

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
**UNIVERSIDAD
CATÓLICA**
DEL PERÚ

ACTIVIDAD DETERRENTE Y ACARICIDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE QUINUAS AMARGAS, ACEITES ESENCIALES Y TARWI

Tesis para optar el Título de Licenciado en Química, que presenta el bachiller:

Graciela Herminia Zegarra Vilchez

ASESOR: Ana Pastor de Abram

Lima, Junio del 2010

RESUMEN

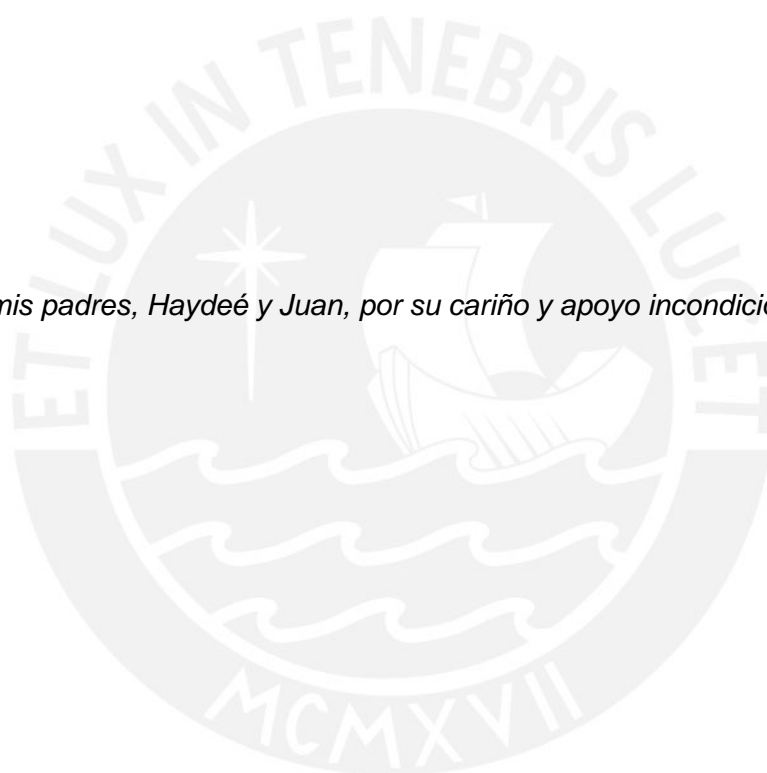
Uno de los principales problemas que afecta la ganadería a nivel mundial está relacionado con la presencia de parásitos externos. Los ectoparásitos afectan la productividad pecuaria al disminuir la producción de carne y leche; además son transmisores de agentes patógenos. La principal parasitosis del ganado bovino es la garrapata *Boophilus microplus*. La agricultura se ve afectada por insectos tales como *Spodoptera littoralis* y *Epilachna paenulata*. Los acaricidas e insecticidas químicos constituyen mecanismos de control contra estas plagas; sin embargo, el uso de estos compuestos ha originado problemas de contaminación y quimioresistencia.

Los productos naturales representan una alternativa interesante y prometedora para el control integrado de plagas; además, son una vía amigable con el medio ambiente y con los productos derivados de estas actividades.

Esta investigación evaluó la actividad deterrente y acaricida de extractos de variedades de quinuas amargas y tarwi; así como de aceites esenciales de molle y muña. La actividad acaricida fue confrontada frente al pesticida sintético amitraz. Después de la obtención de extractos de quinua se estudió la composición proteica de las harinas desaponificadas mediante electroforesis, generando conocimiento de su valor nutricional. Se caracterizaron químicamente los extractos y aceites esenciales empleados en los bioensayos.

Sobre *E. paenulata* resultaron activos los extractos de quinua variedad Markjo y tarwi, y los aceites esenciales de molle y muña; siendo los tres últimos los que mostraron mayor actividad. Ningún extracto mostró actividad sobre *S. littoralis*. Todas las especies mostraron actividad sobre *B. microplus*; siendo el aceite esencial de muña y la quinua Markjo los que mostraron alta bioactividad. Casi todas las muestras resultaron ser menos activas que el acaricida químico amitraz; sin embargo, la muña y la quinua Markjo mostraron valores cercanos al amitraz. Las harinas de quinua desaponificadas mostraron similares perfiles polipéptidicos; encontrándose bandas con pesos moleculares entre 7,6 y 61,7 kDa. Se identificaron las proteínas Globulina 11S y Albúmina 2S en todas las variedades de quinuas estudiadas. La variedad Markjo presentó el mayor número de especies polipeptídicas y el mayor contenido de proteína soluble.

A mis padres, Haydeé y Juan, por su cariño y apoyo incondicional.



AGRADECIMIENTOS

- A mi querida profesora y asesora de Tesis, Ana Pastor, por su orientación y apoyo personal y profesional, por confiar en mis capacidades y proyectarlas hacia mi futuro.
- A las profesoras Lilian Abugoch y Carmen Rossini, por su gran apoyo y contribución para la realización de este trabajo.
- A mi familia, amigos, compañeros y a todos los que contribuyeron de una u otra forma para el logro de este objetivo.



LISTA DE ABREVIATURAS

- BSA:** Estándar de Albúmina Bovina
- C:** Control
- CONABIO:** Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad - México
- CONACYT:** Consejo Nacional Ciencia y Tecnología - México
- DDT:** Diclorodifeniltricloroetano
- DGPA:** Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera - España
- EC:** Efecto de la concentración
- FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación
- GC-MS:** Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopía de Masas
- ha:** Hectárea
- INDDA:** Instituto de Desarrollo Agroindustrial - Perú
- INIA:** Instituto Nacional de Innovación Agraria - Perú
- IR:** Infrarrojo
- I_R calculado:** Índice de retención calculado
- I_R teórico:** Índice de retención teórico
- ISO:** Organización Internacional de Estandarización
- L_{marcador}:** Longitud recorrida por el marcador de proteínas
- L_{proteína}:** Longitud recorrida por cada una de las proteínas de peso molecular conocido presentes en el estándar empleado
- 2-ME:** 2-mercaptoetanol
- MINAG:** Ministerio de Agricultura - Perú
- NCDENR:** Departamento del Ambiente y los Recursos Naturales de Carolina del Norte - USA
- OMS/ONU:** Organización Mundial de la Salud/Organización de las Naciones Unidas
- PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida
- PM:** Peso Molecular
- PSA:** Persulfato de amonio
- rpm:** Revoluciones por minuto
- SDS:** Dodecilsulfato sódico
- STD:** Estándar
- Sub. Homo:** Subgrupo homogéneo
- t:** Tonelada
- T:** Tratamiento

TEMED: Tetrametiletilendiamina

t_R: Tiempo de retención

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano

TWEEN 20: Polisorbato 20

U_r: Movilidad electroforética

UV: Ultravioleta

VIS: Visible



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Principales acaricidas sintéticos para el control de garrapatas: **(a)** DDT. **(b)** Triclorfón. **(c)** Carbaril. **(d)** Amitraz. **(e)** Cipermetrina
- Figura 2.** Planta de *Chenopodium quinoa* Willd.
- Figura 3.** **(a)** Raíz de *Chenopodium quinoa* Willd. **(b)** Tallo de *Chenopodium quinoa* Willd.
- Figura 4.** Anatomía del grano de quinua
- Figura 5.** **(a)** Ejemplo de saponina triterpenoide: Ácido oleánico-D-glucopiranososa. **(b)** Ejemplo de saponina esteroide: Diosgenina-D-glucopiranososa-L-ramnopiranososa
- Figura 6.** Principales saponinas presentes en los granos de quinua
- Figura 7.** Planta de *Lupinus mutabilis* Sweet
- Figura 8.** Principales alcaloides presentes en los granos de tarwi. **(a)** Esparteína. **(b)** Lupinina. **(c)** Lupanina
- Figura 9.** Planta de *Schinus molle* L.
- Figura 10.** Planta de *Minthostachys mollis* Griseb.
- Figura 11.** *Boophilus microplus* (adulto)
- Figura 12.** Etapas de crecimiento de la garrapata
- Figura 13.** Ciclo de vida de la garrapata
- Figura 14.** *Epilachna paenulata* (adulto)
- Figura 15.** *Spodoptera littoralis*. **(a)** Larva. **(b)** Adulto
- Figura 16.** Verificador de disolución empleado para la obtención de extractos crudos de quinua
- Figura 17.** Extractos crudos de quinua y tarwi
- Figura 18.** Evaluación de la actividad deterrente sobre *E. paenulata*
- Figura 19.** Oviposición de teleóginas al día 14 post-tratamiento
- Figura 20.** **(a)** Lavado manual de los granos de quinua. **(b)** Termobalanza para el ajuste de humedad de los granos de quinua
- Figura 21.** Extractos acuosos proteicos a pH 9, 10 y 11
- Figura 22.** Equipo de electroforesis Bio Rad
- Figura 23.** Cromatograma GC-MS del aceite esencial de molle
- Figura 24.** Cromatograma GC-MS del aceite esencial de muña
- Figura 25.** Inhibición de ingesta evaluada sobre *S. littoralis* y *E. paenulata*
- Figura 26.** Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la quinua variedad A. Sacaca
- Figura 27.** Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la quinua variedad A. Maranganí

Figura 28. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la quinua variedad Markjo

Figura 29. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la quinua variedad Zolapozada

Figura 30. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para el tarwi

Figura 31. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para el molle

Figura 32. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la muña

Figura 33. Eficiencia reproductiva obtenida del screening primario

Figura 34. Eficacia obtenida del screening primario

Figura 35. Eficiencia reproductiva obtenida del screening secundario

Figura 36. Eficacia obtenida del screening secundario

Figura 37. Efecto de concentración para la quinua variedad A. Sacaca

Figura 38. Efecto de concentración para la quinua variedad A. Maranganí

Figura 39. Efecto de concentración para la quinua variedad Markjo

Figura 40. Efecto de concentración para la quinua variedad Zolapozada

Figura 41. Efecto de concentración para la muña

Figura 42. Contenido de proteína soluble de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua

Figura 43. Perfil polipeptídico desnaturalizante de la quinua variedad Markjo

Figura 44. Curva de calibración para la determinación del contenido de proteína soluble

Figura 45. Curva estándar para la determinación de los pesos moleculares

Figura 46. Espectro UV/VIS del extracto crudo de la quinua variedad A. Sacaca

Figura 47. Espectro UV/VIS del extracto crudo de la quinua variedad A. Maranganí

Figura 48. Espectro UV/VIS del extracto crudo de la quinua variedad Markjo

Figura 49. Espectro UV/VIS del extracto crudo de la quinua variedad Zolapozada

Figura 50. Espectro UV/VIS del extracto crudo de tarwi

Figura 51. Espectro IR del extracto crudo de la quinua variedad A. Sacaca

Figura 52. Espectro IR del extracto crudo de la quinua variedad A. Maranganí

Figura 53. Espectro IR del extracto crudo de la quinua variedad Markjo

Figura 54. Espectro IR del extracto crudo de la quinua variedad Zolapozada

Figura 55. Espectro IR del extracto crudo de tarwi

Figura 56. Perfil polipeptídico desnaturalizante de la quinua variedad A. Sacaca

Figura 57. Perfil polipeptídico desnaturalizante de la quinua variedad A. Maranganí

Figura 58. Perfil polipeptídico desnaturalizante de la quinua variedad Markjo

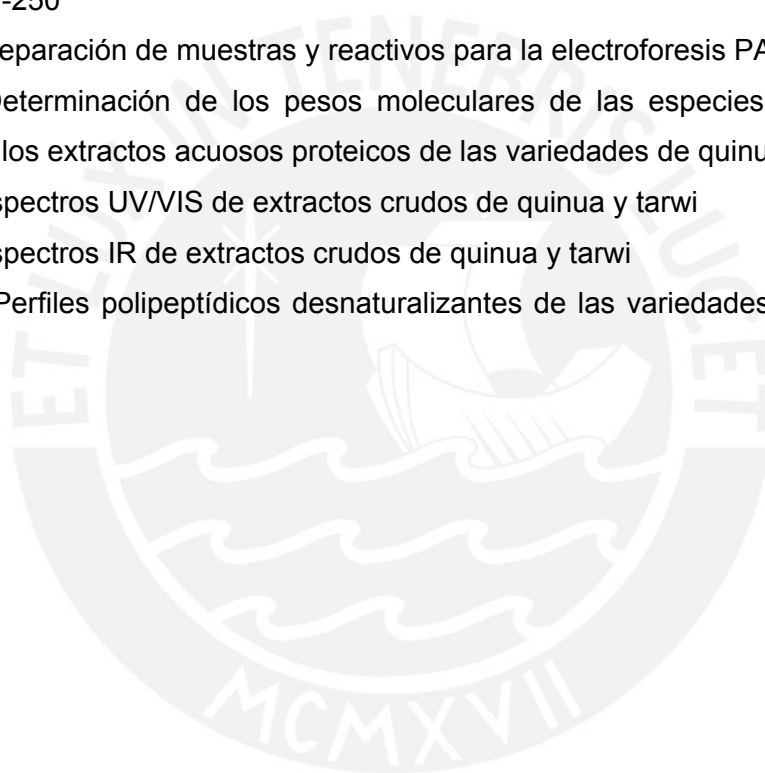
Figura 59. Perfil polipeptídico desnaturalizante de la quinua variedad Zolapozada

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Valores nutricionales del grano de quinua
- Tabla 2.** Aminoácidos presentes en el grano de quinua
- Tabla 3.** Ácidos grasos presentes en el grano de quinua
- Tabla 4.** Vitaminas presentes en el grano de quinua
- Tabla 5.** Minerales presentes en el grano de quinua
- Tabla 6.** Uso de saponinas en la industria
- Tabla 7.** Valores nutricionales del grano de tarwi
- Tabla 8.** Condiciones empleadas para la preparación de geles de separación y concentración
- Tabla 9.** Metabolitos detectados en extractos crudos de quinua y tarwi
- Tabla 10.** Principales componentes del aceite esencial de molle
- Tabla 11.** Principales componentes del aceite esencial de muña
- Tabla 12.** Inhibición de ingesta evaluada sobre *S. littoralis* y *E. paenulata*
- Tabla 13.** Subgrupos homogéneos para la inhibición de ingesta
- Tabla 14.** Eficiencia reproductiva y eficacia obtenidas del screening primario
- Tabla 15.** Eficiencia reproductiva y eficacia obtenidas del screening secundario
- Tabla 16.** Subgrupos homogéneos para la eficiencia reproductiva del screening primario
- Tabla 17.** Subgrupos homogéneos para la eficacia del screening primario
- Tabla 18.** Subgrupos homogéneos para la eficiencia reproductiva del screening secundario
- Tabla 19.** Subgrupos homogéneos para la eficacia del screening secundario
- Tabla 20.** Contenido de proteína total de las variedades de quinua
- Tabla 21.** Subgrupos homogéneos para el contenido de proteína total
- Tabla 22.** Ácidos grasos presentes en las variedades de quinua
- Tabla 23.** Contenido de proteína soluble de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua
- Tabla 24.** Subgrupos homogéneos para el contenido de proteína soluble
- Tabla 25.** Pesos moleculares de las especies polipeptídicas presentes en las variedades de quinua
- Tabla 26.** Cantidades de agua y estándar de proteína BSA empleadas en la preparación de la curva de calibración
- Tabla 27.** Cálculo de la U_r y del Log PM de las proteínas presentes en el estándar

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Esquema de la marcha fitoquímica
- ANEXO 2.** Preparación de reactivos para la marcha fitoquímica
- ANEXO 3.** Determinación del contenido de proteína total mediante el método de Kjeldahl
- ANEXO 4.** Determinación del contenido de proteína soluble mediante el método de Bradford
- ANEXO 5.** Preparación del estándar de proteína BSA y del colorante azul brillante de Coomassie G-250
- ANEXO 6.** Preparación de muestras y reactivos para la electroforesis PAGE-SDS
- ANEXO 7.** Determinación de los pesos moleculares de las especies polipeptídicas presentes en los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua
- ANEXO 8.** Espectros UV/VIS de extractos crudos de quinua y tarwi
- ANEXO 9.** Espectros IR de extractos crudos de quinua y tarwi
- ANEXO 10.** Perfiles polipeptídicos desnaturalizantes de las variedades de quinua en estudio



ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Especies vegetales en estudio	4
1.1.1. Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd)	4
1.1.1.1. Taxonomía	4
1.1.1.2. Origen	4
1.1.1.3. Descripción botánica	5
1.1.1.4. Valor nutritivo	7
1.1.1.5. Producción y rendimiento	10
1.1.1.6. Industrialización	10
1.1.1.7. Saponinas en quinoa	11
1.1.2. Tarwi (<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet)	14
1.1.2.1. Taxonomía	14
1.1.2.2. Origen	14
1.1.2.3. Descripción botánica	14
1.1.2.4. Valor nutritivo	15
1.1.2.5. Alcaloides en tarwi	16
1.1.3. Molle (<i>Schinus molle</i> L.)	17
1.1.3.1. Taxonomía	17
1.1.3.2. Origen	17
1.1.3.3. Descripción botánica	17
1.1.3.4. Aceite esencial de molle	18
1.1.4. Muña (<i>Mintostachys mollis</i> Griseb.)	19
1.1.4.1. Taxonomía	19
1.1.4.2. Origen	19
1.1.4.3. Descripción botánica	19
1.1.4.4. Aceite esencial de muña	20
1.2. Especies animales en estudio	21
1.2.1. Garrapata (<i>Boophilus microplus</i>)	21
1.2.1.1. Definición	21
1.2.1.2. Tipos	22
1.2.1.3. Ciclo de vida	22
1.2.2. San Antonio (<i>Epilachna paenulata</i>)	23
1.2.3. Rosquilla Negra (<i>Spodoptera littoralis</i>)	24

	Página
II. PARTE EXPERIMENTAL	27
2.1. Equipos	27
2.1. Reactivos	28
2.3. Selección de las especies vegetales en estudio	28
2.4. Obtención de extractos crudos de quinua y tarwi para el estudio de su bioactividad	29
2.5. Caracterización química de los extractos crudos de quinua y tarwi	30
2.5.1. Marcha fitoquímica	30
2.5.2. Espectroscopía UV/VIS e IR	30
2.6. Obtención de aceites esenciales de molle y muña para el estudio de su bioactividad	31
2.7. Caracterización química de los aceites esenciales de molle y muña	31
2.8. Estudios de bioactividad	32
2.8.1. Actividad deterrente	32
2.8.2. Actividad acaricida	33
2.9. Caracterización química de las variedades de quinua	35
2.9.1. Determinación del contenido de proteína total	35
2.9.2. Determinación de ácidos grasos	35
2.10. Obtención de harinas de quinua desengrasadas para el estudio de sus proteínas	36
2.11. Obtención de extractos acuosos proteicos a partir de harinas de quinua desengrasadas	37
2.12. Caracterización bioquímica de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua	37
2.12.1. Determinación del contenido de proteína soluble	37
2.12.2. Electroforesis PAGE	38

	Página
III. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	41
3.1. Caracterización química de los extractos crudos de quinua y tarwi	41
3.1.1. Marcha fitoquímica	41
3.1.2. Espectroscopía UV/VIS e IR	42
3.2. Caracterización química de los aceites esenciales de molle y muña	42
3.3. Estudios de bioactividad	46
3.3.1 Actividad deterrente	46
3.3.2. Actividad acaricida	51
3.4. Caracterización química de las variedades de quinua	61
3.4.1. Determinación del contenido de proteína total	61
3.4.2. Determinación de ácidos grasos	62
3.5. Caracterización bioquímica de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua	64
3.5.1. Determinación del contenido de proteína soluble	64
3.5.2. Electroforesis PAGE	66
IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
V. BIBLIOGRAFÍA	72

I. INTRODUCCIÓN

La globalización de la economía, particularmente a nivel del sector agropecuario, ha establecido como uno de los requisitos internacionales para la comercialización de la carne, encontrarla libre de cualquier tipo de sustancias tóxicas al organismo humano como son los biocidas sintéticos [1]. Las garrapatas *Boophilus microplus* constituyen los parásitos externos más perjudiciales para la ganadería a nivel mundial. Las pérdidas económicas reportadas debido a la presencia de estos ácaros son cuantiosas, se estima que estas alcanzan entre 100 a 150 millones de dólares por año [2]. Los principales problemas reportados son: disminución en la producción de carne y leche, disminución en la ganancia de peso y el valor de las pieles, transmisión de agentes patógenos a animales y humanos; además de los elevados costos ocasionados por campañas sanitarias [1]. Actualmente, los acaricidas químicos constituyen el principal mecanismo de control de garrapatas (Figura 1). Los principios activos más conocidos son del tipo: organoclorado (DDT), organofosforado (triclorfón), carbamato (carbaril), amidina (amitraz) y piretroide (cipermetrina); siendo estos dos últimos los más empleados en la actualidad [2].

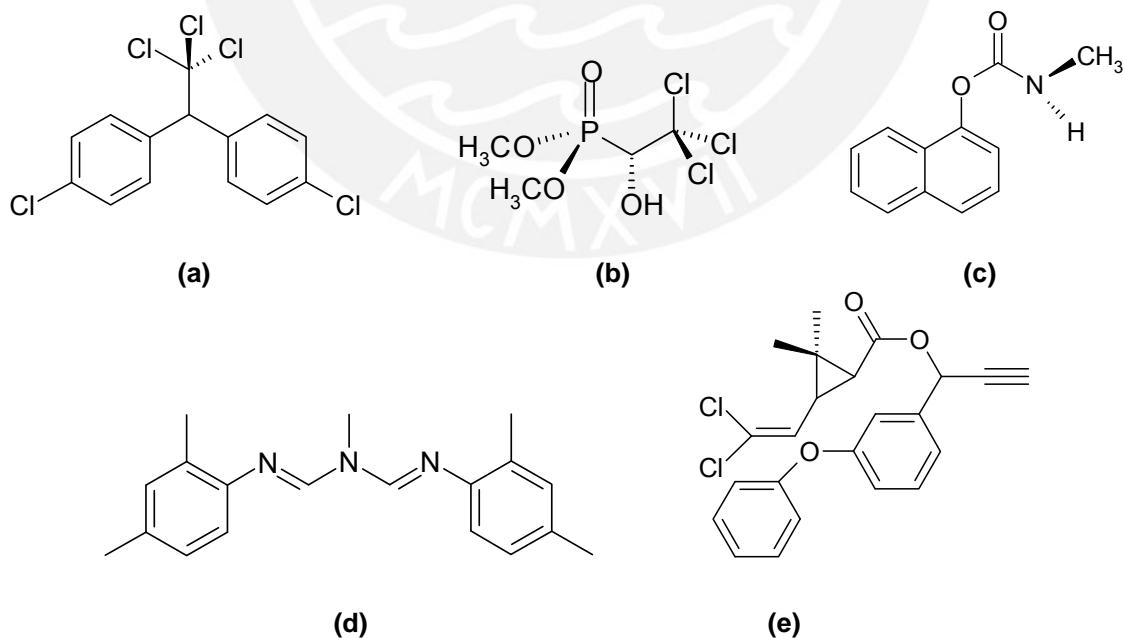


Figura 1. Principales acaricidas sintéticos para el control de garrapatas: **(a)** DDT. **(b)** Triclorfón **(c)** Carbaril. **(d)** Amitraz **(e)** Cipermetrina

Por otro lado, la agricultura se ve afectada por insectos que causan serios daños en los cultivos. Las larvas y adultos de *Epilachna paenulata* se alimentan de hojas de cultivos de cucurbitáceas, esqueletizándolas. Los fragmentos vegetales no son ingeridos por las plagas; sino triturados, ellos solamente absorben los líquidos de las hojas. En algunas oportunidades los daños se generalizan a todo el cultivo, incluso a los frutos, ocasionando perjuicios de consideración. Las larvas de *Spodoptera littoralis* se alimentan de todas las partes verdes de plantas hortícolas, defoliándolas, atacando incluso los frutos. Ambas plagas se controlan químicamente con diversos productos como: metomilo, clorpirofos, metamidofos, etc [1, 3].

El uso de acaricidas e insecticidas químicos ha originado problemas de residualidad, contaminación y quimioresistencia. Los productos naturales con propiedades biocidas representan una alternativa prometedora para el control integrado de plagas ya que alargan el intervalo de aplicación de los productos sintéticos, reduciendo su uso y el gasto invertido en ellos, al tiempo que prolongan la vida útil de dichos plaguicidas en los casos de mayor impacto [2].

En la línea de investigación relacionada con la búsqueda de acaricidas naturales destaca el trabajo de Heimerdinger, Olivo y Molento; quienes evaluaron extractos etanólicos de *Cymbopogon citratos* sobre garrapatas *Boophilus microplus* en vacas Holstein naturalmente infestadas. Encontraron que a una concentración del 2,7% se redujo significativamente las reinfestaciones en un 40%, 47% y 52% durante los días 3, 7 y 14 de postratamiento, respectivamente [4].

Del mismo modo, Borges, Ferri y Silva; evaluaron la eficacia de extractos de *Melia azedarach L.* contra garrapatas *Boophilus microplus*. Todos los extractos ensayados causaron la mortalidad de las larvas a las 168 horas postratamiento. Los extractos no mataron a las hembras adultas, pero inhibieron parcial o totalmente la producción de huevos [5].

Martins también evaluó la acción acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon winterianus* frente a hembras adultas y larvas de la garrapata *Boophilus microplus*. No hubo puesta de huevos cuando las hembras fueron tratadas a una concentración del 10% y tan poco hubo eclosión a una concentración del 7% [6].

Otra planta importante, *Sapindus saponaria*, mostró una alta efectividad contra garrapatas *Boophilus microplus* en experimentos realizados en Brasil [7].

En relación a la búsqueda de insecticidas naturales destaca el trabajo de Castillo, Gonzáles-Coloma y Gonzáles; quienes evaluaron la actividad deterrente de extractos

de diferentes especies de plantas nativas de Uruguay sobre adultos de *Epilachna paenulata* y larvas de *Spodoptera littoralis*. Las especies de plantas pertenecientes a las familias Solanaceae, Bignoniaceae y Sapindaceae mostraron una actividad significativa. Ningún extracto mostró actividad significativa sobre *S. littoralis* [8].

El Perú, país rico en biodiversidad, tiene en la quinua y en otras especies vegetales, recursos de alto valor. La quinua, *Chenopodium quinoa* Willd, ha adquirido importancia internacional por ser un alimento de origen vegetal rico en proteínas y por poseer la mayoría de los aminoácidos esenciales para el ser humano [9]. Para algunas de sus variedades se han encontrado condiciones agronómicas favorables, lo cual ha generado diversas aplicaciones en la industria alimentaria tales como: Elaboración de productos derivados a partir de sus harinas y elaboración de suplementos nutricionales ricos en proteínas [10]; sin embargo, existe un grupo de especies que no cumple esa finalidad dado su alto contenido de saponinas que les imprimen un sabor amargo. La actividad biológica de la quinua está asociada principalmente a la presencia de estos compuestos, habiéndose identificado hasta diez diferentes tipos de saponinas presentes en granos de quinua [11, 12]. Las variedades amargas, de alto contenido de saponinas, crecen frecuentemente sobre 3500 m.s.n.m. en zonas inhóspitas, sin tener al momento valor económico.

Nuestro país cuenta además con otras especies de alto valor nutritivo y biológico como son: *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi), *Minthostachys mollis* Griseb (muña) y *Schinus molle* L. (molle); siendo estas dos últimas plantas aromáticas de ancestral uso pesticida.

1.1. Especies vegetales en estudio

1.1.1. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)

1.1.1.1. Taxonomía

La quinoa pertenece al género *Chenopodium*, familia *Chenopodiaceae*. El género *Chenopodium* es el principal dentro de esta familia y tiene amplia distribución mundial, con cerca de 250 especies [13]. Dentro de este género existen cuatro especies cultivadas como plantas alimenticias: *Ch. quinoa* Willd. y *Ch. pallidicaule* Aellen, como productoras de grano en Sudamérica; y *Ch. nuttalliae* Safford y *Ch. ambrosioides* L., como verdura en México. Este género también incluye especies silvestres de amplia distribución mundial: *Ch. album*, *Ch. hircinum*, *Ch. murale*, *Ch. graveolens*, *Ch. petiolare*, entre otras [14].

La clasificación de la planta en estudio se muestra a continuación [13]:

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Fenerógama
CLASE	Dicotiledonea
ORDEN	Centrosperma
FAMILIA	Chenopodiaceae
GÉNERO	<i>Chenopodium</i>
ESPECIE	<i>Chenopodium quinoa</i>
NOMBRE COMÚN	Quinoa

1.1.1.2. Origen

La quinoa es un producto originario de los países andinos, principalmente de la región del Lago del Titicaca. Su consumo es ancestral en la dieta de la población campesina ya que ha sido cultivada en el altiplano sudamericano desde la época prehispánica. Con la introducción del trigo, la quinoa fue desplazada hacia tierras más altas, disminuyendo su producción. El cultivo de este grano fue artesanal en las zonas alto andinas hasta la década de los 90, tiempo en el que se produjo una importante demanda de exportación a los mercados norteamericano y europeo [14].

1.1.1.3. Descripción botánica

La quinua es una planta anual que crece a más de 1900 m.s.n.m. (Figura 2), es muy resistente a sequías y bajas temperaturas. Se puede clasificar según su contenido de saponinas, en dulce a concentraciones inferiores a 0,11%, o amarga a concentraciones superiores de 0,11% [15].

Es una planta herbácea y erguida. Presenta raíces pivotantes y fasciculadas (Figura 3a). El tallo es redondo cerca del cuello y cuadrangular a la altura de las ramificaciones, pudiendo tener una altura de 60cm a 2m (Figura 3b). Presenta hojas alternas de 3-11cm de largo y de 1-5cm de ancho. La inflorescencia es paniculada y de racimos ascendentes apretados de color púrpura. El fruto es un aquenio amarillento aplanado de 2 a 5mm de diámetro en promedio, aunque su color puede variar desde blanco hasta tonalidades amarillo-rojizas [16].

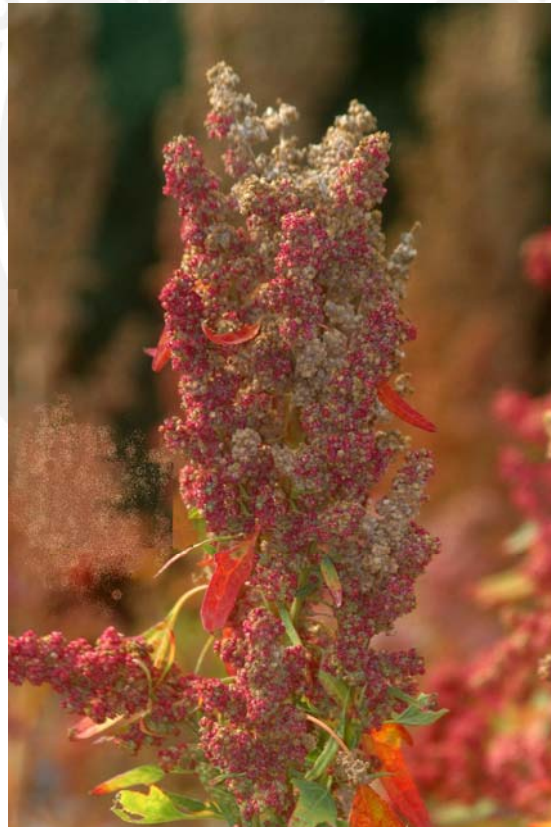


Figura 2. Planta de *Chenopodium quinoa* Willd.

Fuente: Van den Bos, A. (2004). Base de datos de flores, árboles y hojas [fotografía].

Tomado de: <http://www.botanypictures.com/>. Revisado: 11/05/2010

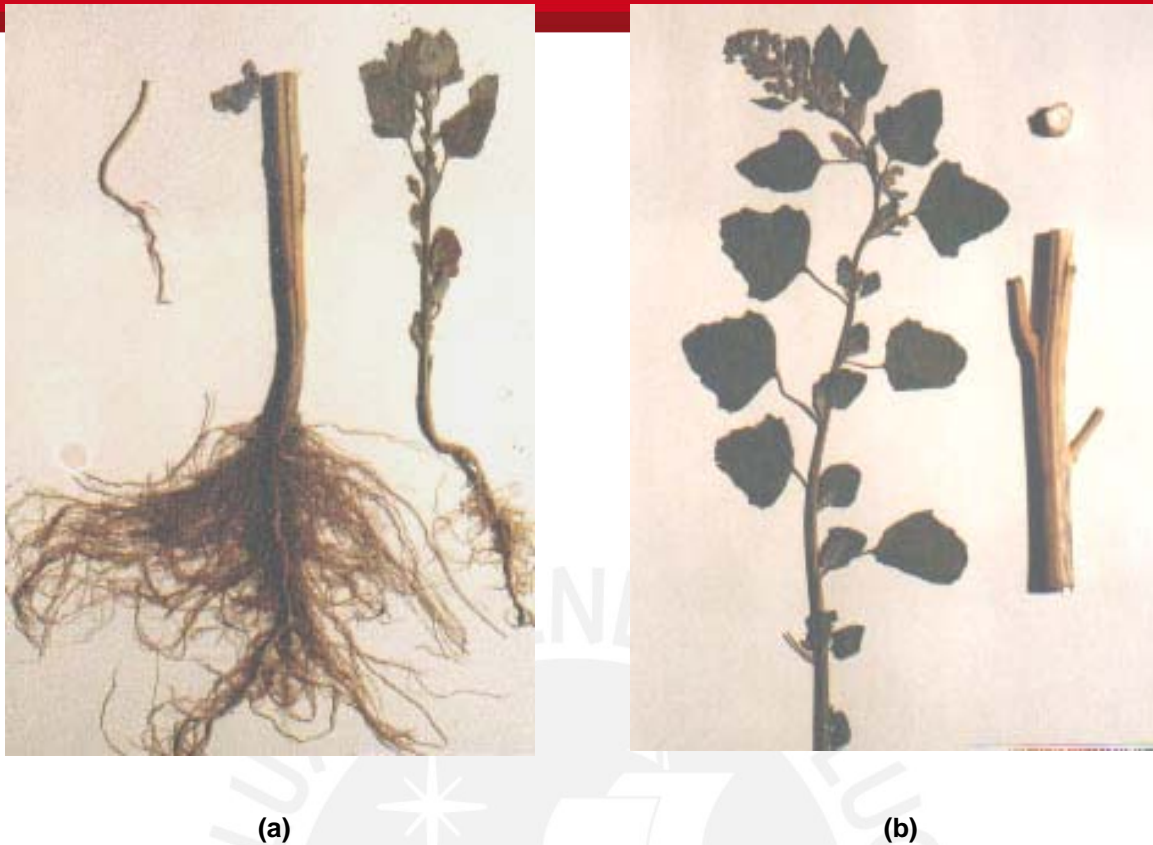


Figura 3. (a) Raíz de *Chenopodium quinoa* Willd. **(b)** Tallo de *Chenopodium quinoa* Willd

Fuente: Fontúrbel, F. (2006). Problemática de la producción y comercialización de *Chenopodium quinoa* W. (Chenopodiaceae) debida a la presencia de las saponinas [fotografía]. Tomado de: <http://cabierta.uchile.cl/revista/21/articulos/pdf/paper6.pdf>. Revisado: 20/06/2010

El fruto de la quinua se forma en el perigonio, éste último recubre una sola semilla y se desprende con facilidad al frotarlo cuando está seco. La semilla está conformada por tres partes bien definidas (Figura 4) [17]:

- *Episperma*: Presenta una capa externa conocida como pericarpio (membrana rugosa, quebradiza y seca que se desprende con facilidad por frotamiento, contiene las saponinas)
- *Perisperma*: Ocupa la parte central de la semilla y encierra una masa de gránulos de almidón pequeños.
- *Endospermo*: Conformado por el embrión, además contiene los cotiledones y la radícula.

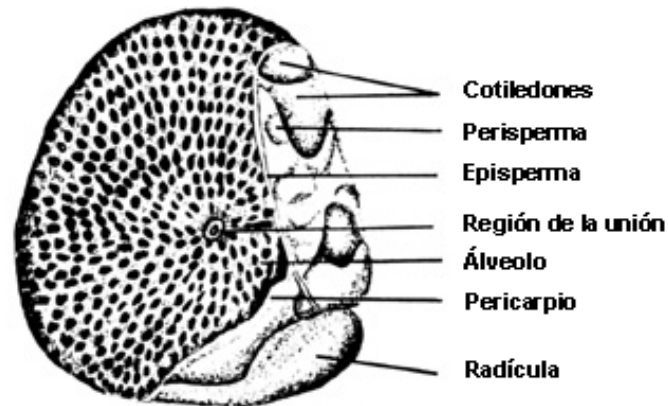


Figura 4. Anatomía del grano de quinua

Fuente: Cultivos Andinos FAO (2009) [imagen]. Tomado de:

<http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro10/images/fig12.jpg>. Revisado: 11/05/2010

1.1.1.4. Valor nutritivo

Si bien todas las partes de la planta de quinua tienen diferentes usos, el producto primario es el fruto. El análisis bromatológico de este grano muestra su alto valor nutricional (Tabla 1)

Tabla 1. Valores nutricionales del grano de quinua [16]

Parámetro	% Peso (p/p)
Proteínas	12-16
Humedad	12,6
Carbohidratos	59,7
Fibras	4,1
Cenizas	3,3
Grasas	4,9

La quinua ha adquirido importancia internacional por ser un alimento de origen vegetal rico en proteínas y por poseer gran parte de los aminoácidos esenciales para el ser humano (Tabla 2). Aunque la quinua no tiene un contenido especialmente alto de proteínas al compararla con otros cereales, su importancia radica principalmente en la

calidad de sus proteínas. Aporta aminoácidos como: histidina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina; todos recomendados por la OMS/ONU [9].

Tabla 2. Aminoácidos presentes en el grano de quinua [16]

Aminoácido	% Peso (p/p)
Histidina*	4,6
Isoleucina*	7,0
Leucina*	7,3
Lisina*	8,4
Metionina*	5,5
Fenilalanina*	5,3
Treonina*	5,7
Triptófano*	1,2
Valina*	7,6
Ácido aspártico	8,6
Ácido glutámico	16,2
Cisteína	7,0
Serina	4,8
Tirosina	6,7
Arginina*	7,4
Prolina	3,5
Alanina	4,7
Glicina	5,2

* Aminoácidos esenciales para el ser humano según la OMS/ONU

Los principales ácidos grasos presentes en el grano de quinua son: palmítico, cis-oleico, cis-linoleico y cis-linolénico (Tabla 3); siendo estos dos últimos esenciales para el ser humano [18].

Tabla 3. Ácidos grasos presentes en el grano de quinua [18]

Ácido graso	% Peso (p/p)
Mirístico 14:0	0,2
Palmítico 16:0	9,9
Esteárico 18:0	0,8
cis-oleico 18:1 (9)	24,5
cis-linoleico 18:2 (9,12)	50,2
cis-linolénico 18:3 (9,12,15)	5,4
Araquídico 20:0	2,7
Behénico 22:0	2,7
Lignocérico 24:0	0,7

Con respecto al contenido de vitaminas y minerales (Tablas 4 y 5), se ha reportado la presencia de cantidades considerables de vitaminas B₁, B₂, B₃ y C; así como de calcio y hierro; además de cantidades menores de fósforo, magnesio y zinc [19].

Tabla 4. Vitaminas presentes en el grano de quinua [16]

Vitamina	mg/100g materia seca
Vitamina B ₁	30
Vitamina B ₂	28
Vitamina B ₃	7
Vitamina C	3

Tabla 5. Minerales presentes en el grano de quinua [16]

Mineral	mg/100g materia seca
Calcio	11
Hierro	54

1.1.1.5. Producción y rendimiento

En el año 2010, la producción anual de quinua en nuestro país fue de 82 185 t y el rendimiento promedio anual alcanzando fue de 2 866 kg/ha. Esta productividad, aunque baja, es superior a la de Bolivia y Ecuador [20].

Los bajos rendimientos que caracterizan al cultivo de quinua se deben principalmente al tamaño de sus granos, lo que dificulta su recolección y procesamiento. El tamaño de los granos está estrechamente relacionado con la variedad de quinua; así, las variedades dulces se caracterizan por poseer granos pequeños; mientras que las variedades amargas presentan granos de mayor tamaño. La presencia de saponinas constituye otro obstáculo para la comercialización y exportación de la quinua debido a su toxicidad y sabor amargo. Por ello, se han planteado algunas opciones para aprovechar tales sustancias; no habiéndose concretado nada aún con respecto a la utilización de dichos compuestos como subproductos de la quinua [21].

Sin embargo, en los últimos años este pseudo cereal ha adquirido importancia económica por la demanda local y mundial. La exportación anual de quinua para el año 2010 fue de 4 838 t. Los principales importadores fueron Estados Unidos, Holanda, España y Alemania [20].

Los principales departamentos productores de quinua en el Perú son: Puno, productor por excelencia, donde se concentra más del 80% de la producción nacional; seguido por Junín, Ayacucho y Cusco con 5%, 3% y 2% respectivamente [22].

1.1.1.6. Industrialización

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas a los que se enfrentan los productores de quinua es la presencia de saponinas; estas son las causantes del sabor amargo del grano, por lo que requieren ser extraídas previamente a su consumo [16]. Existen tres métodos empleados a escala industrial para la desaponificación de los granos de quinua [10]:

- *Proceso por vía seca*: Tratamiento seco del producto por un sistema abrasivo de paletas.
- *Proceso por vía húmeda*: Remojo previo de los granos seguido de un lavado con agitación constante.

- *Proceso combinado*: Remoción de la mayor parte de saponinas por vía seca, mientras que las saponinas residuales son removidas mediante cortos tiempos de lavado.

Los granos desaponificados pueden ser transformados en harinas, las cuales tienen diversas aplicaciones en la industria alimentaria para la elaboración de panes, hojuelas, fideos, galletas, bebidas, extruidos, expandidos, etc.

1.1.1.7. Saponinas en quinua

Las saponinas son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La presencia de saponinas ha sido reportada en más de 100 familias de plantas, siendo *quillaja* y *saponaria* los géneros más comunes [23].

Las saponinas son compuestos glicósidicos, poseen una estructura que contiene dos partes: glicona y aglicona. La parte glicona está compuesta por azúcares sencillos de 1 a 5 unidades; mientras que la parte aglicona, conocida como sapogenina, consta de un esqueleto del tipo esteroideal (C 27) o triterpenoide (C 30) [24].

Estos compuestos se clasifican según su estructura en dos tipos [23,24]:

- *Saponinas triterpenoides* (Figura 5a), ampliamente distribuidas en el reino vegetal, presentes predominantemente en dicotiledóneas, poseen un esqueleto formado por la unión de 6 unidades de isopreno, las estructuras pentacíclicas son más abundantes y conocidas que las tetracíclicas.
- *Saponinas esteroideas* (Figura 5b), menos distribuidas en la naturaleza, presentes predominantemente en monocotiledóneas, poseen una estructura tetracíclica derivada del ciclopentano fenantreno, son empleadas como materia prima para la síntesis de hormonas sexuales.

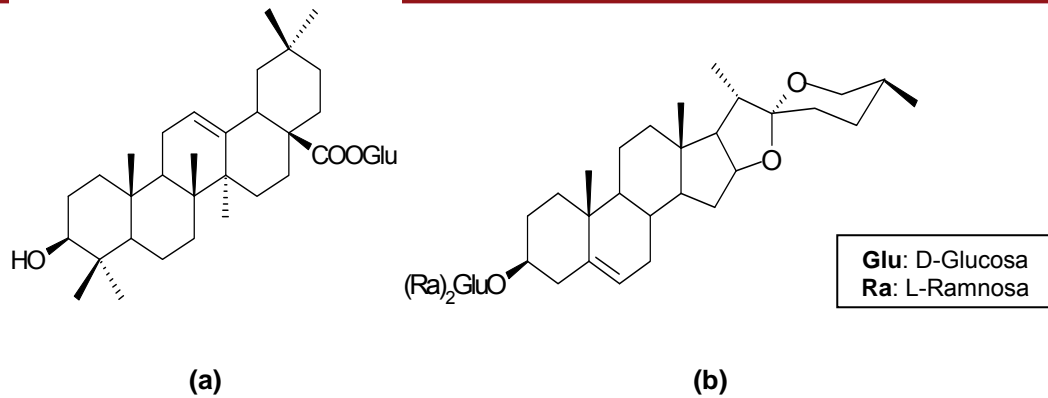


Figura 5. (a) Ejemplo de saponina triterpenoide: Ácido oleánico-D-glucopiranososa.
(b) Ejemplo de saponina esteroidal: Diosgenina-D-glucopiranososa-L-ramnopiranososa

Estas moléculas son solubles en agua y en otros solventes polares de bajo peso molecular como metanol y etanol. Se caracterizan por producir abundante espuma en solución acuosa [25]. Poseen propiedades tensoactivas o surfactantes, producen efectos hemolíticos, son tóxicas para animales de sangre fría y forman complejos con las proteínas y el colesterol [11].

Se han reportado distintas actividades biológicas atribuidas a las saponinas, entre las que destacan: hemolítica, insecticida, antiparasitaria, antimicótica y anticancerígena. Debido a ello, las saponinas cuentan con una gran variedad de aplicaciones a nivel industrial (Tabla 6) [12].

Tabla 6. Uso de saponinas en la industria [12]

Campos de uso	Efectos
Industria alimentaria	- Aditivo de alimentos (mejora la conversión de alimentos y reduce el nivel de colesterol) - Emulsificante de alimentos
Medicina	- Vacunas humanas (adyuvante en vacunas para la hepatitis B y melanomas) - Hipocolesterolémico (reduce el colesterol) - Análisis de sangre (conteo de glóbulos blancos)
Agricultura y ganadería	- Insecticida natural para cultivos
Cosmética	- Medio dispersante para la disolución de aceites esenciales

La bioactividad de las saponinas está asociada a la molécula en su conjunto; es decir, a la parte glicona y aglicona, las cuales al parecer actúan sinérgicamente [26]. Estudios de la inhibición de ingesta, conocida también como actividad deterrente, sobre el insecto *Spodoptera litura* después del tratamiento con saponinas triterpenoides presentes en las especies *Diploknema butyracea* y *Sapindus mukorossi* permitieron confirmar que la molécula de azúcar unida selectivamente a la aglicona produce una actividad insecticida más alta que la producida por su parte aglicona aislada. La glicosilación genera que las agliconas apolares sean solubles en agua, facilitando su ingestión. Para alcanzar una óptima bioactividad, se debe conseguir un apropiado balance hidrofílico-lipofílico, el cual es obtenido cuando la parte glicona está comprendida solo por un número pequeño de unidades de monosacáridos.

Las saponinas presentes en el grano de quinua son básicamente del tipo triterpenoide. Se encuentran en la membrana externa del grano, conocida como pericarpio. Por su toxicidad, protegen a la planta contra aves e insectos y son las causantes del sabor amargo del grano [27]. Se han reportado la existencia de hasta diez diferentes tipos de saponinas presentes en granos de quinua (Figura 6), entre las que destacan las saponinas del ácido oleánico, hederagenina y ácido fitolacagénico [28].

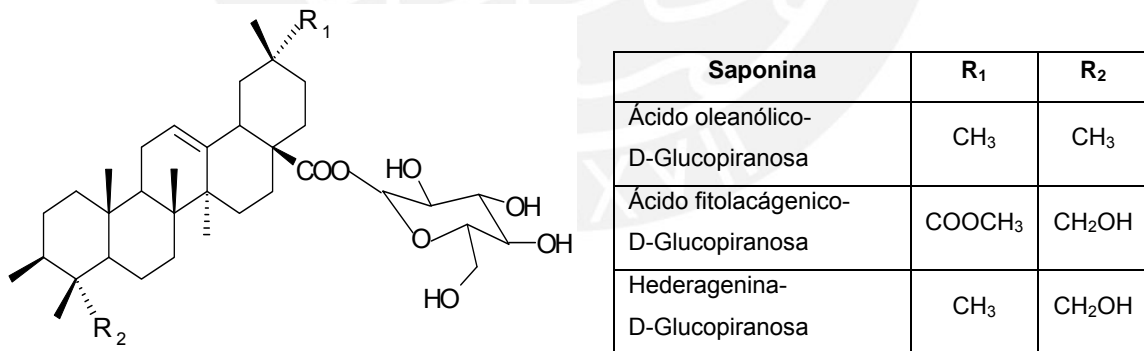


Figura 6. Principales saponinas presentes en los granos de quinua

1.1.2. Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet)

1.1.2.1. Taxonomía

La clasificación actual de la planta en estudio se muestra a continuación [29]:

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Fenerógama
CLASE	Dicotiledonea
ORDEN	Fabales
FAMILIA	Fabaceae
GÉNERO	<i>Lupinus</i>
ESPECIE	<i>Lupinus mutabilis</i>
NOMBRE COMÚN	Tarwi

1.1.2.2. Origen

El tarwi es una leguminosa originaria de los Andes de Bolivia, Ecuador y Perú. Ha sido cultivada en el área andina desde épocas preincaicas. A pesar de su gran valor nutritivo y resistencia a factores climáticos adversos en las zonas donde se siembra, el cultivo y consumo de esta especie está disminuyendo progresivamente debido a la falta de difusión de sus formas de uso y a la promoción de su consumo. Otro factor que afecta su consumo es el fuerte sabor amargo que caracteriza a sus granos, debido a su alto contenido de alcaloides. Por esta razón, se requiere de un proceso de lavado previo a su consumo para eliminar dichas sustancias; esto constituye una desventaja frente a otras leguminosas introducidas [30].

1.1.2.3. Descripción botánica

El tarwi es una planta anual que crece desde los 1500 m.s.n.m. (Figura 7), se desarrolla en valles templados y áreas altoandinas; y es muy resistente al ataque de insectos.

Es una leguminosa herbácea erecta. Presenta una raíz pivotante profunda que puede extenderse hasta los 3m de profundidad. Su tallo es robusto y leñoso, alcanzando una altura de 0,5 a 2m. Sus hojas están compuestas generalmente por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. La inflorescencia presenta una corola grande de 1 a 2cm, con cinco pétalos. El color de sus flores varía desde azul a morado. Las semillas están incluidas en una vaina y varían de forma (redonda, ovalada a casi

cuadrangular), miden de 0,5 a 1,5cm. Los colores del grano incluyen blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón [29].



Figura 7. Planta de *Lupinus mutabilis* Sweet

Fuente: Kress,H. (2009). Base de datos de flores, árboles y hojas [fotografía].

Tomado de: <http://www.henriettesherbal.com/>. Revisado: 21/08/2010

1.1.2.4. Valor nutritivo

El análisis bromatológico de este grano muestra su alto valor nutricional (Tabla 7):

Tabla 7. Valores nutricionales del grano de tarwi [29]

Parámetro	% Peso (p/p)
Proteínas	44,3
Humedad	7,7
Carbohidratos	28,2
Fibras	7,1
Cenizas	3,3
Grasas	16,5

Su alto contenido de proteínas y grasas, incluso mayores que los de la soja, lo hacen una planta de gran interés para la nutrición humana y animal. Se ha encontrado correlación positiva entre el contenido de proteína y alcaloides; y correlación negativa, entre proteína y aceite [30]. Los principales ácidos grasos presentes en el grano de tarwi son: palmítico (13%), oleico (40%) y linoleico (37%), siendo éste último esencial para el ser humano [29].

1.1.2.5. Alcaloides en tarwi

Las semillas de tarwi ocupan uno de los primeros lugares entre los alimentos nativos con elevado contenido de proteínas y aceites a nivel mundial. Sin embargo, el grano requiere un tratamiento previo a su consumo para eliminar las sustancias antinutricionales que contiene, tales como alcaloides. Se han reportado la existencia de diferentes tipos de alcaloides quinolizidínicos presentes en granos de tarwi (Figura 8), entre los que destacan: esparteína, lupinina y lupanina; los cuales se emplean para controlar ectoparásitos y parásitos intestinales de animales [31].

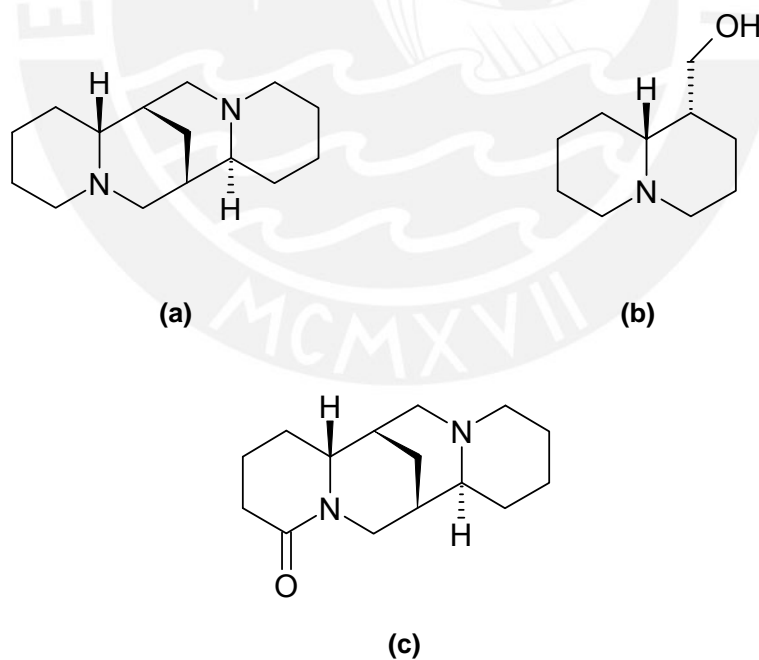


Figura 8. Principales alcaloides presentes en los granos de tarwi. (a) Esparteína. (b) Lupinina. (c) Lupanina

1.1.3. Molle (*Schinus molle* L.)

1.1.3.1. Taxonomía

La clasificación actual de la planta en estudio se muestra a continuación [32]:

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Fenerógama
CLASE	Dicotiledonea
ORDEN	Sapindales
FAMILIA	Anacardiaceae
GÉNERO	<i>Schinus</i>
ESPECIE	<i>Schinus molle</i>
NOMBRE COMÚN	Molle

1.1.3.2. Origen

El molle es oriundo de los valles interandinos del centro del Perú. Se encuentra de forma endémica, desde el sur de México hasta el norte de Chile y centro de Argentina, especialmente en el Perú [32].

1.1.3.3. Descripción botánica

El molle es un árbol de varios metros de altura que crece tanto de manera silvestre como cultivada en zonas secas de la costa, sierra y parte de la Amazonía, desde el nivel del mar hasta los 3500 m.s.n.m. (Figura 9).

Presenta un sistema radical extendido y superficial. Su tronco es nudoso y rugoso, alcanzando una altura de 4 a 15m. Presenta una copa redonda y abierta, con hojas pecioladas y alternadas, terminadas en punta. Sus flores son muy pequeñas, de color blanquecino o amarillento, y están dispuestas en un gran número en panículas colgantes terminales y axilares. Sus frutos son de color rojo, una vez secos se asemejan a granos de pimienta. Este fruto contiene una sustancia colorante y un aceite esencial, el cual produce una resina fragante, impregnada de trementina [33].



Figura 9. Planta de *Schinus molle* L.

Fuente: Blog de Vida y Salud MEIQE (2008) [fotografía]. Tomado de: <http://www.meiqe.com/10/el-molle/>. Revisado: 06/07/2010

1.1.3.4. Aceite esencial de molle

El aceite esencial de molle constituye una fuente rica de monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos, los cuales se emplean en perfumería y como fungicidas naturales. El aceite esencial de esta planta se encuentra principalmente en las hojas y en los frutos. Las hojas pueden contener hasta 2% de aceite esencial; mientras que los frutos, hasta 5%. El aceite esencial de *Schinus molle* está compuesto principalmente por: β -mirceno (30,1%), α -felandreno (26,4%), β -pineno (13,5%), α -pineno (11,9%), limoneno (9,9%) y β -felandreno (5,7%), entre otros [33].

1.1.4. Muña (*Minthostachys mollis* Griseb.)

1.1.4.1. Taxonomía

La clasificación actual de la planta en estudio se muestra a continuación [34]:

REINO	Vegetal
DIVISIÓN	Fenerógama
CLASE	Dicotiledonea
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Lamiaceae
GÉNERO	<i>Minthostachys</i>
ESPECIE	<i>Minthostachys mollis</i>
NOMBRE COMÚN	Muña

1.1.4.2. Origen

La muña es oriunda de la sierra peruana. Su cultivo es muy difundido en las regiones andinas, especialmente en Apurímac, Ayacucho, Cuzco, Huancavelica y Puno, donde se la conoce con diversos nombres como huaycho, coa o ismuña [34].

1.1.4.3. Descripción botánica

La muña es una planta arbustiva que crece entre los 2500 a 3500 m.s.n.m. (Figura 10). Este arbusto es frondoso en la parte superior; erecto y pubescente. Su tallo es ramificado desde la base y alcanza de 80 a 120cm de altura. Posee hojas pequeñas. Sus flores son blancas y se encuentran reunidas en cortos racimos [35].



Figura 10. Planta de *Minthostachys mollis* Griseb.

Fuente: Revista Generación (2008) [fotografía]. Tomado de: <http://www.generacion.com/>. Revisado: 09/08/2010

1.1.4.4. Aceite esencial de muña

El aceite esencial del muña se emplea para combatir parásitos, como piojos y pulgas; así como la gusanera de papas y maíz; la babosa de hortalizas y los piojos del repollo. El aceite esencial de muña está compuesto principalmente por monoterpenos, tales como: pulegona (19,3%), mentona (18,4%), carvona (1,7%); además se han reportado la presencia de limoneno, α -pineno, β -pineno, ácido piperínico, mentol, eucaliptol, entre otros [35, 36].

1.2. Especies animales en estudio

1.2.1. Garrapata (*Boophylus microplus*)

1.2.1.1. Definición

Las garrapatas son artrópodos ectoparásitos hematófagos pertenecientes, a la clase arácnida y al orden acari. Actualmente, se encuentran ampliamente distribuidas en las áreas tropicales, subtropicales y templadas del planeta, ocasionando enormes pérdidas en la ganadería a nivel mundial.

Estos ácaros se alimentan de sangre para sobrevivir y reproducirse. Poseen un aparato bucal capaz de perforar la piel y succionar la sangre, pudiendo ingerir hasta 3mL de sangre por ciclo de vida (Figura 11) [37].

Son capaces de transmitir numerosas enfermedades a través de su saliva o deposición. Las garrapatas son responsables de la enfermedad de Lyme o Borreliosis y de la enfermedad de Babesiosis. La primera, ocasiona decaimiento y falta de apetito, en animales; mientras que en personas, ocasiona síntomas parecidos a los de la gripe, además de trastornos de audición y visión. La segunda, se caracteriza porque entre sus síntomas se incluyen anemia grave y pérdida de sangre por orina, pudiendo ocasionar la muerte del animal [38].

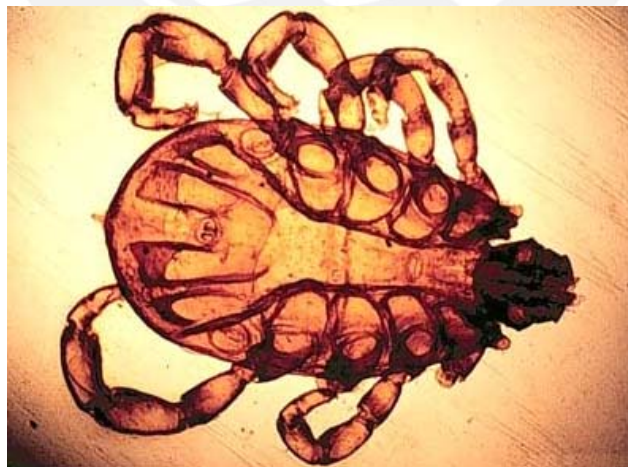


Figura 11. *Boophylus microplus* (adulto)

Fuente: NCDENR USA (2004) [imagen]. Tomado de:

http://www.deh.enr.state.nc.us/phpm/Ticks_spn_9-8-04.pdf. Revisado: 13/07/2010

1.2.1.2. Tipos

Las garrapatas se dividen en dos tipos según la familia a la que pertenecen [37]:

- *Garrapatas duras*: Pertenecientes a la familia ixodidae, su cuerpo está protegido por un caparazón y atacan a numerosos mamíferos, incluso al hombre.
- *Garrapatas blandas*: Pertenecientes a la familia argasidae, no poseen caparazón y atacan mayormente a aves.

1.2.1.3. Ciclo de vida

Durante su desarrollo, las garrapatas atraviesan períodos exclusivamente como parásitos, así como de vida libre en el suelo. Presentan cuatro etapas de crecimiento: huevo, larva, ninfa y adulto (Figura 12).

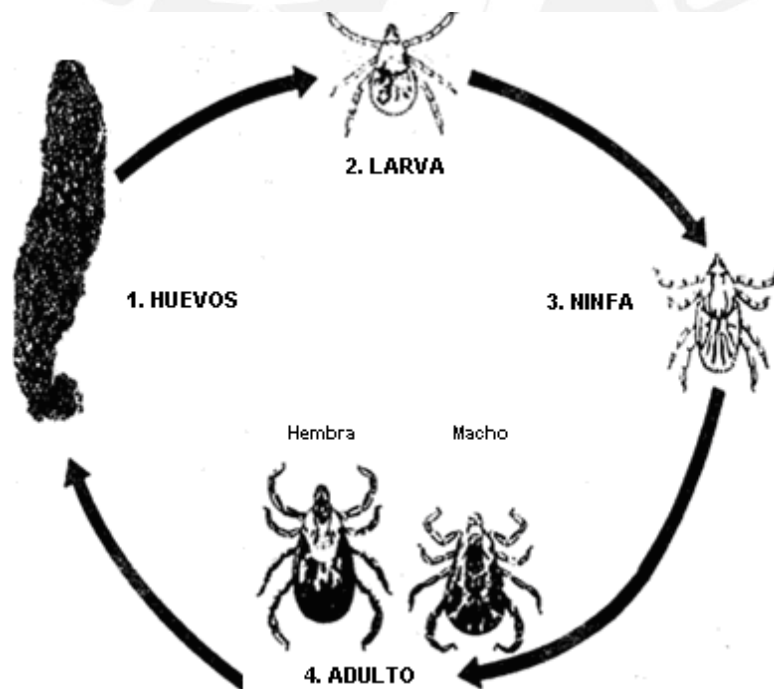


Figura 12. Etapas de crecimiento de la garrapata

Fuente: NCDENR USA (2004) [imagen]. Tomado de:

http://www.deh.enr.state.nc.us/phpm/Ticks_spn_9-8-04.pdf. Revisado: 13/07/2010

El ciclo de vida de una garrapata de un solo huésped se inicia con la eclosión del huevo (Figura 13). Después de emerger del huevo, la larva busca un animal del cual alimentarse (huésped), se alimenta y pronto se incorpora a la etapa de ninfa. La ninfa repleta de sangre se desarrolla en adulto, produciéndose la diferenciación de sexos, seguida de la fecundación de la hembra adulta. Si ésta no es removida, seguirá unida al huésped por 5 a 7 días más. Después de alimentarse, la hembra cae del huésped. Una semana después, pone alrededor de 3000 huevos y muere. Los huevos nacen después de una semana, volviéndose a iniciar el ciclo. El total del ciclo dura aproximadamente 45 días [39].

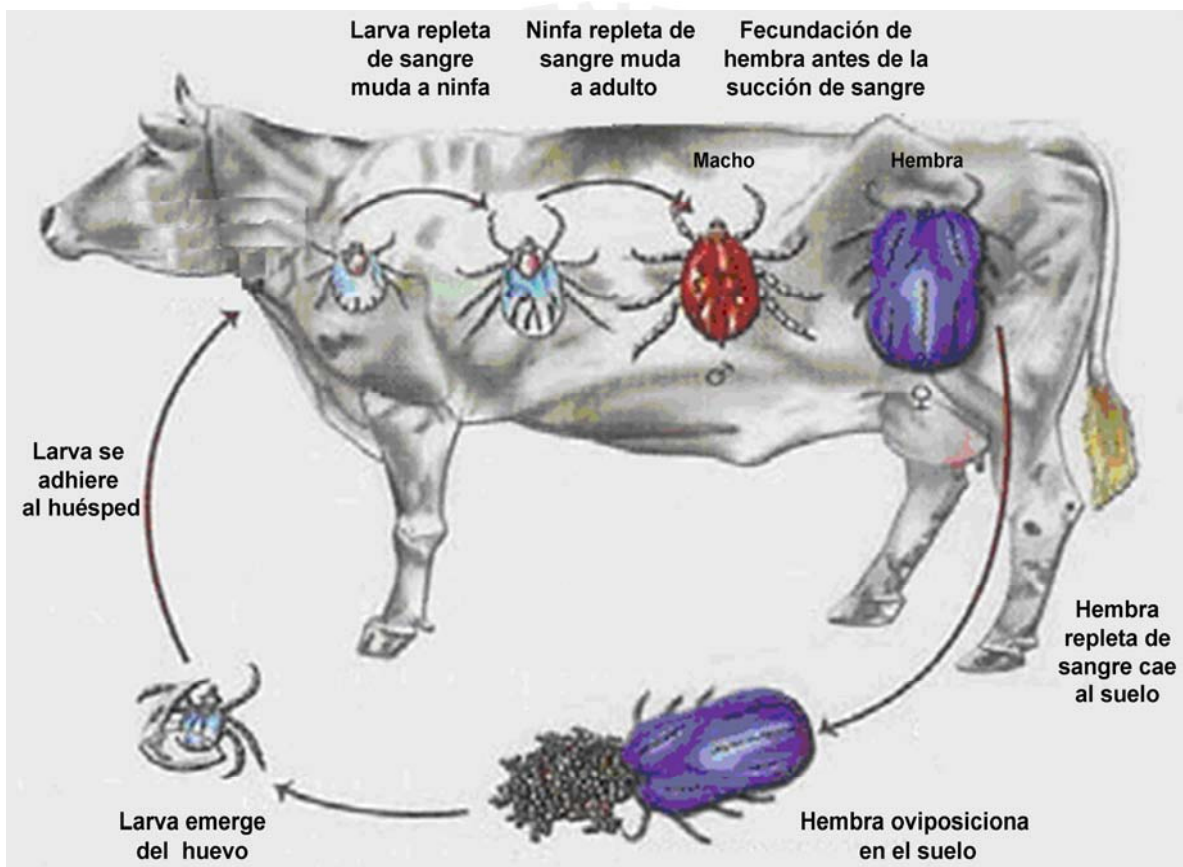


Figura 13. Ciclo de vida de la garrapata

Fuente: Sanidad Animal BAYER México (2004) [imagen]. Tomado de:

<http://www.bayersanidadanimal.com.mx>. Revisado: 13/07/2010

1.2.2. San Antonio (*Epilachna paenulata*)

Artrópodo perteneciente a la clase insecta, orden coleóptera y familia Coccinellidae. Actualmente se encuentra distribuido en gran parte de Sudamérica: Argentina, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Uruguay. Ataca específicamente cultivos de cucurbitáceas (zapallo, zapallito, sandía, melón, pepino y calabaza), ocasionando serios problemas en la agricultura [1].

La hembra deposita entre 40 y 50 huevos en el envés de la hoja, colocándolos en grupos y en posición vertical. Los huevos son alargados y de color amarillento. Después de una semana emergen las larvas, las cuales tienen seis patas y gran movilidad, son de color amarillento con algunas manchas oscuras y abundantes pelos ramificados en el dorso. Las larvas mudan tres veces antes de convertirse en pupas; estas últimas, se adhieren a las hojas, tallos o rocas y son de color anaranjado y negro. De las pupas emergen los adultos sin tener aún definidos sus colores característicos, los cuales aparecen unas pocas horas después. El adulto mide de 8 a 10mm de largo, su cuerpo es hemisférico, con cabeza negra y antenas amarillentas. El protórax es negro con márgenes amarillentos y los élitros son amarillentos con 8 manchas negras (Figura 14) [40].



Figura 14. *Epilachna paenulata* (adulto)

Fuente: Gónzales, G. (2009). Los coccinellidae de Argentina [fotografía]. Tomado de:

http://www.coccinellidae.cl/paginasWebArg/Paginas/Epilachna_paenulata_Arg.php. Revisado: 26/04/2010

1.2.3. Rosquilla Negra (*Spodoptera littoralis*)

Artrópodo perteneciente a la clase insecta, orden lepidóptera y familia Noctuidae. Actualmente se encuentra distribuido principalmente en zonas del litoral Mediterráneo y el sur de España. Es una especie altamente polífaga y migratoria. Afecta principalmente a cultivos hortícolas y ornamentales, ocasionando serios problemas en la agricultura. Presenta notables fluctuaciones en sus poblaciones, alcanzando el máximo en septiembre-octubre, con tres generaciones al año. Recibe el nombre de Rosquilla Negra, por el color oscuro de la larva y por la costumbre de permanecer enroscada en el suelo durante el día [3].

Pasan el invierno como pupas en el suelo, dentro de un capullo terroso. Los adultos aparecen en primavera, poseen una envergadura alar de 3 a 4,5cm y son de color marrón claro con múltiples manchas (Figura 15b). Los adultos realizan la puesta de huevos en el envés de las hojas. Los huevos son casi esféricos y de color amarillento, se encuentran distribuidos en grupos y están cubiertos de pelos o escamas. Las larvas emergen de los huevos, su color varía de gris a pardo, se enrollan en espiral y se ocultan durante el día en el suelo o entre las hojarasca (Figura 15a). Las larvas completan su desarrollo en 3 semanas, convirtiéndose en pupas [41].



(a)



(b)

Figura 15. *Spodoptera littoralis*. (a) Larva. (b) Adulto

Fuente: DGPA España (2009) [fotografía]. Tomado de:

<http://dgpa.besana.es/agentes/info.descripcion.do?id=13>. Revisado: 26/04/2010

Por lo expuesto, las especies vegetales en mención presentan importantes propiedades nutricionales debido a su alto contenido de proteínas, ácidos grasos y aceites, contando en muchos casos con componentes esenciales para el ser humano. Además, todas ellas son plantas de ancestral uso pesticida lo cual ha generado nuestro interés en evaluar su bioactividad sobre insectos y ácaros, comparándolas frente a pesticidas sintéticos; e investigar las características proteicas de las harinas de quinuas desaponificadas, buscando para ellas, aplicación alimenticia y dándoles valor agregado.



II. PARTE EXPERIMENTAL

La liofilización de los extractos crudos de quinua y tarwi fue realizada en los laboratorios de la Universidad Nacional Agraria de la Molina - INDDA. Los estudios de bioactividad y el análisis de GC-MS de los aceites esenciales de molle y muña fueron realizados en el Laboratorio de Ecología Química de la Universidad de la República de Uruguay. Los estudios de composición proteica de las variedades de quinua fueron realizados en el Laboratorio de Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile.

2.1. Equipos

Universidad Nacional Agraria de la Molina - INDDA:

Liofilizador, LABCONCO

Pontificia Universidad Católica del Perú:

Verificador de disolución, VK 7020/7025

Hidrodestilador, Adam AQT 2600

Lámpara UV/VIS, Perkin Elmer

Espectrofotómetro IR, Perkin Elmer

Espectrofotómetro UV/VIS, Lambda 2 Perkin Elmer

Cromatógrafo de gases, HP - 5890 II

Universidad de la República de Uruguay y Universidad de Chile:

Cromatógrafo de gases acoplado a masas, QP 2010 Plus

Termobalanza, Boeco Germany

Tamizador de 50 mesh, Erweka

pHmetro, HANNA

Microcentrifuga, HERMLE Z160M

Agitador vortex, Thermolyne Maxi MixII 37600 Mixer

Equipo para electroforesis, Bio - Rad

2.2. Reactivos

Se emplearon reactivos, ácidos y solventes de las marcas Merck y J. T. Baker, sin purificación previa:

Reactivos:

Sulfato de sodio anhidro, bromuro de potasio, TWEEN 20, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, SDS, TEMED, amoníaco, cloruro férrico, nitrato de bismuto pentahidratado, yoduro de potasio, bicloruro de mercurio, sulfato de potasio anhidro, azul brillante de Coomasie G-250, TRIS, glicerol, acrilamida, bis-acrilamida, anhídrido acético, sulfato de cobre pentahidratado, glicina, azul de bromofenol, 2-ME, PSA, azul de Coomassie R., Amitraz (acaricida concentrado emulsionable 80%, Amitrec)

Ácidos:

Clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético glacial, perclórico, nítrico.

Solventes:

Cloroformo, éter de petróleo, hexano, etanol absoluto, metanol absoluto, éter etílico, tolueno, propanol.

Estándares:

Estándar de ácidos grasos, estándar del índice de Kovats, estándar de proteína BSA, estándar de proteínas de pesos moleculares de rango medio (Sigma)

2.3. Selección de las especies vegetales en estudio

Se seleccionaron cuatro variedades amargas de *Chenopodium quinoa* Willd (*Chenopodiaceae*, quinoa) para asegurar alto contenido de saponinas y comprobar el carácter promisorio de estos recursos vegetales subestimados. Las muestras fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma, Cultivos Andinos INIA, Cuzco. Corresponden a las variedades: Amarillo Sacaca, Amarillo Maranganí, Markjo y Zolapozada. Además, se seleccionaron las siguientes especies: *Lupinus mutabilis* Sweet (*Fabaceae*, tarwi), *Schinus molle* L. (*Anacardiaceae*, molle) y *Minthostachys*

mollis Griseb. (*Lamiaceae*, muña); siendo estas dos últimas, plantas aromáticas de ancestral uso insecticida y acaricida.

2.4. Obtención de extractos crudos de quinua y tarwi para el estudio de su bioactividad

Se pesó 50g de cada variedad de quinua, adicionándose 500mL de agua destilada en cada caso. Las mezclas se mantuvieron bajo agitación constante durante tres horas en el verificador de disolución (Figura 16); siendo las condiciones de extracción: 25°C, 200 RPM. Las soluciones obtenidas fueron sometidas a filtración simple, obteniéndose soluciones ricas en saponinas; éstas produjeron abundante espuma y presentaron coloraciones amarillo - naranja intensas. De la misma forma, se pesó 50g de tarwi y se adicionó 500mL de agua destilada. La mezcla fue llevada a extracción acuosa en caliente durante una hora, la solución resultante fue sometida a filtración simple; obteniéndose una solución rica en alcaloides de color amarillo pálido. Finalmente, todas las soluciones fueron liofilizadas, obteniéndose extractos crudos en cada caso (Figura 17)



Figura 16. Verificador de disolución empleado para la obtención de extractos crudos de quinua

Fuente: Zegarra, G. (2009) [fotografía]



Figura 17. Extractos crudos de quinua y Tarwi

Fuente: Zegarra, G. (2009) [fotografía]

2.5. Caracterización química de los extractos crudos de quinua y tarwi

2.5.1. Marcha fitoquímica

Se disolvió 0,2g de cada uno de los extractos crudos en 100mL de agua destilada. Se analizó la presencia de posibles compuestos químicos en cada una de las soluciones obtenidas siguiendo el método descrito por Lock [42]. Los compuestos analizados fueron los siguientes: esteroides / triterpenoides, alcaloides, quinonas, flavonoides, taninos, leucoantocianidinas, saponinas y cumarinas.

La metodología para la marcha fitoquímica se halla esquematizada en el ANEXO 1. Las diferentes soluciones obtenidas fueron sometidas a la identificación de compuestos químicos presentes en ellas mediante reacciones de coloración y/o de precipitación características, empleando para ello reactivos estandarizados. La metodología para la preparación de los reactivos se presenta en el ANEXO 2.

2.5.2. Espectroscopía UV/VIS e IR

Los extractos crudos fueron analizados en los espectrofotómetros UV/VIS e IR. Para el análisis UV/VIS se pesó 10mg de cada extracto crudo y se disolvió en 2mL de agua destilada; mientras que para el análisis IR, cada extracto crudo fue mezclado con bromuro de potasio en la proporción 1:10 (extracto:KBr), formándose una pastilla en cada caso. Finalmente se procedió a la lectura de las muestras.

2.6. Obtención de aceites esenciales de molle y muña para el estudio de su bioactividad

La metodología usada para la obtención de aceites esenciales considera las muestras con una humedad de 15 a 20% al momento de ejecutar la extracción. Se utilizó el método de arrastre a vapor. En cada caso, se colocó agua en el compartimento inferior del equipo, manteniéndolo en contacto con la fuente de calor. Se colocó el material vegetal haciendo uso de una repisa metálica con fondo perforado en el espacio superior del equipo. Se procedió a tapar el reactor mediante una tapa con sello de agua asegurándose que la salida de gases estuviera en contacto con el condensador y el vaso receptor. Se inició al calentamiento logrando que el agua alcance la temperatura de ebullición. El vapor de agua cruza la malla divisoria y contacta al material vegetal. Cuando éste alcanza alta temperatura, los componentes volátiles emergen del material vegetal y son arrastrados por el vapor hacia el condensador; ambos, agua y aceite esencial, en el estado líquido son colectados en el vaso receptor. La mezcla fue separada en una pera de decantación, eliminando la fase acuosa y reservando la orgánica, la cual fue secada sobre sulfato de sodio anhidro.

Finalmente se midió la densidad relativa a 20°C de los aceites esenciales de molle y muña obtenidos, para lo cual se utilizó un picnómetro de 20mL, permitiéndonos medir la densidad de cada muestra en referencia al agua.

2.7. Caracterización química de los aceites esenciales de molle y muña

Las muestras fueron solubilizadas en cloroformo (10 μ L aceite esencial / 1mL cloroformo) y analizadas en el cromatógrafo de gases acoplado a masas a las siguientes condiciones: Columna DB5, temperatura del inyector 250°C, temperatura del detector 300°C, temperatura de la columna 60°C (1min) / 2°C / min / 200°C / 20°C / min / 280°C (1min), detector FID, gas transportador He, flujo 1mL / min, split 1:100, volumen inyectado 1 μ L.

Los porcentajes de área y los tiempos de retención de cada uno de los componentes de los aceites esenciales estudiados fueron obtenidos directamente del análisis. Los índices de retención calculados fueron determinados aritméticamente en base al estándar del índice de Kovats (mezcla de hidrocarburos de n-alcános: 8-22). Los índices de retención teóricos, así como los porcentajes de similitud de los espectros de

masas de los compuestos analizados fueron determinados de acuerdo a la base de datos del equipo GC-MS [43].

2.8. Estudios de bioactividad

2.8.1. Actividad deterrente

La actividad deterrente de los extractos crudos y aceites esenciales fue evaluada siguiendo el protocolo descrito por Castillo *et al.* [8]. Se evaluó el parámetro de inhibición de ingesta sobre dos especies de insectos: *S. littoralis* y *E. paenulata*, empleándose placas petri (9cm x 1cm) con fondo de agar al 2%. Los insectos fueron aislados, dejándolos sin alimento por 3 horas. Cada insecto fue colocado en una placa conteniendo cuatro discos equidistantes (1cm²) de sus respectivas hojas hospederas (*C. annuum* para *S. littoralis* y *C. pepo* para *E. paenulata*) (Figura 18). Dos de los discos fueron tratados individualmente con 10µL de la muestra al 10% en su respectivo solvente, para que actúen como tratamiento. Se emplearon como solventes: etanol:agua (1:2), en el caso de los extractos crudos; y metanol, para los aceites esenciales. Los otros dos discos fueron tratados con 10µL del solvente empleado en cada caso, para que actúen como control. La actividad deterrente se midió por la observación del área de los discos consumidos después de tres horas de iniciado el ensayo. Sólo en el caso de *E. paenulata*, la observación del consumo del área de los discos fue evaluada cada 15 minutos hasta completar las tres horas. Se realizaron 5 réplicas en el caso de *S. littoralis* y 10-15 para *E. paenulata*.

Con los porcentajes del área consumida tanto para el control (%C) como para el tratamiento (%T) se obtuvo el porcentaje de inhibición de ingesta a partir de la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición de ingesta} = \left[1 - \left(\frac{\%T}{\%C} \right) \right] \times 100\%$$

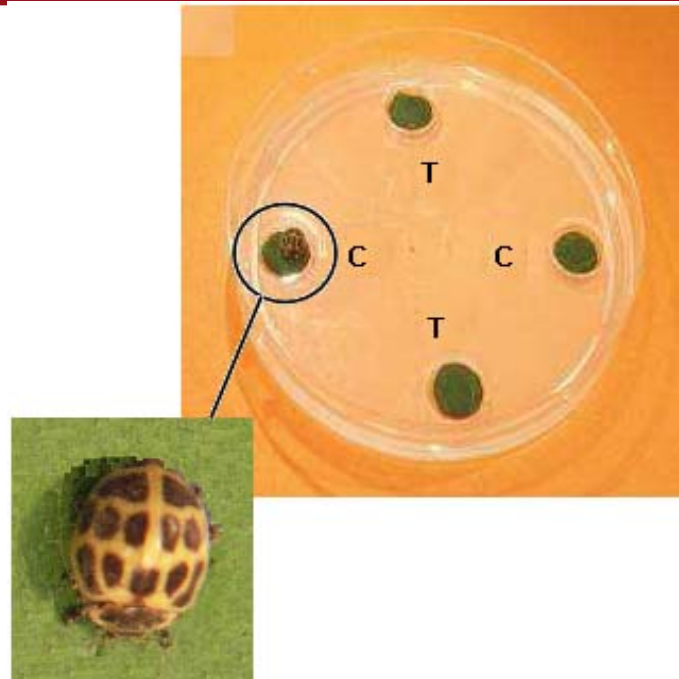


Figura 18. Evaluación de la actividad deterrente sobre *E. paenulata*

Fuente: Zegarra, G. (2009) [fotografía]

2.8.2. Actividad acaricida

La actividad acaricida de los extractos crudos y aceites esenciales fue evaluada siguiendo el protocolo descrito por Drummond, R.; Ernst, S.; Trevino, J.; Gladney, W. y Graham, O. [44]. Se evaluaron los parámetros de oviposición y eclosión sobre hembras de garrapatas adultas ingurgitadas (teleóginas). Las cepas de teleóginas fueron proporcionadas por la División de Laboratorios Veterinarios del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca de la República Oriental del Uruguay. Se realizó un screening primario a concentraciones de 1% y 10%. Las garrapatas fueron lavadas y seleccionadas para eliminar teleóginas con daños o deformaciones. Se formaron grupos de 10 teleóginas, las cuales fueron colocadas en placas petri previamente pesadas e identificadas. Se pesaron las placas conteniendo las garrapatas, con lo cual se obtuvo el peso promedio de garrapatas. Cada grupo fue sumergido en las respectivas soluciones garrapaticidas, agitándose por un minuto. El contenido fue vertido en un colador, eliminando la solución. Las teleóginas fueron secadas con papel absorbente y colocadas nuevamente en las placas petri, las cuales se dejaron incubando durante 14 días a 27°C y 80% de humedad. El día 14 post-tratamiento (Figura 19), las garrapatas fueron retiradas y se pesaron las placas conteniendo los huevos, con lo cual se obtuvo el peso promedio de huevos. Los huevos fueron puestos

a incubar durante 25 días. El día 39 post-tratamiento, se determinó visualmente el porcentaje de eclosión de los huevos comparando la masa total de huevos eclosionados versus los no eclosionados. Posteriormente, con las muestras que mostraron mayor actividad se realizó un screening secundario a concentraciones de 5%, 10% y 15%. En todos los casos, se trabajó por duplicado y se realizaron controles empleándose TWEEN 20 al 1%. Además, se usaron como referencia soluciones del acaricida químico amitraz a todas las concentraciones estudiadas.

Con el peso promedio de huevos y garrapatas, además del porcentaje de eclosión se obtuvo el porcentaje de eficiencia reproductiva de las teleóginas y el porcentaje de eficacia del acaricida a partir de las siguientes expresiones:

$$\% \text{ Eficiencia reproductiva (Er)} = \frac{\text{peso de huevos}}{\text{peso de garrapatas}} \times \% \text{ eclosión}$$

$$\% \text{ Eficacia (E)} = \frac{\text{Er control} - \text{Er tratamiento}}{\text{Er control}} \times 100\%$$



Figura 19. Oviposición de teleóginas al día 14 post-tratamiento

Fuente: Zegarra, G. (2009) [fotografía]

2.9. Caracterización química de las variedades de quinua

2.9.1. Determinación del contenido de proteína total

La determinación del contenido de proteína total de las variedades de quinua se realizó mediante el método de Kjeldahl descrito en la norma ISO.5983 [45], el cual se muestra en el ANEXO 3. Éste método se basa en la oxidación de la materia orgánica de la muestra a través de una digestión con ácido sulfúrico concentrado y calor. Producto de esta digestión se forma sulfato de amonio, el cual se convierte en amoniaco en presencia de exceso de hidróxido de sodio. El amoniaco obtenido es destilado, determinándose el nitrógeno total de la muestra mediante retrotitulación. El factor de conversión de nitrógeno empleado para obtener el contenido proteico total fue 6,25.

2.9.2. Determinación de ácidos grasos

Las variedades de quinua en estudio fueron desaponificadas, secadas, molidas (molino de bolas) y tamizadas (malla de 50 mesh). Las harinas obtenidas del proceso anterior fueron desengrasadas con éter de petróleo; contando así, con fracciones lipídicas de cada una de las muestras. La determinación y cuantificación de los ácidos grasos presentes en las fracciones lipídicas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lock [42]. Se pesó 100mg de la fracción lipídica y se la colocó en un vial. Se agregó 10mL de KOH 0,5N y se calentó a 55°C en baño maría por 20 minutos. Se agregó 5mL de HCl 1:1 hasta alcanzar un pH = 2. La solución obtenida fue extraída con éter de petróleo (1 x 10mL). Se lavó la solución etérea con agua destilada (1 x 10mL); ésta fue secada con sulfato de sodio anhidro, filtrada y concentrada bajo atmósfera de nitrógeno gaseoso. El residuo etéreo obtenido fue redisolto en 10mL de HClO₄ 5% en metanol y calentado a 55°C en baño maría por 5 minutos. La solución fue nuevamente extraída con éter de petróleo (1 x 10mL). Se lavó la solución etérea con agua destilada (1 x 5mL). Posteriormente, ésta fue secada, filtrada y concentrada bajo atmósfera de nitrógeno gaseoso. El extracto obtenido fue redisolto en 1mL de éter de petróleo. Se trabajaron todas las muestras por triplicado.

Finalmente, las muestras fueron analizadas en el cromatógrafo de gases a las siguientes condiciones: Columna DB-225, Temperatura del inyector 250°C, Temperatura del detector 250°C, Temperatura de la columna 70°C (1min) / 10°C / min / 180°C / 3°C / min / 220°C (5min), detector FID, gas transportador He, flujo 1mL / min,

split 1:100, volumen inyectado 1 μ L. Se confrontaron las señales frente a estándares Sigma.

2.10. Obtención de harinas de quinua desengrasadas para el estudio de sus proteínas

Se lavó manualmente 50g de cada variedad de quinua con agua a temperatura ambiente hasta asegurar la remoción total de saponinas (Figura 20a). Los granos fueron secados en una estufa a 50°C hasta alcanzar una humedad del 15%, la cual fue ajustada empleando una termobalanza (Figura 20b). Posteriormente, los granos fueron molidos empleando un molino cuchillo-martillo. Las harinas obtenidas fueron tamizadas sobre malla de 50 mesh y desengrasadas con hexano en la proporción 1:10 (harina:hexano) durante 4 horas, en agitación constante y refrigeración. Las soluciones resultantes fueron filtradas al vacío. Finalmente, se dejó evaporar el solvente remanente en las harinas a temperatura ambiente y estas fueron homogenizadas utilizando un mortero para uniformizar el tamaño de las partículas.



Figura 20. (a) Lavado manual de los granos de quinua (b) Termobalanza para el ajuste de humedad de los granos de quinua

Fuente: Zegarra, G. (2009) [fotografía]

2.11. Obtención de extractos acuosos proteicos a partir de harinas de quinua desengrasadas

Se pesó 1g de harina desengrasada de cada variedad de quinua y se agregó agua en la proporción 1:7,5 (harina:agua), manteniéndose las mezclas en agitación constante. El pH de cada mezcla fue ajustado a 9 con NaOH 1N. Una vez estabilizado el pH, las mezclas se mantuvieron en agitación constante durante una hora. Posteriormente, las soluciones obtenidas a temperatura ambiente se agitaron a 14 000 rpm durante 30 minutos en microcentrífuga. Se separaron los sobrenadantes, obteniéndose así los extractos acuosos proteicos (Figura 21). Se trabajó de la misma forma a pH 10 y 11.



Figura 21. Extractos acuosos proteicos a pH 9, 10 y 11

Fuente: Zegarra, G. (2009) [fotografía]

2.12. Caracterización bioquímica de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua

2.12.1. Determinación del contenido de proteína soluble

La determinación del contenido de proteína soluble de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua se realizó siguiendo el método descrito por Bradford [46], el cual se muestra en el ANEXO 4. Este método se basa en la unión del colorante hidrofóbico azul brillante de Coomassie G-250 a las proteínas. En presencia de ácido fosfórico, la disolución acuosa del colorante presenta un color pardo, el cual se torna azul al entrar en contacto con el entorno hidrofóbico del interior de las proteínas. La

formación del complejo colorante-proteína permite su determinación espectrofotométrica a 595nm.

La metodología para la preparación del colorante azul brillante de Coomassie G-250 y del estándar de proteína BSA empleados en el análisis se muestra en el ANEXO 5.

2.12.2. Electroforesis PAGE

La electroforesis PAGE es una técnica empleada para la separación de proteínas según su movilidad en presencia de un campo eléctrico. Esta técnica se realiza en función del estado de las proteínas a lo largo del proceso electroforético; pudiendo ser este, nativo o desnaturizado [47].

En el primer caso, no se altera la conformación nativa de las proteínas, con lo cual se mantiene la estructura tridimensional (secundaria, terciaria y cuaternaria) de las mismas. Las proteínas son separadas en función de su carga, tamaño y forma; permitiéndonos identificar el número de especies polipeptídicas presentes [47, 48].

En la electroforesis desnaturizante, las proteínas son sometidas a un agente desnaturante (detergente aniónico SDS). El SDS genera el desplegamiento de las proteínas, con lo cual estas pierden su conformación nativa y adoptan una forma semejante; además, adquieren una carga negativa uniforme [47, 48]. Debido a ello, las proteínas son separadas únicamente en función de su tamaño; permitiéndonos identificar el perfil polipeptídico en condiciones desnaturantes en presencia o no de un agente reductor (2-ME), que tiene la función de romper los puentes disulfuros presentes en estas especies, y calcular los pesos moleculares de cada una de ellas.

Electroforesis PAGE desnaturizante (PAGE-SDS):

Algunas proteínas cuentan con puentes disulfuro (S-S) entre los residuos de cisteína de una misma cadena polipeptídica (puentes intracatenarios) o de diferentes cadenas polipeptídicas (puentes intercatenarios). Estos puentes pueden romperse mediante el tratamiento con determinados agentes reductores como el 2-ME. Bajo estas condiciones, la PAGE-SDS muestra un cambio en el patrón electroforético debido a que las proteínas unidas mediante puentes disulfuro se disocian en proteínas de menor masa molecular [48].

La metodología descrita para la preparación de muestras y reactivos para la electroforesis PAGE-SDS se muestra en el ANEXO 6.

La caracterización bioquímica de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli [49]. Se armó el soporte de preparación de los geles. Se lavó las placas de vidrio que sostienen los geles y se las colocó en el equipo de electroforesis. Se prepararon los geles de separación y concentración de acuerdo a la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones empleadas para la preparación de geles de separación y concentración

Reactivos	Volumen (μL)	
	Gel de separación	Gel de concentración
Agua	2 182	4 200
Acrilamida / bis-acrilamida	4 008	1 000
Buffer de gel de separación / concentración con SDS	2 600	760
SDS 10%	100	60
PSA	100	60
TEMED	10	6

En cada caso, se mezclaron los reactivos anteriormente descritos bajo agitación constante. Se colocó aproximadamente 3,5mL del gel de separación entre los vidrios utilizando una micropipeta. Se cubrió la superficie con alcohol para eliminar cualquier burbuja existente. Se dejó secar el gel por media hora, retirándose posteriormente la capa de alcohol. Se lavó con agua destilada y se secó con papel absorbente. Luego, se colocó aproximadamente 1,5mL del gel de concentración sobre el gel de separación formado. Se colocó el peine creando los bolsillos de carga de la muestra. Se dejó secar el gel por una hora y media. Se retiró el peine y se colocaron los vidrios conteniendo el gel en la cámara de corrida. Se agregó el buffer de corrida con SDS hasta cubrir los electrodos. Se cargó el estándar de proteínas y cada una de las muestras, conectándose la cámara a la fuente de poder y corriéndose las muestras a 200 voltios por aproximadamente 50 minutos (Figura 22). Finalmente, se retiraron los vidrios, se sacó cuidadosamente el gel y se lo colocó en una placa petri conteniendo solución colorante. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 12 horas. Luego,

se retiró la solución colorante y se adicionó solución decolorante. Este último proceso se repitió tres veces. Se empleó el estándar de proteínas de pesos moleculares de rango medio para el análisis correspondiente.



Figura 22. Equipo de electroforesis Bio Rad

Fuente: Zegarra, G. (2009) [fotografía]

La metodología seguida para la determinación de los pesos moleculares de las especies polipeptídicas presentes en las muestras a partir del estudio de sus perfiles electroforéticos se muestra en el ANEXO 7.

III. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

3.1. Caracterización química de los extractos crudos de quinua y tarwi

Se obtuvo 1g de extracto crudo para cada una de las variedades de quinua, alcanzando un rendimiento del 2%. En el caso del tarwi se obtuvo 2,5g, con un rendimiento del 5%. Todos los extractos presentaron consistencia sólida (polvo) y coloraciones amarillo-naranja.

3.1.1. Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica permitió reconocer los tipos de metabolitos presentes en los extractos crudos de quinua y tarwi, los cuales se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Metabolitos detectados en extractos crudos de quinua y tarwi

Metabolitos	Quinoa variedad A. Sacaca	Quinoa variedad A. Maranganí	Quinoa variedad Markjo	Quinoa variedad Zolapozada	Tarwi
Esteroides / Triterpenoides	++	+	+++	++	++
Alcaloides	-	-	+	-	+++
Quinonas	-	-	-	-	-
Flavonoides	-	-	-	-	+++
Taninos	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-
Saponinas	++	+	+++	++	-
Cumarinas fijas	-	-	-	-	-
Cumarinas volátiles	-	-	-	-	-

En base a reacciones de coloración y/o precipitación, clasificadas como:

Abundante: +++

Moderado: ++

Escaso: +

Negativo: -

Todas las variedades de quinua resultaron positivas a la presencia de triterpenoides y saponinas; siendo la variedad Markjo, la que mostró de manera cualitativa el mayor contenido de dichos metabolitos, además de resultar positiva a alcaloides. En el caso del tarwi, su extracto acuoso resultó positivo a la presencia de triterpenoides, alcaloides y flavonoides; encontrándose estos dos últimos en altas concentraciones.

3.1.2. Espectroscopía UV/VIS e IR

Los espectros UV/VIS correspondientes a los extractos crudos de quinua y tarwi se muestran en el ANEXO 8. Todos los espectros presentaron el mismo patrón, mostrando una señal de máxima intensidad a una longitud de onda de 197nm para el caso de los extractos crudos de quinua, la cual correspondería a la transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ probable de un C=O de aldehído; mientras que para el tarwi, dicha señal se presentó a 201nm y correspondería a la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$ probable de un C=O de éster o ácido. Adicionalmente, todas las muestras presentaron una señal de menor intensidad alrededor de 280nm, que correspondería a un carbonilo.

Los espectros IR de los extractos crudos de quinua y tarwi se muestran en el ANEXO 9. Todos los espectros presentaron el mismo patrón, con señales de intensidad y frecuencia similares. En todos los casos se observó una señal alrededor de 3400cm^{-1} correspondiente al alargamiento O-H de grupos hidroxilos. Asimismo, se observó una señal a 2900cm^{-1} correspondiente al alargamiento C-H de grupos metilos y una señal a 1600cm^{-1} característica del alargamiento C=O de grupos carbonilos. Las señales entre $1100\text{-}1000\text{cm}^{-1}$ corresponden al alargamiento C-O de grupos hidroxilos; mientras que las señales a 1300cm^{-1} y 1400cm^{-1} corresponden al alargamiento C-O y a la flexión O-H de grupos carboxilos, respectivamente.

3.2. Caracterización química de los aceites esenciales de molle y muña

El aceite esencial de molle es un líquido viscoso incoloro, de olor característico y con densidad relativa de $0,869\text{ g/cm}^3$ (20°C); mientras que el de muña es un líquido viscoso de color amarillo pálido, de olor característico y con densidad relativa de $0,928\text{ g/cm}^3$ (20°C)

Se logró identificar un total de 19 componentes del aceite esencial de molle y 45 del aceite esencial de muña. Sin embargo, muchos de estos compuestos se encontraron en cantidades muy pequeñas, por lo cual se consideraron solo como componentes principales a terpenos con porcentajes de áreas mayores a 1% y con porcentajes de similitud de espectros de masas (% similitud MS) mayores a 90%, además de presentar índices de retención teóricos (I_r teórico) y calculados (I_r calculado) semejantes.

Los principales componentes presentes en el aceite esencial de molle y muña muestran en la Tabla 10 y 11, respectivamente. Asimismo, sus cromatogramas se muestran en las Figuras 23 y 24.

Tabla 10. Principales componentes del aceite esencial de molle

Componente	t_r (min)	% Área	I_r teórico	I_r calculado	% Similitud MS
α -pineno*	7,5	2,7	932	914	97
β -mirceno*	9,7	25,7	988	985	97
α -felandreno*	10,3	33,5	1002	1003	97
ρ -cimeno*	11,2	4,8	1020	1018	97
Silvestreno*	11,5	23,5	1025	1023	93
Metil octanoato	16,6	1,1	1123	1114	96
E-Cariofileno	34,8	1,5	1417	1415	95
δ -cadineno	41,1	2,1	1522	1520	92

* Componentes mayoritarios del aceite esencial de molle.

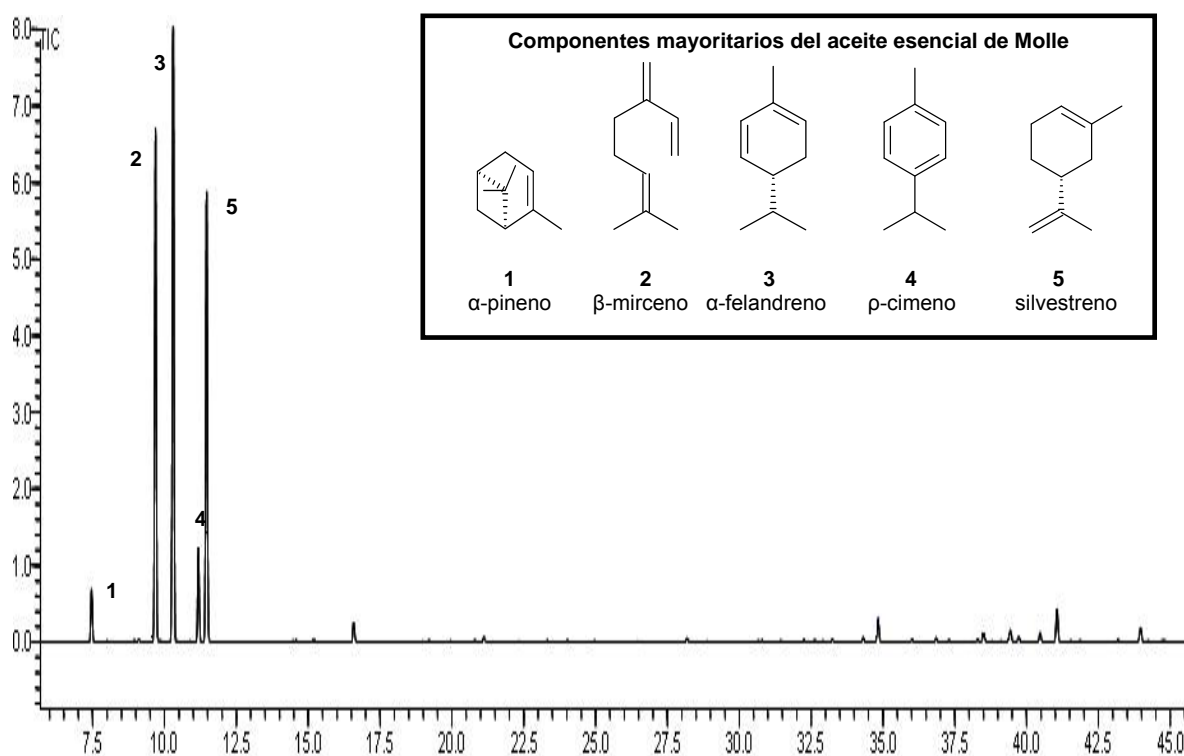


Figura 23. Cromatograma GC-MS del aceite esencial de molle

Tabla 11. Principales componentes del aceite esencial de muña

Componente	t_r (min)	% Área	I_r teórico	I_r calculado	% Similitud MS
α -pineno	7,5	2,1	932	915	97
Sabineno	9,0	1,5	969	962	97
β -mirceneno*	9,7	10,5	988	986	97
α -felandreno	10,3	1,2	1002	1003	97
p-cimeno*	11,2	9,2	1020	1019	97
Limoneno*	11,5	11,5	1024	1024	92
Linalol	15,5	1,4	1095	1089	96
Mentona*	18,2	12,7	1148	1142	97
Pulegona*	23,4	20,1	1233	1231	98
Espatulenol	44,0	1,2	1577	1570	94
Cariofileno óxido	44,2	1,6	1582	1574	93

* Componentes mayoritarios del aceite esencial de muña.

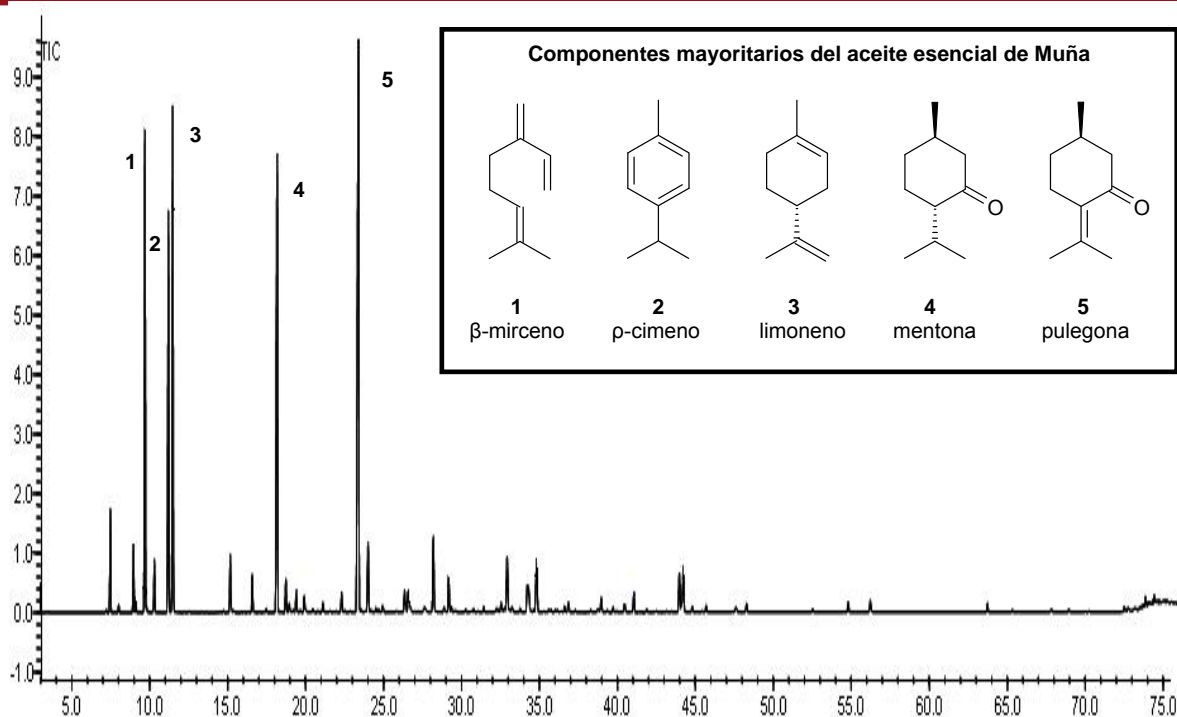


Figura 24. Cromatograma GC-MS del aceite esencial de muña

Los compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de molle fueron: α -felandreno (33,5%), β -mirceno (25,7%), silvestreno (23,5%), p-cimeno (4,8%) y α -pineno (2,7%); estos representan más del 90% de su composición. En el caso del aceite esencial de muña, los compuestos mayoritarios fueron los siguientes: Pulegona (20,1%), mentona (12,7%), limoneno (11,5%), β -mirceno (10,5%) y p-cimeno (9,2%); los cuales representan más del 60% de su composición.

Los principales componentes encontrados en el aceite esencial de molle y muña, así como sus respectivos contenidos, son comparables con otros resultados reportados en la literatura para dichas especies [33,50], los cuales señalan al α -felandreno y β -mirceno como componentes mayoritarios del molle; mientras que a la pulegona y mentona, de la muña. Estudios de las variaciones de los principales componentes del aceite esencial de muña en respuesta a insectos de diferentes hábitos alimenticios han demostrado que la gran actividad de este aceite recae en el monoterpeno pulegona, siendo un gran obstáculo para muchos insectos herbívoros [36].

3.3. Estudios de bioactividad

3.3.1 Actividad deterrente

La actividad deterrente es un indicador de la bioactividad de sustancias que logran el exterminio de los insectos al limitar su proceso alimenticio [8]. Se evaluó el porcentaje de consumo de las especies en estudio sobre sus respectivas hojas hospederas tratadas con el control (%C) y el tratamiento respectivo (%T), lo cual permitió calcular el porcentaje de inhibición de ingesta en cada caso. La Tabla 12 y la Figura 25 muestran los resultados de porcentaje de inhibición de ingesta de las muestras sobre las dos especies de insectos estudiadas.

Tabla 12. Inhibición de ingesta evaluada sobre *S. littoralis* y *E. paenulata*

Muestra	% Inhibición de ingesta	
	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>
Quinoa variedad A. Sacaca	-29,7	41,4
Quinoa variedad A. Maranganí	6,8	11,5
Quinoa variedad Markjo	-7,4	42,1*
Quinoa variedad Zolapozada	27,9	25,5
Tarwi	8,2	94,3*
Molle	-13,7	69,6*
Muña	30,9	99,1*

* Indica que la muestra es deterrente; es decir, que existe diferencia significativa entre %T y %C de acuerdo al análisis no paramétrico para dos muestras relacionadas (Test de Wilcoxon, $p < 0.05$)

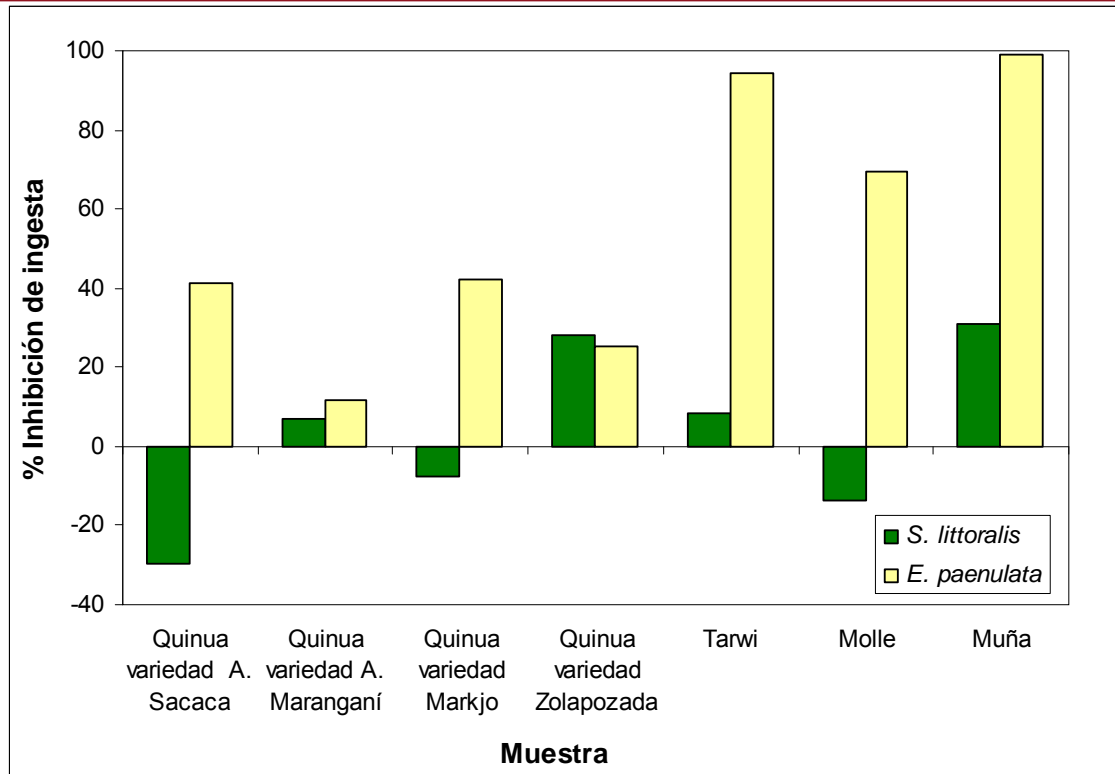


Figura 25. Inhibición de ingesta evaluada sobre *S. littoralis* y *E. paenulata*

Ninguno de los extractos mostró actividad contra *S. littoralis*, ya que no se observaron diferencias significativas entre %T y %C. Además, los valores de porcentaje de inhibición de ingesta obtenidos para esta especie son menores que el valor de referencia reportado en la literatura como criterio para determinar si una muestra es fuertemente deterrente sobre *S. littoralis* (% Inhibición de ingesta = 75%) [51].

Los extractos de quinua variedad Markjo y tarwi; así como los aceites de molle y muña mostraron actividad significativa contra *E. paenulata*, ya que en este caso también se observaron diferencias significativas entre %T y %C. El tarwi y la muña mostraron mayor actividad, presentando porcentajes de inhibición de ingesta superiores a los reportados en la literatura para dos químicos comúnmente usados en el control de esta plaga (nicotina = 82% y rotenona = 87%) [8].

Los resultados del porcentaje de inhibición de ingesta obtenidos para ambas especies en estudio son comparables con otros resultados reportados en la literatura, los cuales señalan una alta actividad sobre la especie *E. paenulata* y una baja actividad sobre *S. littoralis*. La diferencia del efecto deterrente entre estos dos tipos de insectos

masticadores es explicada por las distintas dietas seguidas por dichos herbívoros. Las especies generalistas, como *S. littoralis*, ingieren una gran variedad de plantas con lo cual adquieren una mayor tolerancia a la defensa química de las mismas; mientras que las especialistas, como *E. paenulata*, se alimentan de un número reducido de plantas con lo cual solo toleran metabolitos secundarios propios de las plantas de las que normalmente se alimentan [8].

Las Figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31 y 32 muestran la variación del porcentaje de consumo entre el control (%C) y el tratamiento (%T) para cada una de las muestras sobre la especie *E. paenulata* a lo largo del tiempo.

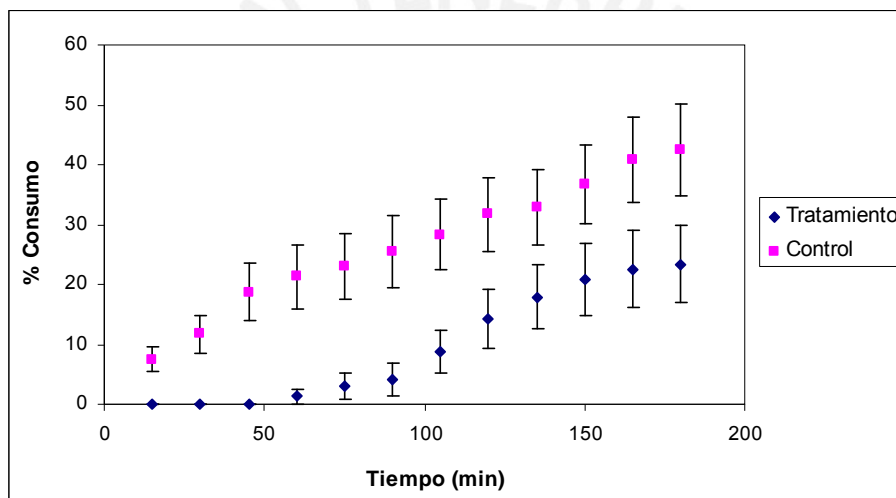


Figura 26. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la quinua variedad A. Sacaca

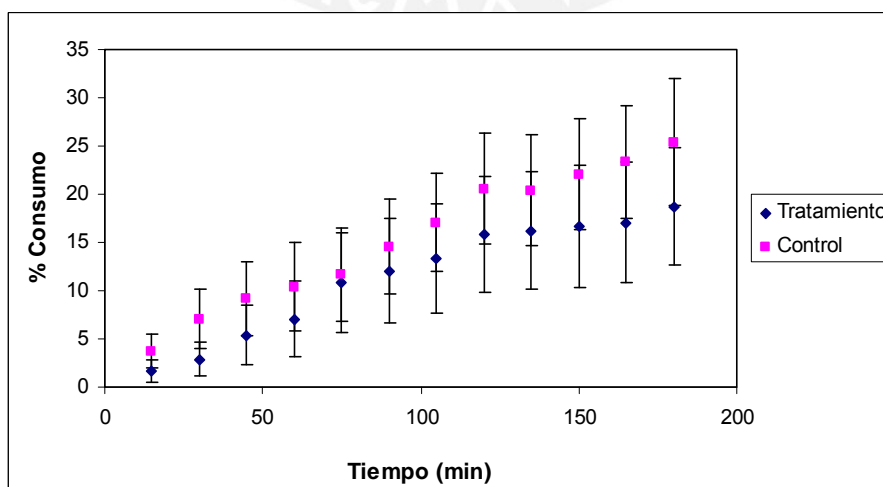


Figura 27. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la quinua variedad A. Maranganí

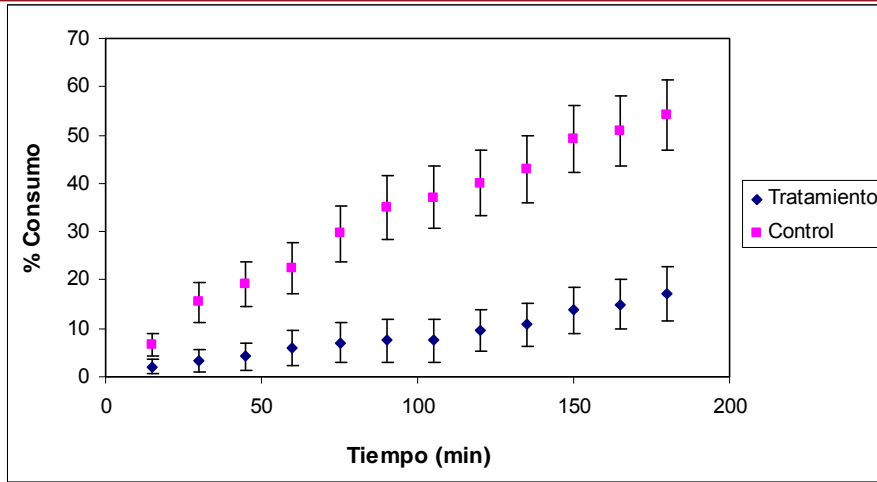


Figura 28. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la quinua variedad Markjo

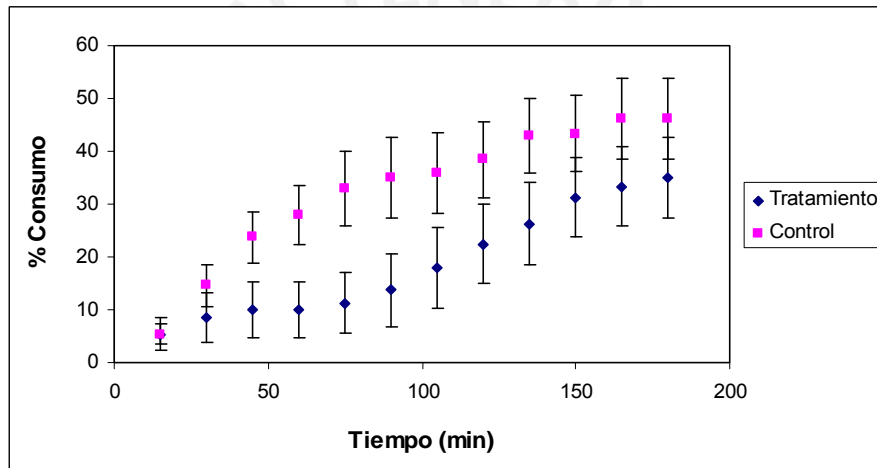


Figura 29. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la quinua variedad Zolapozada

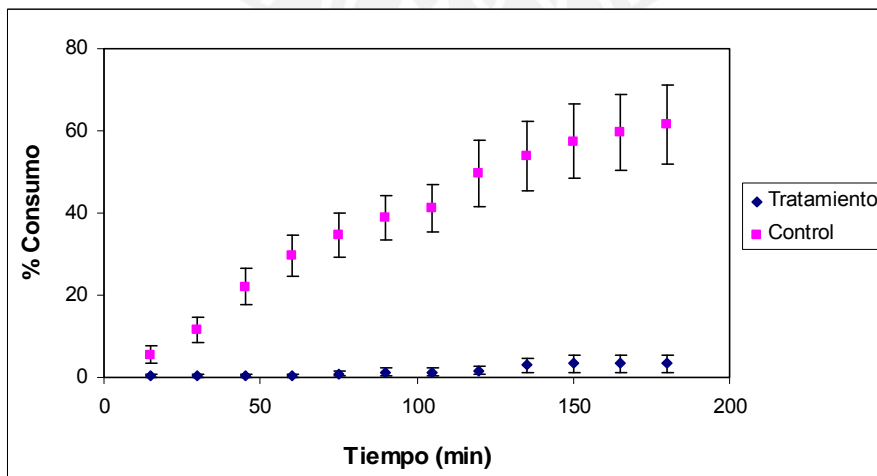


Figura 30. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para el tarwi

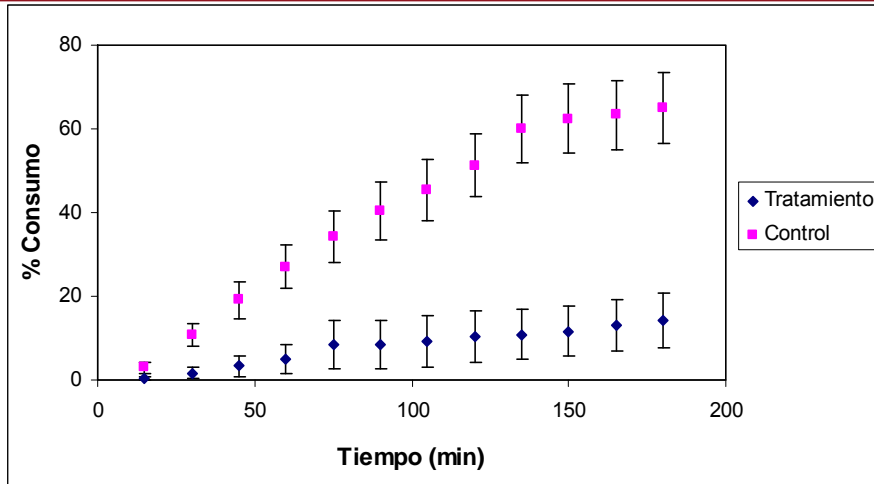


Figura 31. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para el molle

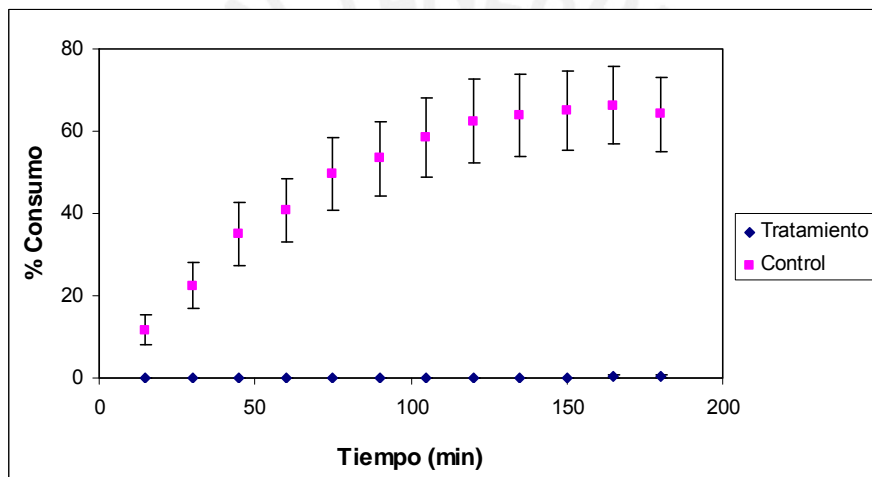


Figura 32. Evaluación de consumo de la especie *E. paenulata* para la muña

Las figuras mostradas anteriormente confirman que las especies de mayor actividad contra *E. paenulata* son la quinua variedad Markjo, el tarwi, la muña y el molle; ya que en las cuatro se observó una diferencia notoria entre el consumo del control frente al del tratamiento. En estos casos, el consumo del tratamiento fue muy bajo a lo largo del tiempo, siendo nulo para la muña. El consumo del control se incrementó en todos los casos a lo largo del tiempo.

Finalmente, se realizó el tratamiento estadístico de los valores de porcentaje de inhibición de ingesta obtenidos para las muestras sobre cada especie de insecto estudiado. Se empleó el análisis de comparaciones múltiples post-ANOVA (Test de Tukey, $p < 0,05$) del programa estadístico SPSS 17.0. Los subgrupos con valores

estadísticamente iguales (Sub. Homo) encontrados en cada caso se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Subgrupos homogéneos para la inhibición de ingesta

Muestra	% Inhibición de ingesta		
	<i>S. littoralis</i>	<i>E. paenulata</i>	
	Sub. Homo 1	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2
Quinoa variedad A. Sacaca	-29,7	41,4	41,4
Quinoa variedad A. Maranganí	6,8	11,5	-
Quinoa variedad Markjo	-7,4	42,1	42,1
Quinoa variedad Zolapozada	27,9	25,5	-
Tarwi	8,2	-	94,3
Molle	-13,7	69,6	69,6
Muña	30,9	-	99,1

La especie *S. littoralis* presenta un solo subgrupo homogéneo, lo cual nos indica que los valores de porcentaje de inhibición de ingesta de todas las muestras evaluadas para esa especie son estadísticamente iguales. La especie *E. paenulata* presenta dos subgrupos homogéneos, indicándonos diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de ingesta de las muestras evaluadas. Los resultados de todas las variedades de quinua y el molle son estadísticamente iguales, pero difieren del tarwi y la muña; los cuales a su vez, son iguales al molle y las variedades de quinua Markjo y A. Sacaca.

3.3.2. Actividad acaricida

Conociendo los pesos de: garrapatas, huevos (día 14 post - tratamiento) y % eclosión (día 40 post - tratamiento), se calculó el porcentaje de eficiencia reproductiva de las garrapatas y el porcentaje de eficacia de los acaricidas naturales empleados en cada caso.

La Tabla 14 y las Figuras 33 y 34 muestran el porcentaje de eficiencia reproductiva y el porcentaje de eficacia, evaluados a concentraciones del 1% y 10% (screening primario):

Tabla 14. Eficiencia reproductiva y eficacia obtenidas del screening primario

Muestra	% Eficiencia reproductiva		% Eficacia	
	[1%]	[10%]	[1%]	[10%]
Quinua variedad A. Sacaca	39,6	20,1	11,2	45,6
Quinua variedad A. Maranganí	44,8	33,3	0,0	0,0
Quinua variedad Markjo	31,3	10,9	28,4	68,8
Quinua variedad Zolapozada	34,8	27,4	21,6	23,1
Tarwi	39,3	32,4	11,4	9,2
Molle	43,8	30,9	2,2	14,8
Muña	40,8	2,5	6,8	92,8
Control	44,3	36,3	N/A	N/A
Amitraz	0,0	0,0	100,0	100,0

N/A: No aplica

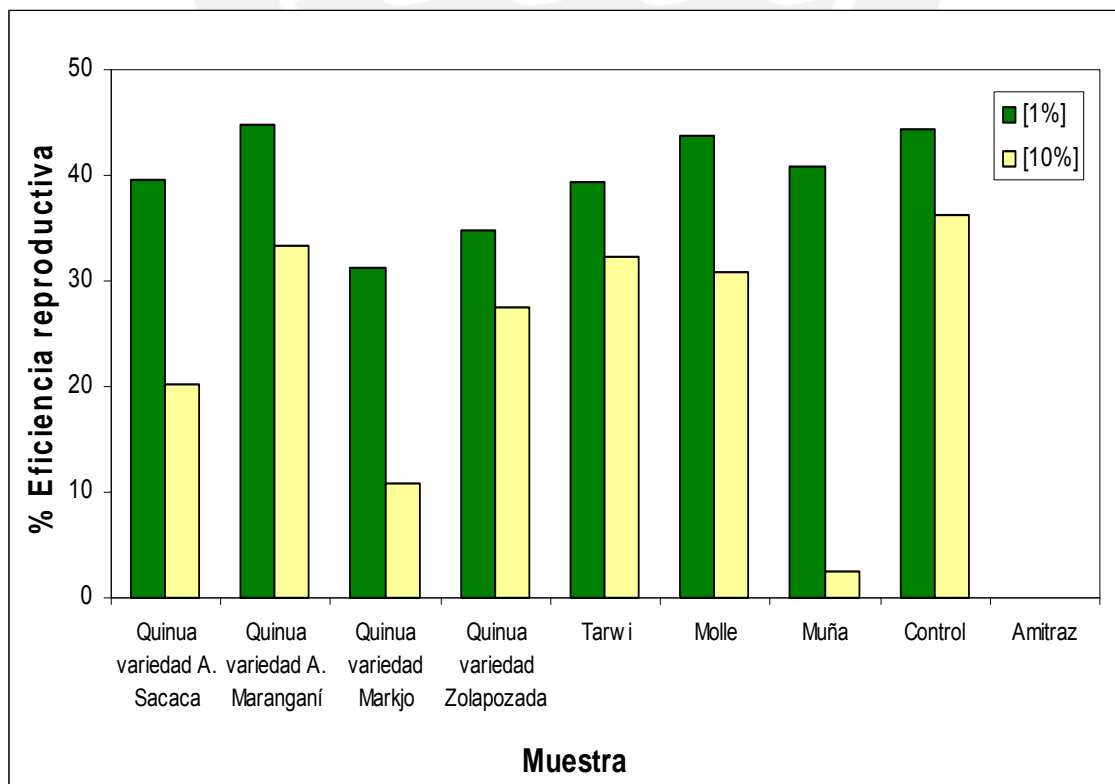


Figura 33. Eficiencia reproductiva obtenida del screening primario

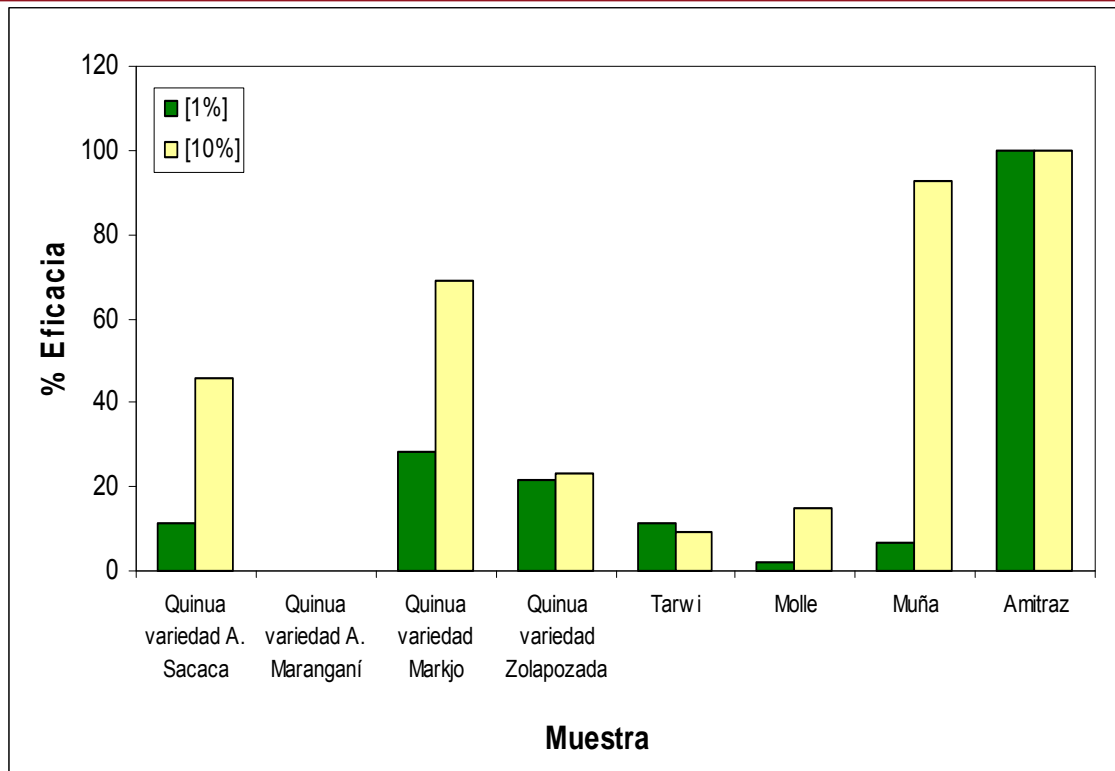


Figura 34. Eficacia obtenida del screening primario

Los resultados del screening primario mostraron que para todas las especies estudiadas, la eficiencia reproductiva disminuye al aumentar la dosis; mientras que la eficacia aumenta. Además, casi todas las muestras presentaron una eficiencia reproductiva menor con respecto al control a las dos concentraciones estudiadas, con excepción de la quinua variedad A. Maranganí para la concentración del 10%. Al comparar la eficiencia reproductiva y la eficacia de las muestras con los valores obtenidos para el acaricida químico amitraz se observó que todas las muestras presentaron una eficiencia reproductiva mayor y una eficacia menor a dicho acaricida; siendo la muña la única especie que presentó valores cercanos a los obtenidos para el amitraz. En todos los casos, el amitraz mostró un porcentaje de eficiencia reproductiva igual a 0% y una eficacia del 100%.

Los resultados de la eficiencia reproductiva mostraron como posibles especies activas al aceite esencial de muña y casi todos los extractos de quinua, con excepción de la quinua variedad A. Maranganí; siendo la muña y la quinua variedad Markjo las de mayor actividad, ya que presentaron una eficacia mayor al 50% a la concentración del 10%.

La Tabla 15 y las Figuras 35 y 36, muestran el porcentaje de eficiencia reproductiva y el porcentaje de eficacia, evaluados a concentraciones del 5%, 10% y 15% (screening secundario):

Tabla 15. Eficiencia reproductiva y eficacia obtenidas del screening secundario

Muestra	% Eficiencia reproductiva			% Eficacia		
	[5%]	[10%]	[15%]	[5%]	[10%]	[15%]
Quinoa variedad A. Sacaca	37,0	23,2	1,7	0,8	52,5	95,7
Quinoa variedad A. Maranganí	35,4	11,7	1,5	7,7	76,3	96,3
Quinoa variedad Markjo	17,6	3,4	2,9	58,9	92,8	92,8
Quinoa variedad Zolapozada	34,0	9,9	24,3	9,5	78,8	37,9
Muña	36,1	4,6	0,0	3,0	90,7	100,0
Control	38,4	48,1	39,2	N/A	N/A	N/A
Amitraz	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0

N/A: No aplica

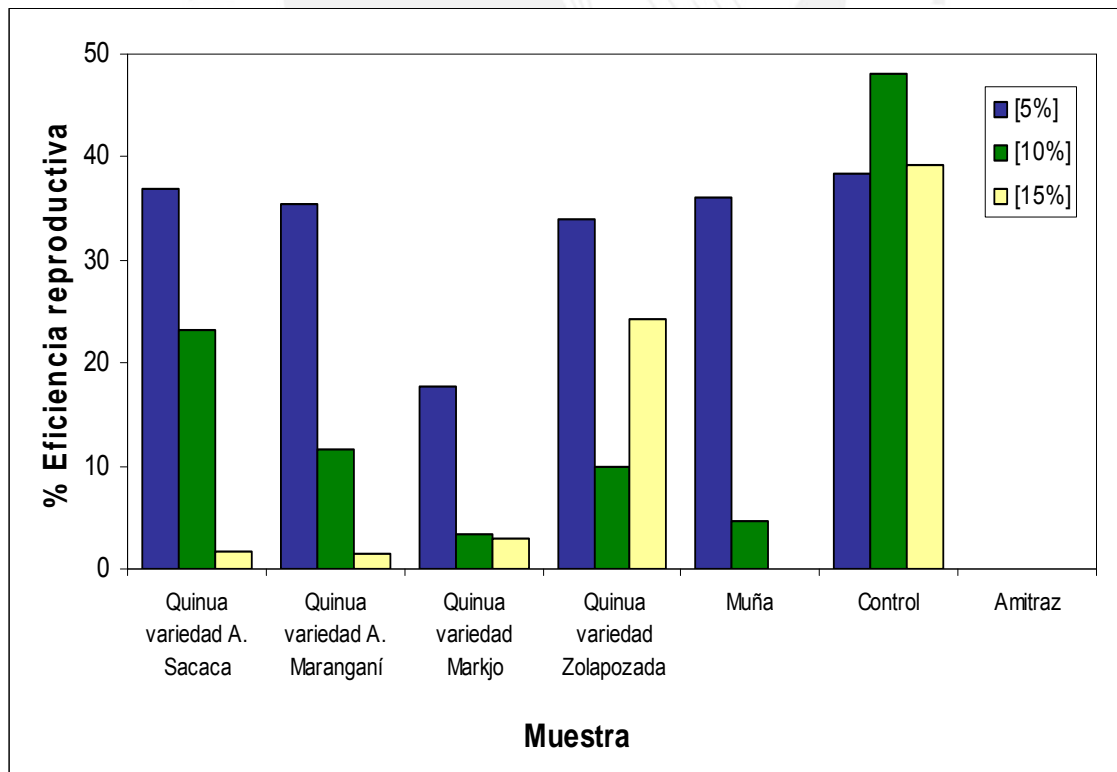


Figura 35. Eficiencia reproductiva obtenida del screening secundario

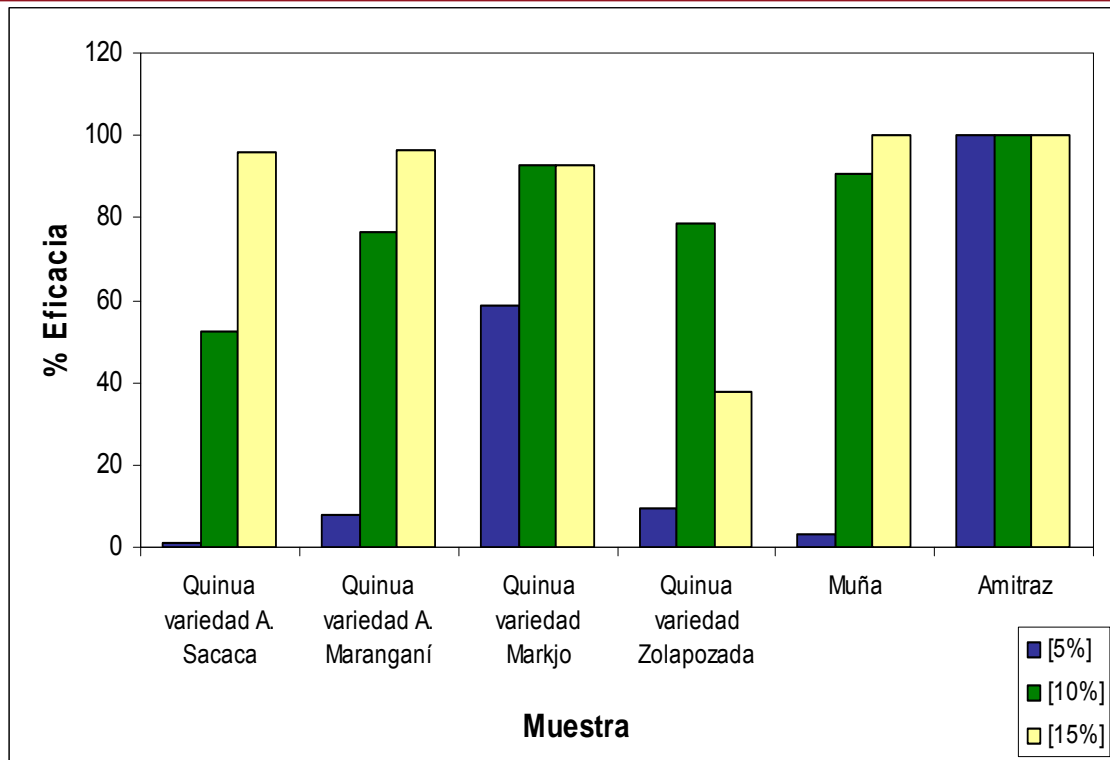


Figura 36. Eficacia obtenida del screening secundario

Con las muestras que resultaron activas, se realizó un screening secundario a mayores concentraciones. A estas condiciones, los resultados mostraron que para casi todas las especies estudiadas, la eficiencia reproductiva disminuye al aumentar la dosis; mientras que la eficacia aumenta, con excepción de las variedades de quinuas Zolapozada y Markjo; esta última presenta una misma eficiencia reproductiva y eficacia a concentraciones del 10% y 15%. Además, todas las muestras presentaron una eficiencia reproductiva menor con respecto al control a todas las concentraciones estudiadas. Al comparar la eficiencia reproductiva y la eficacia de las muestras con los valores obtenidos para el acaricida químico amitraz se observó que todas las muestras presentaron una eficiencia reproductiva mayor y una eficacia menor a dicho acaricida; con excepción de la muña a la concentración del 15%, pues fue la única especie que presentó valores iguales a los obtenidos para el amitraz. A concentraciones del 10%, la variedad de quinua Markjo y la muña presentaron valores cercanos a los obtenidos para el acaricida en mención; mientras que las variedades de quinuas A. Sacaca, Maranganí y Markjo obtuvieron semejantes resultados a concentraciones del 15%. En todos los casos, el amitraz mostró un porcentaje de eficiencia reproductiva igual a 0% y una eficacia del 100%.

Los resultados de la eficiencia reproductiva mostraron como especies activas a todas las especies estudiadas. La variedad de quinua Markjo mostró la más alta actividad acaricida, incluso a dosis bajas (desde 5%), alcanzando eficacias por encima del 50%; mientras que el aceite esencial de muña mostró una muy alta actividad a dosis elevadas (superiores a 10%), alcanzando eficacias superiores al 90%.

Los valores de eficacia obtenidos del screening secundario permitieron evaluar el efecto de la concentración (EC) en cada una de las muestras, los cuales se aprecian en las Figuras 37, 38, 39, 40 y 41.

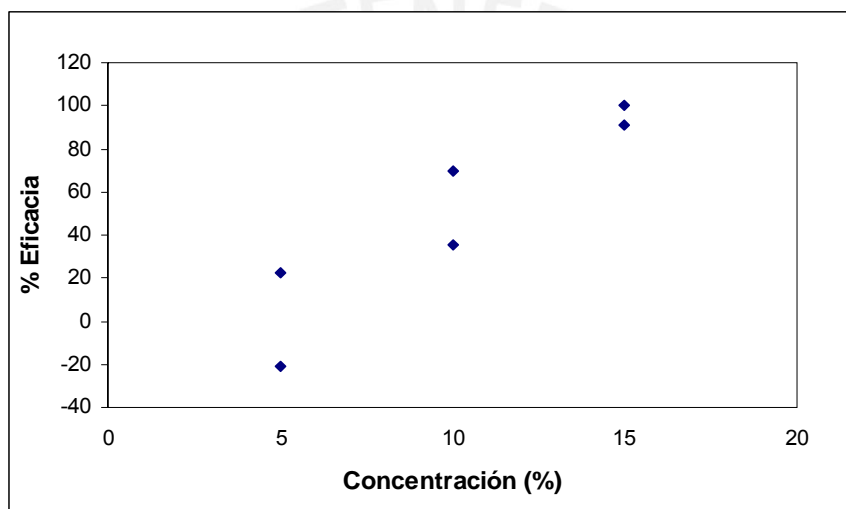


Figura 37. Efecto de concentración para la quinua variedad A. Sacaca

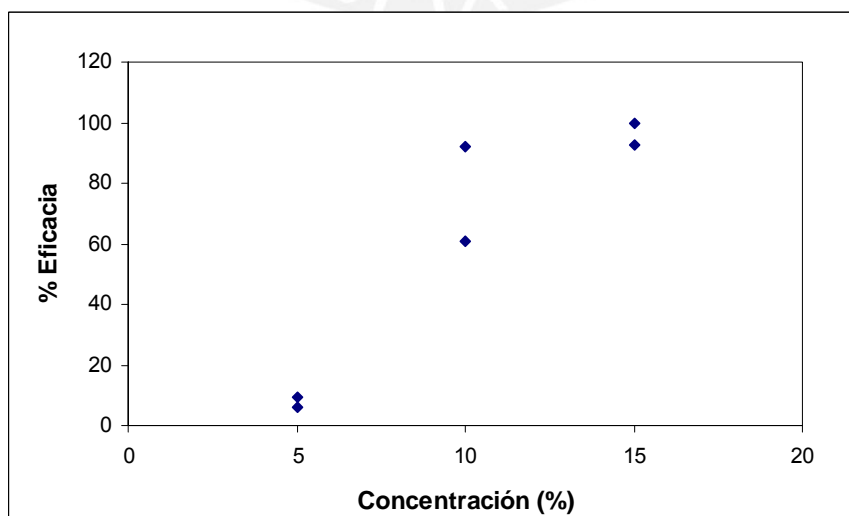


Figura 38. Efecto de concentración para la quinua variedad A. Maranganí

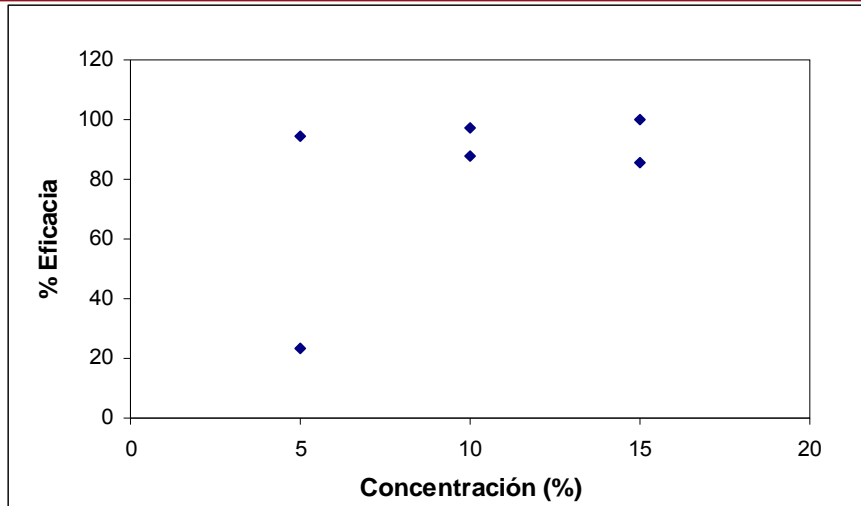


Figura 39. Efecto de concentración para la quinua variedad Markijo

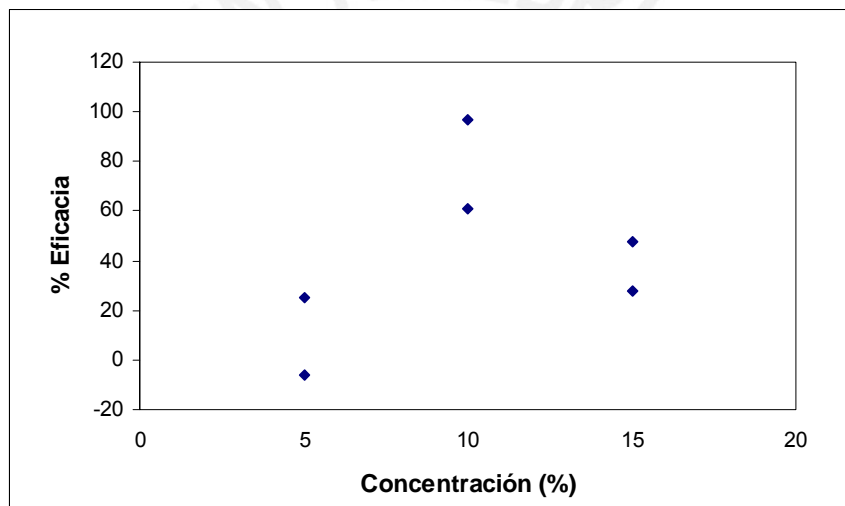


Figura 40. Efecto de concentración para la quinua variedad Zolapozada

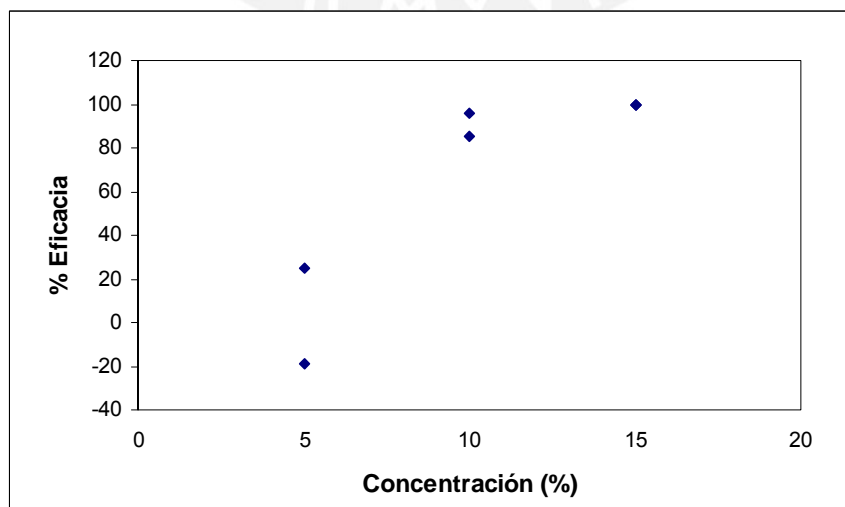


Figura 41. Efecto de concentración para la muña

El efecto de la concentración en las variedades de quinuas A. Sacaca y A. Maranganí mostró una tendencia positiva entre la concentración y la eficacia; obteniendo mayores eficacias a concentraciones más altas. Del mismo modo, la variedad de quinua Markjo y la muña mostraron un aumento de la eficacia al pasar de la concentración del 5% al 10%, para luego mantenerse constante. En el caso de la variedad de quinua Zolapozada, la eficacia aumenta al pasar de la concentración del 5% al 10%, para luego bajar a la concentración del 15%.

Finalmente, se realizó el tratamiento estadístico de los valores de porcentaje de eficiencia reproductiva y eficacia obtenidos para las muestras tanto en el screening primario como en el secundario. Se empleó el análisis de comparaciones múltiples post-ANOVA (Test de Tukey, $p < 0,05$) del programa estadístico SPSS 17.0. Los subgrupos con valores estadísticamente iguales (Sub. Homo) encontrados en cada caso se muestran en las Tablas 16, 17, 18 y 19.

Tabla 16. Subgrupos homogéneos para la eficiencia reproductiva del screening primario

Muestra	% Eficiencia reproductiva				
	[1%]		[10%]		
	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 3
Quinua variedad A. Sacaca	39,6	-	-	20,1	20,1
Quinua variedad A. Maranganí	44,8	-	-	-	33,3
Quinua variedad Markjo	31,3	-	10,9	10,9	-
Quinua variedad Zolapozada	34,8	-	-	27,4	27,4
Tarwi	39,3	-	-	-	32,4
Molle	43,8	-	-	-	30,9
Muña	40,8	-	2,5	-	-
Control	44,3	-	-	-	36,3
Amitraz	-	0,0	0,0	-	-

Tabla 17. Subgrupos homogéneos para la eficacia del screening primario

Muestra	% Eficacia				
	[1%]		[10%]		
	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 3
Quinoa variedad A. Sacaca	11,2	-	45,6	45,6	45,6
Quinoa variedad A. Maranganí	0,0	-	0,0	-	-
Quinoa variedad Markjo	28,4	-	-	68,8	68,8
Quinoa variedad Zolapozada	21,6	-	23,1	23,1	-
Tarwi	11,4	-	9,2	-	-
Molle	2,2	-	14,8	14,8	-
Muña	6,8	-	-	-	92,8
Amitraz	-	100,0	-	-	100,0

Los resultados de eficiencia reproductiva y eficacia obtenidos en el screening primario para las concentraciones del 1% y 10% presentan 2 y 3 subgrupos homogéneos, respectivamente.

Al evaluar la eficiencia reproductiva a la concentración del 1% se obtiene que los resultados de todas las muestras y el control son estadísticamente iguales, con excepción del amitraz. Los resultados de las variedades de quinuas A. Sacaca, A. Maranganí y Zolapozada; así como del tarwi, molle y control son significativamente iguales para la concentración del 10%, pero difieren estadísticamente de la quinua variedad Markjo, muña y amitraz; siendo estos dos últimos iguales a la quinua variedad Markjo, la cual a su vez es igual a las variedades de quinuas A. Sacaca y Zolapozada.

Al evaluar la eficacia a la concentración del 1% se obtiene que los resultados de todas las muestras son estadísticamente iguales, pero difieren del amitraz. Para la concentración del 10%, los resultados de las variedades de quinuas A. Sacaca, A. Maranganí y Zolapozada; así como del tarwi y molle son significativamente iguales, pero difieren estadísticamente de la quinua variedad Markjo, muña y amitraz; siendo estos dos últimos iguales a las variedades de quinuas A. Sacaca y Markjo, las cuales a su vez son iguales a la variedad de quinuas Zolapozada y molle.

Tabla 18. Subgrupos homogéneos para la eficiencia reproductiva del screening secundario

Muestra	% Eficiencia reproductiva						
	[5%]		[10%]		[15%]		
	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 3
Quinua variedad A. Sacaca	37,0	-	23,2	23,2	1,7	-	-
Quinua variedad A. Maranganí	35,4	-	11,7	-	1,5	-	-
Quinua variedad Markjo	-	17,6	3,4	-	2,9	-	-
Quinua variedad Zolapozada	34,0	-	9,9	-	-	24,3	-
Muña	36,1	-	4,6	-	0,0	-	-
Control	38,4	-	-	48,1	-	-	39,2
Amitraz	-	0,0	0,0	-	0,0	-	-

Tabla 19. Subgrupos homogéneos para la eficacia del screening secundario

Muestra	% Eficacia					
	[5%]		[10%]		[15%]	
	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2
Quinua variedad A. Sacaca	0,8	-	-	52,5	95,7	-
Quinua variedad A. Maranganí	7,7	-	-	76,3	96,3	-
Quinua variedad Markjo	-	58,9	92,8	-	92,8	-
Quinua variedad Zolapozada	9,5	-	-	78,8	-	37,9
Muña	3,0	-	90,7	-	100,0	-
Amitraz	-	100,0	100,0	-	100,0	-

Los resultados de eficiencia reproductiva y eficacia obtenidos en el screening secundario para las concentraciones estudiadas presentan 2 subgrupos homogéneos; con excepción de la eficiencia reproductiva evaluada al 15%, que presenta 3 subgrupos.

Al evaluar la eficiencia reproductiva a la concentración del 5% se obtiene que los resultados de todas las muestras y el control son estadísticamente iguales, con excepción de la variedad de quinua Markjo y el amitraz, los cuales son iguales entre sí. Los resultados de todas las muestras y el amitraz son significativamente iguales para la concentración del 10%, pero difieren estadísticamente del control, que a su vez es igual a la quinua variedad A. Sacaca. A la concentración del 15%, todas las muestras son estadísticamente iguales con excepción del control y la quinua variedad Zolapozada.

Al evaluar la eficacia a la concentración del 5% se obtiene que los resultados de casi todas las muestras son estadísticamente iguales, pero difieren de la variedad de quinua Markjo y el amitraz, los cuales son iguales entre sí. Los resultados de la variedad de quinua Markjo, la muña y el amitraz son significativamente iguales para la concentración del 10%, pero difieren estadísticamente de las variedades de quinuas A. Sacaca, A. Maranganí y Zolapozada, las cuales son iguales entre sí. A la concentración del 15%, todas las muestras son estadísticamente iguales con excepción de la quinua variedad Zolapozada.

3.4. Caracterización química de las variedades de quinua

3.4.1. Determinación del contenido de proteína total

Los resultados del contenido de proteína total presente en las variedades de quinua se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Contenido de proteína total de las variedades de quinua

Muestra	Proteína total (%)
Quinua variedad A. Sacaca	11,7
Quinua variedad A. Maranganí	12,6
Quinua variedad Markjo	13,5
Quinua variedad Zolapozada	12,5

De todas las variedades de quinua estudiadas, la quinua Markjo presentó el mayor contenido de proteína total. Los resultados de contenido proteico obtenidos para las quinuas en estudio son comparables con otras variedades de quinuas amargas descritas en la literatura [47] y son superiores a los valores de contenido proteico reportados para otros cereales como cebada (11%) y arroz (7,5%); y similares a los del maíz (13,4%) [48].

Finalmente, se realizó el tratamiento estadístico de los valores de proteína total obtenidos para las muestras. Se empleó el análisis de comparaciones múltiples post-ANOVA (Test de Tukey, $p < 0,05$) del programa estadístico SPSS 17.0. Los subgrupos con valores estadísticamente iguales (Sub. Homo) se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Subgrupos homogéneos para el contenido de proteína total

Muestra	Proteína total (%)		
	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 3
Quinua variedad A. Sacaca	11,7	-	-
Quinua variedad A. Maranganí	-	12,6	-
Quinua variedad Markjo	-	-	13,5
Quinua variedad Zolapozada	-	12,5	-

El contenido de proteína total de las variedades de quinua estudiadas presenta 3 subgrupos homogéneos. Los resultados de las variedades de quinuas A. Maranganí y Zolapozada son significativamente iguales, pero difieren estadísticamente de las variedades de quinuas A. Sacaca y Markjo.

3.4.2. Determinación de ácidos grasos

Como resultado del análisis por cromatografía de gases fue posible reconocer los diferentes tipos de ácidos grasos contenidos en las variedades de quinua estudiadas, logrando también su evaluación cuantitativa. Los ácidos grasos presentes en las muestras se esquematizan en la Tabla 22.

Tabla 22. Ácidos grasos presentes en las variedades de quinua

Ácidos Grasos	t_R	Contenido (%)			
		Quinoa variedad A. Sacaca	Quinoa variedad A. Maranganí	Quinoa variedad Markjo	Quinoa Variedad Zolapozada
Mirístico 14:0	10,4	0,2	0,3	0,2	0,2
Palmítico 16:0	12,4	13,4	12,7	13,4	14,8
Palmitoleico 16:1 (9)	12,6	0,4	-	-	0,4
Esteárico 18:0	14,9	15,9	13,3	14,1	14,0
cis-oleico 18:1 (9)	15,0	0,8	0,6	0,7	1,3
cis-linoleico 18:2 (9,12)	15,5	42,6	40,6	34,1	45,4
cis-linolénico 18:3 (9,12,15)	16,2	7,0	6,7	7,5	7,8
Araquídico 20:0	18,0	-	0,4	0,4	0,7
Heneicosanoico 21:0	20,4	-	0,2	-	-
Behénico 22:0	21,6	0,3	0,2	-	0,6

Se encontraron contenidos de ácidos grasos similares para todas las variedades de quinua en estudio. Los ácidos grasos presentes en mayor proporción fueron: cis-linoleico, esteárico, palmítico y cis-linolénico; siendo el primero el componente mayoritario, el cual constituye más del 30% de la fracción lipídica. Se consideraron los componentes que presentaron un porcentaje de área mayor a 0,1.

Los principales ácidos grasos encontrados en las variedades de quinuas estudiadas, así como sus respectivos contenidos, son comparables con otros resultados reportados en la literatura para dicha especie [52]; observándose similitudes en el caso de los ácidos cis-linoleico y cis-linolénico, y diferencias para los ácidos esteárico, cis-oleico y palmítico.

3.5. Caracterización bioquímica de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua

3.5.1. Determinación del contenido de proteína soluble

Los resultados del contenido de proteína soluble presente en los extractos acuosos proteicos de las cuatro variedades de quinua estudiadas se muestran en la Tabla 23 y en la Figura 42.

Tabla 23. Contenido de proteína soluble de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua

Muestra	Proteína soluble (mg/mL)		
	pH 9	pH 10	pH 11
Quinua variedad A. Sacaca	4,6	4,9	5,2
Quinua variedad A. Maranganí	3,4	4,4	4,9
Quinua variedad Markjo	6,6	5,8	6,6
Quinua variedad Zolapozada	4,2	5,1	5,1

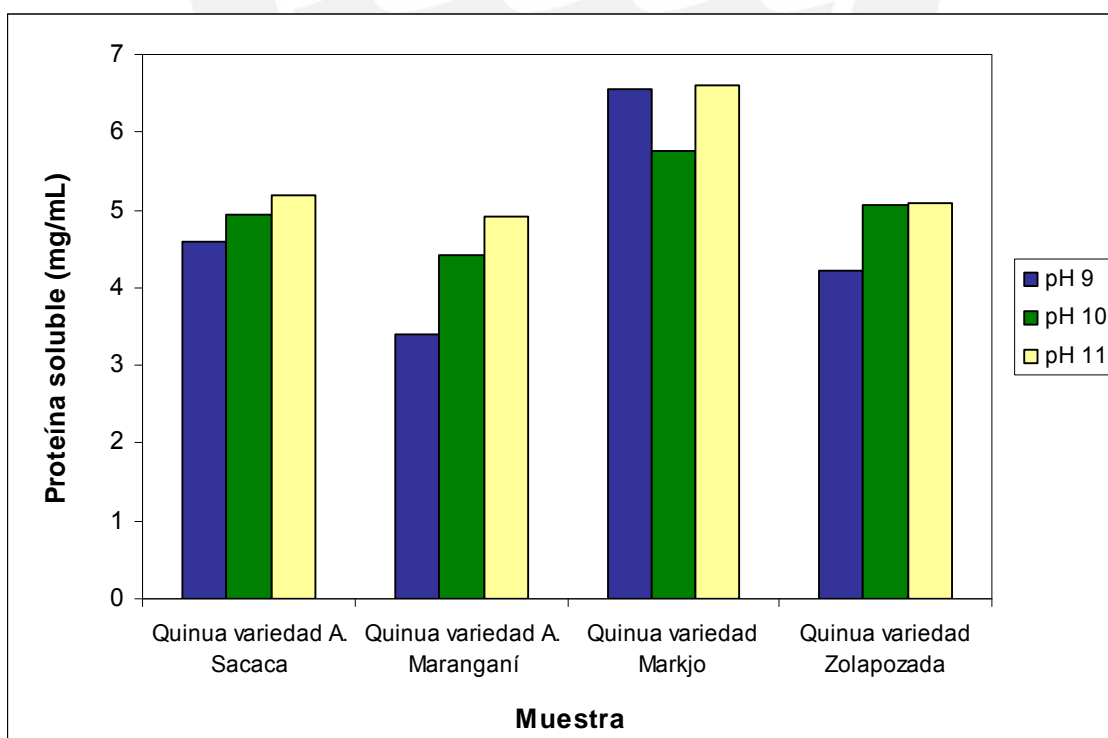


Figura 42. Contenido de proteína soluble de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua

El contenido de proteína soluble de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua estudiadas fluctuó entre 3,4 y 6,6 mg/mL; y se puede observar, tanto en la Tabla 23 como en la Figura 42, que éste aumenta al incrementarse el pH; con excepción del extracto proveniente de la variedad de quinua Markjo, en este caso, el contenido proteico disminuye al pasar de valores de pH 9 a 10, para luego subir a pH 11. De todos los extractos estudiados a distintos valores de pH, la variedad de quinua Markjo presentó el mayor contenido de proteína soluble.

Los resultados obtenidos en todas las variedades de quinua, con excepción de la Markjo, muestran una relación directamente proporcional entre la solubilidad de las proteínas y el pH. Las variaciones de solubilidad debidas al pH están relacionadas con la carga neta de las proteínas [53]. En la zona cercana al punto isoelectrico, la carga neta de las proteínas tiende a cero; lo que aumenta la atracción entre las moléculas, originando que la solubilidad sea mínima. En medio alcalino las proteínas tendrán una carga neta negativa, con lo cual las fuerzas repulsivas predominarán sobre las fuerzas de atracción; aumentando la solubilidad. El punto isoelectrico reportado para harina de quinua es pH = 6 [19].

Finalmente, se realizó el tratamiento estadístico de los valores de proteína soluble obtenidos para las muestras. Se empleó el análisis de comparaciones múltiples post-ANOVA (Test de Tukey, $p < 0,05$) del programa estadístico SPSS 17.0. Los subgrupos con valores estadísticamente iguales (Sub. Homo) se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Subgrupos homogéneos para el contenido de proteína soluble

Muestra	Proteína soluble (mg/mL)						
	pH 9			pH 10		pH 11	
	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 3	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2	Sub. Homo 1	Sub. Homo 2
Quinua variedad A. Sacaca	-	4,6	-	4,9	4,9	5,2	-
Quinua variedad A. Maranganí	3,4	-	-	4,4	-	4,9	-
Quinua variedad Markjo	-	-	6,6	-	5,8	-	6,6
Quinua variedad Zolapozada	-	4,2	-	5,1	5,1	5,1	-

El contenido de proteína soluble de las variedades de quinua estudiadas a pH 9 presenta 3 subgrupos homogéneos; mientras que 2 subgrupos para valores de pH 10 y 11. A pH 9, los resultados de las variedades de quinuas A. Sacaca y Zolapozada son significativamente iguales, pero difieren estadísticamente de las variedades de quinuas A. Maranganí y Markjo. A valores de pH 10 y 11, casi todas las variedades de quinuas son iguales entre sí; con excepción de la variedad de quinua Markjo, esta última es a su vez igual a las variedades A. Sacaca y Zolapozada a pH 10.

3.5.2. Electroforesis PAGE

Electroforesis PAGE desnaturizante (PAGE-SDS):

La PAGE-SDS de los extractos acuosos proteicos de las variedades de quinua se realizó en condiciones reductoras (SDS + 2-ME) y no reductoras (SDS), lo cual permitió distinguir subunidades que se mantenían juntas mediante puentes disulfuro o mediante fuerzas no covalentes. Además, todas las muestras se trabajaron a distintos valores de pH (9, 10 y 11). Las bandas obtenidas fueron comparadas frente al estándar de proteínas de pesos moleculares de rango medio (STD)

Los perfiles polipeptídicos desnaturizantes de todas las variedades de quinua en estudio se presentan en el ANEXO 8; estos no mostraron diferencias en función del pH y presentaron un patrón similar tanto en condiciones reductoras como no reductoras. El perfil polipeptídico desnaturizante de la variedad de quinua Markjo se muestra en la Figura 43.

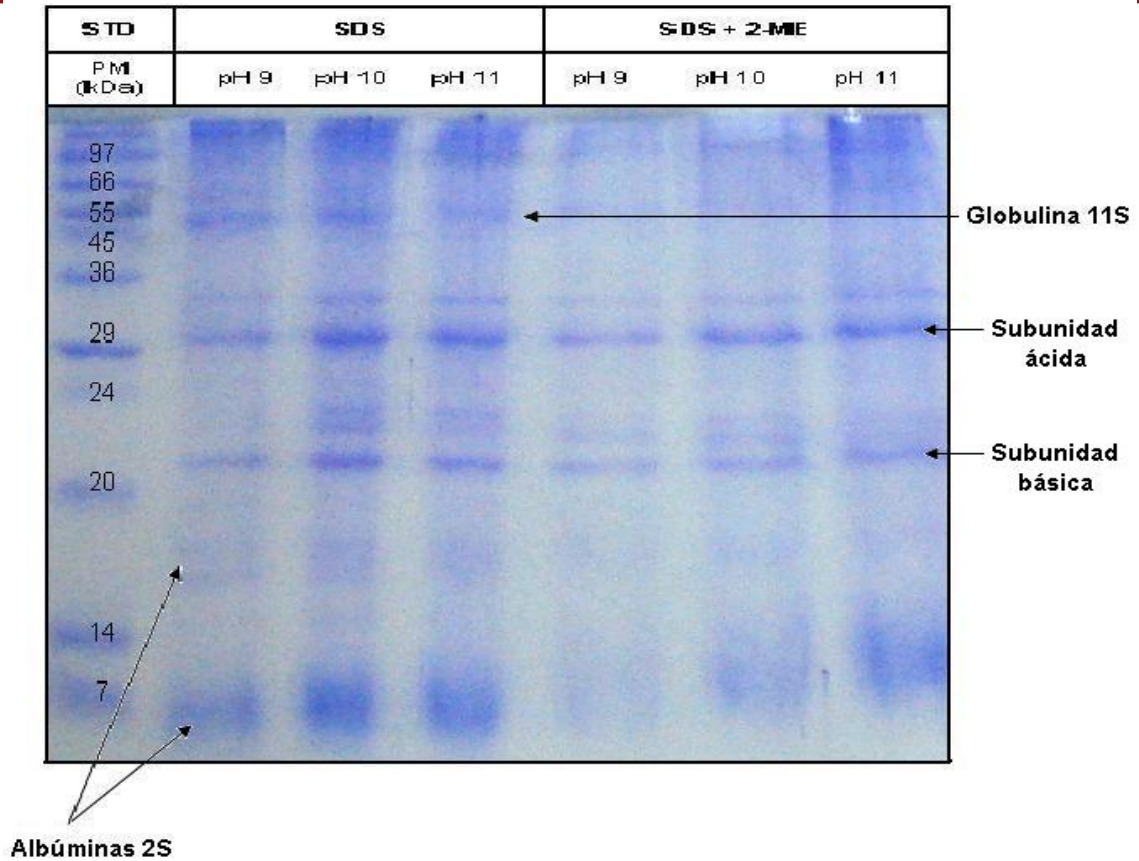


Figura 43. Perfil polipeptídico desnaturalizante de la quinua variedad Markjo

Debido a que las muestras no presentaron diferencias en función del pH, se calcularon los pesos moleculares promedio para cada una de las especies polipeptídicas presentes en las variedades de quinua, tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Los resultados se muestran en la Tabla 25:

Tabla 25. Pesos moleculares de las especies polipeptídicas presentes en las variedades de quinua

PM (kDa)							
Quinua variedad A. Sacaca		Quinua variedad A. Maranganí		Quinua variedad Markjo		Quinua variedad Zolapozada	
SDS	SDS + 2-ME	SDS	SDS + 2-ME	SDS	SDS + 2-ME	SDS	SDS + 2-ME
61,7	-	61,0	-	60,4	-	60,4	-
54,3	-	54,4	-	55,3	-	54,2	-
40,7	41,9	40,5	40,9	39,6	39,8	39,9	39,9
34,9	35,3	35,1	35,1	33,9	34,1	35,5	34,7
28,9	30,2	29,0	28,7	28,5	28,6	28,7	29,0
20,4	20,9	20,4	20,6	25,4	24,2	18,8	20,9
14,5	14,5	13,9	14,0	23,6	22,7	13,9	14,6
8,2	8,3	8,0	7,8	20,8	20,6	10,0	10,1
-	-	-	-	13,9	14,3	8,1	8,1
-	-	-	-	7,6	8,5	-	-

Los pesos moleculares de las especies polipeptídicas presentes en las cuatro variedades de quinua estudiadas fueron semejantes, encontrándose en un rango de 7,6 - 61,7 kDa.

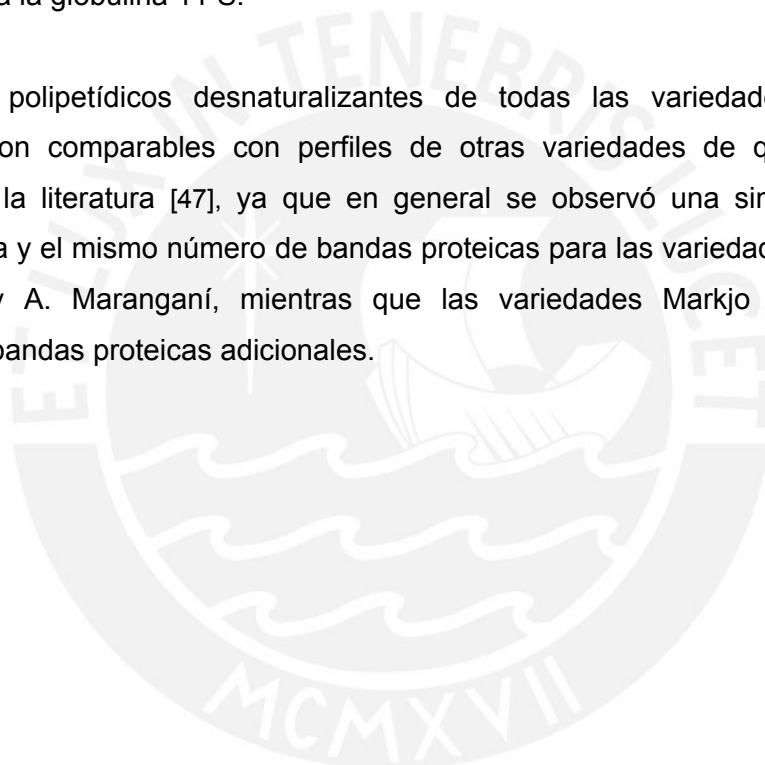
En condiciones no reductoras, las variedades de quinuas A. Sacaca y A. Maranganí presentaron 8 bandas polipeptídicas; mientras que las variedades Markjo y Zolapozada presentaron 10 y 9, en cada caso. En condiciones reductoras dichas variedades presentaron 6, 8 y 7 bandas, respectivamente. Este cambio en el perfil electroforético permitió identificar la presencia de proteínas estabilizadas por puentes disulfuro.

Las proteínas de quinua están compuestas principalmente por dos tipos de polipéptidos: albúminas 2S, de PMs menores a 20 kDa y globulinas 11S, de PMs alrededor de 50 kDa; ambas estabilizadas por puentes disulfuro [47]. En condiciones no reductoras, se identificaron dichas proteínas en todas las variedades de quinua estudiadas, alrededor de 8 y 14 kDa, para el caso de las albúminas 2S; y 54 kDa, para la globulina 11S. El tratamiento de las muestras con un agente reductor permitió

corroborar la presencia de la globulina 11S, ya que la banda correspondiente a dicha proteína desapareció y en su lugar aparecieron las bandas de las subunidades que la conforman: subunidad ácida a 34 kDa y subunidad básica a 20 kDa, las cuales se encontraban unidas por puentes disulfuro (S-S) en condiciones no reductoras.

Al comparar los perfiles proteicos desnaturalizantes de todas las variedades de quinua en estudio, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, se pudo observar que la mayoría de las especies polipeptídicas identificadas no presentan puentes disulfuro (S-S), ya que sus bandas aparecen tanto en presencia como en ausencia de 2-ME; con excepción de las dos bandas de mayor peso molecular, una de las cuales corresponde a la globulina 11 S.

Los perfiles polipeptídicos desnaturalizantes de todas las variedades de quinua estudiadas son comparables con perfiles de otras variedades de quinua amarga descritos en la literatura [47], ya que en general se observó una similar movilidad electroforética y el mismo número de bandas proteicas para las variedades de quinuas A. Sacaca y A. Maranganí, mientras que las variedades Markjo y Zolapozada presentaron bandas proteicas adicionales.



IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones:

1. Se comprobó la actividad deterrente de los extractos crudos de quinua variedad Markjo (42,1%) y tarwi (94,3%); así como de los aceites esenciales de molle (69,6%) y muña (99,1%) sobre la especie *E. paenulata*, siendo los tres últimos los más activos. Ninguna de las muestras mostró actividad deterrente contra *S. litorallis*.
2. Se comprobó la actividad acaricida del aceite esencial de muña y todos los extractos de quinua sobre *B. microplus*, con excepción de la variedad A. Maranganí. El aceite esencial de muña y la variedad de quinua Markjo mostraron la más alta bioactividad. La variedad Marjko mostró alta actividad (% eficiencia reproductiva = 2,9%, % eficacia = 92,8%) incluso a dosis bajas; mientras que el aceite esencial de muña mostró una excelente actividad (% eficiencia reproductiva = 0%, % eficacia = 100%) a dosis elevadas.
3. El acaricida químico amitraz resultó ser más activo que todas las muestras estudiadas a las dosis evaluadas; con excepción del aceite esencial de muña, el cual mostró una igual bioactividad a la obtenida por dicho acaricida (% eficiencia reproductiva = 0%, % eficacia = 100%). La variedad de quinua Markjo mostró una actividad bastante cercana al amitraz.
4. Evaluando el número de especies polipeptídicas de los extractos acuosos proteicos obtenidos de las harinas de quinua en estudio, la variedad Markjo presentó el mayor número, seguida de la Zolapozada. Las variedades A. Sacaca y A. Maranganí presentaron un menor número de polipéptidos, estas últimas mostraron entre ellas similares perfiles electroforéticos.
5. Los pesos moleculares de las especies polipeptídicas presentes en las variedades de quinua estudiadas fluctuaron entre 7,6 - 61,7 kDa; siendo principalmente proteínas del tipo globulinas 11S y albúminas 2S, ambas estabilizadas por puentes disulfuros (S-S). La variedad Marjko presentó el mayor contenido de proteína soluble (6,6 mg/mL)

6. La marcha fitoquímica permitió reconocer en todas las variedades de quinua la presencia de triterpenoides y saponinas, la variedad Marjko dio además positivo para alcaloides. El extracto crudo de tarwi dio positivo a triterpenoides, alcaloides y flavonoides.
7. Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de molle son: α -felandreno (33,5%), β -mirceno (25,7%), silvestreno (23,5%), p -cimeno (4,8%) y α -pineno (2,7%); los cuales representan más del 90% de su composición. Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de muña son: Pulegona (20,1%), mentona (12,7%), limoneno (11,5%), β -mirceno (10,5%) y p -cimeno (9,2%); los cuales representan más del 60% de su composición.
8. De todas las variedades de quinuas estudiadas, la variedad Marjko presentó el mayor contenido de proteína total (13,5%); así mismo se reconocen los siguientes ácidos grasos mayoritarios en promedio: cis-linoleico (40,1%), esteárico (14,3%), palmítico (13,6%) y cis-linolénico (7,3%).

Recomendaciones:

1. Formular productos veterinarios en base a aceites esenciales de molle y muña y extractos de tarwi y quinua Markjo contra *E. paenulata*.
2. Continuar con los estudios de actividad acaricida con extractos de quinuas amargas, en especial con la variedad Marjko. Formular acaricidas naturales con aceite esencial de muña y probarlo en campo.
3. Difundir la potencialidad alimenticia de las quinuas amargas óptimamente desaponificadas, considerando su producción en zonas de gran altitud y de escasos recursos cultivables.

V. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Betancourt, C.; Scatoni, I. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. *Facultad de Agronomía, Universidad de la República*. 1999, 140-145.
- [2] CONACYT-México, *revisado 26/04/2010*
<http://www.veterinaria.uady.mx/cuerpos/SALUD-ANIMAL/doctos/Resistencia.pdf>
- [3] DGPA-España, *revisado 26/04/2010*
<http://dgpa.besana.es/agentes/info.descripcion.do?id=13>
- [4] Heimerdinger, A.; Olivo, C.; Molento, M. Extract of lemongrass on the control of *Boophilus microplus* in cattle. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2006, 15, 37-39.
- [5] Borges, L.; Ferri, P.; Silva, W. In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. *Med. Vet.* 2003, 17, 228-231.
- [6] Martins, R. In Estudio *in vitro* de la acción acaricida del aceite esencial de la gramínea Citronela de Java (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) en la garrapata *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2006, 8, 71-78.
- [7] Fernandes, F.; Freitas, E.; Da Costa, A. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesq. Agropec. Bras.* 2005, 40, 1243-1245.
- [8] Castillo, L.; González-Coloma, A.; González, A. Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. *Ind. Crops Prod.* 2009, 29, 235-240.
- [9] Prakash, D.; Pal, M. *Chenopodium*: Seed protein, fractionation and aminoacid composition. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 1998, 49, 271-275.
- [10] Mujica, A.; Ortiz, R.; Bonifacio, A.; Saravia, R.; Corredor, G.; Romero, A.; Jacobsen, S. Agroindustria de la quinua en los países andinos. 2006. Puno, Perú. Altiplano E.I.R.L. Pág. 26-28.
- [11] Mizui, F.; Kasai, R.; Ohtani, K.; Tanaka, O. Saponins from brans of quinoa, *Chenopodium quinoa* WILLD. *Chem. Pharm. Bull.* 1988, 36, 1415-1418.

- [12] Sparg, S.; Ligth, M.; Van Staden, J. Biological activities and distribution of plant Saponins. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 94, 219-243.
- [13] Cultivos Andinos FAO, *revisado 05/02/2010*.
www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro03/cap1.htm
- [14] Gandarillas, H. Genética y origen de la quinua. *Instituto Nacional del Trigo (Bolivia)*. 1974, Boletín Informativo N°9, 19.
- [15] Risi, J.; Galway N. The *Chenopodium* grains of the Andes: Inca crops for modern agriculture. *Adv. Appl. Biol.* 1984, 10, 145-217.
- [16] Fontúrbel, F. Problemática de la producción y comercialización de *Chenopodium quinoa* W. (Chenopodiaceae) debida a la presencia de las saponinas. *Universidad de Chile*. 2006, Revista N°21, 6, 1-10.
- [17] Villacorta, L.; Talavera, V. Anatomía del grano de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) *Anales Científicos (Perú)*. 1976. 14, 39-45.
- [18] Romo, S.; Rosero, A; Forero, C.; Cerón, E. Potencial nutricional de harinas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) variedad piartal en los andes colombianos - Primera parte. *Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 2006, 4, 112-125.
- [19] Oshodi, A.; Ogungbenle, H.; Oladimeji, M. Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed, pearl millet and quinoa flours. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 1999, 50, 325-331.
- [20] MINAG-Perú, *revisado 08/04/2011*
<http://www.minag.gob.pe/boletines/estadistica-agraria-mensual.html>
- [21] Tapia, M. Agronomía de los cultivos andinos. En: Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. 1997. Santiago, Chile. FAO. Segunda edición. Pág. 147-163.
- [22] Cultivos Andinos INIA-Perú, *revisado 08/03/2010*
www.inia.gob.pe/cultivosandinos/zonas.htm
- [23] Güçlü-Üstündağ, Ö.; Mazza, G. Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007, 47, 231-258.

- [24] Dini, I.; Schettino, O.; Simioli, T.; Dini, A. Studies on the constituents of *Chenopodium quinoa* seeds: Isolation and characterization of new triterpene saponins. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 741-746.
- [25] Zhu, N.; Sheng, S.; Sang, S.; Jhoo, J-W., Bai, N.; Karwe, M.; Rosen, R.; Ho, C-T. Triterpene saponins from debittered quinoa (*Chenopodium quinoa*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 865-867.
- [26] Saha, S.; Walia, S.; Kumar, J. Screening for feeding deterrent and insect growth regulatory activity of triterpenic saponins from *Diploknema butyracea* and *Sapindus mukorossi*. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 434-440.
- [27] Ma, W-W.; Heisntein, P.; McLaughlin, J. Additional toxic, bitter saponins from the seeds of *Chenopodium quinoa*. *J. Nat. Prod.* 1989, 52, 1132-1135.
- [28] Ridout, C.L.; Price, K.R.; DuPont, M.S.; Parker, M.L.; Fenwick, G.R. Quinoa saponins-analysis and preliminary investigations into the effects of reduction by processing. *J. Sci. Food Agric.* 1991, 54, 165-176.
- [29] Jacobsen, S.; Mujica, A. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales, Universidad Mayor de San Andrés.* 2006, 458-482.
- [30] Ruiz, M. A.; Sotelo, A. Chemical composition, nutritive value, and toxicology evaluation of Mexican Wild *Lupinus*. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5336-5339.
- [31] Hatzold, T.; Idmalfa, I.; Gross, R.; Wink, M.; Hartmann, T.; Witte, L. Quinozilidine alkaloids in seeds of *Lupinus mutabilis*. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31, 934-938.
- [32] CONABIO-México, *revisado 13/04/2010*
http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/3-anaca4m.pdf
- [33] Bernhard, R.; Shibamoto, T.; Yamaguchi, K.; White, E. The volatile constituents of *Schinus molle* L. *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31, 463-466.
- [34] Fuertes, C.; Munguía, Y. 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, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* 2001, 4, 23-39.

- [35] Fournet, A.; Rojas de Arias, A.; Charles, B.; Bruneton, J. Chemical constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chaga's disease vectors. *Journal of Ethnopharmacology*. 1996, 52, 145-149.
- [36] Banchio, E.; Zydgado; Valladares, G. Quantitative variations in the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. In response to insects with different feeding habits *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 6903-6906.
- [37] Bravo, M.; Coronado, A.; Henríquez, H. Susceptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodida coumafos en explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Trop.* 2008, 26, 41-46.
- [38] Álvarez, V.; Loaiza, J.; Bonilla, R.; Barrios, M. Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. *Int. J. Trop. Biol.* 2008, 56, 291-302.
- [39] NCDENR USA, *revisado 13/07/2010*
www.deh.enr.state.nc.us/phpm/Ticks_spn_9-8-04.pdf
- [40] Maggi, M.; Maneaud, A.; Carpinella, M.; Ferrayoli, C.; Valladares, G.; Palacios, S. Laboratory evaluation of *Artemisia annua* L. extract and artemisinin activity against *Epilachna paenulata* and *Spodoptera eridania*. *J Chem Ecol.* 2005, 31, 1527-1536.
- [41] Anderson, P., Hilker, M., Lövgvist, J. Larval diet influence on oviposition behavior in *Spodoptera littoralis*. *Entomol. Exp. Appl.* 1995, 74, 71-82.
- [42] Lock, O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 1994. Lima, Perú. Fondo editorial PUCP. Segunda edición. Pág. 3-8, 255-289.
- [43] Adams, R. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. 2007. Illinois, USA. APC. 4th edition. Pág. 1-28.
- [44] Drummond, R.; Ernst, S.; Trevino, J.; Gladney, W.; Graham, O. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 1973, 66, 130-133.
- [45] Standard International ISO 5983. Animal feeding stuffs - Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content - Kjeldahl method. 1997, 11-01.

- [46] Bradford, M. Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- [47] Abugoch, L.; Castro, E.; Tapia, C.; Añón, M.; Gajardo, P.; Villarroel, A. Stability of quinoa flour proteins (*Chenopodium quinoa* Willd.) during storage. *International Journal of Food Science and Technology.* 2009, 44, 2013-2020.
- [48] Abugoch, L.; Romero, N.; Tapia, C.; Silva, J.; Rivera, M. Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 4745-4750.
- [49] Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227, 680-685.
- [50] Valladares, G.; Zapata, A.; Zydgado, J.; Banchio, E. Phytochemical induction by herbivores could affect quality of essential oils from aromatic plants. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4059-4061.
- [51] González-Coloma, A.; Terrero, D.; Perales, A.; Escoubas, P.; Fraga, B. Insect antifeedant Ryanodane diterpenes from *Persea indica*. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 296-300.
- [52] Mujica, A.; Jacobsen, S. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales.* 2006, 449-457.
- [53] Abugoch, L. Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*). 2006. Buenos Aires, Argentina. Tesis doctoral. Universidad de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas. Pág. 45-58.