

# Actividad insecticida del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb y sus componentes

Jairo Calle Álvarez\*, Ana María Espinosa, Claudia Patricia Núñez, Edgar Bautista y Roberto Pinzón

## Resumen

Por medio de análisis preliminares en CCD del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb, se determinó la presencia de terpenos, cetonas, alcoholes, fenoles y ácidos. Por análisis de CG/EM de la fracción fenólica del aceite se identificaron 4 compuestos: timol (6.2%), carvacrol (3.5%), diosfenol e isoeugenol (0.9%) y en la fracción terpénica 10: pulegona (30.2%), mentona (29.2%), cariofileno (5.0%), linalol, mentol, isopulegol, piperitona, verbenona, carvomentona y cadineno.

La actividad insecticida del aceite esencial, mentona, pulegona, cariofileno y las fracciones terpénica y fenólica fueron ensayados con los métodos de contacto forzado, ingestión, repelencia, superficie tratada, aspersión e inmersión frente a dos insectos plaga: *Acanthoscelides obtectus* (Say) e *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Por los métodos evaluados se demostró que el aceite esencial, la mentona, pulegona, cariofileno y las fracciones terpénica y fenólica tienen actividad insecticida. Por el método de contacto forzado se encontró que la actividad insecticida del aceite esencial es mayor que los compuestos aislados y las fracciones terpénica y fenólica a una concentración 0.10%.

**Palabras clave:** Aceite esencial – Actividad insecticida – Terpenos - *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb.

## Summary

### Insecticide activity of essential oil obtained from *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb and its components

The chemical composition of the oil determinate by TLC was: terpenes, ketones, phenols and acid. By means of GC/MS of phenol fraction, 4 compounds were identified: thymol (6.2%), carvacrol (3.5%), diosphenol, and isoeugenol (0.9%) and 10 in the terpene fraction: pulegone (30.3%), menthone (29.2%), caryophyllene (5.0%), linalool, menthol, isopulegol, piperitone, verbenone, carvomenthone and cadinene.

The insecticidal activity of the esencial oil, menthone, pulegone, caryophyllene and terpene and phenol fraction were assayed by the direct forced contact, ingestion, immersion, aspersion, superficial and repellence methods against two insects: *Acanthoscelides obtectus* (Say) and *Hypothenemus hamperi* (Ferrari). The essential oil, menthone, pulegone, caryophyllene and terpene and phenol fraction showed insecticidal activity. By direct forced contact method the essential oil showed have more insecticidal activity that pure compounds or terpene and phenol fractions at a concentration of 0.10%.

**Key words:** Essential oil – Terpens – Insecticidal activity - *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb.

\* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A.14490, Bogotá, D.C., Colombia.  
E-mail: jacalle@etb.net.co

## Introducción

*Acanthoscelides obtectus* (Say), gorgojo de fríjol produce alrededor del 4% de pérdidas en las cosechas del fríjol; el *Hypothenemus hampei* (Ferrari), broca del café, ataca los cafetales perforando y dañando los granos maduros, lo cual afecta notablemente la producción del grano, siendo estos insectos de suma importancia económica para el país por los efectos perjudiciales que producen (1). Los insecticidas químicos han sido usados desde hace mucho tiempo para control de cosechas, contaminado el medio ambiente y a la vez produciendo efectos indeseables en animales y en el hombre. Debido al uso irracional de los insecticidas sintéticos los insectos plaga han generado resistencia, haciendo más compleja su erradicación (2).

En años recientes se ha iniciado la búsqueda de bioinsecticidas para el control estratégicos de pestes (2). Los aceites esenciales de algunas plantas han mostrado tener propiedades insecticidas (3,4). El aceite esencial de *Cleome hirta* se evaluó contra los parásitos del ganado (*Rhipicephalus appendiculatus*) y como repelente del gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamis*) (5). Se ha comprobado la actividad insecticida de 21 aceites esenciales por administración tópica sobre en larvas de tercer instar de *Spodoptera liturata* que atacan las hojas del tabaco (6).

La planta *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb se encuentra diseminada en forma silvestre en varios países de América del Sur, Bolivia, Argentina, Perú y Colombia. Se le conoce con los nombres vulgares de cruz de muña o martín muña y es empleada como condimento, insecticida, vermífugo y para proteger los productos agrícolas almacenados, especialmente en el brotamiento de la papa (7). En Colombia crece a una altitud de 1520 a 3000 m.s.n.m y se le conoce con el nombre vulgar de orégano de monte y muña; se emplea como condimento para sazonar la carne de cerdo entre otros usos ya citados.

## Metodología

### Material vegetal

La planta de *Mintostachys mollis* (HBK) Griseb fue colectada en Ubaque, Departamento de Cundinamarca, a una altura de 1700 m.s.n.m y clasificada en el Herbario Nacional de Colombia, donde en sus archivos reposa un ejemplar bajo el número 357882.

### Aislamiento del aceite esencial

Las partes aéreas de la planta se sometieron a destilación con arrastre de vapor de agua. El destilado se extrajo con éter etílico, se filtró sobre sulfato de sodio anhidro, el solvente se evapóro obteniéndose un aceite esencial (2%).

El aceite esencial se sometió a ensayos preliminares por CCD para la identificación de alcoholes, terpenos, ácidos carboxílicos y compuestos carbonílicos y fenólicos empleando diferentes reveladores específicos para estos compuestos: ácido fosfomolíbdico, vainillina-ácido ortofosfórico, verde de cromocresol, 2-4-dinitrofenilhidrazina, *Fast Blue* y 2,6-dicloroquinonclorimida, respectivamente (8,9).

A partir del aceite esencial se obtuvieron tres fracciones; fenólica, terpéنية y ácida, siguiendo la metodología para tales propósitos descrita por Calle y Ferreira (10). La fracción terpéنية fue sometida a cromatografía en columna sobre Gel de Sílice G (0.05-0.2mm). La elución se hizo por gradiente con hexano 100% terminando con cloruro de metileno 100%, recolectándose 3450 fracciones de 5 mL. El control de la columna se hizo por CCD reagrupando las fracciones de acuerdo a los colores de las manchas luego de reveladas y sus Rf. La pureza de los componentes aislados fue determinados por cromatografía de gases (11), para lo cual se empleó un cromatógrafo Fraction 290, 2900 SERIES, con una columna

capilar de 100 m y con detector de ionización de llama. Como gas de arrastre se empleo nitrógeno a una presión de 2 PSI, bajo el siguiente programa de temperatura:  $T_1: 50^\circ\text{C}$ ,  $R_1: 4^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $T_2: 100^\circ\text{C}$ ,  $R_2: 2^\circ\text{C}/\text{min}$  y  $T_3: 190^\circ\text{C}$ , temperatura del inyector:  $200^\circ\text{C}$  y del detector:  $200^\circ\text{C}$ , velocidad del flujo: 3 mL/min, el corrido de la CG se hizo inyectando muestras de 0.2  $\mu\text{L}$  de concentración 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El porcentaje de mentona, pulegona y cariofileno se establecieron por el método de área normalizada (11). La fracción fenólica fue analizada por CG/EM preparando la muestra en n-Hexano en una concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e inyectando 0.2  $\mu\text{L}$ . El programa de temperatura empleado para este análisis fue igual al anterior, el espectrómetro de masas fue un VG Biotechs Trio 2000, impacto electrónico 70eV, cromatógrafo Hewlett Packard 5890 series II, columna UCOM HB5 de 100 m. La estructura química de los principales compuestos de la fracción terpénica se confirmó por RMN  $^1\text{H}$ , en un equipo JEOL 90 MHz, las muestras de los compuestos se disolvieron en  $\text{CDCl}_3$  y como referencia interna se usó TMS.

## Actividad insecticida

### Insectos

El *A. obtectus* (Say), gorgojo del fríjol, se mantuvo en el laboratorio de granos almacenados en la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, en una cámara climatizada a  $26^\circ\text{C}$  y 70% de humedad (12,13). El *H. hampei* se mantuvo en ambiente húmedo colocándole papel de filtro humedecido con agua destilada estéril y como sustrato alimenticio café Pergamino seco con 45% de humedad (14).

### Evaluación de la actividad insecticida por el método de contacto forzado

Por medio de este ensayo se evaluó la actividad insecticida del aceite esencial, las fracciones terpénica, fenólica, ácida y pulegona y mentona en concentración de 0.10% frente a *A. obtectus* (Say). Para esto se colocó 1 mL de las soluciones a evaluar disueltas en cloruro de metileno en una caja de Petri de 9 cm de diámetro. Una vez evaporado el disolvente se depositaron 25 insectos adultos jóvenes. Los insectos muertos se contaron a las 3, 48 y 96 horas. Este ensayo se repitió cuatro veces y como blanco se evaluó el efecto del cloruro de metileno. La pulegona se evaluó frente a *A. obtectus* (Say) a diferentes concentraciones (0.01%, 0.05%, 0.10% y 0.25%) a 3, 24, 48, 72 y 96 horas utilizando la metodología anteriormente expuesta.

### Evaluación de la actividad insecticida por el método de ingestión

Para este ensayo se prepararon diluciones del aceite esencial en concentraciones de 0.1, 0.05 y 0.01 % en cloruro de metileno. 100 granos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) se sumergieron en 50 mL de estas diluciones por 10 minutos. Posteriormente los granos se retiraron y se mantuvieron a temperatura ambiente por espacio de 12 horas para asegurar la total evaporación del disolvente. Los granos impregnados se colocaron en frascos apropiados con 25 insectos jóvenes de *A. obtectus* (Say) en cámara climatizada. Se contaron los insectos muertos a las 8, 24, 32, 48, 72 y 96 horas. Al cabo de 96 horas se tomaron 10 granos de cada uno de los tratamientos para determinar la presencia de huevos, larvas, pupas y adultos. Cada experimento se repitió cuatro veces.

### Actividad insecticida por el método de repelencia

Este experimento se llevó en el aparato para evaluación de repelencia (Figura 1). Una esponja de 4-5 mm de largo se coloco en cada recipiente lateral, llamado satélite. Una de las esponjas fue impregnada con 25  $\mu$ L de aceite esencial, metona o pulegona y la otra con el control sin tratar (4). Cinco granos de frijol fueron adicionados en cada recipiente lateral y un insecto adulto *A. obtectus* (Say) fue depositado en la parte central. Después de 48 horas se observó hacia cual satélite migró el insecto, el procedimiento se repitió 30 veces para obtener una validez estadística.

### Evaluación de la actividad insecticida por el método de superficie tratada

En este método se evaluó la actividad insecticida de aceite esencial, pulegona, mentona y cariofileno sobre la broca del café (*H. hampei*). Se prepararon emulsiones en agua en concentraciones de 1.0%, 0.75%, 0.50% y 0.25% para el aceite esencial y de 0.5 y 0.25% para los compuestos pulegona, mentona y cariofileno. Se colocó un papel de filtró estéril impregnado con 1 mL de la solución o emulsión a ensayar en una caja de petri de 9 cm de diámetro previamente esterilizada. La caja de Petri se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos. En cada caja se colocaron 10 brocas adultas previamente desinfectadas con solución de hipoclorito de

sodio al 0.5% por 10 minutos, observándose la mortalidad de los insectos a las 2, 18 y 24 horas (14,15). Cada experimento se repitió cuatro veces.

### Evaluación de la actividad insecticida por el método de inmersión

El ensayo fue utilizado frente a *H. hampei*. Para esto se prepararon 10 mL de aceite emulsionado con agua mediante agitación en concentraciones de 0.5 y 0.25%. Las brocas del café se colocaron en 10 mL de la emulsión por dos minutos, seguidamente los insectos se colocaron por separado en frasco vial, observándose la mortalidad a las 72 horas. Cada experimento se repitió cuatro veces (16).

### Actividad insecticida por el método de aspersión

Las brocas del café se asperjaron con 1 mL de emulsión de 0.5 y 0.25% del aceite esencial en agua usando un equipo especial llamado Torre Potter. Los insectos *H. Hampei* tratados se colocaron en viales individuales, observándose la mortalidad a las 72 horas. Cada experimento se repitió cuatro veces.

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente por medio de un análisis de varianza y la prueba múltiple de Duncan. El promedio de insectos muertos se expresaron en términos de porcentaje y a este valor se le hizo una corrección de acuerdo a la fórmula de Abbot:  $\%Mc = [(\%Me - \%Mt) / (100 - \%Mt)] \times 100$ , donde  $Mc$ : mortalidad corregida,  $Me$ : Mortalidad en el ensayo y  $Mt$ : mortalidad en el testigo absoluto.

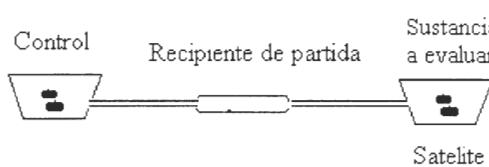


Figura 1. Aparato para evaluación de repelentes.

## Resultados y discusión

Por destilación con arrastre de vapor de las partes aéreas de *M. mollis* (HBK) Griseb, se obtuvo un aceite esencial (2%). Las constantes fisicoquímicas de aceite fueron: gravedad específica: 0.9268 g/mL, índice de refracción: 1.4733, índice de acidez: 5.14 mg de KOH, índice de ésteres: 9.68 mg de KOH e índice de saponificación: 15.01 mg de KOH. Los ensayos preliminares de CCD indicaron la presencia de terpenos, cetonas, alcoholes, fenoles y ácidos en el aceite esencial.

Por medio de la técnica de normalización de áreas en cromatografía de gases se determinó que el aceite contiene un 29.8% de mentona y 30.3% de pulegona. Estos dos compuestos son los componentes mayoritarios del aceite esencial de *M. mollis* ya que constituyen el 60% de su composición porcentual.

A partir del aceite esencial obtuvieron tres fracciones, la terpénica (82.93%), la fenólica (16.81%) y la ácida (0.26%). Por análisis de CG/EM se identificaron 14 compuestos, cuatro en la fracción fenólica: timol (6.2%), carvacrol (3.5%), diosfenol (3.5%) e isoeugenol (0.9%) y en la fracción terpénica 10 compuestos: pulegona (30.3%), mentona (29.2%), cariofileno (5.0%), linalool, mentol, isopulegol, piperitona, verbenona, carvomentona y cadineno. Por CC se lograron aislar los tres componentes principales pulegona (30.2%), mentona (29.2%) y cariofileno (5%) y las estructuras químicas de la pulegona y la mentona se confirmaron por RMN <sup>1</sup>H.

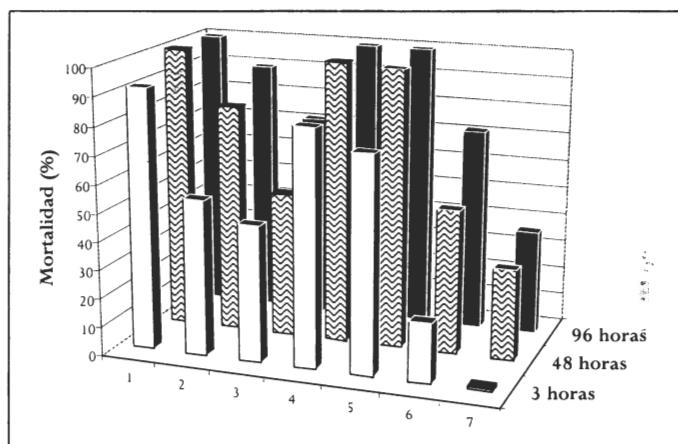


Figura 2. Mortalidad de *Acanthoscelides obtectus* (Say) por el método de contacto forzado. 1: Aceite esencial, 2: Fracción ácida, 3: Fracción fenólica, 4: Fracción terpénica, 5: Pulegona, 6: Mentona y 7: Cariofileno.

## Evaluación de la actividad insecticida

### Método de contacto forzado

Los resultados de la Figura 2 muestran que la mayor mortalidad de *A. obtectus* (Say) por medio de este método se logró frente al aceite esencial. De las fracciones evaluadas la terpénica presentó mayor actividad insecticida que la fenólica y la ácida. De los compuestos aislados la pulegona produjo mayor mortalidad del *A. Obtectus* (Say) que la mentona y el cariofileno. El hecho que el aceite esencial produzca la mayor actividad insecticida que las fracciones o componentes aislados de él, puede explicarse porque posiblemente existe un sinergismo entre los diferentes compuestos presentes. En la Figura 2 se ve que el porcentaje de mortalidad producido por la fracción terpénica y la pulegona es similar, lo que puede indicar que la mortalidad producida por la fracción terpénica se debe principalmente a la presencia de la pulegona, que es uno de los compuestos principales (30.3%) de esta fracción.

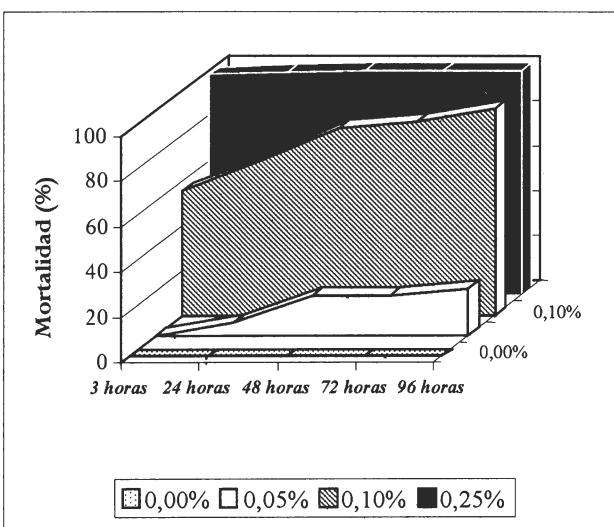


Figura 3. Mortalidad de *Acanthoscelides obtectus* (Say) por el método de contacto forzado frente a la pulegona.

En la Figura 3 se observa la mortalidad a través del tiempo de *A. obtectus* (Say) por el método de contacto forzado frente a la pulegona, en concentraciones de 0.25, 0.1, 0.05 y 0.01%. En esta figura se puede comprobar que la actividad insecticida es proporcional a la concentración de la pulegona. Con respecto al tiempo, estos cambios no son muy marcados y por lo tanto la variable concentración resulta más significativa que el tiempo de contacto.

#### Método de ingestión

En la Tabla 1 se muestran los resultados del conteo de huevos, larvas y adultos de *A. obtectus* (Say) obtenidos por el método de ingestión aplicando el aceite esencial. Los datos demuestran de manera concluyente que en los granos de fríjol así tratados no hubo presencia de oviposición.

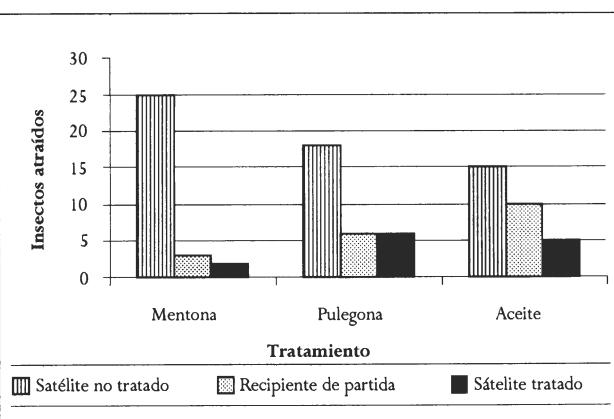


Figura 4. Resultados del ensayo de repelencia de *Acanthoscelides obtectus* (Say) atraídos por el método de repelencia.

#### Método de repelencia

En la Figura 4 se presentan los resultados del ensayo de repelencia que demuestran de manera contundente que el insecto *A. obtectus* es atraído por el aceite esencial, la pulegona y mentona, siendo la mentona el compuesto que demostró tener mayor efecto atractante que las otras sustancias evaluadas.

Tabla 1. Resultados del conteo de huevos, larvas y adultos de *A. obtectus* (Say) obtenidos por el método de ingestión aplicando el aceite esencial.

	Blanco solvente	Aceite esencial
Huevos	111	0
Larvas	102	0
Adultos	93	0

### Método de superficie tratada

Los resultados obtenidos por este método según la Figura 5 demuestran que a una concentración de 0.5% del aceite esencial emulsificado, la mortalidad de *H. hampei* es total después de 24 horas. Empleando este mismo método, en la Figura 5 se observó que pulegona tiene una mayor actividad insecticida frente a *H. hampei* que la mentona y el cariofileno.

### Método de inmersión

En la Figura 6, se puede observar que por el método de inmersión y después de 72 horas de evaluación a una concentración de 0.5% del aceite esencial emulsificado, la mortalidad promedio del insecto *H. hampei* es de 77.5% y de 27.5% a una concentración de 0.25%.

### Método de aspersión

La mortalidad observada de *H. hampei* por el aceite esencial a las concentraciones evaluadas, 0.5% y 0.25% por medio de este método fueron bajas, 52.0 y 15% respectivamente (Figura 6). Este método es importante para determinar la dosis que podría ser aplicada en pruebas de campo para ser usado como bioinsecticida, por lo que se sugiere que se realicen nuevos ensayos a concentraciones mayores para determinar la concentración que presente una actividad insecticida adecuada. Por medio de los análisis estadísticos se demostró que los resultados obtenidos de la actividad insecticida en los diferentes métodos son significativos y confiables.

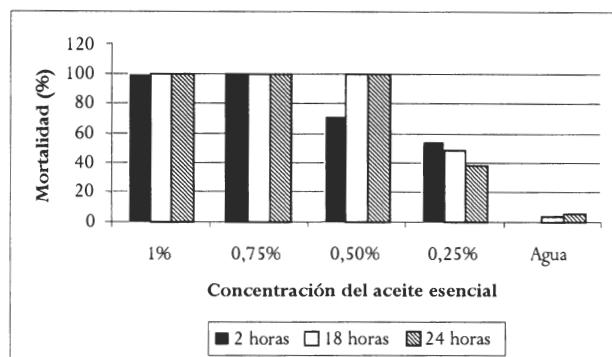


Figura 5. Mortalidad de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) frente al aceite esencial por el método de superficie tratada.

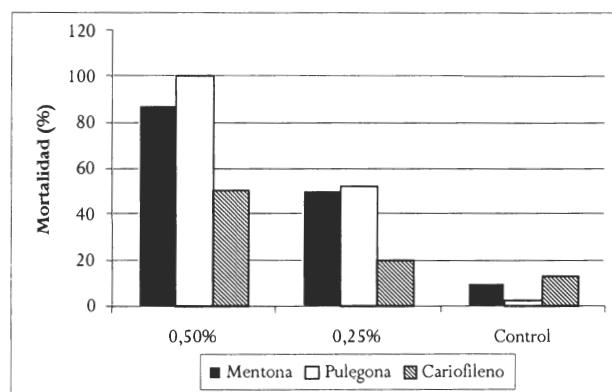


Figura 6. Mortalidad de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) frente a mentona, pulegona y cariofileno por el método de superficie tratada.

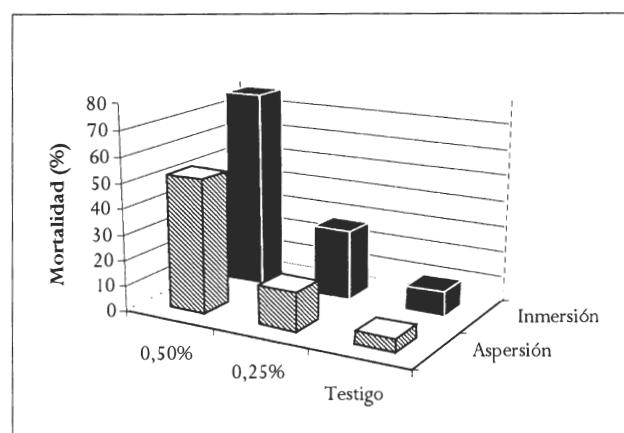


Figura 7. Mortalidad de *Hypothenemus hampei* (Ferrari) frente al aceite esencial por el método de inmersión y aspersión.

## Agradecimientos

Este estudio fue realizado como parte del proyecto “Búsqueda de principios activos en plantas medicinales colombianas” auspiciado por Colciencias, la Universidad Nacional de Colombia y CYTED , a quienes damos las gracias.

## Referencias

1. R.H. Le Pelly, “Las plagas del café”, Ediciones Labor, Madrid, 1968. pp. 140-145.
2. H.S. Hashim y K.S. Devi, Insecticidal action of the polyphenolic rich fractions from the stem bark of *Streblus asperon* *Dysdercus cingulatus*, *Fitoterapia*, **74**, 670 (2003).
3. D. Singh, S.M. Sdoiou y S. Sharma, Reproduction retardant and fumigant properties in essential oils against rice weevil (*Coleoptera cucujionidae*) in stored wheat, *J. Economic Entomol.*, **82**, 727 (1989).
4. D.C. Stamopoulos, Effect of four essential oils vapors on the composition and fecundity of *Acanthoscelides obtectus* (Say), *J. Stored Prod. Res.*, **27**, 199 (1991).
5. M.W. Ndungo, S.C. Chabra y W. Lwanve, Cleome hirta essential oil as livestock tick (*Rhicephalus appendiculatus*) and maize weevil (*Sitophilus zeamis*) repellents, *Fitoterapia*, **70**, 514 (1999).
6. B.M. Isaman, J.A. Isman y M.W. Claus, Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*, **72**, 65 (2001).
7. P.F. Hurtado, E.M. Munares y A.R. Morales, “Aceite esencial de la muña (*Mintostachys mollis*): Algunos aspectos de su extracción y utilización”. Recopilación de conferencias dictadas durante la Reunión Técnica Latinoamericana de Agroindustriales, Federación Nacional de Cafeteros, Manizales, Colombia, 1987. pp. 34-45.
8. E. Stahl, “Thin Layer Chromatography”, 2<sup>nd</sup> ed., Springer Verlag, Berlín, 1969. pp. 857-871.
9. J.B. Harbone, “Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant Analysis”, 2<sup>nd</sup> ed., Chapman and Hall, London, 1984. pp. 37-128.
10. J. Calle y S. Ferreira, Estudio fitoquímico del aceite esencial de *Piper lenticellatum* (CDC), *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **2**, 172 (1973).
11. I.B. Ramírez, E. Gaviria, S. Young y L. Morales, “Química Analítica Instrumental”, Ministerio de Educación Nacional, Bogotá. p. 1989.
12. P. Fenemore, “The Plant Pest and Their Control”, Butterworth & Co., London, 1984. pp. 172-223.
13. D. Villegas, “Aislamiento, purificación e identificación en las hojas de *Ricinus communis* L. de algunos metabolitos secundarios con actividad insecticida sobre *Sitophilus oryzae* L. en maíz almacenado”, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, 1993.
14. L. Ruiz, Investigadora Cenicafe, comunicación personal.
15. O. Yumbla y J. Torres, “Bioecología y control de la Broca del café (*H. hampei* Ferr)”, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Loja, Ecuador, 1986. pp. 6-10.
16. M.T. González, F. Posada y A. Bustillo, “Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) Vuillemin sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari)”, Memorias de XIX Congreso Socolen, Universidad de Caldas, 1992. p. 76.