

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ**

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**



**Identificación de compuestos volátiles de *Alphitobius diaperinus* y estudio de su sensibilidad antenal en función del sexo y la experiencia sexual**

**Tesis para obtener el título profesional de Licenciada en Química**

**Autora:**

Vanessa Jessenia Mayorga Martino

**Asesora:**

Dra. Madina Mansurova

Lima, mayo del 2024

## Informe de Similitud

Yo, .....dra **Madina Mansurova**,

docente de la Facultad de ..... **Ciencias e Ingeniería** ..... de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor(a) de la tesis/el trabajo de investigación titulado

***“Identificación de compuestos volátiles de *Alphitobius diaperinus* y estudio de su sensibilidad antenal en función del sexo y la experiencia sexual”***

de la autora ... **Vanessa Jessenia Mayorga Martino**,

dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de **11%**. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 08/05/2024.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha: ..... **Lima, 20.05.2024** .....

Apellidos y nombres del asesor / de la asesora: <u>Mansurova, Madina</u>	
DNI: 49071162	Firma 
ORCID: 0000-0001-6284-8283	

## Resumen

El escarabajo *Alphitobius diaperinus* es una plaga principalmente de granjas avícolas que causa grandes pérdidas económicas en el sector agropecuario a nivel mundial. Esta plaga es portadora de virus, bacterias y hongos, que afectan la salud de las aves. Existen formas establecidas para combatir esta plaga; sin embargo, debido a los daños que causan algunas de estas, como los pesticidas, se buscan métodos de control más eficientes y con menor toxicidad. Una alternativa es el uso de feromonas de la plaga, compuestos químicos emitidos por el mismo insecto y detectados por medio de sus antenas, con los cuales se busca provocar un efecto en su conducta.

El presente proyecto de tesis tiene como objetivo identificar los compuestos químicos volátiles producidos por *A. diaperinus* y evaluar la sensibilidad antenal del insecto frente a sus propios compuestos volátiles y a fracciones cromatográficas de estos. Para ello, se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y la técnica de electroantenografía para la evaluación de la sensibilidad antenal. Se obtuvo que la composición química varía dependiendo de su sexo y que la respuesta antenal está afectada por el sexo y la experiencia sexual de los insectos adultos. Se identificaron terpenos, alcoholes, ésteres, entre otros, los cuales se propone estudiar la respuesta antenal de estos compuestos para evaluar su poder atrayente y proponer, en un futuro, un control de esta plaga a partir de aquellos compuestos químicos.



A mi familia

## Agradecimientos

A mi asesora de tesis, la Dra. Madina Mansurova, por la confianza puesta en mí, por su orientación y por el tiempo invertido para el desarrollo y mejora de mi trabajo.

A los miembros del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA), en especial al Dr. Alfredo Ibáñez y al Dr. Carlos Martel, por abrirme las puertas del laboratorio, darme la oportunidad de ser parte del proyecto y aprender mucho de ellos en el camino. Adicionalmente, un profundo agradecimiento a la Dra. Erika Calla, por todas sus enseñanzas, cada uno de sus consejos y por su constante apoyo durante el proceso de mi tesis.

A mis padres Alfredo Mayorga y Jessenia Martino, por ser increíbles ejemplos de lo que es la perseverancia, la responsabilidad y la dedicación. En especial, por darme su apoyo constante e incondicional durante mi carrera universitaria; por brindarme la confianza y seguridad en sus palabras cuando más lo necesitaba. También, agradecer a mis hermanos Raúl y Berenice, por su amor, ánimo y comprensión en tiempos de estrés. A pesar de su corta edad, he aprendido mucho de ellos y son una gran inspiración para mí.

A los profesores de la sección Química, por todas sus enseñanzas, su paciencia y su motivación brindada durante mi formación profesional.

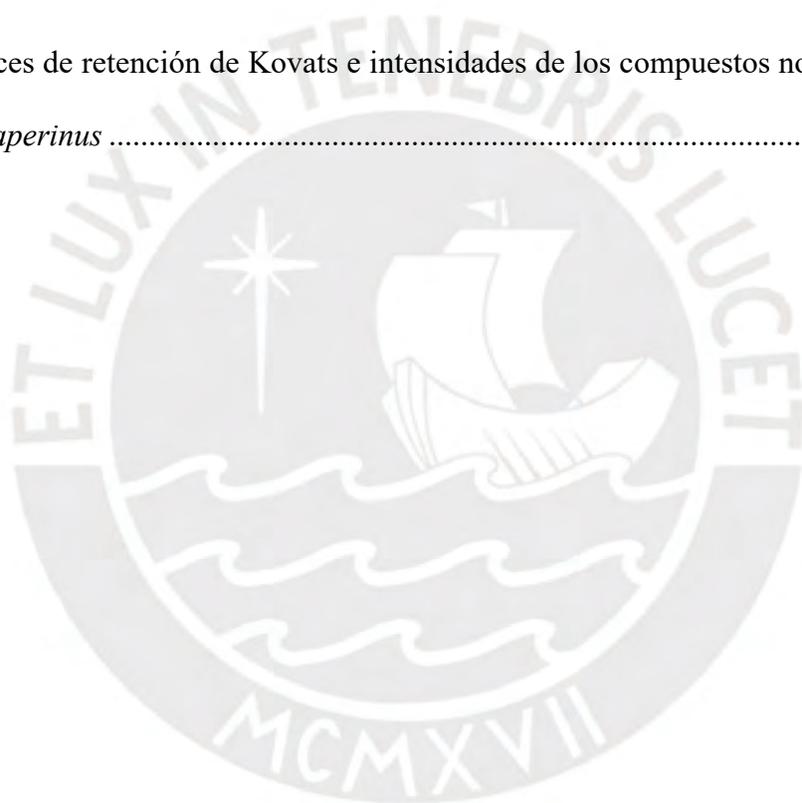
A mis amigos de la sección química, por ser una gran compañía durante los años universitarios, como también un gran soporte emocional.

Al Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) a través del proyecto N° 185-2020-PROCIENCIA y al Partner Group del Max Planck-PUCP por el financiamiento económico recibido para la realización de mi tesis.

## Índice general

<b>1. Marco Teórico</b> .....	1
1.1. Importancia de la industria avícola .....	1
1.2. <i>Alphitobius diaperinus</i> .....	2
1.2.1. Aspecto biológico y ciclo de vida.....	2
1.2.2. Impactos de la plaga y métodos de control.....	4
1.2.3. Los semioquímicos y su uso como alternativa a métodos de control .....	5
1.3. Estudio de semioquímicos.....	8
<b>2. Objetivos</b> .....	11
2.1. Objetivo general .....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
<b>3. Parte experimental</b> .....	12
3.1. Equipos y reactivos .....	12
3.2. Metodología .....	13
3.2.1. Crianza de insectos .....	13
3.2.2. Colecta de volátiles.....	14
3.2.3. Análisis e identificación de compuestos químicos .....	15
3.2.4. Uso de electroantenografía .....	17
<b>4. Resultados</b> .....	19
4.1. Identificación de compuestos volátiles y sus fracciones.....	19

4.2. Sensibilidad de la antena según el sexo y la experiencia sexual .....	22
<b>5. Discusiones</b> .....	24
<b>6. Conclusiones</b> .....	27
<b>7. Referencias</b> .....	28
<b>8. Anexos</b> .....	37
Anexo A. Tratamiento de datos.....	37
Anexo B. Índices de retención de Kovats e intensidades de los compuestos no identificados de <i>Alphitobius diaperinus</i> .....	39

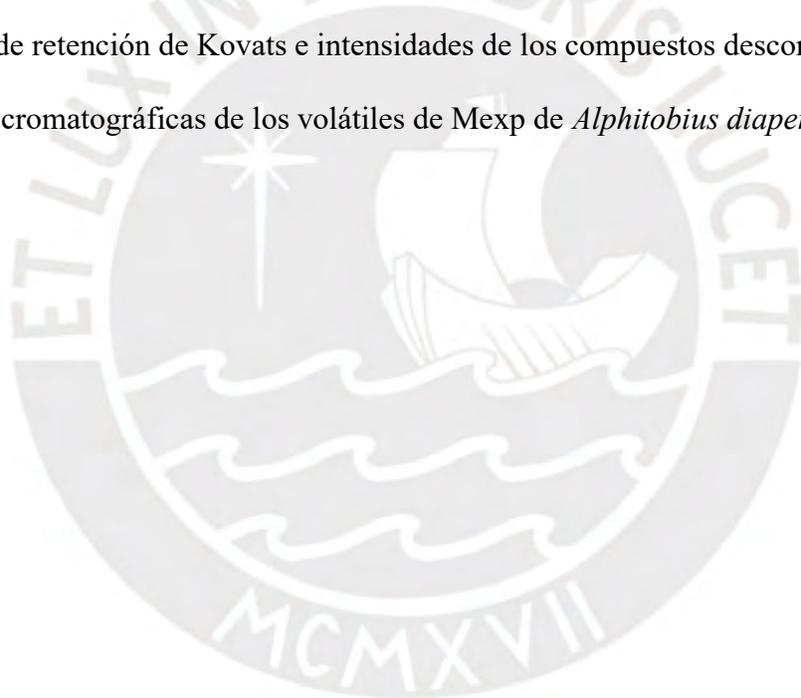


## Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida del escarabajo <i>Alphitobius diaperinus</i> .....	3
Figura 2. Morfología de la antena de un insecto.....	3
Figura 3. Diagrama de un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de gases. ....	9
Figura 4. Esquema de registro en el electroantenograma.. ..	10
Figura 5. Sistema armado para la colecta de volátiles. ....	14
Figura 6. Montaje del electroantenograma. ....	17
Figura 7. Gráfico de escalamiento no métrico de datos NMDS. ....	19
Figura 8. Impacto del sexo y la experiencia sexual en las respuestas antenales de adultos de <i>Alphitobius diaperinus</i> . ....	23
Figura 9. Gráfica de puntuaciones de PCA.....	37
Figura 10. Segunda gráfica de puntuaciones de PCA.....	38

## Índice de tablas

Tabla 1. Compuestos químicos identificados en <i>Alphitobius diaperinus</i> .....	7
Tabla 2. Condiciones del GC-MS.....	16
Tabla 3. Identificación de los compuestos químicos presentes en los volátiles de <i>Alphitobius diaperinus</i> . ....	20
Tabla 4. Identificación de los compuestos químicos presentes en las fracciones cromatográficas de los volátiles de Mexp de <i>Alphitobius diaperinus</i> .....	21
Tabla 5. Promedio de respuestas electroantenográficas de <i>Alphitobius diaperinus</i> . ....	22
Tabla 6. Índices de retención de Kovats e intensidades de los compuestos desconocidos presentes en las fracciones cromatográficas de los volátiles de Mexp de <i>Alphitobius diaperinus</i> .....	39



## Abreviaturas

MS	Espectrometría de masas
EAG	Electroantenografía
GC	Cromatografía de gases
EI	Ionización electrónica
CI	Ionización química
TIC	Cromatograma de iones totales
PCA	Análisis de componentes principales
F <sub>exp</sub>	Hembra experimentada
F <sub>v</sub>	Hembra virgen
M <sub>exp</sub>	Macho experimentado
M <sub>v</sub>	Macho virgen
VOC	Compuestos orgánicos volátiles
VOC-F <sub>exp</sub>	Compuestos orgánicos volátiles de hembras experimentadas
VOC-M <sub>exp</sub>	Compuestos orgánicos volátiles de machos experimentados
M <sub>HEX</sub>	Fracción hexánica de los compuestos orgánicos volátiles de M <sub>exp</sub>
M <sub>MEOH</sub>	Fracción metanólica de los compuestos orgánicos volátiles de M <sub>exp</sub>
M <sub>DCM</sub>	Fracción diclorometánica de los compuestos orgánicos volátiles de M <sub>exp</sub>
F <sub>HEX</sub>	Fracción hexánica de los compuestos orgánicos volátiles de F <sub>exp</sub>
F <sub>MEOH</sub>	Fracción metanólica de los compuestos orgánicos volátiles de F <sub>exp</sub>
F <sub>DCM</sub>	Fracción diclorometánica de los compuestos orgánicos volátiles de F <sub>exp</sub>
EQ	Equivalente
RI	Índice de retención de Kovats
ANOVA	Análisis de varianza
PERMANOVA	Análisis de varianza permutacional multivariante

## **1. Marco Teórico**

### **1.1. Importancia de la industria avícola**

La industria avícola se basa en la crianza, la producción y la comercialización de aves de corral, tales como pollos, pavos y patos, entre otras aves, junto con sus derivados. Estos brindan proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales, por lo que mejoran los niveles nutricionales y disminuyen el riesgo de enfermedades.<sup>1-3</sup> Esta industria se ha vuelto de gran importancia a nivel global y se encuentra en un constante crecimiento gracias a la alta demanda de sus productos para la dieta humana.<sup>2</sup> Como ejemplo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ha reportado en el año 2023 una producción total de carne de aves de corral a nivel mundial de 142,7 millones de toneladas.<sup>4</sup> Además, esta industria se ha desarrollado tecnológicamente y, en consecuencia, tiene alta eficiencia en su producción. En relación al progreso tecnológico, se utilizan técnicas modernas tanto para el manejo de estos animales, como para el monitoreo de su salud y el monitoreo ambiental.<sup>5</sup>

A nivel nacional, la industria avícola se ha convertido en uno de los sectores de producción más importantes para la economía y el desarrollo del país.<sup>6</sup> El Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI) reportó que en el mes de diciembre del 2023 este sector representó el 26,5% del Valor Bruto de la Producción Agropecuaria, con 22,3% por la carne de aves y 4,2% por los huevos de gallina.<sup>6</sup> Además, el país ha mostrado un aumento significativo en la producción de aves de corral durante las últimas décadas y seguirá creciendo para cubrir la demanda interna.<sup>6</sup> Sin embargo, aún existen varias dificultades que ponen en peligro la seguridad alimentaria y frenan el eficiente desarrollo del sector. Las preocupaciones actuales incluyen a los microorganismos patógenos, la propagación de infecciones y la contaminación

del medio ambiente debido a los pesticidas.<sup>1</sup> En concreto, los microorganismos pueden infectar al ave por medio de alimentos, agua, desechos y plagas de insectos. Aquellos organismos se posicionan en el tracto gastrointestinal del ave y contaminan su carne durante el procesamiento avícola.<sup>7</sup> Por ello, es necesario priorizar y garantizar el bienestar de las aves de corral, como también el cuidado al medio ambiente y la salud humana.

## **1.2. *Alphitobius diaperinus***

### **1.2.1. Aspecto biológico y ciclo de vida**

El escarabajo *Alphitobius diaperinus*, también llamado gusano menor de la harina o escarabajo de la cama, es un insecto del orden Coleóptera y de la familia Tenebrionidae. Con respecto a su origen, se cree que esta especie es nativa de África subsahariana y, en la actualidad, su distribución es global.<sup>8</sup> El insecto posee una gran adaptabilidad y plasticidad fisiológica debido a su versatilidad para modificar procesos y funciones fisiológicas con el fin de mantener un funcionamiento óptimo en las condiciones que se encuentre.<sup>9</sup> A nivel nacional, se desconoce desde cuándo habitan en el Perú, pero estos insectos han sido reportados desde la década de 1990 en la avicultura.<sup>10</sup> Este coleóptero es la principal plaga de granos alimenticios almacenados para la industria avícola.<sup>11</sup> Su ciclo de vida pasa por huevo, 8 a 11 estados larvarios, pupa y, finalmente, escarabajo adulto (Figura 1).<sup>12</sup> El tiempo de cada etapa varía dependiendo de las condiciones ambientales, pues se desarrollan con mayor rapidez a mayor temperatura y humedad, y de manera mucho más lenta en climas fríos.<sup>12,13</sup> Los insectos en etapa adulta tienen una forma ovalada y miden entre 4 y 6 mm. Las hembras pueden colocar entre 3 y 4 huevos por día y logran depositar hasta 2000 huevos durante su vida.<sup>12-14</sup>

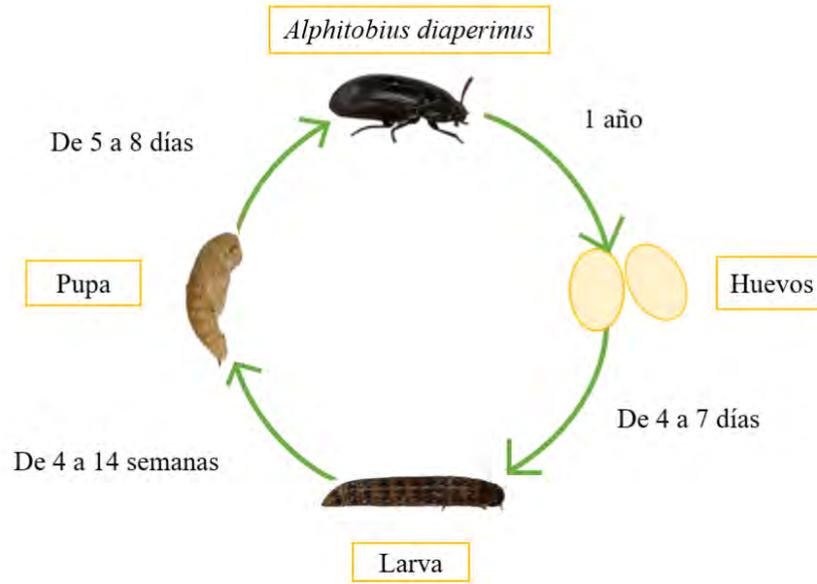


Figura 1. Ciclo de vida del escarabajo *Alphitobius diaperinus*. Información obtenida de las fuentes [12,15].

Las antenas de *A. diaperinus* son de tamaño pequeño (1 mm) y de forma aserrada.<sup>16</sup> Estas poseen once eslabones y se divide en tres segmentos, los cuales son el escapo, el pedicelo y el flagelo, como se muestra en la Figura 2.<sup>14,16,17</sup> El fragmento correspondiente al escapo es el más cercano a la cabeza y está unido a ella mediante un borde de cutícula intersegmentaria flexible. El pedicelo es la fracción que, junto con el escapo, presenta músculos con los cuales se logra la movilidad en la antena. El flagelo corresponde al segmento terminal de la antena y, en el caso del *A. diaperinus*, su último eslabón es más grande y de un color más claro.<sup>14,16,17</sup>

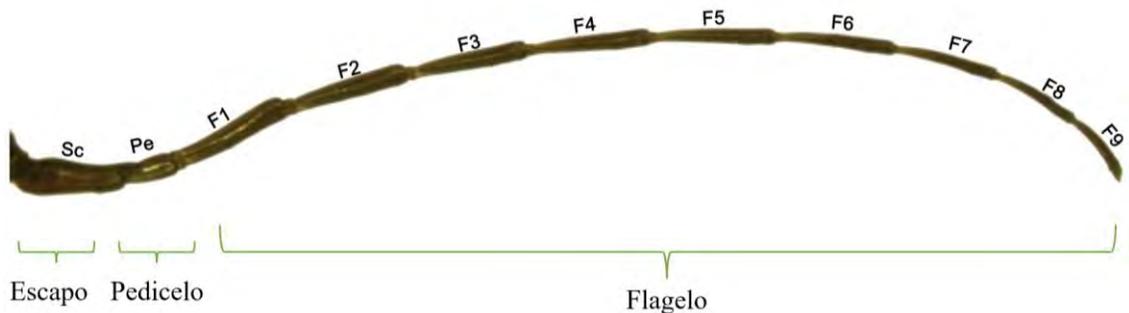


Figura 2. Morfología de la antena de un insecto. Imagen modificada de la referencia [14].

### 1.2.2. Impactos de la plaga y métodos de control

El escarabajo *A. diaperinus* es una plaga muy dañina para las granjas avícolas. Principalmente, el insecto es portador de hongos, bacterias y virus, tales como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, y *Campylobacter*, entre otros, los cuales causan enfermedades.<sup>12,18</sup> Ello trae consigo una cadena de problemas, pues las aves, adultas o polluelos, pueden ingerir entre 300 y 500 insectos y larvas al día, causándoles principalmente desnutrición, producto de las infecciones. Esta pérdida del peso y del tamaño de las aves debido a los patógenos conlleva a una pérdida económica para los avicultores, como también origina problemas de salud en los consumidores humanos.<sup>12,19</sup> Por ejemplo, en Estados Unidos, la *Salmonella* y el *Campylobacter* son los patógenos más distribuidos por la transmisión por alimentos, con un porcentaje del 73,4%, y son los responsables del 55% de muertes humanas debido a este tipo de transmisiones.<sup>7</sup> Además, esta plaga causa daños en los materiales o en la infraestructura de las instalaciones avícolas debido a las excavaciones que los insectos realizan para obtener sitios de puesta de huevos y para su etapa como pupa.<sup>12,20</sup>

Por todo ello, es necesario controlar la población de *A. diaperinus* en las granjas avícolas. Esto se puede lograr mediante métodos de control, como los biológicos, los físicos y los químicos. El control biológico consiste en la utilización de los enemigos naturales del insecto para controlar los niveles de la plaga de manera natural, los cuales pueden ser depredadores, nemátodos o parasitoides.<sup>21,22</sup> Lo negativo de esta técnica es que requiere de un tiempo prolongado para obtener resultados a largo plazo, además de que los agentes de control biológico son propensos a las condiciones climáticas del lugar, lo cual lo vuelve un método impredecible.<sup>23</sup> El control físico utiliza técnicas sistemáticas para el manejo de la

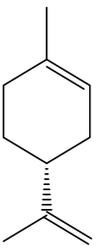
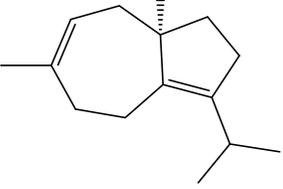
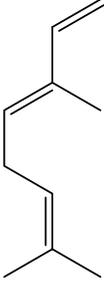
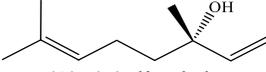
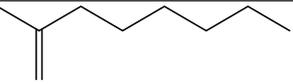
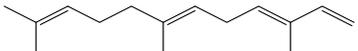
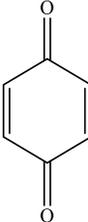
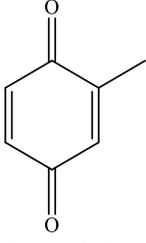
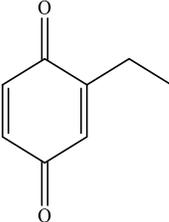
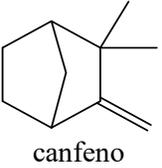
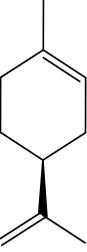
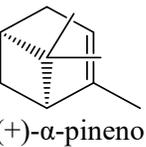
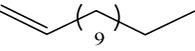
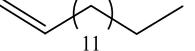
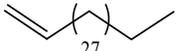
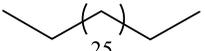
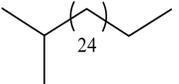
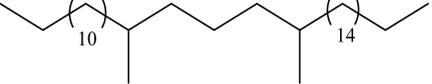
plaga, como controlar la temperatura y los niveles de humedad de la zona, emplear trampas tradicionales y la limpieza estratégica del lugar, que se basa, para este escarabajo, en una constante reposición de las camas de paja en los sistemas de reproducción.<sup>22,24,25</sup> Sin embargo, este método presenta desventajas como el costo de la constante limpieza y cuidado, y también la necesidad de mano de obra.<sup>24-26</sup> El control químico emplea sustancias químicas para controlar al insecto y se divide en el uso de insecticidas y semioquímicos. Tradicionalmente, el tratamiento con insecticidas es el más utilizado de entre todos los métodos de control y consiste en eliminar a la plaga con compuestos sintetizados comercialmente.<sup>21,22,26</sup> Sin embargo, este método puede traer consigo varias desventajas, como la contaminación del medio ambiente, la intoxicación de las aves, la eliminación de animales no objetivo y la generación de resistencia en la plaga.<sup>26,27</sup> Por ello, se necesitan controles de plagas tan efectivos como los insecticidas, pero que, a la vez, sean más específicos y no presenten los problemas de toxicidad y contaminación de los métodos convencionales; es decir, métodos económicamente más beneficiosos para los avicultores y más seguros para el consumidor final.<sup>12</sup>

### **1.2.3. Los semioquímicos y su uso como alternativa a métodos de control**

Un método de control químico alternativo son los semioquímicos, los cuales son compuestos químicos que los organismos vivos liberan para comunicarse entre sí.<sup>28,29</sup> En el caso de los insectos, sus antenas son las responsables de la captación de semioquímicos, pues son estructuras sensoriales que tienen receptores denominados sensilas, las cuales permiten la detección de los volátiles.<sup>10</sup> Los semioquímicos pueden ser aleloquímicos y feromonas; de los cuales, los aleloquímicos se utilizan en la comunicación entre distintas especies, como la interacción planta insecto, brindando beneficios o siendo perjudiciales para el emisor y/o

receptor de la sustancia química.<sup>28,29</sup> Por otro lado, las feromonas permiten la comunicación entre una misma especie y transmiten información específica. Por ejemplo, las feromonas sexuales permiten la atracción entre hembra y macho para incitar la cópula. Las feromonas de agregación reúnen a los individuos de ambos sexos por algún beneficio que puedan conseguir, como la localización de alimento o refugio. Por el contrario, las feromonas de alarma provocan la dispersión o retirada de la especie.<sup>28-30</sup> Estos tipos de feromonas son muy utilizados para el control de plagas de insecto mediante el uso de trampas físicas.<sup>28,31,32</sup> El beneficio de estas llamadas “biotrampas” es que son específicas para el insecto y no presentan los problemas de toxicidad de los plaguicidas, por lo que son más respetuosas con la salud animal, humana y con el medio ambiente.<sup>33</sup> Por ello, se considera que pueden llegar a ser el potencial reemplazo de los insecticidas, los cuales son los más reconocidos y utilizados hasta el momento. Sin embargo, se debe realizar un estudio previo para escoger los semioquímicos a utilizar, ya que existe la probabilidad de que estos compuestos puedan influir en el comportamiento de especies no objetivo.<sup>34</sup> En la Tabla 1, se muestran algunos compuestos químicos presentes en el escarabajo *A. diaperinus* que han logrado ser identificados y que incluyen compuestos volátiles, compuestos presentes en las glándulas abdominales y otros que se encuentran en la cutícula del insecto.<sup>35-40</sup>

Tabla 1. Compuestos químicos identificados en *Alphitobius diaperinus*.

Tipo de colecta	Compuestos químicos			Ref
Volátiles	 (R)-(+)-limoneno*	 (R)-dauceno*	 (E)-β-ocimeno*	35– 38
	 (S)-(+)-linalol	 2-nonanona*	 (E,E)-α-farneseno*	
Glándulas abdominales	 1,4-benzoquinona**	 2-metil-1,4-benzoquinona**	 2-etil-1,4-benzoquinona**	39
	 canfeno	 (S)-(-)-Limoneno	 (+)-α-pineno	
Compuestos cuticulares	 1-trideceno	 1-pentadeceno	 3-metilpentacosano	40
	 1-hentriaconteno	 n-nonacosano	 2-metiloctacosano	
	 13,17-dimetiltriacontano			

\*señales químicas pertenecientes de las feromonas de agregación y \*\*señales químicas pertenecientes de las feromonas de alarma

### 1.3. Estudio de semioquímicos

Uno de los métodos de identificación de semioquímicos es mediante el uso de la técnica de cromatografía de gases (GC) acoplada a la espectrometría de masas (MS). La espectrometría de masas es una técnica analítica que se basa en la ionización de moléculas, las cuales son analizadas o separadas a partir de su relación masa/carga.<sup>41-43</sup> Esta técnica se divide principalmente en tres etapas, las cuales se llevan a cabo en distintas partes del equipo (Figura 3). Primero, la muestra pasa por una fuente de ionización, la cual se encarga de convertir a las moléculas en iones en fase gaseosa.<sup>41-43</sup> Se puede utilizar una fuente de ionización fuerte o débil, y ello dependerá de la naturaleza del compuesto químico a estudiar. Un ejemplo clásico de ionización fuerte es el método de ionización por impacto de electrones (EI), y de ionización débil, la ionización química (CI). Después, los fragmentos ionizados pasan por un analizador, el cual se encargará de separarlos dependiendo de su relación masa/carga.<sup>41-43</sup> Estos pueden ser de resolución baja (cuadrupolo), resolución media (tiempo de vuelo o TOF) o de alta resolución (*Orbitrap*). Posteriormente, los iones analizados pasan por el detector, el cual sirve para obtener su abundancia relativa; y la elección del detector es dependiente de la elección del analizador.<sup>41-43</sup> Esta técnica muestra una alta capacidad de detección y análisis; sin embargo, el espectrómetro de masas no es suficiente para la identificación de compuestos, en especial si se le pide identificar uno entre varios isómeros estructurales (compuestos con la misma relación masa/carga,  $m/z$ ). Por ello, para aumentar la sensibilidad y capacidad de separación, es muy común acoplar la técnica MS con la cromatografía de gases, la cual se basa en la separación de compuestos químicos en función del tiempo de retención.<sup>44</sup> Para ello, se transportan los volátiles con un gas portador (fase móvil), como N<sub>2</sub> o He, a través de una columna, la cual está revestida por una fase estacionaria. Los compuestos irán avanzando a

diferentes velocidades por la columna, en relación a su afinidad con la fase estacionaria. Luego de ello, se dirigen a un detector, el cual registra su abundancia y proporciona el cromatograma de ion total (TIC).<sup>44</sup> Finalmente, con el acoplamiento de ambas técnicas, se logra obtener una identificación completa de los compuestos que se desean determinar.

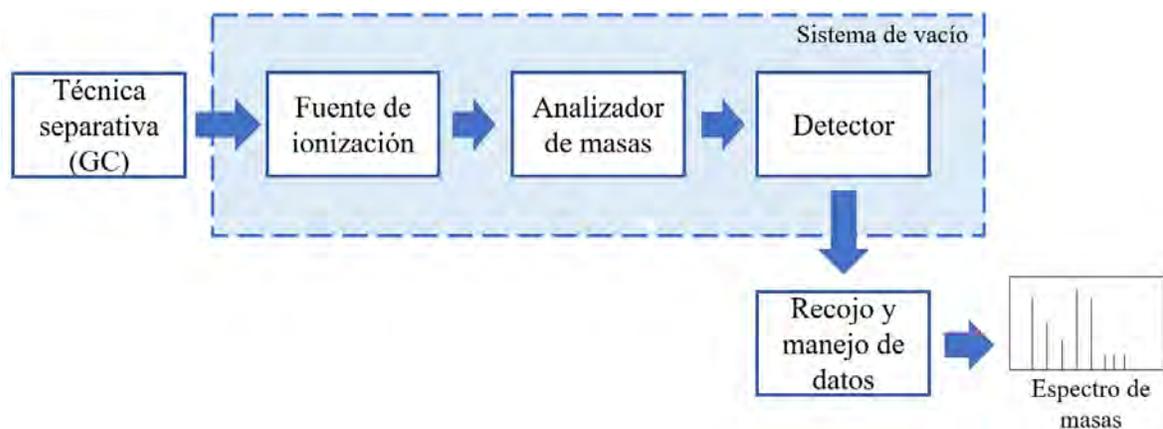


Figura 3. Diagrama de un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo de gases.

La técnica de electroantenografía (EAG) permite evaluar la sensibilidad y selectividad de respuesta de la antena de los insectos hacia los semioquímicos. Esta técnica se basa en medir el nivel de respuesta antenal del insecto ante compuestos volátiles o cualquier estímulo del olor mediante una diferencia de potencial eléctrico.<sup>45</sup> En este bioensayo se coloca una antena viva (recién cortada) entre dos electrodos y el electroantenograma registra la respuesta ante el estímulo en potenciales eléctricos.<sup>46,47</sup> La diferencia de potencial proporciona una amplitud, la cual dependerá de la especie, el estímulo, el sexo y la experiencia sexual, entre otras (Figura 4).<sup>46</sup> Si bien no se conoce con exactitud el mecanismo detrás de las respuestas eléctricas provenientes de la antena, se considera que el cambio de potencial registrado se debe a un conjunto de actividades de neuronas olfativas.<sup>46,48</sup>

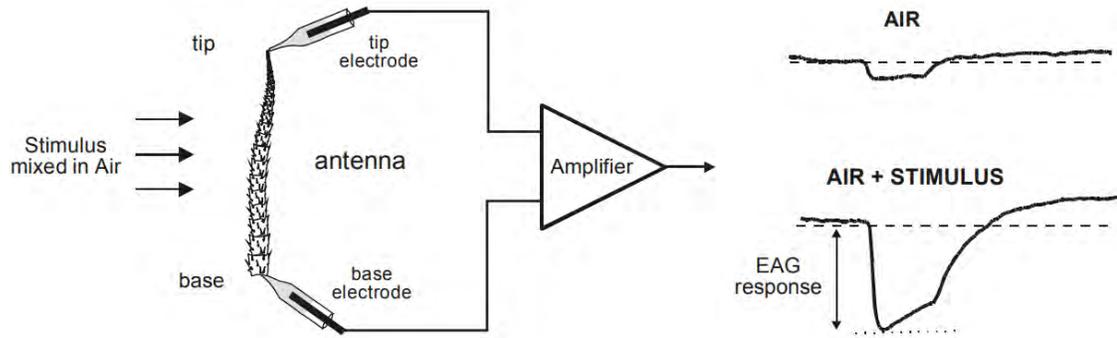
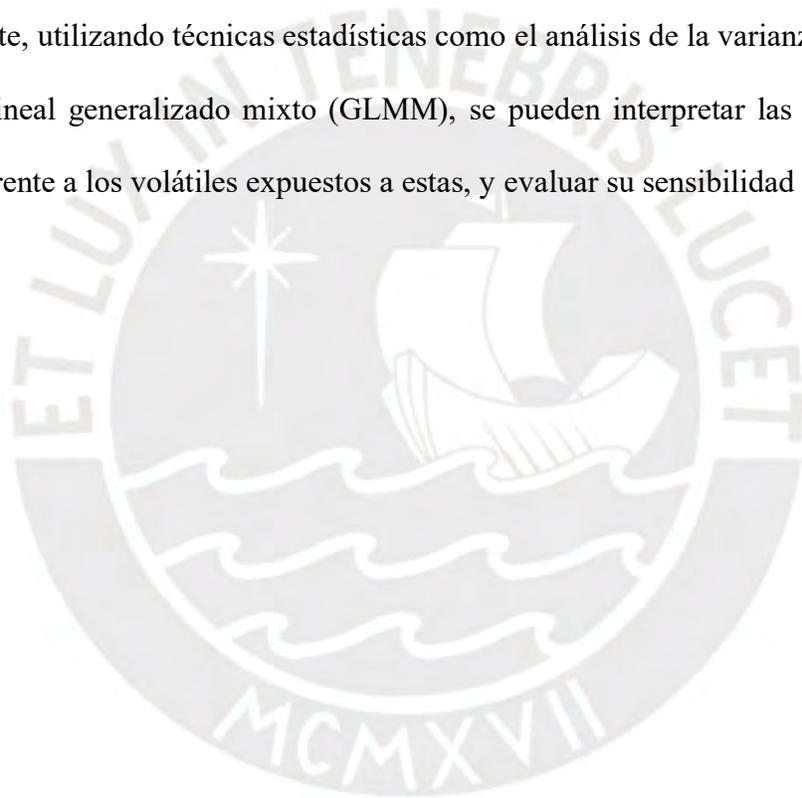


Figura 4. Esquema de registro en el electroantenograma. Imagen tomada de la referencia [46].

Finalmente, utilizando técnicas estadísticas como el análisis de la varianza (ANOVA) y el modelo lineal generalizado mixto (GLMM), se pueden interpretar las respuestas de las antenas frente a los volátiles expuestos a estas, y evaluar su sensibilidad y selectividad.



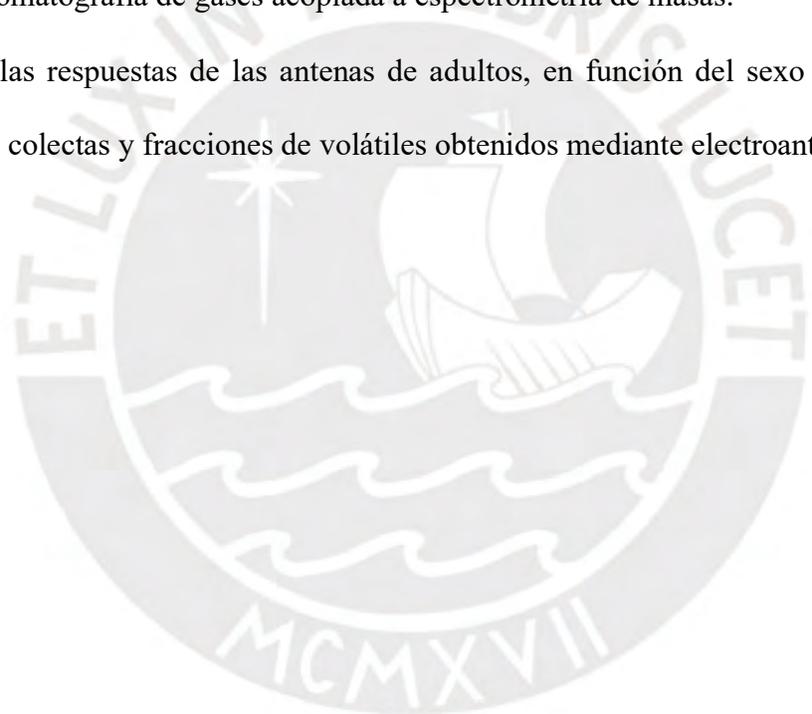
## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Identificar los compuestos volátiles de *Alphitobius diaperinus* y estudiar la respuesta antenal de los escarabajos adultos frente a estos compuestos, en función del sexo y la experiencia sexual.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar la composición química de las colectas de volátiles y fracciones cromatográficas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Estudiar las respuestas de las antenas de adultos, en función del sexo y la experiencia sexual, a las colectas y fracciones de volátiles obtenidos mediante electroantenografía.



### 3. Parte experimental

#### 3.1. Equipos y reactivos

Equipos:

- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas Agilent, Laboratorio Trait and function, Royal Botanic Gardens-Kew, Londres, Reino Unido
- Electroanténografo Ockenfels Syntech GmbH
- Microscopio binocular biológico CX31, OLYMPUS
- Estereomicroscopio 7x-45x, AmScope
- Cámaras de clima controlado Memmert HPP750, Memmert GmbH
- Vórtex Thermo Scientific
- Bombas de aire
- Flujómetro 0,1 - 1 L/min

Reactivos:

- Hexano, grado LC-MS, Sigma Aldrich
- Diclorometano, grado LC-MS, Sigma Aldrich
- Metanol, grado LC-MS, Sigma Aldrich
- Acetato de etilo, grado LC-MS, Sigma Aldrich
- Agua MilliQ, Biopack
- Solución Ringer, Sigma Aldrich
- Filtros adsorbentes de una mixtura de 5 mg de Tenax TA (malla 60–80, Sigma-Aldrich) y 5 mg de Carbotrap B (malla 20–40, Sigma-Aldrich)

## 3.2. Metodología

### 3.2.1. Crianza de insectos

Los escarabajos *A. diaperinus* fueron recolectados en una producción avícola comercial en el Distrito de Villa María del Triunfo ubicado en el departamento de Lima, camino hacia el Parque Industrial Quebrada Retamal (coordenada geográfica: 12° 09' 27,8" S 76° 53' 46,2" W). Estos insectos se encuentran en cámaras de clima controlado, a una temperatura de 30 °C y a una humedad relativa de 50 % en el laboratorio del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada (ICOBA). Los insectos adultos, machos y hembras, se clasifican por experiencia sexual, vírgenes (Mv y Fv) y experimentados (Mexp y Fexp). Los insectos vírgenes no han interactuado con ningún otro escarabajo, mientras que los experimentados han interactuado con machos y hembras. En total, los insectos adultos y las larvas se encuentran distribuidos en seis cajas de vidrio (30 x 25 x 20 cm). Los insectos adultos experimentados son alimentados con harina de trigo comercial "Blanca flor" y se humedecen trozos de papel toalla con agua como bebida en una caja. Asimismo, en otras dos cajas de vidrio, se encuentran separados Fexp y Mexp, y se realiza el mismo procedimiento de crianza. Los escarabajos machos y las hembras vírgenes son mantenidos individualmente en placas de Petri (60 × 15 mm) con papel toalla humedecido y harina como alimento. Las placas Petri de escarabajos vírgenes de un mismo sexo se guardan dentro de una caja de vidrio para facilitar su manipulación y orden. Finalmente, en otra caja, los insectos en la etapa de larva se alimentan en placas en grupos de 10 a 15, también con harina, y se agrega papel humedecido con agua. Para asegurar que no haya existido alguna interacción con otros insectos en Mv y Fv, estos fueron separados desde la etapa de pupa, en el cual se identificó su sexo y, a partir de ello, fueron puestos en placas

individuales. Para la determinación del sexo del insecto en etapa de pupa, este se coloca debajo de un microscopio, y se identifica por diferencias en su morfología.<sup>49</sup>

### 3.2.2. Colecta de volátiles

La colecta de volátiles se realizó a partir de insectos adultos. Para el análisis e identificación de compuestos químicos, cuarenta individuos de cada sexo fueron seleccionados de las cámaras de crecimiento y se les acondicionó en tubos de vidrio especialmente diseñados para este proceso (1 cm de diámetro y 15 cm de longitud). Luego, se ventiló cada tubo con un flujo de aire de 0,3 L/min a través de filtros de carbón activado durante 10 min. Seguidamente, se armó el sistema de colecta mostrado en la Figura 5, con el cual los compuestos volátiles orgánicos liberados de los insectos experimentados (VOC-Mexp y VOC-Fexp) se colectaron en filtros adsorbentes durante 4 horas. Para el control, se prepararon las muestras control (Bk) en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero sin insectos adultos en su interior. Para los ensayos electrofisiológicos, se efectuó una colecta de volátiles para novecientos individuos de cada sexo, siguiendo la metodología antes descrita. Los filtros adsorbentes se eluyeron con hexano y metanol cada uno, los cuales se concentraron los volátiles a sequedad utilizando una corriente suave de N<sub>2</sub> (g), se diluyeron en hexano: acetato de etilo (9:1 v/v) y se almacenaron a -20 °C para su posterior ensayo.



Figura 5. Sistema armado para la colecta de volátiles.

Una parte de los extractos metanólico y hexánico de la colecta de machos experimentados (correspondiente a 600 Mexp) fue destinada para los ensayos electrofisiológicos. Estos extractos se sometieron a fraccionamiento por cromatográfica en columna flash (1 cm de diámetro y 2 cm de altura), lo cual fue realizado por la Dra. Erika Calla Quispe en el laboratorio de ICOBA-PUCP. Se utilizó como fase estacionaria sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) y se eluyó con hexano, diclorometano y metanol. Se obtuvieron tres fracciones, fracción hexánica “M<sub>Hex</sub>”, diclorometánica “M<sub>DCM</sub>” y metanólica “M<sub>MeOH</sub>”. Se realizaron fracciones cromatográficas a los volátiles de Mexp debido a que han sido reportados como los que liberan las feromonas de agregación,<sup>35</sup> además de conseguir una mayor facilidad de estos escarabajos para realizar las colectas. Las fracciones obtenidas se concentraron con N<sub>2</sub> (g) a sequedad, se disolvieron con hexano: acetato de etilo (9:1 v/v) y se almacenaron a -20 °C para su posterior ensayo.

### **3.2.3. Análisis e identificación de compuestos químicos**

La colecta de volátiles de las hembras y los machos (VOC-Mexp y VOC-Fexp) y las fracciones cromatográficas de los Mexp (M<sub>Hex</sub>, M<sub>DCM</sub> y M<sub>MeOH</sub>) se analizaron por GC-MS con fuente de ionización electrónica (EI). Las condiciones instrumentales se describen en la Tabla 2. La EI se fijó a 70 eV con un rango de escaneo de 50–750 *m/z*.

Tabla 2. Condiciones del GC-MS.

	VOC-Mexp y VOC-Fexp	M <sub>Hex</sub> , M <sub>DCM</sub> y M <sub>MeOH</sub>
Equipo GC MS	Agilent 7250 GC/Q-TOF	Agilent 7250 GC/Q-TOF
Fuente de ionización	Ionización electrónica	Ionización electrónica
Columna	DB-5 (30 m × 0,25 mm d.i., 0,25 μm espesor)	DB-5 (30 m × 0,25 mm d.i., 0,25 μm espesor)
Técnica de introducción de muestra	Headspace	Inyección líquida
Temperatura de inyector	250°C	250°C
Temperatura de detector	270°C	270°C
Temperatura de columna	1 min / 40 °C; 320 °C a 6°/min por 7,3 min	1 min / 40 °C; 320 °C a 6°/min por 2,3 min
Gas portador	He (1,5 mL/min)	He (1,5 mL/min)
Volumen de inyección	1 μL	1 μL
Modo de inyección	splitless	splitless
Tiempo de corrida	50 min	55 min

Para analizar los datos obtenidos, se utilizó el software MS-DIAL con el fin de alinear los cromatogramas y normalizar las muestras a partir de la corriente iónica total (TIC). Paralelo, fue necesario convertir el formato de los datos a formato .abf. Posteriormente, se realizaron filtraciones mediante análisis de componentes principales (PCA) y análisis de la varianza (ANOVA) unidireccional en el software MatLab. Para ello, se transformaron los datos con log<sub>10</sub> y se aceptaron las señales significativamente más intensas que el blanco y cuyo *p-value* sea menor que 0,05. El tratamiento de data se encuentra explicado a mayor detalle en el Anexo A. Luego, se identificaron los compuestos filtrados a partir de la búsqueda de los índices de retención de Kovats y se utilizó el software y las bases de datos NIST y MassBank para el análisis de los datos y la obtención de los compuestos. También, se verificó la identificación de esos compuestos en la base de datos *Pherobase*, la cual es

una base de datos con relación a feromonas o compuestos presentes en insectos, como también se verificó en artículos científicos relacionados a la identificación de sustancias químicas en insectos.

### 3.2.4. Uso de electroantenografía

Para las mediciones con el electroantenograma, se utilizaron los compuestos volátiles extraídos de Mexp, Fexp y fracciones de Mexp (sec. 3.2.2). Se evaluó la sensibilidad antenal de Mv, Mexp, Fv y Fexp con 12 repeticiones para cada grupo de adultos. Se describe a continuación el procedimiento realizado para cada antena, la cual equivale a una repetición. Se seleccionó de manera aleatoria una antena de un insecto y se cortó desde el escapo con una microtijera. Después, bajo un estereomicroscopio, se cortó el eslabón final de la fracción del flagelo. Seguidamente, se colocó la antena cortada entre dos capilares con solución salina Ringer y esta fue sometida a un flujo de aire humedecido de 0,1 L/min, como se muestra en la Figura 6.

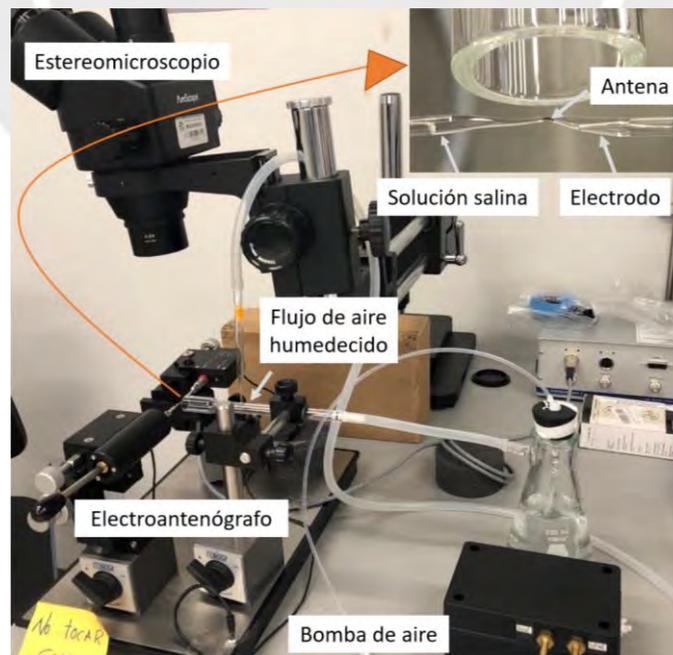


Figura 6. Montaje del electroantenograma.

La antena se sometió a seis tratamientos, los cuales fueron Bk, VOC-Mexp, VOC-Fexp, M<sub>HEX</sub>, M<sub>DCM</sub> y M<sub>MeOH</sub>. Para cada una de ellos, se colocó una pipeta Pasteur con un pedazo pequeño de papel filtro humedecido con 20  $\mu$ L del tratamiento (equivalente a lo extraído de un insecto, 1 EQ) en el tubo por el que pasa el aire humedecido, como se muestra en la Figura 6. Esta pipeta se conectó por medio de una manguera a una bomba manual, la cual se presionó para que se expulsen los volátiles. Finalmente, estos pasaron por el tubo de vidrio y llegaron a la antena. Se observó una respuesta en forma de cambio de potencial desde el programa EagPro, y esta se evaluó a partir de la respuesta del blanco (Bk), el cual es hexano: acetato de etilo (9:1 v/v).

Para analizar los datos obtenidos de las mediciones, se realizó un modelo de regresión mixta generalizada (GLMM) en el programa R-Studio. La variable de respuesta fue el logaritmo de los datos de la sensibilidad de las antenas en  $\mu$ V de los extractos de volátiles y fracciones de los volátiles analizados en cada grupo. Mientras que las variables predictoras fueron las cinco muestras, es decir, los compuestos volátiles extraídos de Mexp, Fexp y las fracciones de Mexp. El efecto aleatorio considerado fue el individuo, el cual se modeló según la antena de cada insecto. Además, la distribución que se utilizó fue la gaussiana con función de enlace logaritmo. Luego de obtener el modelo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), el cual proporcionó información sobre la significancia estadística entre el blanco y los volátiles y fracciones a evaluar.

## 4. Resultados

### 4.1. Identificación de compuestos volátiles y sus fracciones

Se identificaron treinta y tres compuestos en las colectas de adultos de *A. diaperinus* (VOC-Mexp y VOC-Fexp), cuya composición química se vio afectada por el sexo del insecto ( $p = 0,024$ ). Esta falta de similitud del perfil químico se puede visualizar mediante el análisis NMDS en la Figura 7, en la cual se observa la gráfica junto con las elipses de confianza.

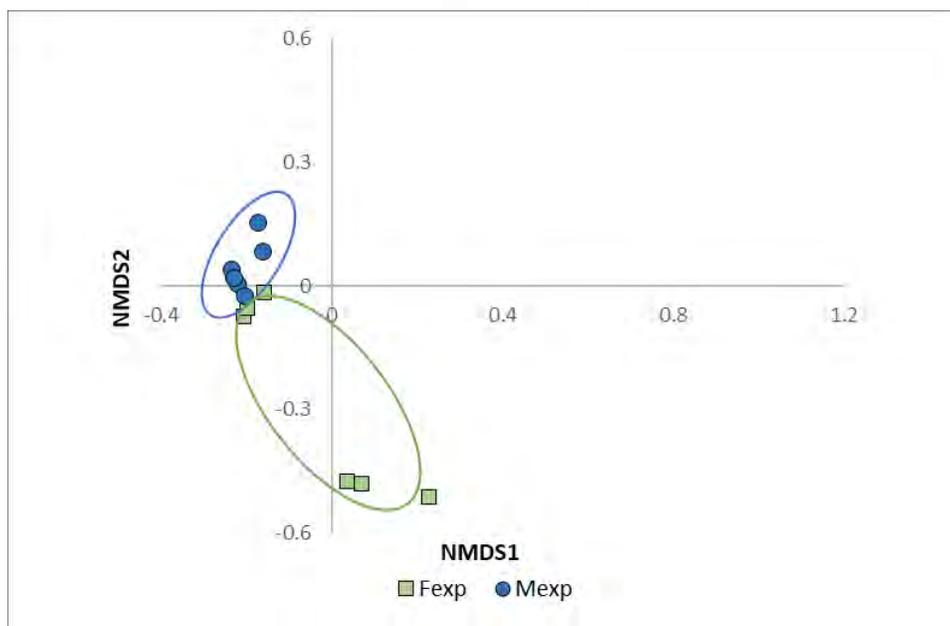


Figura 7. Gráfico de escalamiento no métrico de datos NMDS.

Se muestran los compuestos orgánicos identificados en los volátiles en la Tabla 3, los cuales pertenecen a las familias de alcoholes, aldehídos, alcanos, terpenos, entre otras. Además, se presentan los índices de retención de Kovats obtenidos (RI exp) y las intensidades a partir de la fracción del total de la suma de todas las áreas. A partir de la tabla, se observa que el hexano, el tolueno y el m-xileno se encuentran a mayor concentración que todas las demás sustancias químicas.

Tabla 3. Identificación de los compuestos químicos presentes en los volátiles de *Alphitobius diaperinus*.

Compuesto químico	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	RI exp	Fexp área (%)	Mexp área (%)
hexano	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86,175	599	59,59	44,74
1,1-dietoxietano	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	118,174	721	2,61	1,84
tolueno	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92,14	766	17,86	12,97
m-xileno	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	868	5,07	6,95
(S)-(+)- $\alpha$ -pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,23	932	0,12	0,15
1,1-dietoxi-3-metil-butano	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	160,25	947	0,13	0,22
6-metil-5-hepten-2-ona	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O	126,196	986	0,06	0,11
(R)-(+)- $\alpha$ -pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,234	990	0,12	0,34
decano	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	142,282	1000	1,00	2,91
5-metildecano	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	156,308	1016	0,08	0,20
1-metoxi-4-metil-benceno	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122,164	1023	2,29	1,12
2-etil-1-hexanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	130,228	1027	2,34	4,75
(R)-limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,234	1031	0,46	0,99
3-metil-decano	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	156,308	1051	1,40	4,24
4-metil-decano	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	156,31	1056	0,23	0,71
1-octanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	130,23	1071	0,10	0,31
1-undeceno	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub>	154,29	1075	0,15	0,50
nonanal	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142,238	1098	0,54	1,68
2,4-dimetoxitolueno	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	158,238	1134	0,01	0,04
2-nonanol	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	144,254	1142	1,56	2,92
1,2,3,4-tetrametilbenceno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134,22	1152	0,03	0,08
2-metil-undecano	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170,335	1167	0,02	0,05
2-decanona	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	156,265	1194	0,35	0,96
octanoato de etilo	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172,264	1197	0,04	0,14
salicilato de metilo	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,147	1197	0,35	1,05
dodecano	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170,335	1199	2,11	6,34
4-metil-dodecano	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	128,255	1216	0,04	0,05
9-metildecanal	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	170,29	1240	0,02	0,06
1-decanol	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O	158,28	1261	0,10	0,19
2-metil-dodecano	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184,361	1273	0,76	2,15
tridecano	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	184,361	1300	0,47	1,22
3,5-dimetil-dodecano	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198,388	1314	0,01	0,03
$\alpha$ -copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,351	1381	0,06	0,07

Por otro lado, se detectaron 155 compuestos químicos en las fracciones  $M_{Hex}$ ,  $M_{DCM}$  y  $M_{MeOH}$ , de los cuales se identificaron treinta y tres compuestos orgánicos, entre terpenos, ésteres, alcoholes, entre otros (Tabla 4). En el Anexo B se muestran los índices de retención de Kovats de los compuestos no identificados.

Tabla 4. Identificación de los compuestos químicos presentes en las fracciones cromatográficas de los volátiles de Mexp de *Alphitobius diaperinus*.

Compuesto	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	RI exp	$M_{DCM}$ área (%)	$M_{Hex}$ área (%)	$M_{MeOH}$ área (%)
3-metil-1-butanol	$C_5H_{12}O$	88,148	713	0,92	0,88	0,00
3-metil-1-penten-3-ol	$C_6H_{12}O$	100,159	726	2,86	13,36	1,65
3-metil-2-butanol	$C_5H_{12}O$	88,148	733	0,02	0,23	19,64
tolueno	$C_7H_8$	92,138	764	0,01	0,01	1,35
1-hexanol	$C_6H_{14}O$	102,175	841	0,02	0,00	0,42
4-hidroxi-4-metilpentan-2-ona	$C_6H_{12}O_2$	116,158	869	0,01	0,01	0,64
(S)-(+)- $\alpha$ -pineno	$C_{10}H_{16}$	136,234	924	0,39	0,31	0,26
(R)-(+)- $\alpha$ -pineno	$C_{10}H_{16}$	136,234	1007	0,04	0,04	0,02
p-cimeno	$C_{10}H_{14}$	134,218	1024	0,06	0,17	0,08
(R)-limoneno	$C_{10}H_{16}$	136,234	1029	0,10	0,07	0,11
(S)-limoneno	$C_{10}H_{16}$	136,234	1055	0,02	0,07	0,01
1-octanol	$C_8H_{18}O$	130,228	1075	0,02	0,00	0,43
undecano	$C_{11}H_{24}$	156,308	1101	0,03	0,02	0,47
palmitato de etilo	$C_{18}H_{36}O_2$	284,477	1994	0,13	0,11	0,03
eicosano	$C_{20}H_{42}$	282,547	2001	0,18	0,16	0,02
estearato de etilo	$C_{20}H_{40}O_2$	312,530	2192	0,21	0,01	1,01
docosano	$C_{22}H_{46}$	310,601	2203	0,17	0,24	0,01
tetracosano	$C_{24}H_{50}$	338,654	2405	0,23	0,34	0,02
12-metil-tetracosano	$C_{25}H_{52}$	352,680	2416	0,12	0,17	0,01
hexacosano	$C_{26}H_{54}$	366,707	2595	0,20	0,05	1,18
heptacosano	$C_{27}H_{56}$	380,733	2702	0,21	0,34	0,01
isofталato de bis(2-etilhexilo)	$C_{24}H_{38}O_4$	390,556	2745	0,16	0,08	0,02

Continuación de la Tabla 4. Identificación de los compuestos químicos presentes en las fracciones cromatográficas de los volátiles de Mexp de *Alphitobius diaperinus*.

Compuesto	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	RI exp	M <sub>DCM</sub> área (%)	M <sub>Hex</sub> área (%)	M <sub>MeOH</sub> área (%)
3-metil-heptacosano	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	394,760	2771	2,59	1,05	1,83
octacosano	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	394,760	2810	2,16	0,14	1,74
nonacosano	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	408,787	2899	0,13	0,32	0,03
4-metil-nonacosano	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	422,813	2937	0,19	0,35	0,01
3-metil-nonacosano	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	422,813	2967	4,60	10,03	0,58
triacontano	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	422,813	2993	0,18	0,28	0,05
3-metil-triacontano	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	436,839	3029	0,17	0,27	0,01
4-metil-triacontano	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	436,839	3057	0,65	1,36	0,15
5-metil-hentriacontano	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	450,866	3125	5,12	12,03	0,07
3-metil-hentriacontano	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	450,866	3164	0,84	2,76	0,03
dotriacontano	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub>	450,866	3194	0,03	0,03	0,02

#### 4.2. Sensibilidad de la antena según el sexo y la experiencia sexual

En la Tabla 5 se muestran en forma de porcentaje los promedios de las respuestas de las doce antenas por cada grupo frente a los cinco tratamientos, en el cual el 100% representa la línea base, que es la respuesta de las antenas frente al blanco (hexano:acetato de etilo 9:1 v/v).

Tabla 5. Promedio de respuestas electroantenográficas de *Alphitobius diaperinus*.

	Resp Mexp (N=12) (%)	Resp Mv (N=12) (%)	Rexp Fexp (N=12) (%)	Resp Fv (N=12) (%)
VOC-Fexp	156,2	150,1	116,3	135,6
VOC-Mexp	136,5	121,6	127,1	155,3
M <sub>MeOH</sub>	148,9	113,0	136,1	187,6
M <sub>DCM</sub>	104,4	112,4	108,6	136,9
M <sub>HEX</sub>	118,4	158,9	129,3	175,2

En la Figura 8, se puede observar un gráfico de cajas con las respuestas antenales de los cuatro grupos del insecto *A. diaperinus* en porcentaje. Los asteriscos mostrados debajo de los diagramas significan diferencias significativas en comparación con el blanco ( $p < 0,05$ ). A partir de esta figura, se observa que las respuestas de los escarabajos vírgenes son más variadas y aleatorias que las de los experimentados. Las hembras respondieron significativamente a los volátiles de Mexp ( $p < 0,05$ ), pero no a sus propios volátiles. Los machos respondieron significativamente a los volátiles de Fexp ( $p < 0,05$ ), pero no a sus propios volátiles, con excepción del Mexp. Además, las hembras respondieron significativamente igual a los volátiles de las fracciones  $M_{MeOH}$  y  $M_{HEX}$  ( $p < 0,05$ ), mientras que los machos mostraron respuestas en función de su experiencia sexual. Los Mv respondieron a los volátiles de  $M_{HEX}$  y los Mexp respondieron significativamente a los volátiles de  $M_{MeOH}$ .

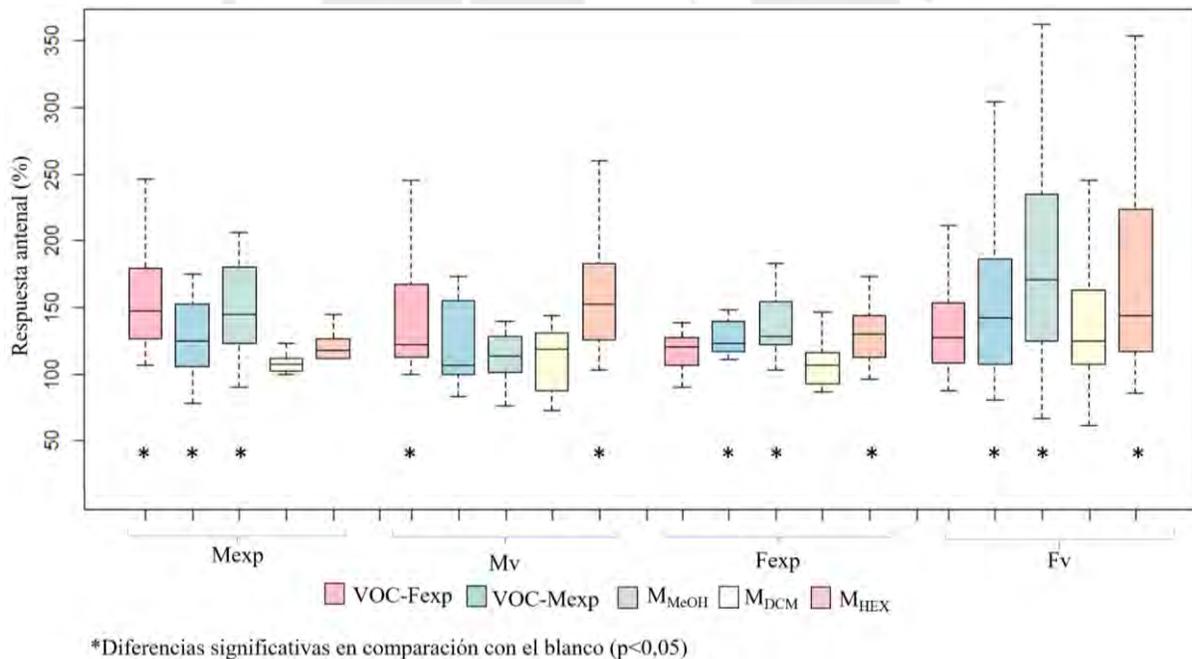


Figura 8. Impacto del sexo y la experiencia sexual en las respuestas antenales de adultos de *Alphitobius diaperinus*.

## 5. Discusiones

La producción química de los insectos se ve afectada por factores tales como el sexo, la edad, la experiencia sexual, la temperatura, la humedad, la alimentación y la interacción con demás especies, entre otros.<sup>50</sup> Esto se debe a que la producción de las feromonas no solo depende de la predisposición genética, sino que también puede variar dependiendo del contexto en el que se encuentre el insecto.<sup>50</sup> La plasticidad fisiológica que ha demostrado esta plaga en estudios previos frente a los distintos factores mencionados les ha conferido una adaptación para sobrevivir en ambientes extremos y aumentar su población.<sup>9</sup> Además, se ha reportado que la producción de compuestos químicos de *Alphitobius diaperinus* se ve afectada por el sexo y la experiencia sexual.<sup>51</sup> Ello concuerda con los resultados obtenidos a partir de la identificación de volátiles y ensayos electroantenográficos en adultos experimentados del escarabajo, lo que demuestra la variabilidad en su respuesta antenal y en la producción química en función del sexo y la experiencia sexual.

Los resultados de los análisis químicos mostraron diferencias significativas entre las composiciones de los volátiles emitidos por hembras y machos experimentados. Ello está relacionado con resultados de investigaciones previas, en las cuales se demostró un comportamiento atractivo frente a VOC de Fexp y Mexp en bioensayos olfatométricos.<sup>51</sup> Además, se ha confirmado que existen diferencias significativas en la composición de la mezcla de volátiles de los insectos en función de la experiencia sexual del insecto (observaciones de Calla-Quispe aún no publicadas). Investigaciones previas mostraron que adultos machos vírgenes de *A. diaperinus* en Estados Unidos producen (R)-(+)-limoneno, (E)- $\beta$ -ocimeno, (R)-dauceno y 2-nonanona como feromonas de agregación,<sup>36,37</sup> mientras que en Brasil los machos producen (E)- $\beta$ -ocimeno, (R)-dauceno, 2-nonanona, (S)-(+)-linalol, (E,E)- $\alpha$ -farneseno y (R)-limoneno como feromona de

agregación en su producción química volátil.<sup>35</sup> Estos resultados demuestran que la producción química de los adultos de *A. diaperinus* se ve afectada por factores externos, como la distribución geográfica de la plaga, la alimentación y la interacción con otras especies.<sup>50,52</sup>

Con respecto a los volátiles de la fracción hexánica de Mexp, esta presenta compuestos que han sido reportados como feromonas o parte de feromonas de agregación y de alarma en otros insectos coleópteros,<sup>53-55</sup> los cuales son 3-metil-1-butanol, 1-hexanol,  $\alpha$ -pineno, heptacosano, octacosano, p-cimeno y (S)-limoneno.<sup>53-55</sup> Con respecto a la fracción metanólica, su composición química fue distinta a la hexánica, pero también presenta compuestos químicos que estudios sugieren que pueden ser feromonas sexuales de otros insectos. Por un lado, el hexacosano está reportado como feromona sexual de varias especies de Lepidóptera, como *Amauris niavius*, *Amauris ochlea* y *Amauris echeria*.<sup>56</sup> Por otro lado, se sugiere que el 3-metil-2-butanol puede ser una feromona sexual en *Rhodnius prolixus*.<sup>57</sup> Además, este mismo compuesto es utilizado como atrayente de polillas de la familia Noctuidae, junto con 3-metil-1-butanol y 3-metil-1-pentanol.<sup>58</sup> No obstante, se espera que parte de los demás alcanos, alcoholes y terpenos identificados tengan alguna función como feromona o sean parte de una para *A. diaperinus*. Por ejemplo, en el caso del compuesto  $\alpha$ -copaeno, este ha sido reportado como feromona para la especie *Euwallacea fornicatus* y es utilizado como método de control de la plaga *Ceratitis capitata*.<sup>59,60</sup> Por ello, se cree que este compuesto orgánico pueda también cumplir un rol importante en el comportamiento de *A. diaperinus*, al igual que los compuestos encontrados en las fracciones hexánica y metanólica.

Las antenas de los insectos son cruciales para la detección de olores y, consecuentemente, para el comportamiento del animal.<sup>61</sup> La variabilidad en la respuesta antenal de los adultos de *A. diaperinus* en función del sexo y experiencia sexual muestra la plasticidad fisiológica de los individuos para adaptarse a distintos entornos y que continúe su proliferación.<sup>9</sup> Los Mexp

presentaron respuestas antenales sensitivas a los VOC-Fexp, VOC-Mexp y  $M_{MeOH}$ . Ello demuestra su capacidad sensorial en reconocer a ambos sexos y que los compuestos sensitivos volátiles de los Mexp están presentes en su fracción metanólica. Los Mv mostraron respuestas antenales sensitivas a los VOC-Fexp y  $M_{HEX}$ . Estos tienen la capacidad sensorial de reconocer individualmente a las hembras frente a los Mexp, los cuales sí son reconocidos como conjunto de individuos, es decir, en población.<sup>15,51</sup> En relación con las Fexp y Fv, estas mostraron la capacidad sensorial de reconocer los VOC-Mexp,  $M_{HEX}$  y  $M_{MeOH}$ , frente a los volátiles de Fexp. Estos resultados están relacionados con hallazgos previos en bioensayos olfatométricos, en los cuales las hembras no presentaron respuestas atractivas frente a otras hembras en comparación con el control, pero sí presentan respuestas positivas frente a los volátiles de machos.<sup>51</sup> Por otro lado, la mayor aleatoriedad en las respuestas antenales de machos y hembras vírgenes, en comparación con los adultos experimentados, refleja que los adultos vírgenes aún no son capaces de discriminar compuestos químicos; y ello se puede explicar por su nula interacción con otros insectos. Además, como se ha demostrado en estudios previos con *A. diaperinus* y otras especies de la familia Tenebrionidae, los adultos al interactuar con otros adultos son capaces de aprender y ganar experiencia, lo que les confiere adaptarse química, fisiológicamente y neurológicamente en entornos variables y sobrevivir.<sup>9,15,51</sup>

## 6. Conclusiones

El presente trabajo de investigación permitió identificar gran variedad de volátiles de la especie *A. diaperinus*. Entre ellos, el (R)-limoneno, el cual es un compuesto de interés para la aplicación de semioquímicos en métodos de control para este insecto. Además, se concluye que los volátiles colectados de Fexp presentan diferencias significativas con los volátiles colectados de Mexp. Además, se estudió la respuesta antenal sensitiva de los adultos *A. diaperinus* frente a sus compuestos volátiles y fracciones, en función del sexo y experiencia sexual.

Se identificaron 33 compuestos volátiles en los adultos experimentados, entre ellos terpenos, alcoholes, aldehídos, alcanos, entre otros, mostrando una variabilidad en la producción química volátiles en función del sexo. Además, se detectaron 155 compuestos químicos en las fracciones hexánica, metanólica y diclorometánica de machos experimentados.

Con respecto a los ensayos electroantenográficos, se concluye que los adultos, sean machos o hembras, responden sensitivamente a los volátiles de machos experimentados, pues en estos se encuentran las feromonas de agregación. Además, se demostró que las respuestas sensitivas de los adultos dependen de la experiencia sexual, pues gracias al aprendizaje, pueden detectar y responder de manera más selectiva a los volátiles.

Adicionalmente, se demostró que posibles compuestos fisiológicamente activos para estos escarabajos se encuentran en las fracciones hexánica y metanólica, de los cuales destacan 3-metil-1-butanol, 1-hexanol,  $\alpha$ -pineno, heptacosano, octacosano, p-cimeno, (S)-limoneno, hexacosano y 3-metil-2-butanol. Se propone comprobar su función biológica en ensayos olfatométricos para evaluar su efectividad en el cambio del comportamiento de la plaga, y proponer un novedoso tratamiento de control a partir de los semioquímicos del *A. diaperinus*.

## 7. Referencias

- (1) Ehsanur, S.; Ariful, S.; Kong, D.; Xi, Q.; Du, Q.; Yang, Y.; Oh, D.; Wang, J.; Han, R. Controlling microbial population in livestock and poultry industry using electrolyzed water as an emerging technology for ensuring food safety. *Food Control* **2023**, *152* (9), 109843. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109843>.
- (2) Gržinić, G.; Piotrowicz-Cieślak, A.; Klimkowicz-Pawlas, A.; Górny, R. L.; Ławniczek-Wałczyk, A.; Piechowicz, L.; Olkowska, E.; Potrykus, M.; Tankiewicz, M.; Krupka, M.; Siebielec, G.; Wolska, L. Intensive poultry farming: A review of the impact on the environment and human health. *Sci. Total Environ.* **2023**, *858* (11), 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160014>.
- (3) Alders, R. Contribución de la avicultura al desarrollo sostenible de los medios de vida de la población rural. En *Produccion Avicola Por Beneficio y Por Placer*; FAO 2004, Ed.; Roma, 2005; p 54.
- (4) FAO. *Food outlook – Biannual report on global food markets*; 2023. <https://doi.org/10.4060/cc3020en>.
- (5) Wu, D.; Cui, D.; Zhou, M.; Ying, Y. Information perception in modern poultry farming: A review. *Comput. Electron. Agric.* **2022**, *199* (6), 107131. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.107131>.
- (6) MIDAGRI. *Producción y Comercialización de Productos Avícolas Diciembre 2023*; Lima, Perú, 2023.
- (7) Wang, J.; Vaddu, S.; Bhumanapalli, S.; Mishra, A.; Applegate, T.; Singh, M.; Thippareddi, H. A systematic review and meta-analysis of the sources of *Salmonella* in

- poultry production (pre-harvest) and their relative contributions to the microbial risk of poultry meat. *Poult. Sci.* **2023**, 102566. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102566>.
- (8) Crippen, T. L.; Singh, B.; Anderson, R. C.; Sheffield, C. L. Adult *Alphitobius diaperinus* microbial community during broiler production and in spent litter after stockpiling. *Microorganisms* **2022**, *10* (1), 175. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010175>.
- (9) Engell Dahl Bjørge, J. Ecophysiological and ecotoxicological consequences of global changes in terrestrial insects, Université de Rennes, 2021.
- (10) Vergara, C.; Gazani, R. Biología de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Rev. Peru. Entomol.* **1996**, *39* (1), 1–5.
- (11) Mariod, A. A.; Saeed Mirghani, M. E.; Hussein, I. *Alphitobius diaperinus* the lesser mealworm and the litter beetle. En *Unconventional Oilseeds and Oil Sources*; Academic Press, 2017; pp 327–330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809435-8.00049-4>.
- (12) Sammarco, B. C.; Hinkle, N. C.; Crossley, M. S. Biology and management of lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in broiler houses . *J. Integr. Pest Manag.* **2023**, *14* (1). <https://doi.org/10.1093/jipm/pmad003>.
- (13) Luna, N. L. Evaluación de la efectividad de la cipermetrina en mezcla con acidificantes y absorbentes de humedad en el control de *Alphitobius diaperinus*, Universidad Nacional de Luján, 2020.
- (14) Song, L. M.; Wang, X. M.; Huang, J. P.; Zhu, F.; Jiang, X.; Zhang, S. G.; Ban, L. P. Ultrastructure and morphology of antennal sensilla of the adult diving beetle *Cybister japonicus* Sharp. *PLOS One* **2017**, *12* (3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174643>.

- (15) Calla Quispe, E. L. M. Diseño y desarrollo de biotrampas avanzadas para la desinfección de granjas avícolas afectadas por *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), Pontificia Univesidad Católica del Perú, 2022.
- (16) Mankar, R. S. Scanning electron microscopic study of antenna of *Alphitobius diaperinus* (lesser mealworm beetle). *Int. J. Anim. Biotechnol. Appl.* **2020**, 6 (2), 24–28.  
<https://doi.org/10.1016/0022>.
- (17) Loudon, C. Antennae. En *Encyclopedia of Insects*; Academic Press, 2009; pp 21–23.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00006-0>.
- (18) Donoso, A.; Paredes, N.; Retamal, P. Detection of antimicrobial resistant *Salmonella* enterica strains in larval and adult forms of lesser mealworm (*Alphitobius diaperinus*) from industrial poultry farms. *Front. Vet. Sci.* **2020**, 7 (10), 1–6.  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.577848>.
- (19) Krinsky, W. L. Beetles (Coleoptera). En *Medical and Veterinary Entomology*; Academic Press, 2019; pp 129–143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00009-1>.
- (20) Tinôco, F.; Campos De Sousa, F.; Dzik, S.; Mituniewicz, T.; Beisenov, A. Efficacy of a biocidal paint in controlling *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) and improving the quality of air and litter in poultry houses. *Animals* **2022**, 12 (10), 1264.  
<https://doi.org/10.3390/ANI12101264>.
- (21) Ripa, S. R.; Rojas, P. S.; Velasco, G. Releases of biological control agents of insect pests on Easter Island (Pacific Ocean). *Entomophaga* **1995**, 40 (3–4), 427–440.  
<https://doi.org/10.1007/BF02373730>.
- (22) Brunner, J. F. Integrated pest management in tree fruit crops. En *Encyclopedia of*

*Agriculture and Food Systems*; Elsevier Ltd., 2014; Vol. 4, pp 15–30.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00175-3>.

- (23) Kumari, M.; Srivastava, A.; Babu Sah, S.; Subhashini. Biological control of agricultural insect pests. En *Insecticides - Impact and Benefits of Its Use for Humanity*; IntechOpen, 2022; pp 1–22. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104464>.
- (24) Cotes, B.; Rämert, B.; Nilsson, U. A first approach to pest management strategies using trap crops in organic carrot fields. *Crop Prot.* **2018**, *112* (5), 141–148.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.05.025>.
- (25) Jiménez M., E. Métodos de control de plagas, Universidad Nacional Agraria, 2009.
- (26) Rasmussen, C.; Lagnaoui, A.; Esbjerg, P. Advances in the knowledge of quinoa pests. *Food Rev. Int.* **2003**, *19* (1–2), 61–75. <https://doi.org/10.1081/FRI-120018868>.
- (27) Aktar, W.; Sengupta, D.; Chowdhury, A. Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* **2009**, *2* (1), 1–12.  
<https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>.
- (28) Brezolin, A. N.; Martinazzo, J.; Muenchen, D. K.; de Cezaro, A. M.; Rigo, A. A.; Steffens, C.; Steffens, J.; Blassioli-Moraes, M. C.; Borges, M. Tools for detecting insect semiochemicals: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410* (17), 4091–4108.  
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1118-3>.
- (29) Bakthavatsalam, N. Semiochemicals. En *Ecofriendly Pest Management for Food Security*; Omkar, I., Ed.; Academic Press: London, 2016; pp 563–611.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00019-1>.

- (30) Yew, J. Y.; Chung, H. Insect pheromones: An overview of function, form, and discovery. *Prog. Lipid Res.* **2015**, *59* (6), 88–105. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.06.001>.
- (31) Hassemer, M. J.; Borges, M.; Withall, D. M.; Pickett, J. A.; Laumann, R. A.; Birkett, M. A.; Blassioli-Moraes, M. C. Development of pull and push–pull systems for management of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*, in poultry houses using alarm and aggregation pheromones. *Pest Manag. Sci.* **2019**, *75* (4), 1107–1114. <https://doi.org/10.1002/PS.5225>.
- (32) Rizvi, S. A. H.; George, J.; Reddy, G. V. P.; Zeng, X.; Guerrero, A. Latest developments in insect sex pheromone research and its application in agricultural pest management. *Insects* **2021**, *12* (6), 1–26. <https://doi.org/10.3390/insects12060484>.
- (33) Witzgall, P.; Kirsch, P.; Cork, A. Sex pheromones and their impact on pest management. *J. Chem. Ecol.* **2010**, *36* (1), 80–100. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9737-y>.
- (34) Sharma, A.; Sandhi, R.; Reddy, G. A review of interactions between insect biological control agents and semiochemicals. *Insects* **2019**, 1–16. <https://doi.org/doi:10.3390/insects10120439>.
- (35) Hassemer, M. J.; Sant’Ana, J.; Borges, M.; Withall, D.; Pickett, J. A.; De Oliveira, M. W. M.; Laumann, R. A.; Birkett, M. A.; Blassioli-Moraes, M. C. Revisiting the male-produced aggregation pheromone of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae): Identification of a six-component pheromone from a brazilian population. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (36), 6809–6818. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02235>.
- (36) Bartelt, R. J.; Zilkowski, B. W.; Cossé, A. A.; Steelman, C. D.; Singh, N. Male-produced

- aggregation pheromone of the lesser mealworm beetle, *Alphitobius diaperinus*. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35* (4), 422–434. <https://doi.org/10.1007/s10886-009-9611-y>.
- (37) Cossé, A. A.; Zilkowski, B. W. Behavioral responses of lesser mealworm beetles, *Alphitobius diaperinus*, (Coleoptera: Tenebrionidae) to pheromone components using a wind tunnel dual choice walking bioassay. *J. Insect Behav.* **2015**, *28* (2), 202–210. <https://doi.org/10.1007/s10905-015-9493-5>.
- (38) Singh, N.; Johnson, D. T. Attractiveness of an aggregation pheromone lure and chicken droppings to adults and larvae of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* **2012**, *105* (6), 2196–2206. <https://doi.org/10.1603/EC11422>.
- (39) Hassemer, M. J.; Sant’Ana, J.; De Oliveira, M. W. M.; Borges, M.; Laumann, R. A.; Caumo, M.; Blassioli-Moraes, M. C. Chemical composition of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) abdominal glands and the influence of 1,4-benzoquinones on its behavior. *J. Econ. Entomol.* **2015**, *108* (4), 2107–2116. <https://doi.org/10.1093/jee/fov147>.
- (40) Lockey, K. H. Cuticular hydrocarbons of adult *Alphitophagus bifasciatus* (Say.) and *Alphitobius diaperinus* (Panz.) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* **1979**, *64* (1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(79\)90182-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(79)90182-2).
- (41) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass spectrometry principles and applications*, 3rd ed.; Hoffmann, E. de, Stroobant, V., Eds.; Wiley: Chichester, 2016.
- (42) Smith, S. A.; Smith, R. W.; Xia, Y.; Ouyang, Z. *Introduction to mass spectrometry*, 4th ed.; Wiley: Chinchester, 2007. <https://doi.org/10.1002/9780470921371.ch1>.
- (43) Gross, J. H. *Mass spectrometry a textbook*, 1st ed.; Springer: Heidelberg, 2004.

- (44) Ferrer, I.; Thurman, E. M. *Advanced techniques in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS-MS and GC-TOF-MS)*; Amsterdam, 2013; Vol. 15.
- (45) Madhu, T. N.; Doddabasappa, B. Electroantennogram for recording olfactory responses of an insect to plant volatiles. *Exp. Tech. Host-Plant Resist.* **2019**, 53–56.  
[https://doi.org/10.1007/978-981-13-2652-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2652-3_7).
- (46) SYNTEC. *Electroantennography, a practical introduction*; Kirchzarten, 2015.
- (47) Felipe, B. E. Investigación, desarrollo y escalamiento de feromonas de insectos. En *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas Volumen 2*; Cotes, A. M., Ed.; Agrosavia: Mosquera, 2018; pp 742–761.
- (48) Reynaud, B.; Jacob, V. Triple electroantennography captures the range and spatial arrangement of olfactory sensory neuron response on an insect antenna. *J. Neurosci. Methods* **2023**, 390 (12), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2023.109842>.
- (49) Crippen, T. L.; Esquivel, J. F. Improved visualization of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)-part II: Alimentary canal components and measurements. *psyche (London)* **2012**, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/607609>.
- (50) Yan, H.; Liebig, J. Genetic basis of chemical communication in eusocial insects. *Genes Dev.* **2021**, 35 (7), 470–482. <https://doi.org/10.1101/gad.346965.120>.
- (51) Calla-Quispe, E.; Martel, C.; Ibáñez, A. J. Chemical signals associated with gender and sexual experience affect mating and the attractiveness of the poultry pest, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* **2022**, 115 (4), 1156–1163.  
<https://doi.org/10.1093/jee/toac101>.

- (52) Calla-Quispe, E.; Martel, C.; Ibañez, A. J. Gender identity and sexual experience affect mating behaviour and chemical profile in the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **2021**.
- (53) Bandeira, P. T.; Fávoro, C. F.; Francke, W.; Bergmann, J.; Zarbin, P. H. G. Aggregation pheromones of weevils (Coleoptera: Curculionidae): Advances in the identification and potential uses in semiochemical-based pest management strategies. *J. Chem. Ecol.* **2021**, *47* (12), 968–986. <https://doi.org/10.1007/s10886-021-01319-1>.
- (54) Attygalle, A. B.; Wu, X.; Maddison, D. R.; Will, K. W. Orange/lemon-scented beetles: Opposite enantiomers of limonene as major constituents in the defensive secretion of related carabids. *Naturwissenschaften* **2009**, *96* (12), 1443–1449. <https://doi.org/10.1007/s00114-009-0596-8>.
- (55) Giglio, A.; Vommaro, M. L.; Brandmayr, P.; Talarico, F. Pygidial glands in Carabidae, an overview of morphology and chemical secretion. *Life* **2021**, *11* (6), 1–22. <https://doi.org/10.3390/life11060562>.
- (56) Minaeimoghadam, M.; Askarianzadeh, A.; Imani, S.; Shojaei, M.; Larijani, K.; Abbasipour, H. Identification of chemical compounds of the pheromone in different ages of female adults of the clearwing moth, *Paranthrene diaphana* Dalla Torre & Strand. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* **2017**, *50* (19–20), 1019–1033. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1411174>.
- (57) Lorenzo, M. G.; Vidal, D. M.; Zarbin, P. H. G. Control of neglected disease insect vectors: Future prospects for the use of tools based on behavior manipulation-interference. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25* (10), 1799–1809. <https://doi.org/10.5935/0103->

5053.20140202.

- (58) Peter J. Landolt, R. R. H. Chemical attractants for moths, 2001.
- (59) Kendra, P. E.; Owens, D.; Montgomery, W. S.; Narvaez, T. I.; Bauchan, G. R.; Schnell, E. Q.; Tabanca, N.; Carrillo, D.  $\alpha$ -Copaene is an attractant, synergistic with quercivorol, for improved detection of *Euwallacea nr. fornicatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *PLOS One* **2017**, *12* (6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179416>.
- (60) Jofré Barud, F.; López, S.; Tapia, A.; Feresin, G. E.; López, M. L. Attractant, sexual competitiveness enhancing and toxic activities of the essential oils from *Baccharis spartioides* and *Schinus polygama* on *Ceratitis capitata* Wiedemann. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *62*, 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.045>.
- (61) Elgar, M. A.; Zhang, D.; Wang, Q.; Wittwer, B.; Pham, H. T.; Johnson, T. L.; Freelance, C. B.; Coquilleau, M. Insect antennal morphology: The evolution of diverse solutions to odorant perception. *Yale J. Biol. Med.* **2018**, *91* (4), 457–469.

## 8. Anexos

### Anexo A. Tratamiento de datos

Se realizó la normalización de los datos obtenidos del programa MS DIAL, convirtiéndolos en sus valores logarítmicos. A partir de estos datos normalizados, se realizó un PCA y un ANOVA unidireccional con el software MatLab. Se utilizaron la primera y la segunda componente principal (PC1 y PC2), lo cual equivale al 67,01% de la varianza de estos. A continuación, en la Figura 9 se muestra el gráfico de dispersión de todos los datos, en el cual el eje X representa el PC1 y el eje Y el PC2. Se puede observar que existe una gran dispersión entre estos grupos, lo cual evidencia mucha variabilidad en su distribución. Además, una parte de los datos de VOC-Mexp y VOC-Fexp se encuentran solapados o en una misma región del PCA. Por tanto, al no presentar una buena distribución entre los grupos, se continuó con el filtrado.

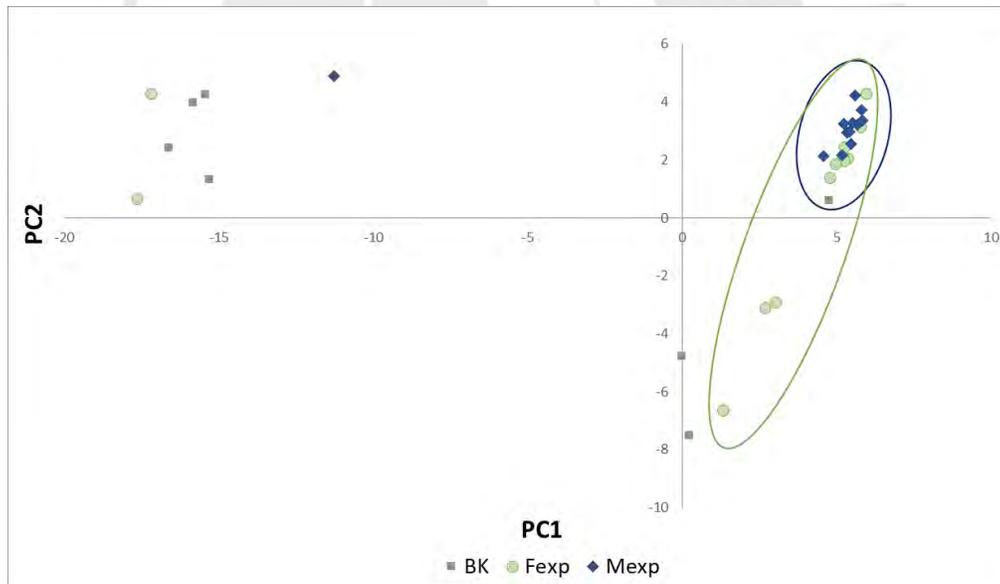


Figura 9. Gráfica de puntuaciones de PCA.

Se utilizó ANOVA unidireccional para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de las réplicas de VOC-Fexp y VOC-Mexp con las réplicas de Blanco (BK). Con esta técnica, se conservaron todos los datos que tengan un  $p\text{ value} < 0,05$ , lo cual significa que

existen diferencias significativas entre ellos y el blanco. Luego, se realizó un segundo filtrado al eliminar todas las señales menores o iguales a la señal del blanco. Con ello, se buscó disminuir el ruido y las interferencias. Finalmente, se obtuvieron treinta y dos compuestos a partir de ambas filtraciones. Con los datos restantes, se realizó un nuevo PCA para su visualización (Figura 10), con un porcentaje de variabilidad del 81,24% entre el PC1 y el PC2.

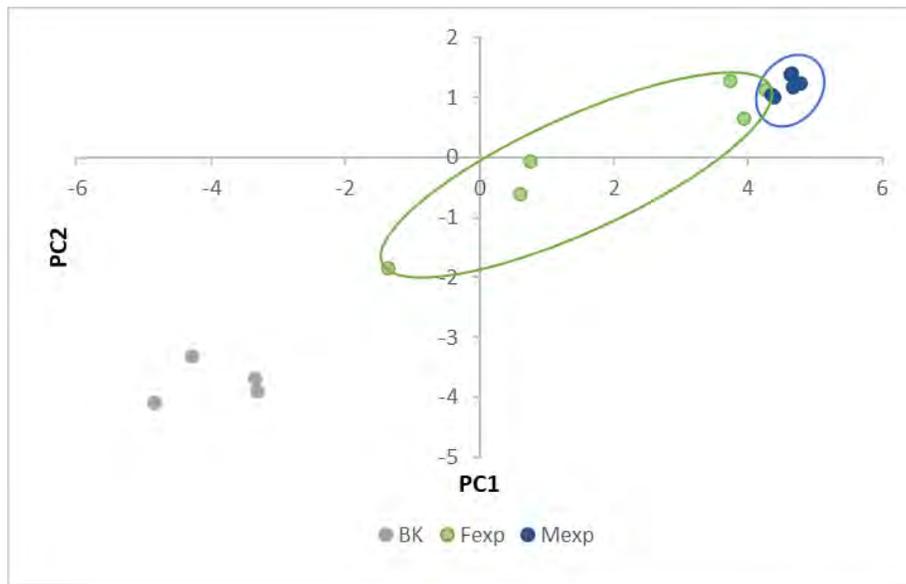


Figura 10. Segunda gráfica de puntuaciones de PCA.

En la Figura 10, se observa que los volátiles de Mexp y Fexp presentan diferencias en su distribución, pues los datos de Fexp se encuentran mayormente en el lado positivo del eje Y, mientras que los datos de Mexp están cercanos a cero y al lado negativo del eje Y. A estos mismos datos se les realizó un análisis de varianza permutacional multivariante (PERMANOVA) con el programa R Studio, lo cual permitió corroborar si la representación con ANOVA y PCA fue adecuada con los datos biológicos. Se obtuvo que el stress fue 0,045, lo cual significa que el análisis logra explicar la variabilidad de los datos, ya que el valor es muy cercano a cero. Luego, se realizó un Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS)

para la visualización de los datos, el cual se muestra en la Figura 7. A partir del gráfico, se puede observar que las tendencias fueron muy similares que las obtenidas con el PCA.

### **Anexo B. Índices de retención de Kovats e intensidades de los compuestos no identificados de *Alphitobius diaperinus***

Tabla 6. Índices de retención de Kovats e intensidades de los compuestos desconocidos presentes en las fracciones cromatográficas de los volátiles de Mexp de *Alphitobius diaperinus*.

RI exp	M <sub>DCM</sub>	M <sub>HEX</sub>	M <sub>MeOH</sub>
706	2,894	0,008	0,002
722	1,566	6,199	0,213
738	0,003	0,009	0,749
740	0,068	0,017	0,050
771	1,140	0,112	0,072
798	0,319	0,679	0,296
807	0,006	0,001	0,709
884	0,001	0,003	0,096
902	0,056	0,003	0,041
905	0,351	0,005	0,022
910	0,095	0,006	0,037
917	0,207	0,025	0,219
921	0,100	0,068	0,048
938	0,213	0,007	0,006
951	0,002	0,001	0,038
967	1,360	1,432	7,662
974	1,406	1,437	7,047
978	0,012	0,024	0,432
1015	0,032	0,069	0,305
1016	0,006	0,002	0,024
1036	0,008	0,010	0,064
1093	0,042	0,321	0,009
1097	0,004	0,001	0,046
1127	0,703	0,248	33,795
1138	0,005	0,017	0,067
1196	0,530	0,344	0,035
1219	0,000	0,000	0,032
1241	0,122	0,016	0,012
1255	0,006	0,002	0,030
1259	0,013	0,002	0,547
1291	0,023	0,008	0,008
1294	0,555	0,115	24,526
1304	0,024	0,005	0,072
1367	0,002	0,001	0,024
1399	0,535	0,460	0,036
1417	0,002	0,000	0,024

Continuación de la Tabla 6. Índices de retención de Kovats e intensidades de los compuestos desconocidos presentes en las fracciones cromatográficas de los volátiles de Mexp de *Alphitobius diaperinus*.

RI exp	M <sub>DCM</sub>	M <sub>HEX</sub>	M <sub>MeOH</sub>
1457	0,402	0,029	6,959
1515	0,001	0,000	0,027
1542	0,002	0,003	0,002
1576	0,002	0,000	0,028
1597	0,669	0,435	0,027
1613	0,569	0,009	2,475
1654	0,103	0,056	0,004
1681	0,108	0,046	0,015
1709	0,095	0,044	0,010
1715	1,365	0,605	0,021
1730	0,501	0,271	0,040
1761	0,053	0,027	0,003
1771	0,526	0,017	1,285
1784	0,050	0,028	0,036
1799	0,076	0,058	0,003
1862	0,507	0,141	0,064
1865	0,156	0,100	0,003
1916	2,389	1,562	0,019
1921	0,164	0,096	0,006
1928	0,029	0,004	0,064
1935	0,103	0,062	0,002
1955	1,044	0,510	0,017
1959	0,436	0,282	0,062
1968	0,124	0,081	0,006
1973	1,889	0,953	0,025
1981	0,081	0,055	0,007
1986	0,222	0,170	0,005
2028	0,031	0,021	0,001
2031	0,349	0,348	0,003
2033	0,039	0,034	0,002
2054	0,178	0,088	0,004
2058	0,181	0,006	0,248
2071	0,145	0,136	0,001
2080	0,021	0,014	0,001
2116	5,996	5,697	0,052
2124	0,021	0,005	0,141
2164	0,596	0,535	0,017
2181	0,119	0,080	0,017
2265	0,046	0,049	0,001
2277	0,114	0,111	0,001
2317	2,848	2,322	0,011
2324	0,235	0,012	0,194
2348	0,010	0,013	0,004
2363	0,477	0,189	0,051

Continuación de la Tabla 6. Índices de retención de Kovats e intensidades de los compuestos desconocidos presentes en las fracciones cromatográficas de los volátiles de Mexp de *Alphitobius diaperinus*.

RI exp	M <sub>DCM</sub>	M <sub>HEX</sub>	M <sub>MeOH</sub>
2380	1,698	1,373	0,025
2372	0,083	0,089	0,000
2457	0,216	0,012	0,187
2470	0,129	0,126	0,006
2484	0,311	0,128	0,015
2494	1,167	0,356	0,083
2512	0,050	0,018	0,005
2518	7,085	6,672	0,006
2532	0,169	0,052	0,016
2546	0,002	0,009	0,001
2565	0,423	0,557	0,003
2572	0,545	0,250	0,113
2588	0,103	0,009	0,074
2609	0,176	0,291	0,010
2614	0,994	1,030	0,134
2620	0,897	0,638	0,134
2677	0,083	0,130	0,004
2693	0,102	0,115	0,005
2721	4,741	6,920	0,009
2745	0,087	0,036	0,003
2777	0,133	0,222	0,001
2787	10,995	2,655	2,221
2813	0,165	0,309	0,050
2816	0,197	0,507	0,047
2837	0,087	0,130	0,003
2844	0,163	0,022	0,098
2882	0,104	0,181	0,006
2894	0,011	0,004	0,000
2923	1,390	2,395	0,003
2926	0,010	0,025	0,001
2961	0,215	0,257	0,005
2972	0,094	0,072	0,002
3015	0,248	0,358	0,013
3015	0,066	0,071	0,003
3087	0,158	0,165	0,008
3094	0,162	0,253	0,006
3106	0,068	0,113	0,001
3115	0,031	0,045	0,001
3137	0,092	0,179	0,004
3164	0,462	1,282	0,003
3179	0,213	0,321	0,003
3186	0,667	2,138	0,007
3274	0,035	1,192	0,005
3304	0,094	0,146	0,006