

Evaluación de la actividad insecticida *in vitro* de extractos vegetales contra la broca del café

Oscar M. Mosquera¹,
Lina M. Henao, Jaime Niño

Las plantas tropicales pueden ser fuente de nuevos insecticidas naturales. Se infiere, que la biodiversidad de las plantas del Parque Regional Natural Ucumarí -especialmente de las familias Ranunculaceae, Piperaceae y Solanaceae - puede ser una alternativa importante para la obtención de bioplaguicidas para el control de la broca del café.

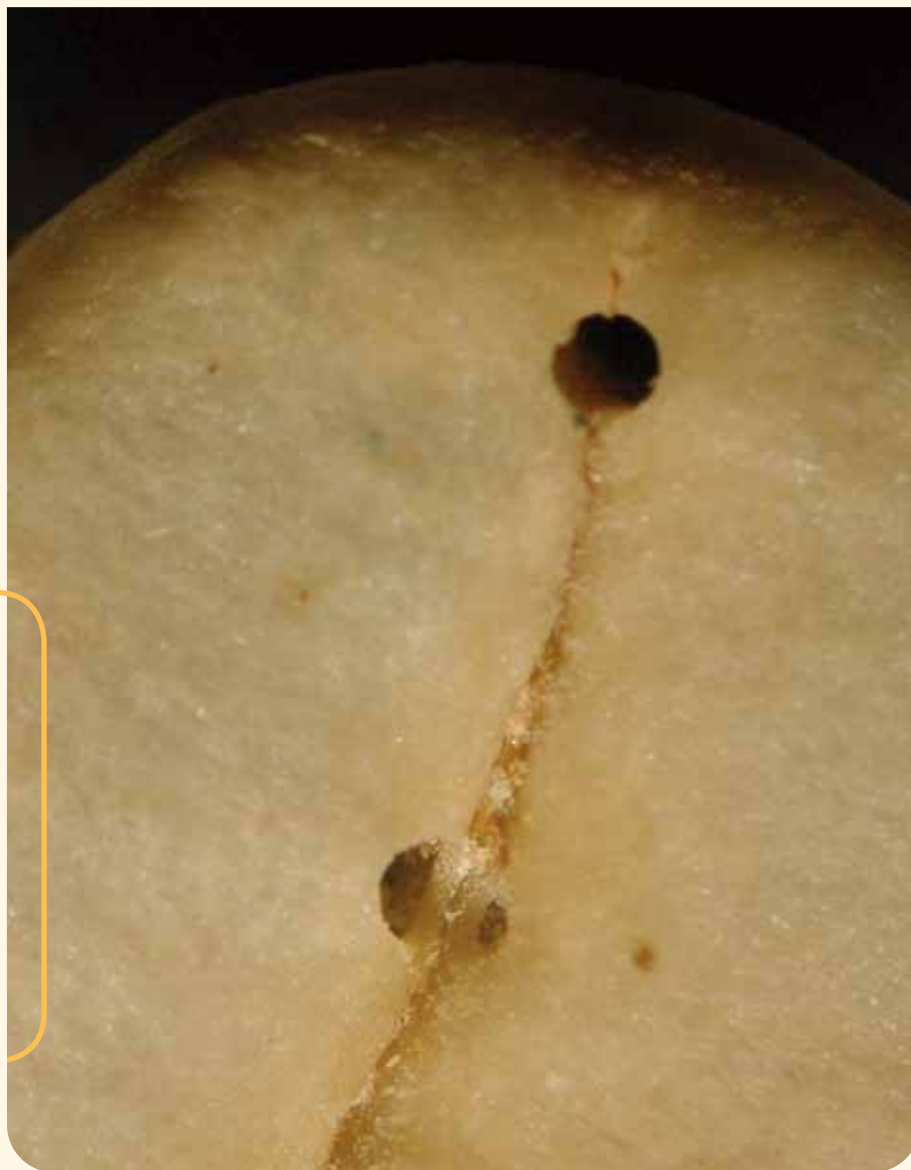


Foto: Angélica María Bustamante Peláez.

¹ Grupo de Biotecnología-Productos Naturales, Escuela de Tecnología Química, Centro de Excelencia (CIEBREG), Universidad Tecnológica de Pereira. A.A. 97. Pereira, Colombia. omosquer@utp.edu.co

Resumen

En la búsqueda de plantas con actividad insecticida para ser empleadas en el manejo integrado de la broca del café (*Hyphothenemus hampei*), se evaluaron 46 extractos crudos de diclorometano y metanol obtenidos de plantas recolectadas en zonas de reserva de la Ecorregión del Eje Cafetero. Dichas plantas pertenecen a las familias Apocynaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Solanaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae y Urticaceae.

La actividad insecticida *in vitro* se evaluó utilizando como unidad experimental un vial, en el cual se introdujo una hembra de broca adulta y un grano de café pergamino impregnado con el respectivo extracto a evaluar (diclorometano o metanol) a 1000 mg/L. Para cada extracto se utilizaron cien unidades experimentales con dos repeticiones. Los extractos de diclorometano de las especies *Clematis haenkeana*, *Piper umbellatum* y *Phenax uliginosus* fueron los más activos contra *H. hampei*. Los extractos metanólicos más activos fueron los de *Topobea cf discolor*, *Dunalia solanacea* y *Rodostemonodaphne* sp. Estos resultados confirman el potencial de las plantas de la zona de reserva de la Ecorregión del Eje Cafetero como fuente de nuevos agentes con actividad insecticida contra *H. hampei*.

Palabras claves: *Hyphothenemus hampei*; *Clematis haenkeana*, *Piper umbellatum*; *Phenax uliginosus*; *Topobea cf discolor*, *Dunalia solanacea*; *Rodostemonodaphne*; estudios *in vitro*; bioprospección; insecticidas de origen vegetal; flora; biodiversidad; Ecorregión del Eje Cafetero; Colombia.

Summary

Evaluation *in vitro* of vegetal extracts insecticidal activity against the coffee berry borer.

In the search of plants with insecticidal activity for the integrated management of the coffee berry borer (*Hyphothenemus hampei*) pest, 46 dichloromethane and methanol crude vegetal extracts were evaluated. The plants evaluated belong to the Apocynaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Solanaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae and Urticaceae families, and were collected in natural reserves of the Colombian Coffee Eco-region.

For evaluating the *in vitro* insecticidal activity, a vial was used as experimental unit in which a mature female coffee berry borer and a coffee grain soaked in the respective extract solution (dichloromethane or methanol) at 1000 mg/L were introduced. For each plant extract analyzed, one hundred experimental units with two replicates were used. The most active dichloromethane extracts against *H. hampei* were those belonging to the species *Clematis haenkeana*, *Piper umbellatum* and *Phenax uliginosus*, while the most active methanolic ones were *Topobea cf discolor*, *Dunalia solanacea* and *Rodostemonodaphne* sp. These results confirm the potential of plants from natural reserves in the Coffee Eco-region as a source of new agents with insecticidal activity against *H. hampei*.

Keywords: *Hyphothenemus hampei*; *Clematis haenkeana*, *Piper umbellatum*; *Phenax uliginosus*; *Topobea cf discolor*, *Dunalia solanacea*; *Rodostemonodaphne*; *in vitro* studies; bioprospection; botanical insecticides; flora; biodiversity; Coffee Eco-region; Colombia.

Introducción

La broca del café (*Hyphothenemus hampei* Ferrari, Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae) es un insecto monofago que ataca al género *Coffea* y es la principal plaga de la caficultura a nivel mundial (Jaramillo et ál. 2009). Desde su aparición en Colombia, en 1988, se ha distribuido por todos los depar-

tamentos cafeteros; en la actualidad, se encuentra prácticamente en las 800.000 hectáreas sembradas, lo cual afecta la calidad del producto, la productividad y la competitividad del cultivo (Romero y Cortina 2007, Poveda et ál. 2006).

El control de la broca se realiza mediante un programa de manejo integrado que comprende varias

alternativas y opciones combinadas, entre las cuales se incluyen controles culturales, biológicos y químicos (Bustillo 2002, Sánchez y Rodríguez 2008). En el control biológico se emplean parasitoides como las avispas *Heterospilus coffeicola*, *Prorops nasuta*, *Cephalonomia stephanoderis*, y entomopatógenos como los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarrizhium*

anisoplae. En el control químico se utilizan los insecticidas endosulfan, lorsban y sumithion, entre otros (Jaramillo et ál. 2006).

En la búsqueda de nuevas alternativas biorracionales que ayuden en el control de plagas de insectos y, a la vez, permitan sustituir los pesticidas sintéticos, los fitoinsecticidas se perfilan como una opción agronómica eficiente, viable y amigable con el ambiente (Calderón et ál. 2001). Los bioinsecticidas preparados a partir de extractos vegetales contienen metabolitos secundarios como alcaloides, sesquiterpenlactonas y terpenos, entre otros compuestos con acciones larvicidas, disuasorias, repelentes y anti-alimentarias contra un amplio rango de insectos plagas (Isman 2006, Pungitore et ál. 2003).

Entre los extractos vegetales con actividad contra *H. hampei* se encuentran los del árbol del neem (*Azadirachta indica*, Meliaceae) que han presentado resultados promisorios como insecticida en varios cultivos (Depieri et ál. 2005, Mitchell y Ahmad 2006). Además, los extractos de *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* y *Macadamia* sp. han causado niveles significativamente altos de mortalidad a la broca del café en los diferentes estados morfológicos (Gómez et ál. 2007). El aceite esencial de *Myntostachys mollis* (HBK) Grises (Lamiaceae) produjo mortalidad total de la broca del café (Calle et ál. 2004); también el extracto etanólico de la corteza de *Bocconia frutescens* (Papaveraceae) presentó un efecto insecticida del 77,8% sobre este insecto plaga (Valencia et ál. 2007). El extracto acuoso de *Trichilia havanensis* (Meliaceae) redujo significativamente el porcentaje de granos de café brocados (López-Olguín et ál. 2006). Estos resultados demuestran que la utilización de extractos vegetales es una estrategia promisoriosa para el control de plagas y enfermedades en cultivos de importancia agronómica, pues no solo se reduce el impacto

económico y ecológico producido por el uso indiscriminado de pesticidas sintéticos, sino que también contribuyen al desarrollo de la agricultura orgánica (Isman 2006).

En este trabajo se determinó la actividad insecticida *in vitro* contra la broca del café, de los extractos crudos de diclorometano y metanol de 23 especies vegetales recolectadas en zonas de reserva de la Ecorregión del Eje Cafetero (conformada por los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda, norte del Valle del Cauca y occidente del Tolima). El propósito de este estudio fue obtener agentes que sean menos contaminantes con el medio ambiente y la salud humana, pero más efectivos en el control del insecto.

Material biológico

Para determinar la actividad insecticida *in vitro* se utilizaron granos de café pergamino con 41% de humedad y brocas hembras recién emergidas. El material biológico fue proveído por el Laboratorio Biocafé de Chinchiná (Caldas, Colombia).

Extracción del material vegetal

Las muestras de las 23 especies vegetales se recolectaron en el Parque Regional Natural Ucumarí [4°43'22" N y 75°33'90" W], ubicado en Pereira, Colombia. Las plantas se recolectaron el 28 de junio del 2006 y fueron clasificadas por el Dr. FJ. Roldán del Herbario de la Universidad de Antioquia. Un espécimen de cada una fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia. El extracto vegetal se obtuvo por maceración durante 48 horas, por triplicado, con *n*-hexano. Los extractos combinados se concentraron a 45°C, a presión reducida. El mismo material vegetal se extrajo con diclorometano y metanol, siguiendo el procedimiento propuesto por Niño et ál. (2006). Todos los extractos se almacenaron a -10°C hasta su utilización en los bioensayos de actividad insecticida y en la marcha fitoquímica.

Marcha fitoquímica de los extractos crudos de diclorometano y metanol

Los diferentes extractos crudos se caracterizaron mediante una marcha fitoquímica a través de cromatografía de capa delgada, según la metodología descrita por Wagner y Blatt (1996). Se utilizaron cromatofolios en aluminio de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Para la elución de los componentes presentes en los extractos de diclorometano se empleó el sistema *n*-hexano-acetato de etilo (70:30) y para los de metanol se utilizó acetato de etilo-metanol-agua (100:13,5:10). Los alcaloides, esteroides, terpenos, saponinas, fenoles y flavonoides se detectaron mediante las siguientes reacciones de caracterización: Dragendorff, anisaldehído-ácido sulfúrico, vainillina 1% en ácido sulfúrico-etanol, cloruro férrico al 1% y tricloruro de aluminio al 2%. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Determinación de la actividad insecticida *in vitro* de extractos vegetales contra la broca del café

Para el bioensayo *in vitro* de la actividad insecticida contra la broca del café se prepararon soluciones patrones a 1000 mg/L de los extractos crudos de diclorometano y metanol. Los extractos de diclorometano se disolvieron en la mezcla etanol-*n*-butanol (3:1) y los de metanol se disolvieron en etanol. El bioensayo se realizó bajo condiciones controladas de temperatura (23±3°C) y humedad relativa (75±5%). A cada unidad experimental (UE) se transfirió un grano de café pergamino previamente desinfectado e impregnado con una solución del respectivo extracto a 1000 mg/L y una broca hembra adulta recién emergida, desinfectada previamente con cloruro de benzalconio al 10% (Sanivec®), enjuagada con agua estéril y secada en corriente de aire tibio. Como control negativo se utilizó el respectivo solvente de solubilidad de los

extractos y como control positivo endosulfan a 1 mg/L. Además, se empleó un testigo absoluto constituido por granos de café pergamino sin ningún tratamiento con los extractos e infestados con una broca en cada UE. Para la evaluación de la actividad insecticida de cada extracto se utilizaron cien UE. Cada día, durante cuatro días consecutivos, se evaluaron aleatoriamente 25 UE; se controló si hubo o no perforación del grano de café por la broca y si estas estaban vivas o muertas (Niño et ál. 2007).

De cada ensayo se efectuaron dos repeticiones; todas las determinaciones se realizaron mediante un diseño aleatorio completamente independiente. La actividad insecticida

in vitro se evaluó con las variables ‘mortalidad de las brocas’ y ‘repelencia producida por el extracto’ mediante un análisis de conglomerados; se seleccionaron los dos tratamientos que mostraron la mayor proporción de brocas muertas y la menor proporción de perforación de granos de café. La información se procesó con el software Infostat 2007 d.3.

Actividad insecticida de los extractos de diclorometano

En el Cuadro 1 se ofrece la lista de plantas cuyos extractos de diclorometano y metanol fueron evaluados por su actividad insecticida *in vitro* contra la broca del café y analizados a través de la marcha

fitoquímica. La actividad insecticida de los extractos evaluados fue baja con respecto al control positivo (Fig. 1). De acuerdo con las diferencias significativas encontradas mediante el análisis estadístico de diferencia de proporciones (Zar 1999), los extractos de diclorometano de las especies *Clematis haenkeana*, *Piper umbellatum* y *Phenax uliginosus* presentaron mayor actividad insecticida de repelencia o disuasión que de mortalidad, con relación al testigo absoluto y al control positivo.

La actividad disuasoria del extracto de diclorometano de *C. haenkeana* correlaciona con la reportada para *Ranunculus japonicus* que presentó actividad insecticida y acaricida moderada contra

Cuadro 1. Marcha fitoquímica de las plantas evaluadas por su actividad insecticida contra la broca del café

Familia	Especie	No. UTP	Metabolitos secundarios											
			Alcaloides		Terpenos y esteroides		Saponinas		Fenoles y taninos		Flavonoides		Sesquiterpenlactonas y cardenólidos	
			MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂	MeOH	CH ₂ Cl ₂
Apiaceae	<i>Arracacia elata</i>	153	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+
Asclepiadaceae	<i>Blepharodon bifidus</i>	151	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Clusia multiflora</i>	157	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Clusiaceae	<i>Clusia</i> sp.	155	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
	<i>Tovomita guianensis</i>	159	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Lauraceae	<i>Rodostemonodaphne</i>	162	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Melastomataceae	<i>Topobea cf discolor</i>	160	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Passifloraceae	<i>Passiflora apoda</i>	141	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	<i>Passiflora antioquiensis</i>	152	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
	<i>Peperomia acuminata</i>	154	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Piperaceae	<i>Piper eriopodon</i>	158	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
	<i>Piper umbellatum</i>	163	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Piper pesaresanum</i>	148	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
Ranunculaceae	<i>Thalictrum podocarpum</i>	144	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-
	<i>Clematis haenkeana</i>	156	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
Rubiaceae	<i>Rubiacea</i> sp.	149	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	<i>Palicourea petioaris</i>	147	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
	<i>Dunalia solanacea</i>	145	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
Solanaceae	<i>Lycianthes radiata</i>	146	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
	<i>Solanum</i> sp.	161	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
	<i>Boehmeria bullata</i>	142	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
Urticaceae	<i>Phenax uliginosus</i>	143	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Urera ballotaefolia</i>	150	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
Control positivo			Licorina		Lanosterol		Diospolisaponina A		Catecol		Kampferol		Digoxina	

Presencia (+) Ausencia (-)

Tetranychus urticae, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Trialeurodes vaporariorum* y *Panonychus citri* (Kim et ál. 2005). La actividad del extracto de diclorometano de *P. umbellatum* también coincide con la actividad insecticida presentada por plantas del género *Piper*. Por ejemplo, *P. longanum* mostró actividad insecticida alta contra *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) (Park et ál. 2002) y *P. marginatum* mostró actividad larvicida y disuasoria fuerte contra *Aedes aegypti* (Autran et ál. 2009). También se ha reportado actividad larvicida de los aceites esenciales de diversas especies de *Piper* (Morais et ál. 2007). Tales actividades se atribuyen a los alcaloides piperidínicos presentes en este género.

La marcha fitoquímica permitió determinar que el extracto de diclorometano de *C. haenkeana* contenía fenoles, taninos, terpenos, triterpenos, esteroides, saponinas esteroidales y triterpénicas. En *P. umbellatum* se detectaron alcaloides, sesquiterpenlactonas y cardenólidos. Se considera que los metabolitos secundarios en estos extractos son los responsables de la actividad insecticida contra la broca del café.

Actividad insecticida de los extractos metanólicos

El análisis estadístico de diferencia de proporciones (Zar 1999) mostró diferencias significativas entre los extractos metanólicos de *Dunalia solanacea*, *Topobea cf discolor* y *Rodostemonodaphne* sp. (Fig. 2). Tales extractos presentaron actividad insecticida de repelencia o disuasión baja, en relación con el control positivo. La actividad insecticida del extracto metanólico de *D. solanacea* coincide con la presentada por otras especies; por ejemplo, el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el ají (*Capsicum frutescens*) presentan actividad insecticida fuerte y de repelen-

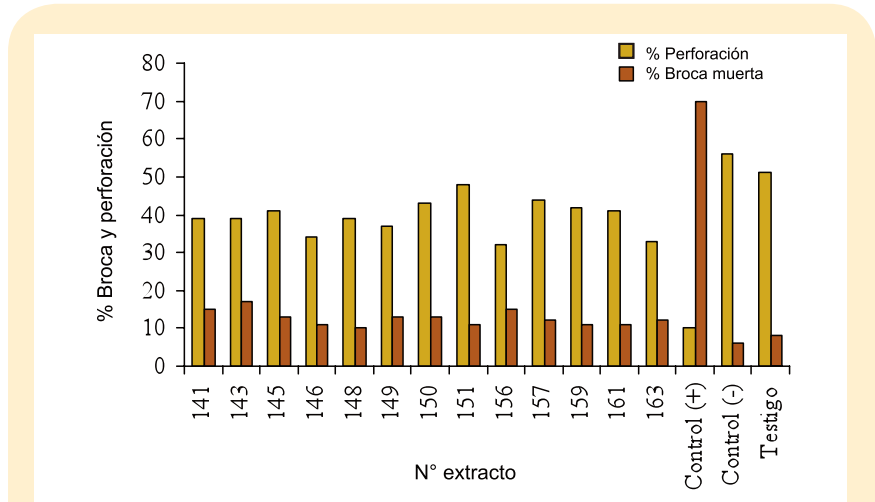


Figura 1. Extractos de diclorometano con actividad insecticida y/o repelencia contra la broca del café

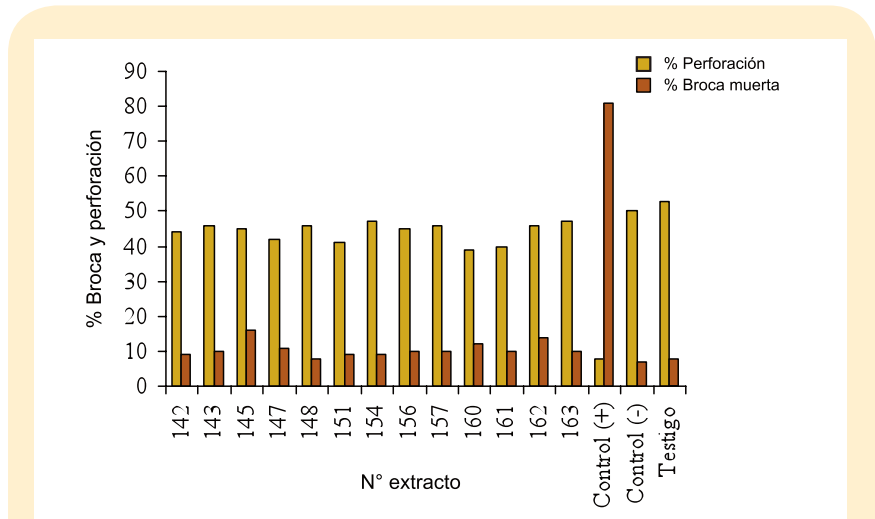


Figura 2. Extractos metanólicos con actividad insecticida y/o repelencia contra la broca del café

cia contra pulgones, ácaros, mosca blanca y broca del café (Ramírez 2004). La actividad insecticida y disuasoria de *Rodostemonodaphne* sp. concuerda con la reportada para *Cinnamomum camphora* (Lauraceae) contra *Sitophilus oryzae* y *Bruchus rugimanus* Bohem, plagas que atacan los granos almacenados (Liu et ál. 2006).

De acuerdo con la marcha fitoquímica, el extracto metanólico de *D. solanaceae* presentó metabolitos

secundarios, tales como alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides, sesquiterpenlactonas y cardenólidos. En el extracto de *T. cf discolor* se detectaron fenoles, taninos, saponinas esteroidales y triterpénicas; mientras que en el extracto de *Rodostemonodaphne* sp. se encontraron alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos (Cuadro 1). Estos metabolitos secundarios podrían ser los responsables de la actividad insecticida reportada.

Conclusion

Los resultados obtenidos en este trabajo corroboran que las plantas tropicales pueden ser fuente de nuevos insecticidas naturales. Se infiere, entonces, que la biodiversidad de las plantas del Parque Regional Natural Ucumarí -especialmente de las familias Ranunculaceae, Piperaceae y Solanaceae - puede ser una alterna-

tiva importante para la obtención de bioplaguicidas para el control de la broca del café. En el futuro, será necesario formular nuevos estudios sobre el aislamiento, purificación, identificación y bioactividad de los metabolitos secundarios aislados en este bioensayo, con el fin de obtener bioinsecticidas que se puedan emplear en el manejo integrado de la broca del café.

Agradecimientos

Los autores agradecen a COLCIENCIAS, al CIEBREG y a la Universidad Tecnológica de Pereira por el financiamiento parcial del proyecto. A la Corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER) por conceder el permiso de recolección de los materiales vegetales.

Literatura citada

- Autran, ES; Neves, IA; da Silva, CSB; Santos, GKN; da Câmara, CAG; Navarro, DMAF. 2009. Chemical composition, oviposition deterrent and larvicidal activities against *Aedes aegypti* of essential oils from *Piper arginatum* Jacq. (Piperaceae). *Bioresource Technology* 100: 2284-2288.
- Bustillo, A. 2002. El desarrollo de un programa de manejo integrado de la broca del café en Colombia. In *Memorias del curso internacional teórico-práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos de la broca del café*. Chinchiná, Colombia. CENICAFE. p. 115-121.
- Calderón, JS; Céspedes, CL; Rosas, R; Gómez-Garibay, F; Salazar, JR; Lina, L; Aranda, E; Kubo, I. 2001. Acetylcholinesterase and insect growth inhibitory activities of *Gutierrezia microcephala* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. *Z. Naturforschung C* 56: 382-394.
- Calle, J; Espinosa, A; Núñez, C; Bautista, E; Pinzón, R. 2004. Actividad insecticida del aceite esencial de *Myntostachys mollis* (HBK) Griseb y sus componentes. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas* 33: 137-144.
- Depieri, RA; Martínez, S; Menezes, JRAO. 2005. Compatibility of the fungus *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycetes) with extracts of Neem seeds and leaves and the emulsible oil. *Neotropical Entomology* 34: 601-606.
- Gómez, J; Guarín, A; Acuña, R. 2007. Evaluación de mortalidad de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytidae) con extractos vegetales crudos incorporados en dieta meridica. In *Resúmenes XXXIV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología*. 126 p.
- Jaramillo, J; Chabi-Olaye, A; Borgemeister, C; Kamonjo, C; Poehling, HM; Vega FE. 2009. Where to sample? Ecological implications of sampling strata in determining abundance and impact of natural enemies of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Biological Control* 45: 245-253.
- Jaramillo, J; Borgemeister, C; Baker, PS. 2006. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research* 96: 223-233.
- Isman, MB. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review Entomology* 51: 45-46.
- Kim, DK; Park, JD; Kim, SG; Kuk, H; Jamg, MS; Kim, SS. 2005. Screening of some crude plant extracts for their acaricidal and insecticidal efficacies. *Journal Asia-Pacific Entomology* 8: 93-100.
- Liu, CH; Mishra, AK; Tan, RX; Tang, C; Yang, H; Shen, YF. 2006. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. *Bioresource Technology* 97:1969-1973.
- López-Olguín, JF; Sánchez-Pérez, A; Aragón, AG; Pérez, RA; Huerta, AP; Tapia, AMR. 2006. Evaluación de extractos acuosos de Meliaceae para el manejo de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: scolytidae). In *Resúmenes XXXIII Congreso Scololen*, 26 - 28 de julio 2006. Manizales, Colombia. 126 p.
- Mitchell, SA; Ahmad, MH. 2006. A review of medicinal plant research in the University of West Indies, Jamaica, 1948-2001. *West Indian Medical Journal* 55: 243-269.
- Morais, SL; Alves, VF; Medeiros, LB; Barreira, ESC; Dos Anjos, JFJ; Ferreira, AS; De Brito, ES; Souza, MAN. 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 35:670-675.
- Niño, J; Bustamante, AM; Correa, YM; Mosquera, OM. 2007. Evaluación de extractos vegetales para el control de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari). *Scientia et Technica* 33:383-385.
- Niño, J; Correa, YM; Mosquera, OM. 2006. Antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombian biodiversity. *Pharmaceutical Biology* 44(1):4-18.
- Park, BS; Lee, SE; Choi, WS; Jeong, ChY; Song, Ch; Cho, KY. 2002. Insecticidal and acaricidal activity of piperonaline and piperoctadecalidine derived from dried fruits of *Piper longum* L. *Crop Protection* 21: 249-251.
- Pungitore, CR; García, M; Gianello, JC; Sosa, ME; Tonn, CE. 2003. Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbernaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 41:433-443.
- Poveda, M; Soriano, J; Villalba, D. 2006. Evaluación de la eficacia del insecticida Rimon 10 EC para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). In *Memorias XXXIII Congreso de Entomología*, Manizales, CO, 26-28 julio 2006. p. 102-111.
- Ramírez, S. 2004. Manual de biopesticidas: tecnología para protección de cultivos. 2 ed. La Paz, Bolivia, Proyecto Agroforestal C-23. p. 3-49.
- Romero, JV; Cortina, HA. 2007. Life tables of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on three coffee accessions. *Revista Colombiana de Entomología* 33: 10-16.
- Sánchez, L; Rodríguez, MG. 2008. Potencialidades de *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar cepa HC1 para el manejo de *Hypothenemus hampei* Ferr. II. Compatibilidad con *Beauveria Bassiana* (Bálsamo) Vuillemin y Endosulfan. *Revista Protección Vegetal* 23:104-111.
- Valencia, O; Silva, J; Barrera, M; Isaza, JH. 2007. Actividad insecticida de extractos de *Bocconia frutescens* sobre *Hypothenemus hampei* Ferrari. *Scientia et Technica* 33:251-252.
- Wagner, H; Bladt, S. 1996. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. 2 ed. Berlin, DE, Springer-Verlag. 360 p.
- Zar, JH. 1999. Bio-statistical analysis. 4 ed. New Jersey, US, Prentice Hall. 929 p.