

**Universidad Peruana Cayetano Heredia**

**Facultad de Ciencias y Filosofía**

**“Alberto Cazorla Talleri”**



**ACTIVIDAD REPELENTE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE  
“PACHA SALVIA” (*Lepechinia meyenii* WALPERS) Y “MUÑA”  
(*Minthostachys mollis* GRISEBACH) FRENTE A *Anopheles albimanus*  
COLECTADOS EN LA REGION TUMBES**

**CALDERÓN FERNÁNDEZ, PIERRE IVÁN**

**Tesis para optar por el Título Profesional de Químico Farmacéutico**

**LIMA – PERÚ**

**2018**

**Miembros del jurado:**

**Dra. Rojas Duran, Rosario**

**M.Sc. Untiveros Bermúdez, Graciela**

**Lic. Lescano Bajarano, Jorge**

*Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección de:*

*M.Sc. Villegas Vélchez, León Faustino.*

## **DEDICATORIA**

*A las dos personas más importantes en mi vida, responsables de lo que era, soy y seré. Dedico este trabajo de investigación a mis padres Bacelides y Sarela por su inagotable apoyo y paciencia. Son ustedes mi principal motivo y reflejo de superación.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis padres, por brindarme el financiamiento requerido para culminar la investigación en aras de mi superación profesional.*

*A mi asesor principal León Villegas Vélchez y asesora externa Rosario Balta León, por sus constantes coordinaciones y evaluaciones que permitieron terminar la investigación satisfactoriamente.*

*Al incondicional profesor Camilo Díaz Santibáñez, ya que a partir de su sabiduría y consejo marcó el inicio del presente trabajo de investigación.*

*Al Laboratorio Regional Referencial de Tumbes del Instituto Nacional de Salud (INS), por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar los ensayos correspondientes.*

*A los profesionales que conforman el Departamento de entomología del Laboratorio Regional Referencial de Tumbes por impartir su conocimiento técnico indispensable para la culminación de esta investigación.*

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos Botánicos generales.....	4
1.1.1 Clasificación taxonómica de <i>Lepechinia meyenii</i> Walpers (Pacha salvia). .....	4
1.1.1.1 Hábitat y descripción.....	4
1.1.1.2 Usos.....	5
1.1.2 Clasificación taxonómica de <i>Minthostachys mollis</i> Grisebach (Muña) .....	5
1.1.2.1 Hábitat y descripción.....	6
1.1.2.2 Usos.....	6
1.2 Aspectos generales de Malaria y su distribución.....	6
1.2.1 Malaria o Paludismo .....	6
1.2.2 Distribución geográfica del <i>Plasmodium vivax</i> .....	7
1.2.3 Ciclo de vida del <i>Plasmodium vivax</i> .....	8
1.3 Aspectos generales del mosquito vector .....	10
1.3.1 Clasificación sistemática de <i>Anopheles albimanus</i> .....	10
1.3.2 Características generales de la familia Culicidae.....	10
1.3.3 Características generales del mosquito <i>Anopheles albimanus</i> .....	11
1.3.4 Ciclo de vida .....	12
1.4 Aspectos generales de los aceites esenciales .....	12
1.5 Aspectos generales de los repelentes .....	13
<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1 Pregunta de investigación .....	15
2.2 Objetivo general.....	15
2.3 Objetivos específicos .....	15
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1 Instalaciones de ejecución .....	16
3.2 Equipos y Materiales. ....	16
3.3 Métodos .....	17
3.3.1 Colección e identificación de muestras vegetales .....	17
3.3.1.1 Colección de muestras vegetales de <i>Lepechinia meyenii</i> Walpers .....	17
3.3.1.2 Colección de muestras vegetales de <i>Minthostachys mollis</i> Grisebach....	17

3.3.2	Colección e identificación de <i>Anopheles albimanus</i> .....	18
3.3.3	Extracción del aceite esencial .....	18
3.3.4	Diluciones de los aceites esenciales .....	19
3.3.6	Análisis de Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas.....	19
3.3.7	Test de Repelencia .....	20
3.3.7.1	Bioensayo .....	20
3.3.7.2	Cálculo del Porcentaje de Repelencia .....	22
3.3.8	Análisis Estadístico.....	24
3.3.8.1	Diagrama de Caja-Bigote (boxplots o box and whiskers).....	22
3.3.8.2	Prueba de Mann-Whitney.....	23
3.3.9	Diagrama de procesos de la investigación.....	23
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	Cantidad de aceite esencial obtenido y determinación del rendimiento.....	25
4.2	Características organolépticas y densidad de los aceites esenciales <i>Lepechinia meyenii</i> Walpers (Pacha salvia) y <i>Minthostachys mollis</i> Grisebach (Muña).....	26
4.3	Constituyentes del Aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> Walpers(Pacha salvia)..	26
4.4	Constituyentes químicos del Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> Grisebach (Muña). .....	29
4.5	Resultados de la actividad repelente del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> Walpers (Pacha salvia).....	31
4.6	Resultados de la actividad repelente del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> Grisebach (Muña). .....	33
4.7	Diagrama Caja-Bigotes (boxplots o box and whiskers).....	34
4.8	Resultados obtenidos mediante la prueba estadística de Mann-Whitney .....	36
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>456</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>47</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valoración del grado de repelencia según Talukder y Howes	22
Tabla 2. Características fisicoquímicas s de los aceites esenciales de <i>Lepechinia meyenii</i> Walp. (Pacha salvia) y <i>Minthostachys mollis</i> Griseb. (Muña).	26
Tabla 3. Constituyentes químicos del aceite esencial del <i>Lepechinia meyenii</i> Walp. (Pacha salvia) por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.	27
Tabla 4. Constituyentes químicos del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb. (Muña) por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.	29
Tabla 5. Cantidad de mosquitos repelidos de <i>Anopheles albimanus</i> , Porcentaje (PR) y Grado de repelencia del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> Walp. (Pacha salvia).	32
Tabla 6. Cantidad de mosquitos repelidos de <i>Anopheles albimanus</i> , Porcentaje (PR) y Grado de repelencia del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb. (Muña)	34
Tabla 7. Principales datos obtenidos mediante la prueba de Mann-Whitney para <i>Lepechinia meyenii</i> Walp. (Pacha salvia)	37
Tabla 8. Principales datos obtenidos mediante la prueba de Mann-Whitney para <i>Minthostachys mollis</i> Griseb. (Muña)	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumen del ciclo de vida del <i>Plasmodium vivax</i> según Mueller	9
Figura 2. Características morfológicas de <i>Anopheles albimanus</i> .	11
Figura 3. Principales pasos del bioensayo	21
Figura 4. Diagrama de procesos de la investigación	24
Figura 5. Cromatograma GC-MS del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> Walp. (Pacha salvia).	28
Figura 6. Cromatograma GC-MS del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb. (Muña).	31
Figura 7. Porcentaje de repelencia de aceite extraído de <i>Lepechinia meyenii</i> Walp. (Pacha salvia) a diferentes dosis	33
Figura 8. Porcentaje de repelencia del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> Griseb. (Muña) a diferentes concentraciones.	35
Figura 9. Diagrama Caja-Bigotes para <i>Lepechinia meyenii</i> Walp. (Pacha salvia)	35
Figura 10. Diagrama Caja-Bigotes para <i>Minthostachys mollis</i> Griseb. (Muña)	36

## ABREVIACIONES

AE	Aceite esencial
C+	Control positivo
C-	Control negativo
°C	Grado Celsius
Cm	Centímetros
DEET	N-N- dietil-m-toluamida
Kg.	Kilogramo
g.	Gramos
LM	<i>Lepechinia meyenii</i> Walpers
MM	<i>Minthostachys mollis</i> Grisebach
mL	Mililitro
M.S.N.M	Metros sobre el nivel del mar
PR	Porcentaje de repelencia
USP	Convención de la Farmacopea de Estados Unidos
tR	Tiempo de retención
μl	Microlitro
V/v	Volumen/ volumen
N/D	No determinado
α	Alfa
β	Beta

## RESUMEN

La Malaria es una enfermedad infecciosa causada por parásitos del género *Plasmodium* (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae*) el cual constituye uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial. El mosquito *Anopheles albimanus* es uno de los principales vectores de la Malaria que en su mayoría transmiten *Plasmodium vivax*. En el Perú, en 2017 se registraron un total de 44.171 casos de malaria presentes en las regiones de Loreto, Amazonas, Junín, La Libertad, San Martín, Cusco, Cajamarca, Puno y Tumbes, de los cuales 33.368 casos fueron causados por *Plasmodium vivax* y 10.803 casos producidos por *Plasmodium falciparum*.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad repelente *in vitro* de los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) frente a *Anopheles albimanus* colectados en la región de Tumbes.

Se prepararon disoluciones al 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 y 10 % v/v de los aceites esenciales. Como control positivo se empleó un repelente comercial que contiene N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET al 15 %) y aceite mineral USP como control negativo.

Se determinaron 39 constituyentes químicos por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) en el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) encontrándose en mayor cantidad el  $\beta$ -pineno (22.96%) seguido de 3-careno (19.45%) y  $\alpha$ -Pineno (12.48). De los 35 constituyentes determinados en el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) mostró la pulegona (38.02%) como constituyente mayoritario, seguido de mentona (34.29%) y D-isomentona (6.95%). Así mismo se determinó que aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walpers al 2.0% presenta buena actividad catalogándose como un repelente de grado IV con 80% de repelencia. Mientras que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach al 1.5% presentó una buena actividad catalogándose como un repelente de grado III logrando un porcentaje de repelencia de 60 %.

Palabras clave: Efecto repelente, Aceite esencial, *Anopheles albimanus*, *Lepechinia meyenii*, *Minthostachys mollis*.

## ABSTRACT

Malaria is an infectious disease caused by parasites of the genus *Plasmodium* (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium malariae*) which is one of the main public health problems worldwide. The mosquito *Anopheles albimanus* is one of the vectors of malaria that mostly transmits *Plasmodium vivax*. In Perú, in 2017 there were a total of 44,171 cases of malaria in the regions of Loreto, Amazonas, Junín, La Libertad, San Martín, Cusco, Cajamarca, Puno and Tumbes, of which 33,368 cases were caused by *Plasmodium vivax* and 10,803 cases produced by *Plasmodium falciparum*.

The objective of this study is to evaluate the repellent activity *in vitro* of the essential oils of *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) and *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) against *Anopheles albimanus*. Likewise, the chemical constituents of said essential oils were determined.

Essential oils were diluted at concentrations of; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 10 % v/v. As a positive control was used a commercial repellent which contains N, N-diethyl-3-methylbenzamide (15% DEET), and USP mineral oil as the negative control.

The major chemical constituents present in the essential oil of *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) were  $\beta$ -pinene (22.96%), followed by 3-carene (19.45%) and  $\alpha$ -Pinene (12.48); while the major compound present in the essential oil of *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) was pulegone (38.02%) followed by menthone (34.29%) and D-isomenthone (6.95%). Finally, it was determined that *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) essential oil at 2% has high repellency, being classified as a grade IV repellent with 80% repellency. While the essential oil of *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) at 1.5% presented good repellency, it was classified as a grade III repellent, achieving a repellence percentage of 60%.

Keywords: Repellent effect, Essential oil, *Anopheles albimanus*, *Lepechinia meyenii*, *Minthostachys mollis*.

# 1. INTRODUCCIÓN

La Malaria es una enfermedad tropical endémica causada por parásitos del género *Plasmodium* el cual representa uno de los principales problemas de salud pública para el país y a nivel mundial <sup>(1,2)</sup>. La transmisión de la enfermedad se lleva a cabo por la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles* de una persona infectada hacia una persona sana. En el Perú existen más de 40 especies de este vector, y los principales son: *An. Pseudopunctipennis*, *An.albimanus*, *An.benarrochi*, *An.calderoni* y *An.darlingi* <sup>(3,4)</sup>.

Las enfermedades transmitidas por mosquitos representan un enorme problema en climas tropicales y sub tropicales, ninguna parte del mundo está inmune a este riesgo, convirtiéndose en un tema relevante en salud pública ya que por el momento no se dispone de una vacuna efectiva y solo puede ser prevenida evitando la picadura del mosquito <sup>(5)</sup>.

En el Perú, en 2017 se registraron un total de 44.171 casos de malaria en su mayoría provenientes del departamento de Loreto, de los cuales 33.368 casos fueron causados por *Plasmodium vivax* y 10.803 casos producidos por *Plasmodium falciparum*. En la Región Loreto, durante el 2017, 51 distritos notificaron 40072 casos de Malaria debido a *P. vivax*, 2,1% más casos que el año previo. Las regiones de Cajamarca y Pasco reportaron 2 casos cada una y, un caso en Puno y Tumbes <sup>(6)</sup>.

En lo que respecta a la región Tumbes, desde el 2012 el número de casos de malaria disminuyó notablemente, siendo los casos registrados por año casi cero asociados a brotes estacionarios <sup>(7)</sup>.

Una de las principales medidas de control vectorial que se realizan en la actualidad es mediante el rociamiento de insecticidas de origen sintético tanto peri e intra domiciliario, sin embargo presentan una serie de inconvenientes tales como contaminación ambiental, eliminación de insectos benéficos para la bio-ecología, aparición de resistencia por parte de los vectores, además de un elevado costo ya que afectan directamente a la salud humana y animal <sup>(8-10)</sup>. Por ello una solución viable para estos problemas es el desarrollo de repelentes

como medida alternativa de protección contra vectores, las cuales signifiquen un costo razonable, seguridad e inocuidad y que favorezcan al ecosistema y al ser humano<sup>(11)</sup>.

Los repelentes son sustancias que actúan de forma local evitando que un insecto en pleno vuelo se pose y pique en la piel<sup>(12,13)</sup>. Hoy en día, se comercializa repelentes sintéticos y naturales o una mezcla de ellos. El más conocido es el DEET (N-N- dietil-m-toluamida) es el más eficaz, persistente en la piel y comercializado hace más de 50 años.<sup>(14,15)</sup> Debido a su patrón de uso limitado la exposición al DEET proviene solo de aplicaciones personales y no se utiliza en la agricultura, por lo tanto, no se encuentra presente en los alimentos. Se descompone lentamente en el suelo y con bastante rapidez en la atmosfera<sup>(16)</sup>. A pesar de que el DEET ha superado muchas pruebas de toxicidad, presenta un alto grado de absorción cutánea y hay pruebas que muestran su efecto tóxico desde niveles leves a severos<sup>(17-19)</sup>. En este sentido, las investigaciones están siendo orientadas hacia el desarrollo de productos derivados de plantas, cuyo potencial en particular radica en la baja predisposición de los extractos vegetales a generar fenómenos de resistencia en vectores de transmisión.

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles, algunos de ellos con actividad atrayente o repelente de insectos.<sup>(20,21)</sup> Desde el punto de vista económico, los productos sintéticos aún son utilizados con mayor frecuencia como repelentes en contraste con los aceites esenciales. No obstante, las posibilidades a futuro son prometedoras, ya que estos tienen potencial para proporcionar productos repelentes eficientes, seguros e inocuos para las personas y el medio ambiente<sup>(22,23)</sup>.

Ciertos estudios concluyen que los aceites esenciales con mayor potencial repelente se extraen de plantas de géneros como *Cymbopogon* spp., *Eucalyptus* spp y *Ocimum* spp. Estos géneros producen la mayoría de los repelentes de origen vegetal utilizados en el mundo<sup>(24)</sup>.

Es así que los aceites esenciales de plantas como *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon nardus*, presentaron un efecto repelente significativo sobre adultos de *Aedes aegypti*, *Anopheles albimanus* y *Anopheles arabiensis* mientras que los aceites esenciales extraídos de *Eucalyptus globulus* solamente sobre *Anopheles albimanus*<sup>(25,26)</sup>.

Aceites esenciales de una gran variedad de plantas de otras familias tales como: *Acantholippia seriphioides*, *Achyrocline satureioides*, *Aloysia citriodora*, *Anemia tomentosa*, *Baccharis spartioides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus saligna*, *Hyptis mutabilis*, *Rosmarinus officinalis*, *Tagetes minuta*, *Tagetes pusilla* y *Zanthoxylum piperitum* también demostraron actividad repelente contra *Aedes aegypti* <sup>(27,28)</sup>.

En zonas andinas del Perú, se sabe por conocimiento tradicional que las hojas de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) repelen de alguna forma una gran variedad de insectos, puesto que se suele cubrir los sacos de las recientes cosechas con este tipo de plantas evitando así que los insectos como gorgojos y polillas perjudiquen al producto guardado <sup>(29)</sup>.

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad repelente *in vitro* de los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) frente a *Anopheles albimanus*, mosquito vector de Malaria colectados en la región de Tumbes. Del mismo modo se plantea determinar los constituyentes químicos principales de cada aceite esencial responsables de la actividad repelente. De esta manera se pretende contribuir y consolidar el uso de aceites esenciales extraídos de plantas como una herramienta alternativa en el control de mosquitos vectores de enfermedades.

## 1.1 Aspectos Botánicos generales

### 1.1.1 Clasificación taxonómica de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia)

La clasificación taxonómica de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) según la base de datos del Missouri Botanical Garden <sup>(30)</sup> es:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Sympetalae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Lepechinia*

Especie: *Lepechinia meyenii*

Sinonimia botánica: *Sphacele meyenii* (Walp.), *Stachys meyenii* (Walp.)

Nombres comunes: Salvia, Pasasalvia, Salvigateadora, Pacha salvia y Kota puriña.

#### 1.1.1.1 Hábitat y descripción

Es una hierba perenne, de tallos subterráneos; pecíolo en margen de 3-6 mm de longitud; hojas crenadas, mayormente de forma ovoide, obtuso, redondeado en la base; 2-5 cm de largo, 1-4 cm de ancho, rugoso y finamente hirtulo encima, puberulento debajo; sus flores son foliosas con dientes estrechamente deltoides (Anexo 1).

Crece en terrenos llanos, secos y en laderas. En el Perú está distribuido en Ancash, Huánuco, Junín, Huancavelica, Cajamarca, Cuzco, La Libertad y Puno <sup>(31)</sup>.

### **1.1.1.2 Usos**

Las hojas son usadas en la medicina popular contra el dolor de estómago, como digestivo, para el tratamiento de fiebre tifoidea, ciclo menstrual irregular, reumatismo, malaria y como un desinfectante para evitar la tuberculosis <sup>(32,33)</sup>. En el Callejón de Huaylas, entre Caraz y Huaraz y en la Región de los Libertadores Wari, los pobladores la usan como infusión de planta entera sola o combinada con culén y orégano blanco para el tratamiento de diarreas, cólicos, afecciones hepáticas y como aperitivo <sup>(34)</sup>.

### **1.1.2 Clasificación taxonómica de *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña)**

La clasificación taxonómica de *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) según la base de datos del Missouri Botanical Garden <sup>(30)</sup> es:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Minthostachys*

Especie: *Minthostachys mollis*

Sinonimia botánica: *Minthostachys mandoniana* (Brig.), *Minthostachys tomentosa* (Benth.)

Nombres comunes: Muña, Huaycho, Coa, Ismuña.

### **1.1.2.1 Hábitat y descripción**

Es un arbusto muy aromático, pubescente, de 0,50 a 1,50 m de altura que crece en forma de mata. Hojas aovadas, de base por lo general redondeada, de 2-3 cm de largo por 1-2 cm de ancho, bordes aserrados, raros enteros y revolutos, con pecíolos de 5-10 mm. Flores en las axilas de las hojas en cimas de 4 inflorescencias por nudo, con pedúnculos cortos de hasta 10 mm de largo, con 10-20 flores cada uno; cáliz de más o menos 2 mm de largo, corola de color blanco, tubo de más o menos 3 mm de largo (Anexo 2).

En el Perú está distribuido en Cajamarca, Amazonas, La Libertad, Lima, Huánuco y Junín <sup>(35)</sup>.

### **1.1.2.2 Usos**

Es utilizado como antiinflamatorio, carminativo, antiséptico, analgésico en afecciones renales y respiratorias. Se utiliza como pesticida, para conservar la papa, para lo cual se cubre con la Planta y se controla la germinación y el ataque de las plagas.

Las hojas y flores frescas o secas se agregan a las comidas para equilibrarlas, como condimento en la preparación de carnes y guisos <sup>(36)</sup>.

## **1.2 Aspectos generales de Malaria y su distribución**

### **1.2.1 Malaria o Paludismo**

La Malaria o Paludismo es una enfermedad febril aguda causado por parásitos del género *Plasmodium* (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium knowlesi*) que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos hembra infectados del género *Anopheles*, los llamados vectores del paludismo. En un individuo no inmune, los síntomas suelen aparecer entre 10 y 15 días tras la picadura del mosquito infectivo. Puede resultar difícil reconocer el origen palúdico de los primeros síntomas (fiebre, dolor de cabeza y escalofríos) ya que pueden ser leves y de no tratarse terapéuticamente en las primeras 24 horas puede agravarse desencadenando anemia grave,

sufrimiento respiratorio relacionado con acidosis metabólica, paludismo cerebral y en el peor de los casos afectación multiorgánica. En las zonas donde el paludismo es endémico, las personas pueden adquirir una inmunidad parcial, lo que posibilita la aparición de infecciones asintomáticas <sup>(37)</sup>.

Durante el 2015, se registró un total de 451.242 casos de malaria en la región de las Américas, lo que significó una reducción de 62% con respecto al año 2000, pero un aumento de 16% con respecto a lo observado en 2014 cuando se registró el menor número de casos de malaria en las últimas cuatro décadas. Ocho de los 21 países endémicos (Colombia, Ecuador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Perú, Venezuela y República Dominicana) notificaron un aumento de casos con respecto al año anterior <sup>(38)</sup>.

En el Perú, en lo que va del 2018, se han reportado un total de 552 casos de Malaria debido a *Plasmodium vivax*, notificados en los departamentos de Loreto, Amazonas, Junín, La Libertad, San Martín, Cusco y Lima, de los cuales se han confirmado cuatro fallecidos, un caso en cada uno de los siguientes distritos: Pastaza, Ramón Castilla, Urarinas y Emilio San Martín todos en la Región Loreto. <sup>(39)</sup>.

### **1.2.2 Distribución geográfica del *Plasmodium vivax***

De las cinco especies de *Plasmodium* causantes de paludismo humano, *Plasmodium vivax* es la que tiene la distribución geográfica más amplia, de modo que aproximadamente un 35% de la población mundial está en riesgo de contraerlo <sup>(40)</sup>.

La distribución de *Plasmodium vivax* depende de varios factores, uno de los más importantes es la presencia de los mosquitos vectores apropiados para la transmisión del parásito. Existen más de 70 especies de mosquitos anofelinos capaces de transmitir el paludismo, aunque se cree que solo 40 de ellas contribuyen de forma significativa a su transmisión. Las condiciones climáticas representan otro factor importante, en especial la temperatura, las cuales permiten el desarrollo del parásito en el vector. Como último factor, la genética humana, en particular la distribución de un rasgo conocido como negatividad Duffy, un antígeno que al encontrarse

ausente en el individuo desarrolla eritrocitos resistentes a la infección. Este rasgo es característico de muchas poblaciones africanas, pero rara en el resto del mundo <sup>(41-43)</sup>. Por ello el *Plasmodium vivax* es raro en muchas partes de África, aunque los datos obtenidos en viajeros de retorno de ese continente indican que puede tener una baja endemicidad en casi todos los países del África subsahariana <sup>(44)</sup>.

### **1.2.3 Ciclo de vida del *Plasmodium vivax***

Realizada la picadura, los esporozoítos inoculados en la piel por mosquitos *Anopheles* hembra llegan al torrente sanguíneo y penetran en los hepatocitos. Aquí el *Plasmodium vivax* puede diferenciarse a esquizontes tisulares que, tras miles de replicaciones mitóticas en cada hepatocito, liberan merozoitos hacia el torrente sanguíneo. También, dentro del hepatocito puede desarrollarse a una fase latente denominada hipnozoíto, que tras su activación pasadas semanas, meses o años causa recidivas clínicas. El merosoma representado en la Figura 1, solo se ha descrito, hasta ahora, en el paludismo de roedores, pero es de suponer que también esté presente en las fases tardías de las infecciones hepáticas por *Plasmodium vivax*. Los merozoitos liberados luego de la ruptura del merosoma, invaden sobre todo los reticulocitos.

Algunos parásitos de *Plasmodium vivax* pueden diferenciarse a gametocitos maduros y justamente estos gametocitos son los infecciosos para los mosquitos anofelinos antes de que aparezcan los síntomas clínicos en el individuo. Tras ser captados por los mosquitos *Anopheles* durante la ingesta de sangre, los gametocitos empiezan el ciclo sexual, que incluye la liberación de gametos macho y hembra, la fertilización y la formación de un oocineto móvil que atraviesa el epitelio del intestino medio del mosquito donde se diferencian en una nueva forma replicativa conocida como oocisto. La liberación de esporozoítos, la migración y la invasión de las glándulas salivares completan este complejo ciclo vital, en el cual el parásito pasa por más de 10 fases de diferenciación celular e invade al menos cuatro tipos de células en dos huéspedes diferentes <sup>(45)</sup>.

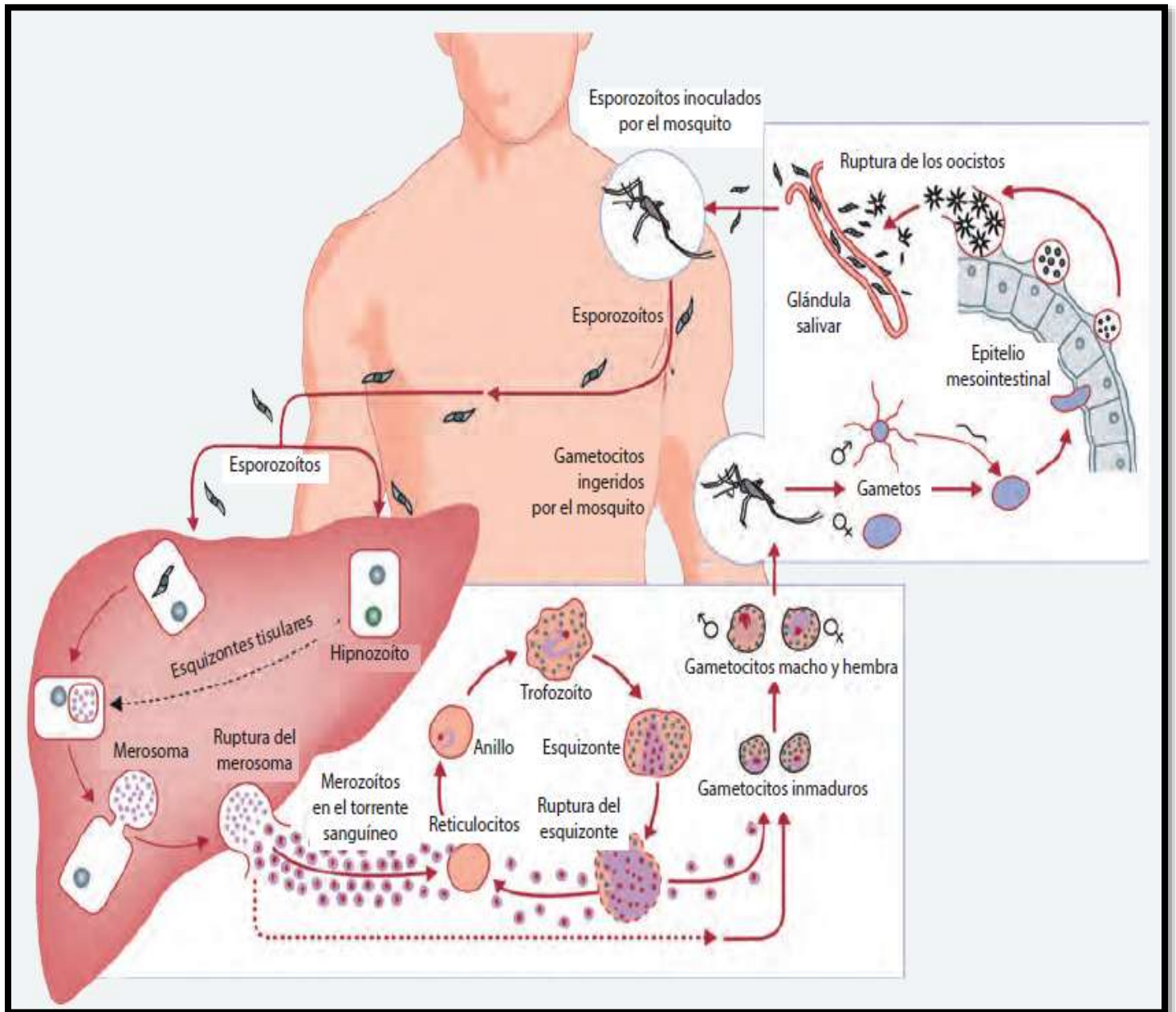


Figura 1. Resumen del ciclo de vida del *Plasmodium vivax* según Mueller <sup>(45)</sup>

## 1.3 Aspectos generales del mosquito vector

### 1.3.1 Clasificación sistemática de *Anopheles albimanus*

La clasificación sistemática del mosquito *Anopheles albimanus* es <sup>(46)</sup>:

Reino: Animalia

Filo: Artrhopoda

Clase: Insecta

Orden: Díptera

Familia: Culicidae

Género: *Anopheles*

Especie: *A. albimanus*

### 1.3.2 Características generales de la familia Culicidae

Los culícidos llamados “mosquitos” o “zancudos” son especímenes delicados de 3 a 9 mm de longitud. Con cabeza globosa, grandes ojos compuestos y no presentan ocelos. Las antenas largas y finas nacen de los lados de la frente, conformadas por 12 o 15 segmentos. En la base de cada segmento nacen pelos que en el caso de los machos son largos y densamente dispuestos dando la apariencia de una pluma; en la hembra por el contrario, los pelos son cortos y escasos. Las piezas bucales son de tipo estiletiforme, las cuales están contenidas en un estuche, formando la llamada probóscide. A cada lado de la probóscide se encuentran los palpos, los cuales sirven para distinguir a los sexos y para separar la subfamilia *Anophelinae* de la subfamilia *Culicinae*. En los culícidos (subfamilia *Culicinae*) los palpos de las hembras miden menos de la mitad de la longitud de la probóscide. En los anofelinos (subfamilia *Anophelinae*) los palpos de ambos sexos son casi tan largos como la probóscide <sup>(47)</sup>.

### 1.3.3 Características generales del mosquito *Anopheles albimanus*

El mosquito *Anopheles albimanus* por lo general es de color castaño oscuro y de tamaño mediano. Su probóscide larga y delgada de tonalidad oscura sin anillos. Los parpos son tan largos como la probóscide oscura y con anillos blancos apicales. El tórax, en su región dorsal, es de color gris oscuro y presenta tres manchas oscuras, dos laterales y una posterior. Las alas presentan escamas oscuras y blanco amarillentas. El abdomen es de color castaño oscuro. Las patas son largas y delgadas con anillos blancos. Sus trompas, tórax y abdomen forman una línea recta y en reposo se mantiene en posición inclinada dentro de un ángulo comprendido entre 45° y 90° <sup>(48)</sup>.

Las crías se desarrollan en aguas dulces expuestas a la luz del sol, con poca materia orgánica y con o sin vegetación. El mosquito adulto tiene una longevidad de dos meses aproximadamente, la hembra pica ávidamente tanto al hombre como a los animales (androzoofílico) preferiblemente de noche. Algunos se alimentan dentro de los hogares (endofagia), mientras que otros prefieren alimentarse fuera de ellos (exofagia) y tras la ingesta de sangre algunos mosquitos prefieren reposar dentro (endofilia) y otros fuera (exofilia); no obstante, este patrón de comportamiento cambia según la localización geográfica, las características del hogar y las condiciones microclimáticas <sup>(48)</sup>.

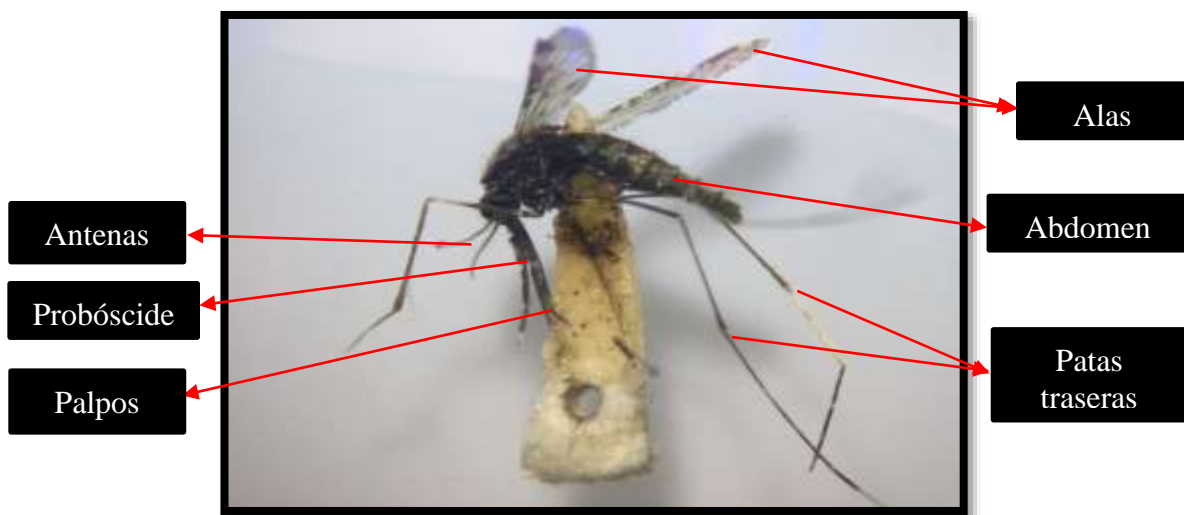


Figura 2. Características morfológicas de *Anopheles albimanus*.

### **1.3.4 Ciclo de vida**

El ciclo de vida del *Anopheles albimanus* pasa por las siguientes fases: huevo, larva, pupa y adulto. La hembra se aparea una sola vez y pone los huevecillos sobre superficies de agua dulce limpia de poca profundidad, durante la segunda y tercera semana de su vida. Los huevos, que se incuban de 3 a 4 días por lo general, presentan flotadores que les permiten mantenerse en la superficie del agua, sin embargo son de diminuto tamaño lo que complica su observación a simple vista. Después de la eclosión del huevo éste pasa a la fase de larva en la cual se desarrollan cuatro mudas; la velocidad de crecimiento depende directamente de la temperatura del agua y la cantidad de alimento que hay en el criadero, con temperaturas iguales o superiores de 25°C. La última muda se alcanza en 72 horas; en el agua las larvas se alimentan de protozoarios de vida libre y microalgas, después que se da la cuarta muda en la que la larva comienza a secretar una cubierta por todo el cuerpo que finalmente la encierra. Este último paso es la llamada pupa en la cual el organismo deja de alimentarse y flota; esta fase es necesaria para que puedan llevarse a cabo los cambios en su cuerpo que le permitan la invasión del ambiente aéreo, así como también cambiar su alimentación a líquidos llenos de proteínas necesarias para formar los huevos. En un período de 24 a 48 horas los tejidos del cuerpo larval desarrollan las alas en el tórax, tres pares de patas, un aparato bucal modificado para picar, ovarios (en el caso de las hembras), glándulas salivales y enzimas digestivas para degradar su futuro alimento sanguíneo. La etapa final es la del mosquito adulto, el cual sale de la pupa emergiendo el adulto, éste queda descansando sobre el agua hasta endurecer su cuerpo y poder realizar vuelos largos. El vuelo más importante es aquel donde busca alimentarse de sangre humana o de animal teniendo un rango de vuelo hasta de hasta 10 a 20 kilómetros <sup>(49)</sup>.

## **1.4 Aspectos generales de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales están compuestos de varias sustancias orgánicas volátiles o aromáticas, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia que es bastante parecida a los aceites grasos, pero se distinguen de ellos porque al dejar caer unas gotas de esencia sobre el papel, éstas se volatilizan fácilmente sin dejar ninguna huella

ni mancha grasosa. Las propiedades medicinales de estos aceites son variadas y abundantes, la mayoría de éstas producen efectos sedantes, antiespasmódicos, desinfectantes y de repelencia, entre otros. Se reconoce una planta que contenga aceites esenciales debido a su aroma característico, fácilmente perceptible <sup>(50)</sup>.

De acuerdo a Masada (1976), los aceites esenciales se clasifican en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza de los compuestos mayoritarios <sup>(51)</sup>.

Según la consistencia se dividen en:

- Esencias fluidas: líquidos muy volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos: líquidos de consistencia espesa, poco volátiles y propensos a polimerizarse.
- Oleorresinas: líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas.

Según su origen, pueden ser:

- Naturales: Se obtienen directamente de la planta y no se somete a ninguna modificación posterior.
- Artificiales: Se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de las esencias con uno de sus constituyentes.
- Sintéticas: Mezcla de compuestos obtenidos sintéticamente.

Según la naturaleza de los compuestos mayoritarios, pueden ser:

- Monoterpenoides.
- Sesquiterpenoides
- Compuestos oxigenados.

## **1.5 Aspectos generales de los repelentes**

Los repelentes básicamente son sustancias que al ser aplicadas sobre la piel generan repulsión frente a los insectos, formando una pequeña capa gaseosa sobre la piel, lo que hace de ésta un lugar desagradable o poco atractivo para ellos, con esto se evita un gran problema como las picaduras y por ende las enfermedades que ellos ocasionan. El uso de las plantas fue el

método inicial para combatir los insectos, principalmente mosquitos, consistió en el uso de repelentes botánicos. Algunas veces se solía cubrir los sacos de las recientes cosechas con plantas determinadas evitando así que insectos como gorgojos y polillas perjudiquen al producto guardado, otras veces otras se quemaban para producir humo que ahuyentara a los insectos y así evitar la succión de sangre y transmisión de enfermedades <sup>(52)</sup>.

En el año 1952 fue descubierto el N-N-dietil-m-toluamida (DEET), sustancia que ha tenido gran importancia hasta el punto que la mayoría de los repelentes formulados hasta hoy lo han utilizado como principio activo. Sin embargo, esta sustancia ha reportado múltiples efectos secundarios tales como toxicidad e irritabilidad, por lo cual se están desarrollando repelentes alternativos basados en sustancias de origen natural como es el caso de los aceites esenciales <sup>(53)</sup>.

En general, el repelente ideal debe mezclar las características naturales y sintéticas. Es decir, debe contener principios activos naturales y que perduren en el tiempo una vez aplicados a la piel. Además de ello debe ser eficaz contra una o varias especies de mosquitos y poseer características organolépticas aceptables. Otro punto que cada vez más se toma en cuenta, es que el repelente no sea propenso a ensuciar o manchar la ropa y que a su vez su adquisición sea de bajo costo <sup>(54)</sup>.

## 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Pregunta de investigación

¿Los aceites esenciales extraídos de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña) serán efectivos como repelentes frente a *Anopheles albimanus* colectados en la región Tumbes?

### 2.2 Objetivo general

Evaluar el efecto repelente *in vitro* de los aceites esenciales extraídos de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) sobre mosquitos de *Anopheles albimanus* colectados en la región Tumbes.

### 2.3 Objetivos específicos

- Extraer aceites esenciales a partir de muestras vegetales frescas de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) y determinar el rendimiento del proceso.
- Realizar el análisis químico de los aceites esenciales obtenidos a partir de las muestras vegetales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).
- Determinar el Porcentaje de Repelencia (PR) de las disoluciones al 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 y 10 % v/v de los aceites esenciales extraídos de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) frente a mosquitos hembras de *Anopheles albimanus*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Instalaciones de ejecución

Las muestras vegetales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) fueron identificadas por el Blgo. Botánico Camilo Díaz Santibáñez e incluidas en el Herbario de Plantas Medicinales (HEPLAME) del Laboratorio de Botánica Aplicada-LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, con números de vouchers; 150518 y 060618 respectivamente.

Los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) fueron extraídos por destilación por arrastre con vapor y analizados por mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en la Unidad de Investigación en Productos Naturales- LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Las diluciones al 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 y 10 % v/v de los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) fueron preparadas y almacenadas en el Laboratorio de Control de Calidad-LID de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

El bioensayo de repelencia fue desarrollado en la Unidad de Entomología del Laboratorio Regional Referencial perteneciente al Instituto Nacional de Salud -MINSa en la región Tumbes.

El presente trabajo fue registrado en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) con el código 101046 y aprobado por la Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT).

#### 3.2 Equipos y Materiales

Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrómetro de Masas (Agilent Technologies modelo 7890A-5975C, USA); Balanza Analítica (Mettler Toledo Modelo AB54 Serie P23502, Suiza); Refrigeradora-Congeladora (Moraveco); Equipo GPS navegador móvil (Garmin

Montana modelo 650); Equipo destilación por arrastre de vapor Unidad de Investigación en Productos Naturales (UPCH); Picnómetro (5 mL); Placas Petri 9 cm de diámetro.

### **3.3 Métodos**

#### **3.3.1 Colección e identificación de muestras vegetales**

Se colectó muestras vegetales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) para la obtención de aceite esencial, posteriormente se guardaron y envolvieron en papel periódico y se colocaron dentro de bolsas plásticas para su transporte al laboratorio donde fueron sometidas a destilación por arrastre con vapor.

Adicionalmente se seleccionaron tres (03) muestras representativas de cada especie vegetal siguiendo el método convencional para la colecta, prensado y secado de dicho material para su posterior identificación taxonómica específica <sup>(55)</sup> (Anexos 3 y 4).

##### **3.3.1.1 Colección de muestras vegetales de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia)**

Se adquirió y colectó un total de 16.85 kg de muestra vegetal fresca de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) a 3359 msnm de una zona cultivada con coordenadas; 9°29'4"S 77°30'43"W, perteneciente al centro poblado de Huilcahuain, distrito Independencia, provincia de Huaraz en el departamento de Ancash.

##### **3.3.1.2 Colección de muestras vegetales de *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña)**

Se adquirió y colectó un total de 7.27 kg de muestra vegetal fresca de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) a 3263 msnm de un zona cultivadas con coordenadas; 12°2'9.4"S 75°13'6.2 W, perteneciente al centro poblado de Umuto, distrito de El Tambo, provincia de Huancayo en el departamento de Junín.

### **3.3.2 Colección e identificación de *Anopheles albimanus***

Se capturó aproximadamente 300 mosquitos de *Anopheles albimanus* hembras en su estadio adulto. La colección fue realizada por el parte profesional técnico entomológico del Laboratorio Regional Referencial de Tumbes, siguiendo el método tradicional de colección por succión, el cual consta de un tubo colector de vidrio acoplado por uno de sus extremos a una manguerilla por medio del cual se genera la succión mediante la boca. Entre tubo colector y manguerilla se coloca un filtro para evitar la ingesta accidental del mosquito (Anexo 6).

La colección se realizó en una zona pecuaria con coordenadas; 3°32'13"S 80°23'3"W, perteneciente a la localidad de Puerto Pizarro, distrito de Tumbes, provincia de Tumbes en el departamento de Tumbes. Posteriormente los especímenes fueron identificados por la Unidad de Entomología del Laboratorio Regional Referencial del Instituto Nacional de Salud de tumbes (Anexo 7).

### **3.3.3 Extracción del aceite esencial**

Para la obtención del aceite esencial se utilizó el equipo de destilación por arrastre de vapor perteneciente a la Unidad de Investigación en Productos Naturales (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Anexo 5).

Se utilizaron las hojas frescas de cada muestra botánica propuesta exentas de hongos, líquenes u otras partículas contaminantes. Las cuales fueron previamente cortadas en trozos de 4-7 cm para aumentar la superficie de contacto y así facilitar el procedimiento de extracción de aceite.

Luego de aproximadamente 6 horas de destilación, se obtuvo aceite esencial y el remante de agua que pudiese estar presente en los mismos, fueron eliminados utilizando sulfato de sodio anhidro. Finalmente los aceites esenciales puros fueron recogidos en frascos ámbar de 25 cm<sup>3</sup> con cierre hermético y refrigerado a una temperatura menor de los 5 °C para su mejor conservación hasta ser sujetos a las pruebas establecidas.

### 3.3.4 Diluciones de los aceites esenciales

Se realizaron cinco diluciones por cada aceite esencial utilizando como disolvente aceite mineral USP. Se inició con la dilución al 10 % v/v, posteriormente se determinó las cuatro diluciones restantes al 2.0%, 1.5%, 1 % y 0.5 % v/v.

### 3.3.5 Determinación de densidad de los aceites esenciales

Se determinó la densidad de los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) utilizando un picnómetro de 5 mL de capacidad y una balanza analítica.

### 3.3.6 Análisis de Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas

La cromatografía de gases y su acoplamiento con la espectrometría de masas es la técnica más idónea para la cuantificación e identificación de los componentes volátiles de mezclas complejas como los presentes en los aceites esenciales.

Los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) se analizaron en un Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C (Agilent Technologies Inc). Se utilizó una columna capilar J&W 122-1545.67659 DB-5ms, 325 °C: 60 m x 250 µm x 0.25 µm. Las condiciones del CG fueron las siguientes:

- La rampa de temperatura: Empieza en 40 °C y sube a 5 °C/min hasta 180 °C; 2.5 °C/min hasta 200 °C por 5 minutos y finalmente 10 °C/min hasta 300 °C manteniéndose por 3 minutos.
- Tiempo de corrida: 54 min
- El volumen de inyección 1 µL
- Split: 100:
- El gas portador: He, 1 mL/min
- Muestra: se diluyó 20 µL de muestra en 1mL de diclorometano

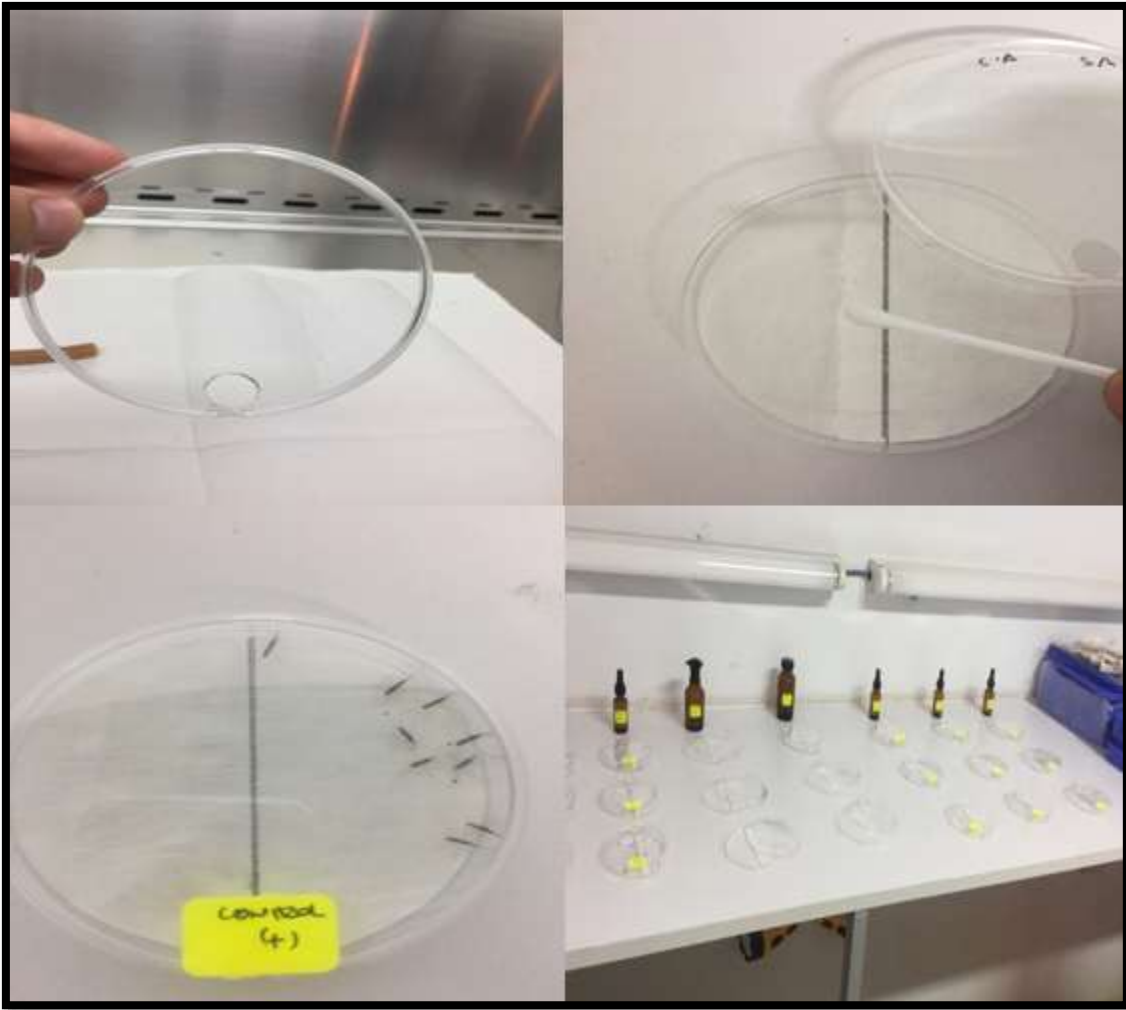
### 3.3.7 Test de Repelencia

#### 3.3.7.1 Bioensayo

El bioensayo fue llevado a cabo de acuerdo con el método descrito por Talukder y Howes. Este método tiene como fundamento observar si la sustancia a evaluar desencadena o no algún tipo de comportamiento netamente migratorio en el mosquito y a través de dichas observaciones determinar la posible actividad repelente o de lo contrario la posible actividad atrayente generada por la sustancia.

El bioensayo consta de la utilización de papel filtro (Whatman®, Grade 40) cortado por la mitad en porciones iguales. En una mitad (zona tratada) se aplicó 1 mL aproximadamente de la sustancia evaluada, para este caso aceites esenciales a diferentes concentraciones, y en la otra mitad (zona no tratada) no se aplicó ninguna sustancia. Las zonas tratadas y no tratadas fueron bien diferenciadas y colocadas de forma contigua dentro de la jaula de prueba o recipiente, para este caso se utilizó placas Petri de 9 cm de diámetro a las cuales se les realizó un orificio de 1 cm de diámetro para la introducción de los mosquitos. Posteriormente, con la ayuda de una manguerilla de succión, se introdujeron diez (10) hembras adultas de *Anopheles albimanus* al recipiente de prueba. Una vez iniciado el procedimiento se realizó recuentos de los mosquitos presentes en la zona no tratada del papel filtro, cada hora durante tres horas <sup>(56)</sup>.

De igual forma se procedió con los controles. Para el control positivo (+) se escogió un repelente sintético comercial con alta actividad que contiene DEET al 15 % el cual se aplicó en la zona tratada del papel filtro y en la zona no tratada no se aplicó ninguna sustancia. Para el control negativo (-) se utilizó aceite mineral USP el cual es inerte y no presenta ninguna actividad que afecte el comportamiento migratorio del mosquito y se procedió del mismo modo que con el control positivo (+). Cada ensayo fue llevado a cabo por triplicado.



*Figura. Principales pasos del bioensayo*

### 3.3.7.2 Cálculo del Porcentaje de Repelencia

Los datos se convertirán a porcentajes de repelencia mediante la fórmula la cual expresa;

$$PR(\%) = 2 \times (C - 50)$$

Dónde: C es el porcentaje de mosquitos presentes en la mitad no tratada, es así que valores (+) indican repelencia y valores (-) indican atracción.

Adicionalmente, siguiendo la metodología, el promedio de los porcentajes de repelencia fueron clasificados según la siguiente escala:

**Tabla 1. Valoración del grado de repelencia según Talukder y Howes <sup>(56)</sup>**

<b>Clase</b>	<b>Grado de Repelencia (%)</b>
<b>0</b>	<b>&gt;0.01 a &lt;0.1</b>
<b>I</b>	<b>0.1 a 20</b>
<b>II</b>	<b>20.1 a 40</b>
<b>III</b>	<b>40.1 a 60</b>
<b>IV</b>	<b>60.1 a 80</b>
<b>V</b>	<b>80.1a 100</b>

### **3.3.8 Análisis Estadístico**

#### **3.3.8.1 Diagrama de Caja-Bigotes (boxplots o box and whiskers)**

La cantidad de mosquitos presentes en la zona no tratada durante el bioensayo tanto para cada concentración de aceite esencial como los controles positivo (+) y negativo (-), serán sometidos a una representación visual detallada mediante diagramas de Caja-Bigotes (boxplots o box and whiskers) los cuales permiten describir características importantes, tales como la dispersión y simetría.

#### **3.3.8.2 Prueba Mann-Whitney**

Para determinar diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de mosquitos presentes en la zona no tratada de cada concentración de aceite esencial y los controles positivo(+) y negativo(-) usados, se empleó la prueba estadística de **Mann-Whitney**, también llamada **Mann-Whitney-Wilcoxon**, **U de Whitney** o **prueba de suma de rangos Wilcoxon**, la cual es una prueba no paramétrica que permite identificar diferencias entre las medianas de dos grupos independientes con libre distribución cuyos datos han sido medidos al menos en una escala de nivel ordinal.

### 3.3.9 Diagrama de procesos de la investigación

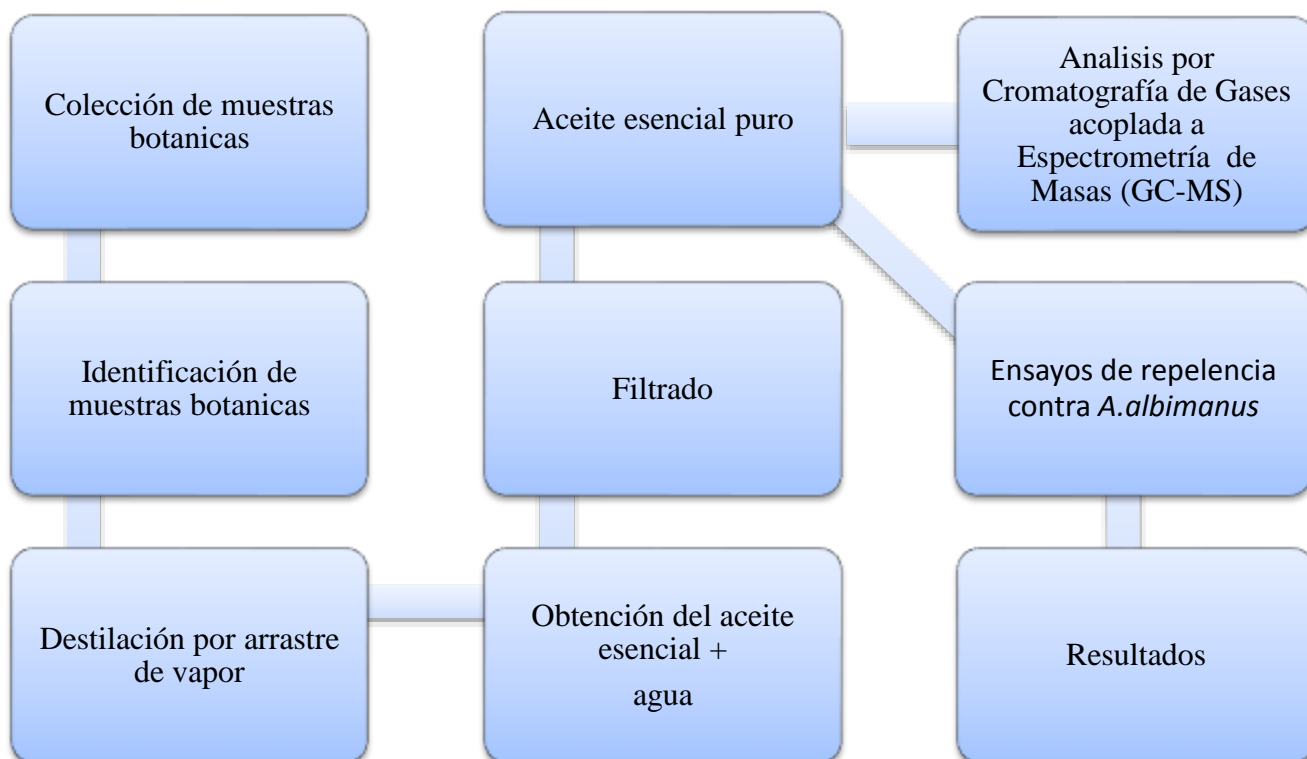


Figura 3. Diagrama de procesos de la investigación

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Cantidad de aceite esencial obtenido y determinación del rendimiento

Luego de la extracción se obtuvo 13.5 mL de aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) a partir de 16.85 Kg de muestra vegetal fresca, obteniendo un rendimiento de 0.07%.

$$R\% = \frac{W_{aceite}}{W_{muestra}} * 100$$

$$R\% = \frac{11.71g}{16850g} * 100 = 0.07\%$$

Mientras que por otro lado se obtuvieron 9.5 ml de aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) a partir de 7.27 kg de muestra vegetal fresca, obteniendo un rendimiento de 0.11%.

$$R\% = \frac{W_{aceite}}{W_{muestra}} * 100$$

$$R\% = \frac{8.64g}{7270g} * 100 = 0.11\%$$

## 4.2 Características organolépticas y densidad de los aceites esenciales *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña)

Se determinó las principales características organolépticas de los aceites esenciales, así como también su densidad. El aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) mostró un color más intenso en comparación con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) que presentó un color ligeramente amarillo (Anexo 8).

En cuanto a sus densidades, el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) mostró una densidad de 0.8677 g/mL un valor menor en comparación con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) que presentó una densidad de 0.9103 g/mL.

**Tabla 2. Características fisicoquímicas s de los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña).**

Especie	Estado y color	Olor	Densidad (g/ml)
<i>Lepechinia Meyenii</i> Walp.	Líquido, amarillo intenso	Característico	0.8677
<i>Minthostachys Mollis</i> Griseb.	Líquido, amarillo tenue	Característico	0.9103

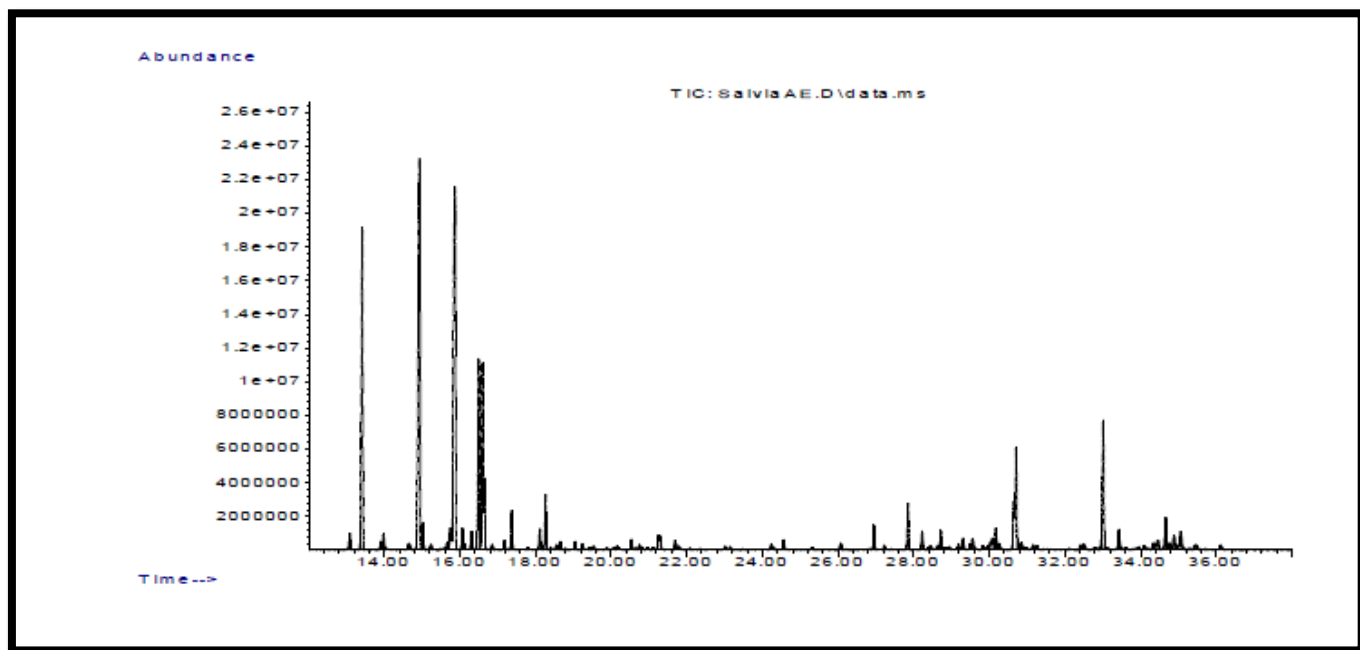
## 4.3 Constituyentes del Aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia)

Se determinó la presencia de 39 constituyentes químicos en el aceite esencial *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), mostrando al  $\beta$ -pineno (22.96%) como componente mayoritario, seguido de 3-careno (19.45%) y  $\alpha$ -Pineno (12.48%).

**Tabla 3. Constituyentes químicos del aceite esencial del *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.**

Número	Nombre del compuesto (NIST08.L)	t <sub>R</sub> (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	1-Isopropil-4-metilbiciclo[3.1.0]hex-2-eno	13.09	0.51
2	α-Pineno	13.42	12.28
3	α-Fencheno	13.91	0.24
4	Canfeno	13.99	0.49
5	β-Pineno	14.94	22.96
6	β-Mirceno	15.02	0.83
7	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> )	15.67	0.25
8	α-Felandreno	15.75	0.96
9	3-Careno	15.87	19.45
10	α-Terpineno	16.07	0.56
11	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> )	16.31	0.67
12	D-Limoneno	16.5	7.39
13	β-Felandreno	16.6	6.61
14	Eucaliptol	16.65	1.9
15	α-Thuyeno	17.18	0.29
16	γ-Terpineno	17.37	1.21
17	Isoterpinoleno	18.12	0.67
18	Terpinoleno	18.27	1.73
19	1-Octen-3-il-acetato	18.66	0.23
20	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> )	19.05	0.24
21	Isomentona	20.54	0.33
22	Pinocamfona	21.26	0.5
23	Terpinen-4-ol	21.3	0.41
24	α-Terpineol	21.7	0.28

25	Desconocido (C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> )	24.56	0.33
26	α-Cubebeno	26.95	0.77
27	α-Gurjuneno	27.85	1.51
28	β-Cariofileno	28.22	0.58
29	Aromadendreno	28.72	0.63
30	β-Gurjuneno	29.31	0.37
31	Copaeno	29.56	0.34
32	α-Farneseno	30.09	0.75
33	α-Muuroleno	30.18	0.62
34	Germacreno D	30.65	1.77
35	δ-Cadineno	30.71	3.72
36	Guaiol	33.01	5.39
37	Ledol	33.43	0.82
38	α-Eudesmol	34.89	0.53
39	Bulnesol	35.07	0.88



**Figura 4. Cromatograma GC-MS del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia).**

#### 4.4 Constituyentes químicos del Aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña)

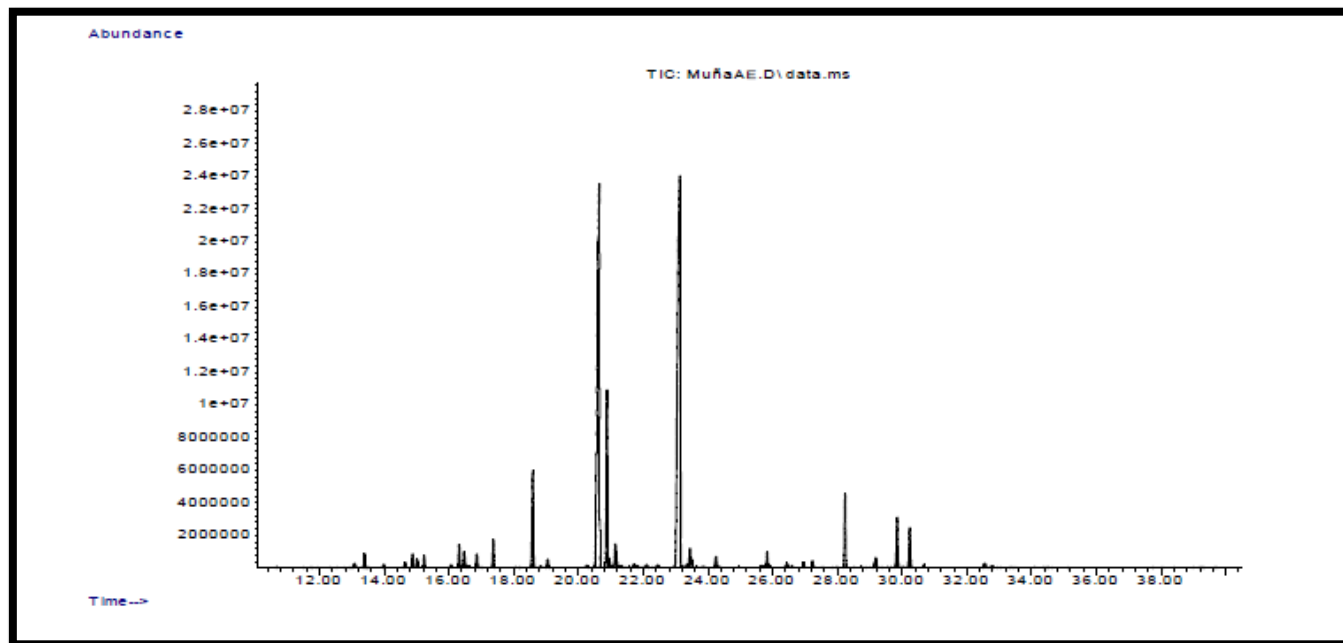
Se determinó la presencia de 35 constituyentes químicos en el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), mostrando a pulegona (38.02%) como componente mayoritario, seguido de mentona (34.29%) y D-isomentona (6.95%).

**Tabla 4. Constituyentes químicos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.**

Número	Nombre del compuesto (NIST08.L)	t <sub>R</sub> (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	1.1-Isopropil-4-metilbicyclo[3.1.0]hex-2-eno	13.08	0.13
2	α-Pineno	13.39	0.46
3	Canfeno	13.98	0.11
4	Sabineno	14.64	0.17
5	β-Pineno	14.88	0.49
6	β-Mirceno	15.02	0.32
7	3-Octanol	15.23	0.43
8	β-Cimeno	16.31	0.77
9	Limoneno	16.47	0.58
10	β-Ocimeno	16.86	0.44
11	γ-Terpineno	17.37	0.96
12	β-Linalool	18.59	3.93
13	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> )	19.05	0.26
14	Mentona	20.64	34.29
15	D-isomentona	20.88	6.95

16	Neoisomentol	20.96	0.36
17	Isopulegona	21.14	1.28
18	$\alpha$ -Terpineol	21.72	0.12
19	Pulegona	23.14	38.02
20	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	23.37	0.1
21	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	23.44	0.72
22	Piperitona	23.5	0.27
23	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> )	24.25	0.43
24	Timol	25.83	0.51
25	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O)	25.9	0.11
26	Desconocido (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> )	26.44	0.18
27	$\alpha$ -Copaeno	26.95	0.19
28	Desconocido (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	27.23	0.24
29	Cariofileno	28.23	2.77
30	Desconocido(C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	29.19	0.46
31	$\beta$ -Cubebeno	29.85	2.00
32	Biciclogermacreno	30.24	1.56
33	Desconocido (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> )	30.69	0.12
34	Desconocido (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O)	32.55	0.16
35	Desconocido (C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> )	46.17	0.11

**Figura 5. Cromatograma GC-MS del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña).**



#### **4.5 Resultados de la actividad repelente del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walpers (Pacha salvia)**

Se determinó la actividad repelente del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* en todas las concentraciones propuestas, obteniendo la máxima actividad en su concentración al 2.0% catalogándose como un repelente de grado IV con 80 % de repelencia (Anexo 9).

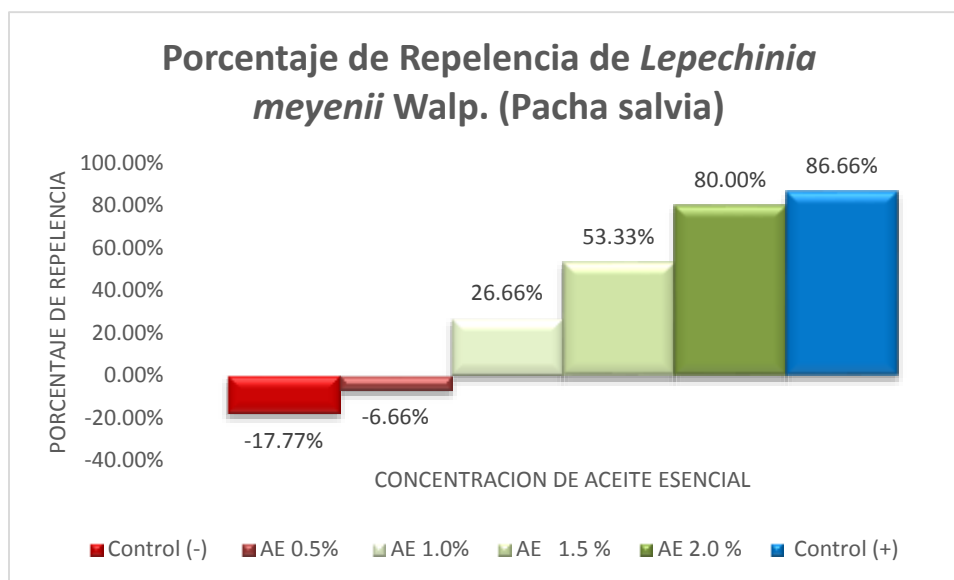
Así mismo en su concentración al 10% causó mortalidad en los especímenes de *Anopheles albimanus* mostrando una potencial actividad insecticida. Otro dato resaltante es el obtenido en su concentración al 0.5% denotando una posible actividad atrayente.

**Tabla 5. Cantidad de mosquitos repelidos de *Anopheles albimanus*, Porcentaje (PR) y Grado de repelencia del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia).**

Muestra	Tiempo para conteo (min)	N° mosquitos presentes en la zona no tratada			Promedio	Mortalidad	Porcentaje de Repelencia (PR)	Grado de repelencia
		1° Ensayo	2° Ensayo	3° Ensayo				
<b>Control (+) DEET 15%</b>	60'	10	10	8	9.33	NO	86.66%	REPELENTE V
	120'	10	10	8				
	180'	10	10	8				
<b>Aceite esencial LM 10%</b>	60'	1	1	2	1.33	SI	0	N/D
	120'	1	1	2				
	180'	1	1	2				
<b>Aceite esencial LM 2 %</b>	60'	7	10	10	9	NO	80%	REPELENTE IV
	120'	7	10	10				
	180'	7	10	10				
<b>Aceite esencial LM 1.5 %</b>	60'	7	9	7	7.66	NO	53.33%	REPELENTE III
	120'	7	9	7				
	180'	7	9	7				
<b>Aceite esencial LM 1 %</b>	60'	6	6	7	6.33	NO	26.66%	REPELENTE II
	120'	6	6	7				
	180'	6	6	7				
<b>Aceite esencial LM 0.5 %</b>	60'	4	5	5	4.66	NO	-6.66%	ATRAYENTE
	120'	1	5	5				
	180'	1	4	4				
<b>Control (-) ACEITE MINERAL USP</b>	60'	3	4	5	4.11	NO	-17.77%	ATRAYENTE
	120'	7	4	3				
	180'	4	5	2				

N/D= No determinado

Los resultados obtenidos muestran una marcada dosis dependencia en los tres primeros puntos válidos, es decir que el aumento del porcentaje de repelencia está sujeto a la concentración del aceite esencial. Respecto al último punto se evidenció un porcentaje de repelencia negativo lo que se traduciría en un efecto atrayente frente al mosquito vector (Anexo 10).



**Figura 6. Porcentaje de repelencia de aceite extraído de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) a diferentes dosis**

#### **4.6 Resultados de la actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach (Muña)**

Se determinó la actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) en todas las concentraciones propuestas, obteniendo la máxima actividad en su concentración al 1.5% catalogándose como un repelente de grado III con 60 % de repelencia (Anexo 9).

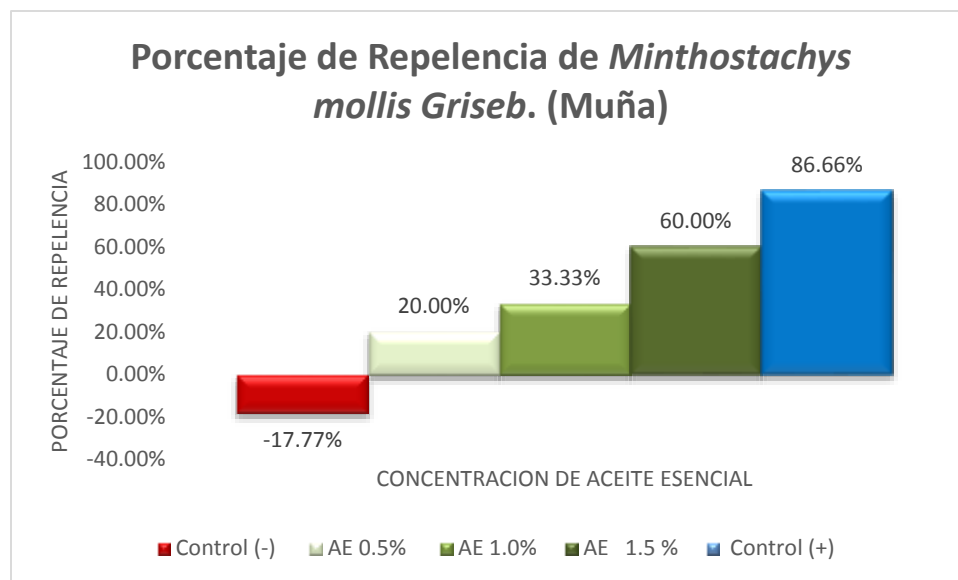
Otros resultados interesantes son los obtenidos a las concentraciones de 10 y 2% en las cuales se observa una posible actividad insecticida frente a especímenes de *Anopheles albimanus*.

**Tabla 6. Cantidad de mosquitos repelidos de *Anopheles albimanus*, Porcentaje (PR) y Grado de repelencia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña)**

Muestra	Tiempo para conteo (min)	N° mosquitos presentes en la zona no tratada			Promedio	Mortalidad	Porcentaje de Repelencia (PR)	Grado de repelencia
		1° Ensayo	2° Ensayo	3° Ensayo				
<b>Control (+) DEET 15%</b>	60'	10	10	8	9.33	NO	86.6%	REPELENTE V
	120'	10	10	8				
	180'	10	10	8				
<b>Aceite esencial MM 10 %</b>	60'	6	3	0	3	SI	0 %	N/D
	120'	6	3	0				
	180'	6	3	0				
<b>Aceite esencial MM 2 %</b>	60'	3	1	6	3.33	SI	0 %	N/D
	120'	3	1	6				
	180'	3	1	6				
<b>Aceite esencial MM 1.5 %</b>	60'	7	8	9	8	NO	60%	REPELENTE III
	120'	7	8	9				
	180'	7	8	9				
<b>Aceite esencial MM 1 %</b>	60'	6	6	8	6.66	NO	33.33%	REPELENTE II
	120'	6	6	8				
	180'	6	6	8				
<b>Aceite esencial MM 0.5 %</b>	60'	7	4	7	6	NO	20%	REPELENTE I
	120'	7	4	7				
	180'	7	4	7				
<b>Control (-) ACEITE MINERAL USP</b>	60'	3	4	5	4.11	NO	-17.77%	ATRAYENTE
	120'	7	4	3				
	180'	4	5	2				

N/D= No determinado

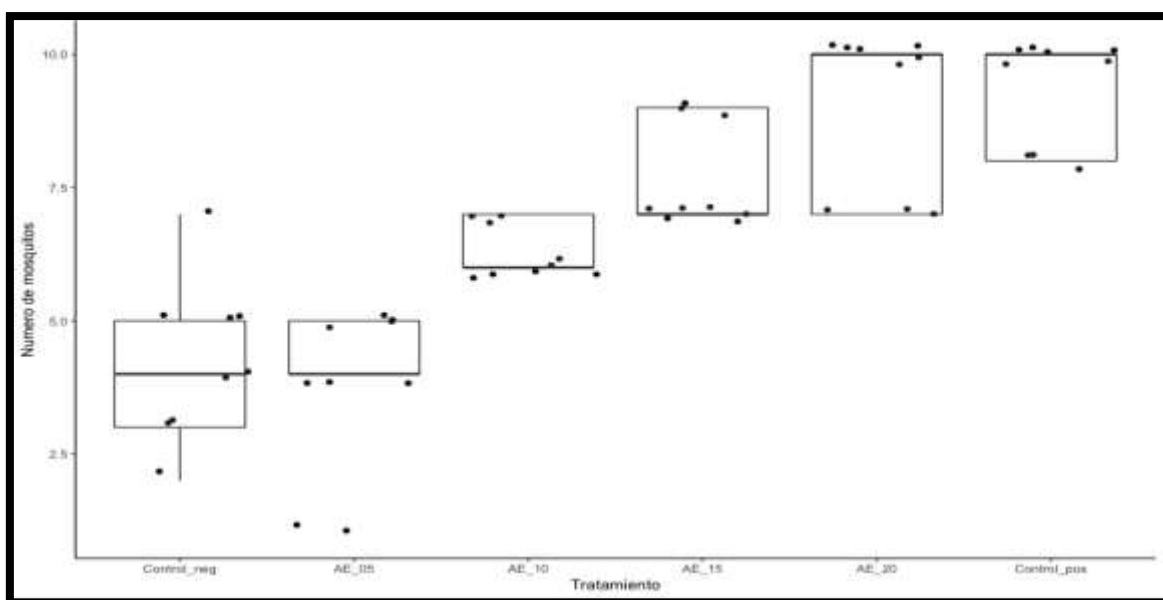
De igual manera, los resultados obtenidos muestran una marcada dosis dependencia en los tres puntos válidos, es decir que el aumento del porcentaje de repelencia está sujeto a la concentración del aceite esencial (Anexo 10).



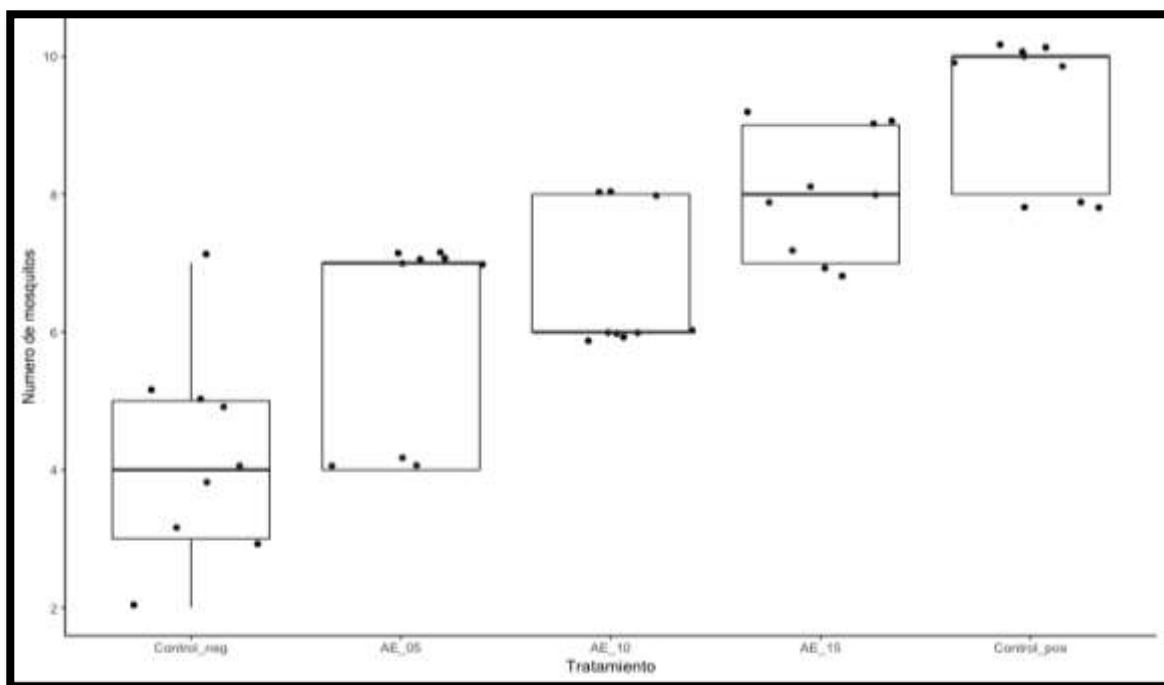
**Figura 7. Porcentaje de repelencia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) a diferentes concentraciones.**

#### 4.7 Diagrama Caja-Bigotes (boxplots o box and whiskers)

**Figura 8. Diagrama Caja-Bigotes para *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia)**



**Figura 9. Diagrama Caja-Bigotes para *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña)**



El análisis de los diagramas de caja-bigotes para las concentraciones de ambas muestras botánicas refleja dos puntos importantes. El primero punto, al igual que lo observado en las figuras 7 y 8, demuestra la dosis dependencia con respecto al número de mosquitos. Puesto que se observa un mayor número de mosquitos presentes en la zona no tratada conforme se aumenta la concentración del aceite esencial evaluado.

El segundo punto que sobresale después de analizar los diagramas, es con respecto al control negativo (-). Existe una evidente diferenciación de la caja correspondiente al control negativo (-) con respecto a las demás cajas pertenecientes a las concentraciones de los aceites esenciales. La notoria variabilidad de los puntos observados en el control negativo (-) puede significar una limitación en el presente bioensayo utilizado.

## 4.8 Resultados obtenidos mediante la prueba estadística de Mann-Whitney

**Tabla 7. Principales datos obtenidos mediante la prueba de Mann-Whitney para *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia)**

<i>Lepechinia meyenii</i> Walp. (Pacha salvia)			
Tipo de Control	Concentración de Aceite Esencial	Valor de significancia (P)	Existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )
Control (-)	0.5 %	0.8179	No
	1.0%	0.0028	Si
	1.5%	0.0006	Si
	2.0%	0.0004	Si
Control (+)	0.5 %	0.0002	Si
	1.0%	0.0002	Si
	1.5%	0.0037	Si
	2.0%	0.6340	No

Mediante la prueba estadística de Mann-Whitney se comparó los grupos controles tanto positivo (+) como negativo (-) con cada concentración de aceite esencial para determinar si existe diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Es así que, los resultados obtenidos para *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) mostraron dos datos sobresalientes.

El primero de ellos es el obtenido entre el control negativo (-) y la concentración del aceite esencial al 0.5%, puesto que al comparar estos grupos se obtuvo un valor de  $p > 0.05$  demostrando que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ellos. El segundo punto es el obtenido entre el control positivo (+) y la concentración de aceite esencial al 2.0% el cual arrojó un valor de  $p > 0.05$ , demostrando de igual manera que no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

**Tabla 8. Principales datos obtenidos mediante la prueba de Mann-Whitney para *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña)**

<i>Minthostachys mollis</i> Griseb. (Muña)			
Tipo de Control	Concentración de Aceite Esencial	Valor de significancia (P)	Existe diferencia estadísticamente significativa (p<0.05)
Control (-)	0.5 %	0.0379	Si
	1.0%	0.0018	Si
	1.5%	0.0005	Si
Control (+)	0.5 %	0.0002	Si
	1.0%	0.0008	Si
	1.5%	0.0129	Si

Los resultados obtenidos mediante la prueba estadística de Mann-Whitney para *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) no mostraron ningún dato resaltante. Todos los grupos comparados arrojaron un valor de  $p < 0.05$ , demostrando la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

## 5. DISCUSION

Según los resultados obtenidos por GC-MS se determinaron 39 constituyentes químicos presentes en el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) encontrándose en mayor cantidad el  $\beta$ -pineno (22.96%) seguido de 3-careno (19.45%) y  $\alpha$ -Pineno (12.48). Mientras que de los 35 constituyentes químicos presentes en el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) fue la pulegona (38.02%) como constituyente mayoritario seguido de mentona (34.29%) y D-isomentona (6.95%).

Los constituyentes obtenidos en el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) en el presente estudio coinciden con el trabajo realizado por Ruiz (2015), el cual muestra por primera vez los constituyentes químicos del presente aceite esencial obtenido a partir de muestras colectadas en el departamento de Ancash, de entre los cuales predomina el  $\alpha$ -Pineno (29.87%) seguido de Eucaliptol (13,25%) y  $\beta$ -Pineno (9,64%)<sup>(57)</sup>.

Con respecto a los constituyentes del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña), Fuertes (2001) muestra los principales constituyentes químicos obtenido a partir de muestras colectadas en el departamento de Junín, mostrando el 1-tetradeceno (23,14 %) como compuesto mayoritario, seguido de 2S-Transmentona (23,00%) y pulegona (13,21%). Así mismo Maquera (2009) identificó los componentes mayoritarios de muestras colectadas en el departamento de Huánuco, mostrando la pulegona (43.49%) como compuesto mayoritario, seguido de mentona (28.64%). La variación de los constituyentes químicos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) mostrados por Fuertes (2001), Maquera (2009) y los mostrados en el presente estudio pueden estar influenciados por diversos factores como el lugar de recolección, la altura sobre el nivel del mar, la naturaleza del terreno, la época de recolección o pequeños cambios genéticos y la diferencia entre las hojas y tallos<sup>(58,59)</sup>.

Algunos de los constituyentes químicos mayoritarios aquí presentados han sido descritos en estudios similares. Araujo (2003) reportó que el monoterpeno 3-careno presente en el aceite esencial *Hyptis martiusii*, un arbusto pequeño que crece en abundancia en el noreste de Brasil, presentó actividad insecticida en diferentes concentraciones del extracto obtenido contra la mosca blanca *Bemisia argentifolii*, plaga común de frutos comestibles de valor

comercial como el melón y la sandía, obteniendo 93% de efectividad a concentraciones de 2000 mg/L. La otra prueba fue realizada contra larva del mosquito *Aedes aegypti*, vector de transmisión del dengue y la fiebre amarilla, cuando usaron concentraciones de 250 y 500 mg/L la efectividad fue de 99 y 100%, respectivamente <sup>(60)</sup>.

Por otro lado un estudio realizado Sanz (2008) demostró que la D-isomentona presente en el aceite esencial de *Pelargonium capitatum* presentó tanto actividad fúngica frente a 14 hongos fitopatógenos como actividad insecticida frente a especímenes *Ceratitis capitata* y *Oncopeltus fasciatus* insectos causantes de plagas potenciales en la floricultura <sup>(61)</sup>.

En general, como lo descrito con anterioridad, los aceites esenciales obtenidos a partir de distintas familias botánicas han demostrado actividad repelente e insecticida de manera significativa frente a especies de artrópodos. Es así que algunos monoterpenos, como  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -mirceno, linolool, 1,8- cineol, 4-terpineol, timol, carvacrol,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno, limoneno, alcanfor poseen algún tipo actividad insecticida y entre los sesquiterpenos el  $\beta$ -cariofileno es citado como un repelente activo frente mosquitos de la familia Culicidae..Esto hace inferir que las propiedades de los aceites esenciales tales como la alta actividad repelente que pudiesen tener frente a mosquitos, este condicionada a la correcta combinación de monoterpenos y sesquiterpenos presentes en su composición particular <sup>(62,63)</sup>.

Los resultados obtenidos mediante los bioensayos de repelencia mostraron que el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* al 10% ocasionó mortalidad en los especímenes hembra de *Anopheles albimanus* desde el primer hasta el último conteo del ensayo. Del mismo modo ocurrió con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 10% y al 2.0% ambas concentraciones arrojaron datos similares de mortalidad, por lo que se deduce que los aceites esenciales a las concentraciones planteadas no presentan una actividad repelente sino una actividad insecticida. Debido a que el test desarrollado no es el idóneo para evaluar la actividad insecticida, los datos obtenidos no son válidos para obtener el parámetro fundamental en el presente estudio que es el porcentaje de repelencia, ni mucho menos es posible lograr valorar el grado de repelencia.

Los resultados de la actividad repelente reportados por primera vez muestran que el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) presenta alta repelencia frente a los mosquitos hembras de *Anopheles albimanus*, logrando un porcentaje de repelencia de 80% en su concentración al 2.0%, catalogándose como un repelente de grado IV. El aceite esencial de *Lepechinia meyenii* al 1.5% y 1.0% obtuvieron una repelencia de grado III y II con un porcentaje de repelencia de 53.3% y 26.6% respectivamente (Ver tabla 5).

Sin embargo el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* al 0.5% presentó un porcentaje de repelencia negativo. Según el método de Talukder y Howes propuesto en este estudio, un porcentaje de repelencia negativo no representa ningún tipo de actividad repente, por el contrario, denota una actividad atrayente frente a mosquitos de *Anopheles albimanus*.

Si bien este último resultado no está alineado con los objetivos principales de la investigación, sigue siendo un resultado igual de importante teniendo en cuenta que una de las herramientas que utiliza actualmente del ministerio de salud en su lucha frente a la erradicación de Malaria es el uso de ovitrampas.

Las ovitrampas son trampas de ovipostura para insectos, confeccionadas con material plástico de color oscuro que simulan criaderos, donde, a través de la presencia de los huevos, se puede inferir la densidad de mosquitos adultos en un área evaluada, dichas ovitrampas contienen una mezcla de pasto seco tipo “grama americana” (*Stenotaphrum secundatum*) y agua reposada a la cual se le denomina infusión de pasto al 10% , esta infusión se deja macerar durante siete días con la única finalidad de acondicionar la ovitrampa y así poder de atraer la mayor cantidad de mosquitos presentes en la zona de monitoreo. Con los estudios pertinentes se podría evaluar la actividad atrayente del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* al 0.5% basándose en los resultados expuestos en el presente estudio <sup>(64)</sup>.

Otro punto a resaltar respecto a los últimos resultados sobre la actividad repelente del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* al 1.0% y 0.5%, es el estrecho margen, la pequeña diferencia de concentración que presentan pero que sin embargo expresan una bioactividad totalmente distinta. Según los resultados obtenidos en el presente estudio, una diferencia de tan solo 0.5% de concentración significó tener por un lado un aceite esencial con actividad repelente y por otro un aceite esencial con actividad atrayente.

Los resultados de la actividad repelente muestran de igual manera que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) presenta una moderada repelencia frente a los mosquitos hembras de *Anopheles albimanus*, logrando un porcentaje de repelencia de 60 % en su concentración al 1.5%, catalogándose, así como un repelente de grado III. Así mismo el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 1.0% y 0.5 % obtuvieron una repelencia de grado II y I con un porcentaje de repelencia de 33.3% y 20 % respectivamente (ver tabla 6).

Un estudio similar realizado por Dávila (2016) demostró que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) presentó actividad repelente leve de grado I frente a mosquitos *Culex pipiens* con un porcentaje de repelencia de 20% <sup>(65)</sup>. Esto hace inferir que la variación de la actividad repelente puede estar sujeta a las formas de respuesta que desarrollan diferentes las múltiples variedades de mosquitos vectores de enfermedades y lo complejo que es lograr dilucidar qué factores son los que condicionan su comportamiento al estar expuestos a aceites esenciales de esta naturaleza. De igual forma que con el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia), se recomienda realizar un análisis de más rigor con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* con la finalidad de dilucidar la concentración máxima real en la cual logre expresar un porcentaje de repelencia mayor al obtenido en el presente estudio.

Por otro lado, los resultados obtenidos mediante los diagramas de caja-bigote dan a conocer dos puntos importantes. El primero de ellos, la notoria dosis dependencia de los datos, puesto que se observa un mayor número de mosquitos presentes en la zona no tratada conforme se aumenta la concentración de aceite esencial. Y el segundo punto es que a través de los diagramas se deja expuesto una de las dos limitaciones identificadas en cuanto al método utilizado en el presente estudio.

La primera limitación identificada con respecto al método utilizado para evaluar la actividad repelente radica en que, dicho método no concibe un control negativo (-). Los diagramas realizados para el control negativo (-) dieron a conocer la notoria variabilidad del número de mosquitos presentes en la zona no tratada para este grupo control, probablemente esta variabilidad se deba a no se utiliza ninguna sustancia activa que interfiera o desencadene algún tipo de cambio en el comportamiento del mosquito durante el bioensayo y que por ende esto genere la migración del mismo hacia a la zona no tratada. Es decir, al no existir ninguna

sustancia activa para este grupo control, el comportamiento del mosquito es sumamente impredecible. Por lo cual, obtener resultados de una actividad repelente o una actividad atrayente para este grupo control es totalmente aleatorio, perdiéndose así la solidez del método (Ver figuras 9 y 10).

Los resultados obtenidos mediante la prueba estadística de Mann-Whitney permitieron identificar dos puntos importantes. La primera, que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el control positivo (+) y el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* al 2.0% lo cual constituye el resultado más prometedor del estudio, puesto que estadísticamente se estaría comprobando que la actividad repelente del aceite esencial a dicha concentración no difiere significativamente de la actividad presentada por un repelente comercial usado en la actualidad.

El segundo punto observado, es que de igual manera no existe diferencia estadísticamente significativa entre el control negativo (-) y el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* al 0.5%, y justamente este resultado permite identificar la segunda limitación del método utilizado, puesto que se demuestra que entre estos dos grupos no existe diferencia significativa pero que sin embargo expresan actividades biológicas distintas. Por un lado el control negativo (-) el cual teóricamente no expresaría ningún tipo de actividad y por otro el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* al 0.5% que presenta actividad atrayente. Entonces atribuir dos tipos de respuestas biológicas a dos grupos que estadísticamente no muestran diferencias significativas constituye una fuerte limitación del método.

Adicionalmente esta limitación se intensifica si comparamos las concentraciones al 0.5% y 1.0% del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* en la cual la migración o no, de poco más de un mosquito a la zona no tratada, representa un margen de aproximadamente 20% de repelencia y a través de ello, determinar dos actividades biológicas totalmente opuestas. Que los datos obtenidos muestren con notoriedad, que la migración de un solo mosquito sea suficiente para atribuir una actividad repelente o una actividad atrayente, constituye una marcada falencia en el método utilizado en la presente investigación (Ver tabla 7).

Probablemente esta deficiencia del método se deba a que la fórmula propuesta por Talukder y Howes para determinar un patrón de repelencia o un patrón de atracción esté basada netamente en el comportamiento migratorio del mosquito mas no concibe la importancia de la cantidad mínima necesaria de mosquitos requeridos y la repercusión del número de mosquitos presentes en el zona no tratada, datos que al ser sometidos a un análisis estadístico constituirían otra visión de los resultados obtenidos como los realizados en el presente trabajo.

Si bien, los aceites esenciales propuestos presentan actividad repelente, la consistencia de un aceite como tal representa un punto crítico en su utilización. Es decir, la característica general de un aceite esencial limita su propio uso como repelente, puesto que por su naturaleza volátil representaría un producto con muy corta duración en la piel. Por ello la formulación de una forma farmacéutica más estable es una herramienta perfecta para aprovechar al máximo la actividad repelente mostrada por los aceites esenciales.

Es así que Dávila (2016) además de determinar la actividad repelente de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña), trabajó en la formulación de una crema en base a la concentración del aceite esencial que más actividad presentó, concluyendo que la formulación preparada mantuvo tanto las características del aceite esencial como su actividad repelente baja.

Adicionalmente mencionó que se debe realizar mayores pruebas con la finalidad de elegir de manera correcta los excipientes partícipes de la formulación, aquellos excipientes que proporcionen adecuadas características fisicoquímicas al trabajo en su mayoría de naturaleza fijadora para hacer perdurar el efecto repelente tales como la parafina y vainillina <sup>(66)</sup>.

El presente estudio tiene además un objetivo intrínseco, la intención de fortalecer el uso de plantas nativas peruanas como repelentes naturales y que este tipo de trabajo sea la base para posteriores investigaciones prometedoras que a la posteridad representen una herramienta importante en la erradicación de enfermedades endémicas causadas por mosquitos vectores.

## 6. CONCLUSIONES

- Se determinó el rendimiento del aceite esencial obtenido de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña), siendo de 0.07% y 0.11% respectivamente.
- Se identificaron 39 constituyentes químicos presentes en el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) siendo  $\beta$ -pineno (22.96%) el mayoritario, seguido de 3-careno (19.45%) y  $\alpha$ -Pineno (12.48).
- Se identificaron 35 constituyentes químicos presentes en el aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña), siendo pulegona (38.02%) el mayoritario, seguido de mentona (34.29%) y D-isomentona (6.95%).
- Se reporta por primera vez la actividad repelente *in vitro* del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia).
- El aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) presenta alta repelencia frente a los mosquitos hembras de *Anopheles albimanus*, logrando un porcentaje de repelencia de 80 % en su concentración al 2.0%, catalogándose como un repelente de grado IV.
- El aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) presenta moderada repelencia frente a los mosquitos hembras de *Anopheles albimanus*, logrando un porcentaje de repelencia de 60% en su concentración al 1.5%, catalogándose como un repelente de grado III.

## 7. RECOMENDACIONES

El presente trabajo de investigación sugiere las siguientes recomendaciones:

- Evaluar la actividad repelente de los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) mediante estudios *in vivo* para obtener resultados que permitan tener la confianza de su reproducibilidad en humanos.
- Realizar posteriores estudios a través de métodos indicados para confirmar la posible actividad insecticida observada tanto a la concentración de 10% para *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) como a las concentraciones de 10% y 2% para *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña).
- Realizar la extracción del aceite esencial en el mismo lugar donde se realizarán los bioensayos. De no ser así, se debe manejar un sistema de cadena de frío para conservar las características del aceite esencial.
- Plantear y elaborar una fórmula farmacéutica estable hecha a base de las concentraciones de aceite esencial que más actividad repelente mostraron, asegurando así la conservación de sus características.
- Desarrollar un estudio a detalle para conocer el costo de producción que representa elaborar repelentes naturales hechos a base de aceites esenciales con respecto a repelentes sintéticos comercializados actualmente.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MINSA (Ministerio de Salud). (1998). Impacto económico de la malaria en el Perú. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1763.pdf>. [Consulta: 6 Julio 2017]
2. MINSA (Ministerio de Salud). (2012). Análisis de la situación de salud del Perú. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/intsan/asis2012.pdf>. [Consulta: 6 Julio 2017]
3. CALDERÓN G., Fernández R., Valle J. (1995) Especies de la fauna anophelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Perú. *Rev Peru Epidemiol.*; 8(1): 5–23.
4. MORALES AYALA F. (1971). A list of the mosquitoes of Peru. (Diptera, *Culicidae*). *Newsletter Mosq Sist* 3(3): 138-45.
5. KOURÍ G., Guzmán G., Bravo J. (1996) Dengue Hemorrágico en Cuba: Crónica de una Epidemia. *Bol of Sanit Panam.* 100(3):322-327.
6. MINSA (Ministerio de Salud)- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - (\*) Hasta la SE 42 del 2017. Disponible en [http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=14&Itemid=154](http://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=154) [Consulta: 6 marzo 2018]
7. MINSA (Ministerio de Salud)- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - (\*) Hasta la SE 52 del 2016. Disponible en <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4148.pdf> [Consulta: 6 marzo 2018]
8. THAVARA U., Tawatsin J., Chompoonsri W., Suwonkerd C & Asavadachanukorn P. (2001). Laboratory and field evaluations of the insect repellent 3535(ethyl butylacetylaminopropionate) and Deet against mosquito vectors in Thailand. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 17: 190-195.
9. KROEGER A., V. Avila & L. Morrison. (2002). Insecticide impregnated curtains to control domestic transmission of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: cluster randomised trial. *British Med. J.* 325: 810-813.
10. SHARMA, U. & S. SINGH. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis.* 45: 255-572.

11. ALEXANDER B., MAROLI M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 17:1-18.
12. BLACKWELL A., Stuart E & Estambale BA. (2003). The repellent and antifeedant activity of oil of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh.*33(3): 209-214
13. CHOOCHOTE W., Chaithong U., Kamsuk K., Jitpakdi A., Tippawangkosol P., Tuetun B., Champakaew D & Pitasawat B. (2007). Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia.*78 (5):359-364.
14. FRADIN MS & DAY JF. (2002). Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *New England Journal of Medicine.*347 (1): 13-18.
15. ISMAN MB. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology.*51: 45-66.
16. NAT. National Pesticides Telecommunications Network DEET (General Fact Sheet). Oregon State University. (2000). Disponible en <http://npic.orst.edu/factsheets/DEETgen.pdf> [Consulta: 16 Julio 2017]
17. ALEXANDER B., H. Cadena., M.C. Usma & C.A. Rojas. (1995). Laboratory and field evaluations of a repellent soap containing diethyl toluamide (DEET) and permethrin against phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Valle del Cauca, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52: 169-170.
18. TAWATSIN A., S.D Wratten., R.R. Scott., U. Thavara & Y. Techadamrongsin. (2001). Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *J. Vector Ecol.* 26: 76-82.
19. KATZ T.M., J.H. Miller & A.A. Hebert. (2008). Insect repellents: historical perspectives and new developments. *J. Am. Acad. Dermatol.* 58: 865-871.
20. ASAKAWA Y., Dawson GW., Griffiths DC., Lallemand JY., Ley SV., Mori K., Mudd A., Pezechk-Leclaire M., Pickett JA., Watanabe H., Woodcock CM., Zhongning Z. (1988). Activity of Drimane Antifeedants and Related Compounds Against Aphids, and Comparative Biological Effects and Chemical Reactivity of (-)- and (+)-polygodial. *J Chem Ecol.*14 (10): 1845-1855.

21. BRUNETON J. (1995). Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Technique et Documentation, Lavoisier, France.p.p.915.
22. TRIPATHI AK., Prajapati V., Aggrawal KK., Khanuja SPS., Kumar S. (2000) Toxicity towards *Tribolium castaneum* in the fraction of essential oil of *Anethum sowa* seeds. J Med Arom Plant Sci. (22).p. 40.
23. VERMA N., Tripathi AK., Prajapati V., Bahl JR., Khanuja SPS., Kumar S. (2000). Toxicity of essential oil from *Lippia alba* towards stored grain insects. J Med Arom Plant Sci.22. p.50.
24. TRONGTOKIT Y., Rongsriyam Y., Komalamisra N & Apiwathnasorn C. (2005). Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytotherapy Research.19 (4): 303-309.
25. CÁRDENAS E., Riveros I., Lugo L. (2013). Efecto insecticida de cuatro aceites esenciales sobre adultos de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus* en condiciones experimentales. Entomotropica 28(1): 1-10.
26. BEZAYIT S., Tsige M and Kaleab A. (2011). Mosquito Repellent Actions of the Essential Oils of *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* and *Eucalyptus citriodora*: Evaluation and Formulation Studies Journal Of Essential Oil Bearing Plants Vol. 15.
27. CHOOCHOTE W., D. Chaiyasit., D. Kanjanapothi., E. Rattanachanpichai., A. Jitpakdi., B. Tuetun., and B. Pitasawat. (2005). Chemical composition and antimosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). J. Vector Ecol.; 30: 302-309.
28. GILLIJ, Y. (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. Bioresource Technology.99 (7): 2507-2515.
29. BUSSMANN RAINER & SHARON DOUGLAS (2015). Plantas medicinales de los andes y amazonia – La flora magica y medicinal del norte del Perú. Jardin Botanico de Missouri. pp 165-167.
30. MISSOURI BOTANICAL GARDEN – TROPICOS. Nomenclatura Data Base. Disponible en: <http://www.tropicos.org>. [Consulta: febrero 2018]
31. MANGO R., Chavez, J., Lock O. (1990). Sesquiterpene guaiol from *Lepechinia meyenii*. Rev. Latinoamer. Quim. 21 (2), 63-66

32. EGGERS, M. (2000). Composición y variación de aceites esenciales de plátano de los Andes venezolanos con especial atención a *Lepechinia* Willd. (Lamiaceae). Tesis doctoral. Pharmazie. Universitat Hamburg.
33. BRUNO M., Savona G., Piozzi F., De La Torre M., Rodríguez M. (1991). Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyenii* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry* **30**, 2339-2343.
34. ROSSI C., Arias G., Lozano N. (2002). Evaluación antimicrobiana y fitoquímica de *Lepechinia meyenii* (Walp.) “Salvia”. Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales. Farmacia, Lima. Ciencia e investigación **5** (1). [http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/ciencia/vol\\_5N1\\_2002/evaluaci%C3%B3n\\_antimicrobiana.htm](http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/ciencia/vol_5N1_2002/evaluaci%C3%B3n_antimicrobiana.htm).
35. MAQUERA D., Tello M., Romero S., Cotacallapa D. (2009). Caracterización Morfológica y momentos de corte de la población natural y cultivada de “muna” *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb para obtención de aceites esenciales en la microcuenca del Higuera. *Investigación vadiana*.3 (1): 22-29.
36. ULLOA C. (2006) Aromas y sabores andinos. *Rev. Botánica Económica de Los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. Bolivia.1: 313-328.
37. WHO (World Health Organization). (2015). GUIDELINES FOR TREATMENT FOR MALARIA., Third Edition. ISBN 978 924 154912 7.
38. OPS/OMS. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. (2017). Alerta Epidemiológica: Aumento de casos de malaria, 15 de febrero de 2017, Washington, D.C. OPS/OMS. 2017. Disponible en <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-feb-15-phe-alerta-epi-malaria.pdf> [Consulta: 2 marzo 2018]
39. MINSA (Ministerio de Salud)- Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - (\*) Hasta la SE 05 del 2018. Disponible en <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2018/05.pdf> [Consulta: 6 marzo 2018]
40. GETTING PW., Elyazar IR., Moyes CL., Smith DL., Battle KE., Guerra CA. (2012). A long neglected world malaria map: Plasmodium vivax endemicity in 2010. *PLoS*

- Negl Trop Dis.; 6(9):e1814. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22970336> [Consulta: 8 marzo 2018]
41. Battle KE., Gething PW., Elyazar IR., Moyes CL., Sinka ME., Howes RE. (2012). The global public health significance of *Plasmodium vivax*. *Advances in Parasitology*. 2012; 80:1– 111. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123979001000013>. [Consulta: 10 mayo 2018]
42. HAY S., Sinka M., Okara RM., Kabaria CW., Mbithi PM., Tago CC. (2010). Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. *PLoS Medicine* 7(2). Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2817710/> [Consulta: 11 mayo 2018]
43. GETHING PW., Van Boeckel TP., Smith DL., Guerra CA., Patil AP., Snow RW. (2011). Modelling the global constraints of temperature on transmission of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*. *Parasites & Vectors*.4 (1):92. Disponible en <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-1-1> , [Consulta: 11 mayo 2018]
44. GUERRA C., Howes R., Patil A., Gething P., Van Boeckel T., Temperley W. (2009). The international limits and population at risk of *Plasmodium vivax* transmission in 2009. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.4(8):e774. Disponible en <https://dl.vecnet.org/citations/c821gw51j> . [Consulta: 11 mayo 2018]
45. MUELLER I., Galinski MR., Baird JK., Carlton JM., Kochar DK., Alonso PL. (2009). Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *The Lancet Infectious Diseases*.9 (9):555–566. Disponible en [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(09\)70177-X/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(09)70177-X/abstract). [Consulta: 11 mayo 2018]
46. CDA (Colectivo de autores). (2006). Texto básico para el curso de operarios y técnicos auxiliares en vigilancia y lucha antivectorial. Ciudad de la Habana. Disponible en [https://www.ecured.cu/Anopheles albimanus](https://www.ecured.cu/Anopheles_albimanus) . [Consulta: 18 mayo 2018]
47. GONZÁLEZ CR, MI JERCIC & L MUÑOZ (2005) Los Culícidos de Chile (Diptera: Culicidae) *Acta Entomológica Chilena* 29(1):31-35

48. LOUNIBOS PL & JE CONN (2000). Malaria vector heterogeneity in South América American Entomologist 46(4):238-249.
49. METCALF, C. L. (1982). Insectos Destructivos e Insectos Útiles. Sus Costumbres y Control. México: Editorial Continental. Disponible en <http://www.worldcat.org/title/insectos-destructivos-e-insectos-utiles-sus-costumbres-y-su-control/oclc/708561357?referer=di&ht=edition> . [Consulta: 25 mayo 2018]
50. CAD, Colombia Alternative Development. (2003). Project Manual de Fitoprotección y Análisis de Plaguicidas. Fundación Chemonics Colombia. Diciembre. Disponible en [http://plaguicidas-y-alternativas.org/sites/default/files/u/uid/p624/f-234-plugin-67manual\\_cultivos\\_plantas\\_medicinales\\_y\\_aromaticas.pdf](http://plaguicidas-y-alternativas.org/sites/default/files/u/uid/p624/f-234-plugin-67manual_cultivos_plantas_medicinales_y_aromaticas.pdf). [Consulta: 1 Junio 2018]
51. Masada, Y. (1976). Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. New York (N.Y.): Wiley. Disponible en: <https://lib.ugent.be/catalog/rug01:000086174> [Consulta: 1 Junio 2018]
52. BLACKWELL A., Stuart E & Estambale BA. (2003). The repellent and antifeedant activity of oil of *Myrica gale* oil against *Aedes aegypti* mosquitoes and its enhancement by the addition of salicylic acid. The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh.33(3): 209-214
53. DAZA LETICIA & Natalia Flores. Diseño de un repelente para insectos voladores con base en productos naturales. [Tesis de Licenciado en Farmacia y Química]. Medellín, Colombia. Universidad EAFIT; 2006.
54. KIRK RAYMOND & OTHMER, DONALD. (1961). Enciclopedia de tecnología Química. 1ª Edición. México: Editorial Uthea.
55. CERRATE, E. (1969). Manera de preparar plantas para un Herbario. Museo de Historia Natural, Serie de Divulgación, No. 1. 10 pp.
56. TALUKER F., Howse P, (1994). Laboratory evaluation of toxic and repellent properties of the pithraj tree, *Aphanamixis polystachya* Wall & 44 Parker, against *Sitophilus oryzae* (L.). International Journal of Pest Management, 40(3): 274-279.
57. RUIZ C., Díaz C., & Rojas R. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(2), 81-94. Disponible en:

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2015000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000200002&lng=es&tlng=es). [Consulta: 25 julio 2018]

58. FUERTES R., César M., Munguía Y. (2014). Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb "Muña" de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación*, [S.l.], v.4, n1, p.23-39. ISSN 1609-9044. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3389>. [Consulta: 25 julio 2018]
59. MAQUERA D., Romero S., Cotacallapa D., Tello M. (2009). Componentes químicos de los aceites esenciales de muna *Minthostachys mollis* Grisebach (Kunth.) en Huanuco. *Revista de investigación Valdizana*. 3(2):100-106. Disponible en: <https://es.calameo.com/read/0003556051acdc3bf302f>. [Consulta: 1 Agosto 2018]
60. ARAUJO, E.; Silveira, E.; Lima, M. A.; Andrade, M.; Lima, M. A. A. 2003. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3760-3762.
61. SANZ I., Ayala i. & P. Moya (2008). Aceite esencial de la malvarrosa (*Pelargonium capitatum* L'Hérit). Actividad insecticida y fungicida. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, ISSN 1131-8988; 90-95.
62. NERIO S & J. OLIVERO-VERBEL. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*.101 (1): 372-378.
63. JAENSON TG., Palsson K & Borg-Karlson AK. (2006). Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea Bissau. *Journal Medical of Entomology*. 43 (1): 113-119.
64. MINSA. (2015). Protocolo sanitario de urgencia para el reforzamiento de la vigilancia entomológica del vector *Aedes Aegypti* mediante el uso de ovitrampas para establecimientos de salud: R.M. N° 010-2015/MINSA / Ministerio de Salud. Dirección General de Intervenciones Estratégicas en Salud Pública -- Lima: Ministerio de Salud. 20 p.; ilus. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3817.pdf>. [Consulta: 2 Agosto 2018]
65. DÁVILA C. (2016). Actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach; y elaboración de una crema repelente contra insectos adultos de la familia

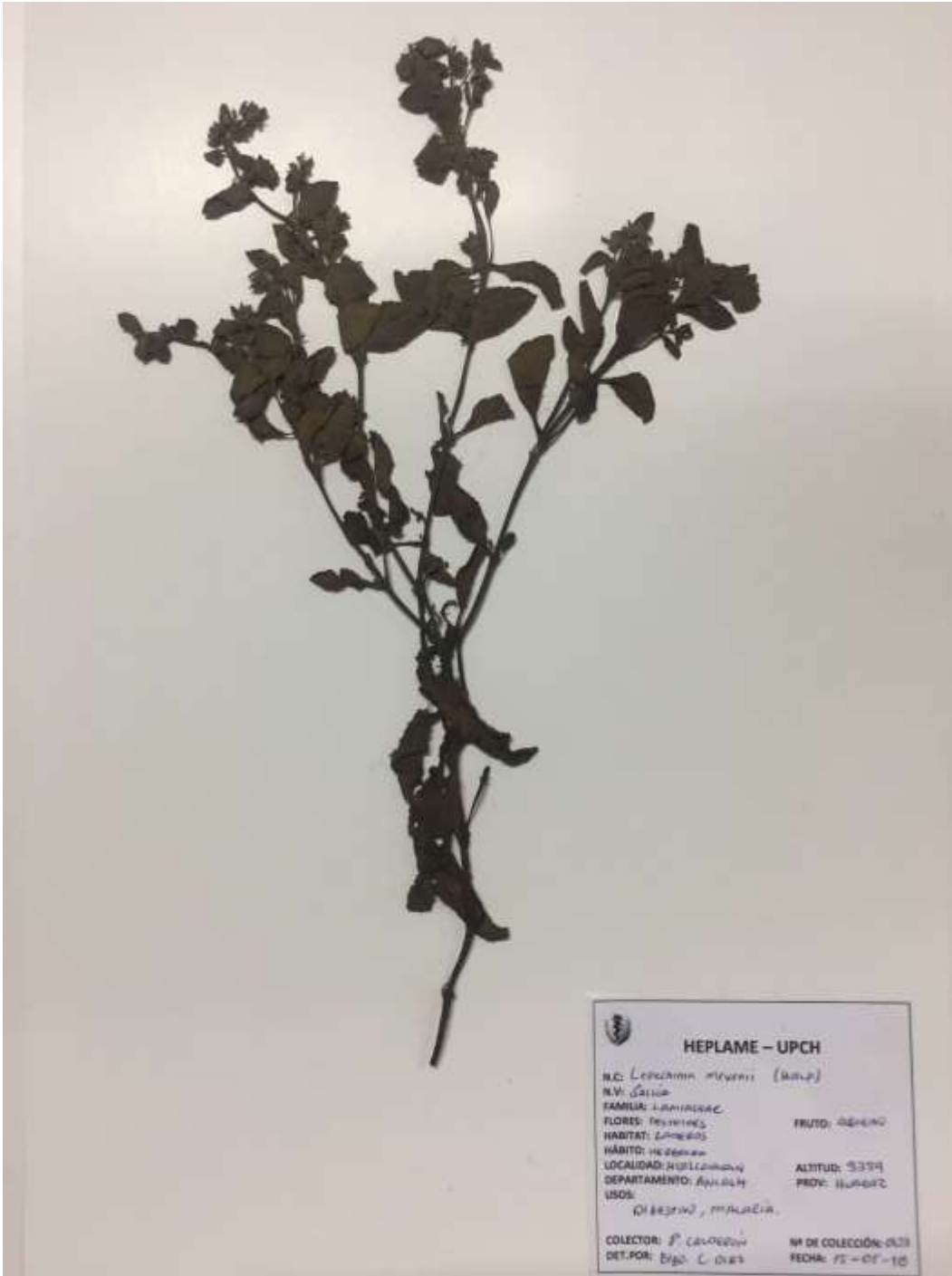
Culicidae.[Tesis de pregrado para optar por el título profesional de Químico Farmacéutico]. Disponible en

[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4878/D%C3%A1vila\\_g.c.pdf?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/4878/D%C3%A1vila_g.c.pdf?sequence=1) . [Consulta: 5 Agosto 2018]

66. TAWATSIN A., Wratten SD., Scott RR., Thavara U & Techan damrongsin Y. (2001). Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal of Vector Ecology*. 26 (1): 76-82.

## 9. ANEXOS

**ANEXO 1.** Montaje de muestra vegetal correspondiente a *Lepechinia meyenii* Walp.



**ANEXO 2.** Montaje de muestra vegetal correspondiente a *Minthostachys mollis* Griseb.



**ANEXO 5.** Obtención del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) mediante destilación por arrastre con vapor.



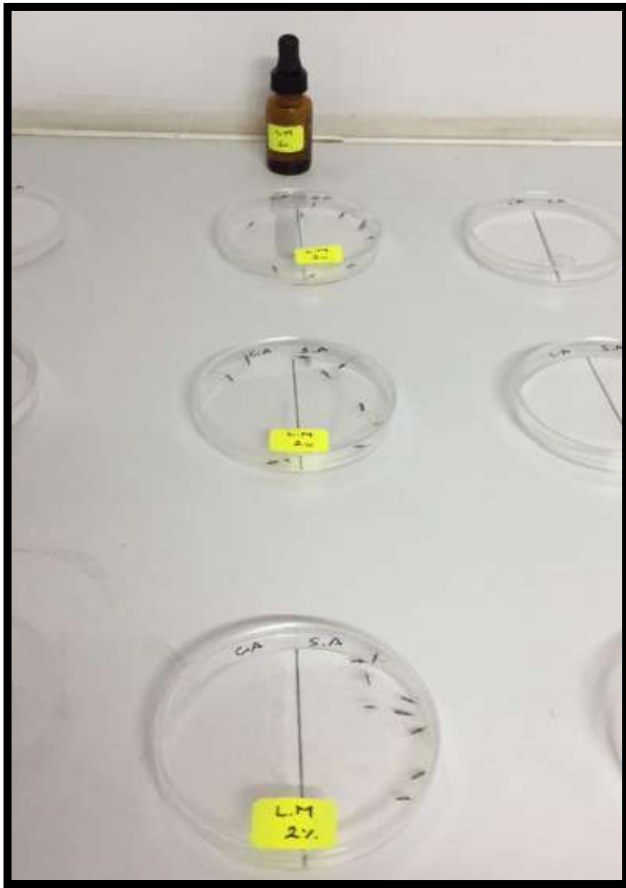
**ANEXO 6.** Colección de especímenes hembras de *Anopheles albimanus* en la localidad de Puerto Pizarro, distritito de Tumbes, provincia de Tumbes.



**ANEXO 8.** Características fisicoquímicas de los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) respectivamente.



**ANEXO 9.** Test de repelencia de los aceites esenciales que más actividad repelente mostraron.



*Lepechinia meyenii* Walp 2%



*Minthostachys mollis* 1.5% Griseb.

**ANEXO 10.** Test de repelencia de los aceites esenciales de *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia) y *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña) a diferentes concentraciones.



## ANEXO 11. Análisis de datos mediante la prueba estadística de Mann-Whitney

- Comparación de grupos controles vs concentración de aceite esencial para *Lepechinia meyenii* Walp. (Pacha salvia).

Ranksom num_mosq if especial=="ML" & (cat=="Control_neg"   cat=="AE_05"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	83	85.5
Control_pos	9	88	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-10.32		
	117.93		
Ho: num_mosq(cat==AE_05) = num_mosq(cat==Control_neg)			
z = -0.230			
Prob >  z  = 0.8179			

Ranksom num_mosq if especial=="ML" & (cat=="Control_pos"   cat=="AE_05"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	45	85.5
Control_pos	9	126	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-7.15		
adjusted variance	121.10		
Ho: num_mosq(cat==AE_05) = num_mosq(cat==Control_pos)			
z = -3.680			
Prob >  z  = 0.0002			

Ranksom num_mosq if especial=="ML" & (cat=="Control_neg"   cat=="AE_10"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	118.5	85.5
Control_pos	9	52.5	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-6.75		
adjusted variance	121.50		
Ho: num_mosq(cat==AE_10) = num_mosq(cat==Control_neg)			
z = 2.994			
Prob >  z  = 0.0028			

Ranksom num_mosq if especial=="ML" & (cat=="Control_pos"   cat=="AE_10"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	45	85.5
Control_pos	9	126	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-10.32		
adjusted variance	117.93		
Ho: num_mosq(cat==AE_10) = num_mosq(cat==Control_pos)			
z = -3.729			
Prob >  z  = 0.0002			

Ranksom num_mosq if especial=="ML" & (cat=="Control_neg"   cat=="AE_15"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	123	85.5
Control_pos	9	48	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-8.74		
adjusted variance	119.51		
Ho: num_mosq(cat==AE_15) = num_mosq(cat==Control_neg)			
z = 3.430			
Prob >  z  = 0.0006			

Ranksom num_mosq if especial=="ML" & (cat=="Control_pos"   cat=="AE_15"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	54	85.5
Control_pos	9	117	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-10.32		
adjusted variance	117.93		
Ho: num_mosq(cat==AE_15) = num_mosq(cat==Control_pos)			
z = -2.901			
Prob >  z  = 0.0037			

Ranksom num_mosq if especial=="ML" & (cat=="Control_neg"   cat=="AE_20"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	124.5	85.5
Control_pos	9	46.5	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-6.75		
adjusted variance	121.50		
Ho: num_mosq(cat==AE_20) = num_mosq(cat==Control_neg)			
z = 3.538			
Prob >  z  = 0.0004			

Ranksom num_mosq if especial=="ML" & (cat=="Control_pos"   cat=="AE_20"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	81	85.5
Control_pos	9	90	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-38.91		
adjusted variance	89.34		
Ho: num_mosq(cat==AE_20) = num_mosq(cat==Control_pos)			
z = -0.476			
Prob >  z  = 0.6340			

➤ Comparación de grupos controles vs concentración de aceite esencial para *Minthostachys mollis* Griseb. (Muña)

Ranksom num_mosq if especial=="MM" & (cat=="Control_neg"   cat=="AE_05"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_05	9	108	85.5
Control_neg	9	63	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-10.72		
adjusted variance	117.53		
Ho: num_mosq(cat==AE_05) = num_mosq(cat==Control_neg)			
z = 2.075			
Prob >  z  = 0.0379			

Ranksom num_mosq if especial=="MM" & (cat=="Control_pos"   cat=="AE_05"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_05	9	45	85.5
Control_pos	9	126	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-10.32		
adjusted variance	117.93		
Ho: num_mosq(cat==AE_05) = num_mosq(cat==Control_pos)			
z = -3.729			
Prob >  z  = 0.0002			

Ranksom num_mosq if especial=="MM" & (cat=="Control_neg"   cat=="AE_10"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	120	85.5
Control_neg	9	51	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-5.96		
adjusted variance	122.29		
Ho: num_mosq(cat==AE_10) = num_mosq(cat==Control_neg)			
z = 3.120			
Prob >  z  = 0.0018			

Ranksom num_mosq if especial=="MM" & (cat=="Control_pos"   cat=="AE_10"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_10	9	49.5	85.5
Control_pos	9	121.5	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-13.90		
adjusted variance	114.35		
Ho: num_mosq(cat==AE_10) = num_mosq(cat==Control_pos)			
z = -3.367			
Prob >  z  = 0.0008			

Ranksom num_mosq if especial=="MM" & (cat=="Control_neg"   cat=="AE_15"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_15	9	124.5	85.5
Control_neg	9	46.5	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-3.18		
adjusted variance	125.07		
Ho: num_mosq(cat==AE_15) = num_mosq(cat==Control_neg)			
z = 3.487			
Prob >  z  = 0.0005			

Ranksom num_mosq if especial=="MM" & (cat=="Control_pos"   cat=="AE_15"), by(cat) Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
cat	obs	rank sum	expected
AE_15	9	58.5	85.5
Control_pos	9	112.5	85.5
combined	18	171	171
unadjusted variance	128.25		
adjustment for ties	-10.32		
adjusted variance	117.93		
Ho: num_mosq(cat==AE_15) = num_mosq(cat==Control_pos)			
z = -2.486			
Prob >  z  = 0.0129			