudo de decantación, con la misma identificación del vaso, inmediatamente tapar el embudo.



20. Dosificar cada media hora al tanque 120 mL de agua, precalentada como se indica en el paso 12, a través del ducto de la tapa del tanque.
21. Registrar inmediatamente la temperatura en el tanque y el tiempo de la dosificación.
22. Repetir los pasos del 16 al 22 hasta terminar el proceso de destilación.
23. Registrar la presión barométrica y la temperatura ambiental. *Ver recomendaciones.*
24. Dejar en reposo los destilados en los embudos de separación hasta observar la inmiscibilidad de las fases orgánica y acuosa, aproximadamente durante 1 h.

### **PROCESO DE SEPARACIÓN (AMBAS TÉCNICAS)**

25. Decantar la fase orgánica a un tubo de ensayo, identificado igual al embudo, desechando la fase acuosa.
26. Desechar la fase orgánica, agregando sulfato de sodio anhidro al tubo de ensayo hasta saturar la fase. *Ver recomendaciones.*
27. Repetir los pasos 26 y 27 hasta completar los embudos de separación.
28. Identificar y pesar un envase recolector del aceite esencial.
29. Separar el aceite al final del proceso de desecación, decantándolo en el envase recolector.
30. Pesar el envase lleno con aceite esencial.
31. Repetir los pasos 37 y 38 para cada tubo de ensayo con el aceite desecado.
32. Agregar al envase recolector uno o dos cristales de butilhidroxitolueno (BHT).
33. Refrigerar el aceite a una temperatura de 5 a 10 °C. *Ver recomendaciones.*

### **PARADA (AMBAS TÉCNICAS)**

34. Apagar y desenchufar los equipos, una vez culminado el tiempo de extracción.
35. Esperar que condense el vapor remanente del sistema hasta observar la ausencia de destilado.
36. Esperar que se enfríe el sistema, aproximadamente 30 minutos.
37. Desmontar el material de vidrio y lavar con suficiente agua. *Ver recomendaciones.*





## RECOMENDACIONES

1. En la destilación por vapor húmedo se debe colocar un conducto de dosificación de agua en la parte interna del tanque, de modo que apunte directamente al fondo del recipiente, para evitar el contacto del agua dosificada y la materia vegetal.
2. Asegurarse de que no queden residuos de agua durante el proceso de desecación.
3. El desecante utilizado de sulfato de sodio anhidro debe estar activado, esto es, colocado en una estufa por 24 h a 100 °C.
4. El lavado del material de vidrio se realiza cuidadosamente con suficiente agua tibia, antes y después de cada experiencia práctica.

## NORMAS DE SEGURIDAD

1. Usar implementos de seguridad personal: tapa boca, guantes, bata de laboratorio.
2. Usar guantes térmicos en el manejo de los materiales y equipos del sistema, para evitar quemaduras.
3. Conectar el condensador al Clevenger, de modo que no existan fugas en el sistema.
4. En caso de fuga en las conexiones del baño térmico y el condensador serpentín, apagar el baño y ajustar de nuevo las conexiones de las mangueras.
5. Fijar el volumen de destilado en la trampa respondiendo a la capacidad máxima de éste, evitando que el destilado retorne al tanque de agua.
6. Evitar la exposición del aceite al aire y luz, para evitar la posible degradación de los componentes del aceite.
7. Realizar la experiencia de destilación en una campana extractora de gases y en condiciones de iluminación adecuadas.



**LISTA DE CHEQUEO EN EL PROCESO DE DESTILACIÓN CON AGUA DEL ACEITE  
ESENCIAL DE CLAVO DE OLOR**

A la entrada del laboratorio	Arranque	Parada	A la salida del laboratorio
<input type="checkbox"/> Encendido de luces y del extractor de aire del laboratorio. <input type="checkbox"/> Herramientas de trabajo: <input type="checkbox"/> Tabla de recolección de datos experimentales. <input type="checkbox"/> Lápices, marcadores, borradores. <input type="checkbox"/> Agua, jabón, papel absorbente, guata. <input type="checkbox"/> Teflón, tirro, cinta adhesiva y guata. <input type="checkbox"/> Cronómetros, termómetros. <input type="checkbox"/> Inyectadoras, micropipetas. <input type="checkbox"/> Tapa bocas, bata de laboratorio, guantes térmicos. <input type="checkbox"/> Mortero, mallas micrométricas, balanzas, prensas. <input type="checkbox"/> Envases recolectores. <input type="checkbox"/> Reactivos: BHT, Sulfato de sodio anhidro. <input type="checkbox"/> Tanque de destilación.	<input type="checkbox"/> Válvulas cerradas del: <input type="checkbox"/> Baño térmico. <input type="checkbox"/> Clevenger.  <input type="checkbox"/> Posición "0" del interruptor de la plancha de calentamiento.  <input type="checkbox"/> Posición "OFF" del interruptor del baño térmico.  <input type="checkbox"/> Enchufados los equipos eléctricos: <input type="checkbox"/> Baño térmico. <input type="checkbox"/> Plancha de calentamiento.  <input type="checkbox"/> Materia vegetal tratada.  <input type="checkbox"/> Material de vidrio: <input type="checkbox"/> Vasos de precipitados 250mL. <input type="checkbox"/> Vasos de precipitados 150mL. <input type="checkbox"/> Erlenmeyer. <input type="checkbox"/> Cilindro graduado. <input type="checkbox"/> Embudo estriado. <input type="checkbox"/> Embudo de separación. <input type="checkbox"/> Condensador serpentín. <input type="checkbox"/> Clevenger.	<input type="checkbox"/> Válvulas cerradas: <input type="checkbox"/> Baño térmico. <input type="checkbox"/> Clevenger.  <input type="checkbox"/> Posición "0" del interruptor de la plancha de calentamiento.  <input type="checkbox"/> Posición "OFF" del interruptor del baño térmico.  <input type="checkbox"/> Desenchufados los equipos eléctricos: <input type="checkbox"/> Baño térmico. <input type="checkbox"/> Plancha de calentamiento.  <input type="checkbox"/> Material de vidrio limpio y seco: <input type="checkbox"/> Vasos de precipitados 250mL. <input type="checkbox"/> Vasos de precipitados 150mL. <input type="checkbox"/> Erlenmeyer. <input type="checkbox"/> Cilindro graduado. <input type="checkbox"/> Embudo de estriado. <input type="checkbox"/> Embudo de separación. <input type="checkbox"/> Condensador serpentín. <input type="checkbox"/> Clevenger.	<input type="checkbox"/> Apagado de luces y del extractor de aire del laboratorio.  <input type="checkbox"/> Orden y limpieza del área de trabajo.  <input type="checkbox"/> Materiales, reactivos, herramientas y otros insumos colocarlos en el lugar correspondiente .

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_



## APÉNDICE B

### B.1. CÁLCULOS RELEVANTES INVOLUCRADOS EN LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE *S. aromaticum*



Los siguientes ejemplos de cálculos corresponden al proceso por hidrodestilación, considerando los datos del experimento 1.

## CARACTERÍSTICAS DEL DESTILADO

- **Cálculo del volumen de destilado total**

$$V_{DT} = \sum_{i=1}^{i=n} V_{Di}$$

$V_{DT}$ : Volumen de destilado total, (mL).

$V_{Di}$ : Volumen de destilado i, (mL).

$$V_{DT} = (46,0 + 47,0 + 46,0 + \dots + 44,0 + 44,0 + 31,0) \text{ mL} \Rightarrow V_{DT} = 660 \text{ mL}; \Delta V_{DT} = 8 \text{ mL}$$

- **Caudal del destilado**

$$Q_{Di} = \frac{V_{Di}}{t_{Di}}$$

$Q_{Di}$ : Caudal del destilado i, (mL/min).

$T_{Di}$ : Tiempo de destilación i, (min).

$$Q_D = \frac{46,0 \text{ mL}}{9 \text{ min}} = 5,1 \frac{\text{mL}}{\text{min}}; \Delta Q_D = 0,6$$

- **Caudal promedio del destilado**

$$\bar{Q}_D = \frac{\left(\sum_{i=1}^n Q_{Di}\right)}{n}$$

$\bar{Q}_D$ : Caudal de destilado promedio, (mL/min)

$$\bar{Q}_D = \frac{(5,1 + 4,7 + 5,1 + \dots + 6,3 + 5,5 + 5,2) \frac{\text{mL}}{\text{min}}}{16} \Rightarrow \bar{Q}_D = 6,0 \frac{\text{mL}}{\text{min}}; \Delta \bar{Q}_D = 0,8 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$$

## RENDIMIENTO

$$R_{\text{expi}} = \frac{m_a}{m_{\text{alim}}} \times 100\%$$

$R_{\text{expi}}$ : Rendimiento experimental i, (%).

$m_a$ : Masa de aceite de esencial, (g).

$m_{\text{alim}}$ : Masa de materia vegetal alimentada, (g).

$$R_{\text{expi}} = \frac{0,781 \text{ g}}{19,995 \text{ g}} \times 100\% \Rightarrow R = 3,91 \%; \Delta R_{\text{expi}} = 0,01\%$$

- **Determinación de la masa de aceite esencial**

$$m_a = m_{LL} - m_v$$



$$m_a = 5,436\text{g} - 4,655\text{g} \Rightarrow m_a = 0,781\text{g}; \Delta m_a = 0,002\text{g}$$

## RELACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS EXPERIMENTAL Y BIBLIOGRÁFICO

$$\alpha_i = \frac{R_{exp_i}}{R_{bb}}$$

$\alpha_i$ : Relación  $i$  del rendimiento experimental con el bibliográfico, (adim).

$R_{bb}$ : Rendimiento bibliográfico, (%).

$$\alpha = \frac{3,91\%}{10\%} = 0,39; \Delta\alpha_i = 0,04$$

## DENSIDAD DEL ACEITE

$$\rho_i = \frac{m}{V}$$

$\rho_i$ : Densidad  $i$  del aceite esencial, (g/mL).

$m$ : Masa del aceite esencial, (g).

$V$ : Volumen del aceite esencial (mL).

$$\rho_i = \frac{0,5990\text{g}}{0,50\text{mL}} \Rightarrow \rho_i = 1,2 \frac{\text{g}}{\text{mL}}; \Delta\rho_i = 0,1 \frac{\text{g}}{\text{mL}}$$



**B.2. CÁLCULOS RELEVANTES INVOLUCRADOS EN LOS BIOENSAYOS DE LA  
ACTIVIDAD INSECTICIDA SOBRE MOSCAS ADULTAS DE *A. obliqua***



## POTENCIAL DE ATRACCIÓN

### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE EUGRENCA

Preparación de la solución al 5 %v/v:  $\%v/v = \frac{V_{\text{aceite}}}{V_{\text{sc}}} \times 100\%$

$V_{\text{aceite}}$ : Volumen de aceite esencial, (mL).

$V_{\text{sc}}$ : Volumen de la solución concentrada, (mL).

$$V_{\text{aceite}} = 2\text{mL} \times \frac{5\%}{100} = 0,1\text{mL} \Rightarrow V_{\text{aceite}} = (0,10 \pm 0,05)\text{mL}$$

### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN FAGRO-UCV-10<sup>®</sup>

Preparación de 2mL de solución al 5 %v/v:

$$V_{\text{comprosol}} = 2\text{mL} \times \frac{5\text{mL/mL}}{100} = 0,1\text{mL} \Rightarrow V_{\text{comprosol}} = (0,10 \pm 0,05)\text{mL}$$

### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PedGo Plus<sup>®</sup>

Preparación de 10mL de solución al 9 %m/v:  $\%m/v = \frac{m_{\text{PedGo}}}{V_s} \times 100\%$

$m_{\text{PedGo}}$ : Masa de PedGo Plus<sup>®</sup>, (g).

$V_s$ : Volumen de la solución, (mL).

$$m_{\text{PedGo}} = V_s \times \frac{\%m/v}{100} \Rightarrow m_{\text{PedGo}} = 10\text{mL} \times \frac{9\text{g/mL}}{100} = 0,9\text{ g}$$

### MOSCAS ATRAÍDAS CONTABILIZADAS

$$\%Atrac_i = \left( \frac{M_{\text{atraídas}}}{M_{\text{total}}} \right) \times 100\%$$

$\%Atrac_i$ : Porcentaje de atracción de las moscas a las formulaciones, (%).

$M_{\text{atraídas}}$ : Cantidad de moscas atraídas a la microcelda, (adim).



$M_{total}$ : Cantidad total de moscas introducidas en la celda, (adim).

Contaje de las moscas hembras atraídas por PedGo Plus® a las 12h

$$\%Atrac_H = \left( \frac{2}{30} \right) \times 100\% \Rightarrow \%Atrac_H = 6,67\%$$

## APLICACIÓN TÓPICA

### PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONCENTRADA DE EUGRENCA

Preparación de 2 mL de solución al 16 %v/v  $V_{aceite} = 2\text{mL} \times \frac{16\%}{100} = 0,32\text{mL}$

### PREPARACIÓN DEL GRUPO DE DISOLUCIONES

$$V_{sc} = \frac{C_d}{C_{sc}} \times V_d$$

$C_{sc}$ : Concentración de la solución concentrada de aceite esencial, (%).

$V_d$ : Volumen de la solución diluida, (mL).

$C_d$ : Concentración de la solución diluida de aceite esencial, (%)

Para la concentración de la solución diluida al 11 %v/v

$$V_{sc(16\%)} = \frac{110000\text{ppm}}{160000\text{ppm}} \times 2\text{mL} = 1,38\text{mL}$$

Corrección de la concentración de la disolución

$$C_d = \frac{C_{sc} \times V_{sc}}{V_d} \Rightarrow C_d = \frac{160000\text{ppm} \times 1,40\text{mL}}{2\text{mL}} = 112.000 \text{ ppm}$$

### MOSCAS MUERTAS CONTABILIZADAS

$$\%Mort_i = \left( \frac{M_{muertas}}{M_t} \right) \times 100\%$$





%Mort<sub>i</sub>: Porcentaje de mortalidad de moscas en el tratamiento i, (%).

M<sub>muertas</sub>: Cantidad de moscas muertas en el tratamiento i, (adim).

M<sub>t</sub>: Cantidad total de moscas introducidas en la jaula de susceptibilidad, (adim).

Contaje de las moscas hembras (H) muertas en T<sub>5</sub> (16000ppm) a las 24h

$$\%Mort_{H(T_5)} = \left( \frac{9}{10} \right) \times 100\% \Rightarrow \%Mort_{H(T_5)} = 90,00\%$$



## APENDICE C

### C.1 DATOS OBTENIDOS EN LOS PROCESOS DE EXTRACCIÓN DE *S. aromaticum*



**Tabla C.1.** Rendimiento acumulado del proceso de extracción de *S. aromaticum* obtenido por hidrodestilación

Experimento	Tiempo de destilación ( $t_D \pm 1$ ) min	Masa acumulada del aceite esencial ( $m_a \pm 0,002$ ) g	Rendimiento acumulado del proceso ( $R \pm 0,01$ )%
1	30	0,582	2,91
	60	0,781	3,91
2	30	0,960	4,80
	60	1,006	5,03
3	30	0,820	4,10
	60	1,025	5,12
4	90	1,091	5,45
	30	1,088	5,43
4	60	1,370	6,84
	90	1,453	7,25
5	30	0,712	3,97
	60	0,747	4,14

**Tabla C.2.** Rendimiento acumulado del proceso de extracción de *S. aromaticum* obtenido por arrastre con vapor de agua

Experimento	Tiempo de destilación ( $t_D \pm 1$ ) min	Masa acumulada del aceite esencial ( $m_a \pm 0,002$ ) g	Rendimiento acumulado del proceso ( $R \pm 0,01$ )%
6	30	0,127	0,63
	60	0,194	0,97
7	30	0,084	0,42
	60	0,141	0,70
8	30	0,101	0,50
	60	0,243	0,71
9	30	0,020	0,10
	60	0,028	0,14
10	30	0,067	0,331



**Tabla C.3.** Relación del rendimiento bibliográfico y el obtenido por hidrodestilación en el proceso de extracción de *S. aromaticum*

Experimento	Masa de materia vegetal alimentada ( $m_{alim} \pm 0,001$ ) g	Masa del aceite esencial ( $m_a \pm 0,002$ ) g	Rendimiento del proceso ( $R \pm 0,01$ )%	Relación entre rendimientos ( $\alpha$ )*
1	19,995	0,781	3,91	0,39
2	20,001	1,006	5,03	0,50
3	20,020	1,091	5,45	0,54
4	20,038	1,453	7,25	0,73
5	20,217	0,837	4,14	0,41
Promedios	20,054	1,034	5,16	0,52

\* Rendimiento bibliográfico 10%

**Tabla C.4.** Relación del rendimiento bibliográfico y el obtenido por arrastre con vapor de agua en el proceso de extracción de *S. aromaticum*

Experimento	Masa de materia vegetal alimentada ( $m_{alim} \pm 0,001$ ) g	Masa del aceite esencial ( $m_a \pm 0,002$ ) g	Rendimiento del proceso ( $R \pm 0,01$ )%	Relación entre rendimientos ( $\alpha$ )*
6	20,001	0,194	0,97	0,10
7	20,001	0,141	0,70	0,07
8	20,127	0,143	0,71	0,07
9	20,357	0,028	0,14	0,01
10	20,229	0,067	0,33	0,03
Promedios	20,143	0,115	0,57	0,06

\* Rendimiento bibliográfico 10%



**Tabla C.5.** Dosificación de agua precalentada al proceso de extracción de *S. aromaticum* por hidrodestilación

Experimento	Agua dosificada		
	Volumen ( $V_A \pm 15$ ) mL	Temperatura ( $T_A \pm 0,5$ ) °C	Temperatura en el tanque ( $T_T \pm 1$ ) °C
1	120	50,0	96
2	120	51,0	96
3	120	53,0	96
4	120	50,0	96
5	120	52,0	96

**Tabla C.6.** Dosificación de agua precalentada al proceso de extracción de *S. aromaticum* por arrastre con vapor de agua

Tiempo de destilación ( $t_D \pm 1$ ) min	Agua dosificada		
	Volumen ( $V_A \pm 15$ ) mL	Temperatura ( $T_A \pm 0,5$ ) °C	Temperatura en el tanque ( $T_T \pm 1$ ) °C
6	120	50,0	96
7	120	49,0	96
8	120	49,0	96
9	120	51,0	96
10	120	51,0	96



**C.2. DATOS OBTENIDOS EN LOS BIOENSAYOS DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA  
DEL ACEITE DE CLAVO SOBRE MOSCAS ADULTAS DE *A. obliqua***



**Tabla C.7.a.** Conteo de moscas adultas de *A. obliqua* atraídas hacia las diferentes formulaciones atrayentes

Tratamiento	R <sub>1</sub>						R <sub>2</sub>					
	12h			24h			12h			24h		
	H	M	H+M	H	M	H+M	H	M	H+M	H	M	H+M
T <sub>1</sub>	0	2	2	0	1	1	1	0	1	2	0	2
T <sub>2</sub>	2	2	4	3	1	4	3	3	6	4	3	7
T <sub>3</sub>	0	1	1	1	1	2	0	2	2	0	3	3
T <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

T<sub>1</sub>: Testigo (agua)  
T<sub>2</sub>: PedGo Plus al 9%  
T<sub>3</sub>: FAGRO-UCV-10<sup>®</sup> al 5%  
T<sub>4</sub>: Eugrenca al 5%

**Tabla C.7.b.** Conteo de moscas adultas de *A. obliqua* atraídas hacia las diferentes ofertas de formulaciones atrayentes

Tratamiento	R <sub>3</sub>						R <sub>4</sub>					
	12h			24h			12h			24h		
	H	M	H+M	H	M	H+M	H	M	H+M	H	M	H+M
T <sub>1</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
T <sub>2</sub>	0	1	1	0	1	1	10	10	20	10	10	20
T <sub>3</sub>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
T <sub>4</sub>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1

T<sub>1</sub>: Testigo (agua)  
T<sub>2</sub>: PedGo Plus al 9%  
T<sub>3</sub>: FAGRO-UCV-10<sup>®</sup> al 5%  
T<sub>4</sub>: Eugrenca al 5%

**Tabla C.8.** Porcentaje promedio de atracción de moscas adultas de *A. obliqua* hacia las diferentes formulaciones atrayentes a las 12 y 24 horas

Tratamiento	12h			24h		
	H	M	H+M	H	M	H+M
Agua potable	0,83	1,67	1,25	1,67	1,67	1,67
PedGo Plus 9%	12,50	13,33	12,92	14,17	12,50	13,33
FAGRO-UCV-10 5%	0,00	2,50	1,25	0,83	4,17	2,50
Eugrenca 5%	0,83	0,00	0,42	0,83	0,00	0,42



**Tabla C.9.** Morbilidad de moscas adultas de *A. obliqua* susceptibles a las concentraciones de aceite esencial de clavo de olor por aplicación tópica

Tratamiento	R <sub>1</sub>						R <sub>2</sub>						R <sub>3</sub>					
	24h			48h			24h			48h			24h			48h		
	H	M	H+ M	H	M	H+ M	H	M	H+ M	H	M	H+ M	H	M	H+ M	H	M	H+ M
T <sub>1</sub>	0	2	2	0	2	2	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
T <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	2	2	0	1	1	0	1	1
T <sub>3</sub>	3	2	5	3	2	5	3	2	5	3	3	6	5	4	9	5	7	12
T <sub>4</sub>	5	9	14	5	9	14	7	9	16	7	9	16	6	7	13	7	7	14
T <sub>5</sub>	9	8	17	9	9	18	1	0	9	19	1	0	9	19	1	0	1	20

T<sub>1</sub>: acetona + BHT

T<sub>2</sub>: Solución de Eugrenca al 1,01%

T<sub>3</sub>: Solución de Eugrenca al 5,60%

T<sub>4</sub>: Solución de Eugrenca al 11,20%

T<sub>5</sub>: Solución de Eugrenca al 16,00%





**Tabla C.10.** Porcentaje de morbilidad de moscas adultas de *A. obliqua* susceptibles a las concentraciones de aceite esencial de clavo de olor por aplicación tópica

Tratamiento	R <sub>1</sub>			R <sub>2</sub>			R <sub>3</sub>											
	24h		48h	24h		48h	24h		48h									
	H	M	H+ M	H	M	H+ M	H	M	H+ M	H	M	H+ M	H	M	H+ M			
T <sub>1</sub>	0	2 0	10	0	2 0	10	1 0	0	5	1 0	0	5	1 0	0	5	1 0	0	5
T <sub>2</sub>	0	0	0	0	0	0	0	2 0	10	0	2 0	10	0	1 0	5	0	1 0	5
T <sub>3</sub>	3 0	2 0	25	3 0	2 0	25	3 0	2 0	25	3 0	3 0	30	5 0	4 0	45	5 0	7 0	60
T <sub>4</sub>	5 0	9 0	70	5 0	9 0	70	7 0	9 0	80	7 0	9 0	80	6 0	7 0	65	7 0	7 0	70
T <sub>5</sub>	9 0	8 0	85	9 0	9 0	90	1 0	9 0	95	1 0	9 0	95	1 0	1 0	10 0	1 0	1 0	10 0

T<sub>1</sub>: acetona + BHT  
T<sub>2</sub>: Eugrenca al 1,01%  
T<sub>3</sub>: Eugrenca al 5,60%  
T<sub>4</sub>: Eugrenca al 11,20%  
T<sub>5</sub>: Eugrenca al 16,00%