



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y
CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES

DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA

EVALUACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA DE HOJAS DE *Peumus boldus* MOLINA PARA EL CONTROL DE LA VAQUITA DEL OLMO, *Xanthogaleruca (Pyrrhalta) luteola* MÜLLER (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Forestal

RODRIGO LEONARDO JIMÉNEZ CATALÁN

Profesores Guías: Dra. Amanda Huerta Fuentes, Ingeniero Forestal
Dr. Ítalo Chiffelle Gómez, Bioquímico

Santiago, Chile

2009

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y
CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES
DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA

EVALUACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA DE HOJAS DE *Peumus boldus* MOLINA PARA EL CONTROL DE LA VAQUITA DEL OLMO, *Xanthogaleruca (Pyrrhalta) luteola* MÜLLER (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE)

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Forestal

RODRIGO LEONARDO JIMÉNEZ CATALÁN

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía Dra. Amanda Huerta Fuentes	7,0
Prof. Guía Dr. Ítalo Chiffelle Gómez	6,7
Prof. Consejero Dr. Carlos Magni Díaz	7,0
Prof. Consejero Dr. Jaime Araya Clericus	7,0

Por ustedes...Mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Después de un largo recorrido se acerca el momento de llegar a la meta y no se puede dejar de agradecer a quienes han sido parte de este andar.

En primer lugar doy gracias a mi familia, por su apoyo incondicional. A mis padres, por entregarme energías y fuerzas para seguir adelante. A mis hermanas, por el enorme cariño que me brindan día a día y por ser ejemplos que me inspiran. A mis sobrinos, por su inigualable ternura. A quien viene en camino, simplemente por el hecho de existir.

Agradezco además a mis profesores guías, Amanda Huerta e Ítalo Chiffelle por su acogida, preocupación y sencillez. Les doy las gracias por brindarme apoyo intelectual y humano en cada una de las etapas del trabajo.

También envié mis agradecimientos a mis profesores consejeros, por su aporte en las correcciones de la memoria de título. Igualmente a Tania, Julia y Gloria por su gran ayuda y por hacer de mi estadía en el laboratorio un momento agradable y familiar.

Agradezco enormemente a la profesora Marcela Sepúlveda por su apoyo permanente, por su ayuda y su profunda calidad humana. Doy gracias por el tiempo brindado, sus sabios consejos, su inagotable confianza y transparencia.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos y a todos aquellos que compartieron esta etapa de mi vida, y que sin saberlo, fueron un importante soporte para llegar a la fase cúlmine.

Un especial agradecimiento a mi casa de estudio, Universidad de Chile, por representar para mí, más que un lugar físico, una etapa de constante aprendizaje, no sólo intelectual, sino también de madurez personal y una desafiante invitación para el futuro.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pág.

RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIAL Y MÉTODO	5
2.1 Material	5
2.2 Método	5
2.2.1 Recolección de hojas y procesamiento	5
2.2.2. Análisis proximal	5
2.2.3. Colecta y cría de insectos	6
2.2.4. Elaboración de los extractos.....	6
2.2.5. Evaluación del efecto insecticida	6
3. RESULTADOS	8
3.1. Caracterización física y química de las hojas de <i>P. boldus</i>	8
3.2. Propiedades insecticidas de los extractos.....	8
3.2.1 Extractos acuosos de hojas de <i>P. boldus</i>	8
3.2.2 Extractos etanólicos de hojas de <i>P. boldus</i>	11
3.2.3 Determinación de la CL ₅₀	14
3.3. Duración de los estados de pupa y adulto de <i>X. luteola</i> en laboratorio.	15
4. DISCUSIÓN	16
4.1. Caracterización física y química de las hojas de <i>P. boldus</i>	16
4.2. Propiedades insecticidas de los extractos.....	16
4.3. Duración de los estados de pupa y adulto de <i>X. luteola</i> en laboratorio.	18
5. CONCLUSIONES	20
6. BIBLIOGRAFÍA	21
APÉNDICES	24
APÉNDICE 1: Análisis Estadístico 1	24
APÉNDICE 2: Análisis Estadístico 2	28

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
CUADRO 1: Análisis proximal de hojas juveniles y maduras de <i>P. boldus</i> .	8
CUADRO 2: Mortalidad promedio (%) \pm E.T. (error típico) de adultos de <i>X. luteola</i> por efecto de extractos acuosos de hojas juveniles de <i>P. boldus</i> para varias concentraciones.	9
CUADRO 3: Mortalidad promedio (%) \pm E.T. (error típico) de adultos de <i>X. luteola</i> por efecto de varias concentraciones de extractos acuosos de hojas maduras de <i>P. boldus</i> .	10
CUADRO 4: Mortalidad promedio (%) \pm E.T. (error típico) de adultos de <i>X. luteola</i> por efectos de extractos etanólicos de hojas juveniles de <i>P. boldus</i> para varias concentraciones.	11
CUADRO 5: Mortalidad promedio (%) \pm E.T. (error típico) de adultos de <i>X. luteola</i> por efectos de varias concentraciones de extractos etanólicos de hojas maduras de <i>P. boldus</i> .	12
CUADRO 6: CL ₅₀ de los adultos de <i>X. luteola</i> ante extractos de hojas juveniles y maduras de <i>P. boldus</i> al segundo día de aplicación, según análisis Probit.	14
CUADRO 7: Duración (días) de los estados de desarrollo de pupas y adultos de <i>X. luteola</i> en laboratorio.	15

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1: <i>Xanthogaleruca luteola</i> (A) Estados de desarrollo (larva y adulto). (B) Follaje de olmo dañado por la plaga.	1
FIGURA 2: Mortalidad promedio de adultos de <i>X. luteola</i> en extractos acuosos en 9 horas, por efectos de extractos desde hojas juveniles de <i>P. boldus</i> en varias concentraciones.	9
FIGURA 3: Mortalidad promedio de adultos de <i>X. luteola</i> en extractos acuosos en 10 horas, por efectos de extractos desde hojas maduras de <i>P. boldus</i> en varias concentraciones.	10
FIGURA 4: Mortalidad promedio de adultos de <i>X. luteola</i> en extractos etanólicos en 12 horas, por efectos de extractos desde hojas juveniles de <i>P. boldus</i> en varias concentraciones.	12
FIGURA 5: Mortalidad promedio de adultos de <i>X. luteola</i> en extractos etanólicos en 13 horas, por efectos de extractos desde hojas maduras de <i>P. boldus</i> en varias concentraciones.	13
FIGURA 6: Representación gráfica del análisis Probit de la mortalidad de <i>X. luteola</i> tras la aplicación de varias concentraciones de extractos de hojas juveniles (A) y maduras (B) de <i>P. boldus</i> con los solventes agua y etanol.	15

Evaluación del efecto insecticida de hojas de *Peumus boldus* Molina para el control de la vaquita del olmo, *Xanthogaleruca (Pyrrhalta) luteola* Müller (Coleoptera: Chrysomelidae)

RESUMEN

Se evaluó el efecto insecticida de extractos elaborados con harina de hojas de boldo (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae) y dos solventes (agua y etanol), en varias concentraciones para el control de *Xanthogaleruca luteola* (*Pyrrhalta*) Müller (Coleoptera: Chrysomelidae) en laboratorio. Se compararon harinas obtenidas de follaje juvenil y maduro de boldo con ambos solventes. Se determinó el porcentaje de mortalidad de los insectos, la concentración letal 50% (CL₅₀) y la duración de los estados de pupa y adulto. Además se caracterizaron física y químicamente las hojas juveniles y maduras mediante análisis proximal. El diseño experimental fue completamente al azar con análisis de efectos fijos para cada uno de los solventes; para la comparación de los estados de madurez se utilizó un diseño bifactorial. Los extractos fueron eficaces y causaron una mortalidad promedio en adultos de *X. luteola* superior al 75% con hojas juveniles y en las concentraciones mayores, con diferencias significativas en relación a las dosis más bajas. La CL₅₀ menor fue de 1% y se obtuvo con etanol como solvente a los 2 días. Los parámetros del análisis proximal, rendimiento, humedad, cenizas y fibra cruda de las hojas arrojaron diferencias significativas entre estados de madurez, no así en el porcentaje de lípidos. El desarrollo de pupas y adultos duró 7 y 21 días, respectivamente.

Palabras clave: concentración letal, insecticidas botánicos, *Peumus boldus*, *Xanthogaleruca luteola*.

Evaluation of the insecticide effect of *Peumus boldus* Molina leaf extracts for control of elms leaf beetle, *Xanthogaleruca (Pyrrhalta) luteola* Müller (Coleoptera: Chrysomelidae)

ABSTRACT

Insecticide effect from extracts of new and mature leaves with two solvents (water and ethanol) from “boldo” trees (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae) was evaluated at various concentrations to control *Xanthogaleruca luteola* (*Pyrrhalta*) Müller (Coleoptera: Chrysomelidae) under laboratory conditions. Insect mortality (%), 50% lethal concentration (LC₅₀) and the duration of pupal and adult stages were determined. Also, new and mature leaves were characterized physically and chemically by proximal analysis. The experimental design was completely randomized with analysis fixed effects for each solvent and a bifactorial design for comparison of different stages. The extracts were effective and they caused an average mortality above 75% of *X. luteola* adults with juvenile leafs at the highest concentration significantly different in relation to the lower doses. The lowest LC₅₀ was 1%, obtained with ethanol as solvent after two days. Proximal analysis parameters, yield, humidity, ash and crude fiber leaf presented significant differences between stages, but not the percentage of specific lipids. The developmental time of pupae and adult stages were 7 and 21 days, respectively.

Key words: lethal concentration, botanical insecticides, *Peumus boldus*, *Xanthogaleruca luteola*.

1. INTRODUCCIÓN

Hasta el siglo XIX el árbol no fue requerido ni imaginado en el espacio público de las ciudades hispanoamericanas. Hoy, en el milenio urbano, el arbolado vial ha tomado un rol importante, que determina en gran medida la imagen y calidad ambiental de la ciudad moderna (Saiz, 2004).

La importancia de la preservación de la arborización urbana viene conquistando un espacio bastante definido en la sociedad, con miras a aprovechar la contribución actual y potencial que los árboles pueden aportar al bienestar de la población tanto desde el punto de vista fisiológico, como psicológico y social, reconociéndose una estrecha relación entre arborización y calidad de vida de la comunidad (Saiz, 2004).

Sin embargo, el mantenimiento de una condición fitosanitaria satisfactoria en el arbolado urbano, se ha vuelto cada vez más compleja. El incremento del intercambio internacional de productos es una de las causas principales de la dispersión de organismos que amenazan la sanidad de las masas vegetales.

En los últimos años se ha detectado en Chile una serie de plagas en plantaciones y arbolado urbano, que afectan directamente la economía y el bienestar del país. Entre ellas se encuentra la “vaquita del olmo”, *Xanthogaleruca (Pyrrhalta) luteola* Müller (Col.: Chrysomelidae), insecto que esqueletoniza las hojas de los olmos (*Ulmus* spp.), especies utilizadas en espacios urbanos con fines ornamentales. Este insecto puede defoliar totalmente estos árboles, comúnmente en verano, lo que los debilita y deja vulnerables al daño por otros insectos (De Liñán, 1998).

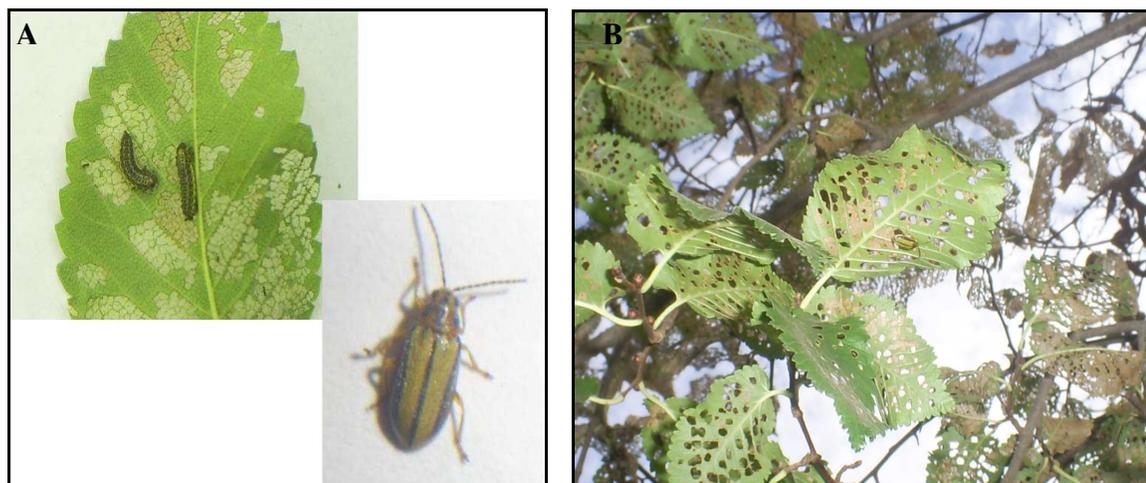


Figura 1. *Xanthogaleruca luteola*. (A) Estados de desarrollo (larva y adulto). (B) Follaje de olmo dañado por la plaga.

X. luteola se desarrolla en una metamorfosis completa, con huevo, larva, pupa y adulto, y suele tener dos generaciones al año (Muñoz *et al.*, 2003). Según las condiciones climáticas puede existir una tercera generación o parte de ella. Debido a que el período de puesta tiene una duración cercana a un mes, es corriente que se encuentren al mismo tiempo huevos, larvas y adultos (Romanik y Cadahia, 2002).

Durante su estado larvario, los insectos devoran el parénquima verde de las hojas, sin consumir la epidermis del haz, y dejan las nerviaciones intactas. A las 2-4 semanas desde su nacimiento se desplazan a lo largo de las ramas y tronco para pupar, estado en el cual permanecen alrededor de diez días (De Liñán, 1998). Luego de invernarse, y una vez llegada la primavera, los adultos de *X. luteola* inician su actividad, se alimentan de las hojas, en las que producen agujeros irregulares (Muñoz *et al.*, 2003). Es frecuente encontrar hojas con ambos tipos de daño simultáneamente, es decir, hojas con daños producidos por larvas y adultos, lo que indica un traslape de generaciones (Jackson y Jackson, 2008). Al poco tiempo de este daño los adultos se aparean y la hembra inicia la puesta (Muñoz *et al.*, 2003). Los huevos son depositados en el envés de las hojas, en grupos de cinco a veinticinco huevos; cada hembra pone en promedio, de cuatrocientos a setecientos huevos. El período medio de incubación es de ocho días (Romanik y Cadahia, 2002).

El primer registro de *X. luteola* en Chile data de abril de 1982, de un ejemplar en Ritoque (Quintero) (Jackson y Jackson, 2008). En 1994 fue detectado en forma masiva en las Regiones de O'Higgins, Bío-Bío y Metropolitana. En marzo de 2005 se le encontró infestando olmos en la Región del Maule (SAG, 2005), lo que indica su rápida dispersión. La Región Metropolitana ha sido invadida en varias de sus comunas, y a la fecha no existe una solución técnico-económica factible de aplicar en las áreas urbanas, con un criterio de manejo sostenible de plagas.

Una de las principales técnicas de control de plagas es el uso de insecticidas químicos, los que, sin embargo, tienen efecto negativo sobre los seres humanos y el ambiente. Por ello, en el último tiempo se ha generado una tendencia hacia la elaboración de insecticidas naturales en base a los componentes activos de la biomasa vegetal.

Las plantas han evolucionado por más de 400 millones de años, y para contrarrestar el daño de los insectos han desarrollado mecanismos químicos de protección con efecto similar al de la acción insecticida. El hombre los ha explotado como herramienta en el manejo de plagas, cuando descubrió que los aceites, cenizas, desechos de extracción, extractos, humos, jugos, polvos, y resinas de algunas plantas le ayudaban a proteger sus cultivos. Sin embargo, estas herramientas fueron desplazadas por los insecticidas inorgánicos y posteriormente órgano sintéticos (Silva y Hepp, 2003).

Para utilizar una planta con fines insecticidas, no basta con que ésta sea prometedora o que sus propiedades insecticidas estén comprobadas; además se debe hacer un análisis de riesgo al ambiente y a la salud, considerando que el vegetal no se encuentre en vías de extinción, sea difícil de encontrar o que su utilización implique alteraciones importantes a su densidad en la naturaleza. Para que el uso de una planta insecticida no implique un deterioro al ecosistema sería ideal que tuviera las características siguientes: ser perenne, estar ampliamente distribuida y en grandes cantidades en la naturaleza, o bien que se pueda

cultivar, usar órganos renovables rápidamente, como hojas, flores o frutos, y evitar el uso de raíces y corteza; que requiera poco espacio, nada de manejo, escasa agua y fertilización, no constituya una maleza para plantas de importancia económica, tenga usos complementarios (como medicinales), y sea efectiva a dosis bajas (Silva *et al.*, 2001).

Gran parte de las especies de plantas que se utilizan en la protección vegetal exhiben un efecto insectistático más que insecticida, es decir, inhiben el desarrollo normal de los insectos (Pascual, 1996). Los compuestos antialimentarios en los sistemas de manejo integrado de plagas pueden resultar muy útiles como complemento o alternativa a los sistemas clásicos de control. Esta es otra forma de contribuir a la reducción en el uso de insecticidas poco recomendables debido a su persistencia y toxicidad potenciales en el medio (Zapata *et al.*, 2006). La alimentación de los insectos fitófagos ocurre en varias etapas; orientación hacia la fuente de alimentación, prueba, ingestión, digestión, asimilación y excreción. De este modo, la inhibición de la alimentación causada por compuestos insectistáticos e insecticidas vegetales consiste en evitar que la alimentación se efectúe de manera normal en por lo menos una de estas fases (Rodríguez, 2000; Silva y Hepp, 2003).

El boldo, *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) es un árbol siempreverde endémico de Chile, de hasta 20 m de altura, que se caracteriza por su copa globosa verde muy oscuro. La fragancia de sus hojas es muy característica, producto de los aceites esenciales sintetizados por esta especie (Vogel *et al.*, 2005).

El boldo es abundante bajo un régimen de clima mediterráneo, donde forma parte de la estructura de los matorrales costeros y bosques esclerófilos de la zona central (CONAF, 1998). Aunque tiende a formar poblaciones puras generalmente se mezcla con otras especies, también esclerófilas, como *Lithrea caustica* (Molina) Hook. et Arn., *Quillaja saponaria* Molina o *Cryptocarya alba* (Molina) Looser (Gajardo, 1994). Su alta capacidad de rebrote del tocón ha permitido una explotación masiva de las plantas silvestres durante décadas, por lo que en su hábitat natural se encuentra más en forma de arbusto que como árbol (Vogel *et al.*, 2005).

P. boldus es una especie que tiene una excelente capacidad de regeneración, incluso en áreas quemadas. El sitio en que crece siempre es asoleado y, en los suelos de secano, la única humedad edáfica disponible proviene de aguas lluvias (CONAF, 1998).

El boldo es una planta altamente valorada nacional e internacionalmente por sus efectos medicinales, lo que ha llevado a que desde comienzos del siglo pasado esté recibiendo la atención de naturalistas y científicos (Hoffmann *et al.*, 2003). La demanda internacional de follaje de boldo ha experimentado un constante aumento, exportándose en el 2005 alrededor de 1.500 ton de hojas secas, lo que corresponde al doble del volumen exportado durante 1985-1991 (Vogel *et al.*, 2005).

Además las hojas del boldo tienen propiedades insecticidas sobre algunos insectos (Silva *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2007), por ejemplo, sobre el gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Col., Curculionidae), con niveles de control cercanos al 100% (Silva *et al.*, 2005).

Zapata *et al.* (2006) evaluaron el efecto antialimentario de hojas de boldo en larvas de tercer estadio de *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lep., Noctuidae), tras añadir hojas molidas a la dieta artificial, y concluyeron que los insectos pudieron discriminar fácilmente su presencia, y consumieron en menor medida el alimento tratado que el no tratado.

Los principios activos más importantes del boldo son alcaloides isoquinoleínicos, aceite esencial y flavonoides (Van Ginkel, 1999). El 28 a 68% del aceite esencial está conformado por el compuesto tóxico ascaridol (Vogel *et al.*, 2005).

El aceite esencial de las hojas de boldo se encuentra en concentraciones entre 1-3 mL/100g de materia seca, y contiene principalmente ascaridol, cineol, limoneno y terpineol-4-ol (Vogel *et al.*, 1997). Otros componentes de las hojas de boldo son: azúcares, taninos, cumarina, ácidos orgánicos como el ácido cítrico, oxalato de calcio, materias minerales cuya mitad son hidrosolubles, como manganeso, lípidos, resina y goma (Van Ginkel, 1999).

Para liberar y aprovechar los componentes activos de las hojas de *P. boldus* con fines insecticidas, éstas deben triturarse. Las propiedades del follaje que se pueden aprovechar no son estables durante el año. En mayo la eficacia insecticida es menor (Pérez *et al.*, 2007). En este mes comienza la floración de *P. boldus*, por lo que la producción de flores explica en cierta medida que bajen los niveles de eficacia del efecto insecticida (Vogel *et al.*, 2005).

Con la finalidad de aportar al desarrollo de nuevas fuentes insecticidas y optimizar el control selectivo se evaluó la capacidad insecticida de extractos de hojas de *P. boldus* sobre *X. luteola*, para contribuir a la sanidad de los olmos como parte del arbolado urbano. Este estudio se hizo en etapas, que incluyeron la obtención y caracterización por análisis proximal del material vegetal de boldo, la colecta y cría de *X. luteola* y la elaboración de extractos, los que se evaluaron mediante bioensayos de laboratorio y el uso de herramientas matemáticas y estadísticas.

2. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 Material

El material vegetal utilizado en el estudio correspondió a hojas de *P. boldus*, extraídas desde árboles ornamentales de dicha especie, situados en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (33°24'27" S, 70°37'59" O), en el sector sur de la ciudad de Santiago, Comuna de La Pintana.

También se colectaron individuos de *X. luteola* en la Comuna de Maipú (33°30'40" S, 70°46'3" O), Santiago, Región Metropolitana.

2.2 Método

Para el estudio se consideraron cinco etapas: (1) recolección de las hojas y procesamiento, (2) análisis proximal, (3) colecta y cría de *X. luteola*, (4) elaboración de extractos, y (5) evaluación del efecto insecticida.

2.2.1 Recolección de hojas y procesamiento

El follaje de *P. boldus* se colectó al azar, desde las ramas bajas hasta la parte superior del árbol. Las hojas (3 kg) se llevaron al laboratorio de Química del Depto. de Agroindustria y Enología de la Facultad de Cs. Agronómicas de la U. de Chile. Este material se separó entre hojas juveniles (ubicadas en los extremos de las ramas, de color verde claro y consistencia más blanda) y maduras (comparativamente más duras y de color verde oscuro) y se secó en una estufa de aire forzado (Thelco, Modelo 18) a 40°C por 48 h. Posteriormente las hojas se trituraron en un molino de grano eléctrico, hasta convertirlas en harina.

2.2.2. Análisis proximal

Con una porción de harina (2.2.1) se hizo un análisis de características físicas y químicas de las hojas juveniles y maduras. Las características analizadas fueron (AOAC, 1984):

- Rendimiento: la pérdida de material se determinó a partir de la diferencia entre el peso de las hojas húmedas y el follaje triturado.
- Humedad: se determinó mediante secado en estufa de aire forzado a 100°C hasta obtener un peso constante.
- Lípidos: el contenido de aceite se obtuvo a través de extracción con el solvente éter de petróleo, con un extractor Soxlet.
- Fibra cruda: se determinó mediante hidrólisis ácida y básica, con ácido sulfúrico e hidróxido de sodio, respectivamente, siempre en caliente, utilizando un filtro Whatman.

- Cenizas: se obtuvieron al calcinar totalmente la materia orgánica mediante incineración en mufla (Heraeus, Modelo: KR170) a 550°C, quedando como remanente la materia inorgánica.

2.2.3. Colecta y cría de insectos

Los insectos se colectaron como larvas de últimos estadios de *X. luteola*, desde distintos árboles de olmo durante el verano de 2008, época en la cual dicha especie vegetal puede ser totalmente defoliada por vaquita del olmo (De Liñán, 1998).

Las larvas se trasladaron en bolsas de tul con follaje de olmo como alimento, al Laboratorio de Entomología Forestal del Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile, lugar dispuesto para su crianza. Las larvas de *X. luteola* se pusieron en placas Petri con papel filtro en la base humedecido con agua destilada y hojas frescas de olmo como alimento, condiciones necesarias para su desarrollo, hasta alcanzar el estado de pupa. A las pupas sólo se les aportó humedad, además de una cubierta de hojas para generar condiciones de baja luminosidad. Al emerger, los adultos se alimentaron con hojas frescas y se utilizaron como material base en los bioensayos. Tanto las larvas como los adultos se mantuvieron en condiciones naturales de luz, con una temperatura de $21,5 \pm 3,4^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $61 \pm 4\%$.

Dentro del estudio se hizo un seguimiento de la duración de los estados de pupa y adulto de *X. luteola* en las condiciones de laboratorio señaladas en el párrafo anterior, para 7 cohortes de 5 individuos cada una.

2.2.4. Elaboración de los extractos

Los extractos se elaboraron usando la harina obtenida en el Laboratorio de Química del Depto. de Agroindustria y Enología, perteneciente a la Facultad de Cs. Agronómicas de la U. de Chile, con dos solventes, agua y etanol, en varias concentraciones del extracto.

Al preparar los extractos se determinó una proporción base para preparar las mezclas de agua-harina de boldo y etanol-harina de boldo. Luego de la obtención del sobrenadante y de acuerdo a los sólidos solubles que quedaron en el extracto, se calcularon las concentraciones a utilizar, que se prepararon por dilución de éste. Las concentraciones se determinaron en unidades de medida peso/volumen (p/v) y posteriormente se transformaron a unidades peso/peso (p/p). Finalmente, las concentraciones para el solvente agua fueron: 2,5; 3,6; 3,9; 4,2; 4,5 y 5,0% p/p, y para etanol: 2,9; 3,2; 4,3; 5,7; 6,8 y 7,1% p/p.

Además se hicieron extractos acuosos y etanólicos de hojas maduras de *P. boldus*, en las siguientes concentraciones: 3,6; 3,9 y 4,5% p/p en agua y 4,3; 5,7 y 6,8% p/p en etanol.

2.2.5. Evaluación del efecto insecticida

La capacidad insecticida se evaluó mediante bioensayos de laboratorio con ejemplares adultos de *X. luteola* de no más de cinco días desde su emergencia, obtenidos en laboratorio. Se evaluaron las concentraciones determinadas para cada uno de los solventes

(agua y etanol), con cinco repeticiones, más los testigos (hojas de olmo sólo con solvente, agua o etanol, según corresponda).

Las unidades experimentales fueron placas Petri con 5 adultos de *X. luteola*, con papel filtro humedecido en su base y una hoja fresca de olmo, con el pecíolo cubierto con un algodón húmedo (Folcia *et al.*, 2005). En cada tratamiento se usó una concentración diferente y se dejó un tratamiento testigo donde no se suministró extracto. La aplicación del producto obtenido sobre las hojas de olmo utilizadas para alimentar a los insectos se hizo por inmersión de éstas en las distintas diluciones del extracto, por un período de 30 s.

Además, se evaluaron extractos acuosos y etanólicos de hojas jóvenes y maduras de *P. boldus*, en varias concentraciones, para un análisis comparativo según las mortalidades obtenidas por *X. luteola*.

La mortalidad de los insectos se evaluó diariamente. Los promedios de mortalidad se calcularon con su respectivo error típico (E.T.). Los resultados se ajustaron mediante funciones matemáticas para identificar aquella más adecuada y con ella obtener la CL₅₀, (concentración letal para matar al 50% de los individuos), calculada mediante análisis Probit (Robertson *et al.*, 1984). El ajuste de los resultados al modelo Probit se verificó con una prueba de Chi² (X^2).

Al concluir la etapa experimental, los resultados obtenidos se sometieron a análisis de varianza. Para su normalización, los valores porcentuales se transformaron previamente a $\arccoseno \sqrt{X/100}$. En ambos solventes se hizo un estudio que contempló un análisis a base de un modelo de efectos fijos para garantizar la validez del estudio al comprobar la efectividad del testigo en los bioensayos. En la comparación entre los diferentes estados de madurez, se utilizó un diseño bifactorial, donde los factores fueron la concentración del extracto y la madurez de las hojas. Por último, cuando se encontraron diferencias estadísticas, se hicieron pruebas de Tukey para comparaciones múltiples de medias, utilizando el programa estadístico InfoStat versión 2009 (INFOSTAT, 2009).

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización física y química de las hojas de *P. boldus*

Los resultados del análisis proximal de las hojas de *P. boldus* se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis proximal de hojas juveniles y maduras de *P. boldus*.

Análisis efectuados (%)	Promedio \pm DE	
	Hojas juveniles	Hojas maduras
Rendimiento	21,75 \pm 1,06a	41,53 \pm 2,87b
Humedad de las hojas	64,85 \pm 2,7a	58,43 \pm 0,48b
Cenizas	9,21 \pm 0,64a	15,95 \pm 0,03b
Lípidos	4,83 \pm 0,86a	6,56 \pm 0,78 ^a
Fibra Cruda	13,55 \pm 0,56a	10,0 \pm 0,0 b

Medias con letras diferentes en forma horizontal difieren estadísticamente por la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). D.E.= Desviación Estándar.

El rendimiento promedio obtenido para ambos estados de madurez de las hojas correspondió al porcentaje final de peso del producto utilizable en relación al peso de las hojas en verde, contemplándose un mayor provecho en el material adulto (Cuadro 1).

El contenido de humedad fue mayor en las hojas juveniles, lo que se observó a simple vista, debido a su consistencia más blanda que las hojas maduras. Además, este parámetro presentó diferencias significativas una vez hecho el análisis estadístico (Cuadro 1).

La determinación de los lípidos, es decir, el contenido de aceite presente en el follaje (AOAC, 1984), no arrojó una diferencia significativa entre los dos estados de madurez de las hojas. Sin embargo, en el material vegetal maduro hubo una significativamente mayor proporción de cenizas (6,7%) que en el juvenil, mientras que en el análisis de fibra cruda, la proporción fue significativamente mayor en las hojas juveniles, superando en 3,5% el nivel alcanzado en las hojas maduras (Cuadro 1).

3.2. Propiedades insecticidas de los extractos

El efecto de los extractos desde *P. boldus* sobre *X. luteola* se distingue claramente por la mortalidad alcanzada en los bioensayos, donde se aplicaron diferentes concentraciones de sustrato. Además, en el testigo, sólo con aplicación de solvente, la acción del agua y etanol por sí solos no causaron la muerte de los insectos.

3.2.1 Extractos acuosos de hojas de *P. boldus*

En el Cuadro 2 se presentan las mortalidades promedios de adultos \pm E.T. de *X. luteola*, por efecto de los diversos extractos acuosos de hojas juveniles de *P. boldus* evaluados. Dichas mortalidades estuvieron relacionadas directamente con la concentración utilizada, con diferencias significativas entre los controles y todas las concentraciones (Apéndice 1). Cabe destacar que con una concentración de sólo 3,6% se alcanzó una mortalidad promedio cercana al 60%.

Cuadro 2. Mortalidad promedio (%) ± E.T. (error típico) de adultos de *X. luteola* por efecto de extractos acuosos de hojas juveniles de *P. boldus* para varias concentraciones.

Extractos (% p/p)						
Testigo	2,5	3,6	3,9	4,2	4,5	5,0
13,1 ± 0,9 a	30,7 ± 3,7 b	57,9 ± 3,4 c	59,2 ± 3,4 c	69,3 ± 3,6 cd	81,9 ± 2,3 d	78,7 ± 4,2 d

Medias con letras diferentes en forma horizontal difieren estadísticamente por la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

Las observaciones periódicas indicaron que la mortalidad de los adultos de *X. luteola* fue paulatina, y alcanzó el 100% a las 180 horas (7 ½ días) con la mayor concentración (5,0%) (Figura 2).

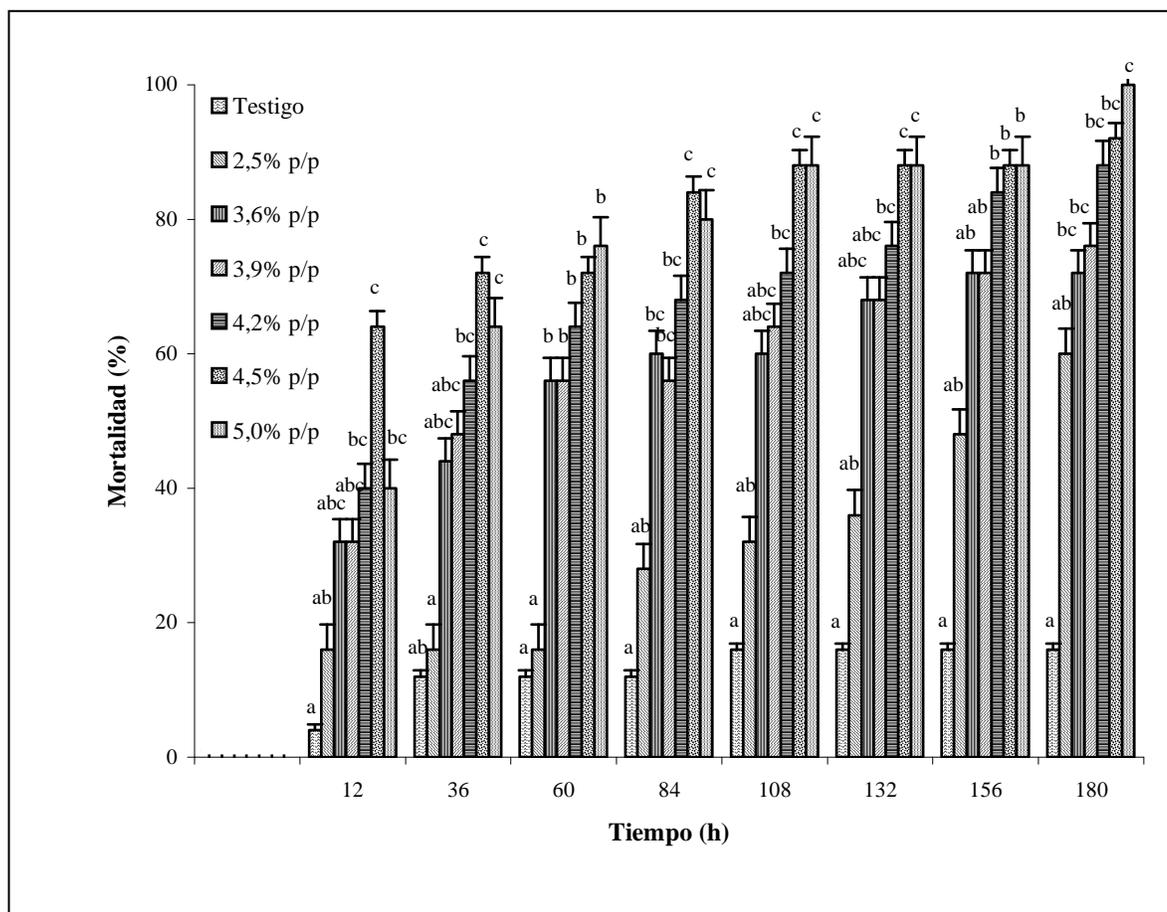


Figura 2. Mortalidad promedio de adultos de *X. luteola* en extractos acuosos en horas, por efecto de extractos desde hojas juveniles de *P. boldus* en varias concentraciones. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

La mortalidad promedio alcanzada en los bioensayos donde se evaluó el efecto de extractos elaborados con hojas maduras fue levemente menor que las causadas por extractos acuosos desde hojas juveniles en las mismas concentraciones, aunque igualmente fueron superiores al 50%, lo que resulta bastante efectivo. La baja mortalidad alcanzada en el testigo fue

menor, según el análisis estadístico, a la obtenida en los demás tratamientos con diversas concentraciones del extracto de harina de boldo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Mortalidad promedio (%) \pm E.T. (error típico) de adultos de *X. luteola* por efecto de varias concentraciones de extractos acuosos de hojas maduras de *P. boldus*

Extractos (% p/p)				
Testigo	3,6	3,9	4,5	
12,8 \pm 1,8 a	52,5 \pm 3,9 b	55,5 \pm 4,2 bc	69,6 \pm 4,6 c	

Medias con letras diferentes en forma horizontal difieren estadísticamente por la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

Los extractos acuosos elaborados con hojas maduras no alcanzaron el 100% de mortalidad en el tiempo de duración de los bioensayos (Figura 3), en ninguna de las concentraciones evaluadas, lo que corrobora la incidencia de las distintas dosis, ya que en las utilizadas para hojas juveniles, si existió mortalidad total, en el último periodo de evaluación y con la concentración mayor (5,0%; Figura 3).

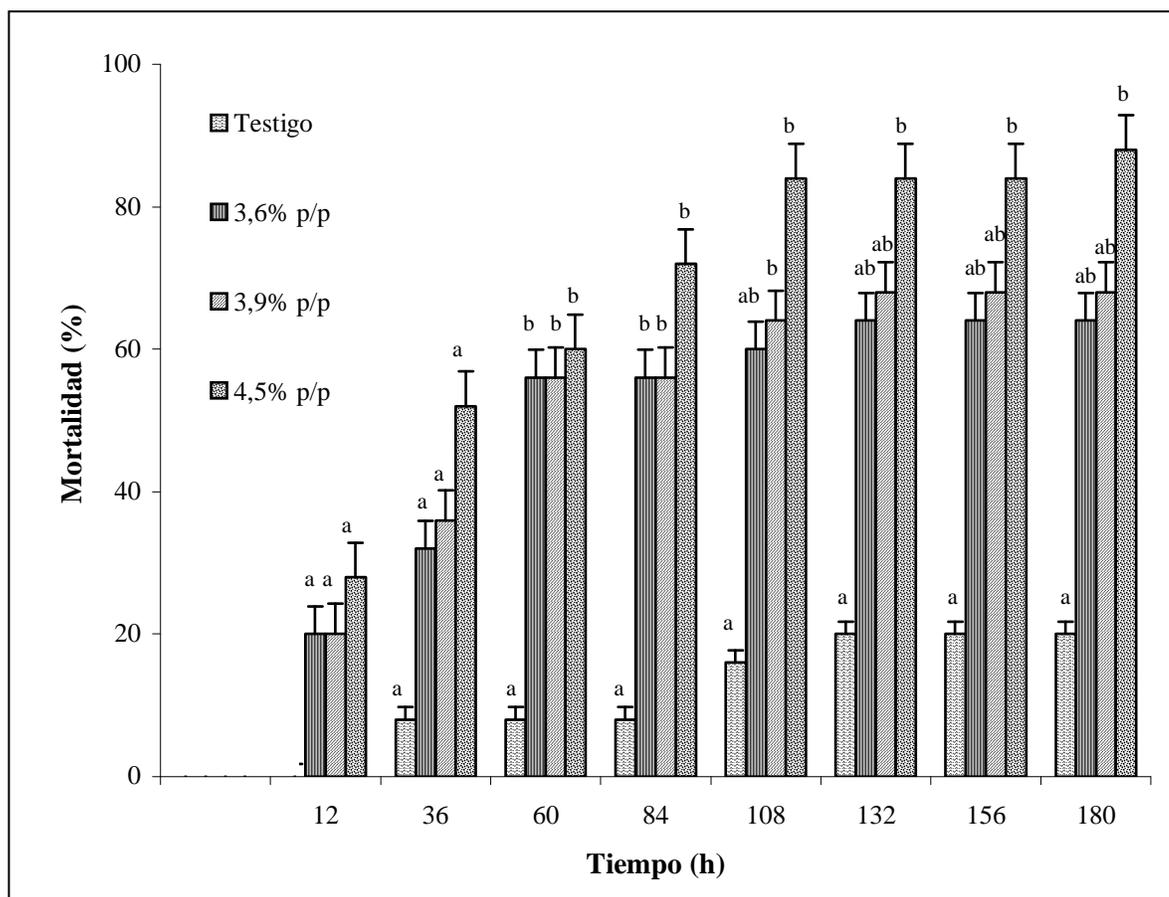


Figura 3. Mortalidad promedio de adultos de *X. luteola* en extractos acuosos en horas, por efecto de extractos desde hojas maduras de *P. boldus* en varias concentraciones. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

3.2.2 Extractos etanólicos de hojas de *P. boldus*

La mortalidad promedio de adultos de *X. luteola* por efecto de extractos etanólicos de hojas juveniles presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en comparación con los testigos (Apéndice 1), no así entre las concentraciones mayores (Cuadro 4).

Cuadro 4. Mortalidad promedio (%) \pm E.T. (error típico) de adultos de *X. luteola* por efectos de extractos etanólicos de hojas juveniles de *P. boldus* para varias concentraciones.

Testigo	Extractos (% p/p)					
	2,9	3,2	4,3	5,7	6,8	7,1
$10 \pm 4,1$ a	$48,9 \pm 15,7$ ab	$58,8 \pm 11,8$ ab	$72,2 \pm 11,8$ b	$78,9 \pm 10,6$ b	$82,3 \pm 8$ b	$87,8 \pm 7,2$ b

Medias con letras diferentes en forma horizontal difieren estadísticamente por la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$).

En la Figura 4 se presentan las observaciones periódicas de los bioensayos con extractos etanólicos de hojas juveniles de *P. boldus*, que indican una mortalidad más rápida que los extractos acuosos. El 100% de mortalidad se alcanzó con las mayores concentraciones evaluadas en 60 h (dos días y medio). Este menor tiempo de respuesta demuestra una mayor acción insecticida de la harina de boldo al ser mezclada con etanol como solvente.

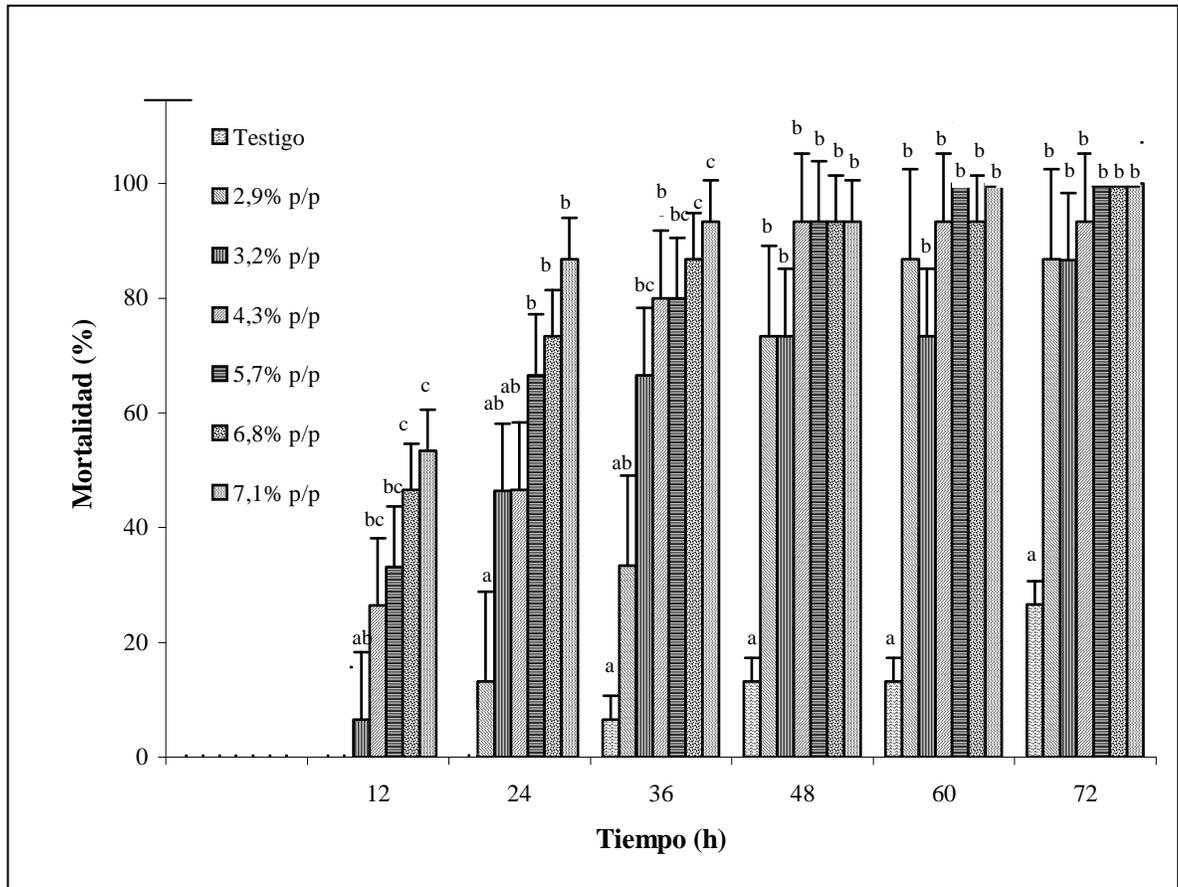


Figura 4. Mortalidad promedio de adultos de *X. luteola* en extractos etanólicos en horas, por efectos de extractos desde hojas juveniles de *P. boldus* en varias concentraciones. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente según la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$).

Al utilizar hojas maduras de *P. boldus* en la aplicación de tres concentraciones distintas sobre adultos de *X. luteola* se produjo una menor mortalidad promedio, al igual que al utilizarse agua como solvente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Mortalidad promedio (%) \pm E.T. (error típico) de adultos de *X. luteola* por efecto de varias concentraciones de extractos etanólicos de hojas maduras de *P. boldus*.

Extractos (% p/p)				
Testigo	4,3	5,7	6,8	
7,7 \pm 2 a	54,4 \pm 11,3 b	67,7 \pm 12 b	78,8 \pm 10,9 b	

Medias con letras diferentes en forma horizontal difieren estadísticamente por la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$).

El 100% de mortalidad se produjo con la concentración mayor (6,8%) a las 60 h. Los testigos presentaron una tasa de mortalidad significativamente menor en todas las observaciones (Figura 5).

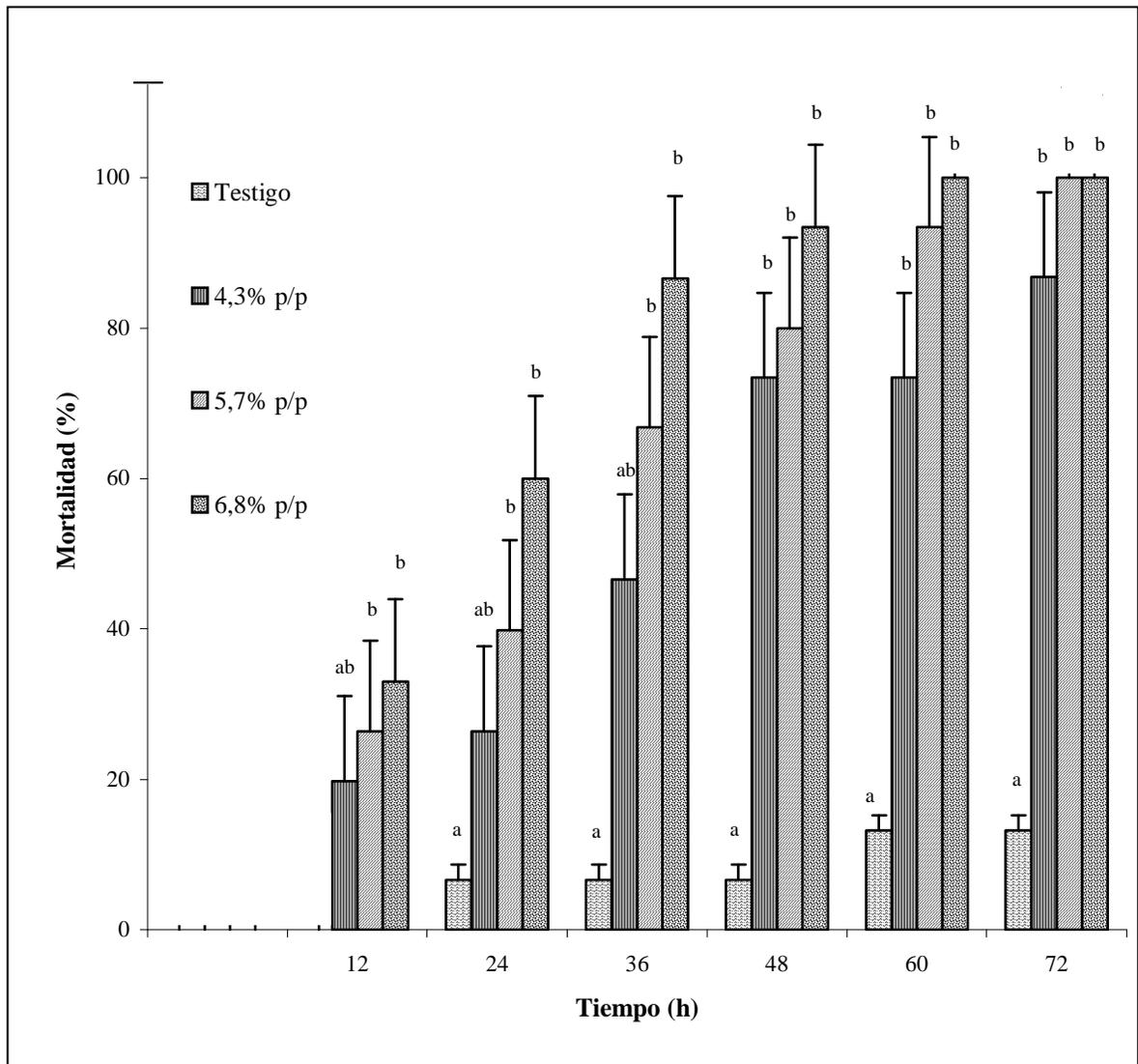


Figura 5. Mortalidad promedio de adultos de *X. luteola* en extractos etanólicos en horas, por efectos de extractos desde hojas maduras de *P. boldus* en varias concentraciones. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente por la prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$).

Para determinar la influencia del grado de madurez de las hojas de *P. boldus* se hizo una comparación entre el follaje juvenil y maduro, con ambos solventes, agua y etanol, en concentraciones 3,6; 3,9 y 4,5 % p/p (Cuadro 3), y 4,3; 5,7 y 6,8% p/p (Cuadro 5), respectivamente.

El análisis estadístico bifactorial para la comparación de estados de madurez no encontró diferencias significativas entre hojas juveniles y maduras, por lo tanto, este factor no determinó un menor o mayor grado de mortalidad en los adultos de *X. luteola*. Por el contrario, los efectos de las concentraciones sí afectaron la mortalidad del insecto en el análisis de los diferentes estados de madurez extraídos con agua. Sin embargo, al utilizar etanol y hacer una comparación entre follaje maduro y juvenil, ambos factores no obtuvieron diferencias significativas (Apéndice 2).

La efectividad de los extractos tuvo una relación directamente proporcional con la concentración suministrada en los bioensayos, independientemente del estado de madurez de las hojas y del solvente utilizado.

El efecto causado por la concentración del extracto se explica por la toxicidad de los componentes de las hojas de boldo que causan daño a los insectos al ingerirlo, pero además a la acción antialimentaria, que se manifestó en una reducción del área foliar devorada y al alejamiento de los insectos de las hojas de olmo tratadas, comportamientos que marcaron diferencia con los testigos.

3.2.3 Determinación de la CL_{50}

Según el análisis Probit, la CL_{50} al segundo día de evaluación fue inferior en los extractos de hojas juveniles que en los de follaje maduro de *P. boldus*, lo que indica una mayor efectividad en el material vegetal inmaduro, por el hecho de requerir una menor dosis de extracto para causar la misma mortalidad (50%) de los individuos.

Con respecto a los solventes utilizados, en ambos estados de madurez etanol tuvo una menor CL_{50} , 1,2 y 2,3% con hojas juveniles y maduras, respectivamente, lo que significa que estos extractos fueron más efectivos para causar mortalidad en los adultos de *X. luteola* (Cuadro 6).

Cuadro 6. CL_{50} de los adultos de *X. luteola* ante extractos de hojas juveniles y maduras de *P. boldus* al segundo día de aplicación, según prueba de Probit.

Tipo de hojas	Extracto	Pendiente \pm DE	CL_{50} (% p/p)	X^2
Juveniles	Agua	82,84 \pm 7,6	3,7	9,90
	Etanol	24,11 \pm 4,54	1,2	0,92
Maduras	Agua	77,3 \pm 17,8	4,0	0,69
	Etanol	42,5 \pm 8,5	2,3	0,38

El estimador X^2 calculado fue menor al valor tabulado, por lo cual el modelo Probit se ajustó a los resultados experimentales.

La mortalidad de *X. luteola* causada por las concentraciones evaluadas con los solventes agua y etanol se presentan en la Figura 6, donde se confirma la efectividad de los extractos en las concentraciones mayores, y el efecto permanentemente mayor de los extractos con etanol en comparación con aquellos obtenidos con agua.

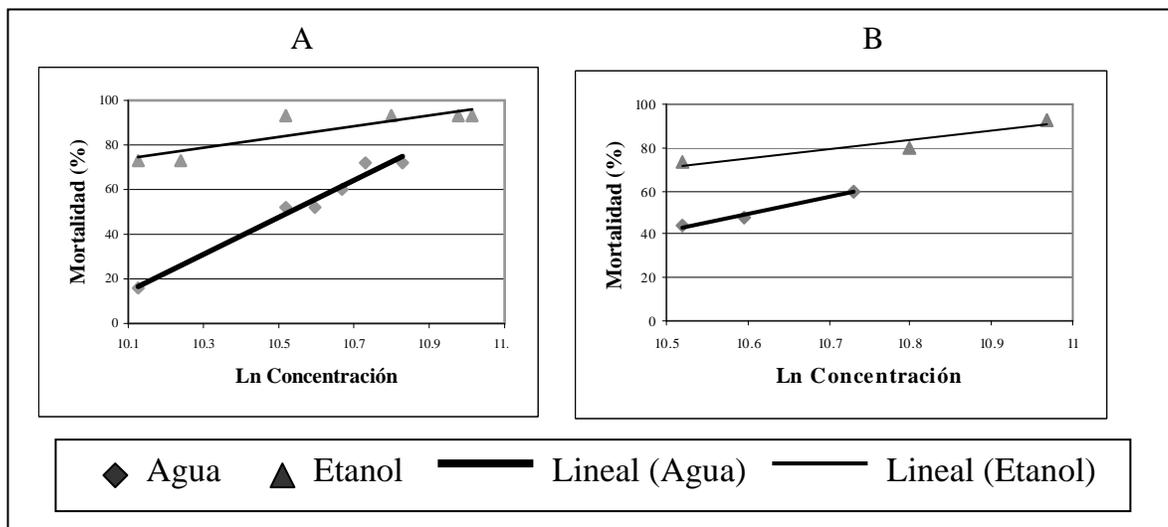


Figura 6. Representación gráfica del análisis Probit de la mortalidad de *X. luteola* tras la aplicación de varias concentraciones de extractos desde hojas juveniles (A) y maduras (B) de *P. boldus* obtenidos con agua y etanol.

3.3. Duración de los estados de pupa y adulto de *X. luteola* en laboratorio.

De las 7 cohortes de *X. luteola* se determinó que la duración promedio de las pupas fue de 7 d y la de los adultos de 21 d, bajo condiciones de laboratorio (Cuadro 7).

Cuadro 7. Duración (días) de estados de desarrollo de pupas y adultos de *X. luteola* en laboratorio.

Cohortes	Duración (d)	
	Pupas	Adultos
C1	7	23
C2	6	22
C3	7	23
C4	8	22
C5	7	17
C6	7	16
C7	8	21
Promedios	7	21

4. DISCUSIÓN

4.1. Caracterización física y química de las hojas de *P. boldus*.

Al igual que en el estudio de Chiffelle *et al.* (2009) con hojas de *Melia azedarach* Linnaeus, el contenido de humedad en las hojas juveniles de *P. boldus* fue mayor que en las hojas maduras.

Los niveles de cenizas y fibra cruda presentaron diferencias entre los estados de madurez del follaje de boldo, al contrario de lo sucedido con *M. azedarach* en el estudio de Chiffelle *et al.* (2009). La proporción de cenizas obtenida en este trabajo con *P. boldus* fue similar en ambos estudios. Sin embargo, en *P. boldus* el porcentaje de cenizas fue mayor en las hojas maduras, mientras que en *M. azedarach* los niveles mayores se obtuvieron de las hojas juveniles.

El porcentaje de lípidos en hojas de boldo no arrojó diferencias significativas entre los diferentes estados de madurez. No ocurrió lo mismo en *M. azedarach* (Chiffelle *et al.*, 2009), donde la diferencia entre follaje juvenil y maduro alcanzó el 60%, con un nivel de 1,08% para el último estado mencionado.

4.2. Propiedades insecticidas de los extractos

El efecto obtenido a partir de los tratamientos evaluados se puede considerar prometedor con ambos solventes. Los resultados dejan de manifiesto que la acción insecticida causada por la harina de boldo es significativa y se verifica al observar la baja mortalidad en los testigos.

Al comienzo se privilegió el uso de hojas juveniles y preferentemente con exposición al sol, debido al efecto que causaría este tipo de material vegetal por encontrarse en la edad y parte de la planta donde se localiza la mayor concentración de compuestos activos (Gross *et al.*, 1985). Sin embargo, una vez incluido el follaje maduro en el estudio y al compararlo con los extractos elaborados con hojas juveniles, no se encontraron diferencias significativas, aunque al analizar las evaluaciones en ambos casos se puede observar una tendencia de mayor mortalidad al utilizar hojas jóvenes, pero sin sustento estadístico.

P. boldus fue una de las cinco plantas promisorias entre los 14 extractos (desde 13 plantas) evaluados por Silva *et al.* (2003a), por causar una mortalidad superior al 40% en una concentración del 1% p/p. Al igual que en el presente estudio, la mortalidad alcanzada por extractos de boldo fue cercana al 100%, aunque la concentración evaluada fue allí menor. Posteriormente, Silva *et al.* (2003a) evaluaron la harina de boldo en mezcla con carbonato de calcio, pero a diferencia de otras plantas evaluadas, el efecto no mejoró, ocurriendo sino todo lo contrario, probablemente por su incompatibilidad o porque sus componentes no permitieron una mezcla homogénea. Por lo tanto, el presente trabajo corrobora la eficiencia del uso del polvo de boldo (sin mezclarse con el mineral inerte).

Tras una evaluación de 23 plantas en polvo para el control de *Sitophilus zeamais*, Silva *et al.* (2005) concluyeron que las harinas con mejores resultados de mortalidad se obtuvieron con *Chenopodium ambrosioides* L. y *P. boldus*, con 65,8 y 99,3%, respectivamente, a una

concentración de 1% p/p. La eficacia alcanzada con la harina evaluada en individuos de *X. luteola* tuvo buenos resultados con ambos solventes utilizados, agua y etanol, en dosis superiores a 2% p/p. La diferencia entre los bioensayos evaluados y los citados radica en la forma de aplicación de la harina de boldo. En los primeros, el polvo del material vegetal se mezcló con los solventes agua y etanol, quedando un extracto líquido, mientras que para los citados, la harina de boldo se aplicó directamente, en estado sólido, para controlar la plaga indicada.

La mortalidad promedio obtenida con la harina de *P. boldus* a base de follaje nuevo y solvente acuoso fue superior al 50% a partir del extracto de 3,6% p/p de concentración. El extracto de menor concentración (2,5% p/p) no obtuvo diferencias significativas con el testigo, por lo que se le considera insuficiente para este tipo de aplicación. Al utilizar etanol como solvente se encontró una igualdad estadística entre los diversos tratamientos evaluados; sin embargo, hubo diferencias significativas entre las mortalidades de los bioensayos suministrados con las distintas concentraciones del sustrato y el testigo solo con aplicación de solvente.

Las mortalidades en el actual trabajo fueron proporcionales al aumento de la concentración aplicada en los bioensayos, que en la harina disuelta en agua alcanzó una mortalidad del 100% el día 8 en el extracto más concentrado (5,0% p/p). Con etanol, el efecto de máxima mortalidad también se alcanzó en los extractos con las concentraciones mayores, pero a las 60 h, es decir, al tercer día de evaluación. Los extractos elaborados con etanol obtuvieron efectos de mortalidad en un menor período de tiempo, probablemente por la mayor solubilidad que tienen los componentes orgánicos en etanol, solvente de menor polaridad que el agua (Weast *et al.*, 1965).

Para Pérez *et al.* (2007), la concentración constituyó un factor limitante puesto que sólo aquella correspondiente a 2% p/p de extractos de *P. boldus*, la mayor evaluada en su estudio, obtuvo, durante todo el período de evaluación, una toxicidad >90% de los individuos de *S. zeamais*, lo que concuerda con los presentes resultados en bioensayos con *X. luteola* y dos solventes, ya que las mayores concentraciones causaron siempre una mayor mortalidad, que bordeó el 80%. La mayoría de las dosis evaluadas alcanzaron mortalidades promedio superiores al 50%, excepto sólo las concentraciones de 2,5 y 2,9% p/p diluidas en agua y etanol, con mortalidades promedio de 30,67 y 48,93%, respectivamente, diferente significativamente del testigo en el segundo caso.

El poder insecticida de *P. boldus* logró 100% de mortalidad de *S. zeamais* en las concentraciones de 1 y 2% p/p en el estudio de Silva *et al.* (2006), quienes además de utilizar material vegetal, incluyeron la aplicación de polvo inerte y cal, en sus bioensayos. Los tratamientos de 0,1, 1 y 2% p/p se aplicaron en distintas proporciones de boldo y cal, y también se evaluó cada ingrediente por sí solo. Únicamente los dos últimos tratamientos alcanzaron mortalidades superiores al 50%, en todas sus combinaciones, en contraste con la concentración de 0,1%, en la que ningún tratamiento superó ese nivel de mortalidad. Esto coincide con los resultados de la aplicación de extractos en *X. luteola*, debido a que las menores concentraciones, de 2,5 y 2,9% p/p, en agua y etanol respectivamente, no superaron el 50% de mortalidad, mientras que los tratamientos restantes sí lo hicieron.

El efecto antialimentario de hojas de *P. boldus*, *Maytenus boaria* Molina y corteza de *Quillaja saponaria* Molina fueron evaluados por Zapata *et al.* (2006) sobre *Spodoptera littoralis*, sobre la que causaron una pérdida de peso significativo en larvas neonatas luego de 15 días (d) de tratamiento. Las larvas del control pesaron más de 600 mg, mientras que las tratadas con diferentes plantas no superaron los 16 mg. El poder antialimentario de *P. boldus* también se desprende de las observaciones efectuadas durante las aplicaciones de extractos acuosos y etanólicos de follaje de boldo, de una menor área foliar ingerida por los adultos de *X. luteola*, al compararla con las hojas de olmo que alimentaban a los testigos; además de la distribución espacial que adoptaron los individuos en el follaje de olmo impregnado con el material insecticida elaborado, cada vez más distante a medida que pasaban los días de bioensayo.

Al añadir a la dieta de *S. littoralis* las especies vegetales al 4% p/p, la mortalidad larvaria a los 24 d de tratamiento superó el 80% y a los 40 d las tres especies vegetales aplicadas en la dieta causaron la muerte de todos los individuos (Zapata *et al.*, 2006). Las evaluaciones sobre adultos de *X. luteola* con extractos acuosos de boldo en una concentración muy cercana a la anterior (3,9% p/p) arrojaron resultados cercanos al 80% de mortalidad a las 180 h, es decir, el día 8.

La CL₅₀ en los extractos acuosos desde hojas juveniles y maduras de boldo fue 3,7 y 4,0% p/p, respectivamente, al segundo día de evaluación. En este mismo periodo de tiempo las concentraciones evaluadas con follaje juvenil y maduro, en mezcla con etanol, obtuvieron CL₅₀ de 1,2 y 2,3% p/p, respectivamente. Los resultados entregados por el análisis de Silva *et al.* (2003b) estimaron una CL₅₀ de 7,4 g kg⁻¹, cercana al 8% p/p en 15 d. Ante este escenario, las concentraciones obtenidas en el presente estudio para alcanzar las CL₅₀ de *X. luteola* fueron significativamente menores que en el estudio citado, un resultado óptimo y promisorio.

Debido al efecto insecticida de *P. boldus*, así como por su efecto antialimentario, además de ser una especie nativa con uso potencial, será interesante seguir con esta línea de investigación, profundizando la posible utilización de compuestos derivados de la biomasa de este vegetal en el manejo integrado de ésta y otras plagas.

4.3. Duración de los estados de pupa y adulto de *X. luteola* en laboratorio.

La duración del estado de desarrollo de la pupa (7 d) fue similar al período de tiempo determinado por Folcia *et al.* (2005), quienes obtuvieron un promedio de 7,29 d. Sin embargo, este período es levemente menor a los 10 d de duración del estado pupal, según lo registrado por De Liñán (1998) y Romanik y Cadahia (2002).

En su estudio sobre el desarrollo de los estados juveniles inmaduros de *X. luteola* a diferentes temperaturas, King *et al.* (1985) encontraron una duración de 6,4 d para la fase pupal, dentro de un intervalo de 22 a 29°C. Estas diferencias con los actuales resultados pueden explicarse porque el rango de temperaturas utilizado aquí fue levemente inferior (18 a 25°C), lo que alargó su desarrollo.

La vida del adulto duró considerablemente menos (21 d) que los 26,29 d registrados por Folcia *et al.* (2005) (26,29 d). Sin embargo, al comparar el tiempo de desarrollo del adulto

de *X. luteola* encontrado por Hall (1986), de 16,7 d, se observa un tiempo menor al obtenido en este estudio, por lo que es posible concluir que el período de vida del estado adulto de este insecto es muy variable en relación a la temperatura.

5. CONCLUSIONES

- Los extractos de hojas de *P. boldus* son efectivos para el control de individuos adultos de *X. luteola* en laboratorio, superando el 50% de mortalidad promedio en concentraciones iguales o superiores a 3,6% en agua y 3,2% en etanol, respectivamente.
- Los extractos elaborados con etanol tienen un menor tiempo de respuesta en la mortalidad de *X. luteola*, la que alcanzó el 100% a las 60 h en dos de las concentraciones mayores (5,7 y 7,1%).
- La mortalidad de *X. luteola* en los extractos en agua son mayores en sus distintas concentraciones al utilizar hojas juveniles; sin embargo, estadísticamente no se refleja diferencia estadística entre los estados de madurez de las hojas.
- En los parámetros determinados en el análisis proximal existe diferencia significativa entre los estados de madurez de las hojas, excepto en el contenido de aceite.
- Las hojas maduras de boldo presentan un mejor rendimiento que el follaje juvenil, fundamentalmente por su menor contenido de humedad, factor que debe considerarse en la elaboración de extractos con acción insecticida.
- La CL_{50} alcanzada en extractos elaborados con hojas juveniles es menor a la determinada con follaje maduro. Además, en ambos estados de madurez, en los extractos con etanol como solvente se obtiene una concentración menor para causar este nivel de mortalidad.
- La crianza de los individuos de *X. luteola* se hizo con éxito en condiciones de laboratorio y la duración de sus estados de pupa y adulto no tiene grandes diferencias con la información encontrada en la literatura.
- El uso de *P. boldus* como insecticida vegetal, además de su utilización actual, indica que esta es una planta prometedora y una alternativa para productores de pequeña y mediana escala, y potencia también el uso del bosque nativo.
- En próximos estudios se recomienda hacer pruebas de campo y verificar el efecto encontrado en laboratorio.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1984. Official methods on analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14th Ed. Virginia, US. 1.141 p.
- CHIFFELLE I., HUERTA A. and LIZANA D. 2009. Physical and chemical characterization of *Melia azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insecticide. Chilean Journal of Agricultural Research 69(1): 38-45.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal). 1998. Corporación Nacional Forestal: Experiencias silviculturales del bosque nativo de Chile. GTZ CONAF. Publicaciones Lo Castillo S.A., Santiago, Chile. 420 p.
- DE LIÑÁN C. 1998. Entomología Agroforestal. Ediciones Aerotécnicas. Madrid, España. 1.309 p.
- FOLCIA A., MICHETTI M. y PELICANO A. 2005. Aspectos biológicos y preferencia alimentaria de la vaquita del olmo *Xanthogaleruca luteola* (Müller) (Coleoptera: Chrysomelidae). IDESIA (Chile) 23(3): 7-12.
- GAJARDO R. 1994. La vegetación natural de Chile. Editorial Universitaria, Santiago. 165 p.
- GROSS E., POMILIO A., SELDES A. y BURTON G. 1985. Introducción al estudio de productos naturales. Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C., EE.UU. 146 p.
- HALL R. 1986. Preference for and suitability of elm for adult elm leaf beetle (*Xanthogaleruca luteola*). Environmental Entomology 15(1): 143-146.
- HOFFMANN A., FARGA C., LASTRA J. y VEGHAZI E. 2003. Plantas medicinales de uso común en Chile. Tercera edición. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 275 p.
- INFOSTAT. 2009. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- JACKSON D. y JACKSON T. 2008. Establecimiento del escarabajo de la hoja del olmo, *Xanthogaleruca luteola* (Müller) (Coleoptera: Chrysomelidae), en Chile. Acta Entomológica Chilena 32(1-2): 27-34.
- KING J., PRICE R., YOUNG J., WILLSON L. and PINKSTON K. 1985. Influence of temperature on development and survival of the immature stages of the elm leaf beetle, *Pyrrhalta luteola* (Müller) (Coleoptera: Chrysomelidae). Environmental Entomology 14(3): 272-274.

- PASCUAL M. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigación. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid. 35 p.
- PÉREZ F., SILVA G., TAPIA M. y HEPP R. 2007. Variación anual de las propiedades insecticidas de *Peumus boldus* sobre *Sitophilus zeamais*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 42(5): 633-639.
- MUÑOZ C., PÉREZ V., COBOS P., HERNÁNDEZ R. y SÁNCHEZ P. 2003. Sanidad Forestal. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 575 p.
- ROBERTSON J.L., SMITH K.C., SAVIN N.E. and LAVIGNE R.J. 1984. Effects of dose selection and sample size on the precision of lethal dose estimates in dose-mortality regression. Journal of Economic Entomology 77(4):833-837.
- RODRIGUEZ C. 2000. Plantas contra plagas; potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco. RAPAM. Texcoco, Edo. de México, México. 133 p.
- ROMANIK N. y CADAHIA D. 2002. Plagas de insectos en las masas forestales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 336 p.
- SAG (SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO). 2005. Informativo Fitosanitario Forestal N°2. Año 1.
- SAIZ J. y PRIETO A. 2004. Arboricultura y gestión del arbolado urbano. Editorial Cedex. Madrid. 320 p.
- SILVA G. y HEPP R. 2003. Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción. Chillán, Chile. 307 p.
- SILVA G., HEPP R., TAPIA M., CASALS P., BUSTOS G. y OSSES F. 2006. Evaluación de boldo (*Peumus boldus* Molina) y cal para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky. Agrociencia México 40(2): 219-228.
- SILVA G., LAGUNES A., RODRÍGUEZ J.C., y RODRÍGUEZ D. 2001. Insecticidas vegetales: una vieja-nueva alternativa en el control de plagas. Manejo Integrado de Plagas (CATIE) Costa Rica 66(2): 4-12.
- SILVA G., LAGUNES A., y RODRÍGUEZ J. 2003a. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. Ciencia e Investigación Agraria 30(3): 153-160
- SILVA G., ODETTE O., HEPP R. y TAPIA M. 2005. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 40(1): 11-17.

SILVA G., PIZARRO D., CASALS P. y BERTI M. 2003b. Evaluación de plantas medicinales en polvo para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky en maíz almacenado. Revista Brasileira de Agrociência 9(4): 383-388.

VAN GINKEL A. 1999. Boldo. Fitomédica 21: 64-75.

VOGEL H., RAZMILIC I. y DOLL U. 1997. Contenido de aceite esencial y alcaloides en diferentes poblaciones de boldo (*Peumus boldus* Mol.). Ciencia e Investigación Agraria 24(1): 1-6.

VOGEL H., RAZMILIC I., SAN MARTÍN J., DOLL U. y GONZÁLEZ B. 2005. Plantas medicinales chilenas: experiencias de domesticación y cultivo de boldo, matico, bailahuén, canelo, peumo y maqui. Editorial Universidad de Talca, Talca, Chile. 192 p.

WEAST R., SELBY S. and HODGMAN C. 1965. Handbook of chemistry and physics: a ready reference book of chemical and physical data. Forty sixth edition. Cleveland, Ohio. 1856 p.

ZAPATA N., BUDIA F., SILVA G., VIÑUELA E. y MEDINA P. 2006. Actividad antialimentaria de *Maytenus boaria* Mol., *Peumus boldus* Mol. y *Quillaja saponaria* Mol. sobre *Spodoptera littoralis* (Boisd). Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas 32(1): 125-135.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Análisis Estadístico 1

Modelo de efectos fijos entre el solvente agua y su correspondiente testigo (hojas juveniles).

	Extractos (% p/p)						
	Testigo	2,5	3,6	3,9	4,2	4,5	5,0
	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6
Mortalidad promedio (%)	20,9747	33,4223	49,7670	50,4355	56,8858	65,3818	64,8948

FV	gl	SC	CM	Razón F	Razón f tabla
Tratamientos	6	24.205,46	4.034,24	53,38	2,19
Error	98	7.495,47	75,57		
Total	104	31.611,39		F0>Fc	

gl: grados de libertad

SC: suma de cuadrados

CM: cuadrados medios

Comparación de Tukey-Kramer

Tratamientos	Resultados
t0	a
t1	b
t2	c
t3	c
t4	cd
t5	d
t6	d

Tratamientos con igual letra en la columna, no difieren estadísticamente según el test de Tukey ($\alpha=0,05$).

Modelo de efectos fijos entre el solvente etanol y su correspondiente testigo (hojas juveniles).

	Extractos (% p/p)						
	Testigo	2,9	3,2	4,3	5,7	6,8	7,1
	t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6
Mortalidad promedio (%)	14,7571	42,1588	49,8529	60,4573	68,0711	68,4876	74,3121

FV	gl	SC	CM	Razón F	Razón f tabla
Tratamientos	6	15.357,49	2.559,58	6,77	2,37
Error	35	13.235,57	378,16		
Total	41	28.593,06		F0>Fc	

gl: grados de libertad
 SC: suma de cuadrados
 CM: cuadrados medios

Comparación de Tukey-Kramer

Tratamientos	Resultados
t0	a
t1	ab
t2	ab
t3	b
t4	b
t5	b
t6	b

Tratamientos con igual letra en la columna no difieren estadísticamente según test de Tukey ($\alpha=0,05$).

Modelo de efectos fijos entre el solvente agua y su correspondiente testigo (hojas maduras).

	Extractos (% p/p)			
	Testigo	3,6	3,9	4,5
	t0	t1	t2	t3
Mortalidad promedio (%)	19,8164	46,3464	48,1014	57,3281

FV	gl	SC	CM	Razón F	Razón f tabla
Tratamientos	3	11.699,32	3.899,77	41,69	2,77
Error	56	5.238,65	93,55		
Total	59	16.937,97		F0>Fc	

gl: grados de libertad
 SC: suma de cuadrados
 CM: cuadrados medios

Comparación de Tukey-Kramer

Tratamientos	Resultados
t0	a
t1	b
t2	bc
t3	c

Tratamientos con igual letra en la columna no difieren estadísticamente según test de Tukey ($\alpha= 0,05$).

Modelo de efectos fijos entre el solvente etanol y su correspondiente testigo (hojas maduras).

	Extractos (% p/p)			
	Testigo	4,3	5,7	6,8
	t0	t1	t2	t3
Mortalidad promedio (%)	14,5446	47,8557	58,8996	68,2451

FV	gl	SC	CM	Razón F	Razón f tabla
Tratamientos	3	9.878,66	3.292,89	9,99	3,10
Error	20	6.589,30	329,47		
Total	23	16.467,96		F0>Fc	

gl: grados de libertad
 SC: suma de cuadrados
 CM: cuadrados medios

Comparación de Tukey-Kramer

Tratamientos	Resultados
t0	a
t1	b
t2	b
t3	b

Tratamientos con igual letra en la columna no difieren estadísticamente según test de Tukey ($\alpha=0,05$).

APÉNDICE 2

Análisis Estadístico 2

Análisis estadístico con diseño bifactorial entre concentraciones y estado de madurez para extractos con solvente agua.

Estado de madurez	Extractos (% p/p)		
	3,6	3,9	4,5
	t1	t2	t3
Agua, hojas jóvenes	49,8378	50,5626	66,0435
Agua, hojas adultas	46,7330	48,7734	57,7157

FV	gl	SC	CM	F0	Fc
Tratamientos	-	1.854,92			
Concentraciones	2	1.567,24	783,62	10,47	3,2594
Estado de madurez	1	203,95	203,95	2,72	4,1132
Ambos	2	83,72	41,86	0,56	3,2594
Error	36	2.695,45	74,87		
Total	41	4.550,38			

gl: grados de libertad

SC: suma de cuadrados

CM: cuadrados medios

Comparación de Tukey-Kramer

Tratamientos	Resultados
t1	a
t2	a
t3	b

Tratamientos con igual letra en la columna no difieren estadísticamente según test de Tukey ($\alpha=0,05$).

Análisis estadístico con diseño bifactorial entre concentraciones y estado de madurez para extractos con solvente etanol.

Estado de madurez	Extractos (% p/p)		
	4,3	5,7	6,8
	t1	t2	t3
Agua, hojas jóvenes	60,4573	68,0711	68,4876
Agua, hojas adultas	47,8557	58,8996	68,2451

FV	gl	SC	CM	F0	Fc
Tratamientos	-	1.980,02	625,55		
Concentraciones	2	1.251,09	484,69	1,6	3,31
Estado de madurez	1	484,69	122,12	1,24	4,17
Ambos	2	244,24	389,90	0,31	3,31
Error	30	11.696,85			
Total	35	13.676,88			

gl: grados de libertad
 SC: suma de cuadrados
 CM: cuadrados medios

Comparación de Tukey-Kramer

Tratamientos	Resultados
t1	a
t2	a
t3	a

Tratamientos con igual letra en la columna no difieren estadísticamente según test de Tukey ($\alpha=0,05$).