



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Agronomía - Programa de Magister en Ciencias Agronómicas

**Actividad insecticida y antixenótica del aceite esencial de  
*Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)  
silvestre sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky  
(Coleoptera, Curculionidae)**

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

MARCO ISRAEL OROZCO PASACA  
CHILLÁN-CHILE  
2016

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



ACTIVIDAD INSECTICIDA Y ANTIXENÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*CHENOPODIUM AMBROSIOIDES* L. (CHENOPODIACEAE) SILVESTRE SOBRE  
*SITOPHILUS ZEAMAI*S MOTSCHULSKY (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE)

**Aprobada por:**

Gonzalo Silva Aguayo  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.  
Profesor Asociado

\_\_\_\_\_

Profesor Guía

Universidad de São Paulo,  
José Djair Vendramim  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.  
Profesor Titular

\_\_\_\_\_

Evaluador Externo

Inés Figueroa Cares  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.  
Profesora Asistente

\_\_\_\_\_

Evaluador Interno

Susana Fischer G.  
Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr. Cs.  
Profesor Asociado

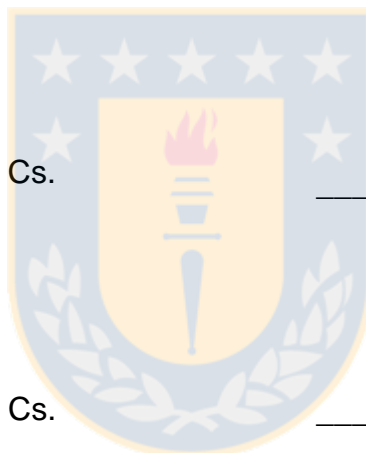
\_\_\_\_\_

Evaluador Interno

Leandro Paulino  
Ing. Forestal, Mg. Cs., Dr. Cs.  
Profesor Asistente

\_\_\_\_\_

Director (s) del Programa



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	2
HIPÓTESIS .....	5
OBJETIVO GENERAL .....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
LITERATURA CITADA .....	6
CAPÍTULO I .....	10
Efecto insecticida y antixenótico del aceite esencial de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae) silvestre sobre <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). .....	10
Resumen.....	10
Introducción .....	11
Materiales y métodos .....	12
Resultados .....	17
Discusión .....	23
Literatura citada .....	27
CAPÍTULO II .....	31
Antixenotic activity of wild <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae) essential oil against <i>Sitophilus zeamais</i> Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). .....	31

Abstract.....	31
Introduction .....	32
Materials and methods.....	34
Results .....	38
Discussion.....	44
References.....	48
CONCLUSIONES GENERALES.....	54



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### CAPÍTULO I

Tabla 1 Efecto fumigante en un volumen de 150 mL del aceite esencial de <i>Ch. ambrosioides</i> silvestre sobre <i>S. zeamais</i> adultos.....	18
Tabla 2 Efecto fumigante en un volumen de 6 L del aceite esencial de <i>Ch. ambrosioides</i> silvestre sobre <i>S. zeamais</i> adultos .....	18
Tabla 3 Mortalidad por contacto con superficie de vidrio tratada con aceite esencial de <i>Ch. ambrosioides</i> silvestre sobre <i>S. zeamais</i> adultos .....	20
Tabla 4 Mortalidad por contacto con superficie de concreto tratada con aceite esencial de <i>Ch. ambrosioides</i> silvestre sobre <i>S. zeamais</i> adultos con maíz a granel en condiciones de bodega .....	21
Tabla 5 Mortalidad por contacto con superficie de concreto y bolsas tratadas con aceite esencial de <i>Ch. ambrosioides</i> silvestre sobre <i>S. zeamais</i> adultos en condiciones de bodega. ....	22
Figura 1 Efecto antixenótico de bolsas tratadas con aceite esencial de <i>Ch. ambrosioides</i> silvestre sobre <i>S. zeamais</i> adultos en una superficie de concreto sin tratamiento en condiciones de bodega.....	21
Figura 2 Efecto antixenótico en bolsas y superficie de concreto tratadas con aceite esencial de <i>Ch. ambrosioides</i> silvestre sobre <i>S. zeamais</i> en condiciones de bodega.....	22

### CAPÍTULO II

Table 1 Analysis of the chemical composition of essential oil of wild <i>Ch. ambrosioides</i> by gas chromatography .....	39
Table 2 Choice of adults of <i>S. zeamais</i> for maize treated with wild <i>Ch. ambrosioides</i> essential oil at different concentrations.....	40
Table 3 Preference, after 72 hour, of adults of <i>S. zeamais</i> for maize treated with wild <i>Ch. ambrosioides</i> essential oil at different concentrations under laboratory conditions.....	42
Table 4 Residual effect evaluated by the preference index (IP) of wild <i>Ch. ambrosioides</i> essential oil against adults of <i>S. zeamais</i> .....	43
Fig 1 Repellent effect of wild <i>Ch. ambrosioides</i> essential oil at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 % against male (M) and female (F) adults of <i>S. zeamais</i> during 5 minutes of observations .....	41

Fig 2 Percentage of adults of *S. zeamais* outside of the bags treated with wild *Ch. ambrosioides* essential oil at concentrations of 1.0, 2.0 and 4.0% after five days ..... 44



## RESUMEN

A nivel mundial, los cereales son el alimento de origen vegetal de mayor valor nutritivo, por lo que su protección contra el ataque de insectos plaga es de gran relevancia económica. *Sitophilus zeamais* Motschulsky, es uno de los principales problemas fitosanitarios de los granos almacenados, ya que ataca cereales tanto en bodega como en campo. El control de este insecto se basa en el uso de insecticidas sintéticos, que aunque son eficientes provocan efectos adversos como desarrollo de resistencia y contaminación ambiental. La utilización de compuestos vegetales de plantas aromáticas ha demostrado ser una alternativa de control y entre ellos se destaca el polvo, aceite esencial y extractos de *Chenopodium ambrosioides* L. cultivado para fines terapéuticos que han mostrado actividad biológica insecticida y repelente sobre *S. zeamais*. Sin embargo, la composición química de los aceites esenciales varía por diversos factores entre especies, variedades e incluso entre poblaciones de la misma especie, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto insecticida y antixenótico del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* proveniente de una población silvestre, sobre adultos de *S. zeamais*. Se realizaron bioensayos de efecto fumigante, utilizando cámaras de gas de diferentes volúmenes y de toxicidad por contacto con superficie tratada (vidrio, concreto y bolsas de polipropileno). Además, se llevaron a cabo bioensayos de antixenosis con olfatómetro en "Y" y bolsas de polipropileno tratadas. Los compuestos que se encontraron en mayor proporción en el aceite esencial fueron  $\alpha$ -terpineno (42,38%), 11-heneicosanol (20,91%) y o-cimeno (20,74%). Por efecto fumigante, la mortalidad aumentó al incrementar la concentración de aceite esencial, llegando a 100% de insectos muertos en la concentración más alta (5%) en un volumen de 150 mL de aire. Solo la concentración de 20% causó una mortalidad superior al 50% en 6 y 14 L de aire, pero disminuyó a 8% en un volumen de 28 L de aire. En el bioensayo de contacto con superficie tratada, la mortalidad también se incrementó cuando se elevó la concentración de aceite esencial. En la superficie de vidrio la mortalidad superó el 80% en las concentraciones más altas pero en el concreto y bolsas de polipropileno no alcanzó el 60%. No obstante, en el bioensayo de bolsas tratadas



se observó efectos antixenóticos y en las pruebas de preferencia se registró una tendencia de selección mayoritaria por el testigo y las menores concentraciones de aceite esencial. En el bioensayo de antixenosis, el maíz tratado con aceite esencial presentó un mayor efecto repelente y de no preferencia en las concentraciones más altas (1 y 2%) y no se encontró diferencia significativa en la respuesta asociada al sexo del insecto. La residualidad del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* disminuyó con el tiempo, alcanzando en las concentraciones más altas solo 72 horas. En el experimento con bolsas tratadas, la concentración de 4% de aceite esencial impidió el ingreso de insectos durante cinco días. Se concluye que el aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre posee actividad insecticida como fumigante y contacto, además de efecto antixenótico sobre *S. zeamais*.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

A nivel mundial, se considera a los cereales como los productos de origen vegetal de mayor importancia alimentaria para humanos y animales domésticos (Dell'Orto & Arias, 1983, Silva *et al* 2005). Los cereales son una importante fuente de proteínas y carbohidratos para la población (García *et al* 2007) y según datos de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA), en la temporada 2012-2013 la superficie cultivada con cereales en Chile fue de aproximadamente 576 mil hectáreas, siendo los cultivos más importantes trigo con 44%, maíz con 24%, y avena con 22% (ODEPA 2016). No obstante, factores como los insectos, enfermedades y roedores limitan su producción y calidad como alimento o semilla (García *et al* 2007). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), de la producción global de granos almacenados, entre un 5 y 10 % se pierde por causa de insectos plaga (FAO 1993).

Los cereales almacenados presentan un comportamiento de ecosistema dinámico, en el que la interacción de agentes bióticos y abióticos influyen en el deterioro de los granos (Salgado *et al* 2012). Una de las plagas más importante de los cereales

almacenados es *Sitophilus zeamais* Motschulsky, conocido comúnmente como gorgojo de los cereales (Danho *et al* 2002). Este insecto causa grandes pérdidas económicas tanto en Chile como en el resto del mundo (Bittner *et al* 2008) y especialmente en regiones tropicales y subtropicales (Throne 1994), afectando cereales tanto en bodega como en campo (Danho *et al* 2002). Larvas y adultos producen pérdida de peso del grano y disminución en su valor comercial, nutritivo y capacidad germinativa (Lorini 2003).

El control de insectos plaga de granos almacenados se realiza con insecticidas sintéticos tanto a gran escala como a nivel de pequeños agricultores (Tavares & Vendramim 2005a), especialmente con fumigantes como bromuro de metilo y fosfuro de aluminio, que han mostrado ser eficaces y de bajo costo (Subramanyam & Hagstrum 1995, SAG 2016). Sin embargo, efectos perjudiciales como desarrollo de resistencia por parte de los insectos, acumulación de residuos en el ambiente, además de ser compuestos que pueden desgastar potencialmente la capa de ozono, determinan que el uso de estos insecticidas sea cada vez menos recomendable (Bittner *et al* 2008). Este tema ha sido de gran preocupación en el aspecto social, ya que la presencia de insecticidas en los alimentos y ambiente ha dado paso a debates y presiones tanto económicas como políticas con el fin de reducir el uso de insecticidas sintéticos (Rebek *et al* 2012). Por esto, se han tomado medidas como la implementada en Estados Unidos en 1996 que limita el número y tipo de insecticidas convencionales, especialmente del grupo de los organofosforados y carbamatos, que los agricultores pueden utilizar (Isman 2000). Por lo cual, es de gran importancia la búsqueda de métodos alternativos que no produzcan problemas de contaminación ambiental, efectos perjudiciales contra organismos benéficos o residuos en los alimentos (Tavares & Vendramim 2005a).

Una de estas alternativas son los insecticidas de origen vegetal como aceites esenciales, polvo o extractos, cuyo uso en el control de plagas ya sea como repelente, fumigante o regulador del crecimiento, ha sido reportado contra varios insectos desde muy antigua data (Isman 2006). Estos compuestos tienen menos efectos tóxicos contra organismos no objetivo, junto con ser fácilmente

biodegradables, lo que los hace idóneos para la protección de granos almacenados, contra insectos plaga (Rebek *et al* 2012, Salgado *et al* 2012).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios producidos por las plantas, los cuales están constituidos por una compleja mezcla de compuestos orgánicos entre los que se encuentran terpenos y sesquiterpenos aunque también pueden presentarse compuestos oxigenados como ésteres, éteres, alcoholes, cetonas, aldehídos, fenoles, éteres de fenol y lactonas, entre otros (Guenther 1972, Nerio *et al* 2010). El modo de acción de los aceites esenciales sobre los insectos es neurotóxico, bloqueando los receptores de un neurotransmisor conocido como octopamina lo que altera el metabolismo, frecuencia cardíaca, movimiento y comportamiento del insecto. La carencia de estos receptores en vertebrados resulta en una acción selectiva de los aceites esenciales sin llegar a afectar a los humanos y otros vertebrados (Isman 2000). Además, poseen propiedades antixenóticas, como repelentes o antialimentarios, que es una característica utilizada por las plantas para limitar la capacidad de los insectos de utilizarlas como refugio o sitio de oviposición o alimento (Fancelli *et al* 2005, Castro *et al* 2011, Oyetunji *et al* 2014).

Una especie vegetal con potencial para el control de insectos plaga es *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), comúnmente conocida en Chile como paico, erva de Santa María en Brasil o epazote en México (Gómez 2008). *Ch. ambrosioides* es una planta aromática perenne o anual con una altura aproximada de 40 cm, cuyo origen se sitúa en las regiones tropicales de América aunque actualmente su distribución también comprende Europa y África (Hegazy & Farrag 2007, Gómez 2008). Estudios realizados con polvo, aceite esencial y extractos de *Ch. ambrosioides* cultivado con fines terapéuticos han mostrado actividad biológica sobre varias especies de insectos como *Caryedon serratus* Olivier (Coleoptera: Bruchidae) (Delobel & Malonga 1987), *S. zeamais* (Tavares & Vendramim 2005a, Tavares & Vendramim 2005b, Silva *et al* 2005, Chu *et al* 2011, Jaramillo *et al* 2012, Mazzonetto *et al* 2013), *Callosobruchus maculatus* F.

(Coleoptera: Bruchidae) y *Tribolium castaneum* Jacqueline du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae) (Denloye *et al* 2010), entre otros.

La composición química de los aceites esenciales varía drásticamente dependiendo de la especie y variedad vegetal e incluso dentro de la misma especie la variación puede depender del área geográfica (Trongtoki *et al* 2005). Además, comúnmente la selección artificial de las plantas tiende a modificar los fenotipos presentes en esta, tales como el tamaño, dispersión, dormancia de semillas y concentración de metabolitos secundarios, afectando sus mecanismos de protección contra herbívoros. Por tanto, la resistencia química de las plantas, puede presentar diferencias entre plantas domesticadas y silvestres, lo que conlleva costos y beneficios para esta ya que aumenta el rendimiento pero es más susceptible al ataque de patógenos (Pickersgill 2007, McKey *et al* 2010). En cuanto a *Ch. ambrosioides* se ha reportado que las condiciones de cultivo pueden influir en la concentración de metabolitos secundarios de importancia biológica (Blanckaert *et al* 2012), por lo que el objetivo de la presente investigación fue estudiar el efecto insecticida y antixenótico del aceite esencial de una población silvestre de *Ch. ambrosioides* sobre adultos de *S. zeamais*.

## **HIPÓTESIS**

El aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* proveniente de una población silvestre presenta actividad insecticida y antixenótica sobre adultos de *Sitophilus zeamais*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto insecticida y antixenótico del aceite esencial de una población silvestre de *Chenopodium ambrosioides* sobre adultos de *Sitophilus zeamais*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto insecticida fumigante (por inhalación) del aceite esencial de una población silvestre de *Ch. ambrosioides* sobre *S. zeamais*.
2. Determinar el efecto tóxico por contacto del aceite esencial de una población silvestre de *Ch. ambrosioides* sobre *S. zeamais*.

3. Evaluar la actividad antixenótica del aceite esencial de una población silvestre de *Ch. ambrosioides* sobre *S. zeamais*.

## LITERATURA CITADA

Bittner M, Casanueva M, Arbert C, Aguilera M, Hernández V, Becerra V (2008) Effects of essential oils from five plant species against the granary weevils *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera) J. Chil. Chem. Soc., 53 (1): 1444-1448

Blanckaert I, Paredes-Flores M, Espinosa F, Piñero D, Lira R (2012) Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. Genet Resour Crop Evol. 59:557-573

Castro A, Henriques D, Coutinho M, Terra N, de Sena Fernandes M (2011) Tomato plant inheritance of antixenotic resistance to tomato leafminer. Pesq. agropec. bras. 46(1): 74-80

Chu SS, Feng H, Liu Z (2011) Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Pest Manag Sci.67: 714–718

Danho M, Gaspar C, Haubruge E (2002) The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. J. Stored Prod. Res., 38: 259–266

Dell'Orto H, Arias C (1983) Distribución e importancia de los insectos que dañan granos y productos almacenados en Chile. Santiago, Chile: FAO/INIA. 67

Delobel A, Malonga P (1987) Insecticidal properties of six plant materials against *Caryedon serratus* (Olivier) (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod. Res., 23(3): 173-176

- Denloye A, Makanjuola W, Teslim O, Alafia O, Kasali A, Eshilokun A (2010). Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) products from Nigeria against three storage insects. J. Plant Prot. Res. 50 (3): 379-384
- Fancelli M, Vendramim JD, Frighetto RTS, Lourenção AL (2005) Exsudato glandular de genótipos de tomateiro e desenvolvimento de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Sternorrhyncha: Aleyrodidae) biótipo B. Neotrop. Entomol. 34: 659-665
- FAO (1993) Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. <http://www.fao.org/docrep/x5027s/x5027S00.htm#Contents>. Accessed 12 May 2015
- García S, Espinosa C, Bergvinson D (2007) Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, México, p 7
- Gómez B (2008) Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas.7 (1) 1-9
- Guenther E (1972) The Essential Oils. Krieger Publishing Company, Florida, USA
- Hegazy A, Farrag H (2007) Allelopathic potential of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants. GJBB. 2(1): 01-09
- Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19: 603-608
- Isman, M (2006) Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Ann. Rev. Entomol. 51: 45-66
- Jaramillo B, Duarte E, Delgado W (2012) Bioactivity of essential oil from Colombian *Chenopodium ambrosioides*. Rev. Cubana Plant. Med. 17(1): 54-64
- Lorini E (2003) Manual técnico para o manejo integrado de pragas de grãos de cereais armazenados. Passo Fundo. Embrapa Trigo. p 80

Mazzonetto F, Corbani R, Dalri A (2013) Biofumigation of plant species on *Sitophilus zeamais* in stored maize. Appl. Res. Agrotec. 6(1): 53-61

McKey D, Elias M, Pujol B, Duputié A (2010) The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. New Phytol. 186: 318-332

Nerio LS, Oliver J, Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: A review. Bioresource Technol. 101: 372–378

ODEPA (2016) Estadísticas productivas. <http://www.odepa.cl/estadisticas/productivas/>. Accessed 24 Feb 2016

Oyetunji O, Nwilene F, Togola A, Adebayo (2014) Antixenotic and antibiotic mechanisms of African rice gall midge in Nigeria. Trends Appl. Sci. Res. 9(4): 174-186

Pickersgill B (2007) Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. Ann. Bot. 100: 925-940

Rebek E, Frank S, Royer T, Bográn C (2012). Alternatives to Chemical Control of Insect Pests, Insecticides - Basic and Other Applications. Intech, USA. 171-196

SAG (2016) Lista de plagas autorizadas <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/evaluacion-y-autorizacion-de-plaguicidas/1367/registros>. Accessed 24 Feb 2016

Salgado D, D'Antonino L, Soto A (2012) Essential oil of *Piper crassinervum* to control of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). Bol Cient Mus Hist Nat 16 (1): 99 - 107

Silva G, Kiger R, Hepp R, Tapia V (2005). Control de *Sitophilus zeamais* con polvos vegetales de tres especies del género *Chenopodium*. Pesq agropec bras Brasília, 10(40): 953-960

Subramanyam B, Hagstrum D (1995) Integrated Management of Insects in Stored Products. Resistance measurement and management, New York, U.S.A, 1995

Tavares MAGC, Vendramim DJ (2005)a Atividade inseticida da erva-de-santa-maria *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (col.: curculionidae). Arq Inst Biol 72 (1): 51-55

Tavares MACG, Vendramim JD (2005)b Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Neotrop. Entomol. 34(2):319-323

Throne JE (1994) Life history of immature maize weevils (Coleoptera: Curculionidae) on corn stored at constant temperatures and relative humidities in the laboratory. Environ. Entomol. 23: 1459–1471

Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C (2005) Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytother. Res. 19: 303–309





## CAPÍTULO I

### **Efecto insecticida y antixenótico del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) silvestre sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae).**

MI Orozco<sup>1</sup>, G Silva<sup>1</sup>, JD Vendramim<sup>2</sup>, I Figueroa<sup>1</sup>, S Fischer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Vicente Méndez 595, Chillán, Chile. morozco@udec.cl, gosilva@udec.cl

<sup>2</sup>Depto. Entomologia y Acarologia, ESALQ/USP, C. postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP. jdvendra@usp.br

#### **Resumen**

La protección de granos almacenados contra insectos plaga tiene gran importancia a nivel mundial. *Sitophilus zeamais* es un insecto que ataca una gran cantidad de cereales tanto en bodega como campo y su control se basa en insecticidas sintéticos. Sin embargo, aunque estos compuestos son eficaces provocan efectos negativos para el ambiente, además del desarrollo de resistencia por parte del insecto. Una de las alternativas son los compuestos naturales como los aceites esenciales. *Chenopodium ambrosioides* cultivado para fines terapéuticos ha mostrado actividad insecticida y antixenótica contra varias especies de insectos, por lo que el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto insecticida fumigante y de contacto además de las propiedades antixenóticas del aceite esencial de una población silvestre de *Ch. ambrosioides* sobre *S. zeamais* adultos. Se realizaron bioensayos de efecto fumigante, utilizando cámaras de gas de diferentes volúmenes y un bioensayo de toxicidad por contacto con superficies de vidrio, concreto y bolsas de polipropileno tratadas. En el bioensayo de efecto fumigante, la mortalidad aumentó al incrementar la concentración de aceite esencial, llegando a 100% de insectos muertos en la concentración más alta (5 µL) en un volumen de 0,15 L. No obstante, al aumentar

el volumen de las cámaras fumigantes, fue necesario incrementar la concentración de aceite esencial, siendo solo el tratamiento de 20  $\mu$ L el que causó una mortalidad superior al 50% en las cámaras de 6 y 14 L de aire. Pero, cuando incrementó el volumen a 28 L de aire la mortalidad disminuyó a 8%. En el bioensayo de contacto con superficie tratada, la mortalidad también se incrementó cuando se elevó la concentración de aceite esencial, aunque mientras en la superficie de vidrio tratada la mortalidad fue mayor al 80% en las concentraciones entre 0,25 y 2,0%, en el concreto y bolsas de polipropileno no superó el 60%. Sin embargo, en el bioensayo de bolsas tratadas se observó efectos antixenóticos. Se concluye que el aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre posee actividad insecticida como fumigante y contacto, además de efecto antixenótico sobre *S. zeamais*.

Palabras clave: Paico, hierba de Santa María, gorgojo de los cereales, granos almacenados

## Introducción

La conservación y protección de los cereales almacenados tiene gran importancia a nivel mundial, ya que forman parte relevante de la dieta de humanos y animales domésticos (Huang & Subramanyam 2005). Aunque según Regnault (1997) y Betancur *et al* (2010), en seis meses hasta un 50% de la cosecha puede verse afectada por el ataque de insectos plaga.

El gorgojo de los cereales (*Sitophilus zeamais* Motschulsky; Coleoptera; Curculionidae) es un insecto cosmopolita considerado como plaga primaria del maíz (*Zea mays* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.). Además, tiene un alto potencial biótico y la capacidad de ingresar a las semillas tanto en bodega como en campo (Gallo *et al* 2002, Tavares & Vendramim 2005). Para contrarrestar los ataques de insectos plaga usualmente se utilizan insecticidas sintéticos (Huang & Subramanyam 2005). No obstante, aparte de su conocida eficacia, algunos son de elevado costo y presentan efectos adversos como desarrollo de resistencia y acumulación de residuos potencialmente tóxicos en el

ambiente (Silva *et al* 2005b), por lo que se justifica la búsqueda de alternativas de control. Una de estas opciones es el uso de compuestos vegetales como los aceites esenciales que están formados por una mezcla de compuestos volátiles de diversa naturaleza química, que han demostrado poseer actividad biológica como fumigante y repelente (Santiago *et al* 2014). El modo de acción de los aceites esenciales es neurotóxica, bloqueando los receptores de un neurotransmisor conocido como octopamina, afectando la regulación del movimiento, metabolismo, frecuencia cardíaca y comportamiento del insecto (Pandey *et al* 2011). Así mismo, cabe destacar que la octopamina no se encuentra en vertebrados, por lo cual la acción de los aceites esenciales es selectiva, sin afectar a humanos ni otros vertebrados (Isman 2000).

El paico (*Chenopodium ambrosioides* L; Chenopodiaceae) es una planta originaria de América del sur, aunque actualmente su distribución se extiende hacia regiones tropicales, subtropicales y templadas, como África y Europa (Hegazy & Farrag 2007, Gómez 2008, Santiago *et al* 2014). Investigaciones realizadas por Silva *et al* (2005a), Chu *et al* (2011) y Jaramillo *et al* (2012) han demostrado que el aceite esencial, polvo y extractos de *Ch. ambrosioides* cultivado para fines medicinales posee actividad biológica, como fumigante y repelente sobre *S. zeamais*, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto insecticida fumigante y de contacto y la actividad antixenótica del aceite esencial de una población silvestre de *Ch. ambrosioides* sobre *S. zeamais*.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal**

Se colectaron plantas de *Ch. ambrosioides* de una población silvestre localizada en San Fabián de Alico (36° 33' 00" S; 71° 33' 00" W), provincia de Ñuble, región del Bío-Bío, Chile.

El aceite esencial se extrajo de las inflorescencias, semillas y hojas de *Ch. ambrosioides* mediante hidrodestilación por arrastre de vapor utilizando un extractor tipo Clevenger según la metodología de Fekadu *et al* (2013). La duración de cada extracción fue de dos horas y la solución obtenida en la hidrodestilación

se almacenó en un congelador por 24 horas a  $-15\pm 1$  °C de temperatura con lo cual se eliminó el agua remanente de la solución por separación de fases. El aceite esencial resultante se almacenó en frascos de vidrio color ámbar a una temperatura de  $4,5\pm 1$  °C.

### Insectos

Los insectos se obtuvieron de colonias permanentes del Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción, campus Chillán. Estas colonias se mantienen en frascos de vidrio de 1 L de volumen, utilizando maíz Cv. DK440 (Anasac Chile S.A.) como sustrato alimenticio. Las colonias se mantuvieron en oscuridad total y a una temperatura de  $30 \pm 2$  °C y  $60 \pm 5$  % de humedad relativa en una cámara bioclimática (ShellLab modelo 1915, Sheldon Manufacturing Inc, Cornelius, OR, USA).

### Efecto fumigante con maíz a granel

En este bioensayo se empleó la metodología de Chu *et al.* (2011) que consistió en impregnar el aceite esencial sin diluir en volúmenes de 0,08; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5 o 5  $\mu$ L, sobre un papel filtro circular adherido al interior de la tapa de contenedores plásticos de 0,15 L. En el interior de los envases se colocaron 25 g de maíz infestado con 10 insectos adultos de *S. zeamais* sin determinación de sexo. Los frascos se cerraron con las tapas que tenían el papel filtro adherido y se mantuvieron en una cámara bioclimática en las mismas condiciones indicadas para la cría de insectos. En cada tratamiento se realizaron cuatro repeticiones y el testigo consistió de papel filtro sin impregnar. Trascurridos cinco días de exposición a los tratamientos se evaluó la mortalidad y los datos obtenidos se corrigieron con la fórmula de Abbott (1925).

## Efecto fumigante con maíz en bolsas de polipropileno

Con base en el bioensayo anterior, aquellos tratamientos que mostraron una mortalidad igual o superior a 80% se utilizaron como referencia para la siguiente fase del bioensayo. Esta consistió en la utilización de recipientes plásticos con un volumen de 6 L en los que se colocó una capa de vaselina de 2 cm de espesor en el borde superior interno, para evitar el escape de los insectos. Además, se usaron bolsas de polipropileno de 25 cm de largo y 18 cm de ancho elaboradas a partir de costales nuevos para grano y en cuyo interior se colocaron 200 g de maíz. Luego, en la parte interna de las tapas de los recipientes se adhirió un círculo de papel filtro el cual se impregnó, con una micropipeta, con 2,5; 5; 10 o 20  $\mu\text{L}$  de aceite esencial sin diluir de *Ch. ambrosioides*. El testigo consistió en solo el papel filtro. A continuación, cada bolsa se infestó con 50 adultos de *S. zeamais* sin diferenciación de sexo y se cerraron con una banda elástica de goma. Los recipientes plásticos se taparon y sellaron con cinta adhesiva para evitar el escape de insectos y se almacenaron en una cámara bioclimática en las mismas condiciones indicadas en el bioensayo anterior. La evaluación de la mortalidad se realizó a los cinco días después de la infestación (DDI). A continuación, nuevamente se seleccionaron las concentraciones que mostraron una mortalidad igual o superior a 80% para la siguiente fase del bioensayo que consistió en utilizar la misma metodología pero con recipientes plásticos de un volumen de 14 y 28 L. Se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento y la mortalidad se corrigió con la fórmula de Abbott (1925).

## Mortalidad por contacto con diferentes superficies tratadas

### *Superficie de vidrio tratada*

Este bioensayo se realizó de acuerdo a la metodología de Betancur *et al* (2010). Se utilizaron tubos de ensayo de vidrio de 6 mL, en los cuales se añadió 1 mL de una solución de aceite esencial en acetona en concentraciones de 0,125, 0,25, 0,5, 1 o 2 % (v/v). Los tubos se agitaron durante 1 minuto, el exceso de solución

se desechó y se esperó durante una hora para que la acetona se evaporara completamente. Posteriormente, en cada tubo se colocaron 10 adultos de *S. zeamais* sin diferenciación de sexo y luego se sellaron con su respectiva tapa perforada y cubierta con tela de tul para permitir el intercambio de gases e impedir el escape de los insectos. El bioensayo se mantuvo en una cámara bioclimática con una humedad relativa de  $60 \pm 5 \%$ ,  $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  de temperatura y oscuridad total. La evaluación de la mortalidad se realizó a las 24, 48 y 72 horas después de la infestación y se corrigió con la fórmula de Abbott (1925).

#### *Superficie de concreto tratada*

En este bioensayo se utilizaron superficies de concreto de  $39 \times 39 \text{ cm}^2$  en las cuales se colocó una capa de vaselina de 2 cm de ancho para evitar el escape de los insectos. Además, se utilizaron jaulas de madera cubiertas con tela de tul de  $30 \times 25 \times 25 \text{ cm}$  (alto, ancho, largo) que se colocaron sobre las placas de concreto unidas a estas con cinta adhesiva para evitar posibles aberturas que permitiesen la fuga de los insectos de la superficie en estudio. Se realizaron cuatro variaciones del bioensayo.

##### *a. Superficie de concreto tratada con maíz a granel*

La superficie de concreto se impregnó con una solución de aceite esencial de *Ch. ambrosioides* en agua destilada en concentraciones de 4 u 8% (v/v) más 30  $\mu\text{L}$  de Tween® 20 (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) como agente compatibilizante. Las aplicaciones se realizaron con un aerógrafo (Indura 8807, Indura S.A., Santiago, Chile), conectado a un tanque de  $\text{CO}_2$  a una presión de  $10 \text{ L min}^{-1}$ . Luego, sobre la superficie tratada, se colocaron 200 g de maíz que posteriormente se infestaron con 50 insectos adultos de *S. zeamais* sin determinación de sexo. A continuación, sobre el maíz se colocaron las jaulas y las unidades experimentales se mantuvieron a temperatura ambiente ( $20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). La evaluación de la mortalidad se realizó a las 24, 48 y 72 horas y los datos se

corrigieron con la fórmula de Abbott (1925). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y el testigo consistió en la superficie de concreto sin tratar.

b. *Superficie de concreto sin tratar con maíz en bolsa tratada*

En este bioensayo se utilizaron bolsas de polipropileno de 25 cm de largo y 18 cm de ancho, que se asperjaron con la solución de aceite esencial de *Ch. ambrosioides* en agua destilada en concentraciones de 4 u 8% (v/v). Las bolsas se dejaron secar por 10 minutos y a continuación se colocó en su interior 200 g de maíz y se cerraron con una banda elástica de goma. En esta variación del bioensayo, la superficie de concreto no se trató. Las bolsas se colocaron en el centro de cada superficie de concreto y sobre estas se colocaron 50 insectos adultos de *S. zeamais* sin determinación de sexo. Luego, las bolsas se cubrieron con las jaulas. En este bioensayo se evaluaron la antixenosis causada por las bolsas tratadas contabilizando el número de insectos en el exterior e interior de las bolsas y la mortalidad a las 24, 48 y 72 horas, esta última corregida con la fórmula de Abbott (1925). Se realizaron cuatro repeticiones para cada tratamiento y en el caso del testigo las bolsas y la superficie de concreto no se trataron.

c. *Superficie de concreto tratada con maíz en bolsa tratada*

En este bioensayo tanto las bolsas de polipropileno que contenían los 200 g de maíz como la superficie de concreto se trataron con la solución de aceite esencial de *Ch. ambrosioides* en agua destilada en concentraciones de 4 u 8 % (v/v). La infestación con insectos adultos de *S. zeamais* y la evaluación de la mortalidad y antixenosis se realizaron como se describió en el bioensayo anterior. Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento y el testigo consistió en bolsas y superficie de concreto sin tratar.

d. *Superficie de concreto tratada con maíz en bolsa no tratada*

Para este bioensayo la superficie de concreto se trató con las concentraciones de aceite esencial de *Ch. ambrosioides* en agua destilada de 4 u 8 % (v/v), en tanto que las bolsas que contenían los 200 g de maíz no se sometieron a ningún

tratamiento. Como en los casos anteriores, se infestó con 50 insectos adultos de *S. zeamais* sin determinación de sexo y las evaluaciones de antixenosis y mortalidad se realizaron de la misma manera ya indicada. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones y el testigo estaba conformado por bolsas y superficie de concreto sin tratar.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar para todos los bioensayos. Se realizaron pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene para la comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de las varianzas y se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey con una significancia de 5%. El efecto fumigante con un volumen de 0,15 L y la mortalidad por contacto con superficie de vidrio tratada se sometieron a un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis. Todos los análisis se realizaron con el software InfoStat®.

## Resultados

### Efecto fumigante

En la toxicidad por efecto fumigante del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre *S. zeamais* adultos en un volumen de 150 mL de aire se observó una tendencia de aumento de la mortalidad a medida que la concentración se incrementó. Las concentraciones 0,63; 1,25; 2,5 y 5  $\mu\text{L}$ , causaron mortalidad superior al 50% (Tabla 1). Además, estos tratamientos no presentaron diferencias significativas entre sí. No obstante, los tratamientos de 0,63 y 1,25  $\mu\text{L}$  tampoco presentaron diferencias significativas con las concentraciones más bajas evaluadas (0,16 y 0,31  $\mu\text{L}$ ), cuya mortalidad fue inferior al 50% (Tabla 1). Por lo cual, las concentraciones de 2,5 y 5  $\mu\text{L}$  se seleccionaron para la siguiente fase del bioensayo.



Al utilizar el volumen de 6 L de aire se observó que las concentraciones de 2,5; 5 y 10  $\mu\text{L}$  causaron una mortalidad inferior a 35%, en tanto 20  $\mu\text{L}$  presentó un 94,6%, siendo significativamente mayor que el resto de los tratamientos (Tabla 2).

Finalmente en un volumen de 14 L de aire, la concentración de 20  $\mu\text{L}$  registró una mortalidad de 87,4%, pero al evaluar el mismo tratamiento en un volumen de 28 L de aire la mortalidad disminuyó a 19,5%.

Tabla 1 Efecto fumigante en un volumen de 0,15 L del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre *S. zeamais* adultos.

Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Mortalidad (%)	
0,08	2,5	a*
0,16	25	ab
0,31	37,5	abc
0,63	52,5	bcd
1,25	55	bcd
2,5	80	cd
5,0	100	d

\*Prueba de Kruskal Wallis: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Tabla 2 Efecto fumigante en un volumen de 6 L de aire del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre *S. zeamais* adultos.

Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Mortalidad (%)	
2,5	10,5	a*
5,0	19,3	ab
10	33,3	b
20	94,6	c

\*Test de Tukey: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

## Mortalidad por contacto con diferentes superficies tratadas

En el bioensayo de superficie de vidrio tratada, a las 24 h la mortalidad en las concentraciones de 0,25; 0,5; 1 y 2% fue superior al 70%. En este mismo tiempo de evaluación, la concentración de 0,125% obtuvo la menor mortalidad con 5%, aunque debido a la alta variabilidad de los datos no presentó diferencias significativas con 0,25%, pero sí con los tratamientos mayores a esta concentración. A las 48 y 72 horas los tratamientos de 0,25; 0,5; 1 y 2% mostraron una mortalidad superior al 82%, presentando todas diferencias significativas con la concentración 0,125%, la cual no superó el 8% de mortalidad (Tabla 3).

En el experimento con superficie de concreto tratada y maíz a granel a las 24 horas la mortalidad de las dos concentraciones evaluadas no superó el 50%, ni presentaron diferencias significativas entre sí. A las 48 y 72 horas la concentración de 8% registró una mortalidad de 52,7 y 54,7% respectivamente, pero no se encontraron diferencias significativas con la concentración de 4%, cuya mortalidad fue inferior al 40% (Tabla 4).

En las pruebas con bolsas tratadas y superficie de concreto sin aceite esencial se observó que a las 24, 48 y 72 horas en todas las concentraciones la mortalidad no rebasó el 2%. Pero, en la evaluación del efecto de antixenosis a las 48 horas (Figura 1), el porcentaje de insectos que ingresaron a las bolsas tratadas con las concentraciones evaluadas (4 y 8%) fue en ambos tratamientos de 5%, presentando estas diferencias significativas con el testigo, en el que se registró un ingreso de insectos de 16%. A las 72 horas el ingreso de insectos aumentó tanto en el testigo como en las bolsas tratadas sin encontrarse diferencias significativas entre estos.

En el caso de bolsas y superficie de concreto tratadas (Tabla 5), a las 24, 48 y 72 h la mortalidad fue significativamente mayor en la concentración de 8%, a pesar de que en ambos tratamientos esta no alcanzó el 30%. Al evaluar la antixenosis (Figura 2) se observó que a las 24 horas el porcentaje de insectos que ingresó a las bolsas fue mayor en el testigo con 25%, mientras que 4 y 8% presentaron 7 y

9% respectivamente. En esta variable las concentraciones evaluadas no mostraron diferencias significativas entre ellas, pero si con el testigo. A las 48 y 72 h el porcentaje de insectos que ingresó a las bolsas aumentó, tanto en los tratamientos como en el testigo, aunque 8% continuó siendo significativamente menor que el control, lo que no se observó en 4%.

Por último, en el bioensayo de superficie de concreto tratada y bolsas sin aceite esencial, la mortalidad en todas las concentraciones no superó el 14% y no se encontraron diferencias significativas entre 4 y 8%. En el caso del porcentaje de ingreso de insectos a las bolsas, tampoco hubo diferencias significativas entre las bolsas ubicadas en el concreto tratado y en la superficie testigo, el cual fluctúa entre más del 30% a las 24 horas y más del 45% a las 72 horas.

Tabla 3 Mortalidad por contacto con superficie de vidrio tratada con aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre *S. zeamais* adultos.

Concentración (%)	Mortalidad (%)					
	24 horas		48 horas		72 horas	
0,125	5	a*	7,5	a	7,5	a
0,25	76,4	ab	82,5	b	82,5	b
0,5	100	b	100	b	100	b
1,0	100	b	100	b	100	b
2,0	100	b	100	b	100	b

\*Prueba de Kruskal Wallis: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Tabla 4 Mortalidad por contacto con superficie de concreto tratada con aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre *S. zeamais* adultos con maíz a granel en condiciones de bodega.

Concentración (%)	Mortalidad (%)					
	24 horas		48 horas		72 horas	
4,0	29,3	a*	34,0	a	35,3	a
8,0	48,7	a	52,7	a	54,7	a

\*Test de Tukey: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

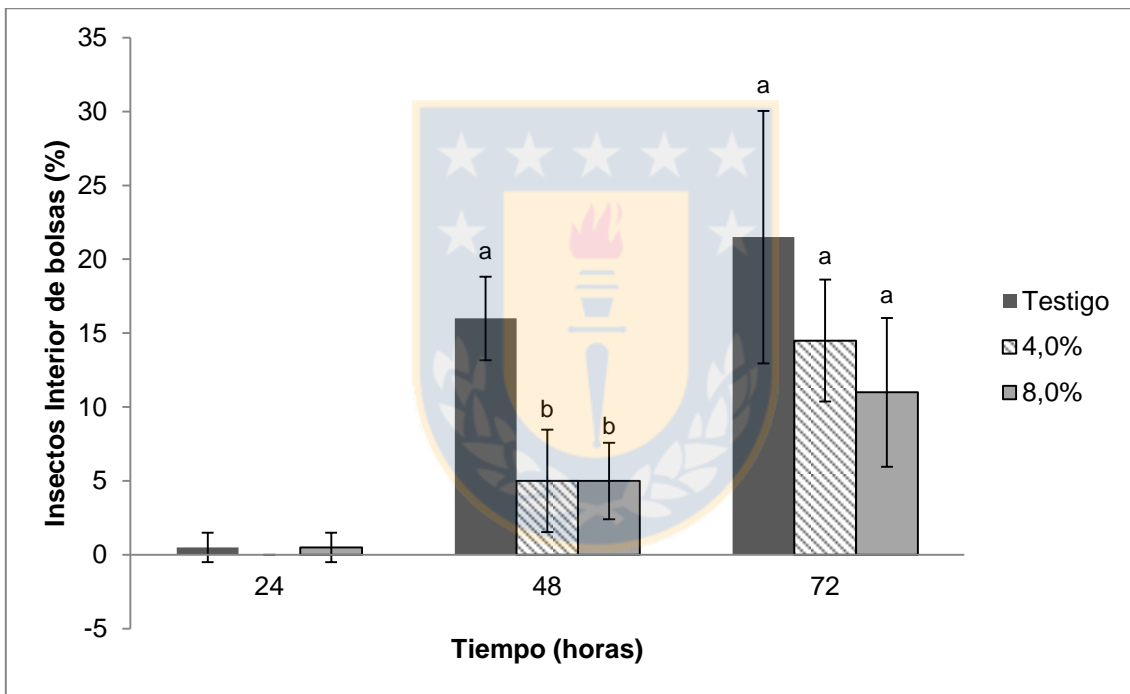


Figura 1 Efecto antixenótico de bolsas tratadas con aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre *S. zeamais* adultos en una superficie de concreto sin tratamiento en condiciones de bodega. Barras verticales = desviación estándar. Test de Tukey: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

Tabla 5 Mortalidad por contacto con superficie de concreto y bolsas tratadas con aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre *S. zeamais* adultos en condiciones de bodega.

Concentración (%)	Mortalidad (%)					
	24 horas		48 horas		72 horas	
4,0	4,5	a*	9,0	a	9,0	a
8,0	23,5	b	25	b	26,2	b

\*Test de Tukey: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

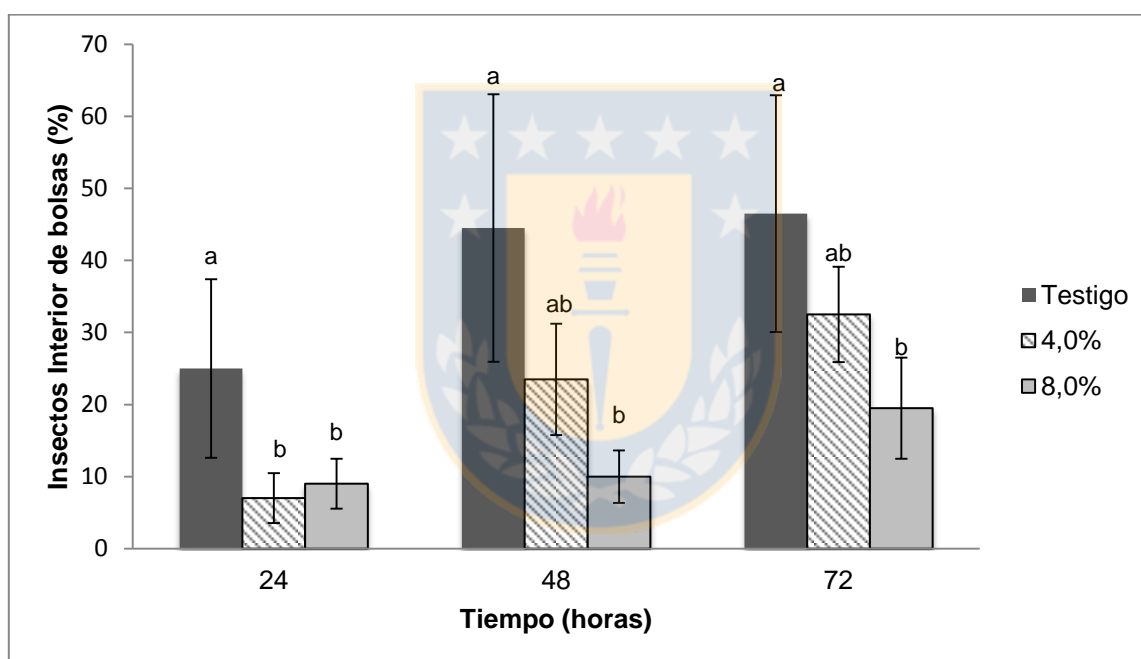


Figura 2 Efecto antixenótico en bolsas y superficie de concreto tratadas con aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre *S. zeamais* en condiciones de bodega. Barras verticales = desviación estándar. Test de Tukey: Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ).

## Discusión

En el bioensayo de efecto fumigante, evaluado en diferentes volúmenes, se observó una tendencia de directa proporcionalidad entre la concentración del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* y la toxicidad sobre adultos de *S. zeamais*. La mayor mortalidad se obtuvo siempre con las concentraciones más altas evaluadas, las que normalmente superaron el 50% de insectos muertos, lo que según Cerna *et al* (2010) las clasifica como prometedoras. El efecto fumigante de los aceites esenciales se debería a que los compuestos activos volátiles que los conforman bloquean los receptores de la octopamina, afectando el comportamiento y provocando la muerte del insecto (Isman 2000, Pandey *et al* 2011). Los resultados obtenidos coinciden con Chu *et al* (2011), quienes con aceite esencial de *Ch. ambrosioides* sobre *S. zeamais*, obtuvieron resultados similares a los de la presente investigación, determinándose que el compuesto  $\alpha$ -terpineno es el que posee propiedades fumigantes. Igualmente Jaramillo *et al* (2012) reportaron toxicidad fumigante de 100% del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* cultivado sobre *S. zeamais*, coincidiendo en que  $\alpha$ -terpineno fue el compuesto responsable del efecto fumigante. Tapondjou *et al* (2002) también demostraron la efectividad del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* como fumigante en una concentración de 0,2  $\mu\text{l cm}^2$  al obtener porcentajes de mortalidad entre 80 y 100% sobre *Sitophilus granarius* L., (Coleoptera; Curculionidae), *Prostephanus truncatus* Horn (Coleoptera; Bostrichidae), *Callosobruchus chinensis* L. y *Acanthoscelides obtectus* Say, (Coleoptera; Bruchidae), infiriendo a la vez una posible relación entre  $\alpha$ -terpineno y el efecto fumigante del aceite esencial. No obstante en la misma investigación, al evaluar individualmente  $\alpha$ -terpineno sobre *S. zeamais*, la mortalidad obtenida no sobrepasó el 20%. Además Yeom *et al* (2013), en un estudio sobre el efecto fumigante del aceite esencial de 11 plantas de la familia Myrtaceae como *Eucalyptus citriodora* Hook, *E. smithii* F. Muell. Ex R. T. Baker, *E. globulus* Labill, *E. radiata* Sieber Ex. D.C., *E. dives* Schauer, *E. polybractea* F. Muell. Ex R. T. Baker, *Melaleuca dissitiflora* F. Muell, *M. quinquenervia* Blake, *M. uncinata* R. Br., *M. linariifolia* SM. y *Leptospermum petersonii* Bailey sobre *Blattella germanica* L.

(Blattodea, Blattellidae), comprobaron que  $\alpha$ -terpineno presenta un efecto fumigante significativo. Por tanto, considerando que en el aceite esencial utilizado en la presente investigación  $\alpha$ -terpineno es el compuesto que se encuentra en mayor proporción (42,38%) (Orozco *et al* 2016), se podría inferir que este compuesto está relacionado con la actividad fumigante del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre. No obstante, a medida que se aumentó el volumen de la cámara de fumigación, la mortalidad disminuyó significativamente, por lo que se deberían realizar estudios posteriores para establecer la relación dosis-volumen más efectiva.

En la toxicidad por contacto del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre sobre una superficie tratada se observaron diferentes tendencias de acuerdo al tipo de bioensayo que se realizó. En el caso de la superficie de vidrio tratada, a partir de la concentración de 0,25% la mortalidad fue mayor a 76%, registrándose un aumento de la mortalidad en la medida que transcurrió el tiempo de exposición. Estos resultados concuerdan con Zhu *et al* (2012), quienes realizaron estudios con aceite esencial de *Ch. ambrosioides*, sobre *Blattella germanica* L. (Blattodea, Blattellidae) obteniendo toxicidad por contacto de este aceite esencial. Por otra parte, la mortalidad obtenida en el bioensayo del presente estudio es superior a la reportada para otras especies utilizando la misma metodología como Betancur *et al* (2010) con aceite esencial de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) sobre *S. zeamais*, quienes necesitaron concentraciones de al menos 1% para obtener una mortalidad mayor al 50%. Por otra parte Santiago *et al* (2014), evaluaron un extracto acuoso de *Ch. ambrosioides* sobre *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera; Coccinellidae), obteniendo una mortalidad por contacto superior al 90% a las 144 horas de exposición. Además cabe resaltar que estos autores en el análisis químico del extracto obtuvieron que estaba compuesto en un 96% por aceite esencial y que uno de los compuestos de mayor concentración era  $\alpha$ -terpineno, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. Según Rani (2012) los compuestos volátiles de los aceites esenciales poseen una elevada actividad insecticida por contacto. Pero, en las pruebas realizadas en la superficie de concreto la mortalidad disminuyó significativamente. En el bioensayo

que se evaluó la combinación de superficie de concreto tratado con aceite esencial y maíz a granel sin tratar, la mortalidad a las 72 horas superó el 50% en su concentración más alta (8%), clasificando al tratamiento como prometedor (Cerna *et al* 2010). El efecto insecticida por contacto se puede deber a que los compuestos activos del aceite esencial pueden ingresar por la cutícula de los insectos, afectando los receptores de la octopamina (Isman 2000, Pandey *et al* 2011). Por tanto, los aceites esenciales pueden presentar actividad insecticida tanto de contacto como fumigante, aunque este último ha evidenciado mayor potencial a más corto plazo (Rani 2012). Sin embargo, en el resto de variaciones del bioensayo que incluyeron a la superficie de concreto tratada, la mortalidad no superó el 27%, lo que puede deberse a la rápida volatilidad de los compuestos activos del aceite esencial al no encontrarse en condiciones de hermetismo. Además, la capacidad de absorción del concreto junto con la susceptibilidad de los compuestos activos de los aceites esenciales a la fotodegradación y temperatura, pudieron afectar su eficacia (Cloyd & Chiasson 2007, Betancur *et al* 2010, Nerio *et al* 2010).

En el bioensayo que consistió en el uso de bolsas de polipropileno sin tratamiento con superficie de concreto tratada, la mortalidad no fue mayor al 14%, toxicidad menor a la registrada con el bioensayo con superficie de concreto tratada y maíz a granel. Esto se pudo deber a que las bolsas no tratadas actuaron como refugio contra el contacto directo del insecto con la superficie de concreto tratada, reduciendo su mortalidad. Sin embargo, en las pruebas en que se empleó bolsas tratadas con aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre, se observó que estas, dentro de las primeras 48 horas, provocaron un efecto antixenótico sobre *S. zeamais*. Estudios realizados en polvo de *Ch. ambrosioides* han reportado el efecto repelente de esta planta (Silva *et al* 2005a, Mazzonetto *et al.* 2013) y una investigación realizada por Koonan *et al* (2007) en el que utilizaron bolsas tratadas con extractos acuosos de *Ch. ambrosioides* y *Lantana camara* L. (Verbenaceae) sobre *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera; Bruchidae) y *A. obtectus*, se obtuvieron resultados similares a los de la presente investigación. Según Brown & Hebert (1997) y Nerio *et al* (2010), los compuestos volátiles del aceite esencial



forman una barrera que disuade a los insectos a entrar en contacto con la superficie que ha sido tratada.

El efecto insecticida y antixenótico del aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre disminuyó cuando el tiempo transcurrió, por lo cual, para su uso práctico, sería necesario realizar aplicaciones repetidas para producir una protección efectiva contra el ataque de insectos plaga. Al respecto, varios estudios han demostrado la actividad antixenótica de los aceites esenciales sobre otras especies de insectos como *Anopheles annularis* S. L. (Diptera; Culicidae) (Ansari *et al* 2000), *Culex pipiens pallens* Coquillett (Diptera; Culicidae) (Park *et al* 2005), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera; Plutellidae) (Zhang *et al* 2004), *Aedes aegypti* L. (Diptera; Culicidae) (Choochote *et al* 2007), *Nephottetix virescens* Distant (Hemiptera; Cicadellidae) (Calumpang *et al* 2013) y *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera; Aleyrodidae) (Dehghani & Ahmadi 2013), por lo que es necesario realizar más investigaciones sobre esta capacidad y el empleo práctico de los aceites esenciales presentes en plantas aromáticas como *Ch. ambrosioides* para la protección contra insectos plaga. Así mismo es necesario el estudio de nuevas alternativas de formulación de los compuestos activos del aceite esencial, con el fin de mejorar la residualidad de su efecto (Denloye *et al* 2010, Sainz *et al* 2012).

Finalmente, con los datos obtenidos en esta investigación se puede concluir que el aceite esencial de *Ch. ambrosioides* proveniente de una población silvestre presenta acción tóxica tanto fumigante como de contacto sobre *S. zeamais* adultos similar a los reportados en literatura (Silva *et al* 2005, Tavares & Vendramim 2005 a y b, Chu *et al* 2011, Jaramillo *et al* 2012, Mazzonetto 2013) para el aceite esencial de plantas cultivadas con fines medicinales. Además, el aceite esencial de *Ch. ambrosioides* aplicado sobre bolsas de polipropileno, presentó efecto antixenótico sobre *S. zeamais* adultos. Por tanto, estos resultados sugieren que el aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre puede ser una alternativa potencial para la protección contra insectos plaga de granos almacenados, pero que en el futuro debe ser validada en condiciones de bodega.

## Literatura citada

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol 18: 265-267

Ansari M, Vasudevan P, Tandon M, Razdan R (2000) Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. Bioresour. Technol. 71, 267–271

Betancur J, Silva G, Rodríguez C, Fischer S, Zapata N (2010) Insecticidal Activity of *Peumusboldus* Molina essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Chil J Agr Res 3 (70): 399-407

Brown M, Hebert AA (1997) Insect repellents: an overview. J. Am. Acad. Dermatol. 36, 243–249

Calumpang S, Burgonio G, Navasero M, Navasero M (2013) Behavioral and Olfactory Responses of Rice Green Leaf Hopper, *Nephotettix virescens* (Distant) to Volatile Cues from Tagbak (*Alpinia elegans* (C. Presl) K. Schum). Philipp. J. Sci.142 (2): 167-173

Cerna E, Landeros J, Ochoa Y, Guevara L, Badii M, Olalde V (2010) Evaluación de aceites y extractos vegetales para el control de *Sitophilus zeamais* y los efectos en la calidad de semilla de maíz. Rev. Fac. Cienc. Agrar. Univ. Nac. Cuyo 42(1): 135-145

Choochote W, Chaithong U, Kamsuk K, Jitpakdi A, Tippawangkosol P, Tuetun B, Champakaew D, Pitasawat B (2007) Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. Fitoterapia 78: 359–364

Chu SS, Feng HJ, Liu ZL (2011) Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Pest Manag Sci.67: 714–718

Cloyd RA, Chiasson H (2007) Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect pests. J Econ Entomol. 100: 459–466

- Dehghani M, Ahmadi K (2013) Anti-oviposition and repellence activities of essential oils and aqueous extracts from five aromatic plants against greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae). *Bulg. J. Agric. Sci.* 19 (No 4): 691-696
- Denloye A, Makanjuola W, Teslim O, Alafia O, Kasali A, Eshilokun A (2010). Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) products from nigerian against three storage insects. *J. Plant Prot. Res.* 50 (3): 379-384
- Fekadu M, Mekuria T, Meshesha B, Teshome GM (2013) Bioactivity of essential oils of local plants against adult *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Ethiopia. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 4, 805-809
- Gallo D, Nakano O, Silveira, Carvalho R, Baptista G, Berti E, Parra J, Zucchi R, Alves S, Vendramim J, Marchini L, Lopes J, Omoto C (2002) *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p
- Gómez B (2008) Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas.* 7 (1) 1-9
- Hegazy A, Farrag H (2007) Allelopathic Potential of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants. *GJBB* 2(1): 01-09
- Huang F, Subramanyam B (2005) Management of five stored-product insects in wheat with pirimiphosmethyl and pirimiphos-methyl plus synergized pyrethrins. *Pest Manag. Sci.* 61:356-362
- Isman MB (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608
- Jaramillo B, Duarte E, Delgado W (2012) Bioactivity of essential oil from Colombian *Chenopodium ambrosioides*. *Rev. Cubana Plant. Med.* 17(1): 54-64
- Koona P, Tatchago V, Malaa D (2007) Impregnated bags for safer storage of legume grains in West and Central Africa. *J. Stored. Prod. Res.* 43 248–251

- Mazzonetto F, Corbani R, Dalri A (2013) Biofumigation of plant species on *Sitophilus zeamais* in stored maize. Appl. Res. Agrotec. 6(1): 53-61
- Nerio LS, Oliver J, Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: A review. Bioresource Technol. 101 (2010) 372–378
- Orozco MI, Silva G, Vendramim JD, Figueroa I, Fischer S (2016) Antixenotic activity of wild *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). Neotrop. Entomol. Submitted
- Pandey A, Singh P, Palni U, Tripathi N (2011). Use of essential oils of aromatic plants for the management of pigeon pea infestation by pulse bruchids during storage. IJAT 7(6): 1615-1624
- Park B, Choi W, Kim J, Kim K, Lee S (2005) Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. J. Am. Mosq. Control Assoc. 21:80-83
- Rani P (2012) Fumigant and contact toxic potential of essential oils from plant extracts against stored product pests. JBiopest. 5(2): 120-128
- Regnault R (1997) The potential of botanical essential oils for insect pest control. Integrated Pest Manag. Rev. 2:25-34
- Sainz P, Sanz J, Burillo J, González, Coloma M, Martínez R (2012) Essential oils for the control of reduviid insects. Phytochem Rev. DOI 10.1007/s11101-012-9261-5
- Santiago V, Bonifaz E, Alegre A, Iannaccone J (2014) Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* (Amaranthaceae) and Imidacloprid on *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera:Coccinelidae). UNFV 2 (1): 19 - 27
- Silva G, Kiger R, Hepp R, Tapia V (2005)a. Control de *Sitophilus zeamais* con polvos vegetales de tres especies del género *Chenopodium*. Pesq agropec bras Brasília, 10(40): 953-960

Silva G, Orrego O, Hepp R, Tapia M (2005)b. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* em maíz almacenado. Pesq agropec bras Brasília 1(40):11-17

Tapondjou L, Adler C, Bouda H, Fontem D (2002) Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles J. Stored Prod. Res. 38: 395–402

Tavares MACG, Vendramim JD (2005) Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., Sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Neotrop. Entomol. 34(2):319-323

Yeom H, Kang J, Kim S, Park I (2013) Fumigant and contact toxicity of Myrtaceae plant essential oils and blends of their constituents against adults of German cockroach (*Blattella germanica*) and their acetylcholinesterase inhibitory activity. Pestic. Biochem. Phyiol. 107: 200-206

Zhang M, Ling B, Chen S, Liang G, Pang X (2004) Repellent and oviposition deterrent activities of the essential oil from *Mikania micrantha* and its compounds on *Plutella xylostella*. Acta. Entomol. Sin. 11(1):37-45

Zhu W, Zhao K, Chu Sh, Liu Z (2012) Evaluation of Essential Oil and its Three Main Active Ingredients of Chinese *Chenopodium ambrosioides* (Family: Chenopodiaceae). J Arthropod-Borne 6(2): 90–97

## CAPÍTULO II

### **Antixenotic activity of wild *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae).**

MI Orozco<sup>1</sup>, G Silva<sup>1</sup>, JD Vendramim<sup>2</sup>, I Figueroa<sup>1</sup>, S Fischer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Vicente Méndez 595, Chillán, Chile. morozco@udec.cl, gosilva@udec.cl

<sup>2</sup>Depto. Entomología y Acarología, ESALQ/USP, C. postal 9, 13418-900, Piracicaba, SP. jdvendra@usp.br

#### **ABSTRACT**

Once of the major problems encountered during grain storage is the attack of insect pests such as *Sitophilus zeamais*, which affects under both field and storage conditions. The use of synthetic insecticides to control pests pose adverse effects, such as resistance and environmental concerns. Previous research has documented insecticidal activity of powders, extracts and essential oils of *Chenopodium ambrosioides* cultivated for therapeutic purposes. This study assessed the antixenotic activity (no preference) of wild *Chenopodium ambrosioides* essential oil against adults of *S. zeamais*. Preference and repellency bioassays were conducted using a Y-shaped olfactometer and bags treated with essential oil. In the repellency bioassay with olfactometer, maize kernels treated with essential oil at higher concentrations (1 and 2%) showed a greater repellent effect but no difference was found in the response associated with insect sex. Regarding the antixenosis bioassay with arena showed that insects preferred the untreated control and the essential oil at lower concentrations. The residual effect of *Ch. ambrosioides* essential oil decreases with time, retaining its activity only 72 hours with at the highest concentrations. In the experiment with treated bags, bags with essential oil at a 4% concentration prevented the entry of insects for five days. The main compounds in the essential oil were  $\alpha$ -terpinene (42.38%), 11-

heneicosanol (20.91%) and o-cimene (20.74%). It can be concluded that wild *Ch. ambrosioides* essential oil has antixenotic effects against adults of *S. zeamais*.

**Keywords:** Maize weevil,  $\alpha$ -terpinene, Mexican tea

## Introduction

Insect pests constitute one of the main sanitary problem in stored grains worldwide, since they may severely affect grain or seed quality (Cruzat *et al* 2009). According to the Food and Agriculture Organization (FAO), the weight loss in stored grains due to insect damage is estimated between 5 and 10% of the worldwide production (FAO 1993). The maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky; Coleoptera; Curculionidae) is a cosmopolitan insect pest that affects cereals, mainly maize and wheat under both field and storage conditions (Danho *et al* 2002).

Synthetic insecticides are used to control these insects. However, these are expensive and may cause adverse effects, such as resistance and the presence of toxic residues in the environment. Therefore, an effective and more environmental friendly control method needs to be found in order to prevent these problems and effectively protect the grain under storage conditions (Silva *et al* 2005b). Essential oils are potential alternatives to current stored-grain insecticides. They are represented by a wide variety of chemical compounds derived from plant's secondary metabolism that might be used against these insect pests (Guenther 1972). The essential oils have shown fumigant, ovicidal and antixenotic properties (Fradin & Day 2002, Jaramillo *et al* 2012), derived from the action of active compounds, such as  $\alpha$ -terpinene, ascaridol, isoascaridole, limonene and p-cimeno (Pandey *et al* 2014). Such compounds, alone or mixed with other type of metabolites are toxic against insects (Nerio *et al* 2010, Pandey *et al* 2011, Jaramillo *et al* 2012).

Essential oils with insecticidal properties affect the nervous system, blocking the octopamine receptors, which regulate insect's movement, heart rate, metabolism and behavior (Pandey *et al* 2011). In addition, essential oils display a fast rate of

degradation in the environment and their mammal selectivity is high (Chu *et al* 2011).

The antixenotic activity is a plant defensive response against the insects, and can be triggered at distance or by direct attack and can be either physical or chemical nature, leading to reduce the possibility to use the plant as a host for shelter, oviposition or feeding (Fancelli *et al* 2005, Castro *et al* 2011). Secondary metabolites are involved in plant chemical defense systems and have feeding or oviposition deterrent effects against pests (Nerio *et al* 2010).

The Mexican tea, also known as Erva-de-santa maria in Brazil, Epazote in Mexico and Paico in Chile (*Chenopodium ambrosioides* L.; Chenopodiaceae) is an herb native to tropical regions of America, particularly Mesoamerica. It can be also found in Europe and Africa (Hegazy & Farrag 2007, Gómez 2008). Previous research has documented fumigant and repellent effects of extracts, powders and essential oils of different structures of *Ch. ambrosioides* cultivated for medicinal purposes (Tavares & Vendramim 2005a, Tavares & Vendramim 2005b, Silva *et al* 2005a, Chu *et al* 2011, Jaramillo *et al* 2012). Thus, the use of *Ch. ambrosioides* essential oil is a potential alternative to synthetic insecticides. However, the domestication of plants tends to reduce the effectiveness of the the protection mechanisms against herbivores, among others, by decreasing the production of secondary metabolites (Pickersgill 2007). Natural selection directly or indirectly modifies chemical resistance phenotypes of plants against herbivores (McKey *et al* 2010). Blanckaert *et al* (2012) conducted a study on *Ch. ambrosioides* and documented that crop practices tend to reduce the concentration of secondary metabolites associated with the odor, flavor and anthelmintic properties of the plant, which could also may negatively influence the biological activity against insect pests. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antixenotic activity of wild *Ch. ambrosioides* essential oil against adults of *S. zeamais*.



## Materials and methods

### Plant material

Wild plants of *Ch. ambrosioides* were collected in San Fabian de Alico (36° 33' 00" S; 71° 33' 00" W), 477 m of altitude, Ñuble County, Bío-Bío Region, Chile. The essential oil was extracted from seeds, inflorescences and leaves of *Ch. ambrosioides* according to Fekadu *et al* (2013) by steam distillation technique. A Clevenger-type apparatus was used to separate volatile molecules lighter than water with a system of direct heat for two hours. The remaining water was removed by phase separation, storing the solution in a freezer at -15°C for 24 hours. The resulting solution was stored in an amber glass bottle and refrigerated at 4.5±1 °C.

The chemical analysis of the essential oil was performed at the Laboratory of Pharmacognosy of the Facultad de Farmacia of the Universidad de Concepción by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS); high-resolution chromatography was used (HPGC -MS, Hewlett Packard series II 5890).

### Insects

Insects were obtained from the permanent colonies of the Laboratory of Entomology of Facultad de Agronomía of the Universidad de Concepción and kept in 1L-glass bottles, providing maize kernels (*Zea mays* L.) CV DK440 (Anasac S.A., Chile) as food substrate and stored in a bioclimatic chamber (Shellab model 1915, Sheldon Manufacturing Inc, Cornelius, OR, USA), at a relative humidity of 60 ± 5 %, temperature of 30 ± 2 °C and total darkness.

### Repellency bioassay

This bioassay was performed according the methodology of Signoretti *et al* (2012). Repellency was evaluated by calculating the percentage of choice of insects. A Y-shaped glass olfactometer was used, which is an instrument consisting of a tube with a Y-shaped bifurcation. These two lateral arms are 16.5 cm long and 3 cm in diameter and connected to a central tube with the same diameter and dimensions. Each arm was sealed with a rubber cap and was connected to a glass flask

containing the odor sources (treatment or control). The odor source corresponding to the treatment contained 25 g of maize kernels treated with essential oil diluted in 1 mL of acetone at the concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1 or 2 % (v / v), while the odor source for the control contained 25 g of kernels treated with 1 mL of acetone. Each arm of the Y-shaped tube was connected to an aquarium air pump Super LB-1000 (Shanghai Luby Pet Industries Co., Shanghai, China) of 1.6 L air min<sup>-1</sup> flow. The air flow was filtered with an activated carbon filter and then passed through a flask containing distilled water to humidify the air. The air flow rate was controlled by SHLLJ LZQ-6 flow meters (Yuyao Shunhuan Instruments Co., Shanghai, China), which provided a constant rate of 0.5 L air min<sup>-1</sup>. Lines were traced outside each arm and at the base of the Y-shaped tube at a distance of 7-cm from the center and then 50 adult insects of *S. zeamais* were individually placed on every dish for each concentration, and then the repellent effect was separately evaluated in males and females. Sex determination was based on the morphology of the proboscis, which describes that males have a rougher surface than females (Halstead, 1963). Repellency was observed for five minutes since the insect crossed the threshold line of the central tube and choices were recorded when an insect crossed the line of one of the two arms and remained there for 20 seconds (Signoretti *et al* 2012). The insects that chose one of the two arms during five minutes of were the only ones considered in the bioassay. Each insect was used a single time in order to prevent associative learning. The olfactometer was covered with a black cloth throughout the bioassay to prevent that the visual inputs could affect insect's behavior. The glass Y-shape tube was washed between replicates, while the connections with the odor sources were alternated in their order to minimize bias. For each concentration of essential oil, 50 replicates were carried out by sex.

#### Antixenosis bioassay with choice arena

Antixenosis behavior was evaluated using the methodology described by Cruzat *et al* (2009), which consists of a free choice device consisting of nine plastic Petri dishes 1.5 cm in height and 5 cm in diameter. Eight of the dishes were

symmetrically placed around a central dish, connected with plastic tubes of 10 cm long. An amount of 20 g of kernels treated with essential oil at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 or 8% (v / v), previously diluted in 1 mL of acetone, were placed in each of the peripheral dishes, plus an untreated control treatment on the remaining dish, consisting of maize kernels treated with 1 mL of acetone only then, 50 adult insects of *S. zeamais* without sex differentiation were released on the central plate. The number of insects per dish was determined 72 h after insect release. Insects that did not make a choice were excluded from the analysis. The bioassay was repeated twice and treatments were randomly distributed in each replicate to avoid biases. Each choice arena device was considered as an experimental unit, performing four replicates per treatment.

#### Residual effect

We used a variation of the methodology described by Procopio *et al* (2003), which consists of a free-choice arena, integrated by four Petri plastic dishes of 5 cm diameter, connected diagonally to a central plate by plastic tubes of 10 cm in length in an X-shaped arrangement. Equal amounts of 20 g of maize kernels mixed with 1 mL of acetone (control) were placed in two dishes, which were in diagonally opposite positions. Similarly, an amount of 20 g kernels mixed with essential oil at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 or 4% diluted in 1 mL of acetone were placed in each of the remaining dishes. Acetone was allowed to evaporate completely during one hour and then 20 non sexed adults of *S. zeamais* were released on the central plate. The evaluation was conducted by counting the number of insects in each of the peripheral dishes (treatments and control) at 24, 48, 72, and 96 h after insect were released. The insects were replaced after each evaluation, but the same treated maize was used throughout the bioassay. Based on the values obtained, the preference index (PI) adapted of Mazzonetto & Vendramim (2003) was calculated:  $PI = 2G \times (G + P)^{-1}$ ; where G is the percentage of insects on the dish with treated kernels, and P is the percentage of insects on the dish corresponding to the untreated control. According to the PI index, a

treatment has no preference effect if PI is lower than 1, neutral if it is equal to 1 and preference if it is greater than 1. Four replicates were performed per treatment.

#### Antixenosis in untreated bags

Polypropylene bags of 25 cm long and 18 cm wide made from conventional unused grain storage bags were used. The bags were sprayed with a solution of essential oil diluted in distilled water at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1 or 2% plus 30  $\mu$ L de Tween® 20 (Sigma-Aldrich,, St. Louis, Missouri, USA) as an adjuvant agent to obtain a homogeneous solution. The solution was applied on the entire outer surface of the bags with an airbrush Indura 8807 (Indura S.A. Santiago, Chile) connected to a CO<sub>2</sub> tank at a pressure of 10 L min<sup>-1</sup>. Once the bags were sprayed with the solution, they were allowed to dry for 10 minutes. Then an amount of 200 g of maize was introduced in each bag and sealed with a rubber band. The bags were placed individually in plastic containers of 3.5 L; six holes 2 cm wide were previously opened on the lids and sealed internally with tulle fabric to allow gas exchange. Furthermore, a film of Vaseline (2 cm wide) was applied to the upper and inner parts of the container to prevent scape of insects. Finally, each plastic container was infested with 20 non sexed adult insects *S. zeamais*. As insects were placed outside the bag, 1 g of maize was added to avoid insect death by starvation during their adaptation to the environment. The containers were stored in a bioclimatic chamber at a temperature of 30  $\pm$  2 °C, relative humidity of 60  $\pm$  5 % and total darkness conditions. Evaluation of mortality and antixenosis was performed 24 h and 5 days after infestation (DAI). The number of insects inside and outside the bags was determined, as well as the number of dead insects. Each treatment had four replicates and mortality was corrected by means of the Abbott's formula (1925).

## Experimental design and statistical analysis

A completely randomized experimental design was used in all the bioassays. Assumptions of data normality were assessed by Shapiro-Wilks modified test, while data were tested for homogeneity of variance using Levene test. Thus, an analysis of variance (ANOVA) and a mean comparison Tukey test at 5% significance level were conducted. The repellency analysis with the Y-shaped glass tube was conducted by chi-square test ( $X^2$ ) and a non-parametric analysis of variance (Kruskal Wallis test) was performed for the non-choice bioassay with treated bags. All the analyzes were performed using InfoStat® software.

## Results

### Chemical analysis of the essential oil

A volume of 6 mL of oil was obtained from 910 g of plant material, which means that yield of the essential oil of wild *Ch. ambrosioides* was 0.66%. The analysis of the chemical composition showed that the main compound was  $\alpha$ -terpinene with 42.38%, followed by 11-heneicosanol (20.91%) and o-cymene (20.74%) (Table1).

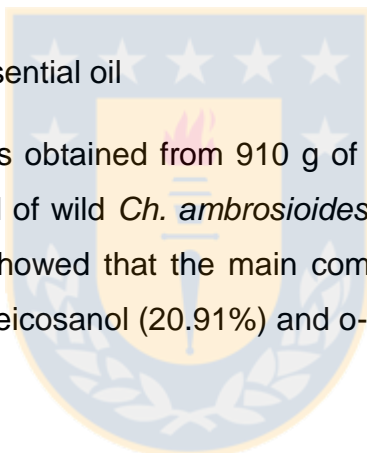


Table 1 Analysis of the chemical composition of essential oil of wild *Ch. ambrosioides* by gas chromatography.

Time (minutes)	Compound	(%)	Identification*
6.44	4-carene	5.56	IK, MS
6.60	o-cimene	20.74	IK, MS
8.18	Unknown	1.15	IK, MS
8.88	Acid 1,2,3-trimetil-ciclopent-2-enecarboxilico	0.22	IK, MS
8.99	Unknown	0.24	IK, MS
9.11	Pollutant	0.33	IK, MS
9.76	Unknown	1.25	IK, MS
10.02	$\alpha$ -terpinene	42.38	IK, MS
10.15	Unknown	0.9	IK, MS
10.19	Unknown	3.39	IK, MS
10.38	Pollutant	0.68	IK, MS
10.62	4-metoxicinamaldehydo	0.64	IK, MS
10,66	Unknown	0.67	IK, MS
10.80	Timol	0.57	IK, MS
10.94	11-heneicosanol	20.91	IK, MS
13.69	O-bencilinalool	0.37	IK, MS
	Total	100	

\*Compounds were identified by comparing the mass spectra (MS) database and Kovats retention indices (IK).

#### Repellency bioassay

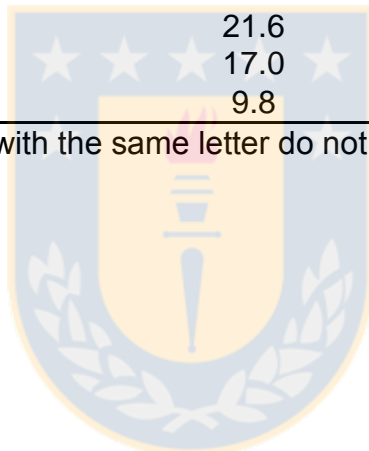
No significant differences were found ( $P > 0.05$ ) in the preference behavior of male and female insects in each of the evaluated concentrations. The observed tendency indicated that as the concentration of the essential oil increased, insect's choice for the treated maize decreased. The lowest percentages of choice were recorded in the maize treated with essential oil at a 2% concentration, reaching 14% in female and 16% in male insects, while the concentration with the highest preference was 0.125%, with 46% and 44 % in female and male insects, respectively (Fig 1). No significant differences were found between the response of males in comparison to females, thus sex was not considered as a source of

variation and data were pooled and analyzed together. This analysis showed that the highest concentrations (1.0 and 2.0%) showed significant differences with the lowest one evaluated (0.125%). Similarly, treatments at 0.25, 0.5 and 1.0% also showed a decreasing tendency in terms of choice arenas as concentration of the essential oil increased, but no significant differences were found between them (Table 2).

Table 2 Choice of adults of *S. zeamais* for maize treated with wild *Ch. ambrosioides* essential oil at different concentrations.

<b>Concentration (%)</b>	<b>Insect's choice (%)</b>	
<b>0.125</b>	29.4	*a
<b>0.25</b>	22.2	ab
<b>0.5</b>	21.6	ab
<b>1.0</b>	17.0	bc
<b>2.0</b>	9.8	c

\*Tukey's test: Mean values with the same letter do not differ significantly ( $p > 0.05$ ).



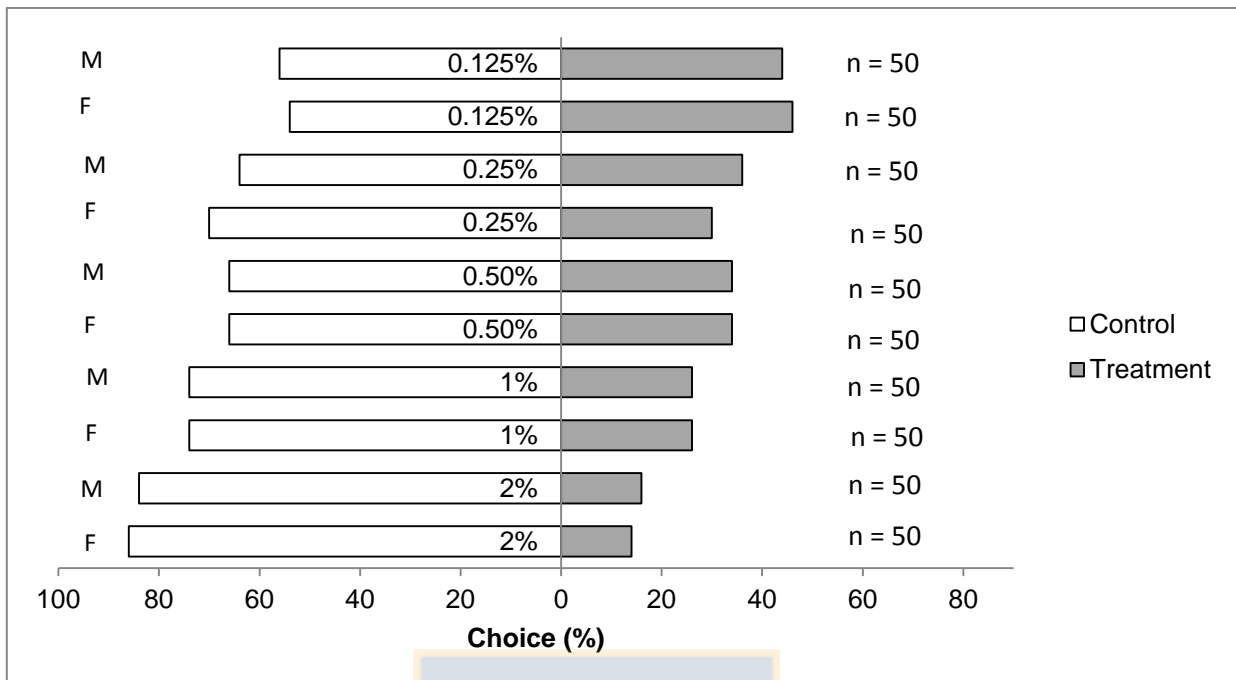


Fig 1 Repellent effect of wild *Ch. ambrosioides* essential oil at concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1 and 2 % against male (M) and female (F) adults of *S. zeamais* during 5 minutes of observations (n = number of replicates).

#### Antixenosis bioassay with choice arena

A number of 308 out of 400 insects evaluated (72 hours) made a choice during the two replications in the bioassay, so that these were considered as a 100% of the evaluation. The highest number of insects was recorded in the control with a value of 24.7%, which was significantly higher than the ones recorded in all the concentrations (Table 3). As the concentration of the essential oil increased, insect's choice for the treated maize decreased. In turn, the 8.0% concentration had the lowest preference with an average of 4.7%, being statistically different from the lowest concentration of essential oil (0.125%) and the control. Preference did not differ significantly between concentrations of 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, and 4%, ranging between 9 and 16% (Table 3).



Table 3 Preference, after 72 hour, of adults of *S. zeamais* for maize treated with wild *Ch. ambrosioides* essential oil at different concentrations under laboratory conditions.

Concentration (%) (v/v)	Preference (%)	
Control	24.7	a*
0.125	15.6	b
0.25	12.5	bc
0.5	11.1	bc
1.0	10.0	bc
2.0	12.5	bc
4.0	8.9	bc
8.0	4.7	c

\*Tukey's test: Mean values with the same letter do not differ significantly ( $p > 0.05$ ).  
n=308

#### Residual effect

The preference index presented values lower than 1 at 24 hours in all concentrations. However, antixenotic effects began to decline at 48 hours, especially at lower concentrations. For instance, the 0.25% concentration showed no antixenotic effect at 48 hours, reaching a preference index greater than 1. The concentrations equal to or higher than 1,0 % were the only ones that maintained antixenotic effects at 72 hours, while only the 1,0 and 2,0% concentrations maintained this effect at 96 hours with preference indices of 0.89 and 0.82, respectively (Table 4).

Table 4 Residual effect evaluated by the preference index (IP) of wild *Ch. ambrosioides* essential oil against adults of *S. zeamais*.

Concentration	Time (hours)			
	24	48	72	96
	IP	IP	IP	IP
0.25	0.93	1.01	1.45	-
0.5	0.49	0.96	1.08	-
1.0	0.25	0.42	0.54	0.89
2.0	0.45	0.9	0.76	0.82
4.0	0.27	0.44	0.75	1.05

PI < 1: no preference; PI = 1: neutral; PI > 1: preference

#### Antixenosis in treated bags

All insects remained outside of the bag at 12 and 24 h. After five days, the entry of insects to the control bags was close to 10%, while there was a 0% entry of insects in the bags treated with *Ch. ambrosioides* essential oil at a concentration of 4.0%. Therefore, significant differences were found between these two treatments, but not with the 1 and 2% concentrations. Insects that did not enter the bags treated with essential oil at 1 and 2% concentrations reached 96.2% and 98.7% respectively (Fig 2). *S. zeamais* mortality throughout the bioassay did not exceed 8%.

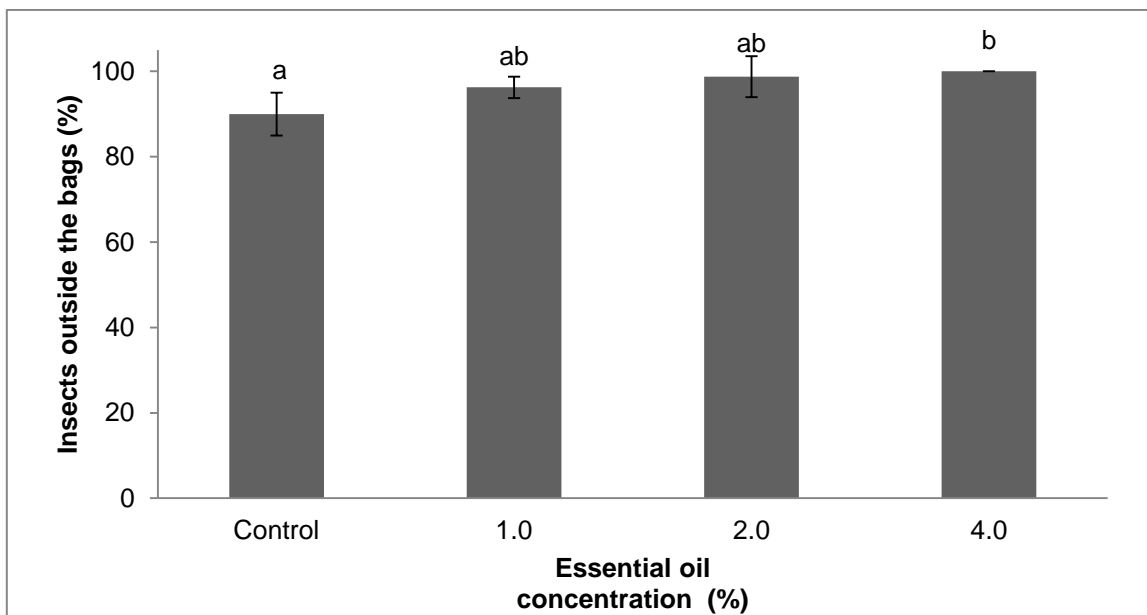


Fig 2 Percentage of adults of *S. zeamais* outside of the bags treated with wild *Ch. ambrosioides* essential oil at concentrations of 1.0, 2.0 and 4.0% after five days. Vertical bars = standard deviation. Kruskal Wallis test: Means with a same letter do not differ significantly ( $p > 0.05$ ).

## Discussion

The chemical analysis showed that  $\alpha$ -terpinene was the active compound found in the highest amount in wild *Ch. ambrosioides* essential oil. There is evidence in the literature that this compound presents biological activity against insects, such as *Culex pipiens pallens* Coquillett (Diptera; Culicidae) (Choi *et al* 2002, Park *et al* 2005), *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera; Plutellidae) (Zhang *et al* 2004), *Nephotettix virescens* Distant (Hemiptera; Cicadellidae) (Calumpang *et al* 2013) and *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera; Aleyrodidae) (Dehghani & Ahmadi 2013). According to Bigoga *et al* (2013), *Ch. ambrosioides* essential oil mainly consists of terpenes, especially  $\alpha$ -terpinene, which are present in variable amounts depending on factors such as geographic location, harvest time and climate, so that its composition and biological effect may vary.

In the repellency bioassay, the maize kernels treated with *Ch. ambrosioides* essential oil had a direct effect on insect food preference ( $p < 0.05$ ) in both males and females. The 0.125% concentration presented the highest level of preference, perhaps because the low concentration of active compounds and their high rate of volatilization is not enough to elicit an effect on insect behavior. This is in agreement with the results obtained at higher concentrations (1 and 2%), in which a marked repellent effect was observed. According to Jayasekara *et al* (2005), *S. zeamais* in their adult stage can detect essential oils and are capable to avoid them, so that the oil film covering treated maize kernels can directly influence insect behavior, reducing their contact with the treated seeds (Brown & Hebert 1997, Nerio *et al* 2010, Salgado *et al* 2012). The results of our study are consistent with those documented by Ukeh *et al* (2012), who used the same methodology on *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera; Curculionidae) with essential oils of *Xylopiya aethiopica* Dunal A Rich (Anonaceae) and *Dennettia tripetala* G. Baker (Anonaceae). The results of their study revealed a clear preference of both male and female insects by the untreated control. In addition, a study by Silva *et al* (2005a) showed that the powder of cultivated *Ch. ambrosioides* has a repellent effect against *S. zeamais* due to semiochemicals present in inflorescence and stem powder.

The active compounds with insecticidal and insectistatic activities usually found in plant essential oils belong to the terpenoid group, which in case of *Ch. ambrosioides* mainly corresponds to  $\alpha$ -terpinene. Several studies have described the capacity that  $\alpha$ -terpinene to modify insect behavior. For instance, Choi *et al* (2002) reported repellent effects of  $\alpha$ -terpinene against *C. pipens pallens*, while Park *et al* (2005) found that this compound was more effective against *C. pipiens pallens* than the commercial repellent DEET. In Addition, Zhang *et al* (2004) reported effective repellent effects against *P. xylostella*, when conducted tests with  $\alpha$ -terpinene isolated from the essential oil of *Mikania micrantha* Kunth (Asteraceae). Similarly, Calumpang *et al* (2013) reported that  $\alpha$ -terpinene obtained from *Alpinia elegans* C. Presl K. Schum (Zingiberaceae) provided 70% repellency against *N. virescens*. The study of Dehghani & Ahmadi (2013) confirmed the

repellent effects of  $\alpha$ -terpinene, contained in *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) essential oil, against *T. vaporariorum*. Therefore, it can be inferred that  $\alpha$ -terpinene is responsible for the biological activity of *Ch. ambrosioides* essential oil, indicating that this essential oil is a potential alternative to control insect infestation in stored grains.

The antixenosis bioassay with choice arena showed, in general, a significant decrease in insect preference was found in the treatments with *Ch. ambrosioides* essential compared to the control, which indicates that this oil presents an antixenotic activity against *S. zeamais*. According to Radha & Murugan (2011), volatile plant compounds may affect both the physiology and behavior of the insect. Several studies have documented repellent effects of *Ch. ambrosioides* against *S. zeamais* (Silva *et al* 2005a, Mazzonetto *et al* 2013). According to Obeng-Oferi & Reichmuth (1997), the action of decreasing insect food preference for maize treated with essential oil can be a potential tool to prevent infestation by stored-grain insects.

In the oil residuality bioassay all concentrations of *Ch. ambrosioides* essential oil presented an antixenotic effect at 24 hours. This may be due to the presence of volatile active compounds that affect insect behavior, leading them to avoid treated food sources (Pandey *et al* 2014). Studies conducted by Silva *et al* (2005a) and Mazzonetto *et al* (2013) on the effects of powder of cultivated *Ch. ambrosioides* reported similar results. However, the antixenotic effect of the essential oil decreased with time, being effective up to 72 hours only in higher concentrations (1, 2 and 4%) with preference indices lower than 1, which according to the formula adapted by Mazzonetto & Vendramim (2003) are considered as antixenotic or no preference. The time-dependent decrease of the repellent efficacy could be due to volatilization of the active compounds since these are susceptible to the effects of light and temperature (Cloyd & Chiasson 2007, Betancurt *et al* 2010). Therefore, their use as a protection against insect pests would have a maximum duration of 72 hours and so that repeated applications are required after this period. Several plant compounds have proven to be equally or more effective than synthetic

products, but the quick volatilization of essential oils limits their efficacy (Collins *et al* 1993, Fradin & Day 2002, Nerio *et al* 2010). In order to increase the biological activity lifespan of essential oils, some authors have proposed the development of formulations with fixing materials, such as polymers, microcapsules and paraffin additives, or the combination with other oils, in order to extend protection time (Sharma & Ansari 1994, Dua *et al* 1996, Das *et al* 1999, Oyedele *et al* 2002, Nentwig 2003, Chang *et al* 2006, Nerio *et al* 2010, Sainz *et al* 2012).

The results of antixenosis in untreated bags bioassay showed a limited number of insects enter the bags in all treatments (treated seeds and control). This delayed entry can be explained by the fact that the bag is an efficient barrier by itself or by the presence of maize kernels on the outside of the bag, which were placed to prevent insects from starving to death. However, the bags treated with oil also presented an antixenotic effect, especially in the 4% concentration as this treatment completely prevented the entry of insects into the bags. However, the antixenotic effect of oil gradually decreased from 5 DAI because the active compounds of the essential oils are volatile and susceptible to photodegradation and other external factors, such as temperature (Cloyd & Chiasson 2007, Betancurt *et al* 2010). Koono *et al* (2007) obtained similar results when using bags impregnated with aqueous extracts of *Ch. ambrosioides* and *Lantana camara* L. (Verbenaceae) against *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera; Bruchidae) and *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera; Bruchidae) and documented a significant reduction in the damage caused by these insects. The treatment consisting of bags treated with *Ch. ambrosioides* essential oil can be used as a preventive measure because it does not require a direct contact of kernels with the oil (Abate & Ampofo 1996, Koono *et al* 2007). However, further research is required to determine which active compounds of essential oils and materials contribute to the development of formulations that provide both efficacy and residual effects (Fekadu *et al* 2013). The essential oil of wild *Ch. ambrosioides* has antixenotic effects against adults of *S. zeamais*, similar to those reported in cultivated species, acting equally on both male and female insects but with a maximum residual effect of 72 hours. Data obtained in this research suggest that

the use of plant compounds, such as *Ch. ambrosioides* essential oil, are an potentially effective alternative to synthetic compounds, not only preventing the damage caused by insects in stored seeds but also the adverse effects associated with synthetic product applications. However, studies are needed to develop formulations and combinations with other compounds in order to extend the residual effects of essential oils.

## References

Abate T, Ampofo JKO (1996) Insect pests of beans in Africa. *Annu Rev Entomol* 41: 45–73

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265-267

Betancur J, Silva G, Rodríguez C, Fischer S, Zapata N (2010) Insecticidal activity of *Peumus boldus* Molina essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chil J Agr Res* 3 (70): 399-407.

Bigoga J, Saahkem P, Ndindeng S, Ngondi J, Nyegue M, Oben J, Leke R (2013) Larvicidal and repellent potential of *Chenopodium ambrosioides* Linn essential oil against *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae). *The Open Entomol J* 7: 16-22

Blanckaert I, Paredes-Flores M, Espinosa F, Piñero D, Lira R (2012) Ethnobotanical, morphological, phytochemical and molecular evidence for the incipient domestication of Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.: Chenopodiaceae) in a semi-arid region of Mexico. *Genet Resour Crop Evol* 59:557–573

Brown M, Hebert AA (1997) Insect repellents: an overview. *J Am Acad Dermatol*. 36, 243–249

- Calumpang S, Burgonio G, Navasero M, Navasero M (2013) Behavioral and olfactory responses of rice green leaf hopper, *Nephotettix virescens* (Distant) to volatile cues from tagbak (*Alpinia elegans* (C. Presl) K. Schum). Philipp J Sci 142 (2): 167-173
- Castro A, Henriques D, Coutinho M, Terra N, de Sena Fernandes M (2011) Tomato plant inheritance of antixenotic resistance to tomato leafminer. Pesq agropec bras 46(1): 74-80
- Chang KS, Tak JH, Kim SI, Ahn YJ, WJ Lee (2006) Repellency of *Cinnamomum cassia* bark compounds and cream containing cassia oil to *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory and indoor conditions. Pest Manage Sci 62:1032–1038
- Choi W, Park IBS, Ku SK, Lee SE (2002) Repellent activities of essential oils and monoterpenes against *Culex pipiens pallens*. J Am Mosq Control Assoc 18(4):348-351
- Chu SS, Feng HJ, Liu ZL (2011) Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. Pest Manag Sci 67: 714–718
- Cloyd RA, Chiasson H (2007) Activity of an essential oil derived from *Chenopodium ambrosioides* on greenhouse insect Pests J Econ Entomol 100(2): 459-466.
- Collins DA, Brady JN, Curtis CF, (1993) Assessment of the efficacy of quwenling as a mosquito repellent. Phytother Res 7, 17–20
- Cruzat M, Silva G, Serri H, Hepp R (2009) Protección de ocho cultivares de trigo con polvo de *Peumus boldus* Molina contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Idesia 27(2): 39-45
- Danho M, Gaspar C, Haubruge E (2002) The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. J Stored Prod Res 38: 259–266.



Das N, Nath D, Baruah I, Talukdar P, Das S (1999) Field evaluation of herbal mosquito repellents. *J Commun Dis* 31: 241–245

Dehghani M, Ahmadi K (2013) Anti-oviposition and repellence activities of essential oils and aqueous extracts from five aromatic plants against greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Homoptera: Aleyrodidae). *Bulg J Agric Sci* 19 (4): 691-696.

Dua VK, Gupta NC, Pandey AC, Sharma VP (1996) Repellency of *Lantana camara* (Verbenaceae) flowers against *Aedes* mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 12:406–408

Fancelli M, Vendramim JD, Frighetto RTS, Lourenção AL (2005) Exsudato glandular de genótipos de tomateiro e desenvolvimento de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Sternorrhyncha: Aleyrodidae) biótipo B Neotrop *Entomol* 34: 659-665

FAO (1993). Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural. <http://www.fao.org/docrep/x5027s/x5027S00.htm#Contents>. Accessed 12 May 2015.

Fekadu M, Mekuria T, Meshesha B, Teshome GM (2013) Bioactivity of essential oils of local plants against adult *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Ethiopia. *Adv Biosci Biotechnol* 4: 805-809.

Fradin MS, Day JF (2002) Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med* 347: 13–18

Gómez B (2008) Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas*.7 (1): 1-9

Guenther E (1972) *The Essential Oils*. Krieger Publishing Company, Florida, USA

Halstead DGH (1963) External sex differences in stored-products Coleoptera. *Bull Entomol Res* 54: 119-134

- Hegazy A, Farrag H (2007) Allelopathic Potential of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants. GJBRR 2(1): 01-09
- Jaramillo B, Duarte E, Delgado W (2012) Bioactivity of essential oil from Colombian *Chenopodium ambrosioides*. Rev Cubana Plant Med 17(1): 54-64
- Jayasekara TK, Stevenson PC, Hall DR, Belmain<sup>1</sup> SR (2005) Effect of volatile constituents from *Securidaca longepedunculata* on insect pests of stored grain. J Chem Ecol 31(2): 303-313 DOI: 10.1007/s10886-005-1342-0
- Koona P, Tatchago V, Malaa D (2007) Impregnated bags for safer storage of legume grains in West and Central Africa. J Stored Prod Res 43: 248–251
- Mazzonetto F, Vendramim J (2003) Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. Neotrop Entomol 32:145-149
- Mazzonetto F, Corbani R, Dalri A (2013). Biofumigation of plant species on *Sitophilus zeamais* in stored maize. Appl Res Agrotec 6(1): 53-61
- McKey D, Elias M, Pujol B, Duputié A (2010) The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. New Phytol 186: 318-332
- Nentwig G (2003) Use of repellents as prophylactic agents. Parasitol Res 90:40–48
- Nerio LS, Oliver J, Stashenko E (2010) Repellent activity of essential oils: A review. Bioresource Technol 101: 372–378
- Obeng-Oferi D, Reichmuth Ch (1997). Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored product Coleoptera. Int J Pest Manag 43:89-94
- Oyedele AO, Gbolade AA, Sosan MB, Adewoyin FB, Soyelu OL, Orafidiya OO (2002) Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from Lemongrass oil. Phytomedicine 9:259–262

Pandey A, Singh P, Palni U, Tripathi N (2011). Use of essential oils of aromatic plants for the management of pigeon pea infestation by pulse bruchids during storage. *IJAT* 7(6): 1615-1624

Pandey AK, Palni UT, Tripathi NN (2014) Repellent activity of some essential oils against two stored product beetles *Callosobruchus chinensis* L. and *C. maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) with reference to *Chenopodium ambrosioides* L. oil for the safety of pigeon pea seeds. *J Food Sci Technol*. 51(12):4066–4071

Park B, Choi W, Kim J, Kim K, Lee S (2005) Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *J Am Mosq Control Assoc* 21:80-83

Pickersgill B (2007) Domestication of Plants in the Americas: Insights from Mendelian and Molecular Genetics. *Ann Bot* 100: 925-940

Procopio S, Vendramim J, Ribeiro J, Santos J (2003) Bioatividade de diversos pós de origen vegetal em relação a *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). *Ciênc Agrotec* 27:1231-1236

Radha R, Murugan K (2011) Bioefficacy of plant derivatives on the repellency, damage assessment and progeny production of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera: Bruchidae). *Internet J Food Saf* 13:115–123

Sainz P, Sanz J, Burillo J, González A, M Bailén, Martínez R (2012) Essential oils for the control of reduviid insects. *Phytochem Rev* 11(4): 361-369

Salgado N, D'Antonino LR, Soto A (2012) Aceite Esencial de *Piper crassinervum* para el control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Bol Cient Mus Hist Nat* 16 (1): 99 – 107

Sharma VP, Ansari MA (1994) Personal protection from mosquitoes (Diptera: Culicidae) by burning neem oil in kerosene. *J Med Entomol* 31:505–507

Signoretta A, Peñaflor M, Bento J (2012) Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), female moths respond to herbivore-induced corn volatiles. *Neotrop Entomol* 41:22–26

Silva G, Kiger R, Hepp R, Tapia V (2005)a. Control de *Sitophilus zeamais* con polvos vegetales de tres especies del género *Chenopodium*. Pesq agropec bras Brasília 10(40): 953-960

Silva G, Orrego O, Hepp R., Tapia M (2005)b. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* em maíz almacenado. Pesq Agropec Bras Brasília 1(40):11-17

Tavares MAGC, Vendramim DJ (2005)a Atividade inseticida da erva-de-santa-maria *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) em relação a *Sitophilus zeamais* Mots., 1855 (col.: curculionidae). Arq Inst Biol São Paulo 72 (1): 51-55

Tavares MACG, Vendramim JD (2005)b Bioatividade da erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., Sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). Neotrop Entomol 34(2):319-323

Ukeh DA, Oku EE, Udo IA, Nta AI, Ukeh JA (2012) Insecticidal effect of fruit extracts from *Xylopiya aethiopica* and *Dennettia tripetala* (Annonaceae) Against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). Chil J Agr Res 72(2): 195-200

Zhang M, Ling B, Chen S, Liang G, Pang X (2004) Repellent and oviposition deterrent activities of the essential oil from *Mikania micrantha* and its compounds on *Plutella xylostella*. Acta Entomol Sin 11(1):37-45

## CONCLUSIONES GENERALES

1. El aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre tiene efecto tóxico como fumigante y por contacto sobre *S. zeamais* adultos.
2. El aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre tiene efecto antixenótico sobre *S. zeamais* adultos sin diferenciación entre macho y hembra.
3. Bolsas de polipropileno tratadas con aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre presentan efecto antixenótico sobre *S. zeamais* adultos.
4. El aceite esencial de *Ch. ambrosioides* silvestre es una alternativa efectiva para la protección de maíz almacenado contra *S. zeamais*.

