

Actividad insecticida del aceite esencial de *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.) Epling en *Drosophila melanogaster*

Insecticidal activity of essential oil of *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.) Epling in *Drosophila melanogaster*

GONZALO SUAZO F.¹, FIDELINA GONZÁLEZ M.^{2*}, ANGÉLICA URBINA P.¹, EDGAR PASTENE N.³, KATIA SÁEZ C.⁴, HUMBERTO SERRI G.¹ & RUTH CHÁVEZ E.²

¹Departamento de Producción Vegetal, Universidad de Concepción, Casilla 575, Chillán, Chile.

²Departamento de Biología Celular, ³Departamento de Farmacia, ⁴Departamento de Estadística, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

*fgonzale@udec.cl

RESUMEN

Se evaluó el efecto insecticida de tres extractos de la planta endémica de Chile, *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.) Epling (extracto polar, exudado resinoso y aceite esencial), sobre larvas del díptero *Drosophila melanogaster* Meigen con el fin de determinar cuál o cuáles de éstos poseen actividad biológica insecticida. El bioensayo se realizó sobre la base de un diseño experimental completamente aleatorio, con 15 tratamientos y tres repeticiones, que contempló el estudio de variables de mortalidad y de concentración letal 50 % (CL₅₀) y 90 % (CL₉₀), y observación de organismos mediante lupa, microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión. Se registró una mortalidad mayor al 90 % en cuatro concentraciones evaluadas del aceite esencial. En el caso de extracto polar y exudado resinoso no hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones evaluadas, respecto al control, presentándose valores de mortalidad inferiores a un 23 %. La concentración letal 50% (CL₅₀) del aceite esencial fue de 0,46 % v/v y la concentración letal 90% (CL₉₀) de 0,77 % v/v. Se observaron cambios en la morfología externa e interna de las larvas en el tercer estado. Externamente, se observó oscurecimiento de la cutícula y un aumento de volumen del organismo. Internamente, se observó una fragmentación de las glándulas salivales además de diferencias en los tubos de Malpighi y discos imaginales en relación al grupo control. A nivel celular, también se presentaron cambios, entre ellos, variaciones en aspecto de organelos como en retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y aparato de Golgi.

PALABRAS CLAVE: Efecto insecticida, bioensayo, plantas nativas, aceite esencial.

SUMMARY

With the aim to assess its biological activity, three extracts of a Chilean endemic plant, *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.) Epling (polar extract, resinous exudate and essential oil) were evaluated for its insecticidal activity on Diptera larvae, *Drosophila melanogaster* Meigen. The bioassay was conducted on the basis of a completely randomized experimental design with 15 treatments and three repetitions, which includes the study of mortality variables and 50% lethal concentration (LC₅₀) and 90 % (LC₉₀), in addition to the observation of organisms through a magnifying glass, optical microscopy and transmission electronic microscopy. Mortality was recorded over than 90 % in four tested concentrations of essential oil. In the case of polar extract and resinous exudate no significant differences between the different concentrations tested and controls, with mortality values lower than 23 %. The lethal concentration 50% (LC₅₀) of essential oil was 0,46 % v/v and the lethal concentration 90% (LC₉₀) of 0,77 % v/v. There were changes in the external and internal morphology of the third stage larvae. Externally, there was darkening of the cuticle and a volume increase of the body. Internally, there was a fragmentation of the salivary glands as well as differences in the Malpighian tubes and imaginal discs in relation to control group. At the cellular level, there were also changes, including changes in organelles like in rough endoplasmic reticulum, mitochondria and Golgi apparatus.

KEYWORDS: Insecticidal effect, bioassay, native flora, essential oil.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han evolucionado en conjunto con los insectos, por ello, han desarrollado una gran variedad de mecanismos de defensa que pueden ser de tipo físico o químico, gracias a los cuales adquieren una serie de ventajas adaptativas (Boulter 1993). Entre los mecanismos químicos de protección se encuentra la acción insecticida o repelente, lo que ha permitido al hombre el desarrollo de herramientas en el combate de plagas, descubriendo que los aceites, cenizas, desechos de extracción, extractos, humos, jugos, polvos y resinas de algunas de ellas le ayudaban a proteger sus cultivos (Rodríguez *et al.* 2003). El interés por compuestos naturales se genera a raíz de que algunos poseen características, como selectividad y bajo nivel de daño a enemigos naturales y/ o a otros insectos que benefician a las plantas y cultivos, no causan perjuicios al medioambiente y tienen una mayor capacidad de degradación (Pascual-Villalobos 1996).

El género *Lepechinia* Willd. está compuesto por cerca de 55 especies distribuidas en zonas templadas del mundo (The Plant List 2010). En Chile existen tres especies endémicas, *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.) Epling, *L. salviae* (Lindl.) Epling y *L. subhastata* (Benth.) Epling (Zuloaga *et al.* 2008). *Lepechinia chamaedryoides* (Balb.) Epling también conocida como “alhuélahuén” o “salvia macho” pertenece a la familia Lamiaceae. Es un arbusto endémico de Chile, erecto, ramoso, hojoso, de hasta 2 m de alto por 1,80 m de diámetro, ramas ascendentes, glabras, con la corteza separada del tallo. Flores reunidas en panículas hojosas de 2 a 3 por ramilla, tubulares, de alrededor de 2 cm de largo, de color celeste-grisáceo. Cáliz campanulado. Frutos, una núcula obovada, de 3 mm de largo, oscura, lisa. Semillas negras (Hoffmann 1998, Peña *et al.* 2000, Montenegro 2000). Crece en cerros asoleados de la zona costera desde la Región de Coquimbo hasta la Región de los Lagos (Chile), en suelos pedregosos, con buen drenaje, pero con algo de humedad.

Popularmente, la planta se emplea por sus propiedades emenagogas y antiinflamatorias como infusión. Se han descrito usos en la medicina popular que hoy pueden ser interpretados como acciones antibacterianas y antituberculosas (Nicolas & Castro 2006). Paralelamente se llevan a cabo algunas evaluaciones para medir capacidad antioxidante inespecífica de los extractos globales y componentes fijos mayoritarios. Las implicancias de estos hallazgos confirman prematuramente el uso popular de la planta y su posible empleo como recurso explotable para obtener componentes volátiles de interés y sustancias fijas con actividad antirradicalaria. En extractos de sus hojas, esta planta posee varios diterpenos, dentro de los cuales destaca el alto contenido de horminona (2,1 %, en base seca) (Pastene *et al.* 2005). Este compuesto corresponde a una diterpenquinona emparentada con el núcleo del abietano, que a su vez está relacionado con la oxitetraciclina

(Nelson *et al.* 1994, Martínez-Vázquez *et al.* 1998), un antibiótico bacteriostático de amplio espectro, conocido por su eficacia contra bacterias Gram positivas y negativas como *Staphylococcus epidermidis* (Winslow & Winslow 1908) Evans 1916, entre otras bacterias (Ulubelen *et al.* 2001). Ese tipo de compuesto terpénico también se comporta como inhibidor del crecimiento del parásito *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), causante de la enfermedad de Chagas (Goijman *et al.* 1985). Respecto al mecanismo de acción, cabe señalar que al igual que las tetraciclinas, pueden formar complejos con el magnesio y posteriormente inhibir la síntesis proteica bacteriana al unirse al ribosoma (Ohyama & Cowan 1995). Así, se ha demostrado que la horminona puede formar un complejo con $[Mg(H_2O)_4]^{2+}$, el cual puede atravesar la membrana celular. Una vez dentro en el citoplasma, el complejo $[horminona-(O_a-O_d)-Mg-(H_2O)_2]^{2+}$ es capaz de inhibir las etapas iniciales de la síntesis de proteína bacteriana (Nicolas *et al.* 2003, Nicolas & Castro 2006).

Areche *et al.* (2009) en ejemplares de *L. chamaedryoides* recolectados en Talca (Región del Maule, Chile) en épocas de fin de verano, encontraron efectos gastroprotectores y actividad antiproliferativa sobre células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) y fibroblastos de pulmón (MRC-5), propiedades que fueron atribuidas a los diterpenos abietanos obtenidos de extractos totales de esta misma planta.

Las pérdidas ocasionadas por insectos a la agricultura y ganadería han llamado la atención de científicos, los que han canalizado sus esfuerzos para atenuarlos y llevarlos a niveles aceptables. Con este objetivo, diversos métodos de origen cultural, físico, mecánico, biológico y principalmente químico, a través del uso de insecticidas, ofrecen soluciones rápidas y de emergencia para combatir plagas que afectan al hombre, en los cultivos por ejemplo. Sin embargo, el considerar sólo a los insecticidas como el único factor para controlar los insectos, tiene una serie de consecuencias (Metcalf & Luckmann 1992) como selección de resistencia en las poblaciones de plagas, destrucción de especies benéficas, resurgimiento de las poblaciones tratadas, aparición de plagas secundarias, residuos en los forrajes, alimentos, ambiente y riesgo en la salud humana (Metcalf & Luckmann 1992, Coscolla 1993, Carrero 1996).

Por lo expuesto anteriormente, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la posible actividad insecticida de tres extractos de *L. chamaedryoides* en insectos (larvas “mosca de la fruta o del vinagre”, *Drosophila melanogaster* Meigen; Diptera: Drosophilidae) bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado corresponde a hojas de *Lepechinia chamaedryoides* provenientes de arbustos

adultos y sanos ubicados en la Cordillera de la Costa de la provincia de Concepción en la comuna de Hualqui, sector Redolino, 24 km al Sur de Concepción, (36°58'00"S, 72°55'48"W) Región del Biobío, Chile; el material vegetativo fue recolectado en la época de primavera, en octubre de 2009. Un ejemplar voucher (CONC 176332) fue depositado en el Herbario de la Universidad de Concepción.

El material fue tratado para obtener el extracto polar, el exudado resinoso y el aceite esencial.

EXTRACTO POLAR

Se obtuvo a partir de un extracto acuoso (infusión al 10 % p/v, 30 min, 90°C) de la planta. El extracto acuoso (800 mL, 80°C) fue limpiado posteriormente aplicándolo en una columna rellena con la resina macro reticulada Sepabeads SP-850 (Tosohass, Japón) de 30 × 5 cm, para eliminar sales, azúcares simples, aminoácidos, proteínas y polisacáridos. Luego de la retención, se lava con 1 L de agua destilada y luego se eluyen los compuestos con 300 mL de etanol absoluto. El extracto alcohólico se concentra a presión reducida (< 40°C) y se lleva a sequedad (1,56 g) para luego ser almacenado a -20°C en oscuridad.

EXUDADO RESINOSO

Se obtuvo sumergiendo 50 g de la planta seca en diclorometano por 30 s, lo que permite extraer y estudiar selectivamente la química de la superficie de la hoja. El extracto diclorometano se concentra a sequedad a presión reducida para obtener un polvo amarillo (0,54 g) que se almacena a -20°C en oscuridad.

ACEITE ESENCIAL

Se obtuvo luego de someter la planta fresca (84 % de humedad) a 90 min de hidrodestilación utilizando el aparato oficial de Clevenger. La cantidad procesada en cada operación es de 2,5 kg con un rendimiento en el rango de 1,01-2,05 ml por 100 g de planta.

BIOENSAYOS DE LOS EXTRACTOS EN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Para evaluar las propiedades de tres extractos de *Lepechinia chamaedryoides* se realizaron bioensayos de toxicidad, en la cepa silvestre (denominada cepa "santiago") disponible en el Laboratorio de Genética de la Universidad de Concepción, Chile.

Los bioensayos contemplaron el uso de larvas de *Drosophila melanogaster* estado II. Los insectos se reprodujeron en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad, tapados con un algodón hidrófobo, envuelto en una gasa con el fin de permitir el intercambio gaseoso. Estos frascos fueron mantenidos en una cámara que contempla las condiciones óptimas de desarrollo de los individuos a fin de reducir los tiempos generacionales, la temperatura de la cámara fue aproximadamente de 25° C, que corresponde a la temperatura ideal para el desarrollo de los individuos.

SUSTRATO

El medio de cría usado para mantener *Drosophila* se compone por: 1 l de agua, 18 g de agar-agar, 60 g de sémola, 10 g de levadura seca, 1 g de ácido salicílico, 50 g de mezcla ácida, 43 g de azúcar, 4,2 g de NaNO₃, 1,2 g K₂HPO₄, 0,7 g KCl, 0,7 g MgSO₄, 0,125 g de FeSO₄. La mezcla puede conservarse durante un mes sin peligro de contaminación o deterioro. Esta mezcla se introduce caliente en frascos de cultivo, previamente esterilizados. La cantidad de alimento que se introduce en cada uno de los frascos es de alrededor de 30 ml (DeBach 1968, Demerec & Kaufmann 1969).

HOMOGENEIZACIÓN DE LA CEPA Y OBTENCIÓN DE LARVAS PARA EL BIOENSAYO

Las poblaciones de individuos de la mosca del vinagre, con las cuales se experimentó, se obtuvieron a partir de la homogeneización genética de la cepa, a través del cruce de cinco parejas "parentales" (P), para obtener una primera generación (F₁) una vez obtenida la progenie se eliminaron los padres dejando sólo la F₁ para cruzamientos. Para obtener (F₂) se tomaron por lo menos diez parejas de (F₁), en donde nuevamente los padres fueron eliminados antes que emergieran los adultos de la nueva generación con la finalidad de evitar que se crucen individuos de dos generaciones diferentes. Así se obtiene (F₃), la progenie con la que se experimentará. De esta forma se pudo asegurar que la mortalidad obtenida fue únicamente producto de la toxicidad del tratamiento evaluado.

TRATAMIENTOS

Se evaluaron tres extractos de *L. chamaedryoides* por separado, mediante bioensayos de laboratorio, usando como variable la concentración del producto (Chiffelle *et al.* 2009). Se ensayó un mínimo de 3 concentraciones por extracto y se replicó tres veces (Exudado resinoso 0,08 % m/v; 0,157 % m/v; 0,314 % m/v; Extracto polar 0,153 % m/v; 0,308 % m/v; 0,615 % m/v; Aceite esencial 0,455 % v/v; 0,727 % v/v; 0,909 % v/v; 1,363 % v/v; 1,82 % v/v), además del respectivo grupo control. El grupo control sólo contenía los componentes usados para disolver los extractos sobre el sustrato alimenticio. En los frascos de vidrio (250 ml) se introdujeron 50 larvas de *Drosophila melanogaster* en estado 1 y 2 de la cepa silvestre homogeneizada. Los tratamientos se repitieron dos veces en el tiempo para disminuir el error experimental (Park *et al.* 2004). La observación de los individuos se realizó durante cinco días luego de la infestación, contabilizando los individuos adultos vivos.

EFFECTO TÓXICO

Para realizar este bioensayo se utilizaron frascos de vidrio de 250 mL con las tapas de algodón envueltas en gasas para permitir el intercambio gaseoso, los que en su interior llevan como sustrato la mezcla para cría propuesto por

Demerec & Kaufmann (1969), donde deben introducirse 50 larvas de *D. melanogaster* por frasco, con tres réplicas por cada concentración. Una vez tapados los frascos, fueron mantenidos alrededor de siete días en una cámara a 25 °C aproximadamente, con iluminación normal.

MORTALIDAD

A los siete días de realizada la infestación se procedió a cuantificar los individuos adultos vivos, de cada tratamiento. De esta forma, se consideró muertos a la diferencia de 50 larvas por tratamiento menos adultos vivos. Para la corrección de los valores de mortalidad se usó la fórmula de Abbott (Abbott 1925), recomendada en casos que los controles presenten mortalidad entre 5 y 20%.

DOSIS EQUITÓXICAS

Una vez obtenida la mortalidad, se estimó la concentración letal 50 % (CL₅₀) y 90 % (CL₉₀) con el procedimiento Probit, mediante la elaboración de una tabla en la que se transformaron las dosis a logaritmos y los porcentajes a valores Probit según tablas de transformación. Para la interpretación de estos resultados se obtuvo una regresión lineal ($Y = a + bx$) entre el logaritmo de la dosis (x) y los valores Probit (y), que es generada mediante el programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.* 2008). Una vez obtenida la regresión se estimó con el modelo calculando el valor para un 50 % y un 90 % de mortalidad, que en unidades Probit corresponden a 5 y 6,28 respectivamente.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño experimental fue completamente aleatorio. Los tratamientos contemplaron dos repeticiones en el tiempo con el fin de disminuir el error experimental (Park *et al.* 2004). Los datos porcentuales alcanzados fueron normalizados con la fórmula Arcoseno. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de comparación de medias de los tratamientos con un nivel de confianza del 95 % ($P < 0,05$) mediante la prueba de Tukey.

MORFOLOGÍA, ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA

Los insectos sometidos a ensayo afectados y control, se observaron mediante una lupa estereoscópica marca Zeiss, Modelo Stemi SV6. Las imágenes se consiguieron adosando una cámara Marca Nikon Modelo DXM 1200F tanto en lupa como microscopio óptico y fueron capturadas mediante el programa de Nikon ACT-1 V2.63.

Para obtener las muestras de microscopía óptica se usó la tinción azul de toluidina al 1 % en agua con 1 % de bórax. Los cortes se obtuvieron por medio de un micrótomo, luego fueron secados por calor sobre un portaobjetos donde se les agregó el colorante por 30 s, luego se lavó con agua destilada y se secó con calor.

Las imágenes obtenidas con Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de muestras normales y tratadas, se

fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en tampón de cacodilato de Na (pH 7,2), toda una noche, después se procedió al lavado en tampón, post-fijación en OsO₄ 1 % en tampón de cacodilato de sodio, se deshidrató en 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % con acetona, 15 min en cada una, 30 min en óxido de propileno, luego 1/3, 2/2 y 3/1 en Araldita/óxido de propileno y 100 % en Araldita la siguiente noche. Inclusión en araldita a 60 °C, por las 48 h sucesivas. Una vez fijadas fueron cortadas con ultramicrotomo. La tinción se realizó en acetato de uranio y citrato de plomo. La observación se realizó a través de Microscopio JEOI JEM 1200EX II, a 80 Kv.

RESULTADOS

TOXICIDAD

El porcentaje de mortalidad en larvas de *D. melanogaster* se incrementó al aumentar la concentración de aceite esencial (Tabla I, Fig. 1), observándose diferencias significativas en las concentraciones de 0,727, 0,909, 1,363 y 1,82 %v/v. Sin embargo, es manifiesto que las concentraciones de 0,727, 0,909 %v/v producen un 10% menos de mortalidad que las concentraciones de 1,363 y 1,82 % v/v.

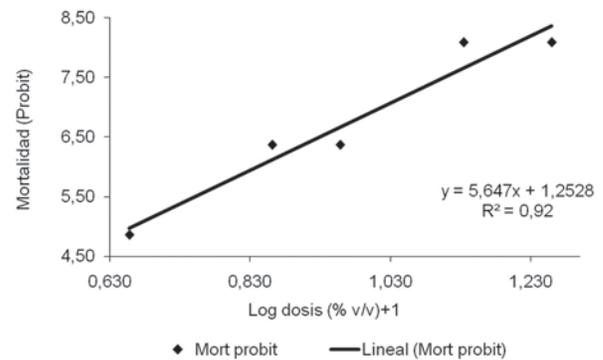


FIGURA 1. Línea dosis Probit (Ldp) para aceite esencial de *L. chamaedryoides* evaluados en larvas *D. melanogaster*.

FIGURE 1. Dose Probit line for essentials oil of *L. chamaedryoides* assessed in *D. melanogaster* larvae.

En el caso de extracto polar y exudado resinoso no hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones evaluadas, ni con los controles respectivos, presentándose valores de mortalidad inferiores a un 23%, por lo tanto no se siguió con el análisis, a nivel de microscopía, a las larvas.

DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

De los tres extractos evaluados en las larvas de *D. melanogaster*, sólo el aceite esencial presentó resultados significativos. Pudiendo apreciarse bajo lupa las siguientes

características:

La larva control presenta un color blanco, con sus segmentos definidos, región cefálica normal en cuanto a coloración y forma (Fig. 2a). Resultaron afectadas a una concentración de 1,363 % v/v de aceite esencial, provocando muerte en un lapso aproximado de 20 h. Estos individuos manifiestan oscurecimiento de la cutícula, la cual se torna de color beige en la parte media y marrón, tanto en la porción anterior como posterior de la larva. Se observa una distensión total de sus segmentos, así como también un aumento de volumen (Fig. 2b). Además, se observa una diferencia de tamaño, coloración y forma cuando se compara una larva tratada y una larva control (Fig. 2c).

DOSIS EQUITÓXICAS

El análisis Probit realizado a los resultados del aceite esencial “salvia chilena” (Fig. 2) muestra una concentración letal 50 % (CL₅₀) de 0,46 % v/v, mientras que la concentración letal 90% (CL₉₀) fue de 0,77 % v/v.

Los valores de mortalidad de la larva de la mosca de la fruta producida por el aceite esencial (90% y 100%) (Tabla I) indican que a cierta concentración (0,727 % v/v-0,909 % v/v) algunas larvas todavía pueden sobrevivir, pero al ser expuestas a una concentración mayor mueren todas, en las sobrevivientes no hay efectos visibles sobre el desarrollo, son adultos normales, esto evidenciado del conteo de adultos para cada concentración, al final del experimento.

TABLA I. Efecto de los extractos de *Lepechinia chamaedryoides* sobre la mortalidad de larvas de *Drosophila melanogaster*.

TABLE I. Effect of *Lepechinia chamaedryoides* extracts on mortality of *Drosophila melanogaster* larvae.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN	% MORTALIDAD *
Control	0%	2,7 c
Aceite Esencial	0% (control)	20,0 cb
	0,455 % v/v	44,7 b
	0,727 % v/v	90,7 a
	0,909 % v/v	91,3 a
	1,82 % v/v	100 a
	1,363 % v/v	100 a
Extracto Polar	0% (control)	20,7 cb
	0,153% m/v	14,7 cb
	0,308% m/v	8,0 c
	0,615% m/v	10,0 c
Exudado Resinoso	0% (control)	15,3 cb
	0,08 % m/v	16,0 cb
	0,157% m/v	8,0 c
	0,314% m/v	19,3 cb

* Tratamientos designados con igual letra no son estadísticamente diferentes. Tukey (P > 0,05). / Treatments marked with the same letter are not statistically different Tukey (P > 0.05).

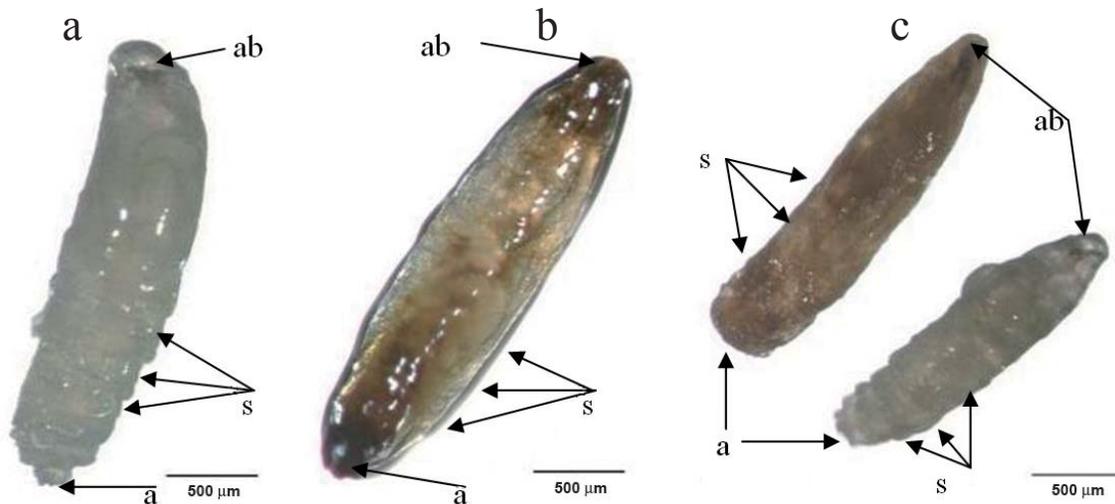


FIGURA 2. Larvas de *Drosophila melanogaster*. a) larva control. b) larva sometida a tratamiento con el aceite esencial (1,363 % v/v). c) comparación entre larva tratada y larva control. ab: aparato bucal, s: segmento, a: ano.

FIGURE 2. *Drosophila melanogaster* larvae. a) control larva. b) larva after essential oil treatment (1,363% v/v). c) comparison between treated larva and control larva. ab: larva mouth armature, s: larva segment, a: anus.

MICROSCOPIA ÓPTICA

CORTE TRANSVERSAL DE LA REGIÓN ANTERIOR DE LA LARVA (PORCIÓN CEFÁLICA). Se observa un corte de una larva normal (Fig. 3a). La larva al ser sometida a tratamiento con 1,363 % v/v de aceite esencial muestra que las glándulas salivales y el sistema digestivo se encuentran afectados, específicamente en el intestino medio, ya que se observa una desorganización con respecto a la larva control. Hay estructuras que no se observan en la larva sometida a tratamiento, como los discos imaginales (Fig. 3b).

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

CORTE TRANSVERSAL CON ULTRA MICRÓTOMO. En la larva control se aprecia un retículo endoplásmico normal con estructuras organizadas y continuas (Fig. 4) y alta densidad de mitocondrias con forma aguzada con gran cantidad de crestas mitocondriales (Fig. 4b). A diferencia, las larvas sometidas a tratamiento con 1,363%v/v de aceite esencial presentan mitocondrias redondeadas, voluminosas, con menor número de crestas mitocondriales (Figs. 5a y 5c) y un retículo endoplásmico rugoso voluminoso fragmentado (Figs. 5b y 5c).

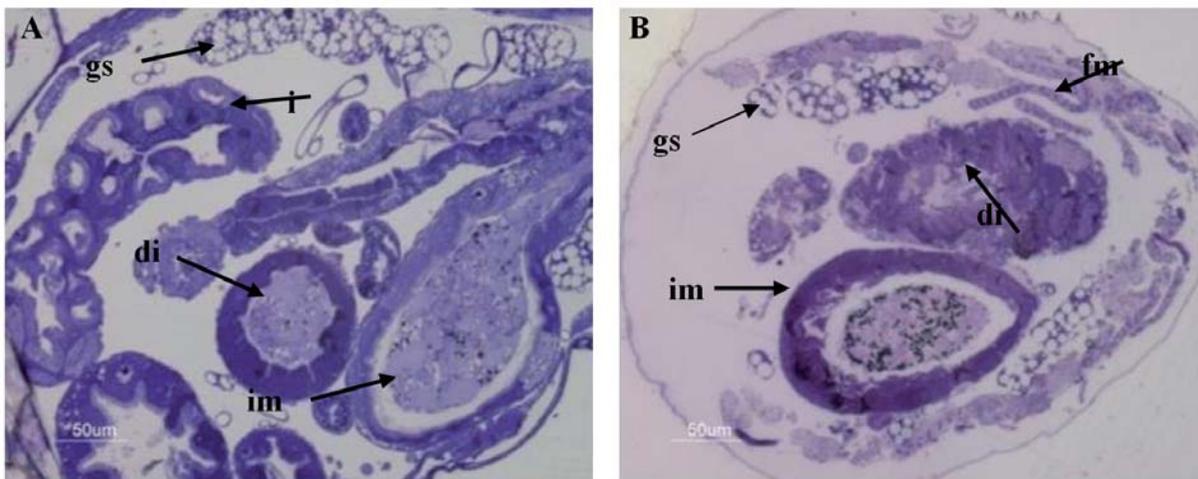


FIGURA 3. Larvas de *Drosophila melanogaster*. A) larva control. B) larva sometida a tratamiento (1,363 % v/v). gs: glándula salival, di: disco imaginal, im: intestino medio, i: intestino, fm: fibra muscular.

FIGURE 3. *Drosophila melanogaster* larvae. A) control larva. B) larva after essential oil treatment (1,363% v/v). gs: salivary gland, di: imaginal disc, im: midintestine; i: intestine, fm: muscle fiber.

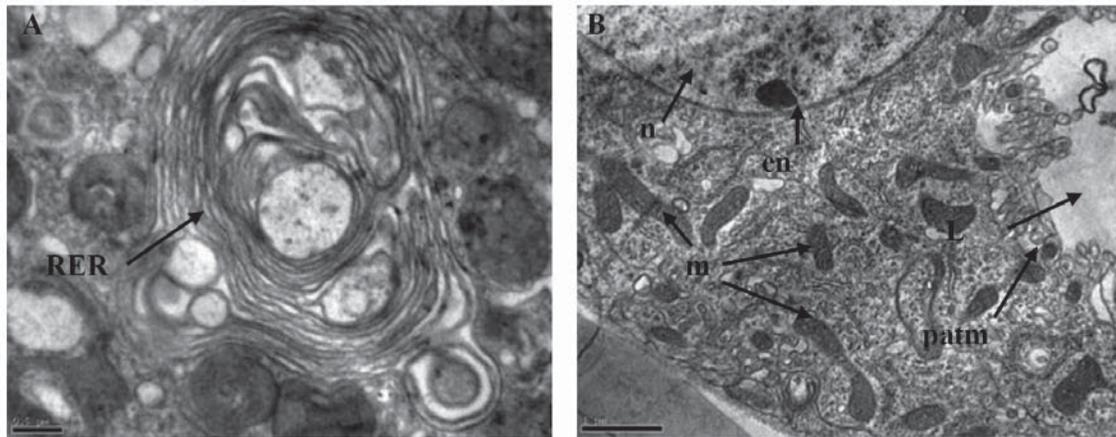


FIGURA 4. Larvas de *Drosophila melanogaster*. A) y B) larva control. b) corresponde a una célula de absorción. RER: Retículo Endoplasmático Rugoso, m: mitocondria, n: núcleo, en: envoltura nuclear, L: lumen, patm: prolongaciones apicales tipo microvellosidades.

FIGURE 4. *Drosophila melanogaster* larvae. A and B). control larva. b) absorption cell, RER: rough endoplasmic reticulum, m: mitochondia, en: nuclear envelope, L: luminal cavity, patm: apical microvilli.

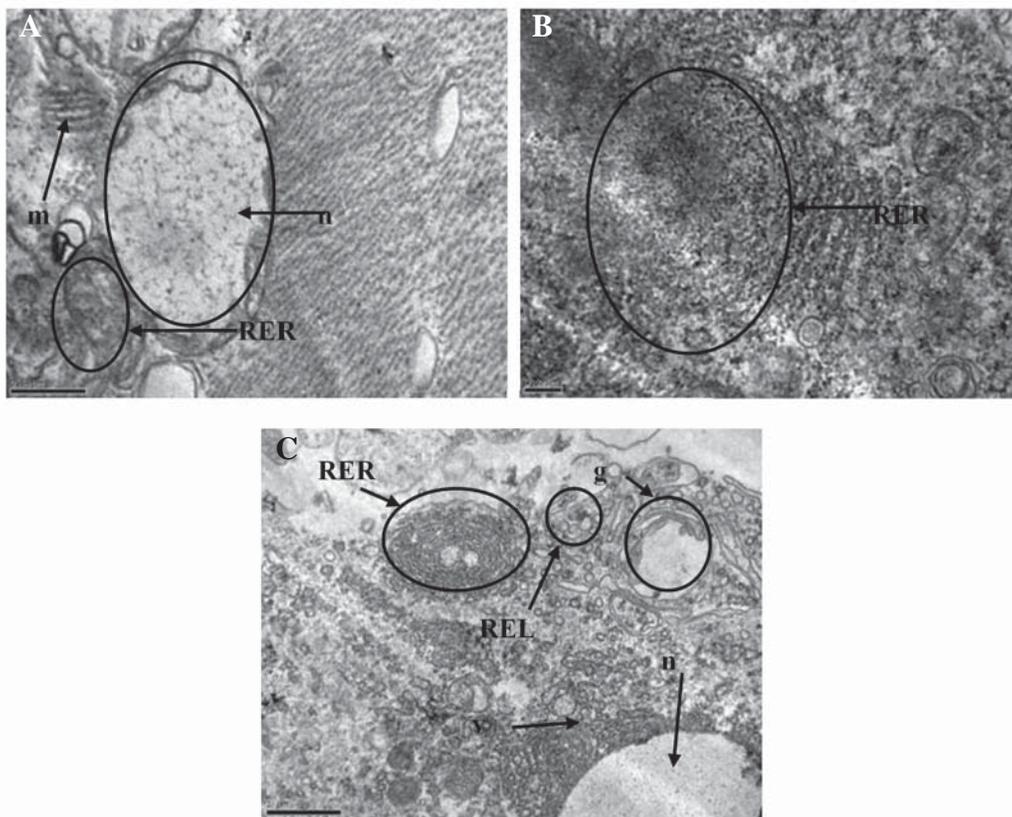


FIGURA 5. A), B) y C). Larva sometida a tratamiento (1,363 % v/v aceite esencial). RER: Retículo Endoplasmático Rugoso, REL: Retículo Endoplasmático Liso, m: Mitocondria, g: Aparato de Golgi, v: vesícula, n: núcleo.

FIGURE 5. A) B) and C) *Drosophila melanogaster* larvae. after essential oil treatment (1,363% v/v). c) RER: rough endoplasmic reticulum, REL smooth endoplasmic reticulum, m: mitochondia, g: Golgi Apparatus, v: vesicle, n: nucleus.

DISCUSIÓN

La familia Lamiaceae comprende hierbas y arbustos con hojas pilosas, glándulas epidérmicas que secretan aceites volátiles, que presentan una alta diversidad estructural química con predominancia de alguno de estos compuestos químicos (Wink 2003, Sangwan *et al.* 2001). Los aceites esenciales son comunes en *Lepechinia*, se producen dentro de pelos glandulares y aumenta la producción durante la época primaveral, que es la de mayor crecimiento de la planta, donde predominan días más largos y mayor temperatura (Burbott & Loomis 1967). Su composición y concentración en la planta puede variar de acuerdo a la época del año. En plantas de *Salvia bracteata* Banks & Sol. recolectadas en Pakistán (Houshidari *et al.* 2006), se ha comprobado que el contenido de aceite esencial varía en composición y concentración de algunos de los componentes en relación a la época de floración. Antes de la floración la concentración del aceite es de 0,22% y contiene 17 compuestos y en la época de floración es de 0,28% y contiene 19 compuestos. Algunos componentes como β cariofileno decrece su concentración en la época de floración desde 49,6% a 41,6%, mientras que γ -muuroleno aumenta desde 18,3% a 22,8%. La época de floración de *L. chamaedryoides*, es entre octubre y noviembre. Los ejemplares en este estudio fueron recolectados en octubre, por lo que la composición y concentración correspondería a la máxima producción de aceite esencial de las plantas.

Es evidente que los metabolitos secundarios presentes en el aceite esencial de estas plantas sirven como defensa antiherbívora, actividad repelente, antialimentaria y/o insecticida (Akhtar *et al.* 2003). Esto se explica porque compuestos estructuralmente similares a estas hormonas, contenidos en los aceites esenciales, conocidos como “disruptores endocrinos”, pueden alterar por actividad mimética antagonista o agonista el equilibrio balanceado entre hormona de muda o ecdisona y hormona juvenil. Este equilibrio hormonal natural hace posible por ejemplo la mantención de los 21 discos imaginales presentes en larvas de insectos holometábolos (Pastor *et al.* 2006), como es la “mosca del vinagre”. Los discos imaginales son sacos epiteliales formados por células indiferenciadas morfológicamente en la larva, pero que poseen un destino ya definido en el adulto. Los disruptores endocrinos alteran la metamorfosis del insecto, dando lugar a mudas prematuras o tardías y la muerte de los individuos al no emerger de las pupas (Viñuela *et al.* 1991, DeFur 2004). Las micrografías de los cortes de las larvas sometidas a tratamiento con el aceite esencial obtenido de “alhuellahuén”, en esta investigación, muestran una etapa avanzada de necrosis, al ser observadas a microscopía electrónica, probablemente posterior a procesos apoptóticos (suicidio programado de la célula) inducidos por estas moléculas que componen el aceite esencial, que actuarían como disruptores endocrinos,

donde también estén presentes compuestos con actividad proapoptótica como se ha demostrado en diversos estudios realizados con los compuestos purificados.

Así, los procesos apoptóticos han sido sugeridos con experimentos de aceites esenciales de dos especies de la familia Lamiaceae, cercanas a *Lepechinia*, *Salvia rubifolia* Boiss. y *S. bracteata*, que muestran actividad inhibitoria sobre células cancerosas de melanoma humano (M14) “*in vitro*” (Cardile *et al.* 2009, Loizzo *et al.* 2010). Loizzo *et al.* (2010) demostraron que el aceite esencial de *Salvia leriifolia* Benth. contiene 50 componentes, mientras que 19 componentes fueron identificados en *S. acetabulosa* L. Ambos aceites muestran alta actividad antiproliferativa, al comparar con vinblastina, usada como control positivo, contra células de carcinoma de células grandes de pulmón humano caucásico (COR-L23) con valores de concentración inhibitoria 50% (CI_{50}) de 7,5 $\mu\text{g/mL}$ para *S. leriifolia* y 6,5 $\mu\text{g/mL}$ para *S. acetabulosa*. Los aceites esenciales de *Salvia* L. muestran una interesante actividad también sobre células de cáncer de laringe (C32) (CI_{50} = 6,3 $\mu\text{g/mL}$, para *S. acetabulosa* y 9,1 $\mu\text{g/mL}$, para *S. leriifolia*). El aceite esencial de *S. acetabulosa* posee actividad citotóxica también contra células de adenocarcinoma renal (CI_{50} = 6,8 $\mu\text{g/mL}$). Así, se puede extrapolar la información, postulando que ha habido apoptosis en células normales de discos imaginales y células epiteliales de las glándulas salivales de la “mosca del vinagre”, derivadas por el estrés al ser expuestas a la concentración de aceite esencial de *L. chamaedryoides*, produciendo muerte celular (Yoon *et al.* 2000, Armstrong 2006). Esta información obtenida debe ser confirmada en forma más específica, en donde se incluya el uso de marcadores específicos para apoptosis en larvas tratadas con aceite esencial de *L. chamaedryoides*.

Los aceites esenciales se pueden definir como mezclas de compuestos que contienen mono-, sesquiterpenoides, benzoides y fenilpropanoides. En investigaciones previas se registró un rendimiento de 0,25% de las plantas de *Lepechinia chamaedryoides*, recolectadas en el mes de marzo de 1989 y 1990 (Valenzuela *et al.* 1992). Este aceite esencial contiene más de 65 compuestos volátiles, siendo el 42,6% monoterpenos y 50,6% sesquiterpenos, cuyos constituyentes mayoritarios del aceite esencial son: β -cariofileno (10,3%), β -felandreno (13 %), limoneno (3 %), espatulenol (6,4%), τ -cadinol (10,4%) y γ -cadineno (5,9%) y entre los componentes minoritarios se encuentra linalool (0,6%), α -terpineol (0,4%), α -humuleno (0,6%), etc. (Valenzuela *et al.* 1992). De los compuestos mencionados, el limoneno, linalool y terpineol tienen demostrada acción insecticida (Leyva *et al.* 2009, Palacios *et al.* 2009, Vila *et al.* 2010).

Sin embargo, actualmente, aislar compuestos que forman parte de la composición de los aceites esenciales, evaluarlos por sí solos y atribuirles alguna acción, es bastante común, no obstante, existen partidarios de la utilización del aceite

completo y no de las fracciones aisladas, ya que otros metabolitos, aunque en menor proporción, pueden ejercer una acción sinérgica letal contra el insecto, corroborando la idea que los componentes esenciales deben su acción más que al efecto de un solo compuesto, al conjunto de éstos (Bakkali *et al.* 2008).

Urzúa *et al.* (2010) está de acuerdo con esta idea y propone en su investigación con *Peumus boldus* Molina (boldo) que el principal componente con propiedades insecticidas en *Musca domestica* L. del aceite esencial es eucaliptol, pero no descarta la posibilidad de efectos sinérgicos y/o antagonistas. Vergara *et al.* (1997) confirman la idea que efectos combinados de compuestos tienen mayor efectividad que en forma individual, lo que permite deducir que sería más efectivo un extracto con todos los componentes, en vez de aislar el principio activo, dado que aumentaría la mortalidad de los insectos y disminuiría la probabilidad que éstos desarrollen resistencia a una mezcla de ingredientes activos.

El β -cariofileno está ampliamente distribuido en diferentes especies vegetales ricas en aceites esenciales, incluyendo a *L. chamaedryoides*, tiene actividad antiinflamatoria, antibiótica, antioxidante, anticarcinogénica, anestésica local y un gran efecto potenciador que no sólo se restringe a las propiedades anticancerígenas de otros constituyentes volátiles como el α -humuleno (también presente en el aceite esencial de *L. chamaedryoides*), sino que también se observa lo mismo con drogas como el paclitaxel (Legault & Pichette 2007). Se ha comprobado que, facilita la acumulación de los compuestos activos dentro de la célula en líneas celulares humanas de adenocarcinoma mamario (MCF-7) y carcinoma de colon (DLD-1) y contra fibroblastos murinos (L-929). La actividad anticáncer de humuleno, en presencia de β -cariofileno aumenta desde 50 a 75%. Los resultados de investigaciones previas han demostrado claramente que en especies de *Salvia* los aceites esenciales tienen una actividad antiproliferativa y estaría relacionada con los compuestos minoritarios, que actúan sinérgicamente con otros compuestos activos, como es el caso de humuleno.

Otro constituyente minoritario interesante, también componente del aceite esencial de “salvia macho” es linalool, un alcohol monoterpénico, que inhibe esporádicamente la proliferación celular mostrando actividad quimioprotectiva, aumentando la sensibilidad de las células cancerosas a drogas anticáncer convencionales. Ravizza *et al.* (2008) demostraron que en concentraciones subtóxicas, el linalool estimula la actividad citotóxica de la droga anticancerígena doxorubicina (DOX), y es capaz de revertir la resistencia en células de adenocarcinoma en cáncer mamario humano (líneas MCF7 WT y la MCF7 ADR multi-droga resistente). Así, linalool promueve efectos proapoptóticos en ambas líneas celulares y se ha comprobado sinergismo en la línea celular MCF7 ADR, también al inducir la acumulación intracelular de DOX y disminuir los niveles de expresión de

los genes antiapoptóticos Bcl-xL, que frenan la apoptosis, evitando proliferación de células cancerosas

Por otro lado, el uso potencial de aceites esenciales como repelentes de insectos ha sido ampliamente discutido (Adorjan & Buchbauer 2010), lo que abre la posibilidad de explorar en un estudio futuro sobre las aplicaciones del aceite esencial de *Lepechinia chamaedryoides*, ante la creciente demanda por estos productos. Dados estos antecedentes, *L. chamaedryoides* tiene actividad biológica sobre larvas de *D. melanogaster*, causa daños en plantaciones agrícolas debido a que las larvas consumen el sustrato y los adultos transportan esporas de levaduras, hongos patógenos y ocasionalmente nemátodos. Al analizar la línea dosis-probit se observa que el valor de la pendiente es 5,647, el cual es considerado alto por Leyva *et al.* (2009), quien obtuvo pendientes similares en experimentación con *Aedes aegypti* L., este valor también indica una baja variabilidad en la respuesta al aceite esencial por parte de la población tratada, lo que concuerda con la forma que presenta la recta (Fig. 5). Los valores de los datos se ajustan bien a una línea recta, indicando una respuesta de tipo normal, es decir, que no hubo mezcla de fenotipos que varíen la respuesta al aceite. El valor de la pendiente también evidencia que para aumentar la eficiencia desde CL_{50} hasta CL_{90} se requiere elevar la dosis en 1,68 veces, lo que puede resultar costoso desde el punto de vista práctico y ecológico. Este hecho refuerza la idea de investigar sobre el uso de inertes minerales en mezcla con aceite esencial de salvia e investigar sobre las condiciones que predisponen una mayor o menor actividad biológica de *L. chamaedryoides* sobre larvas *D. melanogaster*. También se puede explorar la posibilidad de cultivos conjuntos que incluya a esta especie como barrera de plantaciones potencialmente afectadas por la “mosca del vinagre”, lo que además contribuiría a la conservación de este importante componente de la flora nativa de Chile, e incentivaría el estudio de su ciclo biológico, además de las investigaciones ya realizadas relacionadas con germinación y propagación vegetativa de esta especie (Serri *et al.* 2011)

Por lo anterior, se concluye que en la actividad insecticida mostrada por el aceite esencial de “salvia chilena” o “alhuellahuén” en este estudio, a nivel celular (células de discos imaginales o de glándulas salivales de larvas de *Drosophila melanogaster*), algunos compuestos actuarían como un agente que modificaría el balance hormonal, promoviendo apoptosis y necrosis, corroborado por la información de ensayos “*in vitro*” en líneas celulares cancerosas, lo que podría además estar reforzado por agentes contenidos en el mismo aceite que estimulen la entrada a las células del insecto, luego de haber consumido el aceite esencial (linalool), algunos componentes se acumularían en las células interfiriendo con la regulación del ciclo celular, como humuleno, potenciado por β -cariofileno, provocando apoptosis y luego necrosis.

Los hallazgos realizados por Areche *et al.* (2009),

respecto a diterpenos abietanos contenidos en los extractos totales, en esta investigación, se encuentran contenidos en el exudado resinoso, y no presentan actividad insecticida sobre larvas de *D. melanogaster*; es posible que los compuestos no sean capaces de pasar desde el digestivo y llegar a las células de los órganos de la larva.

En resumen, las siguientes conclusiones experimentales del presente trabajo, 1. El aceite esencial de *Lepechinia chamaedryoides* en concentraciones superiores a 0,727 % v/v presenta actividad insecticida en larvas de *D. melanogaster* en condiciones de laboratorio. 2. El extracto polar (rico en constituyentes acuosolubles) y exudado resinoso (rico en constituyentes lipofílicos) de *L. chamaedryoides* no registraron efecto tóxico en larvas de *D. melanogaster* a las concentraciones y condiciones evaluadas en condiciones de laboratorio. 3. La actividad insecticida del aceite esencial sobre larvas sometidas al tratamiento se confirmó por microscopía, lo que sugiere la activación de mecanismos asociados a muerte celular programada o apoptosis.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción, especialmente a Ricardo Oliva y Alexis Estay. Grupo de Investigación Genética de Poblaciones Vegetales y Animales 03.C1.01, Proyecto DIC UDEC 206.031.105-1.0. A Alicia Marticorena por la identificación de la especie.

REFERENCIAS

- ABBOTT, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-7.
- ADORJAN, B. & G. BUCHBAUER. 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal* 25: 407-426.
- AKHTAR, Y., C.H. RANKIM & M.B. ISMAN. 2003. Decreased response to feeding deterrents following prolonged exposure in the larvae of a generalist herbivore, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Behavior* 16: 811-831.
- ARECHE, C., G. SCHMEDA-HIRSCHMANN, C. THEODULOZ & J. RODRÍGUEZ. 2009. Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61: 1689-1697.
- ARMSTRONG, J.S. 2006. Mitochondrial membrane permeabilization: the *sine qua non* for cell death. *BioEssays* 28: 253-260.
- BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK & M. IDAOMAR. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.
- BOULTER, D. 1993. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry* 34: 1453-1466.
- BURBOTT, A.J. & W.D. LOOMIS. 1967. Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. *Plant Physiology* 42: 20-28.
- CARDILE, V., A. RUSSO, C. FORMISANO, D. RIGANO, F. SENATORE, N. APOSTOLIDES ARNOLD & F. PIOZZI. 2009. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: Chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology* 126: 265-272.
- CARRERO, J.M. 1996. Lucha integrada contra las plagas agrícolas y forestales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 775 pp.
- CHIFFELLE, I., A. HUERTA & D. LIZANA. 2009. Physical and chemical characterization of *Melia azedarach* L. fruit and leaf for use as botanical insecticide. *Chilean Journal of Agricultural Research* 69: 38-45.
- COSCOLLA, R. 1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 205 pp.
- DEBACH, P. 1968. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Continental. México D.F., México. 949 pp.
- DEFUR, P.L. 2004. Use and role of invertebrate models in endocrine disruptor research and testing. *Institute for Animal research Journal* 45: 484-493.
- DEMEREK, M. & B. P. KAUFMANN. 1969. *Drosophila* guide: introduction to the genetics and cytology of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington. Washington D.C., USA. 46 pp.
- DI RIENZO, J.A., F. CASANOVES, M.G. BALZARINI, L. GONZÁLEZ, M. TABLADA & C.W. ROBLEDO. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- GOJMAN, S.G., J.F. TURRENS, G.B. MARINI-BETTOLO & A.O.M. STOPPANI. 1985. Effect of tingenone, a quinonoid triterpene, on growth and macromolecule biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 41: 646-648.
- HOFFMANN, A. 1998. Flora silvestre de Chile: zona central (4a. ed.). Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 254 pp.
- HOUSHIDARI, F., F. SEFIDKON & Z. JAMZAD. 2006. Identification and comparison of essential oil composition of *Salvia bracteata* Bank & Soland in two harvesting time. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 22: 209-215.
- LEUGAULT, J. & A. PICHETTE. 2007. Potentiating effect of b-caryophyllene on anticancer activity of a-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59: 1643-1647.
- LEYVA, M., M. MARQUETTI, J.E. TACORONTE, R. SCULL, O. TIOMNO, A. MESA & D. MONTADA. 2009. Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Revista Biomédica* 20: 5-13.
- LOIZZO, M.R., F. MENICHINI, R. TUNDIS, M. BONESI, F. NADJAFI, A.M. SAAB, G. NATALE FREGA & F. MENICHINI. 2010. Comparative chemical composition and antiproliferative activity of aerial parts of *Salvia leriifolia* Benth. and *Salvia acetabulosa* L. Essential oils against human tumor cell *In Vitro* Models. *Journal of Medicinal Food* 13: 62-69.

- MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M., P. MIRANDA, N.A. VALENCIA, M.L. TORRES, R. MIRANDA, J. CÁRDENAS, & M. SALMÓN. 1998. Antimicrobial diterpenes from *Salvia reptans*. *Pharmaceutical Biology* 36: 77-80.
- METCALF, R. & W. LUCKMANN. 1992. Introducción al manejo de plagas de insectos. Limusa. México D.F., México. 710 pp.
- MONTENEGRO, G. 2000. Chile: nuestra flora útil. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 267 pp.
- MONTES, M. & T. WILKOMIRSKY. 1985. Medicina tradicional chilena. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 206 pp.
- NELSON, M., B. PARK & S. LEVY. 1994. Molecular requirements for the inhibition of the tetracycline antiport protein and the effect of potent inhibitors on the growth of tetracycline-resistant bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry* 37: 1355-1361.
- NICOLÁS, I. & M. CASTRO. 2006. Theoretical study of the complexes of hormone with Mg^{2+} and Ca^{2+} ions and their relation with the bacteriostatic activity. *Journal of Physical Chemistry A*. 110: 4564-4573.
- NICOLAS, I., M. VILCHIS, N. ARAGÓN, R. MIRANDA, G. HOJER & M. CASTRO. 2003. Theoretical study of the structure and antimicrobial activity of hormone. *International Journal of Quantum Chemistry*, 93: 411-421.
- OHYAMA, T. & J. COWAN. 1995. Calorimetric studies of metal binding to tetracycline. Role of solvent structure in defining the selectivity of metal ion-drug interactions. *Inorganic Chemistry* 34: 3083-3086.
- PALACIOS, SM., A. BERTONI, Y. ROSSI, R. SANTANDER & A. URZÚA. 2009. Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides against the house fly, *Musca domestica* L. *Molecules* 14: 1938-1947.
- PARK, D.-S., C. PETERSON, S. ZHAO & J.R. COATS. 2004. Fumigation toxicity of volatile natural and synthetic cyanohydrins to stores-product pests and activity as soil fumigants. *Pest Management Science* 60: 833-838.
- PASCUAL-VILLALOBOS, M.J. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: estado actual de la investigación. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Madrid, España. 35 pp.
- PASTENE, E., J. ALARCÓN, M. AVELLO, M. NAIL, A. URBINA, D. SEPÚLVEDA & M. VEGA. 2005. Application of HPTLC to the analysis of hormone in *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. *Journal of Planar Chromatography- Modern TLC* 18: 221-223.
- PASTOR, J.C., E. MARTÍN-BLANCO & A. GARCÍA-BELLIDO. 2006. Eversión y cierre de los discos imaginales. *Investigación y Ciencia* 352: 72-81.
- PEÑA, R., G. MONTENEGRO, L. ITURRIAGA & B. TIMMERMANN. 2000. *Sphacelesalviae*, un recurso de medicina tradicional chilena poco conocido. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 24: 193-199.
- RAVIZZA, R., M.B. GARIBOLDI, R. MOLteni & E. MONTI. 2008. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncology Reports* 20: 625-630.
- RODRÍGUEZ, C., G. SILVA & J.D. VENDRAMIN. 2003. Insecticidas de origen vegetal. pp: 87-112. En: G. Silva & R. Hepp (eds.). Bases para el manejo racional de insecticidas. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía / FIA. Chillán, Chile.
- SANGWAN, N.S., A.H.A. FAROOQI, F. SHABIH & R.S. SANGWAN. 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3-21.
- SERRI, H., A. URBINA, A. CABRERA, T. MILLÁN, E. PASTENE & J. RUBILAR. 2011. Propagación y Descripción Morfo-Anatómica de *Salvia Chilena (Lepechinia chamaedryoides)*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 10: 507-524.
- THE PLANT LIST. 2010. Version 1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (consultado el 18 de Octubre de 2012)
- ULUBELEN, A., S. ÖKSÜZ, G. TOPCU, A.C. GÖREN, C. BOZOK-JOHANSSON, C. ÇELIK, G. KÖKDİL & W. VOELTER. 2001. A new antibacterial diterpene from the roots of *Salvia caespitosa*. *Natural Products Letter* 15: 307-314.
- URZÚA, A., R. SANTANDER, J. ECHEVERRÍA, C. VILLALOBOS, S.M. PALACIOS & Y. ROSSI. 2010. Insecticidal properties of *Peumus boldus* Mol. essential oil on the house fly, *Musca domestica* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9: 465-469.
- VALENZUELA, L., R. VILA, S. CAÑIGUERAL & T. ADZET. 1992. The essential oil of *Sphacele chamaedryoides*. *Planta Medica* 58: 273-274.
- VERGARA, R., C. ESCOBAR & P. GALEANO. 1997. Potencial insecticida de extractos de *Melia azedarach* L. (Meliaceae). Actividad biológica y efectos sobre *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 50: 186.
- VILA, R., A.I. SANTANA, R. PÉREZ-ROSÉS, A. VALDERRAMA, M.V. CASTELLI, S. MENDONCA, S. ZACCHINO, M.P. GUPTA & S. CAÑIGUERAL. 2010. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of alpha-bisabolol. *Bioresource Technology* 10: 2510-2514.
- VIÑUELA, E., F. BUDIA & P. DEL ESTAL. 1991. Los insecticidas reguladores del crecimiento y la cutícula. *Boletín de Sanidad Vegetal-Plagas* 17: 391-400.
- WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3-19.
- YOON, H.S., S.C. MOON, N.D. KIM, B.S. PARK, M.H. JEONG & Y.H. YOO. 2000. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 151-156.
- ZULOAGA, F. O., O. MORRONE & M. J. BELGRANO (eds.). 2008. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), en *Monographs of the Missouri Botanical Garden*, n° 107 (vol. 1 Pteridophyta, Gymnospermae y Monocotyledoneae; vol. 2 Dicotyledoneae: A-F; vol. 3 Dicotyledoneae: F-Z. 3346 pp.

Recibido: 16.01.12
 Aceptado: 15.05.12