

Experiencias piloto de extracción de aceites esenciales cuatro especies de *Tagetes* de México para obtención de bioplaguicidas

Miguel Ángel Serrato Cruz
Departamento de Fitotecnia
Universidad Autónoma Chapingo
Texcoco, México
serratocruz@gmail.com

Christian Iván Zapata Maldonado
Departamento de Fitotecnia
Universidad Autónoma Chapingo
Texcoco, México
cchhee.18@gmail.com

Resumen—Para elaborar bioplaguicidas a partir de especies aromáticas de *Tagetes*, un recurso natural de México, entre otros aspectos es necesario conocer, a nivel de prueba piloto, el rendimiento de aceite esencial y la composición de metabolitos secundarios. Mediante un destilador de acero inoxidable se procesaron 200 kg de tejido fresco de la parte aérea de plantas en floración para obtener aceite esencial de cuatro especies de *Tagetes* y su contenido químico se determinó por GC/MS (Cromatografía de gases/ Espectrometría de masas). Los rendimientos registrados de aceite fueron como sigue: *T. coronopifolia* 26 L Ha⁻¹, *T. filifolia* 45 L Ha⁻¹, *T. lacera* 45 L Ha⁻¹ y *T. terniflora* 75 L Ha⁻¹. Los compuestos mayoritarios de *T. filifolia* fueron fenilpropanoides como el anetol, mientras que en las demás especies la mayoría de los compuestos pertenecieron al grupo de monoterpenos como crisantenona, dihidrotagetona, ocimeno, tagetona, tagetenona, tujeno, verbenona.

Palabras clave— Aceite esencial; composición química; rendimiento de aceite; prueba piloto

Abstract—For obtaining biopesticides from aromatic species of *Tagetes*, a natural Mexican plant resource, is necessary to know among others aspects, essential oil yield and the secondary metabolites content at a pilot test level. Through inoxidable steel distillator 200 kg of fresh weight from aerial part of plants in flowering of four *Tagetes* species were processed for obtaining essential oil and their chemical content was determined by GC/MS. Oil yields recorded were as follow: *T. coronopifolia* 26 L Ha⁻¹, *T. filifolia* 45 L Ha⁻¹, *T. lacera* 45 L Ha⁻¹ and *T. terniflora* 75 L Ha⁻¹. Major compounds of *T. filifolia* were phenylpropanoids as anethole, while in other species most compounds belonged to the group of monoterpenes such as chysantenone, dihydrotagetone, ocimene, tagetone, tagetenone, thujene, verbenone.

Keywords— Eessential oil; chemical composition; oil yield; pilot test

I. INTRODUCCIÓN

En países latinoamericanos hay una rica diversidad biológica de plantas aromáticas con fuerte potencial de uso en agricultura, industria y medicina. El aceite esencial y extractos acuosos que se obtienen de la destilación de plantas aromáticas se están utilizando para formular productos

bioplaguicidas que se aplican en invernadero o en campo contra plagas o enfermedades (1, 2, 3). También tienen aplicaciones como esencia en aromaterapia, saborizante y aromatizante. El género *Tagetes* se desarrolló naturalmente en el Continente Americano como taxa endémico, aproximadamente hace 65 millones de años (4). La mayoría de las especies de *Tagetes* son aromáticas por la presencia de aceites esenciales contenidos en diferentes estructuras de la planta (5). Se calcula que existen alrededor de 58 especies, de las cuales cerca de 30 se distribuyen en México (6); para Ecuador se estiman 10 (7). Se consigna que son muy variados los metabolitos secundarios encontrados en *Tagetes* (8) y la mayoría de las especies que se distribuyen en México aún están por explorarse (9). En el siglo XVI españoles y portugueses llevaron cuatro especies de *Tagetes* a África, Asia y Europa (10) y curiosamente el aprovechamiento comercial de aceites esenciales de *Tagetes* actualmente se practica en la India y en Sudáfrica, países que cuentan con plantas de extracción. Desafortunadamente la información sobre el proceso industrial para la extracción y transformación de aceites esenciales de *Tagetes* no está disponible. Por otra parte, son pocas las especies de *Tagetes* que han sido objeto de aprovechamiento de esa forma (10). Las especies de *Tagetes* que hasta ahora se han sometido a experimentación para conocer su efecto toxicológico o de repelencia muestran actividad contra nematodos, ácaros, bacterias, hongos, insectos y nematodos (11), son de amplio espectro biológico. Sin embargo, no se tienen datos de producción de biomasa y de aceite en campo ni referencias sobre extracción de aceites a nivel industrial que ayuden a ubicar la viabilidad económica de esta biotecnología para utilizar esta fuente natural como bioplaguicida u otro producto de valor agregado (11). Ensayar la extracción de aceites esenciales a nivel piloto tiene la finalidad de inferir este proceso a nivel comercial e industrial, por lo que datos del rendimiento de aceite por unidad de peso o unidad de superficie y contenido del aceite son necesarios (12, 13). *Tagetes coronopifolia*, *T. filifolia*, *T. lacera* y *T. terniflora* son especies distribuidas en México (14), muy contrastantes por su aroma y morfología. En este trabajo se presentan experiencias piloto de extracción de aceites esenciales de estas cuatro especies de *Tagetes* de México con

la finalidad de visualizar su potencial para elaboración de bioplaguicidas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material biológico

Cuatro especies de *Tagetes* de México se utilizaron para realizar extracción de aceite esencial a nivel piloto. Se trata de *T. coronopifolia* una planta herbácea procedente de la comunidades de Santa María Tecuanulco en el municipio de Texcoco, Estado de Mexico; *T. filifolia* otra herbácea de Tlalámac, Atlautla, Estado de Mexico; *T. lacera* especie perenne endémica de la Sierra de la Laguna, Todos Santos, Estado de Baja California Sur; *T. terniflora* de condición herbácea de San Cristóbal de las Casas, Estado de Chiapas. Estas especies, conservadas en el Banco de Germoplasma Salvador Miranda Colín de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), en México se han venido estableciendo en el Campo Experimental del Departamento de Fitotecnia (CAEF-UACH). En 2013 se cosecharon semillas de plantas en madurez total y en 2014 se establecieron en campo para el ensayo piloto.

B. Establecimiento en campo y manejo agronómico

A partir de semillas de un año de almacenamiento, se establecieron almácigos en marzo de 2014 para disponer de plantas de 50 días, mismas que se trasplantaron a mediados de mayo en terrenos del CAEF-UACH. El trasplante se realizó en surcos de 75 cm de separación y distanciamiento entre plantas por surco de 15 cm. Se aplicó un riego al momento del trasplante y en adelante el suministro de agua fue con la lluvia de la estación (750mm). Se hizo una escarda con maquinaria al mes del trasplante y una más 15 días después, todo para eliminar malezas complementando con deshierbe manual. No se aplicaron fertilizantes ni otros productos químicos. Al finalizar septiembre e inicios de octubre, las plantas llegaron a floración listas para la extracción de aceite esencial.

C. Extracción de aceite, rendimiento y determinación de compuestos

Por la mañana se cosecharon las plantas utilizando una cosechadora o picadora de maíz cortando tallos florales y hojas en trozos de tejido de 5 o 6 cm. El material se llevó inmediatamente a una báscula para tomar el peso, ajustando a 200 kg y enseguida se llevó para la destilación. Se empleó un destilador de acero inoxidable con capacidad para 230 kg de tejido fresco. El tiempo de destilación a partir del inicio de la precipitación del extracto fue de 2 h. De cada especie se efectuaron tres destilaciones. Las fracciones de la destilación se separaron y se les midió la cantidad de aceite. A partir de la cantidad de aceite que correspondió al peso de tejido fresco y considerando el rendimiento de biomasa por unidad de superficie, se extrapoló el rendimiento de aceite a una hectárea. La composición química del aceite esencial se analizó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) en un equipo Polaris Q Finnigan Trace GC Ultra® provisto con un detector de masas Polaris Q, impacto electrónico (70 eV). Se empleó una columna RTX-5MX,

difenil-dimetilpolisiloxano (5:95), de 30 m x 0.25 mm D x 0.25 µm. El inyector y el detector se establecieron a 250 y 300 °C. La temperatura del horno se inició en 70 °C, se mantuvo así 1 minuto y se programó para alcanzar 250 °C a una tasa de 20°C.min⁻¹. Como gas acarreador se usó helio, a una velocidad de flujo de 1 mL.min⁻¹. Se inyectaron manualmente muestras diluidas (1/100 en cloruro de metileno v/v) de 1 µL, en modo Split (de barrido). Los datos cuantitativos de abundancia relativa se obtuvieron electrónicamente mediante el software del equipo, y fueron observables en el cromatograma. El intervalo de masas detectadas fue de 35-500 m/z. Se usaron *n*-alcanos como referencias en el cálculo de los índices de Kovats. Se midieron tres muestras procesadas en las que la identificación de los componentes se hizo mediante comparación de los índices de retención relativa y los espectros de masas con la base de datos NIST del sistema GC-MS y los datos de Adams publicados por Corp. Carol Stream, USA (15). Para la descripción de resultados solamente se consideraron los compuestos mayoritarios que correspondieron a porcentajes relativos en más de 10 %.

III. RESULTADOS

A. Rendimiento de aceite

En las especies consideradas, el volumen de extracto acuoso (hidrolato) fue de 20 L en 200 Kg de biomasa fresca. La proporción de aceite e hidrolato según la especie fue de 0.25-0.65: 20. La coloración del aceite de *T. filifolia* fue cristalina, amarilla en *T. coronopifolia* y rojiza en *T. lacera* y *T. terniflora*. *T. filifolia* presentó 0.500 L.Kg⁻¹, *T. lacera* 0.250 L.Kg⁻¹, *T. terniflora* 0.250 L.Kg⁻¹ y *T. coronopifolia* 0.175 L.Kg⁻¹. El orden en producción de biomasa por unidad de superficie (Cuadro 1) se dio en la secuencia siguiente: *T. terniflora*, *T. lacera*, *T. coronopifolia* y *T. filifolia*. La producción de aceite obtenida por hectárea en orden descendente variando entre los 60500 y 18000 Kg.Ha⁻¹, fue: *T. terniflora*, *T. filifolia*, *T. lacera* y *T. coronopifolia*.

Cuadro 1. Rendimiento de aceite destilando tejido vegetal fresco y extrapolación a una hectárea.

Especie de <i>Tagetes</i>	Aceite	Biomasa	Aceite
	L 200 Kg ⁻¹	Kg Ha ⁻¹	L Ha ⁻¹
<i>T. coronopifolia</i>	0.175	29 800	26
<i>T. filifolia</i>	0.500	18 000	45
<i>T. lacera</i>	0.250	36 200	45
<i>T. terniflora</i>	0.250	60 500	75

B. Composición química del aceite

Los tiempos de retención de los compuestos en las cuatro especies osciló de 3 a 9 min, pero los compuestos mayoritarios oscilas entre 3.8 y 5.8 min (Cuadro 2). En *T. coronopifolia*, *T. lacera* y *T. terniflora* se encontraron cuatro compuestos mayoritarios pero en *T. filifolia* solo uno (el anetol). *T. coronopifolia* y *T. lacera* tuvieron dos compuestos comunes (verbenona y crisantenona); *T. lacera* y *T. terniflora* compartieron el mismo metabolito (tagetona). *T. coronopifolia*

presentó dos compuestos distintivos (2-oxo-decanoato de metilo y 6,6-dimetil-2-metilen- biciclo[3.1.1]heptan-3-ona); *T. filifolia* y *T. lacera* un compuesto distintivo (anetol y tujeno, respectivamente) y *T. terniflora* tres compuestos (dihidrotagetona, tagetenona y ocimeno).

Cuadro 2. Especies, compuestos, tiempos de retención (RT) de los compuestos y su porcentaje relativo.

Especie y compuestos	RT (min)	%
<i>T. coronopifolia</i>		
2-oxo-decanoato de metilo	4.0	20.3
2,7,7-trimetilbiciclo[3.1.1]hept-2-en-6-ona (crisantenona)	4.9	15.4
(1R)-cis-4,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (verbenona)	5.6	26.7
(1S)-6,6-dimetil-2-metilen-biciclo[3.1.1]heptan-3-ona	5.7	37.6
<i>T. filifolia</i>		
Propenilanol (anetol)		99.5
<i>T. lacera</i>		
5-isopropil-2-metil-biciclo[3.1.0]hex-2-eno (α -tujeno)	3.8	20.5
4,6,6-dimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ona (verbenona)	5.6	20.1
2,7,7-trimetilBiciclo[3.1.1.]Hept-3-en-2-ona (crisantenona)	5.7	24.8
<i>trans</i> -tagetona	4.9	26.2
<i>T. terniflora</i>		
<i>trans</i> -tagetona	5.0	20.0
<i>trans</i> -tagetenona	5.8	22.0
Dihidrotagetona	4.1	10.0
<i>cis</i> - β -ocimeno	3.9	13.0

IV. DISCUSIÓN

A. Producción de aceite esencial

En el proceso de hidrodestilación a nivel piloto se extrajo más hidrolato que aceite esencial y considerando que su contenido corresponde a otros metabolitos secundarios como flavonoides y cumarinas, sustancias con efectos fungicidas y bactericidas (11), este extracto constituye un vehículo potenciador de efectos biológicos si se incorpora con el aceite esencial, con otros metabolitos (Cuadro 2), al proceso de formulación de bioplaguicidas. En experiencias sin publicar, el primer autor ha observado en durazno, rosal y aguacate efecto antifúngico de hidrolatos de *Tagetes*. La coloración del aceite se atribuye a la naturaleza de los compuestos, aunque convendría medir con mucha precisión esta característica y

explicarla, ya que es posible una asociación con el ambiente, sobre todo porque se cuenta con poblaciones de diferente origen geográfico. Las diferencias en rendimiento de aceite con base en tejido fresco (volumen/peso), aunque no da tanta precisión comparada con el cálculo del rendimiento del aceite con referencia a peso seco. Es una estimación que por primera vez se plantea en forma comparativa para especies de *Tagetes* en la que destaca *T. filifolia* que, siendo una herbácea de porte bajo, sobreproduce aceite esencial sin llegar a 1 % (volumen/peso seco) que es un rendimiento ideal que se espera de cualquier especie aromática. También conviene mencionar que para *T. coronopifolia*, *T. filifolia* y *T. lacera* es el primer reporte de rendimiento; en el caso de *T. terniflora* ya se tenían antecedentes (13, 16). Las diferencias en biomasa por hectárea considerando la misma densidad de plantación, en buena medida se explican por las características morfológicas de las especies. *T. terniflora* en cultivo desarrolla porte alto (1.70 a 2.1 m) y tallos gruesos (16); *T. lacera* semileñosa con porte de 1.2 a 1.5 m; *T. coronopifolia* herbácea de 80 a 100 cm y *T. filifolia* es una hierba de 30 a 50 cm. Es muy posible que la diferencia en producción de biomasa por hectárea sea afectada por la cantidad de plantas por unidad de superficie, así que es posible que con una mayor población de plantas la producción de biomasa podría aumentar, considerando la plasticidad de estas especies ruderales. En cuanto a la producción de aceite por hectárea, la mayor producción de *T. terniflora*, coincide con lo referido en otro estudio (16), y por vez primera se presentan para *T. coronopifolia*, *T. filifolia* y *T. lacera*. En forma empírica se han elaborado formulaciones basadas en resultados de ensayos toxicológicos y de repelencia (CL₅₀, CR₅₀), que se tienen en preparación como patentes en México, que sugieren la posible elaboración de 20 a 60 litros comerciales a partir de 1 L de aceite; cada litro comercial se disuelve en 200 L de agua para aplicar a 1 Ha. Así que de 25 L de aceite puro sería posible obtener en producto comercial de 500 a 1500 L.

B. Metabolitos secundarios

Los diferentes compuestos de las especies analizadas ya se han dado a conocer (16, 17, 18, 19.). El anetol en *T. filifolia* es un fenilpropanoide (20), 2-oxo.decanoato de metilo en *T. coronopifolia* es un éster (16) y los demás metabolitos secundarios se les registra como monoterpenos (8). La cantidad de compuestos mayoritarios en el aceite esencial tiene especial importancia, ya que mientras un solo componente es el responsable del efecto biológico, como en el caso del efecto del aceite de *T. filifolia* en mosquita blanca (21), el efecto biológico del aceite de las especies que contienen cuatro compuestos mayoritarios deben tener algún efecto sinérgico, lo que probablemente se asocie con el efecto de amplio espectro biológico que tienen los aceites de *Tagetes* (11), sustancia vegetal muy diferente de los productos químicos cuyos compuestos casi siempre son monomoleculares y con la ventaja de ser orgánicas, de fácil biodegradación.

REFERENCIAS

- [1] Bakkali F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46(2):446-475.
- [2] Calmasur O., I. Aslan, and F. Sahin. 2006. Insecticidal and acaricidal effect of three Lamiaceae plant essential oils against *Tetranychus urticae* Koch and *Bemisia tabaci* Genn. *Ind. Crops Prod.* 23(2): 140-146.
- [3] Tripathi A., S. Upadhyay, M. Bhuiyan, and P. Bhattacharya. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *J. Pharm. Phyto.* 1(15):52-63.
- [4] Turner B. L. 1977. Fossil history and geography. In *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Heywood V. H., Harborne J. B., Turner B. I. (eds). Academic Press Inc., England. (Volume I). pp. 22-30.
- [5] López, M L, N E Bonzani, J A Zygadlo. 2008. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. *Biochem. System. Ecol.* 36 (12): 882-890.
- [6] Serrato-Cruz, M. A. 2010. Investigación documental sobre el taxa *Tagetes* para dimensionar su origen y diversidad genética en México. (<http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Tagetes/Proyecto/Proyecto%20Tagetes.pdf>). Consulta 13 de marzo 2015.
- [7] Tropicos. 2015. Missouri Botanical Garden. Catalogue of vascular plants of Ecuador. <http://tropicos.org/Name/40009619?projectid=2>
- [8] Xu L., Chen W. J., Qi H. and Shi Y. P. 2012. Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicine* 4(2): 103-117.
- [9] Serrato-Cruz, M. A. 2014. El Recurso Genético Cempoalxóchitl (*Tagetes spp*) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo-SINAREFI-SNICS-SAGARPA. 182 p.
- [10] Neher, R. T. 1965. Monograph of the genus *Tagetes* (Compositae). Ph. D. Dissertation. Indiana University. Bloomington, Indiana, USA. 306 p.
- [11] Serrato-Cruz, M. A., J. S. Barajas-Pérez, y F. Díaz-Cedillo. 2007. Aceites esenciales del recurso genético *Tagetes* para el control de insectos, nematodos, ácaros y hongos. In: *Substancias Naturales contra Plagas. Agricultura Sostenible*. López-Olguín, J. F., A. Aragón-García, C. Rodríguez-Hernández, M. Vázquez-García (eds.). Colegio de Postgraduados, México. pp: 192-200.
- [12] Viturro, C. I.; A. C. Molina y A. M. Apaza. 2011. Caracterización y evaluación de rendimientos de aceites esenciales de *Tagetes terniflora* del valle de Jujuy. Universidad Nacional de Jujuy. Argentina.
- [13] Saavedra, N.; W. Cosme V.; C. Viturro; A. Molina; S. G. Molina. 2002. Ensayo Piloto de Extracción de Volátiles de *Tagetes terniflora* H.B.K. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA 2002. Universidad Nacional de Catamarca. Argentina. 5 p.
- [14] Turner, B. L. 1996. The comps of México-A systematic account of the family Asteraceae. Tageteae and Anthemideae. *Phytol. Memoirs* 6(10):1-93.
- [15] Adams R., P. 2001. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole. Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corp, Carol Stream, IL. pp:468-572.
- [16] Serrato-Cruz M. A., F. Díaz Cedillo, D. Hernández Medina, A. Curiel Rodríguez. 2014. Two agronomical aspects of *Tagetes terniflora* HBK for essential oil production. *Journal of Agriculture Chemistry and Environment* 3(1): 9-13.
- [17] Serrato-Cruz, M. A.; F. Díaz-Cedillo y J. S. Barajas-Pérez. 2008. Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. *Agrociencia* 42(3):277-285.
- [18] Díaz-Cedillo F, M A Serrato-Cruz, M Arce-Montoya, J L León de la Luz. 2012. Composición química de *Tagetes lacera* Brand., planta endémica de Baja California Sur, México. *Rev. Mex. Biodiversidad* 83: 543-547.
- [19] Díaz-Cedillo, F., Serrato-Cruz, M. A., De la Cruz-Marcial J., Sánchez A. M. G. y López-Cruz V. 2013. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36 (4): 405-411.
- [20] Wikipedia. 2015. Anetol. <http://es.wikipedia.org/wiki/Anetol>. (Consulta 15 de marzo de 2015).
- [21] Camarillo, De la R. G., Ortega A. L. D., Serrato M. A. y Rodríguez H. C. 2009. Actividad biológica de *Tagetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 35(2):177-184.