



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Agronomía-Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

Acción insecticida conjunta de mezclas de los aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky.

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agronómicas con mención
en Producción y Protección Vegetal

GABRIEL ESTEBAN BUSTOS FIGUEROA
CHILLAN, CHILE
2016

Profesor Guía: Gonzalo Silva Aguayo
Dpto. de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía
Universidad de Concepción

ACCIÓN INSECTICIDA CONJUNTA DE MEZCLAS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *PEUMUS BOLDUS* MOLINA, *LAURELIA SEMPERVIRENS* (RUIZ & PAV.) TUL. Y *LAURELIOPSIS PHILIPPIANA* (LOOSER) SCHODDE CONTRA *SITOPHILUS ZEAMAI* MOTSCHULSKY.

Aprobada por:

Profesor Asociado, Gonzalo Silva A.

Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.

Profesor Guía

Profesor Asociado, Susana Fischer G

Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.

Evaluador Interno

Profesora Asistente, Inés Figueroa C.

Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.

Evaluador Interno

Profesor Investigador Adjunto Colegio de Postgraduados, J. Concepción Rodríguez M.

Ing. Agrónomo, M C., Ph. D.

Evaluador Externo

RECONOCIMIENTO

La presente investigación fue financiada por el proyecto Fondecyt Iniciación N° 11110105 “Essential oil of *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz et Pau.) Tul and *Laureliopsis philippiana* Looser as an alternative to synthetic insecticides to *Sitophilus* spp. complex and *Acanthocelides obtectus* Say control in stored seeds”.



TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Hipótesis	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos	5
CAPITULO I.- Repelencia de mezclas de aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> Molina, <i>Laurelia sempervirens</i> (Ruiz & Pav.) Tul. y <i>Laureliopsis philippiana</i> (Looser) Schodde contra <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky.	9
Resumen	9
Abstract	9
Introducción	10
Materiales y Métodos	11
Resultados y Discusión	12
Referencias citadas	18
CAPITULO II.- Potenciación de la actividad insecticida fumigante de mezclas de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> Molina, <i>Laurelia sempervirens</i> (Ruiz & Pav.) Tul. y <i>Laureliopsis philippiana</i> (Looser) Schodde contra <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky.	22
Resumen	22
Abstract	22
Introducción	23
Materiales y Métodos	24
Resultados y Discusión	25
Referencias citadas	32
CAPITULO III.- Acción insecticida conjunta de contacto de mezclas de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> Molina, <i>Laurelia sempervirens</i> (Ruiz & Pav.) Tul. y <i>Laureliopsis philippiana</i> (Looser) Schodde contra <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky.	36
Resumen	36
Abstract	36
Introducción	37
Materiales y Métodos	38
Resultados y Discusión	39
Referencias citadas	48
CONCLUSIONES GENERALES	52

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

CAPITULO I

Tabla 1.- Escala de intensidad de repelencia de acuerdo a valores obtenidos con el índice de Mazzonetto y Vendramim (2003).....	12
Tabla 2.-Composición química de los aceites esenciales de follaje de <i>Laurelia sempervirens</i> , <i>Laureliopsis philippiana</i> y <i>Peumus boldus</i>	13
Tabla 3.- Repelencia de los aceites esenciales de <i>Laurelia sempervirens</i> , <i>Laureliopsis philippiana</i> y <i>Peumus boldus</i> evaluados individualmente contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	14
Tabla 4.-Repelencia de los aceites esenciales de <i>Laurelia sempervirens</i> , <i>Laureliopsis philippiana</i> y <i>Peumus boldus</i> individualmente y mezclados en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	15
Tabla 5.-Análisis de contrastes de los tratamientos que mostraron al menos un $\geq 90\%$ de <i>S. zeamais</i> adultos repelidos.....	17

CAPITULO II

Tabla 1.- Concentración Letal 50% (CL ₅₀) de la toxicidad por fumigación de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados individualmente y en mezcla en una proporción de 1:1 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	26
Tabla 2.- Concentración Letal 50% (CL ₅₀) de la toxicidad por fumigación de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en proporciones de 1:10 y 1:20 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	28
Tabla 3.-Índice de acción conjunta (IAC) e Índice de concentración-adición (ICA) para la toxicidad por efecto fumigante contra <i>Sitophilus zeamais</i> de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20.....	31

CAPITULO III

Tabla 1.- Toxicidad por contacto de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados individualmente contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	42
Tabla 2.- Toxicidad por contacto de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en una proporción de 1:1 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	43
Tabla 3.- Toxicidad por contacto de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en una proporción de 1:10 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	44
Tabla 4.- Toxicidad por contacto de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en una proporción de 1:20 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	45
Tabla 5.- Concentración letal 50% (CL ₅₀) de la toxicidad por contacto de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados individualmente y en mezcla en una proporción de 1:1 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	46
Tabla 6.- Concentración letal 50% (CL ₅₀) de la toxicidad por contacto de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en proporciones de 1:10 y 1:20 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	46
Tabla 7.-Índice de acción conjunta (IAC) e Índice de concentración-adición (ICA) para la toxicidad por contacto contra <i>Sitophilus zeamais</i> de mezclas de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20.....	47

FIGURAS

CAPITULO II

Figura 1.- Mortalidad por efecto fumigante de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados individualmente contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	26
Figura 2.- Mortalidad por efecto fumigante de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en una proporción de 1:1 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	27
Figura 3.- Mortalidad por efecto fumigante de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en una proporción de 1:10 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	29
Figura 4.- Mortalidad por efecto fumigante de los aceites esenciales de <i>Peumus boldus</i> , <i>Laurelia sempervirens</i> y <i>Laureliopsis philippiana</i> evaluados en mezcla en una proporción de 1:20 contra adultos de <i>Sitophilus zeamais</i>	30



RESUMEN

Los cereales como el trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.) son una importante parte de la dieta de humanos y animales domésticos. A nivel mundial entre el 5 y 15% del total de los granos cosechados se pierde a causa de los insectos plaga. Usualmente el control de plagas asociadas a granos almacenados es realizado con insecticidas de contacto como clorpirifos o malation y fumigantes como bromuro de metilo y fosfuro de aluminio. Sin embargo, su uso irracional han producido efectos adversos como presencia de residuos, intoxicaciones de usuarios y consumidores y desarrollo de resistencia. Sin embargo, su uso irracional ha producido efectos adversos como presencia de residuos, intoxicaciones de usuarios y consumidores y desarrollo de resistencia. Por tanto, se requieren alternativas que sin perder eficacia no presenten los problemas antes mencionados. Una de las alternativas son los compuestos vegetales que han sido utilizados para el control de insectos y ácaros desde muy antigua data como polvos, extractos o aceites esenciales siendo estos últimos los que presentan un mayor potencial para el control de plagas de los granos almacenados. El objetivo de la presente investigación fue evaluar, en condiciones de laboratorio, la actividad insecticida de contacto y fumigante e insectistática como repelente de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y en combinación, contra adultos de *S. zeamais*.

En la toxicidad por fumigación la evaluación de los aceites esenciales de manera individual la mayor toxicidad se observó en *P. boldus* cuyo aceite a partir de la concentración de 100 μL aceite esencial L^{-1} aire superará el 80% de mortalidad. En los tratamientos de mezclas en proporción de 1:1 y 1:20 se observó un efecto de potenciación ya que todos presentaron valores de ICA superiores a 1. En los bioensayos de toxicidad por contacto en las mezclas en proporciones de 1:1 el mayor porcentaje de insectos muertos se obtuvo con las concentraciones de 200 y 400 mL aceite esencial kg^{-1} cereal y solo el tratamiento *L. sempervirens* + *L. philippiana* con un ICA de 0.74 mostró efecto antagónico. En las proporciones de 1:10 y 1:20 se obtuvo la misma tendencia observándose que todas las combinaciones son antagonistas para *L. sempervirens* y *L. philippiana* mientras que para *P. boldus* todas presentan potenciación. Finalmente, en los estudios del efecto insectistático como repelente todos los tratamientos evaluados mostraron actividad repelente ya que presentaron un $\text{IR} < 1$. En los aceites evaluados individualmente, el mayor efecto de repelencia se obtuvo con las concentraciones de 4.0 y 8.0%. El aceite esencial de *L. philippiana* alcanzó 90% de insectos repelidos ($\text{IR} < 0.25$). En las proporciones de 1:1 y 1:10, el efecto repelente aumentó ya que los tratamientos de 2.0, 4.0 y 8.0% tuvieron valores del IR equivalentes al 90%. En la proporción 1:20 el efecto repelente disminuyó y solamente en los tratamientos al 8.0% se alcanzó el 90% de efectividad. Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten concluir que la mezcla del aceite esencial de *P. boldus* con *L. philippiana* en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20 potencian la actividad insecticida como fumigante de ambas especies mientras que los aceites esenciales de *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones de 1:1 potencian la acción insecticida de contacto de ambos en comparación a utilizarlos individualmente. Además, la mezcla de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones 1:1 y 1:10 potencia el efecto repelente sobre *S. zeamais*.

INTRODUCCIÓN

Los cereales como el trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.) entre otros son una importante parte de la dieta de humanos y animales domésticos (Sode et al. 1995). A nivel mundial entre el 5 y 15% del total de los granos cosechados se pierde a causa de los insectos plaga (Tipathi y Upadhyay, 2009). En Chile cerca de 60 especies de insectos están asociadas a cereales almacenados pero las consideradas como las más importantes son el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Motschulsky; Coleoptera: Curculionidae), el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae* L.) y la polilla de los cereales (*Ephestia kuehniella* Zeller; Lepidoptera: Pyralidae) (Arias y Dell'Orto, 1983; Larrain, 1994).

El daño a los cereales por parte de los insectos consiste en que larvas y adultos se alimentan del endosperma de la semilla y aunque la infestación puede comenzar en campo los mayores daños se producen en condiciones de bodega. Las pérdidas por efecto de los insectos son amplias y mayoritariamente afectan la calidad del grano manifestándose en aspectos como pérdida de peso, lo que causa descuentos en su precio al momento de la comercialización, y reducción en la concentración de nutrientes (White, 1995). De hecho, la sola presencia de insectos en el grano es considerada como una pérdida de calidad y de ahí que el umbral para considerar a una semilla como infestada son dos insectos vivos por kilogramo (Hagstrum y Flinn, 1996) por lo que las medidas de control deben ser altamente eficaces.

Los insecticidas sintéticos han sido considerados como el medio más eficaz para el control de insectos plaga (Huang y Subramanyam, 2005). Sin embargo, su uso irracional han producido efectos adversos como presencia de residuos, intoxicaciones de usuarios y consumidores y desarrollo de resistencia (Roel y Vendramim, 2006). Usualmente el control de plagas asociadas a granos almacenados es realizado con insecticidas de contacto como clorpirifos o malation y fumigantes como bromuro de metilo y fosforo de aluminio (Pretheep-Kumar et al. 2010).

Los fumigantes juegan un rol muy importante en el control de plagas de los granos almacenados no solo por su amplio espectro de control sino también por su facilidad de penetración en los cereales, tanto a granel como ensacados dejando un mínimo de residuos (Zetler y Arthur, 2000). El bromuro de metilo se utiliza como fumigante en instalaciones de almacenaje para el control de insectos en frutas y cereales además de tratamientos cuarentenarios. Este fumigante actúa de manera rápida controlando insectos en menos de 48 horas en instalaciones cerradas, tiene amplio espectro de acción y controla no solo insectos sino que también algunos nematodos y fitopatógenos (Fields y White, 2002). Este compuesto se prohibió el 2005, excepto para fines cuarentenarios, debido a que es uno de los causantes de la disminución de la capa de ozono (Shaaya y Kostjukovsky, 2009). En consecuencia, los productores de cereales lo reemplazaron por fosforo de aluminio y aunque el mercado estaba inicialmente renuente a aceptar este compuesto por temor a los residuos que pudiese dejar ha sido el tratamiento estándar durante la última década. Sin embargo, en los últimos años la industria ha comenzado a experimentar fallas de control con este fumigante y ante la falta de otra alternativa se ha producido un incremento sostenido en las dosis utilizadas (Guedes et al. 2006). Esto último ha hecho que cada vez sean más frecuentes los reportes de casos de insectos resistentes (Chaudhry, 2000). De acuerdo a Pretheep-Kumar et al. (2010) la resistencia a fosforo de aluminio se ha reportado

en al menos 11 especies de insectos asociados a cereales almacenados en 45 países diferentes.

Los cada vez mas comunes reportes de resistencia, los residuos en alimentos, la contaminación de recursos naturales como agua y suelo junto con la demanda de los consumidores por productos libres de residuos (Piesik y Wenda-Piesik, 2015) han hecho necesaria la búsqueda de otras opciones de control que presenten la misma efectividad pero sin los problemas antes mencionados. Una de las alternativas son los compuestos vegetales que han sido utilizados para el control de insectos y ácaros desde muy antigua data como polvos, extractos o aceites esenciales siendo estos últimos los que presentan un mayor potencial para el control de plagas de los granos almacenados (Regnault-Roger, 1997).

Los aceites esenciales son usualmente obtenidos por destilación por arrastre de vapor de plantas aromáticas y son utilizadas mayoritariamente en la industria de las fragancias y aromas, la industria culinaria y mas recientemente en la medicina alternativa (Koul et al. 2008). Estos aceites son lipofílicos e interfieren con el metabolismo, fisiología y comportamiento de los insectos (Tripathi et al. 2009). Normalmente disponibilidad de aceites esenciales está limitada a un determinado número de familias botánicas como Myrtaceae, Lauraceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Cupressaceae, Poaceae, Zingiberaceae y Piperaceae (Regnault-Roger, 1997). La naturaleza de los compuestos químicos de los aceites esenciales es muy variado aunque se pueden dividir en cuatro grupos: terpenos, derivados del benceno, hidrocarburos y otros compuestos misceláneos (Tripathi et al. 2009). Sin embargo, los monoterpenos son las moléculas mas representativas constituyendo el 90% de los aceites esenciales (Lahlou, 2004).

Los aceites esenciales presentan múltiples modos de acción contra insectos y muchos de los estudios se han realizado en plagas de los granos almacenados como *S. zeamais* (Asawalan y Hassanali, 2006; Betancur et al. 2010), *S. oryzae* (Somboon y Pinsamarn, 2006), *S. granarius* (Aslan et al. 2004), *Tribolium castaneum* (Waraporn y Chandrapatya, 2009), *Acatoscelides obtectus* Say (Bittner et al. 2008), *Callosobruchus maculatus* (F.) (Emeasor et al. 2005) y *Prostephanus truncatus* (Obeng-Ofori et al. 1998). En general, los aceites esenciales presentan actividad biológica como insecticidas de contacto, fumigantes, repelentes e inhibidores de la alimentación y oviposición (Koul et al. 2008). Sin embargo, sobre su efecto insecticida ya sea de contacto o fumigante el modo de acción aún no está completamente identificado pero los síntomas de los insectos intoxicados indican un efecto neurotóxico (Tripathi et al. 2009). Según Re et al. (2000) el monoterpeno linalool actúa sobre el sistema nervioso central afectando el transporte de iones y la liberación de acetilcolinesterasa. Además Isman (2000) señala que estudios realizados con *Periplaneta americana* L. (Blattodea: Blattidae) indican que los aceites esenciales afectan los receptores de la octopamina causando alteraciones irreversibles en el sistema nervioso. Al respecto Koul et al. (2008), agregan que como la octopamina se encuentra solo en los insectos los aceites esenciales son seguros para mamíferos.

Las investigaciones con plantas nativas de Chile estudiadas por su efecto insecticida e insectistático sobre insectos asociados a granos almacenados son limitados y se focalizan en especies de la familia Monimiaceae entre las que se encuentran Boldo (*Peumus boldus* Molina), Laurel (*Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y Tepa (*Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde). Pizarro et al. (2013 y 2014) y Torres et al. (2014a y 2014b) determinaron que el polvo y aceite esencial de *P. boldus* y *L. sempervirens* respectivamente presentan actividad biológica como insecticida de contacto y fumigante e insectistática como repelente sobre adultos de *S. zeamais* mientras que en el caso de *L. philippiana* Ortiz

et al. (2012) y Norambuena et al. (2016), documentan actividad similar del polvo y aceite esencial de esta especie. Sin embargo, el uso masivo de compuestos vegetales puede poner en riesgo la densidad natural de la planta recolectada en campo para elaborar los insecticidas botánicos, por lo que es necesario buscar alternativas que permitan, sin perder la eficacia, utilizar la menor cantidad posible de material vegetal. Una de estas opciones es utilizar mezclas de polvos o aceites esenciales con actividad insecticida buscando un efecto de potenciación. Al respecto, existen estudios de aceites esenciales que aplicados en mezclas presentan mayor toxicidad sobre *S. zeamais*, que cuando se aplican individualmente (Tatsadjieu *et al.*, 2010). Bekele y Hassanali (2001) indican que la mezcla de los aceites esenciales de *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Labiatae) y *Ocimum kenyense* Ayobangira (Labiatae) presenta mayor toxicidad que cada una por separado o que sus principales compuestos aislados contra *S. zeamais* y *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae). Así mismo existen antecedentes de que el uso de compuestos vegetales en mezcla con insecticidas sintéticos como malatión (Yuya *et al.*, 2009) o pirimifós metílico (Obeng-Ofori y Amiteye, 2005) potencian su acción tóxica contra *S. zeamais*. Shaalan et al. (2005) obtuvieron mayor toxicidad contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Culex annulirostris* Skuss (Diptera: Culicidae) de fenitrotion (organofosforado) y lambda-cialotrina (piretroide) cuando los mezclaron con aceite esencial de semillas de *Khaya senegalensis* Juss (Meliaceae). Igualmente Maurya et al. (2012) mezclaron aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. (Labiatae) con Imidacloprid (Cloronicotínico) obteniendo mayor mortalidad de *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) con la mezcla que con el insecticida. Este efecto de potenciación incluso se ha obtenido con monoterpenos individuales como lo registran Abbassy et al (2009) quienes mezclaron Terpinen-4-ol y Gama-terpineno con profenofos y metomil aumentando significativamente la toxicidad de estos insecticidas contra *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae). Sin embargo, esto último no es una regla general ya que según Don Pedro et al. (1996) el aceite esencial extraído del epicarpio de cítricos presenta mayor toxicidad como fumigante contra *C. maculatus*, que sus principales compuestos por separado o mezclados artificialmente lo cual de acuerdo a Hummelbrunner e Isman (2001) se debe a que algunos compuestos que pueden estar en pequeñas concentraciones actúan como sinergistas potenciando la acción de los de mayor abundancia. Por todo lo antes expuesto la hipótesis y objetivos de la presente investigación fueron los siguientes.

HIPÓTESIS

La mezcla de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* potencia su actividad insecticida e insectistática sobre adultos de *Sitophilus zeamais*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar, en condiciones de laboratorio, la actividad insecticida de contacto, fumigante e insectistática como repelente de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y en combinación, contra adultos de *S. zeamais*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto insecticida de contacto y fumigante de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y combinados en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20, contra adultos de *S. zeamais*.
2. Evaluar la actividad insectistática como repelente de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y en combinación en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20, contra adultos de *S. zeamais*.

LITERATURA CITADA

- Abbassy, M., S.A. Addelgaleil and R.Y.A. Rabie. 2009. Insecticidal and synergistic effects of Majorana hortensis essential oil and some of its major constituents. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 131: 225-232.
- Arias, C. and H. Dell'Orto. 1983. Distribución en importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. FAO-INIA. Santiago. Chile.
- Asawalam, E.F., A. Hassanali. 2006. Constituents of the essential oil of *Vernonia amygdalina* as maize weevil protectants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 6:95-102.
- Aslan, I., H. Özbek, Ş. Kordali, Ö. Çalmaşur, A., Çakir. 2004. Toxicity of essential oil vapours obtained from Pistacia spp. to the granary weevil, *Sitophilus zeamais* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*. 111:400-407.
- Bekele, J. and A. Hassanali. 2001. Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum kilimandscharicum* and *Ocimum kenyense* (Labiatae) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry* 57:385-391.
- Hummelbrunner, L.A. and M.B. Isman. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpene essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49:715-720.
- Chaudhry, M. Q. 2000. Phosphine resistance. *Pesticide Outlook* 3, 88-91.
- Don-Pedro, K.N. 1996. Investigation of single and joint fumigant insecticidal action of citrus peel oil components. *Pestic. Sci.* 46:79-84.
- Emeasor, K.C., R.O. Ogbuji and S.O. Emosairue. 2005. Insecticidal activity of some seed powders against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) on stored cowpea. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 112(1):80-87.

- Fields, P. and N. White. 2002. Alternatives to methyl bromide treatments for stored-product and quarantine insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47:331-3359.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M. P., Ribeiro, B., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 30-38.
- Hagstrum, D. and P. Flinn. 1996. Integrated pest management. *In*: B. Subramanyam and D.W. Hagstrum (Eds). *Integrated management of insects in stored products*. Pp. 399-408. Marcel Dekker, Inc. New York. USA.
- Huang F. and B. Subramanyam. 2005. Management of five stored-product insects in wheat with pirimiphosmethyl and pirimiphos-methyl plus synergized pyrethrins. *Pest Management Science* 61: 356-362.
- Isman, M.B. 2000. Plant essential oil for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608.
- Koul, O., S. Walia and G.S. Dhaliwal. 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.* 4(1): 63–84.
- Lahlou, M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytoter. Res.* 18:435-448.
- Larraín, P. 1994. Manejo integrado de plagas en granos almacenados. *IPA La Platina* 81:10-16.
- Maurya, P., P. Sharma, L. Mohan, M. M. Verma and C. N. Srivastava. 2012. Larvicidal efficacy of *Ocimum basilicum* extracts and its synergistic effect with neonicotinoid in the management of *Anopheles stephensi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases* 12:110-116.
- Norambuena, C., G. Silva, A. Urbina, I. Figueroa and J.C. Rodríguez. 2016. Insecticidal activity of *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde (Atherospermataceae) essential oil against *Sitophilus* spp. (Coleoptera Curculionidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(2): **En prensa**
- Obeng-Oferi, D., Ch. Reichmuth, A. Bekeles and A. Hassanali. 1998. Toxicity and protectant potential of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum*, against four stored product beetles. *Int. J. Pest Manag.* 44(4): 203-209.
- Padin S., G. D. Bello and M. Fabrizio 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Product Research* 38: 69–74.
- Piesik, D. and A. Wenda-Piesik. 2015. *Sitophilus granarius* responses to blends of five

- groups of cereal kernels and one group of plant volatiles. *Journal of Stored Products Research* 63:63-66.
- Pizarro, D., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, A. Urbina, A. Lagunes, C. Santillán-Ortega, A. Robles-Bermúdez y Sotero Aguilar-Medel. 2013. Actividad insecticida del polvo de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12(4):420-430.
- Pizarro, D., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, A. Urbina, A. Lagunes, C. Santillán-Ortega, A. Robles-Bermúdez, Sotero Aguilar-Medel e I. Tucuch. 2014. Aceite esencial de follaje de *Peumus boldus* colectado en otoño para el control del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science*. 30(3):171-180.
- Pretheep-Kumar, P., S. Mohan and P. Balasubramanian. 2010. Insecticide resistance stored-products insects. Mechanism and management strategies. Lambert Academic Publishing. Lexington, KY. USA.
- Re L, S. Barocci, S. Sonnino, A. Mencarelli, C. Vivani, G. Paolucci, A. Scarpantonio, L. Rinaldi and E. Mosca. 2000. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. *Pharmacol. Res.* 42: 177-181.
- Regnault-Roger, C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*. 2: 25-34.
- Roel, A and J.D. Vendramim. 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciencia Rural* 36: 1049-1054.
- Samboon, S. and S. Pimsamam. 2006. Biological Activity of *Cleome* spp. Extracts Against the Rice Weevil, *Sitophilus oryzae* L. *Agricultural Sci. J.* 37: 5 (Suppl.):232-235.
- Shalan, E., D.V. Canyon, M.W. Younes, H. Abdel-Wahab and A. Mansour. 2005. Synergistic efficacy of botanicals blends with and without synthetic insecticides against *Aedes aegypti* and *Culex annulirostris* mosquitoes. *Journal of Vector Ecology* 30:284-288.
- Shaaya E. and M. Kostjukovsky. 2009 The potential of biofumigants as alternatives to methyl bromide for the control of pest infestation in grain and dry food products, *Recent Advances in Plant Biotechnology*. 4:389-403.
- Tatsadjieu, N. L., A. Yaouba, E. N. Nukenine, M. B. Ngassoum and C. M. F. Mbofung. 2010. Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Food Control* 21:186-190.

- Torres, C., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, I. Figueroa, A. Lagunes, C. Santillán, A. Robles, S. Aguilar and I. Tucuch. 2014a. Insecticidal activity of *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Til. Essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Chilean Journal of Agricultural Research 74(4):421-426.
- Torres, C., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, I. Figueroa, A. Lagunes, C. Santillán, A. Robles y S. Aguilar. 2014b. Propiedades insecticidas del polvo de *Laurelia sempervirens* L. para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 14(1):48-59.
- Tripathi, A. K., S. Upadhyay, M. Bhuiyan and P.R. Bhattacharya. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 1(5): 052-063.
- Tripathi, A.K. and S. Upadhyay. 2009. Repellent and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) leaf essential oil against four stored-grain coleopteran pests. International Journal of Tropical Insect Science 29(4):219-228.
- Warapon, J., and A. Chandrapatya. 2009. Repellency, fumigant and contact toxicities of *Litsea cubeba* (Lour.) Persoon against *Sitophilus zeamais* and *Tribolium castaneum* (Herbst). Kaestsart J. (Nat. Sci) 43:56-63.
- White, N. 1995. Insects, mites, and insecticides in stored-grain ecosystems. In: D. Jayas, N. White and W.E. Muir. (Eds). Stored-Grain Ecosystems. Pp. 123-167. Marcel Dekker, Inc. New York. USA.
- Yuya, A. I., A. Tadesse, F. Azerefegne and T. Tefera. 2009. Efficacy of combining niger seed oil with malathion 5% dust formulation on maize against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research. 42:67-70.
- Zettler, J.L. and F.H. Arthur. 2000. Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. Crop Protection. 19:577-582.

CAPÍTULO I

Repelencia de mezclas de aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky.

Gabriel Bustos¹, Gonzalo Silva^{1*}, Susana Fisher¹, Inés Figueroa¹, A. Urbina¹ y J.C. Rodríguez²

Resumen. *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) es uno de los insectos plaga más importante de los cereales almacenados. Debido a los problemas asociados al uso de insecticidas convencionales como la presencia de residuos peligrosos y desarrollo de resistencia, se ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas como los compuestos de origen vegetal. El objetivo de la presente investigación fue evaluar, en condiciones de laboratorio, la actividad repelente de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y combinados en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20 contra adultos de *S. zeamais*. Los principales componentes identificados en el aceite esencial de *L. sempervirens* fueron Safrol (59.1%) y Metil-eugenol (28.4%). En *L. philippiana* se detectó Safrol (39.5%) y Linalool (34.4%) y en *P. boldus* los metabolitos más concentrados fueron Ascaridol (24.3%) y 1-8-cineol (14.8%). Todos los tratamientos evaluados mostraron actividad repelente ya que presentaron un IR<1. En los aceites evaluados individualmente, el mayor efecto de repelencia se obtuvo con las concentraciones de 4.0 y 8.0%. El aceite esencial de *L. philippiana* alcanzó 90% de insectos repelidos (IR<0.25). En las proporciones de 1:1 y 1:10, el efecto repelente aumentó ya que los tratamientos de 2.0, 4.0 y 8.0% tuvieron valores del IR equivalentes al 90%. En la proporción 1:20 el efecto repelente disminuyó y solamente en los tratamientos al 8.0% se alcanzó el 90% de efectividad. Se concluye que la mezcla de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones 1:1 y 1:10 potencia el efecto repelente sobre *S. zeamais*.

Abstract. *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) is one of the most important pest of stored cereals. Due to the undesirable effects of conventional insecticides such as the presence of dangerous residues and development of resistance, it has been necessary to look for new control alternatives such as the botanical insecticides. The objective of this research was to assess, under laboratory conditions, the repellent effect of essential oils from *P. boldus*, *L. sempervirens* and *L. philippiana*, singly and mixed in proportions of 1:1, 1:10 and 1:20. The main identified chemical compounds in the essential oil of *L. sempervirens* were Safrole (59.1%) and Methyl-eugenol (28.4%). In *L. philippiana* we identified Safrole (39.5%) and Linalool (34.4%) and in *P. boldus*, the most concentrated metabolites were Ascaridole (24.3%) and 1-8-cineole (14.8%). All assessed treatments showed repellent activity since they displayed an IR<1. In oils evaluated singly, the highest

¹Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Vicente Méndez 595, Chillán, Chile.

²Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, km 38.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, México.

*Autor para correspondencia (gosilva@udec.cl).

repellency was obtained at concentrations of 4.0 and 8.0%. The essential oil of *L. philippiana* caused 90% of insect repellency (IR<0.25). In the proportions of 1:1 and 1:10, the repellent effect increased since the treatments of 2.0, 4.0 and 8.0% showed IR values equivalent to 90%. In the proportion 1:20, the repellent effect decreased, and only in the treatments of 8.0% a 90% of efficacy was reached. We concluded that mixing the essential oils of *P. boldus*, *L. sempervirens* and *L. philippiana* at the proportions of 1:1 and 1:10, enhances the repellent effect against *S. zeamais*.

Introducción

El gorgojo del maíz, (*Sitophilus zeamais* Motschulsky; Coleoptera: Curculionidae), es considerado mundialmente como uno de los insectos plaga más destructivos de los cereales almacenados (Wale y Assegie, 2015). El daño causado por esta especie de insectos provoca reducción del valor nutricional, del potencial de germinación y del valor comercial de los cereales (Yuya et al. 2009). El principal método de control se sustenta en el uso de insecticidas de contacto y fumigantes (Santos et al. 2015). Sin embargo, el desarrollo de resistencia y la demanda por parte de los consumidores de productos libres de residuos peligrosos a la salud humana (Piesik y Wenda-Piesik, 2015) han hecho necesaria la búsqueda de otras opciones de control.

Una de las alternativas consiste en resurgir, con visión moderna, el uso de los compuestos vegetales, mismos que han sido utilizados para el control de insectos y ácaros desde tiempos remotos en forma de polvos, extractos o aceites esenciales; siendo estos últimos los que presentan un mayor potencial para el control de plagas de los granos almacenados (Regnault-Roger, 1997). Los aceites esenciales son complejos de compuestos volátiles, que pertenecen al metabolismo secundario y se caracterizan por un fuerte aroma (Tripathi et al. 2009). De acuerdo a Koul et al. (2008), los aceites esenciales presentan actividad biológica como insecticidas de contacto o fumigantes y preventivos como antialimentarios y repelentes.

Los repelentes son sustancias que actúan localmente o a distancia disuadiendo al insecto de volar hacia un lugar determinado, aterrizar en éste o alimentarse (Nerio et al. 2010). Entre las plantas nativas de Chile que han presentado efecto repelente sobre *S. zeamais* se destacan Boldo (*Peumus boldus* Molina), Laurel (*Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y Tepa (*Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde), todas pertenecientes a la familia Monimiaceae. Pizarro et al. (2013 y 2014) y Torres et al. (2014a y 2014b) determinaron que el polvo y aceite esencial de *P. boldus* y *L. sempervirens* presentan actividad biológica como repelente en concentraciones iguales o superiores a 0.25%. Por su parte Ortiz et al. (2012), documentan que el polvo de *L. philippiana* también presenta efecto repelente sobre adultos de *S. zeamais*. Sin embargo, el uso masivo de compuestos vegetales puede poner en riesgo la densidad natural de la planta que es recolectada en campo para preparar los insecticidas botánicos, por lo que es necesario buscar alternativas que permitan, sin perder la eficacia, utilizar la menor cantidad posible del compuesto vegetal. Una de estas opciones es utilizar mezclas de polvos o aceites esenciales con actividad insecticida buscando un posible efecto de potenciación. Al respecto, existen estudios de aceites esenciales que aplicados en mezclas presentan mayor toxicidad sobre *S. zeamais*, en comparación cuando se aplican individualmente (Tatsadjieu et al., 2010). Así mismo existen antecedentes de que el uso de compuestos vegetales en mezcla con insecticidas sintéticos como malatión (Yuya

et al., 2009) o pirimifós metílico (Obeng-Ofori y Amiteye, 2005) potencian su acción tóxica contra *S. zeamais*. El objetivo de la presente investigación fue evaluar, en condiciones de laboratorio, la actividad repelente de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y en combinación, contra adultos de *S. zeamais*.

Materiales y Métodos

Aceites esenciales. Los aceites esenciales se obtuvieron de follaje recolectado en la zona de Pinto (36°42'0" S, 71°54'0" W; 286 m.s.n.m.), Región del Biobío, Chile, en el caso de *P. boldus* y *L. sempervirens* y de Maullín (40°41' S, 73°25' W; 28 m.s.n.m.), Región de Los Lagos, Chile, en *L. philippiana*. El criterio de recolecta fue el de Vogel et al. (1997), que consiste en seleccionar hojas al azar, de los cuatro puntos cardinales y en distintos lugares dentro del árbol. El follaje recolectado se lavó con agua potable para eliminar contaminantes, y posteriormente se sometió a destilación por arrastre de vapor en un aparato tipo Clevenger durante dos horas utilizando agua destilada (Kouninki et al., 2007). El aceite obtenido se mezcló con sulfato de sodio anhidro (Winkler Ltda., Santiago de Chile, Chile) para eliminar los restos de agua y posteriormente se conservó en frío a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en envases de vidrio color ámbar, hasta su utilización en los bioensayos. La composición de los aceites esenciales de las tres especies vegetales se analizó individualmente en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, Campus Concepción, Chile.

Insectos. Los insectos provinieron de colonias permanentes que se mantienen en el Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, en una cámara bioclimática (IPS 749, Memmert GmbH, Schwabach, Alemania) en condiciones de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% de humedad relativa y oscuridad total utilizando maíz (*Zea mays* L.) Cv. Dekalb DK 440 (Anasac Chile S.A.) como sustrato alimenticio. Siete días antes de iniciar los bioensayos se extrajeron todos los insectos adultos de las colonias y la progenie emergida (F_1) se ocupó en los bioensayos. El maíz utilizado para las colonias y bioensayos se obtuvo de la Estación Experimental "El Nogal" de la Facultad de Agronomía y para evitar cualquier infestación previa por insectos o residuo de insecticida este se lavó con agua potable y posteriormente se almacenó en refrigeración ($4.5 \pm 1^\circ\text{C}$) por 72 horas.

Metodología. La metodología utilizada consistió en una arena de libre elección, consistente en cinco placas Petri plásticas de 5 cm de diámetro, distribuidas cuatro de ellas alrededor de una placa central conectadas por tubos plásticos de 10 cm de largo y 0.25 cm de diámetro, formando una "X" (Procópio *et al.*, 2003). En cada una de las cuatro placas periféricas, se depositaron 20 g de maíz, pero en solo dos de ellas, opuestas diagonalmente, se aplicaron los tratamientos a evaluar. Luego, en la placa central se liberaron 50 insectos adultos sin diferenciación de sexo, de menos de 48 h de edad y a las 24 horas se contabilizó el número de insectos por placa. Cada arena de selección constituyó una repetición y se montaron 10 de ellas y la metodología se repitió cinco veces en diferentes días. En cada repetición se rotó la posición de los tratamientos y con los valores obtenidos se calculó el índice de repelencia (IR) de Mazzonetto y Vendramim (2003) que clasifica al tratamiento como repelente si $\text{IR} < 1$, atrayente si $\text{IR} > 1$ y neutro si $\text{IR} = 1$. Sin embargo, considerando

que IR=1 equivale a 50% de insectos repelidos se elaboró una escala complementaria para cuantificar de manera más precisa los tratamientos clasificados como repelentes (Tabla 1).

Tabla 1.- Escala de intensidad de repelencia de acuerdo a valores obtenidos con el índice de Mazzonetto y Vendramim (2003).

Valor índice de repelencia	Categoría
≥ 1.0	Sin repelencia
0.76-0.99	Repelencia débil
0.51-0.75	Repelencia moderada
0.26-0.50	Repelencia alta
0.0-0.25	Repelencia muy alta

Los tratamientos consistieron en mezclas de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones de 1:0, 1:1, 1:10 y 1:20 (Ahmad *et al.* (2009) y cada una de estas en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0% (v/v). Las diferentes concentraciones se prepararon utilizando acetona como solvente (99% pureza) y se agitaron por 30 segundos en un agitador vortex (Vortex V-1plus, Boeckel & Co. GmbH & Co. KG, Hamburg, Alemania) para formar una solución homogénea.

El diseño experimental fue complemente al azar y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de contrastes no ortogonales a aquellos tratamientos que se consideraron como efectivos al presentar un IR ≤ 0.2 equivalente a $\geq 90\%$ de insectos repelidos. Todos los análisis se realizaron con el software Statistical Analysis System (SAS) (SAS, 1998).

Resultados y discusión

El análisis fitoquímico de los aceites esenciales mostró que los principales componentes del aceite esencial de *L. sempervirens* fueron Safrol y Metil-eugenol con 59.1 y 28.4%, respectivamente. En *L. philippiana* se repitió Safrol como uno de los más abundantes con 39.5% pero también se detectó la presencia significativa de Linalool con 34.4%. En esta última especie, Metil-eugenol solo se presentó en 4.4%. En el caso de *P. boldus* no se detectó la presencia de Linalool mientras que Safrol (1.4%) y Metil-eugenol (0.4%) se encontraron en bajas concentraciones. Los compuestos más abundantes en esta especie fueron Ascaridol con 24.3% y 1-8-cineol con 14.8% (Tabla 2).

Los resultados del índice de repelencia indican que a medida que se incrementa la concentración de aceite esencial, aumenta también el efecto repelente, tanto de los aceites individuales como en mezcla. Según Nerio *et al.* (2010) esto se debe a que al incrementar la concentración de aceite esencial aumenta también la cantidad de terpenoides que son los compuestos químicos que presentan la actividad disuasiva. Al analizar los aceites individualmente se observa que el mayor efecto de repelencia se obtuvo con las concentraciones de 4.0 y 8.0% aunque solo con el aceite esencial de *L. philippiana* esta última concentración alcanzó el 90% de insectos repelidos con un IR de 0.23 que según la Tabla 1 corresponde a una repelencia muy alta. En el caso de *L. sempervirens* y *P. boldus* con la concentración máxima evaluada se obtuvo un IR de 0.38 y 0.56 lo que significa que la repelencia fluctuó entre 70 y 80% (Tabla 3) clasificándose como moderada a alta. Los

resultados con *L. sempervirens* coinciden con Torres et al. (2014a) quienes con concentraciones $\geq 0.25\%$ de aceite esencial de follaje de esta especie obtuvieron efecto repelente sobre *S. zeamais*. Zapata y Smagghe (2010) evaluaron el aceite esencial de hojas y corteza de *L. sempervirens* obteniendo una fuerte repelencia sobre *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). En el caso de *P. boldus* los valores del índice de repelencia coinciden con Betancur et al (2010) y Pizarro et al (2014) quienes también reportan un efecto repelente a partir de una concentración de 0.25% de aceite esencial.

Tabla 2.-Composición química de los aceites esenciales de follaje de *Laurelia sempervirens*, *Laureliopsis philippiana* y *Peumus boldus*.

Constituyentes	Concentración constituyentes (%)		
	<i>Laurelia sempervirens</i>	<i>Laureliopsis philippiana</i>	<i>Peumus boldus</i>
1-8-cineol	-	8.28	14.85
Isoterpinoleno	-	-	-
Terpineol	-	3.32	2.14
Terpinen-4-ol	-	-	3.37
g-Terpineno	2.31	0.14	3.94
p-Cimeno	-	0.07	0.21
Methyl-eugenol	28.49	4.47	0.46
Safrol	59.11	39.56	1.45
Linalool	0.61	34.45	-
(E)germacreno D	0.72	0.84	0.45
B-Tujeno	4.56	0.04	0.32
Ascaridol	-	-	24.37

La mayor repelencia obtenida con los aceites esenciales de *L. sempervirens* y *L. philippiana*, en comparación a *P. boldus*, se puede deber al alto contenido de Safrol, Metil-eugenol y Linalool que presentan estas especies. Al respecto, Ngho et al (1998) señala que Safrol presenta mayor repelencia de ninfas de *Periplaneta americana* (L.) que Metil-eugenol y α -pineno entre otros compuestos. Huang et al. (1999) señalan que Safrol presenta efecto de inhibición de la alimentación en *S. zeamais* y *T. castaneum*. El único tratamiento que alcanzó una repelencia de 90% (IR<2.5) fue la concentración de 8% de *L. philippiana* lo cual podría atribuirse a un efecto de potenciación entre Safrol y Linalool, sus dos compuestos químicos más abundantes, ya que este último como compuesto mayoritario de otros aceites esenciales también ha mostrado efecto repelente contra *S. zeamais* (Cansian et al 2015) y otros insectos como *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (Müller et al 2009), *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) (Mao-xin et al 2004) y *Lycorma delicatula* (White) (Hemiptera: Fulgoridae) (Yoon et al 2011). Sobre Metil-eugenol no existen muchos antecedentes sobre repelencia pero Wu et al (2015) documentan que el aceite esencial de *Liriope muscari* Bailey (42.15% de Metil-eugenol) presenta una fuerte repelencia contra *Lasioderma serricorne* (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae), *Liposcelis bostrychophila* Badonnel (Psocoptera: Liposcelididae) y *T. castaneum*. Finalmente en relación a los principales compuestos químicos de *P. boldus* solo 1-8 cineol presenta antecedentes como repelente. Este compuesto individualmente ha mostrado actividad contra *S. zeamais*, *S. granarius* (Obeng-Ofori et al 1997) y *A. aegypti* (Klocke et al 1987) y

como compuesto mayoritario de un aceite esencial contra *S. zeamais* (Ukeh et al 2009), *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae) (Traboulsi et al 2005), *Neotoxoptera formosana* (Takahashi) (Homoptera: Aphididae) (Hori and Komatsu, 1997) y *T. castaneum* (Wang et al 2006).

Tabla 3.- Repelencia de los aceites esenciales de *Laurelia sempervirens*, *Laureliopsis philippiana* y *Peumus boldus* evaluados individualmente contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	Concentración (%) (v/v)	Índice de Repelencia (IR)*
<i>P. boldus</i>	0.5	0.86
	1.0	0.84
	2.0	0.69
	4.0	0.69
	8.0	0.56
<i>L. sempervirens</i>	0.5	1.18
	1.0	1.19
	2.0	0.70
	4.0	0.40
	8.0	0.38
<i>L. philippiana</i>	0.5	0.87
	1.0	0.91
	2.0	0.51
	4.0	0.27
	8.0	0.23

* IR= (2*G) / (G*P) donde G=porcentaje (%) de insectos presentes en la placa con tratamiento y P=porcentaje (%) de insectos presentes en placa testigo. IR< 1 Repelente, IR>1 atrayente, IR=1 neutro.

Al realizar la mezcla de los aceites esenciales en proporciones iguales (1:1) se observó que en comparación a los aceites esenciales individuales el efecto repelente aumentó ya que los valores del IR se alejaron más de 1, valor umbral para considerar a un tratamiento como repelente. Específicamente los tratamientos de 4.0 y 8.0%, en todas las combinaciones, mostraron valores que de acuerdo a la Tabla 1 se clasifican como con una repelencia muy alta (Tabla 4) siendo que individualmente solo *L. philippiana* al 8.0% alcanzó este umbral. En las concentraciones menores solo el tratamiento al 2.0% de la mezcla de *L. sempervirens*-*L. philippiana* mostró un IR (0.13) que clasifica al tratamiento como con muy alta repelencia. Los restantes tratamientos tuvieron IR que los califica con repelencia débil a moderada. Esta tendencia concuerda con Liu et al. (2006) quienes al mezclar el aceite esencial de *Artemisia princeps* Pamp (Asteraceae) con el de *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl (Lauraceae) en proporción de 1:1 obtuvieron un incremento significativo en el efecto repelente sobre adultos de *Sitophilus oryzae* L. y *Bruchus rufimanus* Bohem (Coleoptera: Chrysomelidae). Mwangi et al. (2013) documentan que los responsables del efecto repelente del aceite esencial de *Capparis tormentosa* Lam (Capparaceae) contra adultos de *S. zeamais* son Nerolidol y Linalool, los cuales presentan mayor efecto repelente cuando se mezclan que cuando se aplican individualmente. Según Hummelbrunner e Isman (2001) el

efecto repelente de los aceites esenciales generalmente es atribuido a algunos compuestos específicos pero usualmente a causa de un efecto sinérgico entre estos se obtiene una mayor actividad cuando se combinan que al utilizarse individualmente.

Tabla 4.-Repelencia de los aceites esenciales de *Laurelia sempervirens*, *Laureliopsis philippiana* y *Peumus boldus* individualmente y mezclados en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	Concentración (%) (v/v)	Índice repelencia (IR)*		
		Proporción aceite esencial		
		1:1	1:10	1:20
<i>P. boldus</i> - <i>L. sempervirens</i>	0.5	0.77	0.86	0.88
	1.0	0.83	0.52	0.92
	2.0	0.46	0.23	0.45
	4.0	0.21	0.18	0.27
	8.0	0.10	0.10	0.10
<i>P. boldus</i> – <i>L. philippiana</i>	0.5	1.04	0.51	1.14
	1.0	0.82	0.64	0.85
	2.0	0.49	0.46	0.69
	4.0	0.78	0.37	0.76
	8.0	0.15	0.26	0.23
<i>L. sempervirens</i> - <i>L. philippiana</i>	0.5	0.59	0.92	0.95
	1.0	0.82	0.95	0.99
	2.0	0.13	0.48	0.62
	4.0	0.12	0.55	0.64
	8.0	0.03	0.15	0.09
<i>L. sempervirens</i> - <i>P. boldus</i>	0.5	-	0.41	0.89
	1.0	-	0.15	0.87
	2.0	-	0.21	0.46
	4.0	-	0.13	0.31
	8.0	-	0.02	0.37
<i>L. philippiana</i> - <i>P. boldus</i>	0.5	-	0.77	0.62
	1.0	-	0.53	0.82
	2.0	-	0.28	0.35
	4.0	-	0.33	0.30
	8.0	-	0.10	0.002
<i>L. philippiana</i> - <i>L. sempervirens</i>	0.5	-	0.73	0.97
	1.0	-	0.70	0.70
	2.0	-	0.41	0.51
	4.0	-	0.42	0.48
	8.0	-	0.32	0.16

* $IR = (2 \cdot G) / (G \cdot P)$ donde G=porcentaje (%) de insectos presentes en la placa con tratamiento y P=porcentaje (%) de insectos presentes en placa testigo. $IR < 1$ Repelente, $IR > 1$ atrayente, $IR = 1$ neutro.

En la proporción 1:20 solamente la concentración de 8.0% mantuvo en la mayoría de los tratamientos un IR inferior a 0.25 (equivalente en al menos a un 85% de insectos repelidos) para ser clasificado como con muy alta repelencia. Esta situación solamente no se observó en la mezcla de *L. sempervirens*-*P. boldus* que alcanzó un IR de 0.37 que identifica al tratamiento como con repelencia alta. La disminución del número de tratamientos con repelencia calificada como alta o muy alta se puede deber a que en esta proporción se produce una actividad antagónica entre los compuestos químicos que conforman los aceites esenciales. Al respecto Pavlidou et al. (2004), señalan que combinaciones de aceites esenciales o de los principales componentes aislados en determinadas proporciones pueden mostrar un efecto antagónico en la toxicidad sobre *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) y *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae). Igualmente Franzios et al. (1997) indican que la toxicidad de los aceites esenciales no presenta una relación lineal con la concentración de los principales componentes por lo que cada combinación debe evaluarse de manera independiente ya que la presencia de algunos compuestos, aunque se encuentren en pequeñas concentraciones, pueden producir reacciones antagónicas. Finalmente, el análisis estadístico de los tratamientos que mostraron $\geq 90\%$ de insectos repelidos ($IR \leq 0.2$) no mostró diferencias significativas ($gl=67$, $F=1.06$, $P=0.415$) entre ellos. Sin embargo, al realizar el análisis de contrastes no ortogonales se pudo observar que la única diferencia estadística se encuentra entre los tratamientos en concentraciones de 8.0% con los de 2 y 4% (Tabla 5). Por tanto, los tratamientos en concentraciones de 8.0% conformados por mezclas en proporciones de 1.1, 1:10 o 1:20 presentan un significativamente mayor efecto repelente que los restantes tratamientos evaluados y por ende debieran preferirse para la protección de cereales almacenados.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la mezcla de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones de 1:1 y 1:10 en concentraciones de 2, 4 y 8% presentan efecto de potenciación en su actividad repelente. Sin embargo, los resultados deben ser validados en pruebas en bodega con mayores volúmenes de grano.

Agradecimientos

Los autores agradecen al programa Fondecyt iniciación de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) que a través del proyecto N° 11110105 “Essential oil of *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz et Pau.) Tul and *Laureliopsis philippiana* Looser as an alternative to synthetic insecticides to *Sitophilus* spp. complex and *Acanthocelides obtectus* say control in stored seeds”, financió la presente investigación. Igualmente se agradece al M. Sc. José Luis Rodríguez Pineda por sus comentarios en la revisión de los borradores del presente artículo.

Tabla 5.-Análisis de contrastes de los tratamientos que mostraron al menos un $\geq 90\%$ de *S. zeamais* adultos repelidos.

		Contraste	Valor F	Valor P
<i>L. sempervirens</i> - <i>L. philippiana</i> (1:1) al 2%	vs	<i>P. boldus</i> - <i>L. sempervirens</i> (1:1) al 4%	0.21	0.6475 ns
<i>P. boldus</i> - <i>L. sempervirens</i> (1:10) al 2%		<i>L. sempervirens</i> - <i>L. philippiana</i> (1:1) al 4%		
<i>L. sempervirens</i> - <i>P. boldus</i> (1:10) al 2%		<i>P. boldus</i> - <i>L. sempervirens</i> (1:10) al 4%		
		<i>L. sempervirens</i> - <i>P. boldus</i> (1:10) al 4%		
<i>L. sempervirens</i> - <i>L. philippiana</i> (1:1) al 2%	vs	<i>P. boldus</i> - <i>L. sempervirens</i> (1:1) al 8%	3.66	0.0615 ns
<i>P. boldus</i> - <i>L. sempervirens</i> (1:10) al 2%		<i>P. boldus</i> - <i>L. philippiana</i> (1:1) al 8%		
<i>L. sempervirens</i> - <i>P. boldus</i> (1:10) al 2%		<i>L. sempervirens</i> - <i>L. philippiana</i> (1:1) al 8%		
		<i>P. boldus</i> - <i>L. sempervirens</i> (1:10) al 8%		
		<i>L. sempervirens</i> - <i>L. philippiana</i> (1:10) al 8%		
		<i>L. sempervirens</i> - <i>P. boldus</i> (1:10) al 8%		
		<i>L. philippiana</i> - <i>P. boldus</i> (1:10) al 8%		
		<i>P. boldus</i> - <i>L. sempervirens</i> (1:20) al 8%		
		<i>P. boldus</i> - <i>L. philippiana</i> (1:20) al 8%		
		<i>L. sempervirens</i> - <i>L. philippiana</i> (1:20) al 8%		
		<i>L. philippiana</i> - <i>P. boldus</i> (1:20) al 8%		
		<i>L. philippiana</i> - <i>L. sempervirens</i> (1:20) al 8%		
Tratamientos al 4%	vs	Tratamientos al 8%	3.37	0.0723 ns
Tratamientos al 2%	vs	Tratamientos al 4% + Tratamientos al 8%	2.47	0.1219 ns
Tratamientos al 4%	vs	Tratamientos al 2% + Tratamientos al 8%	2.19	0.1454 ns
Tratamientos al 8%	vs	Tratamientos al 2% + Tratamientos al 4%	5.63	0.0215 *

* significativo $p \leq 0.05$, ns= no significativo.

Referencias citadas

- Ahmad, M., M.A. Saleem and A.H. Sayyed. 2009. Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid- and organophosphate-resistant populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science* 65:266-274.
- Betancur, J., G. Silva, J.C. Rodríguez, S. Fischer y N. Zapata. 2010. Insecticidal activity of *Peumus boldus* Molina essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean Journal of Agricultural Research (Chile)*. 70(3):399-407.
- Cansian, R.L., V. Astolfi, R.I. Cardoso, N. Paroul, S.S. Roman, A.A. Mielnoczki-Pereira, G.F. Pauletti and A.J. Mossi. 2015. Insecticidal and repellent activity of the essential oil of *Cinnamomum camphora* var. *Linaoolifera* Y. Fujita (Ho-Sho) and *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. Var. *Hosyo* (Hon-Sho) on *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera, Curculionidae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 17:769-773.
- Franzios, G., M. Mirotsoy, E. Hatziapostolou, J. Kral, Z.G. Scouras and P. Mavragani-Tsipidou. 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food. Chem.* 45:2690-2694.
- Hori, M. and H. Komatsu. 1997. Repellency of Rosemary oil and its components against the Onion aphid, *Neotoxoptera formosana* (Takahashi) (Homoptera, Aphididae). *Appl. Entomol. Zool.* 32:303-310.
- Hummelbrunner, L.A. and M.B. Isman. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpene essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49:715-720.
- Huang, Y., H. Ho, and K. Manjunatha. 1999. Bioactivity of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 92:676-683.
- Huang, F., and B. Subramanyam. 2005. Management of five stored-product insects in wheat with pirimiphosmethyl and pirimiphos-methyl plus synergized pyrethrins. *Pest Management Science* 61:356-362.
- Klocke, J.A., M.V. Darlington and M.F. Balandrin. 1987. 1,8-Cineole (Eucalyptol), a mosquito feeding and ovipositional repellent from volatile oil of *Hemizonia fitchii* (Asteraceae). *J. Chem. Ecol.* 13:2131-2141.
- Koul, O., S. Walia and G.S. Dhaliwal. 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.* 4(1): 63-84.
- Kouninki, H., T. Hance, F.A. Noudjou, G. Lognay, F. Malaisse, M.B. Ngassoum, et al. 2007. Toxicity of some terpenoids of essential oil of *Xylopiya aethiopica* from Cameroon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Journal of Applied Entomology* 131(4):269-274.

- Liu, C.H., A.K. Mishra, R.X. Tan, C. Tang, H. Yang and Y.F. Shen. 2006. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresource Technology* 97:1969-1973.
- Mao-xin, Z., B. Ling, C. Shao-ying, L. Guang-wen and P. Xiong-fei. 2004. Repellent and oviposition deterrent activities of the essential oil from *Mikania micrantha* and its compounds on *Plutella xylostella*. *Entomologia Sinica* 11:37-45.
- Mazzonetto, F. e J. Vendramim. 2003. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. *Neotropical Entomology* 32(1): 145-149.
- Müller, G. A. Junnila, J. Butler, V.D. Kravchenko, E. E. Revay, R. W. Weiss and Y. Schlein. 2009. Efficacy of the botanical repellents geraniol, linalool, and citronella against mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*. 34:2-8.
- Mwangi, K., M. Ndung'u and L. Gitu. 2013. Repellent activity of the essential oil from *Capparis tomentosa* against Maize weevil *Sitophilus zeamais*. *Journal of Resources Development and Management*. 1:9-13.
- Nerio, L.S., J. Olivero-Verbel and E. Stashenko. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101:372-378.
- Ngoth, S., L.E.W. Choo, F. Y. Pang, Y. Huang, M.R. Kini and S.H. Ho. 1998. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the american cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Pestic. Sci.* 54:261-268.
- Obeng-Ofori, D., CH. Reichmuth and A. Hassanali. 1997. Biological activity of 1,8 cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. *J. Appl. Ent.* 121:237-243.
- Obeng-Ofori, D. and S. Amiteye. 2005. Efficacy of mixing vegetable oils with pirimiphos-methyl against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky in stored maize. *Journal of Stored Products Research* 41: 57-66.
- Ortiz, A., G. Silva, A. Urbina, N. Zapata, J.C. Rodríguez and A. Lagunes. 2012. Bioactivity of Tepa (*Laureliopsis philippiana* (Looser) Shodde) powder to *Sitophilus zeamais* Motschulsky control in laboratory. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(1):68-73.
- Pavlidou, V., I. Karpouthsis, G. Franzios, A. Zambetaki, Z. Scouras and P. Mavragani-Tsipidou. 2004. Insecticidal and genotoxic effects of essential oils of Greek sage, *Salvia fruticosa*, and Mint, *Mentha pulegium*, on *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *J. Agric. Urban Entomol.* 1:39-47.

- Piesik, D. and A. Wenda-Piesik. 2015. *Sitophilus granarius* responses to blends of five groups of cereal kernels and one group of plant volatiles. *Journal of Stored Products Research* 63:63-66.
- Pizarro, D., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, A. Urbina, A. Lagunes, C. Santillán-Ortega, A. Robles-Bermúdez y Sotero Aguilar-Medel. 2013. Actividad insecticida del polvo de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12(4):420-430.
- Pizarro, D., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, A. Urbina, A. Lagunes, C. Santillán-Ortega, A. Robles-Bermúdez, Sotero Aguilar-Medel e I. Tucuch. 2014. Aceite esencial de follaje de *Peumus boldus* colectado en otoño para el control del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science*. 30(3):171-180.
- Procópio, S., J. Vendramim, J.I. Ribeiro e J. dos Santos. 2003. Bioatividade de diversos pós de origem vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Ciência e Agrotecnología* 27(6): 1231-1236.
- Regnault-Roger, C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews*. 2: 25-34.
- Santos, A.C.V., C.C. Fernandes, L.M. Lopez and A.H. Souza. 2015. Use of plant oils from the southwestern Amazon for the control of maize weevil. *Journal of Stored Product Research* 63:67-70.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Tatsadjieu, N. L., A. Yaouba, E. N. Nukenine, M. B. Ngassoum and C. M. F. Mbofung. 2010. Comparative study of the simultaneous action of three essential oils on *Aspergillus flavus* and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Food Control* 21:186-190.
- Torres, C., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, I. Figueroa, A. Lagunes, C. Santillán, A. Robles, S. Aguilar and I. Tucuch. 2014a. Insecticidal activity of *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Til. Essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74(4):421-426.
- Torres, C., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, I. Figueroa, A. Lagunes, C. Santillán, A. Robles y S. Aguilar. 2014b. Propiedades insecticidas del polvo de *Laurelia sempervirens* L. para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 14(1):48-59.
- Traboulsi, A., S. El-Haj, M. Taobu, N.A. Nader and A. Mrad. 2005. Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus*

- (Diptera:Culicidae). Pest Manag Sci 61:597-604.
- Tripathi, A. K., S. Upadhyay, M. Bhuiyan and P.R. Bhattacharya. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 1(5): 52-63.
- Ukeh, D., M.A. Birkett, J.A. Pickett, A. S. Bowman and A.J.M. Luntz. 2009. Repellent activity of alligator pepper, *Aframomum melegueta*, and ginger, *Zingiber officinale*, against the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Phytochemistry 70:751-758.
- Vogel, H., I. Razmilic, y U. Doll. 1997. Contenido de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de boldo (*Peumus boldus* Mol.) Ciencia e Investigación Agraria 24:1-6.
- Wale, M. and H. Assegie. 2015. Efficacy of castor vean oil (*Ricinus communis* L.) against maize weevils (*Sitophilus zeamais* Mots.) in northwestern Ethiopia. Joirnal of Stored Product Researc. 63:38-41.
- Wang, J., F. Zhu, X.M. Zhou, C.Y. Niu and C.L. Lei. 2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Stored Products Research 42:339-347.
- Yoon, C., M. Sang-Rae, J. Jin-Won. S. Youn-Ho, C. Sun-Ran, A. Ki-Su, Y. Jeong-Oh and K. Gil-Hah. 2011. Repellency of lavender oil and linalool against spot clothing wax cicada, *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) and their electrophysiological responses. Journal of Asia-Pacific Entomology. 14:411-416.
- Yuya, A. I., A. Tadesse, F. Azerefegne and T. Tefera. 2009. Efficacy of combining niger seed oil with malathion 5% dust formulation on maize against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research. 42:67-70.
- Zapata, N., and G. Smagghe. 2010. Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. Industrial Crops and Products 32:405-410.
- Wu, Y., Z. Wen-Juan, W. Ping-Juan, K. Yang, H. Dong-Ye, W. Jian-Yu, T. Zhao-Fu, B. Jia-Feng and D. Shu-Shan. 2015. Contact toxicity and repellency of the essential oil of *Liriope muscari* (DECN.) Bailey against three insect tobacco storage pests. Molecules 20:1676-1685.

CAPÍTULO II

Potenciación de la actividad insecticida fumigante de mezclas de los aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky.

Gabriel Bustos², Gonzalo Silva^{1*}, Susana Fisher¹, Inés Figueroa¹, A. Urbina¹ y J.C. Rodríguez²

Resumen. Los insecticidas sintéticos han sido considerados durante décadas como el medio de control de insectos plaga de los cereales almacenados más eficaz. Sin embargo, su uso irracional ha producido efectos adversos como residuos peligrosos en alimentos, intoxicaciones y desarrollo de resistencia. El objetivo de la presente investigación fue evaluar, en condiciones de laboratorio, la actividad insecticida por fumigación de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y en combinación, contra adultos de *S. zeamais*. En la evaluación de los aceites esenciales de manera individual la mayor toxicidad se observó en *P. boldus* cuyo aceite a partir de la concentración de 100 µL aceite esencial L⁻¹ aire superó el 80% de mortalidad. En los tratamientos de mezclas en proporción de 1:1 y 1:20 se observó un efecto de potenciación ya que todos presentaron valores de ICA superiores a 1. Aunque, al analizar los IAC por especie se observó que en la proporción 1:10 *P. boldus* y *L. sempervirens* disminuyen su toxicidad al ser mezclados entre sí. En la proporción 1:20 los tratamientos en la concentración de 50 µL aceite esencial L⁻¹ aire presentaron una mayor mortalidad que los de la proporción 1:10 superando todos el 50% de mortalidad. Los valores del IAC para esta proporción mostraron que solo el tratamiento de *L. sempervirens*-*L. philippiana* mostró antagonismos al tener un valor de 0.96. Todos los restantes tratamientos fueron mayores a 1. Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten concluir que la mezcla del aceite esencial de *P. boldus* con *L. philippiana* en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20 potencian la actividad insecticida como fumigante de ambas especies.

Abstract. Synthetic insecticides has been the most effective pest control strategy for decades. However its irrational use has produced adverse effects such as dangerous residues in food, intoxications and development of resistance. The objective of this research was to assess, under laboratory conditions, the insecticidal activity by fumigation of the essential oils of *P. boldus*, *L. sempervirens* and *L. philippiana*, singly and mixed against adults of *S. zeamais*. In the evaluation of singly essential oils the highest toxicity was observed in *P. boldus* whose oil from 100 µL essential oil L⁻¹ air exceed 80% mortality. In treatments consisting of mixtures in proportions of 1:1 and 1:10 a potentiation effect was observed because all showed values of ICA higher to 1. Although while analyzing the IAC, by specie, we observed that the proportion 1:10 *P. boldus* and *L.*

²Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Vicente Méndez 595, Chillán, Chile.

²Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, km 38.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, México.

*Autor para correspondencia (gosilva@udec.cl).

sempervirens decreased their toxicity when mixed. In the 1:20 proportion, treatments at the concentration of 50 μL essential oil L^{-1} air exhibited a higher mortality than the treatments at 1:10 proportion because all surpass a 50% of mortality. The values of IAC for this proportion showed that treatment of *L. sempervirens*-*L. philippiana* had antagonism showing a value of 0.96. All other treatments were higher than 1. Results obtained suggest that mixing the essential oil of *P. boldus* with and *L. philippiana* at the proportions of 1:1, 1:10 and 1:20 have a potentiating effect of fumigant insecticidal activity.

Introducción

Los insecticidas sintéticos han sido considerados durante décadas como el medio de control de insectos plaga de los cereales almacenados más eficaz (Huang y Subramanyam, 2005). Sin embargo, su uso irracional ha producido efectos adversos como residuos en alimentos, intoxicaciones y desarrollo de resistencia (Roel y Vendramim, 2006). Usualmente se utilizan insecticidas de contacto como clorpirifos o malation y fumigantes como fosforo de aluminio (Pretheep-Kumar et al. 2010). Este último ha sido el tratamiento estándar durante la última década aunque en los últimos años ha comenzado a experimentar fallas de control (Guedes et al. 2006) lo cual ha hecho que cada vez sean mas frecuentes los reportes de casos de poblaciones de insectos resistentes (Chaudhry, 2000). De acuerdo a Pretheep-Kumar et al. (2010) la resistencia a fosforo de aluminio se ha reportado en al menos 11 especies de insectos asociados a cereales almacenados en 45 países diferentes. Todo esto ha hecho necesaria la búsqueda de alternativas que con una eficacia similar no presenten los efectos negativos de los insecticidas sintéticos.

Una gran cantidad de compuestos naturales han sido considerados para reemplazar al fosforo de aluminio destacándose entre estos los monoterpenos de los aceites esenciales. Koul et al. (2008), señalan que estos a causa de su alta volatilidad presentan un gran potencial como fumigantes. Al respecto Tripathi et al. (2009) reportan que el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.: Lamiaceae), albahaca (*Ocimum basilicum* L.: Lamiaceae), romero (*Rosmarinus officinalis* L.: Lamiaceae) y menta (*Mentha piperita* L.: Lamiaceae) son las especies mas promisorias como fumigantes naturales. Aunque, según Lee et al. (2004) el compuesto con mejores perspectivas futuras como fumigante es 1-8-cineol (Eucalyptol) el que aparte de encontrarse en una gran cantidad de aceites esenciales ha mostrado una alta toxicidad por fumigación junto con desaparecer del ambiente en 24 horas sin dejar residuos o producir cambios fisiológicos en las semillas.

Peumus boldus Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde, (Laurales: Monimiaceae) son plantas nativas de Chile cuyo aceite esencial ha mostrado efecto tóxico por fumigación contra insectos plaga de los granos almacenados como el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae)) y el bruco del frejol (*Acatoscelides obtectus* Say; Coleoptera: Chrysomelidae). Pizarro et al. (2014) evaluaron el aceite esencial de esta planta encontrado que se obtiene un 100% de mortalidad con una concentración equivalente a 233 μL aceite L^{-1} aire. Por su parte Torres et al. (2014) determinaron que una concentración de 175 μL de aceite esencial de *L. sempervirens* L^{-1} de aire provoca un 72% de insectos muertos. Finalmente, Norambuena et al. (2016) reportan que a partir de una concentración de 170 μL de aceite esencial de *L. philippiana* L^{-1} de aire se registra una toxicidad igual o superior al 80%. Sin embargo, el bajo rendimiento de la extracción de aceites esenciales hace

necesaria una gran cantidad de material vegetal por lo que su uso puede amenazar la densidad natural de la planta por lo que se requieren estrategias que, sin perder eficacia, utilicen la menor cantidad posible de follaje o flores. Una de estas estrategias es aprovechar el efecto de potenciación entre dos aceites esenciales con propiedades insecticidas. Por ejemplo, Bekele y Hassanali (2001) indican que la mezcla de los aceites esenciales de *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Labiatae) y *Ocimum kenyense* Ayobangira (Labiatae) presenta mayor toxicidad contra *S. zeamais* y *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae) que individualmente o sus principales compuestos por separado. Sin embargo, esto último no es una regla general ya que según Don Pedro et al. (1996) el aceite esencial extraído del epicarpio de cítricos presenta mayor toxicidad como fumigante contra *C. maculatus*, que sus compuestos principales por separado o mezclados artificialmente lo cual de acuerdo a Hummelbrunner e Isman (2001) se debe a que algunos compuestos que pueden estar en pequeñas concentraciones actúan como sinérgicos potenciando la acción de los de mayor abundancia. Por lo antes indicado el objetivo de la presente investigación fue evaluar, en condiciones de laboratorio, la actividad insecticida por fumigación de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y en combinación, contra adultos de *S. zeamais*.

Materiales y Métodos

Aceites esenciales. Los aceites esenciales se obtuvieron de follaje recolectado en la zona de Pinto (36°42'0" S, 71°54'0" W; 286 m.s.n.m.), Región del Biobío, Chile, en el caso de *P. boldus* y *L. sempervirens* y de Maullín (40°41' S, 73°25' W; 28 m.s.n.m.), Región de Los Lagos, Chile, en *L. philippiana*. El criterio de recolecta fue el de Vogel et al. (1997), que consiste en seleccionar hojas al azar, de los cuatro puntos cardinales y en distintos lugares dentro del árbol. El follaje colectado se lavó con agua potable para eliminar cualquier contaminante, y posteriormente se sometió a destilación por arrastre de vapor en un aparato tipo Clevenger durante dos horas utilizando agua destilada (Kouninki et al., 2007). El aceite obtenido se mezcló con sulfato de sodio anhidro (Winkler Ltda., Santiago de Chile, Chile) para eliminar los restos de agua y posteriormente se conservó en frío a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en envases de vidrio color ámbar, hasta su utilización en los bioensayos. La composición de los aceites esenciales de las tres especies vegetales se analizó individualmente en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectómetro de masas en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, Campus Concepción, Chile.

Insectos. Los insectos provinieron de colonias permanentes que se mantienen en el Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, en una cámara bioclimática (IPS 749, Memmert GmbH, Schwabach, Alemania) en condiciones de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% de humedad relativa y oscuridad total utilizando maíz (*Zea mays* L.) Dekalb DK 440 (Anasac Chile S.A.) como sustrato alimenticio. Los insectos utilizados en los bioensayos no tenían más de una semana de edad por lo que siete días antes de iniciar los bioensayos se extrajeron todos los insectos adultos de las colonias, los que se utilizaron para iniciar nuevas crianzas, y la progenie emergida (F₁) se ocupó en los bioensayos. El maíz utilizado para las colonias y bioensayos se obtuvo de la Estación Experimental "El Nogal" de la Facultad de Agronomía y para evitar

cualquier infestación previa por insectos o residuo de insecticida este se lavó con agua potable y posteriormente se almacenó en refrigeración (4.5 ± 1 °C) por 72 horas.

Metodología. Este bioensayo se llevó a cabo con la metodología de Pires et al. (2006) que consiste en la aplicación del tratamiento con una micropipeta sobre un papel filtro (Whatman N° 10) circular de 5,5 cm de diámetro adherido interiormente a la tapa de envases de 100 mL de capacidad, que contenían 50 g de maíz infestado con 50 insectos adultos sin diferenciación de sexo. El testigo se manejó de la misma manera pero sin tratar el papel filtro. Los tratamientos consistieron en mezclas de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones de 1:0, 1:1, 1:10 y 1:20 (Ahmad et al. (2009) y cada una de estas en concentraciones de 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 μL aceite esencial L^{-1} aire. Las diferentes concentraciones se prepararon utilizando acetona como solvente (99% pureza) y se agitaron por 30 segundos en un agitador vortex (Vortex V-1plus, Boeckel & Co. GmbH & Co. KG, Hamburg, Alemania) para formar una solución homogénea. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones y la metodología completa se repitió cinco veces en diferentes días. Las unidades experimentales se mantuvieron en una cámara bioclimática a 30 ± 1 °C de temperatura, 60% HR y oscuridad total. La evaluación de mortalidad se realizó a cinco días después de la exposición. Se utilizó el criterio de mortalidad de FAO (1980) y la mortalidad se corrigió con la fórmula de Abbott (1925).

Análisis estadístico y de la acción conjunta. El diseño experimental fue complementado al azar y para cada tratamiento de aceite individual o mezcla de ellos se estimó la concentración letal 50 % (CL_{50}) mediante el método Probit (Finney, 1974) con el procedimiento PROC Probit del software Statistical Analysis System (SAS) (SAS, 1999). En este análisis, de acuerdo al criterio de Robertson et al. (2007), se consideraron los tratamientos como significativamente diferentes cuando los límites de confianza de las CL_{50} no se traslaparon. La valoración de la acción conjunta se obtuvo mediante el índice de acción conjunta (IAC) de Otitoloju (2002 y 2003) y el índice de concentración adición (ICA) de Gaete y Chávez (2008). Estos índices clasifican la actividad de la mezcla como neutra si es igual a 1, con efecto de potenciación si es mayor a 1 y antagónica si es menor a 1.

Resultados y discusión

En la evaluación de los aceites esenciales de manera individual la mayor toxicidad se observó en la de *P. boldus* la cual a partir de la concentración de 100 μL aceite esencial L^{-1} aire superaron el 80% de mortalidad (Figura 1). En el caso de *L. sempervirens* y *L. philippiana* este umbral solo se alcanzó a los 150 y 250 μL aceite esencial L^{-1} aire respectivamente. Aunque cabe destacar que a partir de los 250 μL aceite esencial L^{-1} aire todos los tratamientos evaluados alcanzaron el 100% de insectos muertos. Esta tendencia se confirmó en el cálculo de la CL_{50} donde el aceite esencial de *P. boldus* presentó una CL_{50} de 75.5 μL aceite esencial L^{-1} aire valor que fue significativamente inferior a *L. sempervirens* (115.6 μL aceite esencial L^{-1} aire) pero no a *L. philippiana* (150.9 μL aceite esencial L^{-1} aire) ya que sus límites fiduciales se traslaparon (Robertson et al. 2007) (Tabla 1). La mayor toxicidad del aceite esencial de *P. boldus* se puede deber a la presencia de 1-8-cineol que de acuerdo a Lee et al. (2004) con una dosis igual o superior a 200 μL aceite esencial L^{-1} aire se eliminan hasta los huevos de *S. oryzae* que usualmente son los más

resistentes a los fumigantes. Este compuesto en el aceite esencial utilizado en esta investigación se encuentra en una concentración de 14.85% (Bustos et al. 2016). Igualmente Wang et al. (2006), evaluó el aceite esencial de *Artemisia vulgaris* (L.) (Asteraceae) (46.5% de 1,8-cineole) contra *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) obteniendo con dosis de 10, 15 y 20 μL aceite esencial L^{-1} aire a las 96 h de exposición una mortalidad de 100%. Por último, Aggarwal et al. (2001) utilizando el compuesto puro a una concentración de 1.0 μL aceite esencial L^{-1} aire obtuvo una toxicidad de 93-100% sobre *C. maculatus*, *Rhyzopertha dominica* F. y *S. oryzae*.

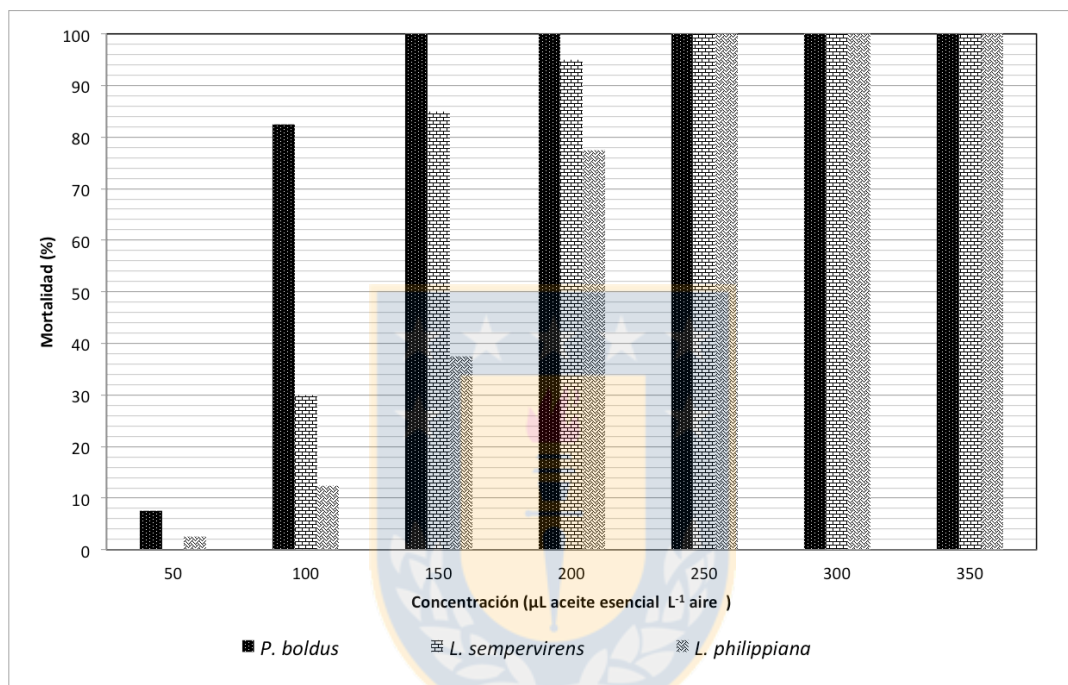


Figura 1.- Mortalidad por efecto fumigante de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados individualmente contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tabla 1.- Concentración Letal 50% (CL_{50}) de la toxicidad por fumigación de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados individualmente y en mezcla en una proporción de 1:1 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	CL_{50} *	Lim min-Lim max**	S^{\S}
<i>P. boldus</i>	75.5	67.8-83.9	8,26
<i>L. sempervirens</i>	115.6	104.9-125.6	8,04
<i>L. philippiana</i>	150.9	46.8-291.3	6,05
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i>	64.3	57.6-71.6	7,73
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i>	23.4	2.2-42.2	1.81
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i>	93.7	82.5-104.6	5.03

* μL aceite esencial L^{-1} aire **Límites fiduciales CL_{50} ($\alpha=0.05$) S^{\S} =pendiente línea dosis-probit (Ldp)

Al realizar las combinaciones de los aceites esenciales en proporciones de 1:1 se observa un efecto de potenciación ya que la mezcla *P. boldus*-*L. philippiana* a partir de la concentración de 50 μL aceite esencial L^{-1} aire (la mas baja evaluada) muestra una toxicidad superior al 85% situación que no se observó en la evaluación de los aceites de manera individual (Figura 2). Además, en este bioensayo a partir de la concentración de 200 μL aceite esencial L^{-1} aire todos los tratamientos alcanzaron el 100% de mortalidad situación que solo se observó en los aceites individuales con concentraciones iguales o superiores a 250 μL aceite esencial L^{-1} aire. Este efecto de potenciación del efecto fumigante también se refleja en las CL_{50} ya que para las mezclas de *P. boldus*-*L. philippiana* y *P. boldus*-*L. sempervirens* se obtuvieron concentraciones letales significativamente menores que para cada uno de los aceites individualmente (Tabla 1). Además la CL_{50} de la mezcla *P. boldus*-*L. philippiana* (23.4 μL aceite esencial L^{-1} aire) fue significativamente menor que la de *P. boldus*-*L. sempervirens* (64.3 μL aceite esencial L^{-1} aire) (Robertson *et al.* 2007) (Tabla 2). En el análisis de los índices de acción conjunta (IAC) y de concentración-adición (ICA) se confirma el efecto de potenciación o sinergismo análogo ya que en todas las combinaciones en la proporción 1:1 el IAC presenta valores superiores a 1 lo cual según Otitoloju (2002 y 2003) los clasifica como con sinergismo o potenciación (Tabla 3). Aunque, el valor más alto (6.44) se observa en *L. philippiana* cuando se mezcla con *P. boldus* lo cual significa que su toxicidad aumenta en mayor proporción cuando se mezcla con esta última especie que con *L. sempervirens*. La misma tendencia se observa en el ICA donde todos los tratamientos son superiores a 1 lo que de acuerdo a Gaete y Chávez (2008) los clasifica como con acción de potenciación. Al igual que en el caso anterior el mayor valor del índice se obtuvo en la mezcla *P. boldus*-*L. philippiana* con 4.83.

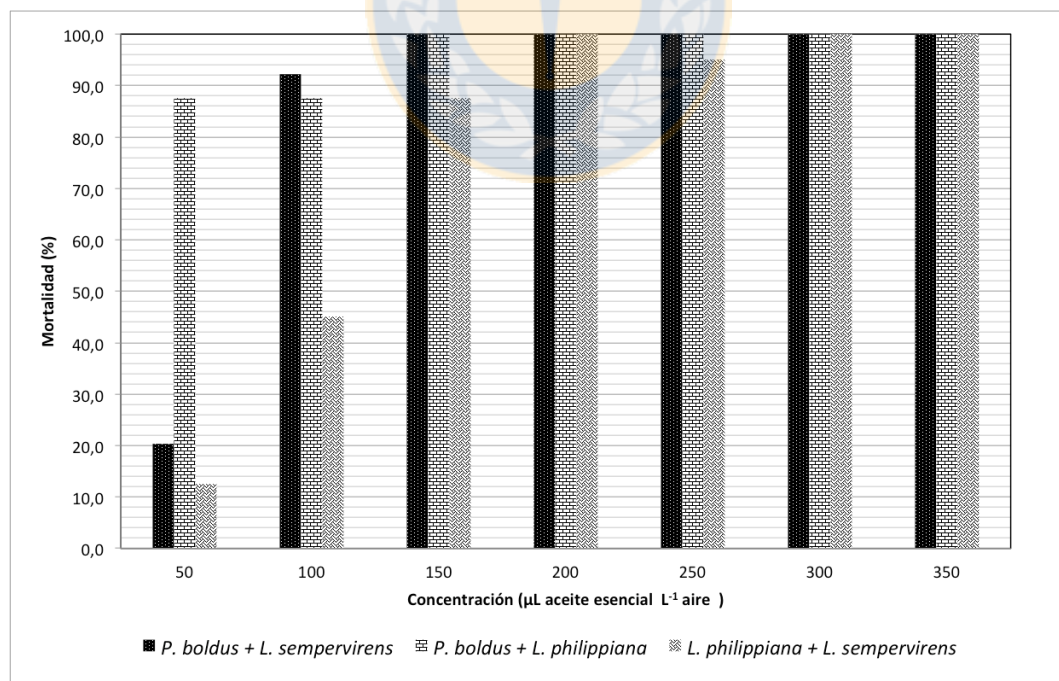


Figura 2.- Mortalidad por efecto fumigante de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en una proporción de 1:1 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

El efecto de potenciación obtenido se puede deber a la presencia de Safrol en el aceite esencial de *L. philippiana* y *L. sempervirens* con 39.5 y 59.1% respectivamente (Bustos et al. 2006). Según Philogène (2012) este compuesto presente propiedades como sinergista/potenciador además de que es un precursor del butóxido de piperonilo el cual es uno de los sinergistas mas utilizados comercialmente. Aunque, se destaca que la mayor potenciación se obtenga con el aceite esencial de *L. philippiana* y no con *L. sempervirens* que presenta una mayor concentración de Safrol. Esto último se puede explicar en que *L. philippiana* además presenta una elevada concentración (34.3%) de Linalool que es un monoterpeno que también ha mostrado actividad insecticida tanto individualmente y como compuesto mayoritario de aceites esenciales contra *S. zeamais* (Cansian et al. 2015) y *S. oryzae* (Kim et al. 2016). Además se debe agregar que estos últimos autores señalan a Linalool junto con isopinocamfor y terpeno-4-ol como los que más contribuyen a la toxicidad como fumigante de la mezcla del aceite esencial de ocho especies de la familia Lamiaceae.

Tabla 2.- Concentración Letal 50% (CL₅₀) de la toxicidad por fumigación de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en proporciones de 1:10 y 1:20 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	CL ₅₀ *	Lim min-Lim max**	S [§]
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:10)	112.2	100.6-123.9	4.04
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i> (1:10)	44.7	26.0-58.3	2.75
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:10)	66.0	48.9-82.1	2.57
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i> (1:10)	67.5	58.1-76.5	5.30
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:10)	137.6	125.9-148.5	7.42
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:10)	100.4	89.7-110.7	6.11
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:20)	109.1	94.7-122.9	3.8
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i> (1:20)	39.0	22.9-48.0	5.0
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:20)	52.4	31.4-69.0	2.24
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i> (1:20)	13.9	0.01-32.1	1.93
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:20)	155.1	141.6-168.0	6.03
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:20)	32.4	10.3-50.7	1.86

*μL aceite esencial L⁻¹ aire **Límites fiduciales CL₅₀ (α=0.05) §S=pendiente línea dosis-probit (Ldp)

En los tratamientos constituidos por mezclas de los aceites esenciales en proporciones de 1:10 en comparación a los aceites individuales o en mezcla en proporción de 1:1 se observó una disminución en el efecto de potenciación. La única concentración en que todos los tratamientos alcanzaron el 100% de mortalidad fue con 350 μL aceite esencial L⁻¹ aire. Aunque, nuevamente se destaca el tratamiento *L. philippiana* + *P. boldus* que a partir de la concentración de 50 superó el 80% de mortalidad (Figura 4) lo cual como ya se mencionó se debería a una acción de potenciación entre el Safrol y Linalool que posee *L. philippiana* y el 1-8 cineol de *P. boldus*. Al analizar las CL₅₀ se puede observar que la menor concentración la obtuvo la combinación *L. sempervirens*-*P. boldus* con 44.7 μL aceite esencial L⁻¹ aire pero sin diferencias significativas con los tratamientos de *L. philippiana* + *P. boldus* y *P. boldus* + *L. philippiana* los cuales presentan una CL₅₀ de 66 y

67.5 μL aceite esencial L^{-1} aire respectivamente. Sin embargo, el ICA indica que todos los tratamientos constituidos por mezclas de aceite esencial en proporciones de 1:10 presentan un valor superior a 1, lo cual según Gaete y Chávez (2008) se debe a un efecto de potenciación. Pero, al revisar los valores del IAC que es más preciso debido a que analiza el efecto por especie, se observa que *P. boldus* y *L. sempervirens* en los tratamientos de *P. boldus* + *L. sempervirens* y *L. sempervirens* + *L. philippiana* presentaron valores de 0.67 y 0.84 respectivamente lo cual indica que estas especies no se ven favorecidas con la combinación en estas proporciones registrándose un efecto de antagonismo (Otitoloju 2002 y 2003). Esto último refrenda lo señalado por Hummelbrunner e Isman (2001) al indicar que cada combinación debe ser evaluada individualmente pues un incremento de la efectividad no está directamente relacionado con un aumento en las concentraciones de los principales componentes ya que puede haber compuestos en muy bajas cantidades que cumplan algún rol sinérgico.

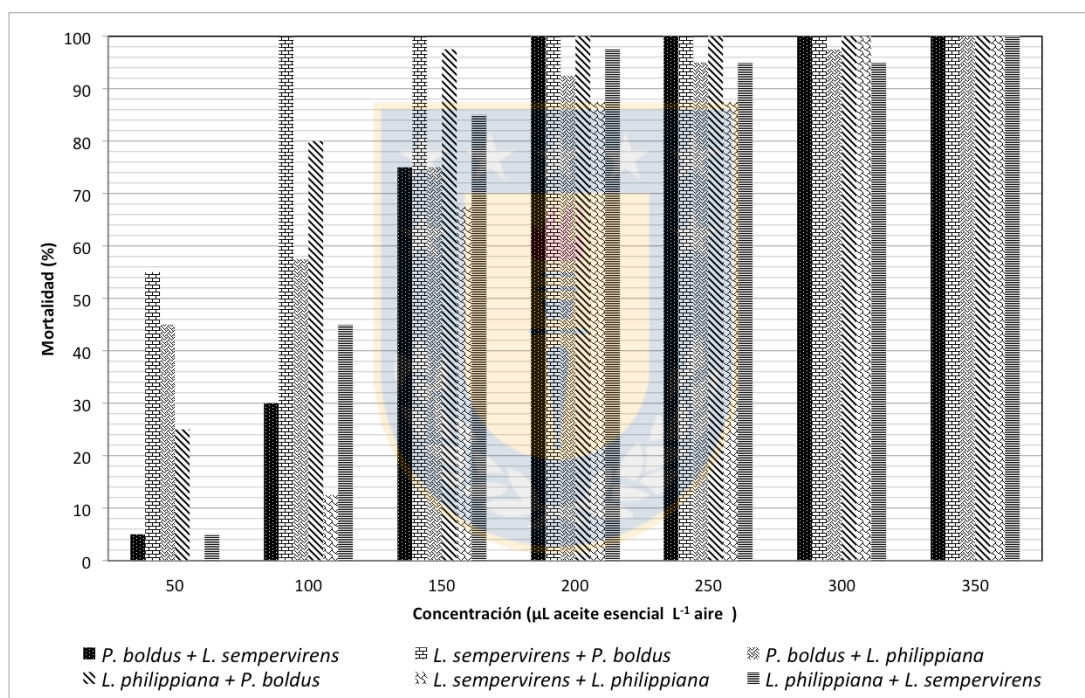


Figura 3.- Mortalidad por efecto fumigante de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en una proporción de 1:10 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Finalmente, en los tratamientos correspondientes a la mezcla en una proporción de 1:20 en la concentración de 50 μL aceite esencial L^{-1} aire se observó una mayor mortalidad que los de la proporción 1:10 (Figura 4). En esta concentración solo el tratamiento *P. boldus*-*L. sempervirens* no alcanzó el 50% de toxicidad mientras que la combinación *L. philippiana*-*P. boldus* superó el 80% de insectos muertos. Esta mayor toxicidad también se estableció en las CL_{50} ya que los tratamientos *L. sempervirens*+*P. boldus*, *P. boldus*+*L. sempervirens*, *L. philippiana*+*P. boldus* y *L. philippiana*+*L. sempervirens* presentaron concentraciones letales que fluctuaron entre 13.9 y 39.0 μL aceite esencial L^{-1} aire y con

límites fiduciales que se traslapan por lo que no existen diferencias significativas entre ellos (Robertson et al. 2007). Los restantes tratamientos presentaron CL_{50} superiores a $50 \mu\text{L}$ aceite esencial L^{-1} aire (Tabla 2). Los valores del IAC para esta proporción mostraron que solo el tratamiento de *L. sempervirens*+*L. philippiana* mostró antagonismo al presentar un valor de 0.96 (Tabla 3). Todos los restantes tratamientos fueron mayores a 1 destacándose *L. philippiana*+*P. boldus* con 5.68. En el IAC el mismo tratamiento mostró antagonismo para ambas especies lo cual también se observó en la proporción de 1:10 lo que indica que un aumento en la concentración de safrol, compuesto mayoritario en ambas especies, no asegura un mayor efecto insecticida refrendando lo señalado por Hummelbrunner e Isman (2001). Una situación similar se observó con *P. boldus* en su mezcla con *L. sempervirens* que en las proporciones de 1:10 y 1:20 mostró antagonismo con un IAC de 0.67 y 0.69 respectivamente lo cual se debe a que *P. boldus* por si solo presenta una mayor toxicidad que cuando se mezcla con *L. sempervirens* por lo que desde un punto de vista práctico no se justifica realizar la combinación ya que se obtendrá una menor mortalidad.

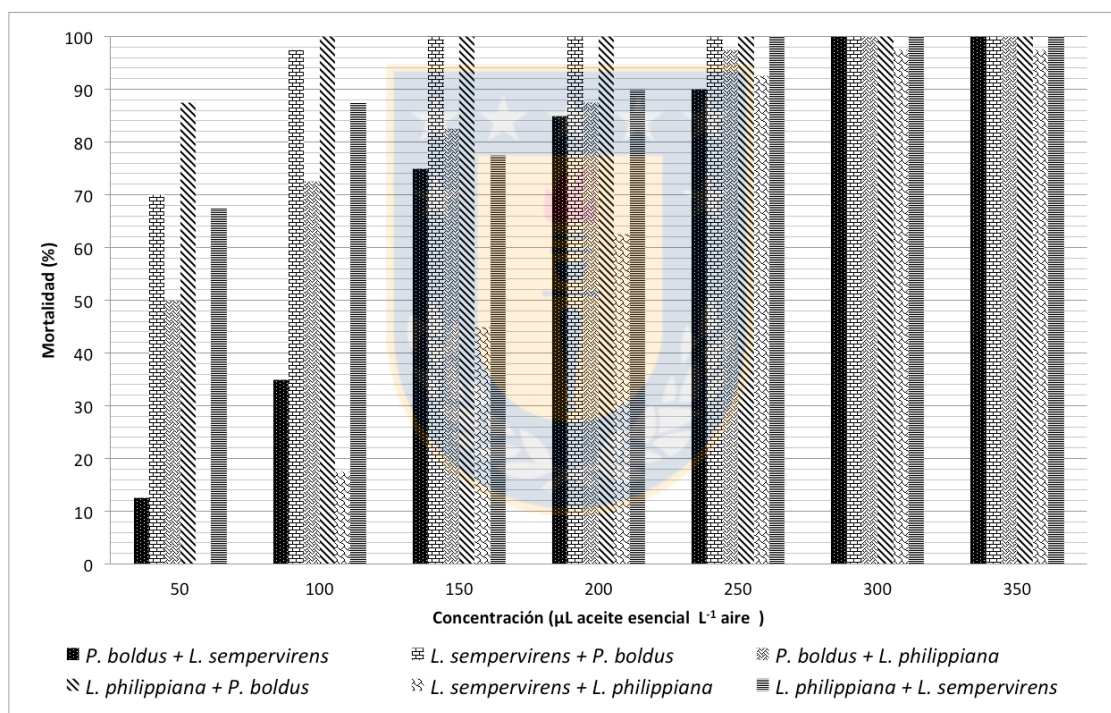


Figura 4.- Mortalidad por efecto fumigante de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en una proporción de 1:20 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten concluir que la mezcla del aceite esencial de *P. boldus* con *L. philippiana* en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20 potencian la actividad insecticida como fumigante de ambas especies. Sin embargo, estos antecedentes deben ser validados en bodega con mayores volúmenes de grano junto con buscar una formulación que maximice la duración del efecto insecticida.

Tabla 3.-Índice de acción conjunta (IAC) e Índice de concentración-adición (ICA) para la toxicidad por efecto fumigante contra *Sitophilus zeamais* de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20.

Tratamiento	IAC ₁ *	IAC ₂ *	IAC ₃ *	ICA**
	<i>P. boldus</i>	<i>L. sempervirens</i>	<i>L. philippiana</i>	
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:1)	1.17	1.79	--	1.48
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:1)	3.22	--	6.44	4.83
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:1)	--	1.23	1.61	1.42
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:10)	0.67	1.03	--	1.69
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i> (1:10)	1.68	2.58	--	1.17
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:10)	1.14	--	2.28	2.18
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i> (1:10)	1.11	--	2.23	1.21
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:10)	--	0.84	1.09	1.47
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:10)	--	1.15	1.50	1.18
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:20)	0.69	1.05	--	1.04
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i> (1:20)	1.93	2.96	--	1.98
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:20)	1.44	--	2.87	2.84
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i> (1:20)	5.43	--	10.85	5.68
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:20)	--	0.74	0.97	0.96
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:20)	--	3.56	4.65	3.61

* IAC <1= Efecto antagonista, IAC=1= Efecto aditivo, IAC>1=Efecto potenciador **ICA<1= Efecto antagonista, ICA=1= Efecto aditivo, ICA>1=Efecto potenciador

Agradecimientos

Los autores agradecen al programa Fondecyt iniciación de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) que a través del proyecto N° 11110105 “Essential oil of *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz et Pau.) Tul and *Laureliopsis philippiana* Looser as an alternative to synthetic insecticides to *Sitophilus* spp. complex and *Acanthocelides obtectus* Say control in stored seeds”, financió la presente investigación.

Referencias citadas

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18:265-267.
- Abbassy, M., S.A. Addelgaleil and R.Y.A. Rabie. 2009. Insecticidal and synergistic effects of Majorana hortensis essential oil and some of its major constituents. Entomologia Experimentalis et Applicata 131: 225-232.
- Aggarwal, K.K., A.K. Tripathi and V. Kumar. 2001. Toxicity of 1-8 cineole against against three species of stored product coleopterans. Insect. Sci. Appl. 21:155-160.
- Ahmad, M., M.A. Saleem, and A.H. Sayyed. 2009. Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid- and organophosphate-resistant populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Pest Manag Sci. 65:266-274.
- Bekele, J. and A. Hassanali. 2001. Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum kilimandscharicum* and *Ocimum kenyense* (Labiatae) on two post-harvest insect pests. Phytochemistry 57:385-391.
- Bustos, G., G. Silva, S. Fischer, I. Figueroa, A. Urbina y J.C. Rodríguez. 2016. Repelencia de mezclas de aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Southwestern Entomologist. **En arbitrio**.
- Cansian, R.L., V. Astolfi, R.I. Cardoso, N. Paroul, S.S. Roman, A.A. Mielnoczki-Pereira, G.F. Pauletti and A.J. Mossi. 2015. Insecticidal and repellent activity of the essential oil of *Cinnamomum camphora* var. Linaoolifera Y. Fujita (Ho-Sho) and *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. Var. Hosyo (Hon-Sho) on *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera, Curculionidae). Rev. Bras. Pl. Med. 17:769-773.
- Chaudhry, M. Q. 2000. Phosphine resistance. Pesticide Outlook 3: 88-91.
- Don-Pedro, K.N. 1996. Investigation of single and joint fumigant insecticidal action of citruspeel oil components. Pestic. Sci. 46:79-84.

- FAO. 1980. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides. FAO Plant Production and Protection Paper N°21. Rome. Italy.
- Finney, D. J. 1974. Probit Analysis a Statistical Treatment of the sigmoid response curve. Cambridge University Press. New York. 255p.
- Gaete, H. y C. Chávez. 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1984) (Cladocera, Crustacea). *Limnetica*. 27(1): 1-10.
- Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E., Guedes, N.M. P., Ribeiro, B., Serrão, J.E., 2006. Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology* 31, 30-38.
- Huang F. and B. Subramanyam. 2005. Management of five stored-product insects in wheat with pirimiphosmethyl and pirimiphos-methyl plus synergized pyrethrins. *Pest Management Science* 61: 356-362.
- Hummelbrunner, L.A. and M.B. Isman. 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep., Noctuidae). *J. Agric. Food Chem.* 49:715-720.
- Kim, S.W., H.R. Lee, M. Jang, C. Jung and I. Park. 2016. Fumigant toxicity of lamiaceae plant essential oils and blend of their constituents against adult rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Molecules* 21:360-370.
- Koul, O., S. Walia and G.S. Dhaliwal. 2008. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.* 4(1): 63–84.
- Kouninki, H., T. Hance, F.A. Noudjou, G. Lognay, F. Malaisse, M.B. Ngassoum, et al. 2007. Toxicity of some terpenoids of essential oil of *Xylopiya aethiopica* from Cameroon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Journal of Applied Entomology* 131(4):269-274.
- Lee, B-H., P. Annis, F. Tumaalii, S. Lee. 2004. Fumigant toxicity of *Eucalyptus blakelyi* and *Melaleuca fulgens* essential oils and 1,8-Cineole against different development stages of the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Phytoparasitica*. 32(5): 498-506.
- Norambuena, C. G. Silva, A. Urbina, I. Figueroa and J.C. Rodríguez. 2016. Insecticidal activity of *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde (Atherospermataceae) essential oil against *Sitophilus* spp. (Coleoptera Curculionidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 76:En prensa.
- Otitoloju, A. 2002. Evaluation of the joint-action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus var radula* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53:404-415.

- Otitoloju, A. 2003. Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals. *Journal of Environmental Management* 67:121-128.
- Philogène, B.J.R. 2012. Acción sinérgica de los compuestos de origen vegetal. Pag. 67-76. *In* C. Regnault-Roger, B.J.R., Philogène and C. Vincent (ed). *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Pires, J., J. De Morais, e S. De Bortoli. 2006. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biología e Ciência da Terra* 6:96-103.
- Pizarro, D., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, A. Urbina, A. Lagunes, C. Santillán-Ortega, A. Robles-Bermúdez, Sotero Aguilar-Medel e I. Tucuch. 2014. Aceite esencial de follaje de *Peumus boldus* colectado en otoño para el control del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science*. 30(3):171-180.
- Pretheep-Kumar, P., S. Mohan and P. Balasubramanian. 2010. Insecticide resistance stored-products insects. Mechanism and management strategies. Lambert Academic Publishing. Lexington, KY. USA.
- Robertson, J., R. Russell, H. Preisler and N. E. Savin. 2007. *Biossays with arthropods*. CRS Press. Boca Ratón. Florida. USA.
- Roel, A and J.D. Vendramim. 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciencia Rural* 36: 1049-1054.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Torres, C., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, I. Figueroa, A. Lagunes, C. Santillán, A. Robles, S. Aguilar and I. Tucuch. 2014. Insecticidal activity of *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Til. Essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean Journal of Agricultural Research* 74(4):421-426.
- Tripathi, A. K., S. Upadhyay, M. Bhuiyan and P.R. Bhattacharya. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 1(5): 052-063.
- Vogel, H., I. Razmilic, y U. Doll. 1997. Contenido de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de boldo (*Peumus boldus* Mol.) *Ciencia e Investigación Agraria* 24:1-6.
- Wang, J., F. Zhu, X.M. Zhou, C.Y. Niu and C.L. Lei. 2006. Repellent and fumigant

activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 42, 339–347.



CAPITULO III

Acción insecticida conjunta de contacto de mezclas de los aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky.

Gabriel Bustos³, Gonzalo Silva^{1*}, Susana Fisher¹, Inés Figueroa¹, A. Urbina¹ y J.C. Rodríguez²

Resumen. A nivel mundial entre el 5 y 15% del total de los granos cosechados se pierde a causa de los insectos plaga. El control de estas plagas es realizado con insecticidas de contacto como clorpirifós o malatión y fumigantes como bromuro de metilo y fosfuro de aluminio. Sin embargo, su uso irracional ha producido efectos adversos como presencia de residuos peligrosos, intoxicaciones y desarrollo de resistencia. El objetivo de la presente investigación fue evaluar, en condiciones de laboratorio, la actividad insecticida por contacto de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y en combinación, contra adultos de *S. zeamais*. La toxicidad de los aceites esenciales individuales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* se incrementó en la medida que aumentó el tiempo de exposición de los insectos. En las mezclas en proporciones de 1:1 el mayor porcentaje de insectos muertos se obtuvo con las concentraciones de 200 y 400 mL aceite esencial kg⁻¹ cereal y solo el tratamiento *L. sempervirens* + *L. philippiana* con un ICA de 0.74 mostró efecto antagónico. En las proporciones de 1:10 y 1:20 se obtuvo la misma tendencia observándose que todas las combinaciones son antagonistas para *L. sempervirens* y *L. philippiana* mientras que para *P. boldus* todas presentan potenciación. Los resultados obtenidos en los diferentes bioensayos permiten concluir que la mezcla de los aceites esenciales de *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporción de 1:1 potencian la acción insecticida de contacto de ambos en comparación a utilizarlos individualmente.

Abstract. Worldwide, between 5 and 15% of harvested grains, are lost by insect pest. Control of these pests is performed with contact insecticides as chlorpyrifos or malathion and fumigants as methyl bromide and phosphine. However its irrational use has caused problems such as dangerous residues, intoxications and development of resistance. The objective of this research was to assess, under laboratory conditions, the insecticidal activity by contact toxicity of essential oils of *P. boldus*, *L. sempervirens* and *L. philippiana*, singly and mixed against adults of *S. zeamais*. The toxicity of singly essential oils increased when insect exposition time increased too. In mix of 1:1 proportion, the highest percent of dead insects was obtained with concentrations of 200 and 400 mL essential oil kg⁻¹ cereal and only in treatment of *L. sempervirens* + *L. philippiana* with a ICA of 0.74 showed antagonic effect. In 1:10 and 1:20 proportions the same trend was obtained observed that all combinations are antagonics for *L. sempervirens* and *L. philippiana* while for *P. boldus* all exhibites potentiation. Results obtained in our research suggest that the

³Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Vicente Méndez 595, Chillán, Chile.

²Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, km 38.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Estado de México, México.

*Autor para correspondencia (gosilva@udec.cl).

essential oils of *L. sempervirens* and *L. philippiana* in proportions of 1:1 potentiating contact insecticidal activity in comparison with using them separately.

Introducción

Los cereales como el trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) y maíz (*Zea mays* L.) son una importante parte de la dieta de humanos y animales domésticos (Sode et al. 1995). A nivel mundial entre el 5 y 15% del total de los granos cosechados se pierde a causa de los insectos plaga (Tipathi y Upadhyay, 2009). En Chile cerca de 60 especies de insectos están asociados a cereales almacenados pero las consideradas como las mas importantes son el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais* Motschulsky; Coleoptera: Curculionidae), el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae* L.) y la polilla de los cereales (*Ephestia kuehniella* Zeller; Lepidoptera: Pyralidae) (Arias y Dell `Orto, 1983; Larrain, 1994).

Los insecticidas sintéticos han sido considerados como el medio mas eficaz para el control de insectos plaga (Huang y Subramanyam, 2005). Usualmente el control de plagas asociadas a granos almacenados es realizado con insecticidas de contacto como clorpirifos o malation y fumigantes como bromuro de metilo y fosfuro de aluminio (Pretheep-Kumar et al. 2010). Sin embargo, su uso irracional han producido efectos adversos como presencia de residuos, intoxicaciones de usuarios y consumidores y desarrollo de resistencia (Roel y Vendramim, 2006). Por tanto, se hace necesario la búsqueda de alternativas que no presenten estos problemas como pueden ser los insecticidas de origen vegetal o botánicos.

El control de insectos plaga de los granos almacenados con insecticidas vegetales se centra en el uso de polvos y aceites esenciales pero privilegiándose la toxicidad por inhalación a través de un modo de acción fumigante. Sin embargo, muchos de estos compuestos también presentan efecto insecticida de contacto. Por ejemplo Salvadores et al. (2006) evaluó el efecto insecticida de contacto de diferentes especies aromáticas sobre adultos de *S. zeamais* encontrando que el polvo de *Piper nigrum* L. (Piperaceae) causó un 80% de mortalidad. En cuanto a especies nativas de Chile Betancur et al. (2010) reportan que el aceite esencial de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) presenta actividad insecticida de contacto contra *S. zeamais*. Actividad similar observaron Pizarro et al. (2013 y 2014) con el polvo y aceite esencial de esta misma especie. Otras especies nativas que han mostrado toxicidad por contacto son *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde, también de la familia Monimiaceae, que al igual que *P. boldus* el polvo y aceite esencial de estas han mostrado toxicidad por contacto contras plagas de almacén (Ortiz et al. 2012; Torres et al. 2014a y 2014b; Norambuena et al. 2016). Sin embargo, el uso de compuestos vegetales puede poner en riesgo la densidad natural de la planta por lo que se requieren estrategias para utilizar la menor cantidad posible de material vegetal. Una de estas opciones es la mezcla de compuestos vegetales con actividad insecticida para aprovechar un algún efecto de potenciación o sinergismo que entre extractos o aceites esenciales es usual (Philogène, 2012). Así mismo existen antecedentes de que el uso de compuestos vegetales en mezcla con insecticidas sintéticos de contacto como malation (Yuya et al., 2009) o pirimifós metílico (Obeng-Ofori y Amiteye, 2005) potencian su acción tóxica contra *S. zeamais*. En cuanto a otras especies Shaalan et al. (2005) obtuvieron mayor toxicidad contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) y *Culex annulirostris* Skuss (Diptera: Culicidae) de fenitrotion (organofosforado) y lambda-cialotrina (piretroide) cuando los mezclaron con aceite

esencial de semillas de *Khaya senegalensis* Juss (Meliaceae). Igualmente Maurya et al. (2012) mezclaron aceite esencial de *O. basilicum* con Imidacloprid (Cloronicotínico) obteniendo mayor mortalidad de *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae) con la mezcla que con el insecticida individualmente. Incluso este efecto de potenciación se ha obtenido con monoterpenos aislados como lo registran Abbassy et al (2009) quienes mezclaron Terpinen-4-ol y gama-terpineno con profenofos y metomil aumentando significativamente la toxicidad de estos compuestos contra *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae). Por lo antes indicado el objetivo de la presente investigación fue evaluar, en condiciones de laboratorio, la actividad insecticida por contacto de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana*, solos y en combinación, contra adultos de *S. zeamais*.

Materiales y Métodos

Aceites esenciales. Los aceites esenciales se obtuvieron de follaje recolectado en la zona de Pinto (36°42'0" S, 71°54'0" W; 286 m.s.n.m.), Región del Biobío, Chile, en el caso de *P. boldus* y *L. sempervirens* y de Maullín (40°41' S, 73°25' W; 28 m.s.n.m.), Región de Los Lagos, Chile, en *L. philippiana*. El criterio de recolecta fue el de Vogel et al. (1997), que consiste en seleccionar hojas al azar, de los cuatro puntos cardinales y en distintos lugares dentro del árbol. El follaje colectado se lavó con agua potable para eliminar cualquier contaminante, y posteriormente se sometió a destilación por arrastre de vapor en un aparato tipo Clevenger durante dos horas utilizando agua destilada (Kouninki et al., 2007). El aceite obtenido se mezcló con sulfato de sodio anhidro (Winkler Ltda., Santiago de Chile, Chile) para eliminar los restos de agua y posteriormente se conservó en frío a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ en envases de vidrio color ámbar, hasta su utilización en los bioensayos. La composición de los aceites esenciales de las tres especies vegetales se analizó individualmente en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectómetro de masas en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, Campus Concepción, Chile.

Insectos. Los insectos provinieron de colonias permanentes que se mantienen en el Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, Campus Chillán, en una cámara bioclimática (IPS 749, Memmert GmbH, Schwabach, Alemania) en condiciones de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 60% de humedad relativa y oscuridad total utilizando maíz (*Zea mays* L.) Dekalb DK 440 (Anasac Chile S.A.) como sustrato alimenticio. Los insectos utilizados en los bioensayos no tenían más de una semana de edad por lo que siete días antes de iniciar los bioensayos se extrajeron todos los insectos adultos de las colonias, los que se utilizaron para iniciar nuevas crianzas, y la progenie emergida (F_1) se ocupó en los bioensayos. El maíz utilizado para las colonias y bioensayos se obtuvo de la Estación Experimental "El Nogal" de la Facultad de Agronomía y para evitar cualquier infestación previa por insectos o residuo de insecticida este se lavó con agua potable y posteriormente se almacenó en refrigeración ($4.5 \pm 1^\circ\text{C}$) por 72 horas.

Metodología. El bioensayo se realizó con la metodología de Obeng-Ofori y Reichmuth (1997). Se utilizaron envases de vidrio de 500 mL, en los que se mezclaron 100 g de maíz (VARIEDAD?) con una solución del tratamiento diluido en 1 mL de acetona. Los

tratamientos consistieron en mezclas de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones de 1:0, 1:1, 1:10 y 1:20 (Ahmad *et al.* (2009) y cada una de estas en concentraciones de 25, 50, 100, 200 y 400 mL aceite esencial kg⁻¹ cereal. Las diferentes concentraciones se prepararon utilizando acetona como solvente (99% pureza) y se agitaron por 30 segundos en un agitador vortex (Vortex V-1plus, Boeckel & Co. GmbH & Co. KG, Hamburg, Alemania) para formar una solución homogénea. Los envases se agitaron manualmente por 30 segundos para permitir un cubrimiento uniforme de los granos por la solución, para luego dejarlos a temperatura ambiente por una hora para evaporar la acetona. En seguida, cada frasco se infestó con 10 parejas de insectos, los cuales se diferenciaron por sexo de acuerdo al criterio de Halstead (1963), quien señala que el rostrum del macho es de menor longitud y mayor ornamentación que el de la hembra. Posteriormente, los frascos se cubrieron con sus tapas perforadas para permitir el intercambio gaseoso, para luego almacenarlos en una cámara bioclimática a 30 ± 2 °C, 60 ± 5 % de humedad relativa y oscuridad total. La mortalidad se evaluó a las 24, 48 y 72 horas y a los 7 y 15 días después de la infestación (DDI), cuantificando los insectos vivos y muertos para obtener el porcentaje de mortalidad que se corrigió con la fórmula de Abbott (1925).

Análisis estadístico y de la acción conjunta. El diseño experimental fue complementado al azar y en cada tratamiento de aceite individual o mezcla de ellos se estimó la concentración letal 50% (CL₅₀) mediante el método Probit (Finney, 1974) con el procedimiento PROC Probit del software Statistical Analysis System (SAS) (SAS, 1999). En este análisis, de acuerdo al criterio de Robertson *et al.* (2007), se consideraron los tratamientos como significativamente diferentes cuando los límites de confianza de la CL₅₀ no se traslaparon. La valoración de la acción conjunta se obtuvo mediante el índice de acción conjunta (IAC) de Otitolaju (2002 y 2003) y el índice de concentración adición (ICA) de Gaete y Chávez (2008). Estos índices clasifican la actividad de la mezcla como neutra si es igual a 1, con efecto de potenciación si es mayor a 1 y antagónica si es menor a 1.

Resultados y discusión

La toxicidad por contacto de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* se incrementó en la medida que aumentó el tiempo de exposición de los insectos (Tabla 1). En la evaluación a las 24 horas el único tratamiento que superó el 50% de mortalidad fue el de 400 mL aceite esencial kg⁻¹ cereal de *L. sempervirens* y *L. philippiana* con un 98.8 y 63.8% de insectos muertos respectivamente. *P. boldus* a esta misma concentración solamente registró un 10% de mortalidad. La mayor toxicidad de *L. sempervirens* y *L. philippiana* se puede deber a la presencia en ambas especies de Safrol con 59.1 y 39.5% respectivamente (Bustos *et al.* 2016). Al respecto Zapata y Smagghe (2010) reportaron toxicidad del aceite esencial de la corteza de *L. sempervirens* sobre *S. zeamais* donde el mayor componente también fue safrol (49.71 %). Igualmente Huang *et al.* (1999) señalan que tanto *S. zeamais* como *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) son igualmente susceptibles a la toxicidad por contacto de safrol e isosafrol. Además, otros estudios con aceites esenciales con altas concentraciones de safrol como el de *Piper*

hispidinervum C. DC. (82%) han mostrado actividad insecticida sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera, Noctuidae) (Lima *et al.*, 2009).

En las evaluaciones en los otros periodos de evaluación las concentraciones de 200 y 400 mL aceite esencial kg^{-1} cereal de los aceites esenciales de *L. sempervirens* y *L. philippiana* superaron el 80% de mortalidad a las 72 h y 7 y 15 DDI. En el caso de *P. boldus* solo la concentración de 400 mL aceite esencial kg^{-1} cereal incrementó su toxicidad alcanzando un máximo de 91.25% a los 15 DDI. Las restantes concentraciones no superaron el 7% de insectos muertos. Esta mayor toxicidad de *L. sempervirens* y *L. philippiana* también se registró en el cálculo de la CL_{50} ya que estas dos especies tuvieron valores de 115.1 y 157.6 respectivamente versus 313.3 mL aceite esencial kg^{-1} cereal de *P. boldus*.

En las mezclas de los aceites esenciales en proporciones de 1:1 se observa la misma tendencia en la toxicidad que los aceites individuales ya que el mayor porcentaje de insectos muertos se obtuvo con las concentraciones de 200 y 400 mL aceite esencial kg^{-1} cereal. Sin embargo, a partir de las 24 horas la concentración más alta evaluada mostró en todos los tratamientos una toxicidad superior al 80% situación que no se observó con los aceites evaluados individualmente (Tabla 2). De hecho, la concentración de 400 mL aceite esencial kg^{-1} cereal a las 48 horas alcanzó un 100% de mortalidad en los tratamientos de *P. boldus* + *L. sempervirens* y *L. sempervirens* + *L. philippiana* y 98.8% en *P. boldus* + *L. philippiana*. Sin embargo, al analizar el índice de concentración adición (ICA) la mezcla de los aceites esenciales de *L. sempervirens* + *L. philippiana* mostró un valor de 0.74 que de acuerdo a Gaete y Chávez (2008) se clasifica como un efecto antagónico, es decir la mezcla presenta una menor toxicidad que los aceites esenciales que la componen individualmente. Además los otros dos tratamientos tuvieron valores muy cercanos a 1.0 que es el umbral mínimo para determinar una acción potenciadora por lo que se puede inferir que la mezcla de estos tres aceites en proporciones de 1:1 no produce un aumento significativo en la toxicidad (Tabla 7). Al observar los resultados del índice de acción conjunta (IAC) que analiza el efecto de la mezcla en cada especie de manera individual se observa que *L. sempervirens* y *L. philippiana* en todos los tratamientos presentan valores menores a 1 lo que los clasifica como con efecto antagónico (Otitoloju, 2002 y 2003). Solo *P. boldus* presenta efecto potenciador debido a que por ser el aceite esencial, de los tres evaluados, que tiene la menor toxicidad individual al ser mezclado con cualquiera de los otros dos su toxicidad mejorará pero no de una manera suficientemente significativa para que desde el punto de vista práctico resulte viable la mezcla.

En los tratamientos de la proporción 1:10 nuevamente se obtuvo la tendencia de que solo las concentraciones de 200 y 400 mL aceite esencial kg^{-1} cereal superaron el 50% de mortalidad aunque en esta evaluación solo los tratamientos de *P. boldus* + *L. sempervirens* y *L. philippiana* + *P. boldus* alcanzaron el 90% de mortalidad a las 24 h con la concentración de 400 mL aceite esencial kg^{-1} cereal (Tabla 3). Al analizar los valores del ICA se observa que los tratamientos de *P. boldus* + *L. sempervirens*, *P. boldus* + *L. philippiana* y *L. sempervirens* + *L. philippiana* presentan efecto antagónico debido a que el valor es menor a 1 (Gaete y Chávez, 2008). Por otra parte, el IAC indica que solo el aceite de *P. boldus* obtuvo un efecto de potenciación al mostrar en todos los tratamientos en que se incluyó un valor superior a 1. Esto se debe a que por ser el menos tóxico de los tres aceites esenciales al mezclarse con los tratamientos de mayor toxicidad aumentó su actividad. El único tratamiento que mostró potenciación para ambos componentes de la mezcla fue *L. philippiana* + *L. sempervirens* con 6.49 y 4.74 respectivamente lo cual se

debería a la presencia de safrol como componente mayoritario en ambas especies (Bustos et al. 2006) junto con que *L. philippiana* también presenta linalool (34.4%) el cual según Cansian et al (2015) presenta toxicidad sobre *S. zeamais*.

La proporción de 1:20 se mantuvo una tendencia similar a los tratamientos de la proporción 1:10 ya que los tratamientos y concentraciones que mostraron los mejores resultados fueron las mismas (Tabla 4). El ICA de los tratamientos en esta proporción mostró antagonismo con valores menores a 1 en las combinaciones de *P. boldus* + *L. sempervirens*, *P. boldus* + *L. philippiana*, *L. sempervirens* + *L. philippiana* y *L. philippiana* + *L. sempervirens*. Pero, al analizar las especies individualmente con el IAC se puede ver que todas las combinaciones son antagonistas para *L. sempervirens* y *L. philippiana* mientras que para *P. boldus* todas presentan potenciación. Esto se debe a que el compuesto químico mayoritario de *P. boldus* es 1-8 cineol (Bustos et al. 2016) el cual tiene actividad insecticida como fumigante (Lee et al. 2004) y no de contacto lo cual explica su baja actividad biológica en la presente investigación.

Finalmente los resultados obtenidos en los diferentes bioensayos permiten concluir que la mezcla de los aceites esenciales de *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones de 1:1 y 1:10 potencian la acción insecticida de contacto de ambos en comparación a utilizarlos individualmente. Igualmente se concluye que *P. boldus* no presenta toxicidad de contacto significativa contra adultos de *S. zeamais*. Aunque, estos resultados deben ser validados en experimentos de mayor envergadura en condiciones de bodega.

Agradecimientos

Los autores agradecen al programa Fondecyt iniciación de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) que a través del proyecto N° 11110105 “Essential oil of *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz et Pau.) Tul and *Laureliopsis philippiana* Looser as an alternative to synthetic insecticides to *Sitophilus* spp. complex and *Acanthocelides obtectus* say control in stored seeds”, financió la presente investigación.

Tabla 1.- Toxicidad por contacto de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados individualmente contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	Concentración*	Mortalidad (%)				
		24 h	48 h	72 h	7 días	15 días
<i>P. boldus</i>	25	0.0	0.0	0.0	1.25	1.25
	50	0.0	0.0	0.0	3.75	3.75
	100	0.0	0.0	0.0	1.25	6.25
	200	0.0	0.0	0.0	0.0	6.25
	400	10.0	16.25	20.0	80.0	91.25
<i>L. sempervirens</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	50	0.0	1.25	1.25	5.0	5.0
	100	0.0	1.25	6.25	28.7	31.3
	200	10.0	55.0	80.0	93.8	97.5
	400	98.8	100	100	100	100
<i>L. philippiana</i>	25	0.0	0.0	1.25	5.0	5.0
	50	2.5	1.25	2.50	2.50	10.0
	100	1.25	10.0	15.0	18.75	20.0
	200	8.75	25.0	40.0	56.25	57.5
	400	63.75	88.75	98.75	98.75	100

*mL aceite esencial kg⁻¹ cereal

Tabla 2.- Toxicidad por contacto de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en una proporción de 1:1 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	Concentración*	Mortalidad (%)				
		24 horas	48 horas	72 horas	7 días	15 días
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	1.25
	50	0.0	1.25	1.25	1.25	2.5
	100	0.0	2.50	2.50	3.75	8.75
	200	1.25	25.0	28.75	52.50	55.0
	400	92.5	100	100	100	100
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i>	25	0.0	0.0	0.0	1.25	2.5
	50	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0
	100	1.25	1.25	1.25	2.5	3.75
	200	0.0	0.0	3.75	18.95	21.44
	400	85.0	98.8	100	100	100
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	1.25
	50	0.0	0.0	1.25	3.75	3.75
	100	0.0	0.0	0.0	1.25	1.25
	200	5.0	17.5	32.5	55.0	62.5
	400	96.25	100	100	100	100

*mL aceite esencial kg⁻¹ cereal

Tabla 3.- Toxicidad por contacto de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en una proporción de 1:10 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	Concentración*	Mortalidad (%)				
		24 horas	48 horas	72 horas	7 días	15 días
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	100	0.0	0.0	2.5	5.0	6.2
	200	13.8	47.5	61.3	67.5	69.67
	400	96.3	98.75	100	100	100
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	100	0.0	0.0	1.25	3.75	3.75
	200	2.5	6.25	7.50	31.3	41.9
	400	65.0	96.3	97.5	100	100
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	50	0.0	1.25	1.25	1.25	1.25
	100	0.0	0.0	1.25	5.0	5.0
	200	0.0	0.0	0.0	1.25	5.0
	400	17.5	63.7	70.0	97.5	97.5
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	50	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5
	100	0.0	0.0	0.0	1.25	2.5
	200	2.50	5.0	8.75	40.0	41.7
	400	93.8	93.8	97.5	100	100
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i>	25	0.0	0.0	0.0	1.25	1.25
	50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	200	0.0	3.75	7.50	20.0	20.0
	400	36.3	46.3	78.8	97.5	97.5
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	1.25
	50	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	100	0.0	1.25	1.25	1.25	2.56
	200	12.5	25.0	26.3	64.6	68.4
	400	60.0	93.8	97.5	100	100

*mL aceite esencial kg⁻¹ cereal

Tabla 4.- Toxicidad por contacto de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en una proporción de 1:20 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	Concentración*	Mortalidad (%)				
		24 horas	48 horas	72 horas	7 días	15 días
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i>	25	0.0	1.25	1.25	1.25	1.25
	50	0.0	0.0	0.0	0.0	2.50
	100	0.0	0.0	1.25	1.25	1.25
	200	5.0	40.0	63.8	68.8	73.8
	400	97.5	100	100	100	100
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	50	0.0	0.0	0.0	1.25	7.5
	100	0.0	1.25	3.75	3.75	6.25
	200	12.5	25.0	28.8	40.0	41.3
	400	48.8	68.8	73.8	91.3	97.5
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	50	0.0	0.0	1.25	2.5	2.5
	100	0.0	0.0	0.0	1.25	1.25
	200	1.25	1.25	6.25	13.8	16.3
	400	58.8	73.8	93.8	100	100
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i>	25	0.0	0.0	0.0	1.25	1.25
	50	0.0	0.0	0.0	1.25	1.25
	100	0.0	0.0	1.25	6.25	6.25
	200	2.5	5.0	7.5	50.0	58.8
	400	93.8	95.0	96.3	97.5	100
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	1.25
	50	0.0	0.0	0.0	0.0	1.25
	100	0.0	0.0	1.25	3.75	3.75
	200	0.0	0.0	1.25	3.75	3.75
	400	51.3	72.5	81.3	93.8	97.5
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i>	25	0.0	0.0	0.0	0.0	1.25
	50	0.0	0.0	0.0	3.8	5.1
	100	0.0	0.0	1.25	3.8	5.1
	200	6.25	12.5	17.7	73.3	79.7
	400	88.8	98.8	100	100	100

*mL aceite esencial kg⁻¹ cereal

Tabla 5.- Concentración letal 50% (CL₅₀) de la toxicidad por contacto de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados individualmente y en mezcla en una proporción de 1:1 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	CL ₅₀ *	S [§]
<i>P. boldus</i>	313.3	3.32
<i>L. sempervirens</i>	115.1	5.54
<i>L. philippiana</i>	157.6	3.25
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i>	186.9	5.97
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i>	229.8	4.5
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i>	182.3	5.2

*mL aceite esencial kg cereal [§]S=pendiente línea dosis-probit (Ldp)

Tabla 6.- Concentración letal 50% (CL₅₀) de la toxicidad por contacto de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en proporciones de 1:10 y 1:20 contra adultos de *Sitophilus zeamais*.

Tratamiento	CL ₅₀ *	S [§]
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:10)	171.1	7.27
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i> (1:10)	216.5	6.94
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:10)	263.2	5.74
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i> (1:10)	206.3	6.35
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:10)	24.25	5.50
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:10)	180.4	8.90
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:20)	170.5	5.88
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i> (1:20)	218.9	4.72
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:20)	241.2	5.72
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i> (1:20)	188.0	4.42
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:20)	290.2	11.1
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:20)	158.2	5.54

*mL aceite esencial kg cereal [§]S=pendiente línea dosis-probit (Ldp)

Tabla 7.-Índice de acción conjunta (IAC) e Índice de concentración-adición (ICA) para la toxicidad por contacto contra *Sitophilus zeamais* de mezclas de los aceites esenciales de *Peumus boldus*, *Laurelia sempervirens* y *Laureliopsis philippiana* evaluados en mezcla en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20.

Tratamiento	IAC ₁ *	IAC ₂ *	IAC ₃ *	ICA**
	<i>P. boldus</i>	<i>L. sempervirens</i>	<i>L. philippiana</i>	
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:1)	1.67	0.62	--	1.14
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:1)	1.36	--	0.68	1.02
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:1)	--	0.63	0.86	0.74
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:10)	1.83	0.67	--	0.77
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i> (1:10)	1.44	0.53	--	1.36
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:10)	1.19	--	0.59	0.65
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i> (1:10)	1.51	--	0.76	1.44
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:10)	--	4.74	6.49	6.34
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:10)	--	0.63	0.87	0.66
<i>P. boldus</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:20)	1.83	0.67	--	0.73
<i>L. sempervirens</i> + <i>P. boldus</i> (1:20)	1.43	0.52	--	1.38
<i>P. boldus</i> + <i>L. philippiana</i> (1:20)	1.29	--	0.65	0.68
<i>L. philippiana</i> + <i>P. boldus</i> (1:20)	1.66	--	0.83	1.62
<i>L. sempervirens</i> + <i>L. philippiana</i> (1:20)	--	0.39	0.54	0.53
<i>L. philippiana</i> + <i>L. sempervirens</i> (1:20)	--	0.72	0.99	0.74

* IAC <1= Efecto antagonista ,IAC=1= Efecto aditivo, IAC>1=Efecto potenciador **ICA<1= Efecto antagonista, ICA=1= Efecto aditivo, ICA>1=Efecto potenciador

Referencias citadas

- Abbassy, M., S.A. Addelgaleil and R.Y.A. Rabie. 2009. Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 131: 225-232.
- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265-267.
- Ahmad, M., M.A. Saleem, and A.H. Sayyed. 2009. Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid- and organophosphate-resistant populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci.* 65:266-274.
- Arias, C. and H. Dell'Orto. 1983. Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. FAO-INIA. Santiago. Chile.
- Betancur, J., G. Silva, J.C. Rodríguez, S. Fischer, and N. Zapata. 2010. Insecticidal activity of *Peumus boldus* Molina essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70:399-407.
- Bustos, G., G. Silva, S. Fischer, I. Figueroa, A. Urbina y J.C. Rodríguez. 2016. Repelencia de mezclas de aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. y *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Southwestern Entomologist*. **En arbitrio**.
- Cansian, R.L., V. Astolfi, R.I. Cardoso, N. Paroul, S.S. Roman, A.A. Mielnoczki-Pereira, G.F. Pauletti and A.J. Mossi. 2015. Insecticidal and repellent activity of the essential oil of *Cinnamomum camphora* var. *Linaoolifera* Y. Fujita (Ho-Sho) and *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl. Var. *Hosyo* (Hon-Sho) on *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera, Curculionidae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 17:769-773.
- Finney, D. J. 1974. *Probit Analysis a Statistical Treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge University Press. New York. 255p.
- Gaete, H. y C. Chávez. 2008. Evaluación de la toxicidad de mezclas binarias de cobre, cinc y arsénico sobre *Daphnia obtusa* (Kurz, 1984) (Cladocera, Crustacea). *Limnetica*. 27(1): 1-10.
- Halstead, D. 1963. External sex differences in stored-products coleoptera. *Bull. Entomol. Res.* 54(1): 119-134.
- Huang, Y., S.H. Ho and R.M. Kini. 1999. Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* 92(3): 676-683.

- Huang F. and B. Subramanyam. 2005. Management of five stored-product insects in wheat with pirimiphosmethyl and pirimiphos-methyl plus synergized pyrethrins. *Pest Management Science* 61: 356-362.
- Kouninki, H., T. Hance, F.A. Noudjou, G. Lognay, F. Malaisse, M.B. Ngassoum, et al. 2007. Toxicity of some terpenoids of essential oil of *Xylopia aethiopica* from Cameroon against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Journal of Applied Entomology* 131(4):269-274.
- Larraín, P. 1994. Manejo integrado de plagas en granos almacenados. *IPA La Platina* 81:10-16.
- Lee, B-H., P. Annis, F. Tumaalii, S. Lee. 2004. Fumigant toxicity of *Eucalyptus blakelyi* and *Melaleuca fulgens* essential oils and 1,8-Cineole against different development stages of the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Phytoparasitica*. 32(5): 498-506
- Lima, R., M. Cardoso, J. Moraes, B. Melo, V. Rodrigues e P. Guimarães. 2009. Atividade insecticida do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Acta Amazon.* 39(2): 377-382.
- Maurya, P., P. Sharma, L. Mohan, M. M. Verma and C. N. Srivastava. 2012. Larvicidal efficacy of *Ocimum basilicum* extracts and its synergistic effect with neonicotinoid in the management of *Anopheles stephensi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Diseases* 12:110-116.
- Norambuena, C. G. Silva, A. Urbina, I. Figueroa and J.C. Rodríguez. 2016. Insecticidal activity of *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde (Atherospermataceae) essential oil against *Sitophilus* spp. (Coleoptera Curculionidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 76:En prensa.
- Obeng-Ofori, D., CH. Reichmuth and A. Hassanali. 1997. Biological activity of 1,8 cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. *J. Appl. Ent.* 121:237-243.
- Obeng-Ofori, D. and S. Amiteye. 2005. Efficacy of mixing vegetable oils with pirimiphos-methyl against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky in stored maize. *Journal of Stored Products Research* 41: 57-66.
- Ortiz, A., G. Silva, A. Urbina, N. Zapata, J.C. Rodríguez and A. Lagunes. 2012. Bioactivity of Tapa (*Laureliopsis philippiana* (Looser) Shodde) powder to *Sitophilus zeamais* Motschulsky control in laboratory. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(1):68-73.
- Otitoloju, A. 2002. Evaluation of the joint-action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle *Tympanotonus fuscatus var radula* (L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53:404-415.

- Otitoloju, A. 2003. Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals. *Journal of Environmental Management* 67:121-128.
- Philogène, B.J.R. 2012. Acción sinérgica de los compuestos de origen vegetal. Pag. 67-76. *In* C. Regnault-Roger, B.J.R., Philogène and C. Vincent (ed). *Biopesticidas de origen vegetal*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.
- Pizarro, D., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, A. Urbina, A. Lagunes, C. Santillán-Ortega, A. Robles-Bermúdez y Sotero Aguilar-Medel. 2013. Actividad insecticida del polvo de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12(4):420-430.
- Pizarro, D., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, A. Urbina, A. Lagunes, C. Santillán-Ortega, A. Robles-Bermúdez, Sotero Aguilar-Medel e I. Tucuch. 2014. Aceite esencial de follaje de *Peumus boldus* colectado en otoño para el control del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean Journal of Agricultural and Animal Science*. 30(3):171-180.
- Pretheep-Kumar, P., S. Mohan and P. Balasubramanian. 2010. Insecticide resistance stored-products insects. Mechanism and management strategies. Lambert Academic Publishing. Lexington, KY. USA.
- Roel, A and J.D. Vendramim. 2006. Efeito residual do extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) para lagartas de diferentes idades de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Ciencia Rural* 36: 1049-1054.
- Robertson, J., R. Russell, H. Preisler and N. E. Savin. 2007. *Biossays with arthropods*. CRS Press. Boca Ratón. Florida. USA.
- Salvadores, Y., G. Silva, M. Tapia y R. Hepp. 2007. Polvos de especies aromáticas para el control del gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, en trigo almacenado. *Agricultura Técnica (Chile)*. 67: 147-154.
- SAS Institute. 1998. Language guide for personal computer release. 6.03 Edition. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Shalan, E., D.V. Canyon, M.W. Younes, H. Abdel-Wahab and A. Mansour. 2005. Synergistic efficacy of botanicals blends with and without synthetic insecticides against *Aedes aegypti* and *Culex annulirostris* mosquitoes. *Journal of Vector Ecology* 30:284-288.
- Sode, O.J., F. Mazaud and F. Troude. 1995. Economics of grain storage. *In*: D. Jayas, N. White and W.E. Muir. (Eds). *Stored-Grain Ecosystems*. Pp. 101-122. Marcel Dekker, Inc. New York. USA.

- Torres, C., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, I. Figueroa, A. Lagunes, C. Santillán, A. Robles, S. Aguilar and I. Tucuch. 2014a. Insecticidal activity of *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Til. Essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Chilean Journal of Agricultural Research 74(4):421-426.
- Torres, C., G. Silva, M. Tapia, J.C. Rodríguez, I. Figueroa, A. Lagunes, C. Santillán, A. Robles y S. Aguilar. 2014b. Propiedades insecticidas del polvo de *Laurelia sempervirens* L. para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 14(1):48-59.
- Tripathi, A.K. and S. Upadhyay. 2009. Repellent and insecticidal activities of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) leaf essential oil against four stored-grain coleopteran pests. International Journal of Tropical Insect Science 29(4):219-228.
- Vogel, H., I. Razmilic y U. Doll. 1997. Contenido de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de boldo (*Peumus boldus* Mol.). Cien. Investig. Agrar. 24(1): 1-6.
- Yuya, A. I., A. Tadesse, F. Azerefegne and T. Tefera. 2009. Efficacy of combining niger seed oil with malathion 5% dust formulation on maize against the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Journal of Stored Products Research. 42:67-70.
- Zapata, N. and G. Smagghe. 2010. Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. Ind. Crops Prod. 32(3): 405-410.

CONCLUSIONES GENERALES

1.- La mezcla del aceite esencial de *P. boldus* con *L. philippiana* en proporciones de 1:1, 1:10 y 1:20 potencian la actividad insecticida como fumigante contras adultos de *S. zeamais*.

2.-Los aceites esenciales de *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporción de 1:1 potencian la acción insecticida de contacto contras adultos de *S. zeamais*.

3.-La mezcla de los aceites esenciales de *P. boldus*, *L. sempervirens* y *L. philippiana* en proporciones 1:1 y 1:10 potencia el efecto repelente sobre *S. zeamais*.

