

Facultad de Medicina

Escuela de Obstetricia y Puericultura

Flora chilena: Aceite esencial de la Familia Atherospermataceae y su efecto larvicida.

Tesis para obtener el grado de licenciado/a en Obstetricia y Puericultura

Profesor guía: Dr. Iván Montenegro Venegas

Profesora co-guía: Dra. Waleska Vera Quezada

Integrantes: Camila Guerrero González

Sofía Ibacache Gómez

Valery Véliz Jara

Antonella Zamora Villarroel

Viña del Mar, 2023

AGRADECIMIENTOS

Al equipo completo, por el esfuerzo y la dedicación detrás de la elaboración de los aceites esenciales, los ensayos biológicos y el comprender los contenidos necesarios para la formulación de este documento.

Al Dr. Iván Montenegro, nuestro querido tutor de tesis, quien nos guió con la información acertada en los momentos correctos, nos orientó y sumó a esta investigación, brindándonos múltiples oportunidades y conocimientos provechosos.

No puede quedar fuera la increíble profesora Dra. Waleska Vera, a quien conocimos durante la construcción de esta tesis, pero terminamos queriendo tal y como si fuera una profesora que conociéramos desde hace años. Gracias, por enseñarnos con amor, ayudarnos y tenernos paciencia infinita.

También, agradecer al Laboratorio de Química de Metabolitos Bioactivos de la Universidad de Valparaíso, por ser nuestro segundo hogar y ayudarnos desde la paciencia y el cariño. Asimismo, agradecemos al Dr. Enrique Werner del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad del Bío Bío, por su acompañamiento, su orientación y recibimiento durante el trabajo realizado en Chillán para los bioensayos.

A cada una de las personas que desde su área de trabajo aportó en diferentes momentos durante la construcción del documento: Elizabeth Sanchez del centro de biotecnología de la UTFSM por el procesamiento de las muestras, Mauricio Cuellar y Valeska Guevara de la Universidad de Valparaíso; todos quienes nos apoyaron incondicionalmente, todos aquellos que creyeron en nosotras y nos ofrecieron su guía, gracias totales.

ABREVIACIONES

°C: Grados Celsius

cm: Centímetro

D. melanogaster: *Drosophila melanogaster*

FT-IR: Espectroscopia Infrarroja-Índice de refracción

g: Gramos

GC-MS: Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

kg: Kilogramo

L. philippiana: *Laureliopsis philippiana*

L. sempervirens: *Laurelia sempervirens*

lt: Litro

mL: Mililitro

mm: Milímetro

T°: Temperatura

AE: Aceite esencial

AE 1: *L. philippiana* Chihuaín.

AE 2: *L. philippiana* Valdiviana primera muestra.

AE 3: *L. philippiana* Valdiviana segunda muestra.

AE 4: Tallos de *L. philippiana* Valdiviana. (ambas muestras)

AE 5: *L. sempervirens* primera muestra.

AE 6: Tallos de *L. sempervirens*.

AE 7: *L. sempervirens* hojas de árbol joven.

AE 8: *L. sempervirens* hojas de árbol viejo.

AE 9: *L. sempervirens* segunda muestra.

AE 10: *L. sempervirens* tercera muestra.

AE 11: *L. sempervirens* cuarta muestra.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Laureliopsis philippiana</i>	1
1.2 <i>Laurelia sempervirens</i>	5
1.3 Aceite esencial	7
2. OBJETIVOS	8
2.1 Pregunta investigativa	8
2.2 Hipótesis	8
2.3 Objetivo General	8
2.4 Objetivos específicos	8
2.4.I Analizar el aceite esencial de <i>Laureliopsis philippiana</i> y <i>Laurelia sempervirens</i> por cromatografía de gases acoplada a detección de masa.	8
2.4.II Determinar según la teoría las propiedades químicas y biológicas de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> .	8
2.4.III Estudiar el efecto larvicida del aceite esencial de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> contra <i>Drosophila melanogaster</i> .	8
3. VARIABLES	9
3.1 Tipos y clasificación de las variables	9
3.2 Operacionalización de variables	10
4. METODOLOGÍA	13
4.1 Marco conceptual	13
4.1.I Eugenol	13
4.1.II Safrol	13
4.1.III Actividad larvicida	14
4.1.IV Actividad antifúngica	14
4.1.V <i>Drosophila melanogaster</i>	15
4.1.VI Cromatógrafo de gases	16
4.1.VII Espectrometría de masas	17
4.1.VIII Destilación por arrastre de vapor	18
4.1.IX Espectroscopía infrarroja	19
4.1.X Índice de refracción	19
4.1.XI Densidad	20
4.1.XII Destilador	20
4.1.XIII Rotaevaporador	21

4.1.XIV Balanza	22
4.1.XV Embudo de filtración	23
4.1.XVI Papel filtro	23
4.1.XVII Picnómetro	24
4.1.XVIII Refractómetro	25
4.1.XIX Agua destilada	25
4.1.XX Cloruro de metileno/diclorometano	26
4.1.XXI Sulfato de magnesio anhidro	27
4.2 Material y método	28
4.3 Recolección e identificación del material vegetal	28
4.4 Extracción del aceite esencial	28
4.5 Caracterización física del aceite esencial	29
4.5.I Densitometría	29
4.5.II Índice de refracción	30
4.5.III Espectroscopia infrarroja (FT-IR)	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Obtención del aceite esencial	31
5.2 Caracterización física del aceite esencial	32
5.2.I Densitometría	32
5.2.II Índice de refracción	33
5.3 Caracterización del aceite esencial mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR)	34
5.3.1 AE 1	34
5.3.2 AE 2	36
5.3.3 AE 3	38
5.3.4 AE 4	40
5.3.5 AE 5	42
5.3.6 AE 6	44
5.3.7 AE 7	46
5.3.8 AE 8	48
5.3.9 AE 9	50
5.3.10 AE 10	52
5.3.11 AE 11	54
5.4 Caracterización química del aceite esencial mediante GC-MS	56
5.4.1 AE 1	57

5.4.2. AE 2	58
5.4.3. AE 3	59
5.4.4. AE 5	60
5.4.5. AE 7	60
5.4.6. AE 8	62
5.4.7. AE 9	63
5.4.8. AE 10	64
5.4.9. AE 11	65
5.5 Ensayos biológicos	66
6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN, FUENTES E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	72
7. DISCUSIÓN	72
8. CONCLUSIÓN	74
9. BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1A: Hojas de <i>L. philippiana</i> (2)	
Figura 1B: Flores de <i>L. philippiana</i> (3)	1
Figura 2: Árbol <i>L. philippiana</i> (5)	2
Figura 3. Árbol <i>L. sempervirens</i> (16)	5
Figura 4A. Hojas <i>L. sempervirens</i> (16)	6
Figura 4B. Frutos <i>L. sempervirens</i> (17)	6
Figura 4C. Flores <i>L. sempervirens</i> (18)	6
Figura 5. Estructura química del compuesto eugenol. 4-Allyl-2-methoxyphenol, CAS 97-53-0 (21)	13
Figura 6. Estructura química del compuesto safrol. 5-Allyl-1,3-benzodioxole, CAS 94-59-7 (23)	14
Figura 7. Unidad estructural de los terpenos, molécula de isopreno. 2-Methyl-1,3-butadiene. CAS 78-79-5 (24)	14
Figura 8A. <i>D. melanogaster</i> adulta (27)	15
Figura 8B. Huevos de <i>D. melanogaster</i> (28)	15
Figura 9. Larva de <i>D. melanogaster</i> (29)	16
Figura 10. Elementos de la cromatografía de gases (13)	17
Figura 11. Espectrómetro de masas (14)	18
Figura 12. Imagen de un destilador de agua (35)	21
Figura 13. Componentes de un evaporador rotativo (37)	22
Figura 14. Balanza analítica de precisión (39)	23
Figura 15. Embudo de filtración de vidrio (41)	23
Figura 16. Papel filtro (42)	24
Figura 17. Picnómetro de agua de 10 mL (44)	24
Figura 18. Refractómetro de mesa, utilizado habitualmente para el área química y farmacéutica (46)	25
Figura 19. Composición molecular del agua. Dihydrogen oxide. CAS 7732-18-5 (48).	26
Figura 20. Composición química del diclorometano. Methylene chloride. CAS 75-09-2 (51)	27
Figura 21. Composición química del sulfato de magnesio anhidro. magnesium;sulfuric acid. CAS 7487-88-9(53)	27
Figura 22. Espectro infrarrojo del AE 1.	34
Figura 23. Espectro infrarrojo del AE 2.	36

Figura 24. Espectro infrarrojo del AE 3.	38
Figura 25. Espectro infrarrojo del AE 4.	40
Figura 26. Espectro infrarrojo del AE 5.	42
Figura 27. Espectro infrarrojo AE 6.	44
Figura 28. Espectro infrarrojo AE 7.	46
Figura 29. Espectro infrarrojo AE 8.	48
Figura 30. Espectro infrarrojo AE 9.	50
Figura 31. Espectro infrarrojo AE 10.	52
Figura 32. Espectro infrarrojo AE 11.	54
Figura 33. Cromatograma muestra AE 1 (15 ppm). Se identifican 5 analitos, enumerados desde izquierda a derecha.	57
Figura 34. Cromatograma muestra AE 2 (15 ppm). Se identifican 60 analitos.	58
Figura 35. Cromatograma muestra AE 3 (15 ppm). Se identifican 5 analitos, enumerados desde izquierda a derecha.	59
Figura 36. Cromatograma muestra AE 5 (15 ppm). Se identifica 1 analito.	60
Figura 37. Cromatograma muestra AE 7 (15 ppm). Se identifican 47 analitos.	61
Figura 38. Cromatograma muestra AE 8 (15 ppm). Se identifican 32 analitos.	62
Figura 39. Cromatograma muestra AE 9 (15 ppm). Se identifica 1 analito.	63
Figura 40. Cromatograma muestra AE 10 (15 ppm). Se identifican 2 analitos.	64
Figura 41. Cromatograma muestra AE 11 (15 ppm). Se identifican 4 analitos.	65
Figura 42. Placa AE 1 50 ppm con pupas muertas.	69
Figura 44. Placa AE 2 100 ppm con pupas y larvas muertas.	69
Figura 43. Placa AE 2 10 ppm con pupas y larvas muertas.	69
Figura 45. Placa AE 3 100 ppm con pupas muertas.	69
Figura 46. Placa AE 5 10 ppm con pupas muertas enterradas dentro del alimento.	69
Figura 47. Placa AE 50 ppm con pupas muertas e imagos vivos alrededor.	69
Figura 48. Placa AE 5 100 ppm con pupas muertas y adultos vivos alrededor.	70
Figura 50. Placa AE 7 100 ppm con pupas muertas y 3 adultos muertos con alas atrofiadas.	70
Figura 52. Placa AE 9 100 ppm. Se observa 1 adulto con alas atrofiadas.	70
Figura 49. Placa AE 7 50 ppm con pupas muertas y 1 adulto muerto con alas atrofiadas.	70
Figura 51. Placa AE 9 50 ppm con pupas muertas y 1 adulto muerto con alas atrofiadas.	70

Figura 53. Placa AE 10 50 ppm. Se observa 1 adulto con alas atrofiadas.	70
Figura 54. Placa AE 10 100 ppm con pupas muertas, 1 imago con alas atrofiadas y 1 imago con alas normales.	71
Figura 56. Otra placa AE 11 50 ppm con pupas muertas, e imagos con alas atrofiadas y normales.	71
Figura 55. Placa AE 11 50 ppm con pupas muertas, 1 imago con alas atrofiadas y 1 imago con alas normales.	71
Figura 57. Estructura de Sulcatona (55)	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables utilizadas y sus respectivas clasificaciones.	9
Tabla 2. Operacionalización de variable “Analizar el aceite esencial de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> por cromatografía de gases con detección de masa”.	10
Tabla 3. Operacionalización de variable “Determinar según la teoría las propiedades químicas y biológicas de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> ”.	11
Tabla 4. Operacionalización de variable “Estudiar el efecto larvicida del aceite esencial de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> contra <i>D. melanogaster</i> ”.	12
Tabla 5. Porcentaje de rendimiento por cada procedimiento de obtención de los AE.	31
Tabla 6. Densidad en g/mL de los AE.	32
Tabla 7. Índices de refracción y comportamiento por temperatura de los AE.	33
Tabla 8. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 1 (Hojas de <i>L. philippiana</i>).	34
Tabla 9. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 2 (Hojas de <i>L. philippiana</i>)	36
Tabla 10. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 3 (Hojas de <i>L. philippiana</i>)	38
Tabla 11. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 4 (Tallos de <i>L. philippiana</i>)	40
Tabla 12. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 5 (Hojas de <i>L. sempervirens</i>)	42
Tabla 13. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 6 (Tallos de <i>L. sempervirens</i>)	44
Tabla 14. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción	

del AE 7 (Hojas de <i>L. sempervirens</i>)	46
Tabla 15. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 8 (Hojas de <i>L. sempervirens</i>)	48
Tabla 16. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 9 (Hojas de <i>L. sempervirens</i>)	50
Tabla 17. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 10 (Hojas de <i>L. sempervirens</i>)	52
Tabla 18. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 11 (Hojas de <i>L. sempervirens</i>)	54
Tabla 19. Analitos identificados desde la muestra AE 1.	57
Tabla 20. Los cinco analitos de mayor concentración identificados desde la muestra AE 2.	58
Tabla 21. Analitos identificados desde la muestra AE 3.	59
Tabla 22. Analito identificado desde la muestra AE 5.	60
Tabla 23. Los cinco analitos de mayor concentración identificados desde la muestra AE 7.	61
Tabla 24. Los cinco analitos de mayor concentración identificados desde la muestra AE 8.	62
Tabla 25. Analito identificado desde la muestra AE 9.	63
Tabla 26. Analitos identificados desde la muestra AE 10.	64
Tabla 27. Analitos identificados desde la muestra AE 11.	65
Tabla 28. N° de larvas muertas y N° pupas en una población de 30 larvas distribuidas en 3 placas	66

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Laureliopsis philippiana*

Laureliopsis philippiana, conocida comúnmente como tepa, es un árbol endémico de la zona sur de Chile y Argentina. Predominante en las regiones del Maule, Ñuble, Biobío, La Araucanía, Los Ríos, Los Lagos y Aysén, lugares de humedad característica (1).

Esta planta posee hojas color verde de 5 a 8 centímetros de largo (Figura 1A), las que se mantienen durante todo el año. Flores hermafroditas de coloración rojas y verdes (Figura 1B) de 6 a 8 pétalos uniformes que florecen entre octubre y noviembre, frutos secos de semilla única y corteza delgada de olor desagradable (1).

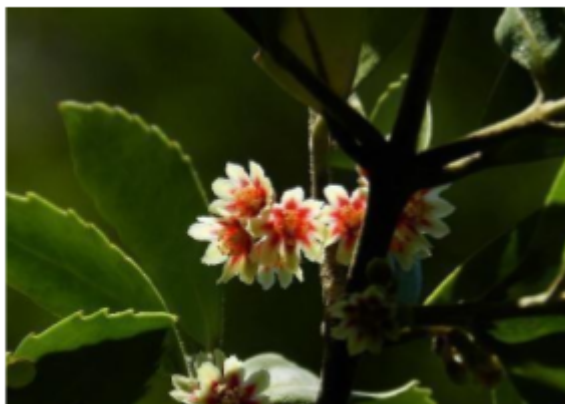


Figura 1A: Hojas de *L. philippiana* (2).

Figura 1B: Flores de *L. philippiana* (3).

De la familia Atherospermataceae, del género *Laureliopsis* y especie *Philippiana*, la tepa puede llegar a medir treinta metros de alto y un metro y medio de diámetro (Figura 2). Un

gran número de estudios coinciden en que este árbol posee actividad antifúngica destacable contra hongos (4) Dicha propiedad es altamente aprovechada en la industria alimenticia y medicinal. La función antifúngica de *L. philippiana* se relaciona al alto porcentaje de eugenol que contiene su aceite esencial (1).

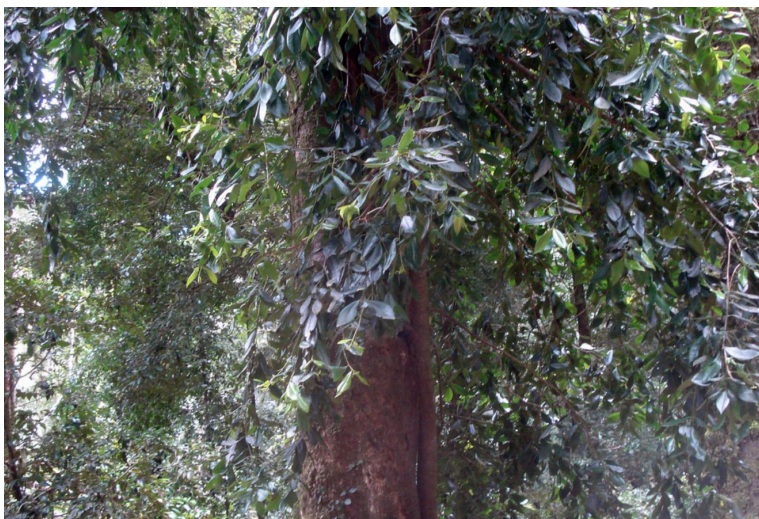


Figura 2: Árbol *L. philippiana* (5).

El compuesto eugenol es una sustancia ampliamente empleada en el campo de la medicina por sus propiedades, entre las que destaca la antiséptica, así lo demuestra un estudio realizado por la Revista CENIC en el año 2016 (6). Es por ello, por lo que el efecto observado sobre las cepas fúngicas que contiene el árbol de la tepa puede ser atribuido a este componente.

El compuesto safrol se puede obtener de lauráceas tales como el árbol nativo laurel (*Laurelia sempervirens*). Bittner et al. (7) en su estudio de aceites esenciales con posible actividad antifúngica, descubrió a través de cromatografía de gases acoplada a detector de masa, que el aceite esencial de laurel posee altas concentraciones de safrol y presenta una

fuerte actividad antifúngica en contra de hongos tales como *Rhizoctonia solani* Kühn y *Fusarium oxysporum*.

En una tesis realizada por González (1) se probó la efectividad del aceite esencial de *L. philippiana* contra colonias de hongos filamentosos de alta importancia clínica tales como *Fusarium* y *Aspergillus*, de los cuales se utilizaron 4 cepas de *Aspergillus* y dos cepas de *Fusarium*. De esta forma, se pudo comprobar que de las 6 cepas al ser expuestas al aceite esencial de *L. philippiana* en una concentración de $4,5 \pm 0,8$ mg/L, prácticamente ninguna cepa pudo desarrollarse en el agar con la excepción de *Fusarium solani*, donde se puede observar muy poco crecimiento. Las cepas mencionadas, presentan una fuerte resistencia a los insecticidas convencionales, por lo que el experimento realizado trae consigo un importante aporte con respecto a la efectividad antifúngica de *L. philippiana*, primordialmente atribuido a los compuestos safrol y eugenol.

Sin embargo, y a pesar de los múltiples estudios de la capacidad antifúngica de esta planta, otras propiedades de gran relevancia no han sido cabalmente estudiadas. Entre ellas se encuentra la capacidad larvicida.

La propiedad de inhibir larvas tiene usos cotidianos ya sea en el día a día, controlando plagas en los hogares o lugares de trabajo, y a gran escala como lo es la industria de alimentos y la agricultura. Las larvas, que se alimentan de tejido vegetal vivo, causan daños serios a muchas frutas comerciales (8). El rol larvicida hoy lo cumplen diversos agentes sintéticos y dañinos que se caracterizan por su alta toxicidad. Conocer cuáles especies de la flora son capaces de repeler parásitos implica un avance de impacto medioambiental (9).

Distintos autores han experimentado con aceites esenciales de diversas plantas, aplicándolos para el control de variadas plagas de insectos y colonias de hongos, mayoritariamente en países europeos. Con respecto a Chile, la evidencia científica es menor, sin embargo, consta de documentos y tesis que evidencian la potencialidad del

efecto larvicida. Por ejemplo, para el extracto de *Drimys winteri* (Canelo Mapuche), en un estudio realizado en el 2013, se encontró que el compuesto con mayor porcentaje de actividad, la isodrimenina, mostraba actividad larvicida contra *Drosophila melanogaster* (10).

En otro estudio del año 2022, se demostró una eficacia prometedora de la actividad insecticida del aceite esencial de *L. philippiana* contra *M. domestica*, *C. quinquefasciatus*, y larvas de *S. littoralis* (11).

Por ello, en esta investigación aparece la latente pregunta sobre si los metabolitos presentes en el aceite esencial de *L. philippiana* poseen potencial acción larvicida sobre *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta. Bajo este enfoque se realizarán procedimientos tales como extracción de aceite esencial por medio de arrastre de vapor de agua, cromatografía de gases, espectrometría de masas y ensayos biológicos, los cuales permitirán identificar basándose en la teoría conjunto a los resultados obtenidos, las propiedades químicas y biológicas de las hojas y tallos de este árbol.

Para la identificación y caracterización de los distintos compuestos del aceite esencial de tepa, primeramente se hará una destilación por arrastre de vapor, que es “una técnica que permite la separación de sustancias insolubles en H₂O y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles” (12) luego se utilizará la técnica de cromatografía de gases y la espectrometría de masas. La cromatografía de gases “es una técnica analítica que permite separar mezclas de compuestos fácilmente volatilizables y térmicamente estables en sus componentes individuales empleando como fase móvil un gas” (13). Mientras que la espectrometría de masas permite “obtener información de la masa molecular del compuesto analizado e información estructural del mismo, y también permite detectar su presencia y/o cuantificar su concentración” (14).

El estudio del aceite esencial de *L. philippiana*, tiene una gran relevancia en el ámbito de la investigación para conseguir utilizar estos productos naturales en diversos ámbitos,

mejorando así, la calidad de vida y reduciendo el impacto medioambiental de los insecticidas actualmente utilizados en la industria de la agricultura.

1.2 *Laurelia sempervirens*

El laurel chileno, conocido científicamente como *Laurelia sempervirens*, es un árbol que puede crecer hasta 50 metros de altura y su tronco puede tener un diámetro de hasta 2 metros. Se encuentra comúnmente en las regiones de Valdivia y Los Lagos de Chile, así como en las provincias argentinas de Neuquén, Río Negro y Chubut. Crece en bosques húmedos de la zona costera, a menudo en laderas de montañas y valles fluviales. También se le conoce como "Laurel de Chile" o "*Laurelia*", y es una especie endémica de Sudamérica (15).



Figura 3. Árbol *L. sempervirens* (16).

Es “de hoja perenne, tiene un tronco recto y una copa redondeada y densa. Sus hojas son

ovaladas, de un verde oscuro brillante en la parte superior y más pálidas en la parte inferior. Produce pequeñas flores blancas en primavera y frutos de color negro azulado en otoño. La corteza del árbol es de color gris y tiene una textura rugosa” (15).



Figura 4A. Hojas *L. sempervirens* (16).

Figura 4B. Frutos *L. sempervirens* (17).

Figura 4C. Flores *L. sempervirens* (18).

Estas distintas estructuras tienen diversos componentes que le otorgan propiedades aplicables tanto a organismos como a diversas acciones de la cotidianidad. Estos

componentes son denominados metabolitos secundarios, los cuales tienen una gran cantidad de propiedades. Al igual que en la *L. philippiana*, “el safrol es un aceite esencial presente en gran porcentaje en las hojas de esta planta (91%) ... A este se suma otro grupo de metabolitos secundarios presentes en esta planta, los flavonoides (Carvajal, 2005), los que se caracterizan por poseer propiedades antioxidantes, ya que su estructura química es capaz de transferir electrones y quelar metales (Marcano y Hasegawa, 2002; Escamilla et al., 2009).” (19).

1.3 Aceite esencial

Para el desarrollo de esta investigación, se tuvieron que extraer los aceites esenciales, puesto que estos eran el método de estudio, ya que se investigará si estos poseen efecto larvicida.

Es por esto que, a partir de las hojas y tallos de las especies mencionadas, se realiza una serie de procesos, partiendo por la destilación por arrastre de vapor. Luego se debe filtrar la fase orgánica obtenida como resultado de esta técnica para luego ser procesada por un rotaevaporador, del que se obtendrá el aceite esencial esperado.

Una vez obtenidos estos, se realizan otra serie de procesos con el objetivo de caracterizar física y químicamente los aceites basándonos en la teoría conjunto a los resultados. Para esto se utilizarán instrumentos como cromatógrafo de gases junto a espectrómetro de masas, picnómetro, refractómetro y espectrómetro de infrarrojo.

2. OBJETIVOS

2.1 Pregunta investigativa

¿Poseen los aceites esenciales de *Laureliopsis philippiana* y *Laurelia sempervirens* propiedades larvicidas?

2.2 Hipótesis

“Los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de L. philippiana y L. sempervirens poseen una potencial actividad larvicida contra Drosophila melanogaster”

2.3 Objetivo General

Demostrar la efectividad del aceite esencial de *Laureliopsis philippiana* y *Laurelia sempervirens* como efecto larvicida en *D. melanogaster*.

2.4 Objetivos específicos

2.4.I Analizar el aceite esencial de *Laureliopsis philippiana* y *Laurelia sempervirens* por cromatografía de gases acoplada a detección de masa.

2.4.II Determinar según la teoría las propiedades químicas y biológicas de *L. philippiana* y *L. sempervirens*.

2.4.III Estudiar el efecto larvicida del aceite esencial de *L. philippiana* y *L. sempervirens* contra *Drosophila melanogaster*.

3. VARIABLES

3.1 Tipos y clasificación de las variables

Tabla 1. Variables utilizadas y sus respectivas clasificaciones.

Variable	Tipo	Subtipo	Dimensionalidad
Ecotipos de tepa y laurel	Cuantitativa	Operacional	Física
Zona de muestreo	Cuantitativa	Operacional	Física
Tipo de suelo	Cuantitativa	Operacional	Física
Latitud de muestreo	Cuantitativa	Operacional	Física

3.2 Operacionalización de variables

Analizar el aceite esencial de *L. philippiana* y *L. sempervirens* por cromatografía de gases con detección de masa.

Tabla 2. Operacionalización de variable “Analizar el aceite esencial de *L. philippiana* y *L. sempervirens* por cromatografía de gases con detección de masa”.

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN
Aceite esencial de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> .	Fracción líquida que contiene sustancias asociadas al aroma de la planta (20) Variable de tipo operacional cuantitativa.	Sustancia química.
NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN
Cromatografía de gases con detección de masa.	Técnica cromatográfica analítica para separar compuestos altamente volatilizables (12) Variable de tipo operacional cuantitativa.	Técnica.

Determinar según la teoría las propiedades químicas y biológicas de *L. philippiana* y *L. sempervirens*.

Tabla 3. Operacionalización de variable “Determinar según la teoría las propiedades químicas y biológicas de *L. philippiana* y *L. sempervirens*”.

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN
Propiedades químicas de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> .	Composición química de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> . Variable de tipo operacional cuantitativa.	Propiedades químicas.
NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN
Propiedades biológicas de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> .	Composición y características biológicas de <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> . Variable de tipo operacional cuantitativa.	Propiedades biológicas.

Estudiar el efecto larvicida del aceite esencial de *L. philippiana* y *L. sempervirens* contra *D. melanogaster*.

Tabla 4. Operacionalización de variable “Estudiar el efecto larvicida del aceite esencial de *L. philippiana* y *L. sempervirens* contra *D. melanogaster*”.

NOMBRE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	SUBINDICADORES
Efectos larvicidas de los AE <i>L. philippiana</i> y <i>L. sempervirens</i> .	Variable de tipo operacional cuantitativa	Acción larvicida e insecticida	Alto Medio Bajo Sin actividad	Positivo (hay actividad) Negativo (no hay actividad)

4. METODOLOGÍA

4.1 Marco conceptual

Si hablamos de la composición química de la especie *Laurelia*, los compuestos principales son eugenol y safrol, los cuales se describirán brevemente a continuación:

4.1.I Eugenol

Derivado fenólico (Figura 5) empleado en el campo de la medicina por sus propiedades, entre las que destaca la antiséptica, por lo que el efecto observado sobre las cepas fúngicas que contiene el árbol de la tepa puede ser atribuido a este compuesto (1).

Entre las muchas propiedades de este compuesto destacan fundamentalmente sus propiedades anestésicas, antiagregantes, antiedémicas, antivomitivas, carminativas, antiácidas, antioxidantes, gastroprotectoras, gastroregenerativas, bactericidas, antifúngicas, antisépticas, antivirales, herbicidas, pesticidas, insecticidas, insectífugas, vermífugas, sedativas, fragantes y aromatizantes (6).

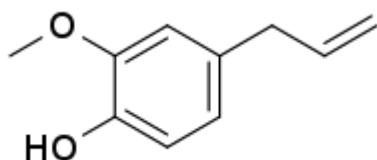


Figura 5. Estructura química del compuesto eugenol. 4-Allyl-2-methoxyphenol, CAS 97-53-0 (21)

4.1.II Safrol

Bittner et al. (7) en su estudio de aceites esenciales extraídos del boldo con posible actividad antifúngica, encontraron a través de cromatografía de gases acoplada a detector

de masa, que el aceite esencial de laurel posee altas concentraciones de safrol (Figura 6). Por otra parte, se sabe que tiene propiedades insecticidas y antisépticas (22).

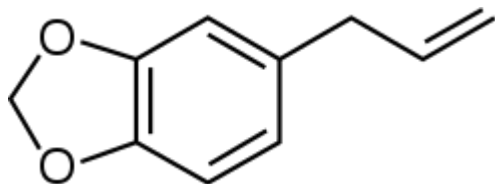


Figura 6. Estructura química del compuesto safrol.

5-Allyl-1,3-benzodioxole, CAS 94-59-7 (23).

4.1.III Actividad larvicida

Los extractos naturales de plantas constituyen una fuente de nuevas y variadas estructuras bioactivas, denominados metabolitos secundarios (Figura 7), las cuales pueden tener actividad intrínseca o servir como líderes para el desarrollo de insecticidas más seguros. Los metabolitos secundarios, entre los que sobresalen alcaloides, terpenos, cumarinas y fenoles, se caracterizan por presentar actividad biológica para controlar insectos vectores (4).

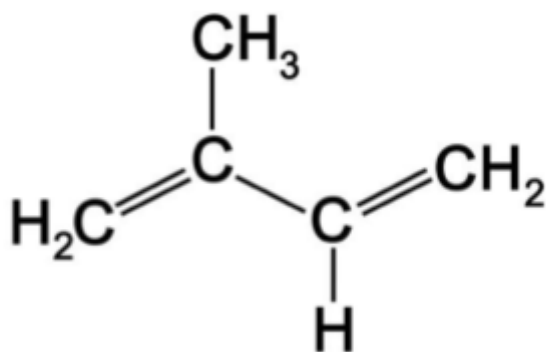


Figura 7. Unidad estructural de los

terpenos, molécula de isopreno. 2-Methyl-1,3-butadiene. CAS 78-79-5 (24).

4.1.IV Actividad antifúngica

Las plantas cuentan con la habilidad de sintetizar sustancias aromáticas de diferentes grupos funcionales, la mayoría de los cuales son fenoles o sus derivados oxigenados. Los

metabolitos secundarios son utilizados como mecanismos de defensa de las plantas contra depredadores: microorganismos, insectos y herbívoros. Algunas plantas, de las que se explotan su esencia (terpenoides), pigmentos (quinonas y taninos), su sabor (terpenoide capsaicina del pimentón dulce), se ha encontrado que poseen propiedades medicinales. Algunas de las hierbas y especias que se utilizan para dar sazón a los alimentos también contienen compuestos con usos medicinales (25).

4.1.V *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (Figura 8A) es un insecto díptero, es decir, con dos alas, de color amarillo-rojo de 3-5 mm de tamaño, generalmente con ojos rojos, también conocido como mosca del vinagre o de la fruta. Su ciclo de desarrollo es muy rápido, y se ve favorecido por el acceso a líquidos azucarados. El ciclo vital completo dura entre 9 y 20 días, y en verano es de aproximadamente 7 a 8 días. Las hembras llegan a poner entre 700 y 800 huevos a lo largo de su vida (Figura 8B). La oviposición tiene lugar en frutas heridas, y en líquidos como zumos, vinagre, vino, cerveza y refrescos (26).



Figura 8A. *D. melanogaster* adulta (27).

Figura 8B. Huevos de *D. melanogaster* (28).

Las larvas (Figura 9) son pequeñas, de aspecto blanquecino, y se encuentran en el interior de la fruta dañada. El principal daño causado por este insecto se debe a su capacidad para transmitir enfermedades como la podredumbre agria, reconocible por el fuerte olor a

vinagre que desprenden los artículos contaminados. La cepa til-til resultó ser una nueva especie de *Drosophila* perteneciente al grupo funebris (26).



Figura 9. Larva de *D. melanogaster* (29).

4.1.VI Cromatógrafo de gases

Su funcionamiento está dado por la separación de los compuestos de forma individual en sus clasificaciones, dependiendo de las propiedades físicas y químicas de cada uno. El sistema (Figura 10) consta de un gas portador que está conectado directamente a un horno o equipo simulado, del que sobresale un detector instalado en un software especial para la medición de la cromatografía (13).

Dentro del equipo, las sustancias que componen la muestra seleccionada interactúan entre sí, siempre y cuando sean lo suficientemente volátiles. El margen que se utiliza para la ebullición de los componentes no sobrepasa los 300°C, la muestra tampoco debería descomponerse por la temperatura (13).

El cromatograma grafica montañas o picos que corresponden a la sustancia detectada en la muestra que llega al detector del sistema. Los primeros enmarcados en el software indican los compuestos más volátiles: mientras mayor sea la altura y área de cada pico, implica que hay una mayor concentración de ese compuesto en la muestra analizada. Las

sustancias que no pudieron traspasar la columna o por algún motivo, tienen una masa más alta, estarán reflejadas en los últimos picos del cromatograma (13).

Al finalizar el procedimiento, se rescatará el reporte cromatográfico que indicará la concentración de cada analito y analizará la pureza de los compuestos de la muestra.

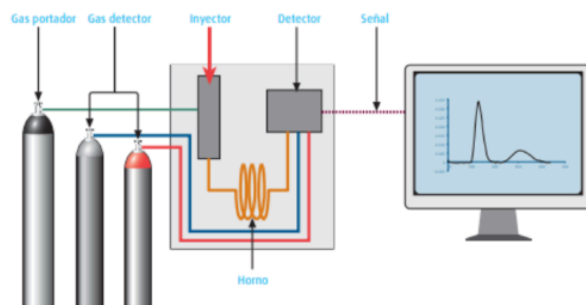


Figura 10. Elementos de la cromatografía de gases (13).

4.1.VII Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se define como una técnica analítica que permite estudiar diversos compuestos de la naturaleza, tanto orgánicos como inorgánicos o biológicos, así como obtener información cualitativa o cuantitativa (14).

Mediante el análisis por espectrometría de masas, es posible obtener información de la masa molecular del compuesto analizado e información estructural del mismo. No obstante, también permite detectar su presencia y/o cuantificar su concentración. El proceso en sí tiene lugar en la fuente de ionización. Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o determinando el tiempo de llegada a un detector. Cuando los iones llegan a éste, producen una señal eléctrica que se envía al ordenador (14).

El registro que se obtiene se llama espectro de masas y, en general, es una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos.

De esta forma, un espectrómetro de masas (Figura 11) consta de tres elementos: la fuente de ionización, el analizador de masas y, finalmente, el detector. Una vez se consiguen los átomos o moléculas de una determinada muestra, se ionizan, separan y detectan en una fase gaseosa (14).



Figura 11. *Espectrómetro de masas (14).*

4.1.VIII Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre de vapor posibilita la purificación o el aislamiento de compuestos de punto de ebullición elevado mediante una destilación a baja temperatura (siempre inferior a 100 °C). Es una técnica de destilación muy útil para sustancias de punto de ebullición muy superior a 100 °C y que se descomponen antes o al alcanzar la temperatura de su punto de ebullición (12).

La destilación por arrastre de vapor es una técnica de destilación que permite la separación de sustancias insolubles en H₂O y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles. A la mezcla que contiene el producto que se pretende separar, se le adiciona un exceso de agua, y el conjunto se somete a destilación. En el matraz de destilación se

recuperan los compuestos no volátiles y/o solubles en agua caliente, y en el matraz colector se obtienen los compuestos volátiles e insolubles en agua. Finalmente, el aislamiento de los compuestos orgánicos recogidos en el matraz colector se realiza mediante una extracción (12).

4.1.IX Espectroscopía infrarroja

La espectroscopía infrarroja (IR) se basa en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la región infrarroja del espectro electromagnético, convirtiéndola en una vibración molecular. Esta absorción es característica de la naturaleza de los enlaces químicos presentes en una muestra (30).

Con un espectrómetro, esta absorción se mide como una función de longitud de onda (como números de onda, típicamente de $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$). El resultado es un espectro IR que sirve como una característica "huella digital molecular" que se puede utilizar para identificar muestras orgánicas e inorgánicas (30).

4.1.X Índice de refracción

El índice de refracción se define como el cociente de la velocidad de la luz cuando pasa a través de dos medios. Es un número adimensional que depende de la temperatura y de la longitud de onda de la luz. Define la rapidez con la que un haz de luz viaja a través de los medios, y esta relación se describe mediante la fórmula:

$$n = c/v$$

Donde:

n es el índice de refracción

c es la velocidad de la luz en un vacío (o aire)

v es la velocidad de la luz en los medios (por ejemplo, agua, aceite de oliva, etc.)

La refractometría es un método analítico que se usa para medir el índice de refracción de una muestra a fin de determinar su composición o pureza. La refractometría es una técnica cualitativa y no destructiva que se basa en la ley de Snell.

En el método de refractometría, que se usa principalmente en la industria con fines de control de calidad, se emplea un refractómetro. Hablaremos de la refractometría y el uso de refractómetros en los capítulos siguientes (31).

4.1.XI Densidad

La *densidad* es una magnitud referida a la cantidad de masa contenida en un determinado volumen, y puede utilizarse en términos absolutos o relativos.

La *densidad absoluta* o densidad normal, también llamada densidad real, expresa la masa por unidad de volumen. Cuando no se hace ninguna aclaración al respecto, el término «densidad» suele entenderse en el sentido de densidad absoluta.

La fórmula de esta densidad es m/v y su unidad de medida es kg/m^3 .

Pero también existe la *densidad relativa* o aparente expresa la relación entre la densidad de una sustancia y una densidad de referencia, resultando una magnitud adimensional y, por tanto, sin unidades (32).

4.1.XII Destilador

Es un aparato (Figura 12) ocupado a nivel industrial y dentro del área científica para separar componentes líquidos de una mezcla mediante el proceso de la destilación (33) que consiste en una separación de los componentes en función de sus diversos puntos de ebullición (33). Por medio del vapor de agua, se separan las moléculas de líquidos de las moléculas de otros elementos que se encuentran como parte de la mezcla seleccionada; luego de este procedimiento, el líquido es recolectado en forma de vapor y es llevado a un condensador, donde este vapor es enfriado y retorna a su fase acuosa, dando como

resultado elementos en estado puro y limpio. Químicamente, los componentes más volátiles se evaporan primero (33).

Los destiladores pueden ser utilizados para elaborar bebidas alcohólicas, obtener refinados de petróleo, para obtener productos petroquímicos, etc (34). A su vez, pueden estar hechos de distintos materiales, primando el de acero inoxidable o alambique.

Un destilador se compone, generalmente, de las siguientes partes (33):

- Matraz de destilación: donde se coloca el líquido a destilar.
- Generador de vapor: almacena el agua que será destilada, utiliza el calor proveniente de una fuente de energía o la producida mediante resistencias eléctricas de inmersión capaces de transmitir energía térmica hacia el agua utilizada.
- Tubo de condensación: conecta el matraz de destilación con el colector, el vapor es enfriado mediante un líquido refrigerante que circula a través de él, provocando la condensación del vapor recolectado.

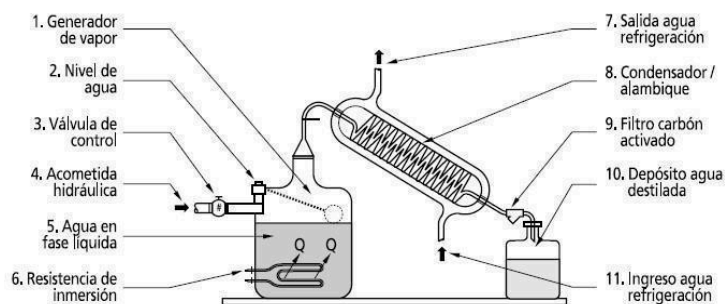


Figura 12. Imagen de un destilador de agua (35).

4.1.XIII Rotaevaporador

Es un equipo de laboratorio (Figura 13) empleado en el proceso de la destilación y/o purificación de líquidos mediante la separación del solvente de las muestras a elección. Es

utilizado para concentrar muestras y extraer aceites esenciales. Es mucho más eficiente que el equipo de destilación simple (36).

Componentes de un rotavapor (36):

- Motor: capaz de rotar la muestra conectada al matraz de evaporación.
- Bomba de vacío: reduce la presión del sistema.
- Condensador: enfría el vapor generado, recolectando en un matraz recolector especial.

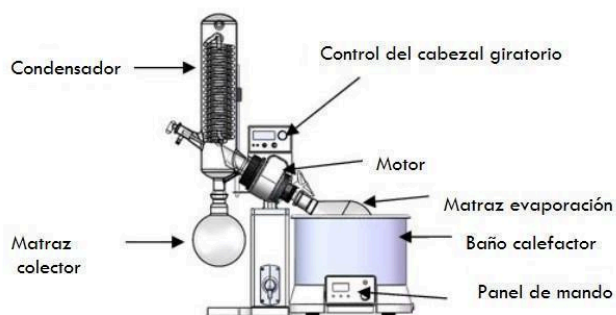


Figura 13. Componentes de un evaporador rotativo (37).

4.1.XIV Balanza

La balanza de laboratorio es un instrumento utilizado para medir la masa de los compuestos. Puede usarse para saber el pesaje de sólidos, líquidos y materia gaseosa (38).

El tipo más común de balanza usada en laboratorio es la de tipo analítica de precisión (Figura 14), debido a que es capaz de medir masas sumamente pequeñas que incluso, están bajo los miligramos y con una sensibilidad aproximada de hasta la diezmilésima de gramo (0,0001 gramos) (38) Al trabajar con masas tan pequeñas, la temperatura e incluso corrientes de aire pueden variar el resultado total de la medición, por lo que están compuestas por una caja de cristal o vitrina capaz de aislar polvo en suspensión o cualquier agente externo que pudiese afectar el resultado otorgado por el equipo.



Figura 14. *Balanza analítica de precisión (39).*

4.1.XV Embudo de filtración

En conjunto con los productos de filtrado, son instrumentos que se utilizan, en química orgánica, para recoger compuestos recristalizados porque ayudan a eliminar la humedad del producto final (40). Los embudos de filtración más utilizados son los Buchner y Hirsch.

El material de estos instrumentos es habitualmente el plástico o polietileno de alta densidad, de metal o, como es utilizado comúnmente, de vidrio (Figura 15).

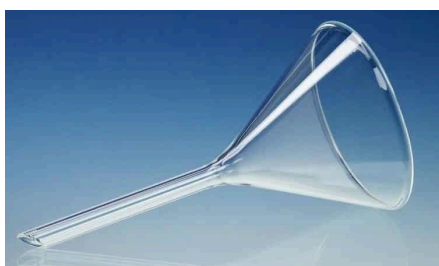


Figura 15. *Embudo de filtración de vidrio (41).*

4.1.XVI Papel filtro

Es un papel en forma redonda (Figura 16) y se introduce en un embudo, con el fin de ser filtro para las impurezas insolubles y permitir el paso de la solución a través de sus poros (42).



Figura 16. *Papel filtro (42).*

4.1.XVII Picnómetro

Es utilizado para medir y contrastar las densidades o gravedades particulares de sólidos y líquidos (43). Los valores extraídos gracias a su uso son procesados y estudiados a través de la picnometría. Compara un líquido con un fluido escogido, como por ejemplo, agua destilada, pesando el fluido y a través de la fórmula empleada, consiguiendo la densidad total en base a la masa de la muestra (44).

La fórmula utilizada es $p_l = m_l / m_a * p_a$ (44) donde p_l y m_l son densidad y masa del líquido, mientras p_a y m_a densidad y masa del agua, respectivamente.

Dentro de sus componentes, posee un tapón esmerilado con un capilar (Figura 17) que permite una medición exacta de la muestra evitando derrames y burbujas de aire. El tipo de picnómetro más usado en laboratorio es el de gas, el cual aplica la gravimetría para medir las muestras (44).

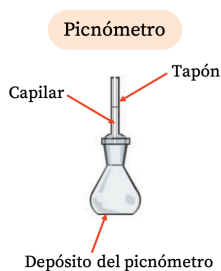


Figura 17. Picnómetro de agua de 10 mL (44).

4.1.XVIII Refractómetro

Es un aparato (Figura 18) que se utiliza para poder medir el índice de refracción de los líquidos y sólidos que son translúcidos, además de la concentración de sólidos solubles. Se rige bajo escalas de medición de porcentajes, como lo son la escala de índice de refracción, los grados Brix, Densidad específica, % sal, entre otros (45).

Emplea la refracción de la luz a través de un medio (muestra de interés) la cual está asociada directamente con la densidad y la totalidad de sólidos en suspensión de este, la cual al pasar por varios prismas nos arroja una escala primaria de medición conocida como: índice de refracción. Su uso está asociado a concentración de sustancias específicas, confirmación de pureza de una sustancia, estandarización de productos alimenticios. etc. Mientras más densidad tenga el líquido de la muestra a elección, mayor será su refracción (45).



Figura 18. *Refractómetro de mesa, utilizado habitualmente para el área química y farmacéutica (46).*

4.1.XIX Agua destilada

Corresponde al agua obtenida por el proceso de destilación o imitación del ciclo natural del agua, que conlleva su evaporación y condensación. Su característica más importante es la pureza que contiene, ya que, mediante la destilación, el agua es desprovista de electrolitos, impurezas y posibles sustancias que pudiesen estar presentes (47).

Es un agua limpia, inodora, incolora y sin sabor, otra característica es que debido a la falta de iones metálicos, se transforma en una sustancia con baja conductividad. En química es utilizada como disolvente y reactivo químico (47).

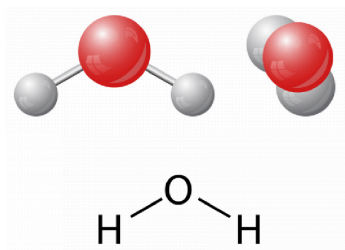


Figura 19. Composición molecular del agua. Dihydrogen oxide. CAS 7732-18-5 (48).

4.1.XX Cloruro de metileno/diclorometano

El cloruro de metileno es un compuesto altamente volátil, incoloro y no inflamable (49) utilizado comúnmente como disolvente de proceso y medio de extracción por su alta solvencia y pureza, además de poder destilarse fácilmente. Es producido por la reacción de metano o cloro metano con cloro gaseoso.

Propiedades físicas (49):

- Fórmula química: CH_2Cl_2 (Figura 20).
- Masa molecular: 84,9 g/mol.
- Punto de ebullición: 40°C.
- Densidad relativa del líquido (agua=1 g/mL): 1,3 g/mL.

Dentro de los peligros a la exposición de diclorometano, se encuentra la irritación por inhalación, ingestión o absorción de la piel, específicamente: irritación en mucosas, vómitos, afección al sistema nervioso central, intoxicación por monóxido de carbono, disminución del estado de alerta e incluso, la muerte (50).

Al arder o ante la presencia de altas temperaturas puede descomponerse en humos corrosivos, aumentando el peligro de explosión y toxicidad (49).

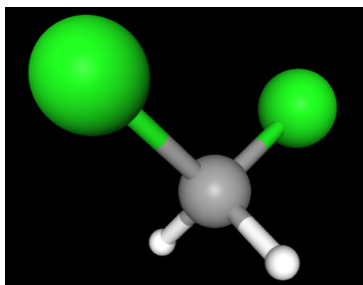


Figura 20. Composición química del diclorometano. Methylene chloride. CAS 75-09-2 (51)

4.1.XXI Sulfato de magnesio anhidro

El sulfato de magnesio anhidro es un compuesto que se utiliza en la química a menudo como agente de secado en síntesis orgánica debido a su afinidad por el agua y compatibilidad con la mayoría de los compuestos orgánicos. Durante el proceso, se trata una fase orgánica con una cantidad de sulfato de magnesio anhidro, y luego el sólido se elimina mediante filtración, decantación o destilación (52).

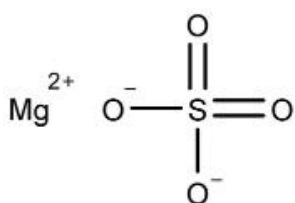


Figura 21. Composición química del sulfato de magnesio anhidro. magnesium;sulfuric acid. CAS 7487-88-9 (53).

4.2 Material y método

Este estudio corresponde a uno de tipo experimental prospectivo, donde, después de la recolección directa de *L. philippiana* y *L. sempervirens*, se procedió a extraer aceites esenciales mediante la técnica de destilación, para posteriormente analizarlos por medio de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-Ms), densitometría, índice de refracción y Espectroscopia Infrarroja (FT-IR), para así aplicarlos sobre una población de *D. melanogaster*, evaluando su efecto larvicida en un periodo de tiempo establecido, contrastando la sobrevivencia de los insectos ante las propiedades biológicas y químicas de *L. philippiana*.

4.3 Recolección e identificación del material vegetal

Las hojas y tallos de *Laureliopsis philippiana* fueron recolectadas en el Parque Nacional Alerce Costero ubicado entre las comunas de Corral y La Unión, y en la localidad de Chaihuín, comuna de Corral, Región de Los Ríos, Chile. Se almacenaron en sacos de polipropileno y se trasladaron a la Facultad de Farmacia, Laboratorio de Química de Metabolitos Bioactivos, de la Universidad de Valparaíso.

Las hojas y tallos de *Laurelia sempervirens* fueron recolectadas desde la localidad de Valdivia, Región de Los Ríos, Chile.

La identificación de las plantas fue hecha por Mauricio Cuellar, académico de la Universidad de Valparaíso.

4.4 Extracción del aceite esencial

Para el proceso de extracción de los aceites, se utilizaron hojas frescas y tallos de *L. philippiana* y *L. sempervirens*.

Mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor en un destilador de aceites esenciales de acero inoxidable, conectado a un embudo decantador, se obtuvieron los hidrolatos de donde se extrajeron los aceites esenciales.

Posterior a deshojar las ramas, estas se pesaron y se ubicó 1 kg de material vegetal como masa inicial en la parte superior la rejilla dentro del equipo de destilación sobre 3,5 L de agua destilada vertida previamente bajo la rejilla. Se conectó el equipo a una fuente de corriente para que comenzara el goteo desde el tubo refrigerante al matraz de decantación, y se desconectó el sistema una vez recogidos 2 L de muestra (hidrolato). Una vez obtenido el hidrolato se realizó la separación de las fases acuosa y orgánica, para lo cual, se realizaron extracciones líquido-líquido utilizando un embudo de decantación, agregando 200 mL de hidrolato junto con 40 mL de diclorometano; se agita manualmente el embudo para combinar las fases, luego se deja reposar abriendo la tapa del embudo para liberar la presión y permitir la separación, y se saca la fase orgánica que se encuentra en la parte inferior del embudo; se repite el procedimiento previo dos veces más, añadiendo 40 ml de diclorometano en la segunda y después en la tercera extracción, para finalizar combinando las 3 fases orgánicas obtenidas.

Una vez recolectadas y combinadas las fases orgánicas, se añade sulfato de magnesio anhidro (que cubra el fondo del matraz) y se deja reposar por 15 minutos para después filtrar en un embudo de gravitación utilizando papel filtro de pliegue simple. El filtrado de la fase orgánica se procede a agregar a un balón previamente masado, para concentrarlo en el rotavapor. Al concentrar la totalidad de la fase orgánica, se procede a determinar la masa final del aceite obtenido y el % de rendimiento.

4.5 Caracterización física del aceite esencial

4.5.1 Densitometría

Para cuantificar la densidad de los aceites extraídos, se utilizaron picnómetros de 1 mL, 5 mL y de 10 mL. Se pesó un volumen de muestra (agua destilada) para comparar su masa con la de los aceites esenciales. Para determinar la masa del picnómetro completo (cuerpo

y tapa), se llenó con agua destilada hasta el borde y se tapó. Se secó el rebalse de agua y se volvió a masar.

Una vez obtenida la masa del líquido muestra, se vació el picnómetro, se enjuagó con acetona y se repitió el mismo procedimiento del agua con cada uno de los AE para obtener sus masas y se calcularon las densidades.

4.5.II Índice de refracción

Se utilizó un Refractómetro ABBÉ y se registró la temperatura ambiental.

En primer lugar se frotaron ambas caras del prisma con un trozo de algodón humedecido con acetona. Luego se colocaron unas gotas de aceite esencial de manera de cubrir totalmente la superficie del prisma inferior del refractómetro y se cerró. Posteriormente se giró el prisma hasta una delineación bien definida entre el campo claro y oscuro con la intersección de los hilos entrecruzados y se efectuó la lectura del índice de refracción.

Se repitió el mismo procedimiento con cada uno de los aceites obtenidos, limpiando entre cada uno ambas caras del prisma con acetona.

4.5.III Espectroscopia infrarroja (FT-IR)

Se utilizó el equipo Thermo Scientific Nicolet iS5 Ft-ir Spectrometer iD junto al programa de computación "OMNIC" conectado a la señal del Espectrómetro Infrarrojo.

Se extrajo 1 gota de AE (0,05 mL) con pipeta Pasteur y se diluyó la muestra con 3 gotas de diclorometano en un frasco de vidrio. De esta última mezcla, se extrajeron 2 gotas y se colocaron en una celda de KBr.

Se repitió el mismo procedimiento con cada muestra, limpiando previamente la celda del espectrómetro con diclorometano para no entrecruzar compuestos entre las diferentes muestras.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención del aceite esencial

Tabla 5. Porcentaje de rendimiento por cada procedimiento de obtención de los AE.

Aceite esencial	Masa inicial	Masa final	% de rendimiento
AE 1	1092,25 gr	20,23 gr	1,8%
AE 2	508,3 gr	16,04 gr	3,15%
AE 3	409,8 gr	15,62 gr	3,8%
AE 4	1007,3 gr	2,15 gr	0,21%
AE 5	1550,4 gr	16,99 gr	1,09%
AE 6	1003,1 gr	6,05 gr	0,6%
AE 7	1000 gr	9,05 gr	0,9%
AE 8	1000,4 gr	11,72 gr	1,1%
AE 9	1000 gr	13,49 gr	1,3%
AE 10	1000 gr	13,08 gr	1,3%
AE 11	1000 gr	14,23 gr	1,4%

5.2 Caracterización física del aceite esencial

5.2.1 Densitometría

Tabla 6. Densidad en g/mL de los AE.

Aceite esencial	Densidad (g/mL)
AE 1	0,9282
AE 2	0,9519
AE 3	0,9411
AE 4	1,1039
AE 5	PENDIENTE
AE 6	PENDIENTE
AE 7	1,1625
AE 8	PENDIENTE
AE 9	1,0963
AE 10	1,0444
AE 11	1,010

5.2.II Índice de refracción

Tabla 7. Índices de refracción y comportamiento por temperatura de los AE.

Aceite esencial	Valor índice de refracción	T° (°C)
AE 1	1472,5	16
AE 2	1484,5	16
AE 3	1486,5	16
AE 4	1492,0	16
AE 5	1525,0	16
AE 6	1514,5	16
AE 7	1533,5	14
AE 8	1533,5	14
AE 9	1532,5	14
AE 10	1521,5	14
AE 11	1488,0	14

5.3 Caracterización del aceite esencial mediante espectroscopia infrarroja (FT-IR)

Por cada muestra, se pudieron observar los siguientes grupos funcionales, según su intervalo de frecuencia:

5.3.1 AE 1

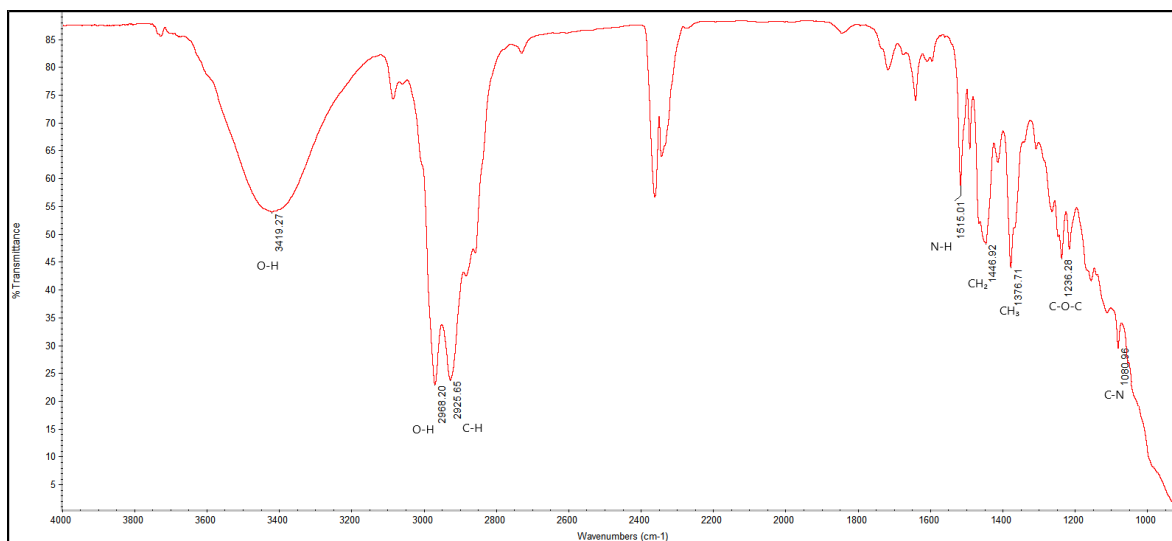


Figura 22. Espectro infrarrojo del AE 1.

Tabla 8. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 1 (Hojas de *L. philippiana*).

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3419.27	3400-3300	O-H	Tensión
Alcanos	2925.65	2950-2800	C-H	Tensión
	1446.92	~1465	CH ₂	

				Flexión
	1376.71	~1375	CH ₃	
Aminas	1515.01	1640-1500	N-H	Flexión
	1080.96	1200-1025	C-N	Tensión
Ácidos carboxílicos	2968.20	3400-2400	O-H	Tensión
Éteres	1236.28	1300-1000	C-O-C	Tensión

La figura 22 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 1. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 8, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.2 AE 2

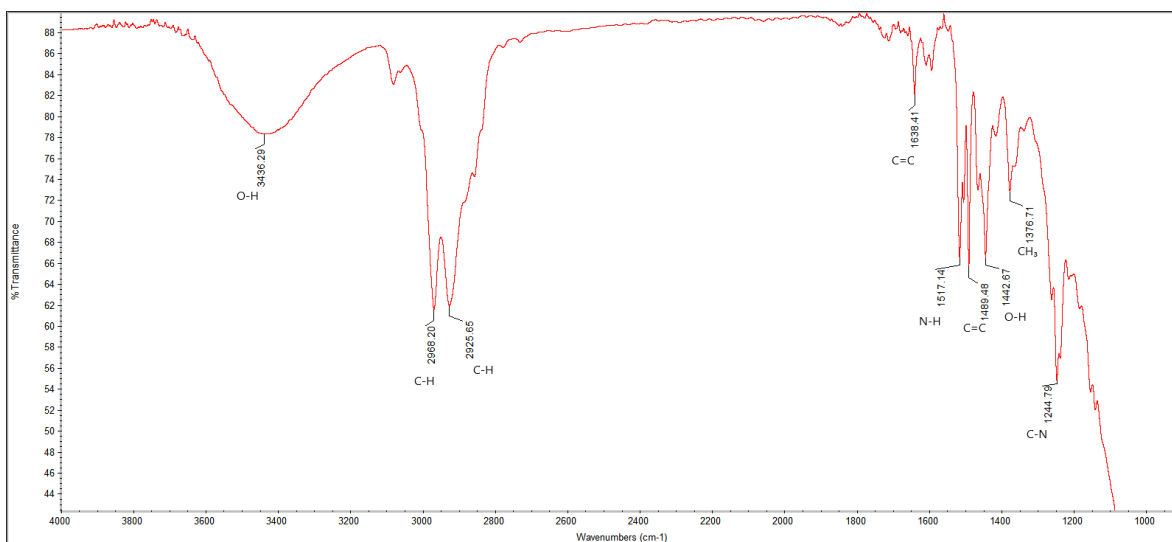


Figura 23. Espectro infrarrojo del AE 2.

Tabla 9. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 2 (Hojas de *L. philippiana*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3436.29	3400-3300	O-H	Tensión
Alcanos	2968.20	2950-2800	C-H	Tensión
	2925.65			
	1376.71	~1375	CH ₃	Flexión

Alquenos	1638.41	1640-1610	C=C	Tensión
Aminas	1517.14	1640-1500	N-H	Flexión
	1244.79	1360-1250	C-N	Tensión
Compuestos Aromáticos	1489.48	~1600 y ~1475	C=C	Tensión
Ácidos carboxílicos	1442.67	1440-1400	O-H	Flexión

La figura 23 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 2. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 9, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.3 AE 3

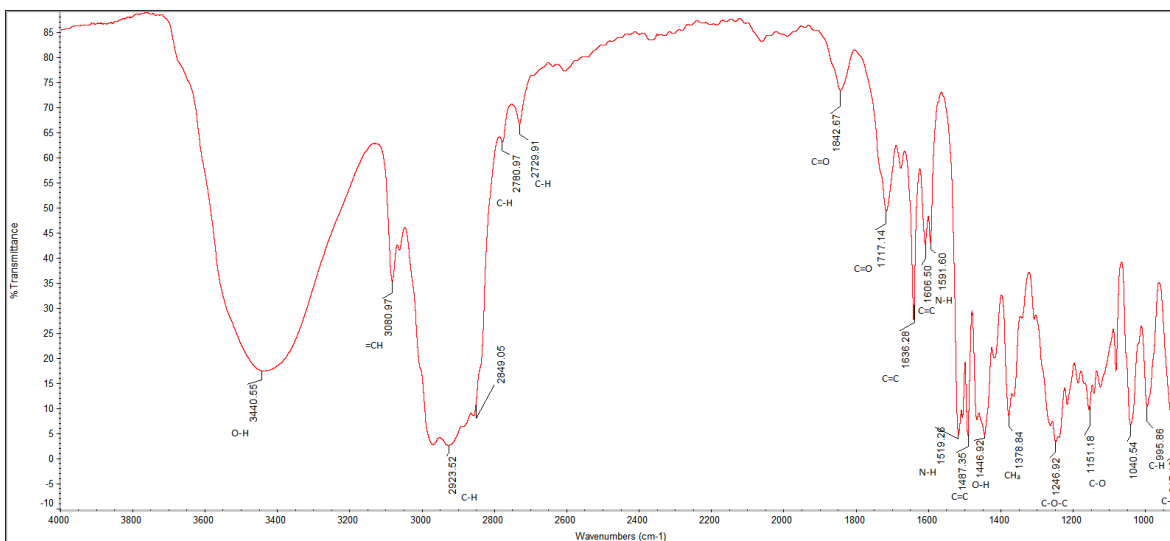


Figura 24. Espectro infrarrojo del AE 3.

Tabla 10. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 3 (Hojas de *L. philippiana*)

Grupo	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3440.55	3400-3300	O-H	Tensión
	1151.18	1260-1000	C-O	
Alquenos	3080.97	3100-3010	=CH	Tensión
	1636.28	1640-1610	C=C	
	1606.50			
	995.86	~990 y ~910	C-H	Flexión

	917.13			
Alcanos	2923.52	2950-2800	C-H	Tensión
	2849.05			
	1378.84	~1375	CH ₃	Flexión
Aldehídos	2780.97	~2850 y ~2750	C-H	Tensión
	2729.91			
Anhídridos	1842.67	1830-1800 y 1775-1740	C=O	Tensión
Cetonas	1717.14	~1715	C=O	Tensión
Aminas	1591.60	1640-1500	N-H	Flexión
	1519.26			
Compuestos aromáticos	1487.35	~1600 y ~1475	C=C	Tensión
Ácidos carboxílicos	1446.92	1440-1400	O-H	Flexión
Éteres	1246.92	~1250 y ~1120	C-O-C	Tensión

La figura 24 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 3. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 10, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.4 AE 4

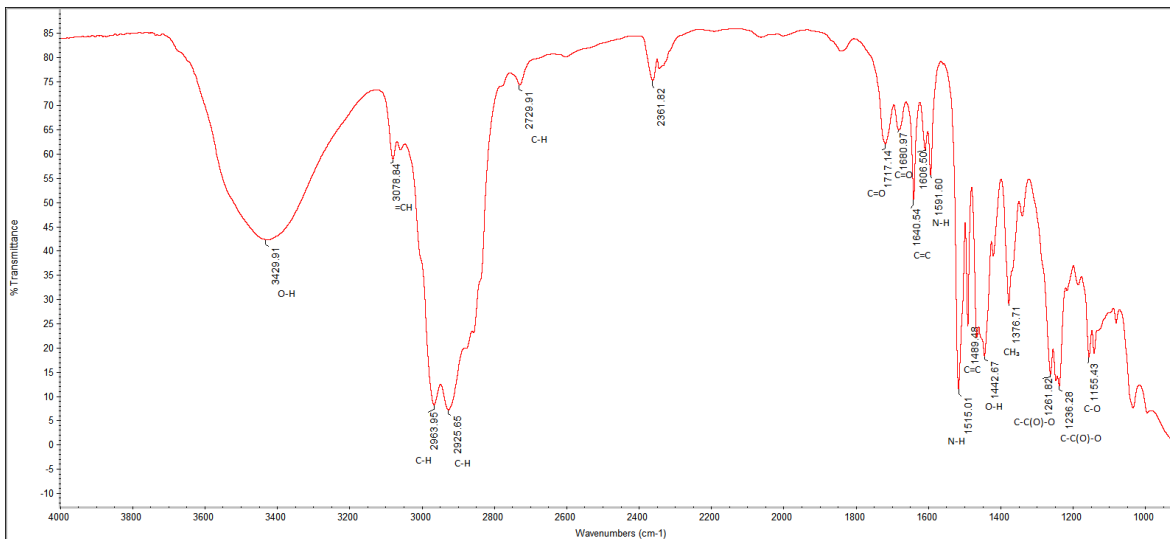


Figura 25. Espectro infrarrojo del AE 4.

Tabla 11. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 4 (Tallos de *L. philippiana*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3429.91	3400-3300	O-H	Tensión
	1155.43	1260-1000	C-O	
Alquenos	3078.84	3100-3010	=CH	Tensión
	1640.54	1640-1610	C=C	
Alcanos	2963.95	2950-2800	C-H	Tensión
	2925.65			

	1376.71	~1375	CH ₃	Flexión
Aldehídos	2729.91	~2850 y ~2750	C-H	Tensión
Cetonas	1717.14	~1715	C=O	Tensión
Amidas	1680.97	1680-1630	C=O	Tensión
Compuestos aromáticos	1606.50	~1600 y ~1475	C=C	Tensión
	1489.48			
Aminas	1591.60	1640-1500	N-H	Flexión
	1515.01			
Ácidos carboxílicos	1442.67	1440-1400	O-H	Flexión
Ésteres	1261.82	1260-1230	C-C(O)-O	Tensión
	1236.28			

La figura 25 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 4. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 11, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.5 AE 5

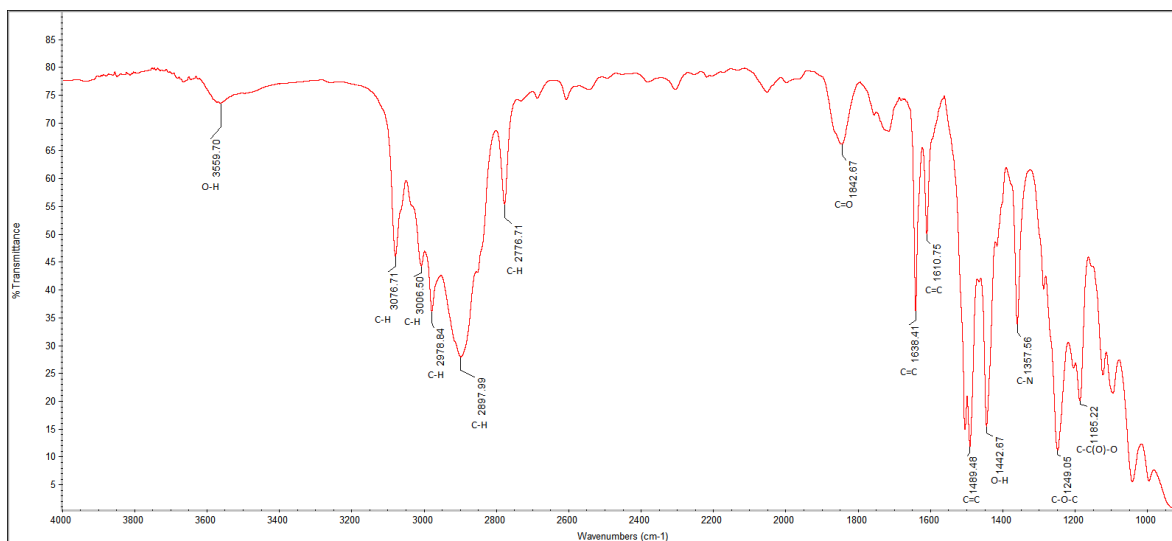


Figura 26. Espectro infrarrojo del AE 5.

Tabla 12. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 5 (Hojas de *L. sempervirens*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3559.70	~3650	O-H	Tensión
Compuestos aromáticos	3076.71	3020-300	C-H	Tensión
	3006.50			
	1489.48	~1600 y ~1475	C=C	
Alcanos	2978.84	2950-2800	C-H	Tensión
	2897.99			

Aldehídos	2776.71	~2850 y ~2750	C-H	Tensión
Anhídridos	1842.67	1830-1800	C=O	Tensión
Alquenos	1638.41	1640-1610	C=C	Tensión
	1610.75			
Ácidos carboxílicos	1442.67	1440-1400	O-H	Flexión
Aminas	1357.56	1360-1250	C-N	Tensión
Éteres	1249.05	~1250 y ~1120	C-O-C	Tensión
Ésteres	1185.22	1210-1160	C-C(O)-O	Tensión

La figura 26 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 5. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 12, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.6 AE 6

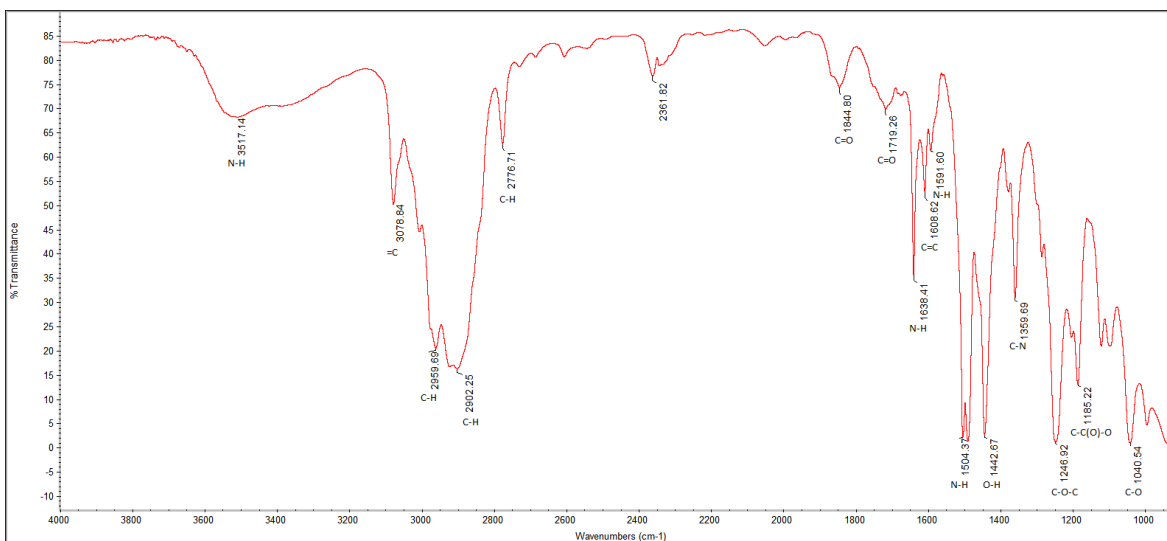


Figura 27. Espectro infrarrojo AE 6.

Tabla 13. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 6 (Tallos de *L. sempervirens*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	1040.54	1260-1000	C-O	Tensión
Alcanos	2959.69	2950-2800	C-H	Tensión
	2902.25			
Aldehídos	2776.71	~2850 y ~2750	C-H	Tensión
Aminas	3517.14	3500-3300	N-H	Tensión
	1638.41	1640-1500	N-H	Flexión

	1591.60			
	1504.37			
	1359.69	1360-1250	C-N	Tensión
Alquenos	3078.84	3100-3010	=CH	Tensión
	1608.62	1640-1610	C=C	
Anhídridos	1844.80	1830-1800 y 1775-1740	C=O	Tensión
Cetona	1719.26	~1715	C=O	Tensión
Ácidos carboxílicos	1442.67	1440-1400	O-H	Flexión
Éteres	1246.92	~1250 y ~1120	C-O-C	Tensión
Ésteres	1185.22	1210-1160	C-C(O)-O	Tensión

La figura 27 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 6. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 13, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.7 AE 7

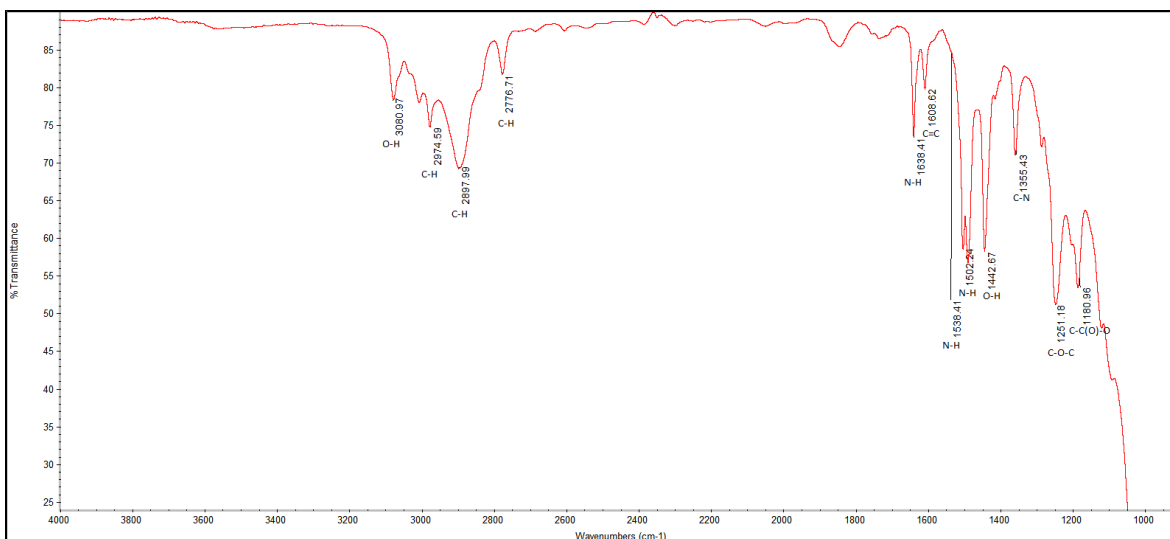


Figura 28. Espectro infrarrojo AE 7.

Tabla 14. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 7 (Hojas de *L. sempervirens*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3080.97	3400-3300	O-H	Tensión
Compuestos aromáticos	1608.62	~1600 y ~1475	C=C	Tensión
Alcanos	2974.59	2950-2800	C-H	Tensión
	2897.99			
Aldehídos	2776.71	~2850 y ~2750	C-H	Tensión

Ácidos carboxílicos	1442.67	1440-1400	O-H	Flexión
Aminas	1638.41	1640-1500	N-H	Flexión
	1538.41			
	1502.24			
	1355.43	1360-1250	C-N	Tensión
Éteres	1251.18	~1250 y ~1120	C-O-C	Tensión
Ésteres	1180.96	1210-1160	C-C(O)-O	Tensión

La figura 28 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 7. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 14, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.8 AE 8

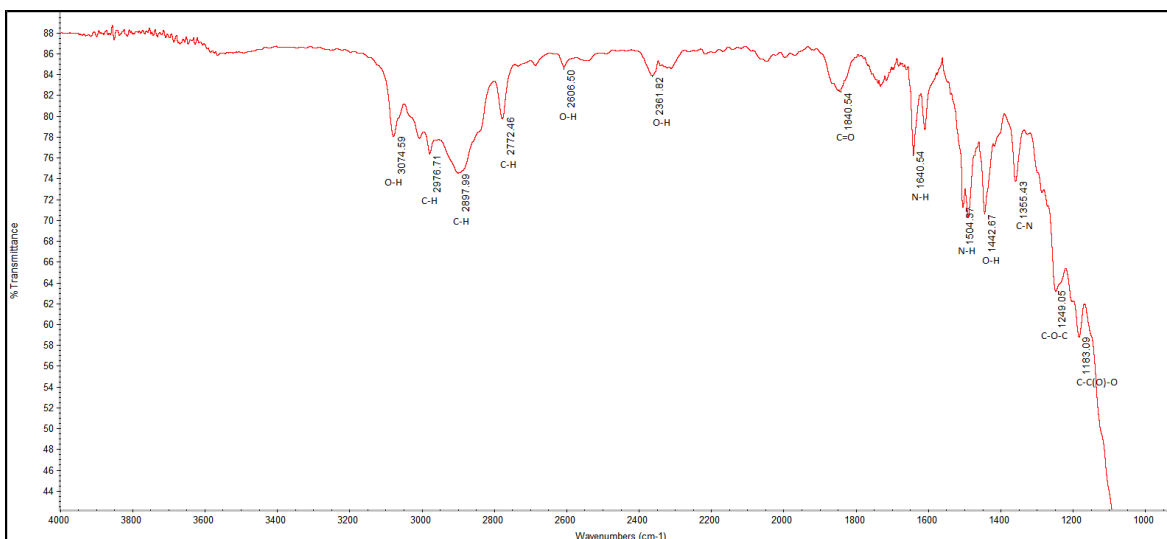


Figura 29. Espectro infrarrojo AE 8.

Tabla 15. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 8 (Hojas de *L. sempervirens*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3074.59	3400-3300	O-H	Tensión
Alcanos	2976.71	2950-2800	C-H	Tensión
	2897.99			
Aldehídos	2772.46	~2850 y ~2750	C-H	Tensión
Anhídridos	1840.54	1830-1800 y 1775-1740	C=O	Tensión
Ácidos	2606.50	3400-2400	O-H	Tensión

carboxílicos	2361.82			
	1442.67	1440-1400	O-H	Flexión
Aminas	1640.54	1640-1500	N-H	Flexión
	1504.37			
	1355.43	1360-1250	C-N	Tensión
Éteres	1249.05	~1250 y ~1120	C-O-C	Tensión
Ésteres	1183.09	1210-1160	C-C(O)-O	Tensión

La figura 29 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 8. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 15, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.9 AE 9

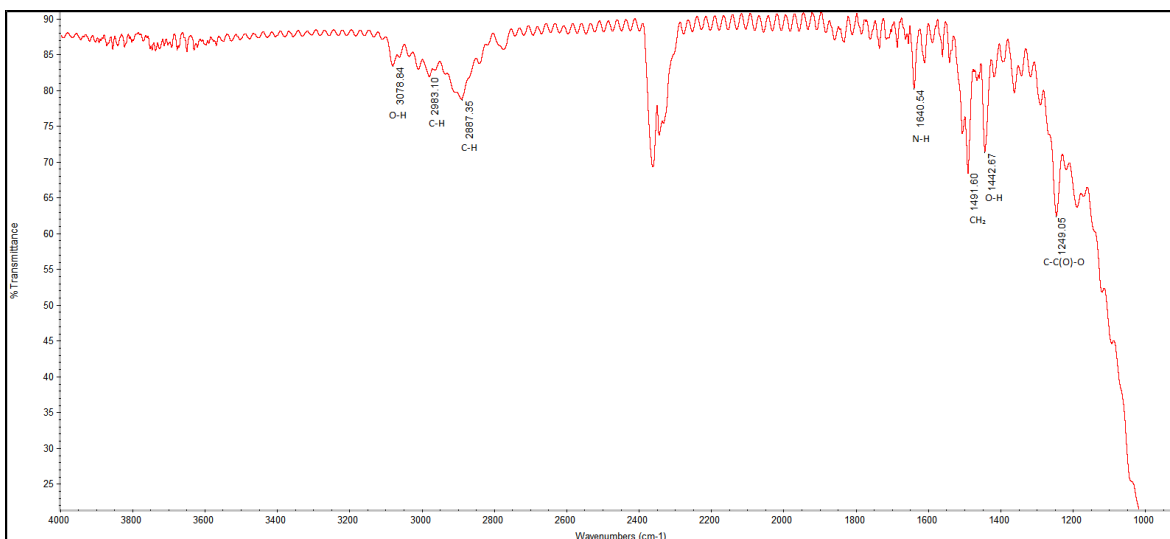


Figura 30. Espectro infrarrojo AE 9.

Tabla 16. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 9 (Hojas de *L. sempervirens*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3078.84	3400-3300	O-H	Tensión
Alcanos	2983.10	2950-2800	C-H	Tensión
	2887.35			
	1491.60	~1465	CH ₂	Flexión
Ácidos carboxílicos	1442.67	1440-1400	O-H	Flexión

Aminas	1640.54	1640-1500	N-H	Flexión
Ésteres	1249.05	1260-1230	C-C(O)-O	Tensión

La figura 30 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 9. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 16, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.10 AE 10

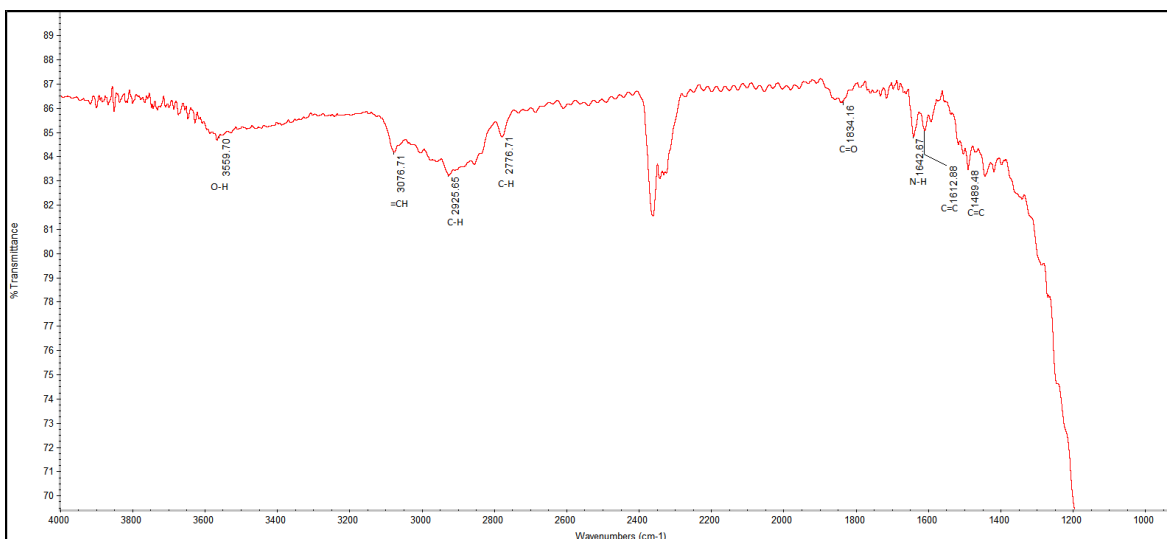


Figura 31. Espectro infrarrojo AE 10.

Tabla 17. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 10 (Hojas de *L. sempervirens*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3559.70	3400-3300	O-H	Tensión
Compuestos aromáticos	1489.48	~1600 y ~1475	C=C	Tensión
Alcanos	2925.65	2950-2800	C-H	Tensión
Aldehídos	2776.71	~2850 y ~2750	C-H	Tensión
Anhídridos	1834.16	1830-1800 y	C=O	Tensión

		1775-1740		
Alquenos	3076.71	3100-3010	=CH	Tensión
	1612.88	1640-1610	C=C	
Aminas	1642.67	1640-1500	N-H	Flexión

La figura 31 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 10. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 17, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.3.11 AE 11

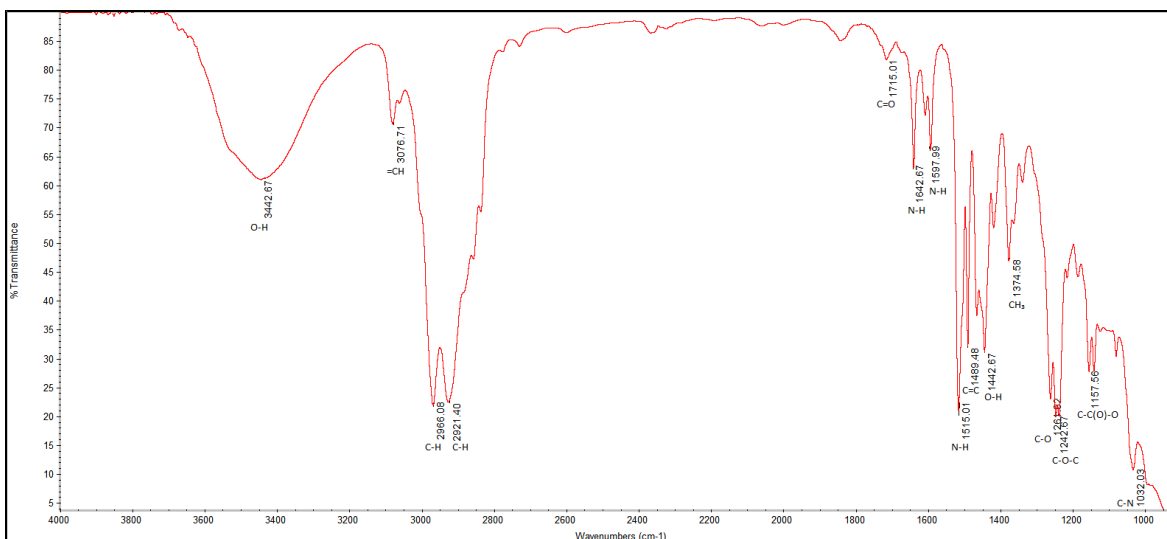


Figura 32. Espectro infrarrojo AE 11.

Tabla 18. Resultados espectroscópicos FT-IR de las principales bandas de absorción del AE 11 (Hojas de *L. sempervirens*)

Grupo Funcional	Frecuencia cm-1(e)	Intervalo de frecuencia cm-1(t)	Enlace	Tipo de vibración
Alcoholes	3442.67	3400-3300	O-H	Tensión
	1261.02	1260-1000	C-O	
Compuestos aromáticos	1489.48	~1600 y ~1475	C=C	Tensión
Alcanos	2966.08	2950-2800	C-H	Tensión
	2921.40			

	1374.58	~1375	CH ₃	Flexión
Alquenos	3076.71	3100-3010	=CH	Tensión
Ácidos carboxílicos	1442.67	1440-1400	O-H	Flexión
Cetona	1715.01	~1715	C=O	Tensión
Aminas	1642.67	1640-1500	N-H	Flexión
	1597.99			
	1515.01			
	1032.03	1200-1025	C-N	Tensión
Éteres	1242.67	~1250 y ~1120	C-O-C	Tensión
Ésteres	1157.56	1210-1160	C-C(O)-O	Tensión

La figura 32 muestra visualmente la espectrometría infrarroja del AE 11. Gracias a las señales y bandas graficadas, se puede deducir que el aceite esencial se compone de los grupos funcionales detallados en la Tabla 18, según los intervalos y frecuencias a las que se comportan.

5.4 Caracterización química del aceite esencial mediante GC-MS

Para la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se acondicionó el equipo GC-MS QP2010 Plus, Shimadzu. La inyección de cada muestra se realizó usando una columna InertCap 5MS (30m x 0.25mm id x 0.25 μ m df). En primera instancia, se realizó una corrida cromatográfica sólo con temperatura y luego se inyectó 1 μ L de hexano supra solvente para lavar la columna. Posteriormente se procedió a inyectar las muestras. Todas las muestras fueron diluidas en hexano supra solvente.

El G.C se operó en modo splitless con 1 μ L de muestra, con helio como gas portador a flujo de 1.50 mL/min, y una temperatura del inyector de 200°C. El horno y la columna se programaron desde 50°C (5 min de retención) hasta 270°C a una velocidad de 8°C min (15 min de retención). Los compuestos de los cromatogramas se identificaron comparando sus espectros de masas con los de la biblioteca de espectros de masas del NIST/EPA/NIH.

Por motivos externos al estudio, no se pudo analizar los AE 2 y AE 4, por lo que no aparecen dentro de los resultados.

Inyección cromatográfica de muestras:

5.4.1 AE 1

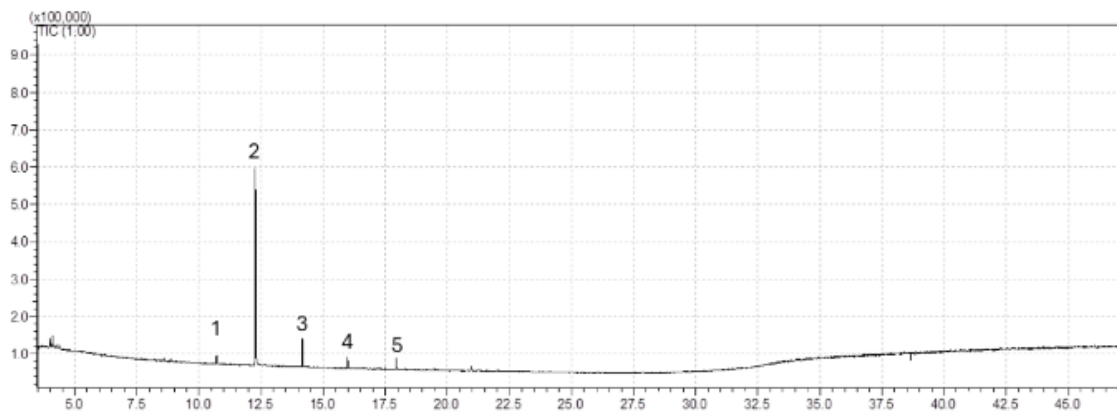


Figura 33. Cromatograma muestra AE 1 (15 ppm). Se identifican 5 analitos, enumerados desde izquierda a derecha.

Tabla 19. Analitos identificados desde la muestra AE 1.

Analito	Nombre compuesto	Similitud	Librería	Tiempo retención (min)	Área (%)
1	2-Hexanone, 3-methyl-4-methylene §§ 4-Ethyl-3-methyl-4-penten-2-one	78	NIST17-1	10.715	1.31
2	Linalool	91	NIST17s	12.264	45.85
3	alpha.-Terpineol §§ 3-Cyclohexene-1-methanol	88	NIST17s	14.163	6.10
4	Safrole §§ 1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)- §§ Benzene, 4-allyl-1,2-(methylenedioxy)	75	NIST17s	15.979	1.98
5	Methyleugenol §§ Benzene	72	NIST17s	17.944	1.80

5.4.2. AE 2

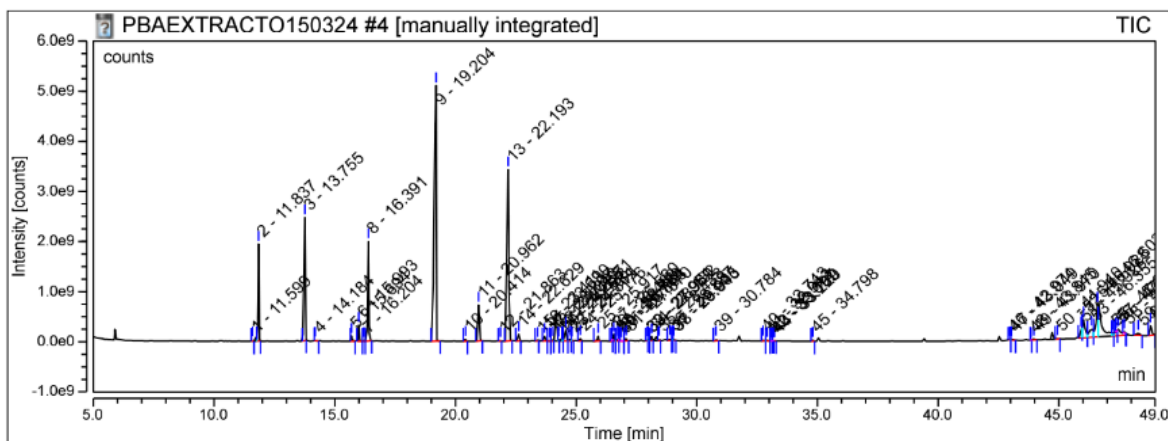


Figura 34. Cromatograma muestra AE 2 (15 ppm). Se identifican 60 analitos.

Tabla 20. Los cinco analitos de mayor concentración identificados desde la muestra AE 2.

Analito	Nombre compuesto	CASNUMBER	Tiempo retención (min)	Área (%)
2	Eucalyptol	470-82-6	11.837	5.26
3	Linalool	78-70-6	13.755	9.15
8	L-a-Terpineol	10482-56-1	16.391	6.56
9	Safrole	94-59-7	19.204	35.50
13	Methyleugenol	93-15-2	22.193	18.65

5.4.3. AE 3

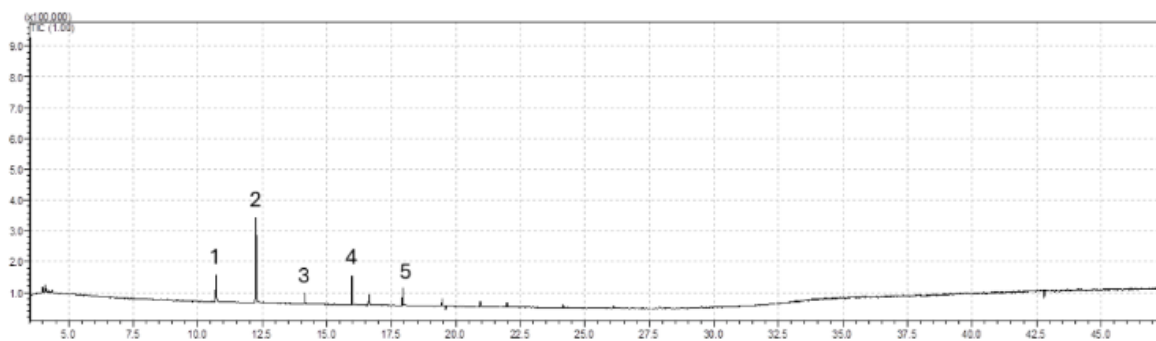


Figura 35. Cromatograma muestra AE 3 (15 ppm). Se identifican 5 analitos, enumerados desde izquierda a derecha.

Tabla 21. Analitos identificados desde la muestra AE 3.

Analito	Nombre compuesto	Similitud	Librería	Tiempo retención (min)	Área (%)
1	5-Hepten-2-one, 6-methyl	82	NIST17-1	10.707	15.25
2	Linalool	91	NIST17s	12.256	48.08
3	alpha.-Terpineol \$\$ 3-Cyclohexene-1-methanol	84	NIST17s	14.157	4.41
4	Safrole \$\$ 1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)- \$\$ Benzene, 4-allyl-1,2-(methylenedioxy)	88	NIST17s	15.975	14.39
5	Methyleugenol \$\$ Benzene	79	NIST17s	17.938	8.84

5.4.4. AE 5

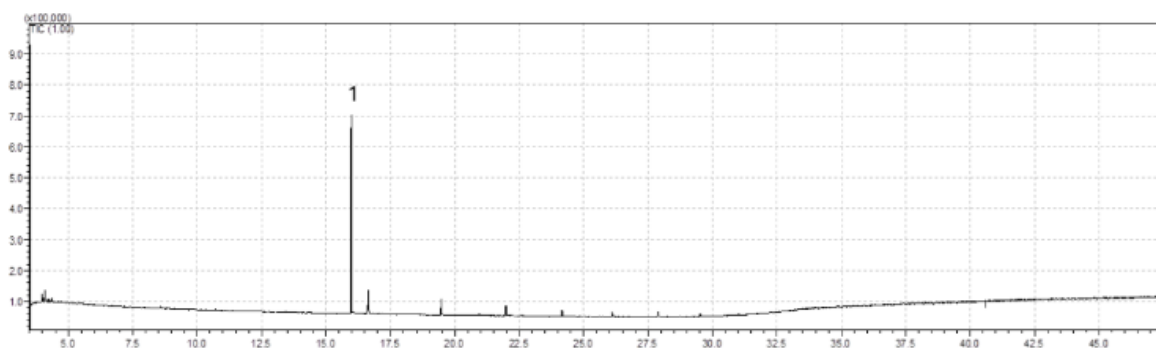


Figura 36. Cromatograma muestra AE 5 (15 ppm). Se identifica 1 analito.

Tabla 22. Analito identificado desde la muestra AE 5.

Analito	Nombre compuesto	Similitud	Librería	Tiempo retención (min)	Área (%)
1	Safrole <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2</chem> 1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)- <chem>CC1=CC=C(C=C1)OC2=CC=CC=C2</chem> Benzene, 4-allyl-1,2-(methylenedioxy)	98	NIST17s	15.979	81.75

5.4.5. AE 7

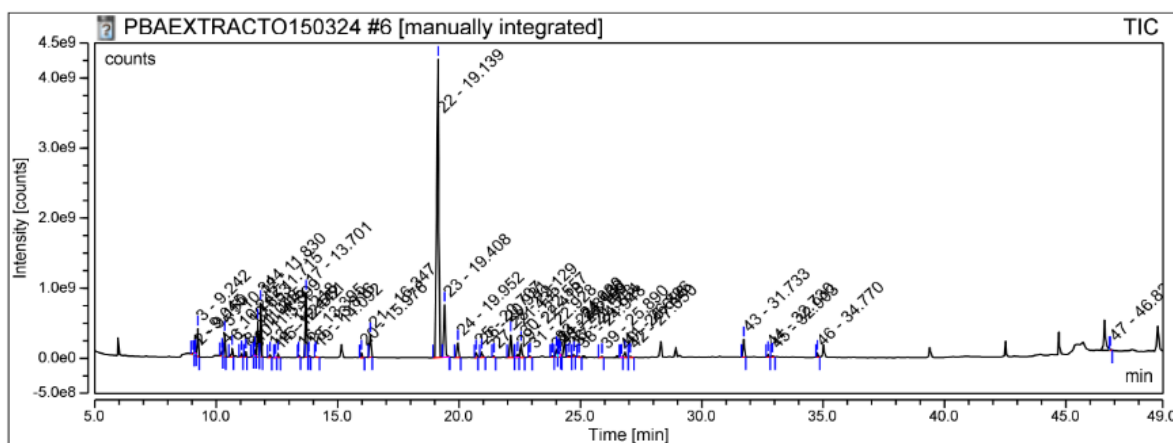


Figura 37. Cromatograma muestra AE 7 (15 ppm). Se identifican 47 analitos.

Tabla 23. Los cinco analitos de mayor concentración identificados desde la muestra AE 7.

Analito	Nombre compuesto	CASNUMBER	Tiempo retención (min)	Área (%)
11	D-Limonene	5989-27-5	11.715	3.74
12	Eucalyptol	470-82-6	11.830	4.43
17	Linalool	78-70-6	13.701	5.54
22	Safrole	94-59-7	19.139	51.40
9	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-	499-75-2	19.408	6.96

5.4.6. AE 8

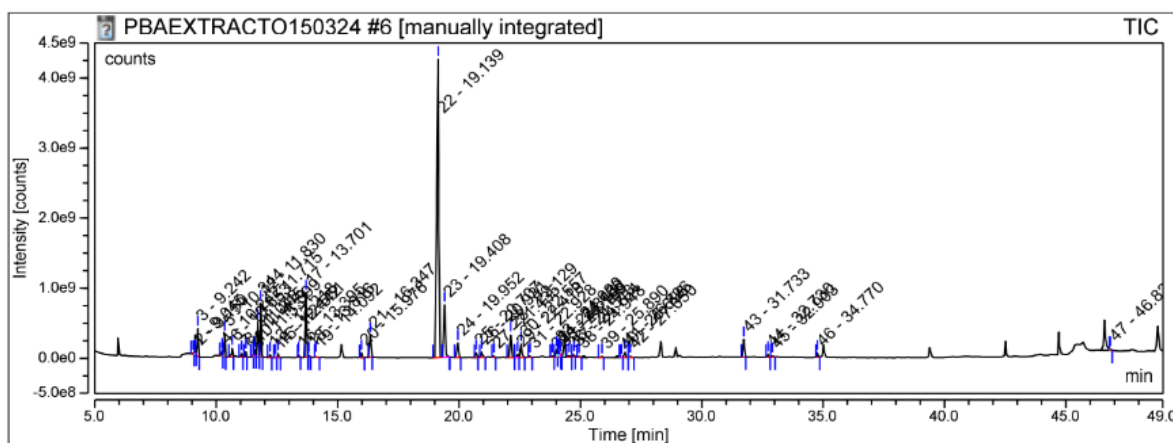


Figura 38. Cromatograma muestra AE 8 (15 ppm). Se identifican 32 analitos.

Tabla 24. Los cinco analitos de mayor concentración identificados desde la muestra AE 8.

Analito	Nombre compuesto	CASNUMBER	Tiempo retención (min)	Área (%)
6	3-Carene	13466-78-9	9.181	3.94
14	Eucalyptol	470-82-6	11.800	3.69
18	Linalool	78-70-6	13.680	4.86
22	Safrole	94-59-7	19.143	68.36
26	Methyleugenol	93-15-2	22.135	3.11

5.4.7. AE 9

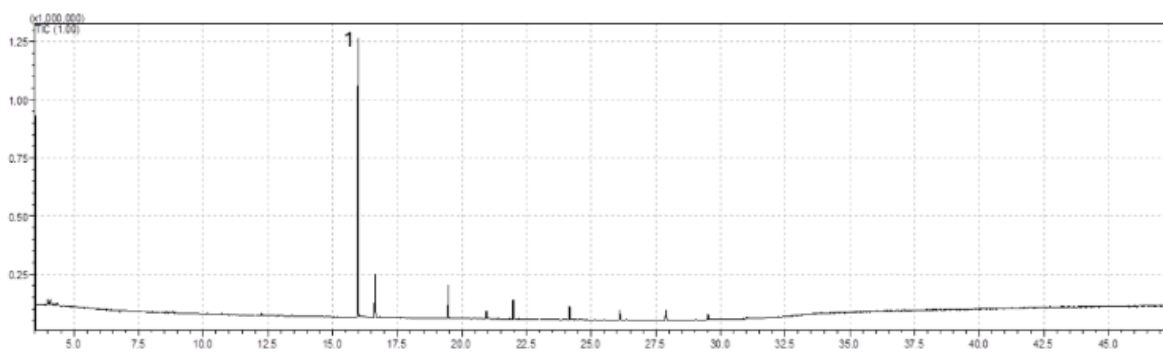


Figura 39. Cromatograma muestra AE 9 (15 ppm). Se identifica 1 analito.

Tabla 25. Analito identificado desde la muestra AE 9.

Analito	Nombre compuesto	Similitud	Librería	Tiempo retención (min)	Área (%)
1	Safrole \$\$ 1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)- \$\$ Benzene, 4-allyl-1,2-(methylenedioxy)	92	NIST17s	15.982	72.49

5.4.8. AE 10

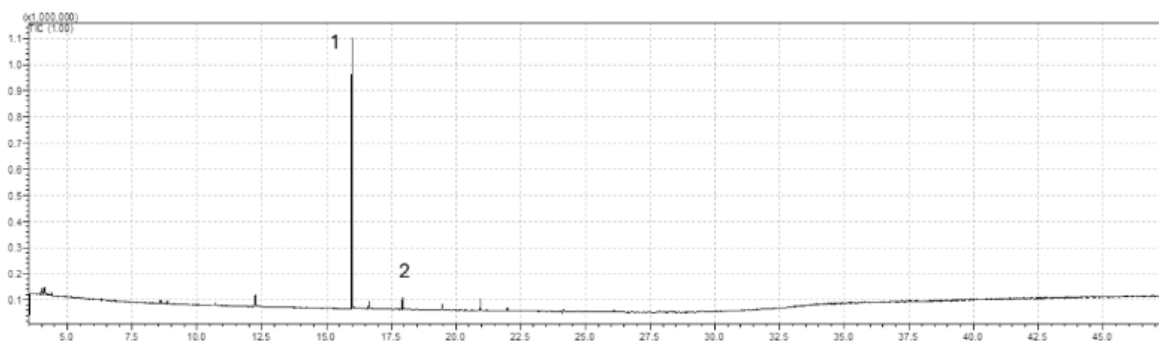


Figura 40. Cromatograma muestra AE 10 (15 ppm). Se identifican 2 analitos.

Tabla 26. Analitos identificados desde la muestra AE 10.

Analito	Nombre compuesto	Similitud	Librería	Tiempo retención (min)	Área (%)
1	Methyleugenol \$\$ Benzene	78	NIST17s	15.981	88.34
2	Safrole \$\$ 1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)- \$\$ Benzene, 4-allyl-1,2-(methylenedioxy)	93	NIST17s	12.252	4.63

5.4.9. AE 11

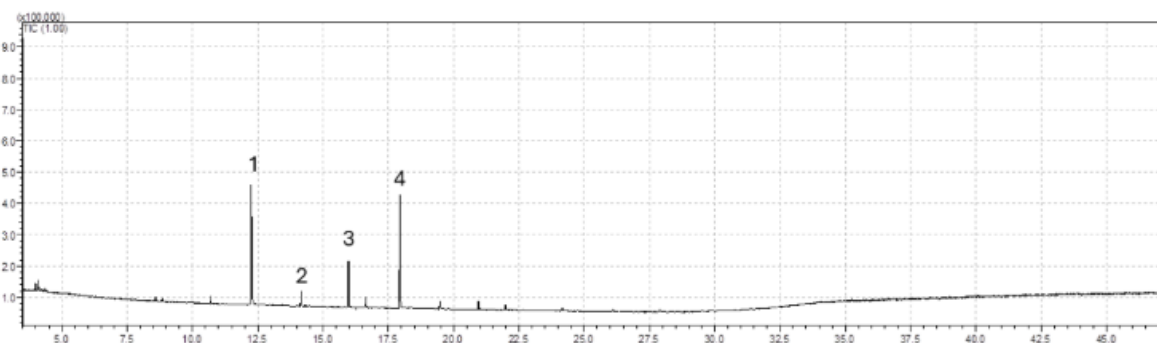


Figura 41. Cromatograma muestra AE 11 (15 ppm). Se identifican 4 analitos.

Tabla 27. Analitos identificados desde la muestra AE 11.

Analito	Nombre compuesto	Similitud	Librería	Tiempo retención (min)	Área (%)
1	Linalool	92	NIST17-1	12.255	44.31
2	alpha.-Terpineol \$\$ 3-Cyclohexene-1-methanol	85	NIST17s	14.155	4.50
3	Safrole \$\$ 1,3-Benzodioxole, 5-(2-propenyl)- \$\$ Benzene, 4-allyl-1,2-(methylenedioxy)	89	NIST17s	15.975	14.74
4	Methyleugenol \$\$ Benzene	87	NIST17s	17.940	33.34

5.5 Ensayos biológicos

En primera instancia, se disolvió en un vaso precipitado 0,01 mg de aceite esencial en 10 ml de etanol. Posteriormente se prepararon las cápsulas petri, en las cuales se depositó la mezcla de la dosis específica de la disolución para cada tratamiento (10, 50 y 100 ppm) con el alimento artificial preparado con distintos materiales. Se dispusieron 3 placas por cada tratamiento, y se repitió el mismo procedimiento con cada uno de los aceites esenciales.

Una vez que el medio de cultivo obtuvo la consistencia sólida en la cápsula, se depositaron 10 larvas de 2do estadio en cada placa para iniciar el experimento. Se realizaron observaciones a las 24 hrs, 48 hrs y 72 hrs; además de una última a los 7 días de comienzo del experimento, una vez aparecidos los imagos.

Tabla 28. N° de larvas muertas y N° pupas en una población de 30 larvas distribuidas en 3 placas

AE	Concentración (ppm)	24 hrs	48 hrs		72 hrs	
		N° larvas muertas	N° larvas muertas	N° pupas	N° larvas muertas	N° pupas
AE 1	10	0	0	1	2	7
	50	0	0	5	1	11
	100	1	2	7	3	11
AE 2	10	2	4	11	8	12
	50	0	1	16	6	24
	100	0	0	16	1	28
AE 3	10	0	0	20	6	24
	50	0	1	16	3	26
	100	6	6	14	6	22
AE 5	10	0	2	21	3	21
	50	0	1	20	1	26

	100	1	1	14	1	23
AE 7	10	0	3	20	4	23
	50	0	0	21	2	27
	100	6	6	13	6	22
AE 8	10	2	18	11	18	11
	50	1	1	19	8	21
	100	5	5	13	7	22
AE 9	10	3	11	18	12	18
	50	0	0	23	4	26
	100	4	5	20	6	26
AE 10	10	0	4	24	5	25
	50	0	2	25	3	27
	100	2	4	22	5	25
AE 11	10	3	5	22	5	25
	50	0	0	29	0	30
	100	0	0	26	0	30

Al igual que en la GC-MS, no aparecen en tabla los AE 2 y AE 4 ya que por razones externas al estudio, no se pudo realizar pruebas biológicas con ellos.

Los aceites esenciales que presentaron mayor actividad larvicida a las 48 horas de observación fueron los AE 8 y AE 9 de *L. sempervirens* con una concentración de 10 ppm (60% y 40% respectivamente). Las concentraciones de 50 y 100 ppm de estos aceites no tuvieron un gran efecto larvicida, sin embargo se pudo apreciar que con estas concentraciones mayores de disolución, se acortó la etapa de pupación de los individuos en aproximadamente 1 día al pupar más del 50% a las 48 hrs de comienzo del experimento con las larvas en segundo estadio.

Respecto a *L. philippiana*, la mayor letalidad se observó con el AE 2 a 10 ppm a las 72 hrs (26,6%), seguido del AE 3 a 10 ppm (20%), sin embargo, tomando en cuenta el tiempo que demoró en causar letalidad y la casi nula actividad larvicida del AE 1, se podría concluir que el efecto mortífero de *L. philippiana* en las larvas de *D. melanogaster* en comparación a *L. sempervirens* es ínfimo. Similar a que con *L. sempervirens*, los AE de *L. philippiana* también aceleraron el ciclo de vida de los organismos en casi un día al tener a las 48 hrs alrededor del 50% de las larvas en estado de pupa. Particularmente, el AE 1 tuvo un casi nulo efecto insecticida y una casi nula afectación sobre el ciclo de vida del insecto.

Resumiendo, se observó que a menores concentraciones de AE es mayor el efecto larvicida, mientras que por el otro lado, las mayores concentraciones del AE tienen un efecto sobre la duración del ciclo de vida de *D. melanogaster* reduciéndolo en cerca de 1 día, tanto para *L. philippiana* como para *L. sempervirens*. Entre ambos, destacan los AE de *L. sempervirens* como los compuestos con mayor efecto letal.

A los 7 días de comenzado el bioensayo se realizó una observación de las placas, donde se dio cuenta de algunas muestras donde las pupas no emergieron, y otras donde ya habían nacido imagos pero quedaban pupas muertas. Además, se dio cuenta de cambios anatómicos en los organismos, viendo alas atrofiadas en los imagos que habían nacido, situación que se repitió en casi el total de las placas, excepto en una de las placas del AE 11 a 50 ppm, donde casi no se observaron mutaciones en los individuos.

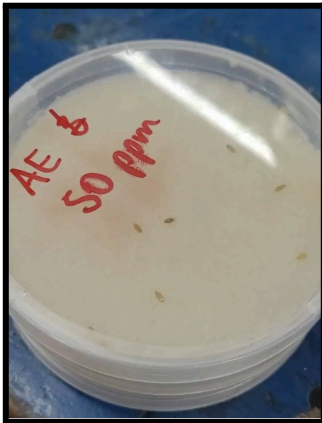


Figura 42. Placa AE 1 50 ppm con pupas muertas.

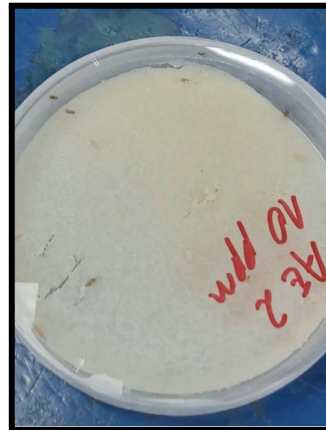


Figura 43. Placa AE 2 10 ppm con pupas y larvas muertas.

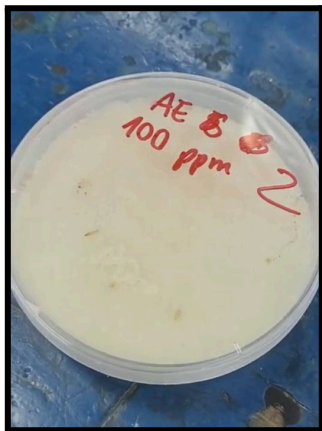


Figura 44. Placa AE 2 100 ppm con pupas y larvas muertas.

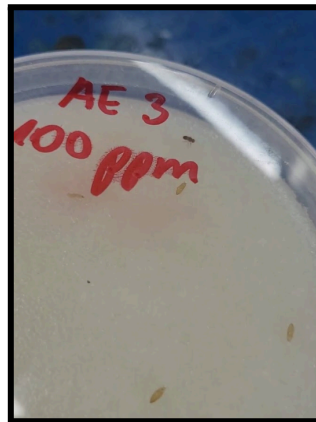


Figura 45. Placa AE 3 100 ppm con pupas muertas.

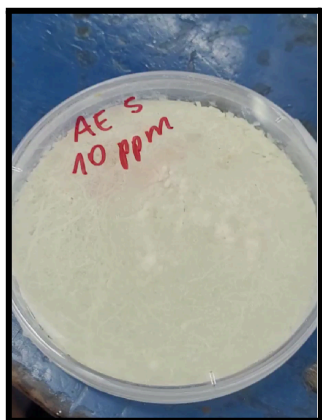


Figura 46. Placa AE 5 10 ppm con pupas muertas enterradas dentro del alimento.

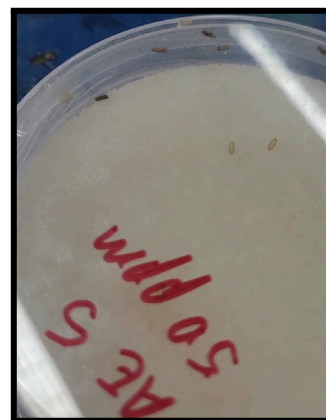


Figura 47. Placa AE 50 ppm con pupas muertas e imagos vivos alrededor.

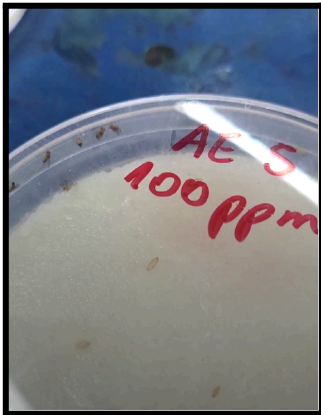


Figura 48. Placa AE 5 100 ppm con pupas muertas y adultos vivos alrededor.

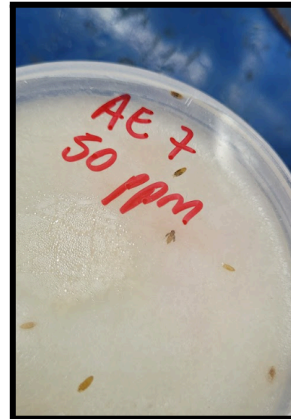


Figura 49. Placa AE 7 50 ppm con pupas muertas y 1 adulto muerto con alas atrofiadas.

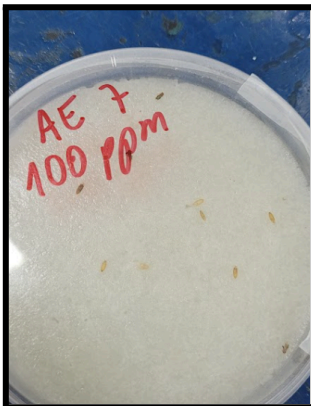


Figura 50. Placa AE 7 100 ppm con pupas muertas y 3 adultos muertos con alas atrofiadas.

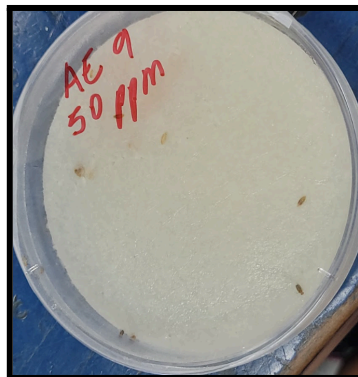


Figura 51. Placa AE 9 50 ppm con pupas muertas y 1 adulto muerto con alas atrofiadas.

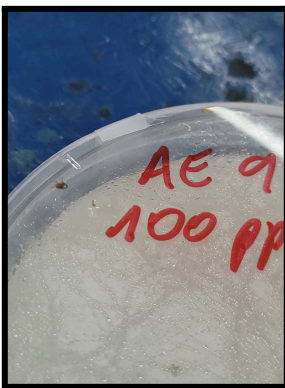


Figura 52. Placa AE 9 100 ppm. Se observa 1 adulto con alas atrofiadas.



Figura 53. Placa AE 10 50 ppm. Se observa 1 adulto con alas atrofiadas.



Figura 54. Placa AE 10 100 ppm con pupas muertas, 1 imago con alas atrofiadas y 1 imago con alas normales.

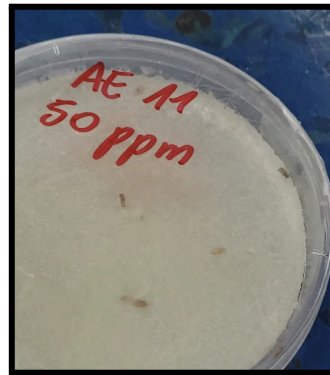


Figura 55. Placa AE 11 50 ppm con pupas muertas, 1 imago con alas atrofiadas y 1 imago con alas normales.



Figura 56. Otra placa AE 11 50 ppm con pupas muertas, e imagos con alas atrofiadas y normales.

6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN, FUENTES E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

- Observación experimental prospectiva
- Tesis, artículos de revista y artículos de sitios web, experimentos de laboratorio.
- Cuadernos de notas, fotografías digitales, observación experimental, datos de otras investigaciones, análisis químico.

7. DISCUSIÓN

La presencia de linalool y safrol como los componentes con mayor concentración en el aceite esencial de *L. philippiana* coincide con lo reportado por otro estudio realizado en el sur de Chile en el 2022 (54), las principales diferencias fueron en la cantidad de metil-eugenol y eucaliptol, lo que puede deberse a diversos factores como el clima, el suelo, la edad del árbol, y los métodos de extracción analítica.

Otra diferencia fue la ausencia de 3-careno, que había sido informada por Bittner, M. et al. en 2007 como el compuesto con mayor cantidad (7). Por otro lado, en nuestro estudio se identificó sulcatona, que había sido reportada en aceite esencial de albahaca, pero hasta hoy no se han realizado estudios que la detecten en *L. philippiana*.

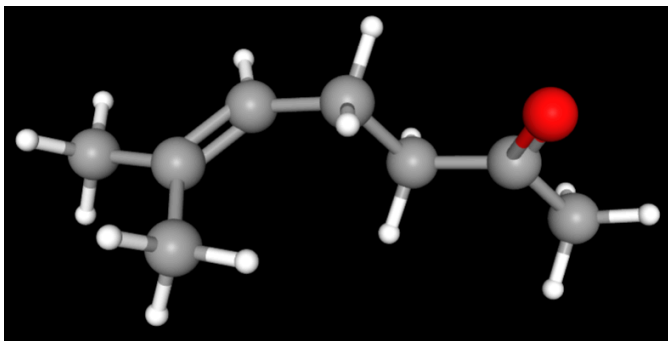


Figura 57. Estructura de Sulcatona (55).

Linalool, safrol y sulcatona han demostrado actividad insecticida contra *S. zeamais* (56) (57) . En el caso de la sulcatona su efecto repelente contra *D. melanogaster* fue estudiado en base al aceite esencial de albahaca, siendo este de los primeros ensayos donde se revela un efecto insecticida utilizando *L. philippiana* en contra de este insecto (58).

Respecto a *L. sempervirens*, safrol y metil-eugenol destacaron como los componentes principales en casi todos los aceites extraídos, lo que guarda símil con lo obtenido por Ortiz, C. en el 2017 (59), empero, la concentración de metil-eugenol y el resto de los componentes también tuvo variaciones en cuanto a cantidad. La presencia de 3-careno en el aceite esencial había sido informada por Bittner et al. en 2009 (7).

En nuestro estudio fue identificado Carvacrol, un compuesto que ha evidenciado genotoxicidad y mutaciones en *D. melanogaster* (60), lo que sumado a los efectos mutagénicos descritos de los metabolitos de safrol y metil-eugenol puede dar respuesta a los cambios anatómicos observados al final del experimento en cuanto a la atrofia de las alas (61). La capacidad de respuesta de los ensayos SMART a los compuestos recombinagénicos y los metabolitos de safrol y eugenol como responsables de genotoxicidad observada en *D. melanogaster* exhibe una identificación de peligros humanos y riesgos para la salud (62) al ser compuestos localizables en productos de la industria de alimentos, cosméticos, pesticidas y herbicidas.

8. CONCLUSIÓN

Este estudio reportó por primera vez la evaluación de la actividad larvicida de dos aceites esenciales obtenidos de plantas nativas chilenas sobre *Drosophila melanogaster*.

- Los aceites de *Laurelia sempervirens* destacaron por su mayor letalidad, especialmente en concentraciones bajas (10 ppm), siendo AE 8 y AE 9 los más efectivos con tasas de mortalidad de 60% y 40% respectivamente a las 48 horas. Sin embargo, concentraciones más altas no incrementaron significativamente la letalidad.
- En contraste, los aceites de *Laureliopsis philippiana* mostraron menor actividad larvicida, alcanzando su mayor efectividad con AE 2 y AE 3 a 10 ppm con tasas de 26,6% y 20% respectivamente a las 72 horas.
- La composición química de los aceites esenciales reveló durante los análisis que están compuestos por algunas moléculas bioactivas que sustentan su actividad insecticida. Los hallazgos por estudios previos podrían explicar los efectos subletales observados en los cambios anatómicos de los insectos, como la atrofia de las alas en los imagos y fallas en la emergencia de los mismos, lo que resalta el potencial genotóxico de algunos componentes.

Estos hallazgos no solo confirman la capacidad de los aceites esenciales como agentes de control biológico, sino que también plantean repercusiones importantes para la salud humana debido a la presencia de estos compuestos en productos cotidianos. A pesar de los resultados prometedores, deben realizarse estudios adicionales para comprender mejor los mecanismos de acción, y evaluar formulaciones estables en ensayos de campo para considerar su uso práctico en programas de manejo de plagas.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Gonzalez SI. Actividad antifúngica de aceites esenciales aislados de plantas nativas del sur de Chile contra hongos filamentosos de importancia clínica. [Internet]. [Valdivia]: Universidad Austral de Chile; 2014 [cited 2022 Dec 11]. Available from: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/fcg643a/doc/fcg643a.pdf>
2. Abello L. Tapa (*Laureliopsis philippiana*) [Internet]. 2011 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.flickr.com/photos/lucianativa/5397161550/in/photostream/>
3. Andes M. *Laureliopsis philippiana*. 2011.
4. Ortiz CP. Variación estacional de las propiedades insecticidas e insectistáticas de los aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* Tul y *Laureliopsis philippiana* Looser (Monimiaceae) en el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) [Internet]. [Chillan]: Universidad de Concepción; 2016 [cited 2022 Dec 11]. Available from: http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/2121/3/Tesis_Variacion_estacional_de_las_propiedades.pdf
5. Chilebosque. Ficha de descripción de *Laureliopsis philippiana*. [Internet]. Chilebosque; 2016 [cited 2023 Dec 15]. Available from: http://www.chilebosque.cl/flora/laureliopsis_philippiana.html
6. Valdés-Pérez O, Borrego-Alonso S, Vivar-González I, AnayaVillalpanda M, Molina-Veloso A. Actividad antifúngica del aceite esencial de clavo de olor en el control del biodeterioro fúngico de documentos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2016;47:78–85.
7. Bittner M, Aguilera MA, Hernández V, Arbert C, Becerra J, Casanueva ME. FUNGISTATIC ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS EXTRACTED FROM *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde AND *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. (CHILEAN MONIMIACEAE) [Internet]. 2009 [cited 2022 Dec 11]. Available from: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/chiljar/v69n1/at04.pdf>
8. Moreno IP, Vega PB. Sección coordinada y dirigida por Dípteros de interés agronómico. Agromícidos plaga de cultivos hortícolas intensivos. [Internet]. Vol. 33. Almería; 2003 [cited 2023 Dec 15]. Available from: http://sea-entomologia.org/PDF/BOLETIN_33/B33-054-293.pdf
9. Schaaf AA. Valoración de impacto ambiental por pesticidas agrícolas. *Observatorio Medioambiental* [Internet]. 2015 Nov 24 [cited 2023 Dec 15];18:87–96. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/38809339.pdf>

10. Montenegro I, Pino L, Werner E, Madrid A, Espinoza L, Moreno L, et al. Comparative study on the larvicidal activity of drimane sesquiterpenes and nordrimane compounds against *Drosophila melanogaster* til-til. *Molecules* [Internet]. 2013 Apr [cited 2022 Dec 11];18(4):4192–208. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/18/4/4192>
11. Giordani C, Spinozzi E, Baldassarri C, Ferrati M, Cappellacci L, Santibañez Nieto D, et al. Insecticidal Activity of Four Essential Oils Extracted from Chilean Patagonian Plants as Potential Organic Pesticides. *Plants* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2022 Dec 11];11(15). Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/15/2012>
12. Angurell I, Casamitjana N, Caubet A, Dinares I, Llor N, Muñoz-Torrero D, et al. Universitat de Barcelona. [cited 2023 Dec 15]. Destilación por arrastre de vapor. Available from: https://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/destilacio_tipus.html#vapor
13. Linde A. Cromatografía de gases [Internet]. Barcelona; [cited 2022 Dec 11]. Available from: https://www.linde-gas.es/es/images/Cromatograf%C3%ADa%20de%20gases%2019107-01_tcm316-120150.pdf
14. Formación Alcalá. Espectrometría de masas: Qué es, elementos y usos en el laboratorio clínico. 2021 Mar 12 [cited 2023 Dec 15]; Available from: <https://www.formacionalcala.com/articulos/68/espectrometria-de-masas-que-es-element%20os-y-usos-en-el-laboratorio-clinico#title-1>
15. Arborizacion. Laurelia Sempervirens | Laurel Chileno [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.arborizacion.cl/laurelia-sempervirens-laurel-chileno/>
16. Vivero Pilmaiquen. Laurel [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.viveropilmaiquen.cl/producto/laurel/>
17. Chilebosque. Chilebosque. [cited 2023 Dec 15]. Laurelia Sempervirens. Detalle de los frutos. Available from: <http://www.chilebosque.cl/tree/lsemp10.jpg>
18. PatagoniaNatureJournal. Laurelia Sempervirens. [Internet]. 2014 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://patagonianaturejournal.wordpress.com/2014/11/25/laurelia-sempervirens/>
19. Solis C, Jurgens K, Manosalva C. “Estudio fitoquímico y toxicológico de Laurelia Sempervirens” [Internet]. [Valdivia]: Universidad Austral de Chile; 2012 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fcs687e/doc/fcs687e.pdf>
20. Martínez A. UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA ACEITES ESENCIALES [Internet]. 2001 [cited 2023 Dec 15]. Available from: https://www.med-informatica.net/TERAPEUTICA-STAR/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf

21. PubChem. Eugenol [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Eugenol>
22. Zhao J, Miao J, Zhao B, Zhang S, Yin D. Safrole oxide inhibits angiogenesis by inducing apoptosis. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2005 Jun [cited 2023 Dec 15];43(1):69–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1537189105001035>
23. PubChem. Safrole [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Safrole>
24. PubChem. Isopreno [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6557>
25. Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, et al. Natural products – antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res* [Internet]. 2009 Jul [cited 2022 Dec 11];11(7):621–38. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10286020902942350>
26. Aguirre-Obando OA, Duarte-Gandica I, Álvarez-Londoño JC, Jiménez-Montoya JA. Actividad larvícida de extractos vegetales de la familia Asteraceae y modelación matemática para su uso en el control de poblaciones de *Aedes aegypti*. *Actualidades Biológicas* [Internet]. 2018 Jan 1;40(108). Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/actbio/article/view/333119>
27. Terrartropoda. Ficha Mosca de la Fruta - *Drosophila* sp. [Internet]. 2018 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://terrartropoda.wordpress.com/2018/04/06/ficha-mosca-de-la-fruta-drosophila-sp/>
28. SINC. La mosca de la fruta baña sus huevos en alcohol para prevenir infecciones. 2013 Feb 21 [cited 2023 Dec 15]; Available from: <https://www.agenciasinc.es/Noticias/La-mosca-de-la-fruta-bana-sus-huevos-en-alcohol-para-prevenir-infecciones>
29. Grotemeyer A. Characterisation and application of new optogenetic tools in *(Drosophila)* *(melanogaster)* [Internet]. University Hospital Erlangen; 2019 [cited 2023 Dec 15]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/332188515_Characterisation_and_application_of_new_optogenetic_tools_in_Drosophila_melanogaster
30. Bruker. ¿Qué es la espectroscopía infrarroja y FT-IR? ¿Hay alguna diferencia? [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html>

31. Mettler Toledo. What Is Refractive Index (Index of Refraction)? [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: https://www.mt.com/us/en/home/applications/Application_Browse_Laboratory_Analytics/Refractive_index/definition_and_measurement.html#:~:text=The%20refractive%20index%20of,wavelength%20of%20the%20light%20beam.
32. Legaz Berbel R, Riba Ruiz JR, Baquero Armans G. Estudio de la viscosidad y densidad de diferentes aceites para su uso como biocombustible [Internet]. 2010 Jun [cited 2023 Dec 15]. Available from: <http://hdl.handle.net/2099.1/9403>
33. CisLab. Tipos y Funciones del Destilador [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.cislab.com.mx/blog/el-blog-del-quimico-1/tipos-y-funciones-del-destilador-68>
34. Zarza L. iagua. [cited 2023 Dec 15]. ¿Qué es la destilación y para qué sirve? Available from: <https://www.iagua.es/respuestas/que-es-destilacion-y-que-sirve>
35. Instrumentosdelaboratorio. Destilador de agua [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.instrumentosdelaboratorio.net/2012/05/destilador-de-agua.html>
36. Agudelo G. Lo que necesitas saber antes de comprar un rotaevaporador [Internet]. 2021 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://intekgroup.com.co/lo-que-necesitas-saber-antes-de-comprar-un-rotaevaporador/#:~:text=El%20rotaevaporador%20o%20rotavapor%20es,de%20los%20puntos%20de%20ebullic%C3%B3n>
37. Labbox. Evaporador rotativo: Todo lo que debe saber [Internet]. 2022 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://esp.labbox.com/evaporador-rotativo-todo-lo-que-debes-saber/>
38. Cotecno. Balanza de laboratorio [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.cotecno.cl/balanza-de-laboratorio-tipos-de-balanzas/>
39. Mettler Toledo. Balanza Analítica ME 204.
40. Fisher Scientific. Embudos de filtración [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.fishersci.es/es/es/browse/90094208/embudos-de-filtraci%C3%B3n?page=1>
41. Alcantara S. Tp Laboratorio Químico. [cited 2023 Dec 15]. Embudo. Available from: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/embudo.html>
42. Alcantara S. Tp Laboratorio Químico. [cited 2023 Dec 15]. Papel filtro. Available from: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/papel-filtro.html>

43. Onelab. ¿Cómo funciona un picnómetro? [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.onelab.com.ar/como-funciona-un-picnometro>
44. Ciencia Analítica Tecnología. Picnómetro: Tipos y usos en el laboratorio [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.cromtek.cl/2023/03/09/picnometro-tipos-y-usos-en-el-laboratorio/>
45. Equiposylaboratorio. Refractómetros: ¿Qué es un refractómetro, Tipos de refractómetros, ¿Cómo funcionan y para qué sirven? [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.equiposylaboratorio.com/portal/articulo-ampliado/refractometros:-que-es-un-refractometro-tipos-de-refractometros-como-funcionan-y-para-que-sirven>
46. ABBE. Refractómetro de Mesa ABBE UNIVERSAL [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://labexco.com/product/refractometro-de-mesa/>
47. Aquae Fundación. Agua destilada: definición y propiedades [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.fundacionaquae.org/wiki/que-es-agua-destilada/#:~:text=El%20agua%20destilada%20est%C3%A1%20compuesta,iones%20del%20agua%20de%20origen>
48. PubChem. Water [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Water>
49. PRTR. Diclorometano [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://prtr-es.es/Diclorometano-DCM,15622,11,2007.html>
50. INNST. Diclorometano [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=0058&p_lang=es
51. PubChem. Methylene Chloride [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6344>
52. Laboratoriumdiscounter. Sulfato de magnesio [Internet]. [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://www.laboratoriumdiscounter.nl/es/quimicos/a-z/m/sulfato-de-magnesio/>
53. PubChem. Magnesium sulfate-anhydrous [Internet]. 2023 [cited 2023 Dec 15]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Magnesium-sulfate-anhydrous>
54. Pérez-San Martín A, Uribe K, Hernández-Montelongo J, Naveas N, Manso-Silván M, Oyarzún P, et al. Antibacterial Activity and Kinetic Release of Laureliopsis philippiana (Looser) Essential Oil from Nanostructured Porous Silicon with Surface-Functionalization Alternatives. Applied Sciences (Switzerland). 2022 Aug 1;12(16).
55. Pubchem. PubChem. (2024). 6-Methyl-5-hepten-2-one. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-Methyl-5-hepten-2-one>. 2024. Sulcatone.

56. Herrera-Rodríguez C, Ramírez-Mendoza C, Becerra-Morales I, Silva-Aguayo G, Urbina-Parra A, Figueroa-Cares I, et al. Bioactivity of peumus boldus molina, laurelia sempervirens (Ruiz & Pav.) Tul. and Laureliopsis philippiana (Looser) schodde (Monimiaceae) essential oils against sitophilus zeamais motschulsky. *Chil J Agric Res.* 2015 Sep 1;75(3):334–40.
57. Achimón F, Brito VD, Peschiutta ML, Jacquat AG, Zygadlo JA, Pizzolitto RP. Efecto insecticida y repelente de la Sulcatona contra el gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais*. VII Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales, III Jornadas Nacionales de Plantas Medicinales Nativas [Internet]. 2022 [cited 2025 Jan 1]; Available from: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/154568>
58. Anggraeni T, Nisrine N, Barlian A, Sumarsono SH. Repellency of some essential oils against *Drosophila melanogaster*, vector for bacterium blood disease in banana plantation. *Journal of Entomology.* 2018;15(3):125–34.
59. Ortiz C, Silva G, Moya E, Fischer S, Urbina A, Rodríguez JC. VARIACIÓN ESTACIONAL DE LA REPELENCIA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE MONIMIACEAE SOBRE *Sitophilus zeamais* Motschulsky (CURCULIONIDAE). *Chilean journal of agricultural & animal sciences.* 2017;(ahead):0–0.
60. Nesterkina M, Bilokon S, Alieksieieva T, Chebotar S, Kravchenko I. Toxic effect and genotoxicity of carvacrol ethers in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 2020 May;821:111713.
61. Munerato MC, Sinigaglia M, Reguly ML, de Andrade HHR. Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2005 Apr;582(1–2):87–94.
62. Pitchakarn P, Inthachat W, Karinchai J, Temviriyankul P. Human Hazard Assessment Using *Drosophila* Wing Spot Test as an Alternative In Vivo Model for Genotoxicity Testing—A Review. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 14;22(18):9932.