

CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* (Ferrari) CON
EXTRACTOS VEGETALES DE PLANTAS DE LA FLORA REGIONAL

LINA MARCELA HENAO BETANCUR

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD DE TECNOLOGIA

ESCUELA DE TECNOLOGIA QUIMICA

PEREIRA

2008

1

CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ *Hypothenemus hampei* (Ferrari) POR
EXTRACTOS VEGETALES DE PLANTAS DE LA FLORA REGIONAL

LINA MARCELA HENAO BETANCUR

PROYECTO DE GRADO PARA OBTENER EL TITULO DE TECNOLOGO EN
QUIMICA

DIRECTOR DEL PROYECTO

JAIME NIÑO OSORIO

UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGIA
ESCUELA DE TECNOLOGIA QUIMICA PEREIRA

2008

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y a la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) por apoyarme en el proceso de adquirir la oportunidad de adquirir los conocimientos para afrontar este proyecto y los demás retos profesionales que en el ejercicio de mi carrera pueda encontrar.

Al grupo de Biotecnología-Productos Naturales (GBPN) y al Centro de investigación y Estudios en Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIEBREG) por aportar los recursos logísticos, académicos económicos para la realización del proyecto.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABLAS.....	IV
LISTA DE ANEXOS.....	V
1. INTRODUCCION.....	2
2. MARCO TEORICO.....	3
2.1. Zona de estudio.....	3
2.2. EL CAFÉ.....	3
2.2.1. Breve historia del café.....	3
2.2.2. Tipos de café.....	4
2.2.3. Composición del café.....	5
2.3. ASPECTOS BASICOS SOBRE LA BROCA DEL CAFE.....	6
2.3.1. Aparición de la broca del café.....	6
2.3.2. Descripción del ciclo de la broca.....	8
2.3.3. Efectos del ataque de la broca sobre el café.....	9
2.4. CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ.....	9
2.4.1. Control manual.....	9
2.4.2. Control Cultural.....	10
2.4.3. Control biológico.....	10
2.4.4. Control químico.....	11
2.4.5. Control con trampas.....	12

2.5. DESCRIPCION DE LAS FAMILIAS.....	13
2.5.1. Familia Apiaceae.....	13
2.5.2. Familia Asclepiadaceae.....	13
2.5.3. Familia Cluciaceae.....	14
2.5.4. Familia Laureaceae.....	14
2.5.5. Familia Melastomataceae.....	14
2.5.6. Familia Moraceae.....	15
2.5.7. Familia Passifloraceae.....	15
2.5.8. Familia piperaceae.....	16
2.5.9. Familia Ranunculaceae.....	16
2.5.10. Familia Rubiaceae.....	17
2.5.11. Familia Solanaceae.....	17
2.5.12. Familia Urticaceae.....	18
2.6. INSECTICIDAS NATURALES.....	19
3. JUSTIFICACION.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos específicos.....	22
5. SECCION EXPERIMENTAL.....	23
5.1. DESCRIPCION DE LAS CONDICIONES BIOFISICAS DONDE SE REALIZO LA PARTE EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO.....	23
5.2. MATERIALES.....	23
5.2.1. Material vegetal.....	23
5.2.2. Material biológico.....	23
5.2.3. Controles.....	24
5.3. REACTIVOS.....	24
5.4. METODOS.....	25
5.4.1. Extracción del material vegetal.....	25
5.4.2. Marcha fitoquímica aplicada a los extractos crudos de hexano, diclorometano y metanol.....	n- 26

5.4.3. Dieta artificial (CENIBROCA D-200).....	27
5.4.4. Preparación de soluciones patrones de los extractos de metanol y diclorometano.....	28

5.4.5. Determinación de la actividad insecticida <i>in vitro</i> de extractos vegetales contra la broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>).....	29
5.4.6. Determinación de humedad.....	30
5.4.7. Toma de datos y método de análisis estadístico.....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSION.....	32
6.1. Recolección de plantas.....	32
6.2. Obtención y caracterización fitoquímica de los extractos....	33
6.3. ACTIVIDAD INSECTICIDA CONTRA LA BROCA DEL CAFÉ..	36
6.3.1. Extractos activos de Diclorometano y Metanol.....	36
6.3.3.1. Actividad insecticida de los extractos de diclorometano	36
6.3.1.2. Actividad insecticida de los extractos de metanol.....	36
7. CONCLUSIONES.....	48
8. RECOMENDACIONES.....	49

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
A. Procedimiento para preparación de dieta artificial.....	56
B. Datos estadísticos obtenidos del ensayo de broca con los extractos de diclorometano.....	57
C. Datos estadísticos obtenidos del ensayo de broca con los extractos de metanol.....	58

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Composición de los granos de café tostado.....	5
2. Taxonomía de la broca del café.....	6
3. Enemigos naturales de la broca del fruto del café.....	11
4. Extractos de plantas que presentan actividad insecticida.....	19
5. Extractos de plantas que presentan actividad insecticida repelente contra la broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>)....	20
6. Marcha fitoquímica realizada a los extractos crudos de <i>n</i> -hexano, diclorometano y metanol.....	26
7. Lista de las 23 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí.....	33
8. Resultados obtenidos de la marcha fitoquímica realizada a los extractos de n-Hexano, diclorometano y metanol de las plantas recolectadas en la ventana 2 del CIEBREG.....	38
9. Conglomerados conformados en los extractos de diclorometano.....	38
10. Conglomerados conformados en extractos de diclorometano (DCM) con mejor actividad insecticida contra la broca del café.....	38
11. Extractos mas activos de diclorometano (DCM).....	40
12. Conglomerados conformados en extractos de metanol.....	43
13. Conglomerados conformados en extractos de metanol con mejor actividad insecticida contra la broca del café.....	43
14. Extractos mas activos de metanol (MeOH).....	46

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Ciclo de vida de la broca del café <i>Hypothenemus hampei</i>	7
2. Hembra de broca del fruto del café (A); Macho de broca del fruto del café (B).....	8
3. (A) Broca atacada por un entomopatógeno; (B) Broca atacada por parasitoide	10
4. Trampa usada para capturar la broca.....	11
5. Aplicación de insecticida seleccionado.....	12
6. Procedimiento para la obtención de extractos.....	25
7. Procedimiento realizado para la desinfección de la broca utilizada en dieta artificial.....	27
8. Etapas de preparación de los extractos a evaluar a una concentración de 1000mg/L.....	28
9. Procedimiento realizado para los bioensayos de broca con los extractos obtenidos.....	29
10. Procedimiento realizado para determinación de humedad de los granos de café pergamino.....	30
11. Ubicación de ls sitios de recolección de las plantas en la ventana 2 de estudio del CIEBREG(Cuenca del rio Otún).....	32
12. Conglomerados obtenidos con extractos de diclorometano, repetición I.....	37
13. Conglomerados obtenidos con extractos de diclorometano, repetición II.....	37
14. Resultados de los extractos de diclorometano frente al ensayo de actividad insecticida contra la broca del café.....	39

15. Conglomerados obtenidos con extractos de metanol,	repetición I 42
16. Conglomerados obtenidos con extractos de metanol,	repetición II 42
17. Resultados de los extractos de diclorometano frente al ensayo de actividad insecticida contra la broca del café	44

RESUMEN

Debido a la gran importancia que tiene el cultivo del café tanto a nivel nacional, como a nivel mundial y a las pérdidas que produce la broca para este sector agrícola, se evaluaron los extractos crudos de diclorometano y metanol de 23 plantas recolectadas en el Parque Regional Natura Ucumari (PRNU), con el fin de determinar la actividad insecticida contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), de los cuales los que presentaron actividad insecticida y/o de repelencia fueron tres extractos de diclorometano de las especies indet. (UTP-19, Rubiaceae), *Clematis haenkeana* (UTP-156, Ranunculaceae) y *Piper Umbellatum* (UTP-163, Piperaceae) y tres extractos de metanol de las especies *Dunalia solanacea* (UTP-145, Solanaceae), *Topobea cf discolor* (UTP-160, Melastomataceae) y *Rodostemonodaphne* (UTP-162, Lauraceae).

La actividad insecticida detectada para estos extractos puede atribuirse a la presencia de núcleos fitoquímicos tales como: alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, sesquiterpenlactonas y cardenólidos presentes en dichos extractos.

ABSTRACT

Due to the great importance that has the cultivation of so much coffee at national level, as world and to the lost ones that it products the drill for this agricultural sector, the raw extracts of dichloromethane and methanol of plants were evaluated gathered in the Natural Regional Park Ucumari (PRNU), with the purpose of determing the insecticide activity against the drill of the coffee (*Hypothenemus hampei* Ferrari), the which is was found that those that presented the insecticide and/or repellent were three dichloromethane extracts of the species indet. (UTP-19, Rubiaceae), *Clematis haenkeana* (UTP-156, Ranunculaceae) and *Piper Umbellatum* (UTP-163, Piperaceae) and three methanol extracts of the species *Dunalia solanacea* (UTP-145, Solanaceae), *Topobea cf discolor* (UTP-160, Melastomataceae) and *Rodostemonodaphne* (UTP-162, Lauraceae).

The insecticide activity detected for these extracts can be attributed to the presence of nuclei such phytochemistry as: alkaloids, flavonoides, phenols, tannins and cardenólidos presents in this extracts.

1. INTRODUCCION

El café en Colombia, más que un producto agrícola de exportación, es ante todo un tejido social, cultural, institucional y político que ha servido de base para la estabilidad democrática y la integración nacional. Se estima que el cultivo del café, aporta 800 mil empleos directos anualmente equivalentes al 40% del empleo del sector agropecuario. Caldas es considerado uno de los departamentos más productivos de café en Colombia, ubicándose en los primeros puestos por cantidad y calidad. El cultivo del café en Colombia, es de gran importancia para la economía del país, por tanto cualquier problema fitosanitario que se presente podría afectar significativamente a este sector agrícola, (Baker, 1999)

Desde su aparición en Colombia en 1988, la Broca, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera Curculionidae: Scolytinae), se ha distribuido en todos los departamentos cafeteros, encontrándose prácticamente en mas de 800.000 hectáreas sembradas y convirtiéndose en la principal plaga de cultivo por sus efectos sobre la calidad del producto, la productividad y los costos de producción, (Bustillo et al., 1998).

Esta es una plaga exótica, originaria de África, razón por la cual no cuenta con los agentes benéficos que puedan restringir su desarrollo en los sitios donde se establece. Para su manejo, el Centro, Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafe (CENICAFE, 1990), recomienda un programa integrado que comprende prácticas culturales, recolecciones adecuadas y oportunas, renovación del cultivo, control biológico (con hongos entomopatógenos o con insectos parasitoides y controles químicos con insecticidas de baja toxicidad, (Bustillo et al., 1998).

La manera más racional y económica del control de la broca es a través del seguimiento de los principios del manejo integrado de plagas (MIP). El cual es un método ecológicamente orientado, que utiliza diversas técnicas de control,

combinadas armónicamente en un sistema de manejo de plagas, tratando de proteger, preservar e incrementar los agentes bióticos de mortalidad natural de la broca, (Bustillo et al., 1998). Sin embargo, es posible mejorar la eficacia en la implementación de los componentes del MIB a través de metodologías participativas que le ayuden al caficultor a comprender e integrar eficientemente los diferentes componentes de control (Aristizábal et al., 2002).

El objetivo de este trabajo fue el estudio de 23 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumari, en la búsqueda de extractos que presenten actividad insecticida contra la broca del café, que conduzcan al desarrollo de insecticidas naturales de bajo costo, para ser incluidos en los programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP), de este cultivo.

2. MARCO TEORICO

2.1 ZONA DE ESTUDIO

El Parque Regional Natural Ucumari es una reserva natural ubicada a unos 30 km al sureste de Pereira. Adjunta al Parque Nacional Los Nevados, la Reserva de Ucumarí cubre 42 km² de terreno perteneciente a la cuenca media del río Otún. La misión del parque es conservar el bosque andino dentro de una zona agrícola.

Tiene una extensión de 3986 hectáreas de bosque de niebla, presenta una temperatura promedio de 14°C, pluviosidad de 2600 mm/año, humedad del 87% y veredas ecológicas establecidas en su interior. El área se encuentra cubierta por un mosaico de bosque natural maduro poco intervenido, bosque secundario formado por regeneración natural y plantaciones, (Rangel and Garzón, 1994).

2.2 EL CAFE

2.2.1. Breve historia del café

El café es una bebida de carácter universal que se consume en todos los países del mundo. Sin embargo, el café como grano, es una semilla que procede del árbol o arbusto del cafeto, perteneciente al género *Coffea* de la familia Rubiaceae. El café es originario de Etiopía, en el África Oriental, exactamente en el territorio denominado «Kaffa», de cuyo nombre se deriva el café. En la edad media, el arbusto producía unas semillas aromáticas que los marineros africanos llevaron a la península de Arabia, país donde se originó el cultivo del café. Desde Arabia los peregrinos que se dirigían a la Meca lo llevaron a Europa, donde su consumo tardó bastante en ser aceptado y en extenderse, tal vez a causa de su color negro, (Peysson, 2001).

2.2.2. Tipos de café

La planta del café alcanza entre 2 y 12 metros de altura y puede llegar a vivir 50 años. Los granos de café o semillas, se hallan en el fruto del arbusto, que en el estado de madurez, son de color rojo y se le denomina cereza. Cada cereza posee una piel exterior que envuelve una pulpa dulce, debajo de la cual están los granos recubiertos por una delicada membrana dorada que envuelve las dos semillas de café. Existen dos especies de café importantes comercialmente. *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* P, las cuales se diferencian no solo genética y morfológicamente, si no por su composición química y cualidades organolépticas, (Quintero, 2000).

Cuando los frutos están en el estado óptimo de madurez se recolectan de manera manual, se despulpan, se fermentan, se lavan y se secan; este proceso se conoce como beneficio agrícola por vía húmeda. Posteriormente, el grano seco se trilla, para retirar la capa dorada que lo recubre. Una vez retirado el pergamino, el grano se selecciona y se clasifica cuidadosamente, teniendo en cuenta su tamaño, peso, color y defectos. Finalmente, estos granos seleccionados se tuestan para que desarrollen el sabor y aroma del café, se muelen y quedan listos para la preparación de la bebida. De tal manera que la producción de café tiene diferentes pasos importantes que determinan la calidad final del producto, (Echeverri et al., 2005).

La calidad del café colombiano se origina en las variedades de la especie *C. arabica* cultivadas, la localización geográfica y el clima de la zona cafetera colombiana, el manejo del cultivo, la cosecha de granos maduros de café y el beneficio húmedo, sistema que se utiliza para su proceso. Colombia produce café de las variedades Caturra, Colombia, Típica y Borbón principalmente, que exporta como mezclas de variedades de café almendra (*green coffe*), cuya proporción en

el café exportado depende de la producción de cada variedad en cada región cafetera y de la época de cosecha, (Hinman, 1993).

2.2.3. Composición del café

Los granos de café de las especies *C. arabica* y *C. canephora* tienen la composición que se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de los granos de café tostado (Porcentaje de base seca), (Viani, 1991).

Componentes	Especie	
	Arábica	Canephora
Cafeína	1,3%	2,4%
Minerales	4,5%	4,7%
Proteínas	10%	10%
Ácidos alifáticos	2,4%	2,5%
Ácidos clorogénicos	2,7%	3,1%
Carbohidratos	38%	41,5%
Lípidos	17%	11%
Trigonellinas	1%	0,7%
Aromas volátiles	0,1%	0,1%
Melanoidinas	23%	23%

En el café tostado se han identificado más de 700 sustancias volátiles, las cuales corresponde cerca del 0,1% del total de la materia, (Nishimura and Mihara, 1990) Las características químicas y el aroma de los constituyentes volátiles del café han sido motivo de importantes estudios; hoy en día se conocen cientos de aromas, que según los expertos superan las del vino, (Shimoda and Shibamoto, 1990).

El café también posee gran cantidad de contaminantes y sus concentraciones dependen de múltiples factores que intervienen en la selección, preparación y tostado del grano. Entre ellos se encuentran las parafinas, (Grob et al., 1991),

hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), trazas de N-nitrosaminas (N-nitrosopirrolidinas- NPYR) (Sen and Seaman, 1981), aminas heterocíclicas, residuos de pesticidas como organoclorados, organofosforados y micotoxinas, (McCarthy and McMullin, 1991; Terada et al., 1986).

2.3. ASPECTOS BASICOS SOBRE LA BROCA DEL CAFE

2.3.1. Aparición de la broca del café.

La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) es el insecto plaga mas importante de la caficultora, (Bustillo, 2002). Desde su introducción a Colombia en 1988 se ha extendido a más de la mitad del área cafetera causando pérdidas considerables que amenazan esta industria agrícola. Es una plaga muy perjudicial porque ataca y daña los granos de café. El insecto perfora el ombligo de los frutos verdes, maduros y sobre maduros y se alimenta de la almendra (semilla) del café, el daño lo hace al perforar las cerezas y completar su ciclo de vida internamente; esto ocasiona un daño directo al grano debido a las galerías que hace en el interior de la semilla para la alimentación de larvas y adultos, (CENICAFE, 1990).

En la tabla 2 se presenta la clasificación taxonómica correspondiente a la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleóptera Curculionidae: Scolytinae)

Tabla 2. Taxonomía de la broca del café, (Rubio et al., 2007).

Clasificación taxonómica	
Reino	Animal
Clase	Insecta
Orden	Coleóptera
Familia	Scolytinae
Género	<i>Hypothenemus</i>
Especie	<i>Hypothenemus hampei</i>

2.3.2 Descripción del ciclo de la broca

En el campo, una hembra penetra la depresión distal u ombligo del fruto; cuando la broca ataca frutos en estado verde espera hasta cuando el contenido de humedad sea apropiado antes de depositar los huevos.

La hembra pone hasta 70 huevos en diferentes frutos; los cuales eclosionan en 7,6 días y de ellos emergen las larvas que son de color crema y miden 0,8 cm de largo; las larvas se alimentan de los tejidos de la almendra y su duración es aproximadamente de 15 días.

La siguiente fase es la de pupa, son de color blanco, parecidas a granos de arroz. En la cabeza se notan claramente la parte bucal y las antenas. En el tórax se aprecian los élitros (alas) y en la parte ventral se observan las patas. En promedio, el estado de pupa dura de 6,4 días, (Bustillo et al., 1998).

Se completa el desarrollo total desde huevo hasta adulto en un promedio de 27,5 días a 24,5°C, el cual presenta una coloración castaño clara. A los tres o cuatro días de permanecer en el interior del grano donde nacieron se tornan más oscuros y maduran sexualmente como se muestra en la figura 1.

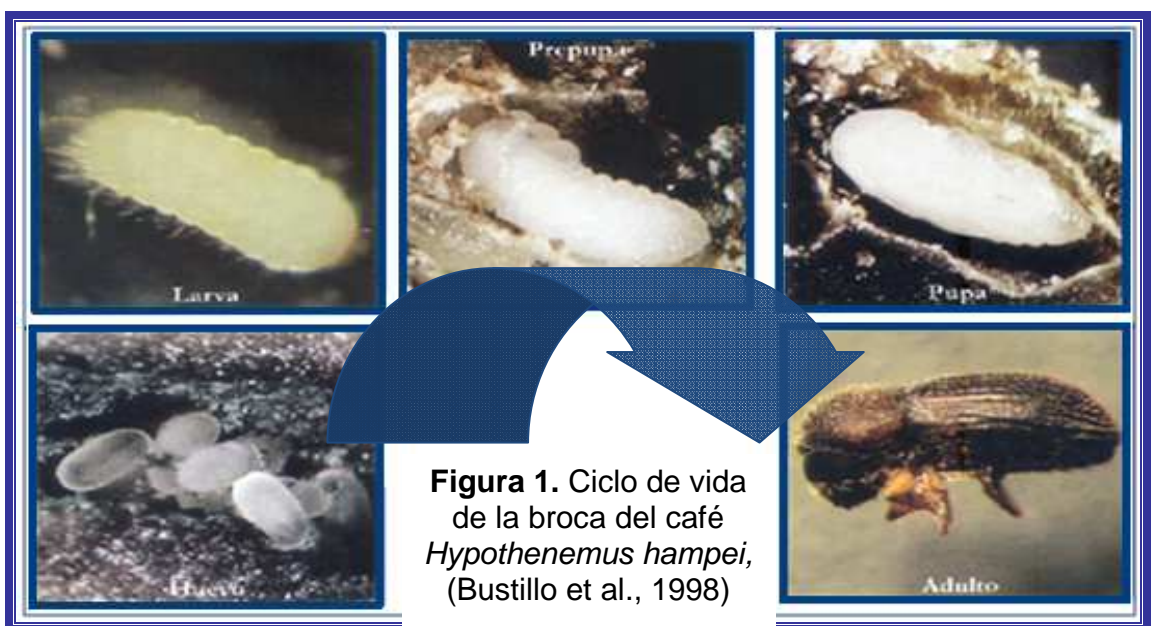


Figura 1. Ciclo de vida de la broca del café *Hypothenemus hampei*, (Bustillo et al., 1998)

Las hembras miden alrededor de 1,6 mm de largo y 0,7 mm de ancho. Son de cuerpo cilíndrico, ligeramente encorvado hacia la región ventral y de color negro brillante. La hembra es capaz de volar cortas distancias y vive hasta por cinco meses, su función es la de poner huevos y esta sale del grano donde nace y puede dañar otros granos, como se presenta en la parte A de la figura 2.

El macho, es de menor tamaño que la hembra, mide 1,1 mm de largo y 0,5 mm ancho como se muestra en la parte B de la figura 2. Además, posee vestigios de alas membranosas que le impiden volar, vive hasta por 2 meses y su única función es la de fecundar a las hembras, pues este muere en el mismo grano, (Decazy 1990).

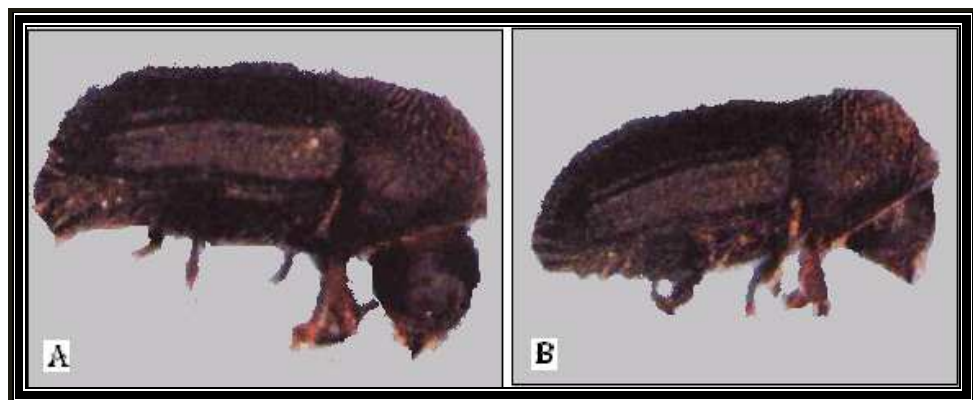


Figura 2. Hembra de broca del fruto del café (A); Macho de broca del fruto del café (B), (Decazy, 1990).

2.3.3. Efectos del ataque de la broca sobre el café.

Las pérdidas del café, como consecuencia del ataque de la broca, se deben a los siguientes aspectos:

- El fruto joven perforado puede caer al suelo en cantidades apreciables.
- El fruto verde y maduro atacado, que no cae, pierde peso en proporción al grado de infestación.

- Los granos perforados por la broca producen una alta proporción de café vano, de poco peso y muy baja calidad.
- La pérdida de peso de los frutos brocados significa una disminución apreciable en los rendimientos de la cosecha. La mala apariencia de los frutos brocados, por otra parte, dificulta su venta y son castigados en el precio (CENICAFE, 1990).

2.4. CONTROL DE LA BROCA DEL CAFÉ

La broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari, es la plaga más perjudicial para la caficultura regional y mundial, pues es muy difícil de controlar debido a su hábito de permanecer oculta dentro de las galerías en los frutos del café, (Baker, 1999). Coloniza los frutos durante su maduración y destruye gran parte de la cosecha en un tiempo corto. El control de la broca se realiza mediante un programa de MANEJO INTEGRADO DE BROCA (MIB) que comprende varias tácticas y opciones con la combinación de los controles culturales, biológicos y químicos, (Bustillo et al., 1998).

Dentro de las estrategias diseñadas para el manejo integrado de la broca (MIB) se ha incluido el control cultural, biológico y químico. El análisis de la estructura de costos de producción en café muestra que este control puede representar 7,1% del total, es decir, aproximadamente \$ 300.000 dólares por ha/año (Duque, 2001).

2.4.1. Control manual

- A principios de la cosecha, se deben granear los frutos atacados por la broca y transferirlos a un recipiente con agua hirviendo para su destrucción.
- Al final de la cosecha, hacer un buen graneado final o repela, cosechando todos los frutos que se encuentren en la planta.
- Finalizada la cosecha, coleccionar todos los granos que estén en el suelo.

En Colombia esta práctica es conocida como el Re-Re (Salazar, 1993).

2.4.2. Control Cultural

Tiene como finalidad crear un ambiente no apto para el insecto y que a la vez mantenga el cafetal renovado y productivo. En estas plantaciones, controlar la broca es más sencillo, además de obtener mayor productividad.

Entre las prácticas a realizar están la poda, deshija y arreglo de sombra pues a la broca le incomodan los cafetales "abiertos". La fertilización y el manejo de malezas son prácticas que se deben incluir dentro un programa de control cultural de la broca del fruto del café, (Bustillo et al., 1998).

2.4.3. Control biológico

La broca tiene enemigos naturales como algunos parasitoides y entomopatógenos que la destruyen en sus diferentes estados de desarrollo, en la figura 3 se muestran detalles de la broca atacada por dichos enemigos.

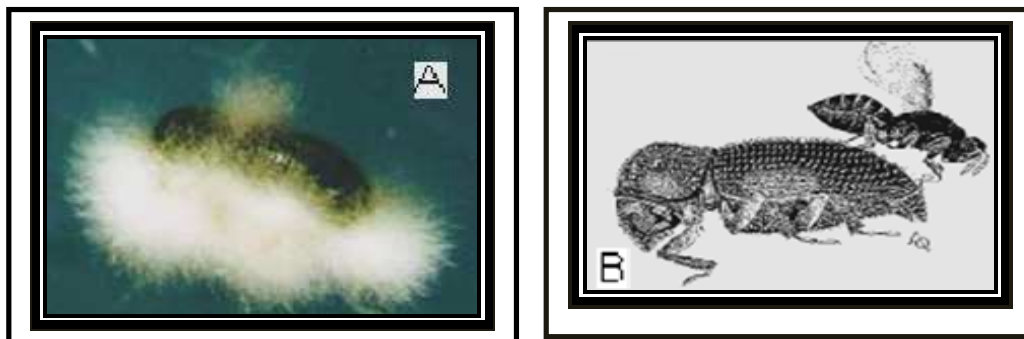


Figura 3. (A) Broca atacada por un entomopatógeno; (B) Broca atacada por un parasitoide, (Bustillo, 2002).

Dentro del grupo de parasitoides se cuenta con avispas como *Heterospilus coffeicola*, *Prorops nasuta*, *Cephalonomia stephanoderis* y dentro de los entomopatógenos con *Beauveria bassiana* y *Metarrizhium anisoplae* como se muestra en la tabla 3

Tabla 3. Enemigos naturales de la broca del fruto del café, (Bustillo et al 1998).

Plaga	Nombre científico	Estado biológico que ataca	Hábito
Broca del café <i>Hypothenemus hampei</i> (Ferrari)	<i>Heterospilus coffeicola</i>	Adultos	Parasitoide
	<i>Prorops nasuta</i>	Huevos, larvas y pupas	Parasitoide
	<i>Cephalonomia stephanoderis</i>	Huevos , larvas y pupas	Parasitoide
	<i>Metarrhizium anisopliae</i>	Larvas, pupas y adultos	Hongo entomopatógeno
	<i>Beauveria bassiana</i>	Larvas, pupas y adultos	Hongo entomopatógeno

2.4.4. Control con trampas

Durante los últimos años se han mejorado los prototipos de trampas para capturar la broca en los cafetales. Las trampas usadas en la producción convencional llevan adentro pequeñas botellas con, o mezclas alcoholicas, para atraer los insectos, como se muestra en la figura 4. En Colombia, el uso de las trampas de alcoholes se ha venido evaluando bajo un esquema de investigación participativa desde 1998, logrando capturas de hasta 300 hembras de broca por trampa por semana (Aristizábal et al., 2002).



Figura 4. Trampa usada para capturar la broca.

2.4.5. Control químico

Es una de las alternativas a usar y solamente en caso que después de haber aplicado todas las técnicas de control antes descritas, el muestreo determina la necesidad de aplicar un insecticida. Los insecticidas más usados son Endosulfan, Lorsban y Sumithion.

La aplicación de insecticida seleccionado por el agricultor se ilustra en la figura 5 y se aplica de la siguiente manera:

- Utilizar un producto específico recomendado.
- Aplicarlo en el momento oportuno.
- Emplearlo solo en lugares con alta presencia del insecto.
- Seguir recomendaciones y advertencias de uso en cuanto a manejo y concentración
- Usar equipo adecuado y buena protección personal

El control químico debe ser racional para no contaminar el ambiente y evitar residuos tóxicos en el grano.



Figura 5. Aplicación de insecticida seleccionado.

2.5. DESCRIPCION DE LAS FAMILIAS BOTANICAS ESTUDIADAS

A continuación se hará una descripción botánica general de las familias de plantas, las cuales fueron recolectadas para este estudio.

2.5.1. Familia Apiaceae

La familia Apiaceae, tratada como Umbelliferae en diversos artículos y textos, agrupa más de 250 géneros y más de 2.500 especies, las que se encuentran ampliamente difundidas en el mundo, aunque la mayoría tiene su origen en las zonas templadas del hemisferio norte. La principal característica distintiva de la familia es que son plantas aromáticas, con un olor y sabor anisado, un tanto variable entre las especies, pero muy típico. En general, son plantas herbáceas, arrosetadas, de hojas alternadas, de lámina finamente dividida y con pecíolo en la base. La zanahoria y el apio son las especies más significativas dentro de este grupo de plantas, (Kraup, 1997).

2.5.2. Familia Asclepiadaceae

Esta familia esta compuesta de plantas herbáceas, o mas comúnmente arbustivas, a menudo crasas; hojas sencillas, enteras opuestas y sin estípulas; las flores se disponen en inflorescencia de tipo definido en climas corimbiformes o umbeliformes, o también en racimos o panojas; flores actinomorfas, corola generalmente contorta en el capullo, raras veces de estivación valvar, estambres libres o con mayor frecuencia unidos al gineceo. Para formar un ginostegio; ovarios súpero bicarpelar constituido por dos lóbulos separados, (García, 1992).

2.5.3. Familia Clusiaceae

La familia Clusiaceae también conocida como Guttiferae, consiste de unos 50 géneros y 1200 especies distribuidas en las zonas tropicales y templadas, esta constituida por árboles, arbustos o hierbas, resinosos. Hojas opuestas, sin estípulas. Flores perfectas o unisexuales. Pétalos libres o connatos, imbricados o convolutos; numerosos estambres libres o connatos en fascículos; ovario súpero,

lúculos y estilos libres en igual número que carpelos, numerosos óvulos. Fruto capsular, drupáceo o bacciforme. De esta familia el género *Clusia* es el mas importante, por ser medicinal y estar mejor representado en la flora colombiana, (Buitrón 1989).

2.5.4. Familia Laureaceae

Las flores de la familia Laureacea son comúnmente hermafroditas y dispuestas en racimos a veces en cimas dicótomas; la flor típica contiene los cuatro verticilos de estambres rara vez fértiles todos, comúnmente los mas internos son estaminoideos como el género *Persea*. Todas las laureaceas contienen células productoras de esencia en la corteza, el leño, las hojas y los frutos; generalmente al lado de los depósitos oleíferos (esencia) se encuentran células sintetizadoras de mucílago.

Esta familia esta representada por más de un millar de especies, principalmente en los países tropicales y subtropicales. Se ha encontrado que especies pertenecientes a esta familia presentan actividades vermífugas, antibacteriales, antioxidantes y repelentes, (García, 1992).

2.5.5. Familia Melastomataceae

La familia Melastomataceae esta representada por árboles, arbustos, bejucos y yerbas de hojas opuestas y con indumento muy a menudo característico, sin estípulas; las hojas presentan con gran frecuencia, además del nervio medio, de 2 a 8 nervios laterales (curvinerviados) que corren arqueados a lo largo del limbo. Esta familia comprende muchos géneros muy ricos en especies. Hay algunos de estos maderables y casi todos en el país son de una belleza incomparable tanto por su porte como por sus bellas flores que frecuentemente durante la floración cambian de color en tonos morados y púrpura como *Tibouchina*, *Meriania*, (García, 1992).

2.5.6. Familia Moraceae

La familia Moraceae esta compuesta por árboles o arbustos, raras veces yerbas; terrestres o epifíticos, generalmente con látex blanco; hojas alternas, simples estipuladas, flores diminutas monoicas o dioicas en amentos, cabezuelas en un receptáculo aplanado o en el interior de un receptáculo cerrado, perianto masculino con dos o cuatro lóbulos o segmentos, tubular o ausente, estambres de uno a cuatro, pétalos ausentes; flores femeninas con perianto 3-5 partido o tutelar con una pequeña abertura apical; ovario unilocular o bilocular, semillas pequeñas o grandes con endosperma escaso o nulo. Muchas especies de esta familia tienen gran importancia tanto medicinal como industrial, (García, 1992).

2.5.7. Familia Passifloraceae

La familia Pasifloraceae son lianas o enredaderas que trepan por medio de zarcillos, aunque existen especies arbóreas o arbustivas. Sus hojas son alternas y con estípulas. Los pecíolos pueden o no llevar glándulas, las cuales pueden ser sésiles o estipitadas y casi siempre pareadas. Las láminas foliares generalmente son enteras o 2-3 lobadas. Las flores tienen un androginóforo prominente, con menos frecuencia solamente ginóforo, y en pocas especies el ovario es sésil. Poseen una corona extraestaminal bien desarrollada, que ayuda a atraer polinizadores, aunque en algunas especies se reduce a una fila de pequeños tubérculos o dienteclillos. Los frutos son bayas o raramente cápsulas. Las especies de esta familia tienen distribución pantropical y comprenden 17 géneros y aproximadamente 660 especies. En América se encuentran representadas por cuatro géneros (*Ancistrothyrus*, *Dilkea*, *Mitostemma* y *Passiflora*) con alrededor de 500 especies, la mayoría de ellas del género *Passiflora*, (Escobar, 1988).

2.5.8. Familia Piperaceae

Los individuos de esta familia pueden ser, arbustos, frútices o yerbas, mas frecuentemente entre nosotros son arbustos; crecen por lo regular en lugares húmedos y sombreados y es una de las familias que se cuentan con mayor

número de especies, pues crecen en climas calidos, medios o fríos. Tallos nodosos, hojas esparcidas, flores en inflorescencias densas en espigas o en racimos; androceo en 1-10 estambres y gineceo de 1-4 carpejos, generalmente tricarpelar; ovario unilocular, con un rudimento seminal ortótropo de inserción basal; fruto en baya o en drupa; semillas con embrión muy pequeño. En la flora colombiana la familia Piperaceae esta conformada por los géneros *Piper*, *Peperonia*, *Trianopiper* y *Pothomorphe*, con mas de 400 especies, algunas de estas conocidas por sus propiedades dentífricas y hemostáticas, (García, 1992).

2.5.9. Familia Ranunculaceae

Plantas en general herbáceas, anuales o perennes, con frecuencia rizomatosas. Hojas con disposición diversa, generalmente sin estípulas. Flores con perianto formado por 5 piezas, habitualmente vistoso, de simetría radiada (*Adonis*, *Ranunculus*) o con un solo plano de simetría (*Delphinium*). Androceo formado por numerosos estambres, gineceo súpero con uno o numerosos carpelos, casi siempre libres. Fruto normalmente en poliaquenio, cápsula o folículo.

En la flora colombiana la familia Ranunculacea esta conformada aproximadamente 50 géneros y 2000 especies, (Aizpuru et al., 1999).

2.5.10. Familia Rubiaceae

Pueden encontrarse en esta familia árboles o arbustos, hierbas o trepadoras. Poseen hojas opuestas, simples; estípulas generalmente interpeciolares, persistentes o caducas. Flores perfectas o unisexuales; cáliz con el tubo unido al ovario formando un hipanto, limbo con 4–5 dientes o lóbulos o espatulado; corola gamopétala, actinomorfa, infundibuliforme, campanulada o rotada, lóbulos usualmente 4–6, imbricados, valvados o abiertos; estambres en igual número y alternos con los lóbulos de la corola, insertos en el tubo de la corola, anteras dehiscentes por hendiduras longitudinales; ovario ínfero, usualmente 2-locular, coronado por un disco carnos, estilo simple o furcado con estigma terminal; numerosos óvulos en cada lóculo. El fruto puede ser una baya o una cápsula

La familia Rubiaceae es una de las más grandes de las plantas con flores, consta de unos 600 géneros y tal vez 10.000 especies. Su distribución es cosmopolita pero está mejor representada en las zonas tropicales, (Andersson, 1992).

2.5.11. Familia Solanaceae

Esta constituida por plantas herbáceas, árboles y arbustos. Hojas simples, alternas y sin estípulas. Flores formadas normalmente por 5 sépalos y 5 pétalos soldados en corolas de morfología diversa: rotácea en *Solanum*, tubulosa en *Datura*. Los estambres se insertan en el tubo de la corola y pueden presentar las anteras connadas. El fruto puede ser baya (*Solanum*) o cápsula (*Datura*). Esta compuesta por más de 1500 especies, difundidas particularmente en América del sur. En nuestro país son numerosísimas las especies de esta familia, pues crecen desde el nivel del mar hasta los tres mil metro de altura, ó sea en todos los climas. Tanto desde el punto de vista farmacéutico, como por la riqueza en alcaloides y otras sustancias, así por su valor económico y alimenticio, esta familia es una de las más importantes de la flora colombiana, (García, 1992).

2.5.12. Familia Urticaceae

Las familia Urticaceae son hierbas u ocasionalmente semiarbustos, rara vez pequeños árboles o lianas, a menudo con pelos urticantes especializados. Tienen hojas simples, opuestas o alternas, con tendencia a mineralizarse con sílice o carbonato de calcio.

Las flores de las especies pertenecientes a la familia Urticaceae son anemófilas, de distribución monoica, dioica (plantas macho y hembra en distinto pie) o polígama, pequeñas con inflorescencias axilares, con 4 ó 5 sépalos y 4 ó 5 estambres. Dentro de la familia Urticaceae se distinguen 45 géneros y 700 especies, ampliamente distribuidas en regiones tropicales y subtropicales y más escasas en regiones templadas y frías, (Mañas et al., 1990).

2.6. INSECTICIDAS NATURALES

A partir de la necesidad por encontrar nuevas alternativas naturales para el control de insectos plagas y reemplazar así los pesticidas sintéticos, aparecen los insecticidas botánicos ofreciendo seguridad al medio ambiente y una opción agronómica eficiente, (Calderón et al., 2001; González et al., 2002).

Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas con importancia contra insectos plagas. La selección de plantas que contengan metabolitos secundarios capaces de ser utilizados como insecticidas naturales deben ser de fácil cultivo y con principios activos potentes, con alta estabilidad química y óptima producción, (Calderón et al., 2001; González et al., 2002).

El uso de extractos de plantas como insecticidas data de la época del Imperio Romano. Sin embargo, sólo a partir de los años 30 del siglo pasado se produjeron los avances más importantes en el uso de los insecticidas como: nicotina, rotenona, cuasina y piretrinas. Estos progresos fueron seguidos por el desarrollo de los compuestos orgánicos de síntesis, incluyendo insecticidas clorados, fosforados y carbamatos, algunos de los cuales han sido retirados del mercado por tener efectos nefastos en el ambiente.

En la actualidad existen centenares de sustancias que se encuentran registrados en diversos países y hay tendencia hacia la elaboración de productos cada vez más específicos, cuyo objetivo es alterar sólo alguna de las fases del ciclo biológico del insecto, como por ejemplo, inhibir la formación de la cutícula, alterar la muda o la actividad de la hormona juvenil, entre otros. Las investigaciones destinadas a solucionar estos problemas se han orientado hacia la búsqueda de productos naturales capaces de apoyar la labor de los insecticidas sintéticos, disminuyendo sus efectos negativos, (Calderón et al., 2001; González et al.,

2002), en la tabla 4 se presentan algunas familias de plantas que han mostrado algún grado de actividad insecticida.

Tabla 4. Extractos de plantas que presentan actividad insecticida, (Ramírez 2004).

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMUN	PROPIEDADES
Alliaceae	<i>Allium sativum</i>	Ajo	Repelente, insecticida y fungicida. Actúa contra pulgones, cogolleros y roya del frijol.
Labiatae	<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca	Repelente e inhibidor del crecimiento de los insectos. Actúa contra pulgones, polillas y mosca blanca.
Meliaceae	<i>Melia azedarach</i>	Árbol del paraíso	Sus semillas tienen efecto insecticida, su toxina actúa por contacto o ingestión. Actúa contra pulgones, cogolleros y ácaros.
Urticaceae	<i>Urtica urens- urtica dioica</i>	Itapallo	Repelente que actúa sobre los pulgones, polillas y mariposa blanca.
Sapotaceae	<i>Pouteria sapota</i> L	Mamey o zapote	Insecticida, repelente y nematocida. Actúa contra moscas, garrapatas, piojos, cucarachas y niguas.
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	Tomate	Repelente y ayuda a evitar el desove de los insectos. Actúa contra pulgones, mariposa blanca y ácaros.
Simboroubaceae	<i>Quassia amara</i>	Quassia	Insecticida, nematocida y larvicida, y sus toxinas actúan por contacto e ingestión.

Además de las plantas mencionadas anteriormente, se han encontrado extractos de plantas que han sido utilizados como insecticidas y/o repelentes contra la broca del café, (*Hypothenemus hampei*), (Ver tabla 5).

Tabla 5. Extractos de plantas que presentan actividad insecticida y repelente contra la broca del café (*Hypothenemus hampei*), (Ramirez, 2004).

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMUN	PROPIEDADES
Solanaceae	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	Presenta actividad insecticida y de repelencia
	<i>Capsicum frutescens</i>	Ají	Presenta actividad de repelencia
Caprifolaceae	<i>Mintostachys mollis</i>	Cruz de muña ò Martin muña	Presenta actividad insecticida
Meliaceae	<i>Azadirachta indica</i>	Árbol de Neem	Presenta actividad de repelencia

3. JUSTIFICACION

Con la realización de este proyecto se pretende determinar el efecto de los extractos crudos de metanol y diclorometano de 23 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU), con el fin de evaluar la acción insecticida de los extractos contra la broca del café, con el propósito de obtener agentes menos contaminantes y gran efectividad en el control de esta plaga.

Se debe entender que no se erradicará la plaga y que la misma se mantendrá por siempre en los cafetales, por lo que es responsabilidad de técnicos y productores, desarrollar estrategias de control basada en los principios y alternativas del manejo integrado de plagas MIP, (Bustillo et al., 1998).

Dentro de las estrategias diseñadas para el manejo integrado de la broca (MIB) se ha incluido el control cultural, biológico y químico. El análisis de la estructura de costos de producción en el café, muestra que este control puede representar 7,1% del total de la producción por hectárea, es decir, aproximadamente \$ 300.000 dólares por ha/año, (Duque, 2001).

Entendiendo el componente socioeconómico que representa la caficultura colombiana, es de vital importancia realizar procesos de generación, desarrollo y transferencias de tecnologías del manejo de la broca del café y del cultivo, que le permita a los caficultores y a Colombia continuar produciendo un café de muy buena calidad, (Bustillo, 2002).

Incorporar un método de control de la broca dentro del MIP haría este manejo más eficiente y reduciría sus costos; de tal manera que el proceso de control biológico *in vitro* desarrollado con este trabajo, busca contribuir a los estudios realizados para el manejo integrado de broca (MIB).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad insecticida de los extractos de diclorometano y metanol de 23 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU), mediante ensayos *in vitro* con broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari).

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener los extractos de diclorometano y metanol de las plantas recolectadas.
- Caracterizar los metabolitos secundarios más representativos en los extractos, a través de la marcha fitoquímica por cromatografía en capa delgada (CCD)
- Evaluar la actividad insecticida *in vitro* de los extractos contra broca del café mediante ensayos con café pergamino.

5. SECCION EXPERIMENTAL

5.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CONDICIONES BIOFÍSICAS DONDE SE REALIZO LA PARTE EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

La parte experimental básica del proyecto fue realizado en el laboratorio del Grupo de Biotecnología Productos Naturales (GBPN) de la Escuela de Tecnología Química, de la Universidad Tecnológica de Pereira, sede la Julita, municipio de Pereira, que tiene las especificaciones biofísicas siguientes: Temperatura promedio de 22 °C, humedad relativa del 80%, precipitación promedio de 2400 mm/año y una altitud de 1340 msnm.

5.2. MATERIALES

5.2.1. Material vegetal

La recolección de las 23 plantas se efectuó en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU), por el grupo de Biotecnología-Productos Naturales, de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP). Para esta recolección se conto con la colaboración del taxónomo Francisco Javier Roldan (HUA, Medellín, Colombia). Las plantas recolectadas pertenecen a las familias Apiaceae, Asclepiadaceae, Clusiaceae, Lauraceae, Melastomataceae, Moraceae, Passifloraceae, Piperaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae y Urticaceae y de cada una hay depositado un ejemplar o voucher en el Herbario de la Universidad de Antioquia.

5.2.2. Material biológico

Para los ensayos de actividad insecticida se utilizaron granos de café pergamino y brocas adultas. Estos se obtuvieron del laboratorio de Biocafé, Chinchiná, Caldas.

5.3. REACTIVOS

La extracción del material vegetal se realizó con *n*-hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂) y metanol (CH₃OH), grado comercial y los solventes utilizados para preparar las soluciones patrón de los extractos fueron etanol (C₂H₅OH) grado analítico, *n*-butanol (C₄H₉OH) grado analítico y como control positivo endosulfan a 1mg/L (Mallinckrodt, USA).

5.4. METODOS

5.4.1. Extracción del material vegetal

Las 23 plantas recolectadas para el estudio, fueron sometidas a extracción por maceración con los solventes *n*-hexano, diclorometano y metanol como se describe en la figura 6, de los cuales se seleccionaron los extractos de diclorometano y metanol para realizar los ensayos correspondientes.

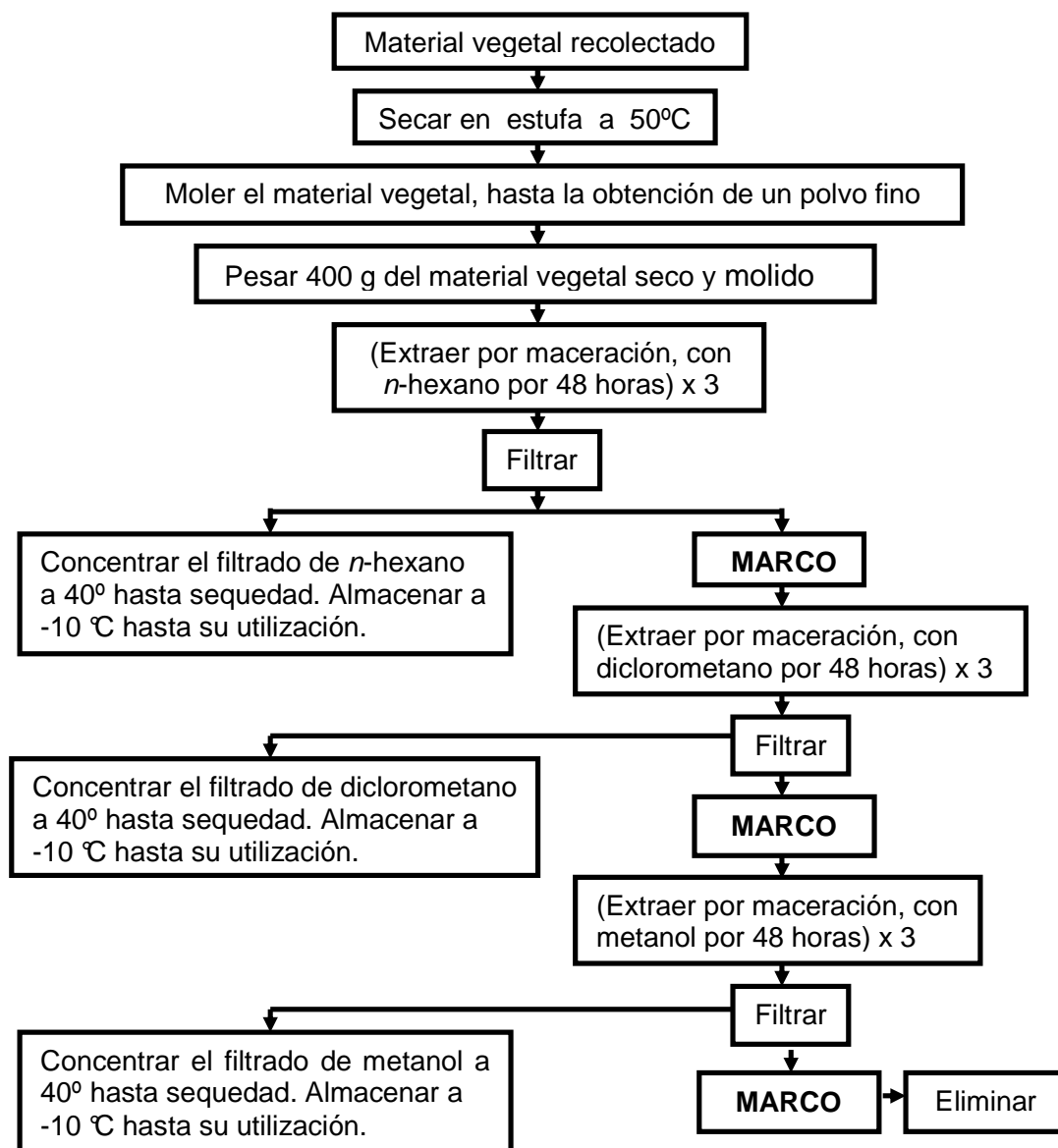


Figura 6. Procedimiento para la obtención de extractos crudos.

5.4.2. Marcha fitoquímica realizada a los extractos crudos de *n*-hexano, diclorometano y metanol

Con el fin de detectar los núcleos fitoquímicos presentes en los diferentes extractos crudos evaluados, fueron caracterizados a través de la marcha fitoquímica por cromatografía de placa delgada (CCD), siguiendo la metodología descrita por, (Stahl 1969).

Los solventes utilizados para la elución de las cromatoplasmas con los extractos polares fueron cloroformo-acetato de etilo-metanol (2:2:1) y para extractos apolares se utilizó *n*-hexano-acetato de etilo (7:3). En la tabla 6, se muestran los patrones y reveladores usados, para la identificación de los metabolitos secundarios. (Wagner and Bladt, 1996).

Para la marcha fitoquímica se utilizaron cromatofolios en aluminio (Merck, Alemania) de sílica gel 60F₂₅₄

Tabla 6. Patrones y Reveladores utilizados en CCD para la marcha fitoquímica.

Núcleo fitoquímico	Patrón (2000 mg/L)	Revelador
Alcaloides	Papaverina	Dragendorff
Terpenos	Taxol y lanosterol	Anisaldehído/ CH ₃ COOH-H ₂ SO ₄
Triterpenos		
Esteroides		
Flavonoides	Kaempferol	AlCl ₃ al 2% en EtOH absoluto
Taninos	Acido gálico y ácido tánico	FeCl ₃ al 5% en solución salina saturada
Fenoles		
Saponina esteroidales y triterpénicas	Patrón de diospolisaponina A	Vainillina 1% en EtOH-H ₂ SO ₄
Sesquiterpenlactonas	Digitoxina	Acido 3,5-dinitrobenzóico-MeOH-KOH

5.4.3. Dieta Artificial (CENIBROCA D-200)

La dieta artificial CENIBROCA D-200, (Portilla, 1999), fue usada como un medio de cría de broca, al permitir el desarrollo de esta en condiciones de laboratorio sin tener que depender directamente de los frutos de café, como se muestra en el anexo A.

El control de la humedad y la temperatura es de gran importancia pues son factores que causan daños en la realización del experimento, debido a la presencia de hongos entomopatógenos en la dieta o a la deshidratación de esta, impidiendo así la adecuada reproducción del insecto e interfiriendo en sus ciclos correspondientes.

Las brocas usadas para la infestación de la dieta artificial CENIBROCA D-200 se desinfectaron como se muestra en la figura 7.

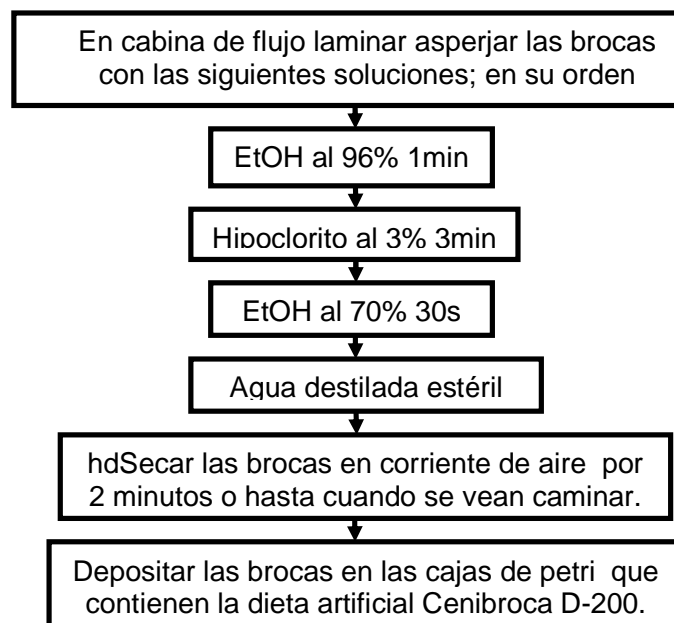


Figura 7. Procedimiento realizado para la desinfección de la broca utilizada en dieta artificial.

5.4.4 Preparación de soluciones patrones de los extractos de metanol y diclorometano

Para realizar el bioensayo *in vitro* de la actividad insecticida contra la broca se prepararon soluciones patrones de los extractos de metanol y diclorometano como se presenta en la figura 8.

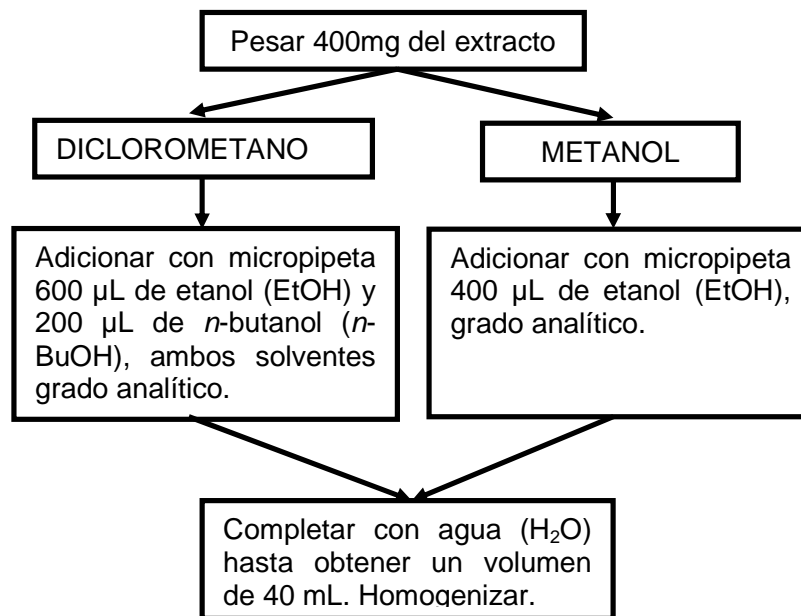


Figura 8. Etapas de la preparación de los extractos a evaluar a una concentración de 1000 mg/L

Los controles usados fueron los siguientes:

- Control positivo: Endosulfan a 1mg/L
- Control negativo: para los extractos metanólicos se usó etanol al 1% y para los extractos de diclorometano se empleó etanol al 1% y butanol al 0.5%
- Testigo absoluto: granos de café pergamino sin tratamiento alguno

5.4.5. Determinación de la actividad insecticida *in vitro* de extractos vegetales contra la broca del café (*Hypothenemus hampei*)

El bioensayo se realizó bajo condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) y humedad relativa ($75 \pm 5 \%$), utilizando como unidad experimental (UE) un tubo eppendorf, al interior del cual se transfirió un grano de café pergamino previamente desinfectado impregnado con el respectivo extracto a 1000 mg/L y una hembra adulta desinfectada previamente como se planteó en la figura 9. Se evaluaron cien (100) unidades experimentales por cada extracto. Cada día durante cuatro días se tomaron aleatoriamente 25 UE (Establecidos a través de Excel) observando si la broca perforo el grano o si estaba muerta en cada unidad experimental evaluada (UE), el ensayo se efectuó con dos repeticiones.

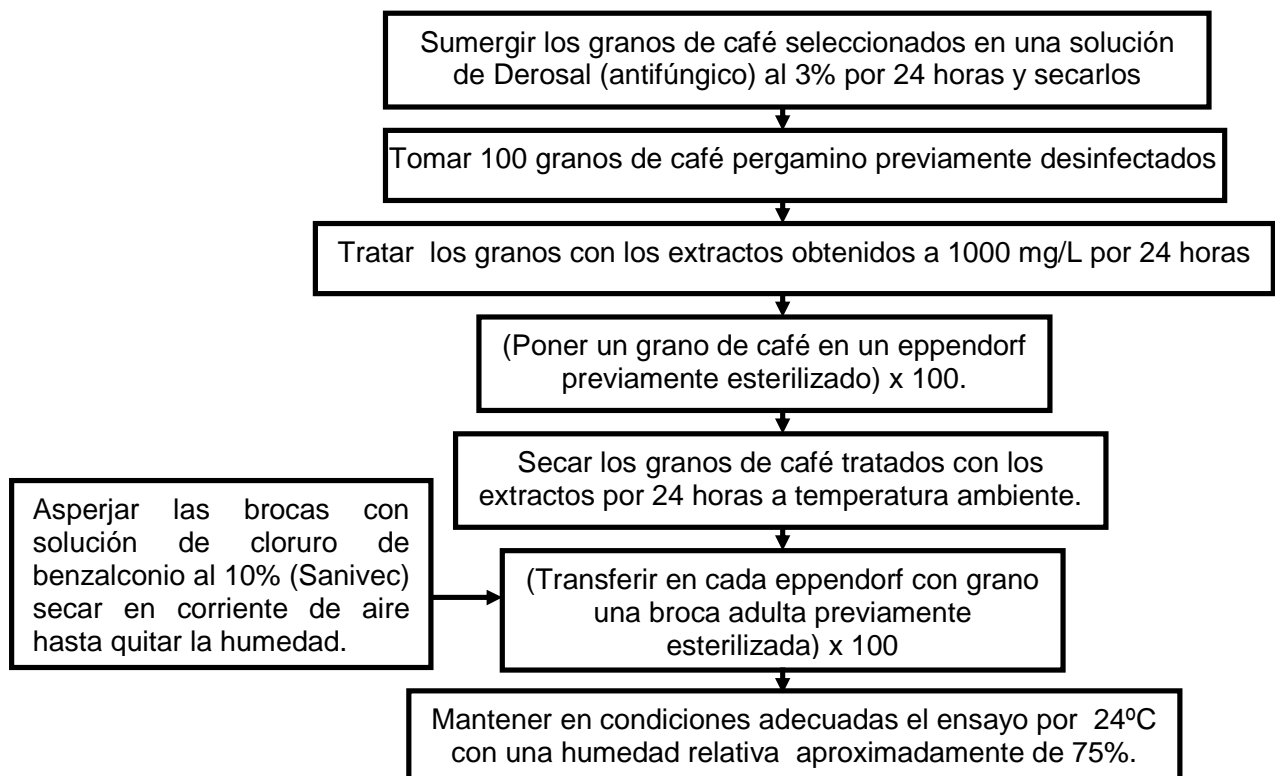


Figura 9. Procedimiento realizado para los bioensayos de broca con los extractos obtenidos.

5.4.6. Determinación de humedad

Durante la realización del experimento de evaluación de actividad insecticida *in vitro*, se determinó el porcentaje de humedad de los granos de café pergamino usados en el bioensayo fuera el adecuado. Para la determinación de humedad se llevo a cabo el procedimiento descrito por Ramírez,1993, como se muestra en la figura 10.

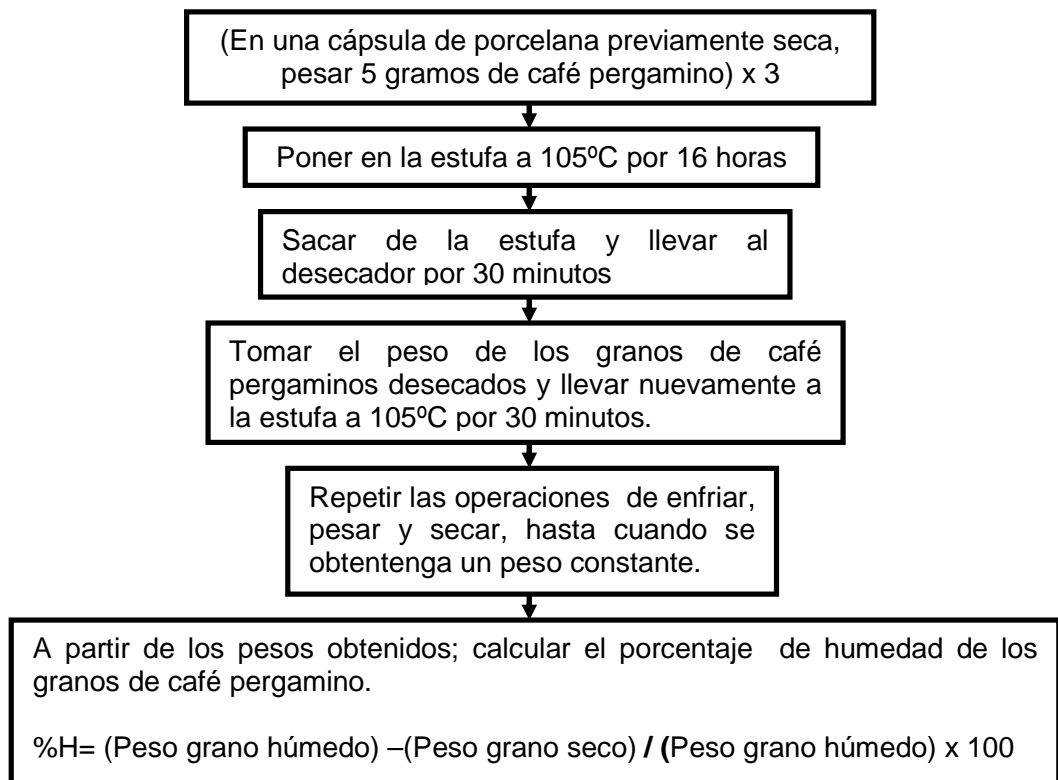


Figura 10. Procedimiento realizado para determinación de humedad de los granos de café pergamino (Ramírez ,1993).

5.4.7. Toma de datos y método de análisis estadístico

Se evaluaron cien (100) unidades experimentales por cada extracto. Cada día durante cuatro días se tomaron aleatoriamente 25 UE (Establecidos a través de Excel) observando si la broca perforo el grano o si estaba muerta en cada unidad experimental evaluada (UE), el ensayo se efectuó con dos repeticiones.

El análisis estadístico utilizado fue el método de conglomerados cuya finalidad es exploratoria en busca de obtener un mejor conocimiento de la estructura de las observaciones, en este caso de la acción de los extractos vegetales ensayados sobre la repelencia o actividad insecticida contra la broca del café.

El proceso de agrupamiento se llevó a cabo por el método de conglomerados, el cual reúne en una misma clase, unidades que aunque no son idénticas son semejantes, por lo cual necesitan de un algoritmo, que puede ser jerárquico o no jerárquico, para el análisis estadístico de los datos, se uso el software Infostat 2005 D.1. El cual es un análisis de conglomerados que requiere medir la similitud entre las unidades que se quieren agrupar, para esto se necesita utilizar una medida de distancia o similaridad entre unidades. Para este trabajo se utilizaron las medidas de distancia: Euclídea al Cuadrado y Manhattan.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Recolección de plantas

La recolección del material vegetal la realizó el Grupo de Biotecnología -Productos Naturales (GBPN) de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU), en la ventana 2 de estudio del CIEBREG. El 28 de junio del 2006 y en la figura 11 se muestran los puntos de muestreo y en la tabla 7 se presentan, la lista de las familias, las cuales serán evaluadas en el bioensayo de actividad insecticida contra la broca del café.

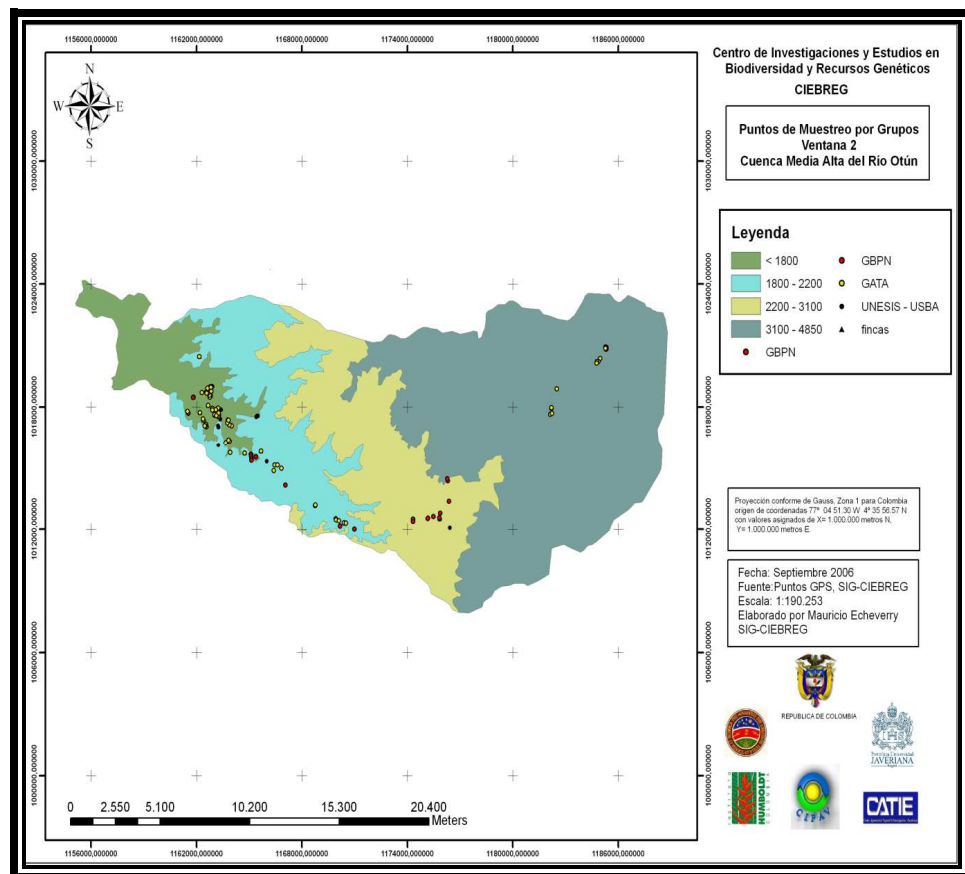


Figura 11. Ubicación de los sitios de recolección de las plantas en la ventana 2 de estudio del CIEBREG (Cuenca del río Otún)

Tabla 7. Lista de las 23 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU).

Familia	Nombre Científico	Voucher FJR	No. UTP
APIACEAE	<i>Arracacia elata</i>	4001	153
ASCLEPIADACEAE	<i>Blepharodon bifidus</i>	3999	151
CLUSIACEAE	<i>Clusia multiflora</i>	4006	157
	<i>Clusia sp</i>	4004	155
	<i>Tovomita guianensis</i>	4008	159
LAURACEAE	<i>Rodostemonodaphne</i>	4011	162
MELASTOMATACEAE	<i>Topobea cf discolor</i>	4009	160
PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora apoda</i>	3988	141
	<i>Passiflora antioquiensis</i>	4000	152
PIPERACEAE	<i>Peperomia acuminata</i>	4002	154
	<i>Piper eriopodon</i>	4007	158
	<i>Piper umbellatum</i>	4012	163
	<i>Piper pesaresanum</i>	3996	148
RANUNCULACEAE	<i>Thalictrum podocarpum</i>	3991	144
	<i>Clematis haenkeana</i>	4005	156
RUBIACEAE	Indet	3997	149
	<i>Palicourea petioaris</i>	3995	147
SOLANACEAE	<i>Dunalia solanacea</i>	3992	145
	<i>Lycianthes radiata</i>	3993	146
	<i>Solanum sp</i>	4010	161
URTICACEAE	<i>Boehmeria bullata</i>	3989	142
	<i>Phenax uliginosus</i>	3990	143
	<i>Urea ballotaefolia</i>	3998	150

6.2. Obtención y caracterización fitoquímica de los extractos

A los extractos crudos de *n*-hexano, diclorometano y metanol de las 23 plantas recolectadas en la ventana 2 de estudio del CIEBREG, obtenidos por maceración, según el procedimiento presentado en la figura 6, se le detectaron los núcleos fitoquímicos que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la marcha fitoquímica realizada a los extractos de *n*-hexano, diclorometano y metanol de las plantas recolectadas en la ventana 2 de estudio del CIEBREG.

UTP No	PRUEBA								
	Dragendorff			Anisaldehído/CH ₃ COOH-H ₂ SO ₄			Vainillina al 1% en EtOH-H ₂ SO ₄		
	Alcaloides			Terpenos, triterpenos y esteroides			Saponinas esteroidales y triterpénicas		
	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	<i>n</i> -Hexano	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	Ext. <i>n</i> -Hexano	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	<i>n</i> -Hexano
141	-	++	-	-	-	++	-	-	++
142	-	-	-	-	+	++	-	+	-
143	-	+	-	-	++	+	-	+	+
144	+++	+++	-	-	++	++	-	-	-
145	++	-	-	-	+	-	-	-	+
146	+++	-	-	-	+	++	-	++	++
147	++	-	-	-	++	++	-	-	+
148	+++	+++	+++	-	+	++	-	-	+
149	-	-	-	-	++	++	-	++	+
150	-	+	-	-	+	++	-	+	-
151	-	+	-	-	+	+++	-	++	-
152	+++	-	-	+++	++	+	+++	-	++
153	++	+	+	-	++	++	-	-	+
154	++	++	-	+++	-	+	+++	-	++
155	-	-	-	-	++	+++	-	-	++
156	-	-	-	+++	++	+	+++	++	-
157	-	-	-	-	++	+++	-	-	+++
158	+++	+	-	-	+	+	-	-	-
159	-	++	-	-	+	+++	-	-	++
160	-	-	-	++	++	+	++	++	+
161	+++	++	-	-	+	+	-	+	+
162	++	-	-	-	++	+	-	++	+
163	-	+	-	-	-	+	-	-	++
Control (+): Licorina y escopolamina [5000]ppm				Control (+): Lanosterol, estigmasterol y diosgenina [5000]ppm			Control (+): Patrón de diospolisaponina A [5000]ppm		

UTP No	PRUEBA								
	FeCl ₃ al 5% en HCl 0,5N			AlCl ₃ al 1% en EtOH absoluto			CTA		
	Fenoles y Taninos			Flavonoides			Sesquiterpenlactonas y cardenolidos		
	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	<i>n</i> -Hexano	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	<i>n</i> -Hexano	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	<i>n</i> -Hexano
141	-	++	+++	+	-	-	-	+	+
142	-	+	+	-	-	-	-	++	+++
143	-	+++	++	-	-	-	-	-	+
144	+	++	-	+++	+	-	+++	-	-
145	+	+	-	+	-	-	+	-	+
146	+	++	+	-	-	-	-	-	+
147	-	++	+	++	-	-	+++	-	++
148	++	+	+	+	-	-	-	-	++
149	+++	++	+	-	-	-	-	-	+
150	-	++	-	-	-	-	+	-	+
151	-	+	-	-	-	-	-	-	+
152	++	++	+	+++	-	-	-	-	-
153	-	++	+	+	-	-	++	+++	++
154	+	+	++	++	+	-	-	-	+
155	++	+	+	++	-	-	++	+	++
156	-	++	+	-	-	-	-	+	++
157	++	+	+	++	-	-	-	-	+++
158	-	+	-	-	-	-	-	+	-
159	+++	+	-	+++	+++	+++	-	-	-
160	+++	++	+	-	-	-	-	-	++
161	-	+	+	+	-	-	-	-	+
162	-	++	+	++	+	-	-	-	++
163	-	-	-	-	-	-	-	+	++
Control (+): Catecol [5000]ppm				Control (+): Extracto San Joaquin y extracto de Ruda			Control (+): Digoxina [2000]ppm		

(+) Presencia del núcleo (-) Ausencia del núcleo

6.3. ACTIVIDAD INSECTICIDA CONTRA LA BROCA DEL CAFÉ

6.3.1. Extractos activos de diclorometano y metanol

En cada experimento se calculó la proporción de broca perforada y de broca muerta por extracto y por repetición; además, se realizó un análisis de conglomerados para cada uno de ellos, tanto de los extractos de diclorometano como de metanol. De todos los conglomerados, se seleccionaron dos con base a que mostraron la menor proporción de perforación de la broca y la mayor proporción de broca muerta, como se presenta en el anexo B y el anexo C respectivamente; con esta información a mano, se seleccionaron los extractos más activos de cada experimento

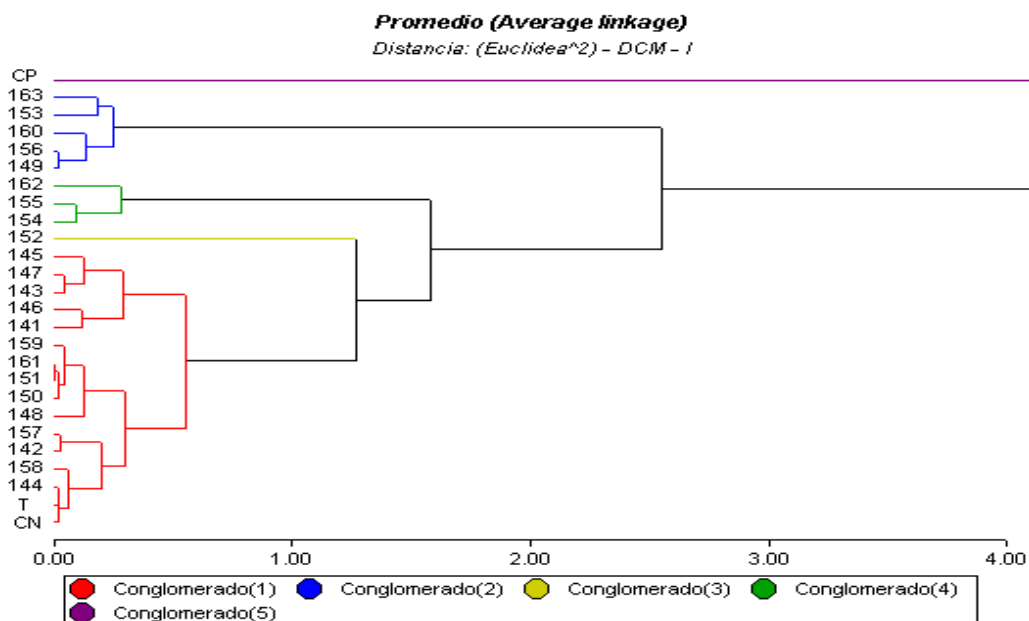
El coeficiente de correlación cofenético (CC) reportado para cada uno de los conglomerados, indica que el nivel de agrupamiento y el estadístico empleado fue el mas adecuado para hacer el análisis de los respectivos conglomerados.

Adicionalmente, a los granos de café pergamino utilizados en la realización de los experimentos de actividad insecticida, se determinó el porcentaje de humedad, el cual fue de 41%, antes de infestarlos con broca y de 40% después de la última revisión (4º día), el cual no varió considerablemente durante los cuatro días de duración del experimento. Esta determinación se hizo con el fin de verificar que las condiciones de humedad de los granos de café utilizados a lo largo del experimento fueron las mas adecuadas y homogéneas posibles, para que las brocas pudieran hacer la perforación.

6.3.1.1. Actividad insecticida de los extractos de Diclorometano

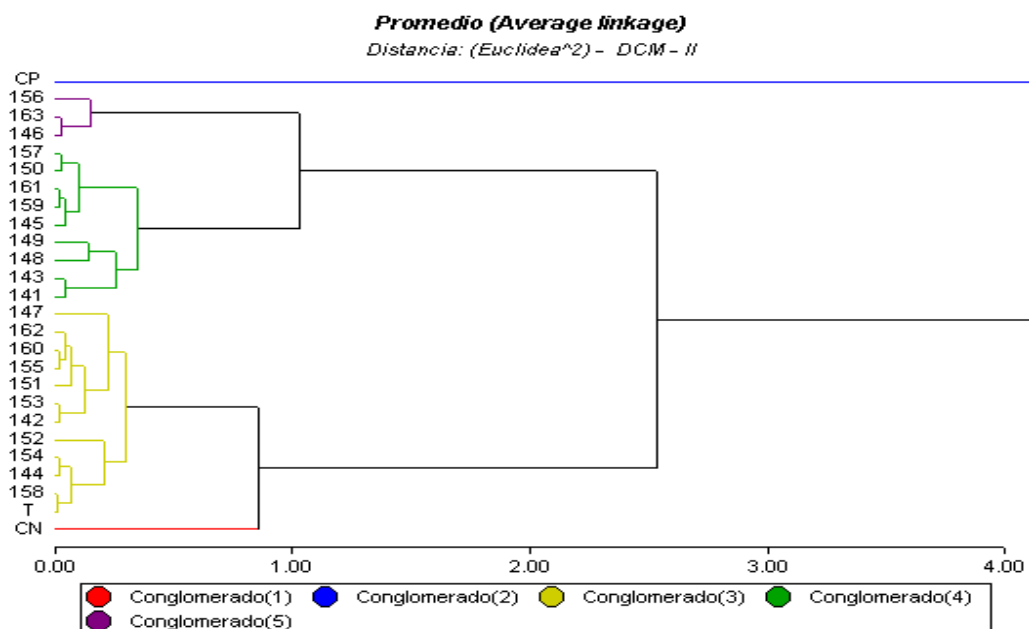
En las figuras 12,13 y en la tabla 9 se presentan los cinco conglomerados conformados de los extractos de diclorometano, de los cuales se seleccionaron los dos mejores conglomerados en donde se encontraban los extractos más activos,

pues presentaban el mayor porcentaje de broca muerta y el menor porcentaje de perforación.



CC = 0,971

Figura 12. Conglomerados obtenidos con extractos de diclorometano, repetición I



CC = 0,970

Figura 13. Conglomerados obtenidos con extractos de diclorometano, repetición II.

Tabla 9. Conglomerados conformados en los extractos de diclorometano

			Repetición	
			I	II
			Proporción	Proporción
Conglomerados DCM	1	Perforación	.51	.56
		Broca	.10	.06
	2	Perforación	.37	.21
		Broca	.15	.63
	3	Perforación	.58	.50
		Broca	.21	.10
	4	Perforación	.64	.41
		Broca	.08	.13
	5	Perforación	.10	.33
		Broca	.70	.13

Los dos mejores conglomerados seleccionados en ambas repeticiones se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Conglomerados conformados en extractos de diclorometano (DCM) con mejor actividad insecticida contra la broca del café

Conglomerados de DCM		Rep. I	Extractos	Conglomerados de DCM		Rep. II	Extractos
		Proporción	Nº UTP			Proporción	Nº UTP
2	Perforación	37	163, 153, 160, 156, 149	4	Perforación	41	157, 150, 161, 159, 145, 149,
	Broca	15			Broca	13	148, 143, 141
3	Perforación	58	152	5	Perforación	33	156, 163, 146
	Broca	21			Broca	13	

A partir de los conglomerados mostrados en la tabla 10 se seleccionaron los extractos más activos, los cuales presentaban mejor actividad insecticida, como se en la tabla 11 y figura 14.

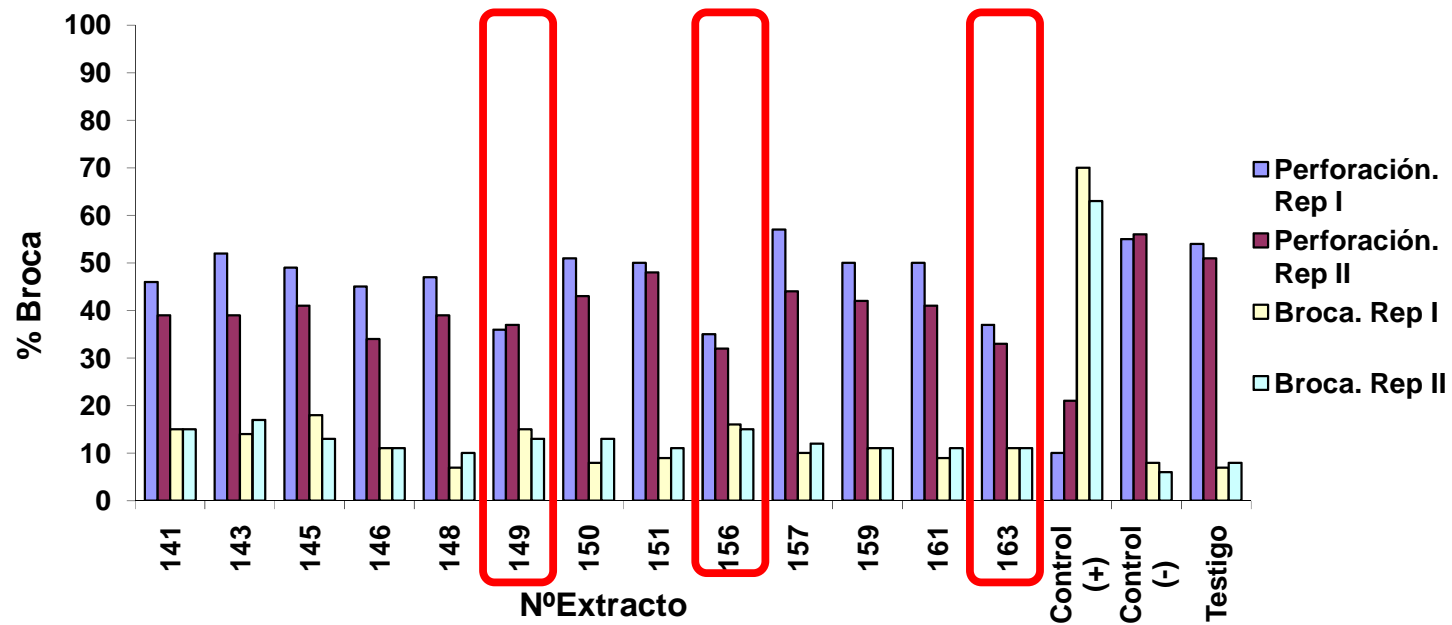


Figura 14. Resultados de los extractos de diclorometano frente al ensayo de actividad insecticida contra la broca del café. **En rojo se resaltan los extractos de diclorometano más activo**

Tabla 11. Extractos más activos de diclorometano (DCM)

Extracto	% Perforación		% Broca Muerta		% Promedio	
	Rep. I	Rep. II	Rep. I	Rep. II	Perforación	Broca muerta
149	36	37	15	13	36,5	14
156	35	32	16	15	33,5	15,5
163	37	33	11	12	35	11,5
Control +	10	21	70	63	15,5	66,5
Control -	55	56	8	6	55,5	7
Testigo	54	51	7	8	52,5	7,5

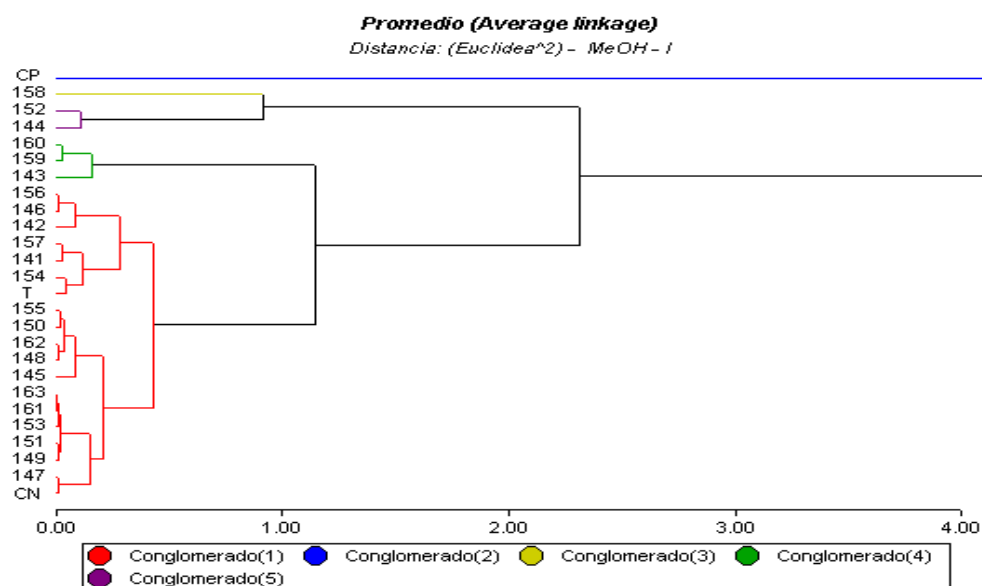
Los extractos de diclorometano de las especies indet (UTP-149, Rubiaceae), *Clematis haenkeana* (UTP-156, Ranunculaceae) y *Piper Umbellatum* (UTP-163, Piperaceae) presentaron una mayor actividad de repelencia o disuasión que insecticida respecto al testigo y control positivo, debido a que la diferencia significativa encontrada mediante el análisis estadístico de Diferencia de Proporciones; mientras que la actividad insecticida de estos es baja respecto al control positivo, en relación al porcentaje de brocas muertas como se muestra en la tabla y figura.

Mediante la marcha fitoquímica se determinó que el extracto de diclorometano de las especies (Indet, UTP-149, perteneciente a la familia Rubiaceae), contenía fenoles, taninos, terpenos, triterpenos, esteroides, saponinas esteroidales y triterpénicas; de igual manera, en la *Clematis haenkeana* (UTP-156, Ranunculaceae), se encontraron fenoles, taninos, terpenos, triterpenos, esteroides, saponinas esteroidales y triterpénicas; mientras que en el extracto *Piper umbellatum*, (UTP-163, Piperaceae), se detectaron alcaloides, sesquiterpenlactonas y cardenólidos. Se considera que estos extractos presentan su actividad de repelencia y/o insecticida contra la broca del café, debido a sus metabolitos secundarios, los cuales poseen fuertes propiedades biológicas contra este insecto plaga.

La posible actividad de repelencia y/o insecticida de los extractos más activos se debe a la presencia de alcaloides, triterpenos, fenoles y taninos, pues según los reportes de la literatura, triterpenos, como el limonoide gedunina aislado de *Trichilia roka* (Meliaceae), es un compuesto de baja toxicidad, pero que posee fuerte efecto insecticida, (Arnason et al 1987; Calderón et al 2001); Así mismo, la nicotina que es un alcaloide presente en la familia Solanaceae, se encuentra en hojas y tallos y es el principio activo del *Nicotiana tabacum*, el cual presenta actividad insecticida fuerte y de repelencia contra la mosca blanca, cogolleros, gorgojos y broca del café, este alcaloide es considerado uno de los compuestos orgánicos mas tóxicos y poderosos por su actividad, (Ramírez 2004); También se ha reportado que la especie *Oldenlandia affinis* perteneciente a la familia Rubiaceae posee compuestos Kalata B 1 y Kalata B 2 que presentan actividad insecticida, debida a la presencia de minipéptidos cíclicos conocidos como ciclótidos, los cuales se consideran que intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas contra insectos y microorganismos, dado que se encuentran en cantidades apreciables en las especies vegetales que los biosintetizan (Jennings et al 2005).

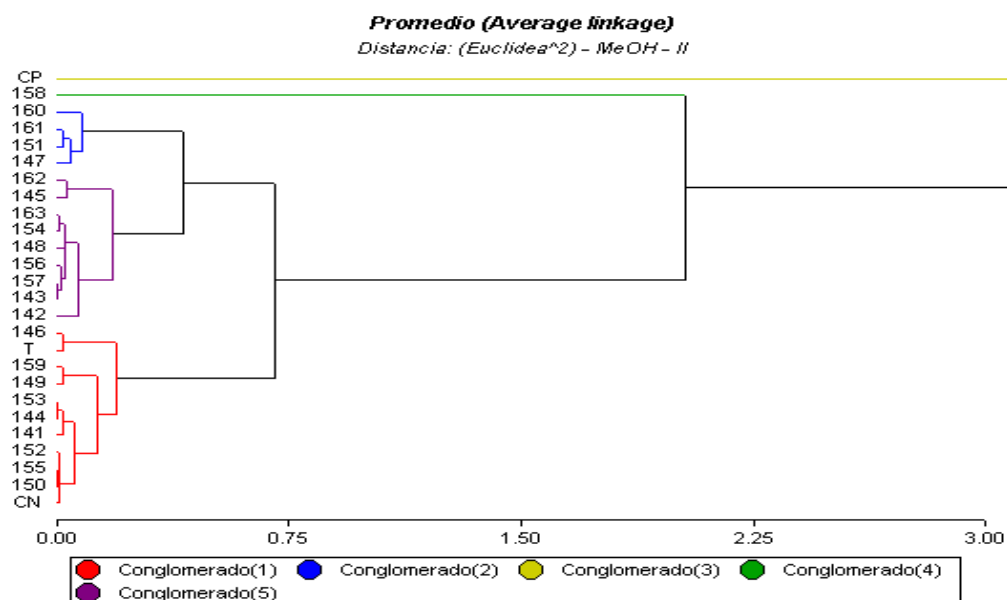
6.3.1.2. Actividad insecticida de los extractos de metanol

En las figuras 15, 16 y tabla 12 se presenta la conformación de 5 conglomerados de los extractos metanólicos, de los cuales se seleccionaron los extractos más activos, pues presentaban mayor porcentaje de broca muerta y menor porcentaje de perforación de ésta, comparada con los demás extractos de metanol y los respectivos controles.



CC = 0,980

Figura 15. Conglomerados obtenidos con extractos de Metanol, repetición



CC = 0,991

Figura 16. Conglomerados obtenidos con extractos de Metanol, repetición II

Tabla 12. Conglomerados conformados en extractos de metanol

			Repetición	
			I	II
			Proporción	Proporción
Conglomerados MeOH	1	Perforación	.52	.51
		Broca	.11	.08
	2	Perforación	.10	.41
		Broca	.70	.11
	3	Perforación	.71	.08
		Broca	.07	.81
	4	Perforación	.42	.59
		Broca	.13	.06
	5	Perforación	.62	.46
		Broca	.10	.11

De los datos obtenidos en la tabla 12 donde se presentan los 5 conglomerados conformados, de los cuales se seleccionaron los dos mejores (Ver tabla 13). De estos se escogieron los extractos más activos de metanol, pues presentaron mayor actividad insecticida contra la broca del café.

Tabla 13. Conglomerados conformados en extractos de metanol con mejor actividad insecticida contra la broca del café

Conglomerados de MeOH		Rep. I	Extractos	Conglomerados de MeOH		Rep. II	Extractos
		Proporción	Nº UTP			Proporción	Nº UTP
1	Perforación	52	156, 146, 142, 157, 141, 154, T, 155, 150, 162, 148, 145, 163, 161, 153, 151, 149, 147, CN	2	Perforación	41	160, 161, 151, 147
	Broca	11			Broca	11	
4	Perforación	42	143, 159, 160	5	Perforación	46	162, 145, 163, 154, 148, 156, 157, 143, 142
	Broca	13			Broca	11	

En la figura 17 se presentan los extractos de las plantas que presentaron mayor porcentaje de broca muerta y menor porcentaje de perforación, siendo estos los más activos en ambas repeticiones de los extractos metanólicos (Ver tabla 14).

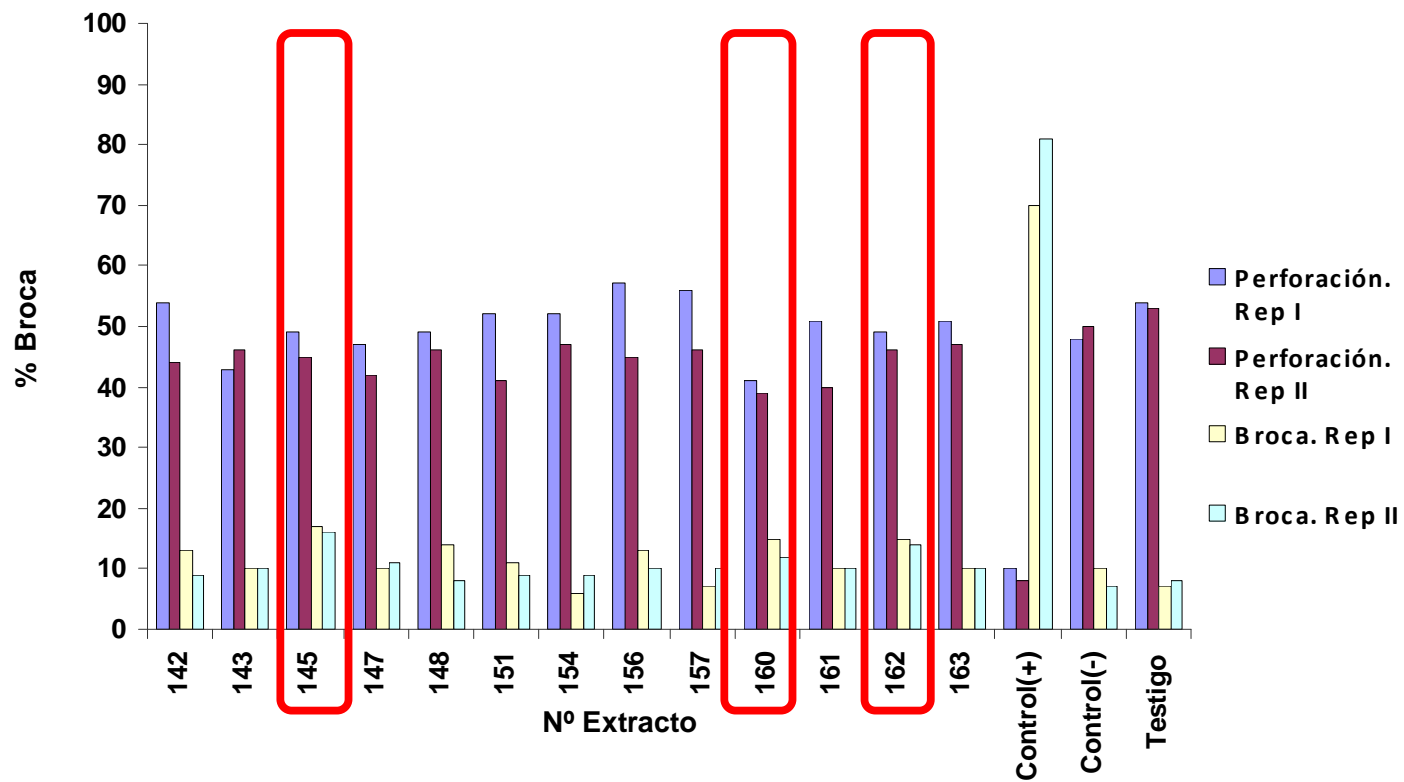


Grafico 17. Resultados de los extractos de metanol frente al ensayo de actividad insecticida contra la broca del café. **En rojo se resaltan los extractos de metanol más activos**

Tabla 14. Extractos más activos de metanol (MeOH)

Extracto	% Perforación		% Broca Muerta		% Promedio	
	Rep. I	Rep. II	Rep. I	Rep. II	perforación	broca muerta
MeOH						
145	49	45	17	16	47	16,5
160	41	39	15	12	40	13,5
162	49	46	15	14	47,5	14,5
Control +	10	8	70	81	9	75,5
Control -	48	50	10	7	49	8,5
Testigo	54	51	7	8	53,5	7,5

Los extractos de metanol *Dunalia solanacea* (UTP-145, Solanaceae), *Topobea cf discolor* (UTP-160, Melastomataceae) y *Rodostemonodaphne* (UTP-162, Lauraceae) presentaron baja actividad de repelencia o disuasión, en relación con el control positivo y con un comportamiento similar al testigo con base en las diferencias significativas al 95% de confiabilidad, realizado a través del análisis estadístico de Diferenciación de Proporciones; entre tanto que la actividad insecticida es baja respecto al control positivo.

El extracto de metanol *Dunalia solanacea*, UTP-145 perteneciente a la familia Solanaceae presentó metabolitos secundarios tales como alcaloides, fenoles, taninos, flavonoides, sesquiterpenlactonas y cardenolidos. De igual manera en el extracto *Topobea cf discolor*, UTP-160 (Melastomataceae), se detectaron fenoles, taninos, saponinas esteroidales y triterpénicas, mientras que en el extracto de la especie *Rodostemonodaphne* (UTP-162, Lauraceae), se encontraron alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos, según lo mostrado en la marcha fitoquímica (Ver tabla 8).

Aunque los resultados de actividad de repelencia y/o insecticida encontrados en los extractos metanólicos fueron muy bajos, esta puede atribuirse a la presencia de metabolitos secundarios tales como alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos, pues según los reportes de la literatura, en la familia Solanaceae se ha reportado que el tomate (*Lycopersicum esculentum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y el ají

(*Capsicum frutescens*), presentan fuerte actividad insecticida y de repelencia contra pulgones, ácaros, mosca blanca y broca del café (Ramírez, 2004).

También se ha encontrado que compuestos tales como lignanos, diterpenos rianodanos e isorianodanos, todos pertenecientes a la familia Lauraceae presentan actividad insecticida, (González, 2002); de igual manera, se reportó que en el aguacate, (*Persea americana* Millar, Lauraceae) presenta actividad insecticida sobre adultos del gorgojo del maíz, (Iannacone and Quispe 2004).

En este estudio se encontró que los extractos activos de diclorometano, presentaron un comportamiento de repelencia mayor que los extractos metanólicos, pero menor actividad insecticida que estos, como se puede observar en las tablas 11 y 14 respectivamente.

7. CONCLUSIONES

1. Con los resultados obtenidos en este trabajo se pudo determinar que tres extractos de diclorometano pertenecientes a las familia Ranunculaceae (*Clematis haenkeana*, UTP-156), Piperaceae (*Piper Umbellatum*, UTP-163) y Rubiaceae (Indet, UTP-149), presentaron una posible actividad repelencia e insecticida contra la broca del café
2. Se encontró que los extractos metanólicos pertenecientes a las familia Melastomataceae (*Topobea cf discolor* , UTP-160), Solanaceae (*Dunalia solanacea*, UTP-145) y Lauraceae (*Rodostemonodaphne*, UTP-162), presentaron actividad de repelencia y/o insecticida contra la broca del café
3. La actividad de repelencia y/o actividad insecticida presentada por los extractos de metanol y diclorometano, puede atribuirse a la presencia de núcleos fitoquímicos tales como alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, sesquiterpenlactonas y cardenolidos, detectados a través de la marcha fitoquímica

8. RECOMENDACIONES

1. Realizar la separación e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de metanol y diclorometano más activos y evaluar cual de los metabolitos o si es una mezcla de estos se le podría atribuir actividad de repelencia y/o insecticida contra la broca del café en este trabajo.
2. Continuar con los estudios de plantas de la flora regional que no han sido evaluadas aun contra la broca del café.
3. Efectuar bioensayos de actividad insecticida contra la broca del café, usando la dieta CENIBROCA D-200, mediante la adición a la misma de los extractos obtenidos a evaluar, facilitando así la evaluación *in vitro* de este insecto plaga.

BIBLIOGRAFIA

1. Aizpuru, I. C. Aseginolaza P.M. Uribe-Ecchebarria P. Urrutia I & Zorrakin. 1999. Claves ilustradas de la Flora del País Vasco y Territorios Limítrofes. Departamento Agricultura y Pesca-Gobierno Vasco. 1:831p.
2. Andersson, L. 1992. A provisional check-list of Neotropical Rubiaceae. Scripta Botánica Bélgica. 1:1–199.
3. Aristizábal, A., L. F., Salazar., E. H. M. Mejía M., C. G. 2002. Evaluación de dos componentes del manejo de la broca en la renovación de cafetales, mediante investigación participativa. Cenicafé, Chinchiná (Colombia). Avances Técnicos. 295:1-8
4. Arnason, J.T.Philogéne B.J.R.Donskov N.Kubo I. 1987. Limonoids from the Meliaceae and Rutaceae reduce feeding, growth and development of *Ostrinia nubilali*. Entomol Exp Appl. 43: 221-226.
5. Baker P. S. 1999. La broca del café en Colombia; Informe final del proyecto MIP para el café DFID – Cenicafé – CABI Bioscience (CNTR 93/1536 A). Chinchiná (Colombia), DFID. 154p.
6. Ramirez, I. B. 1993. Análisis de alimentos. Santa fe de Bogotá: Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 3: 313p.
7. Buitrón, X. 1989. Estudios taxonómicos de las familias Clusiaceae e Hypericaceae. Informe técnico final del Proyecto Estudios botánicos sobre la taxonomía del bosque montano. 67: 969–1043.

8. Bustillo P.A.E. Cárdenas M. Villalva G.D.A. Benavides M. P. Orozco H. J. Posada F. F.J. Cenicafe. 1998. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Chinchiná, 134p
9. Bustillo, A. 2002. El desarrollo de un programa de manejo integrado de la broca del café en Colombia. En: Memorias del curso internacional teórico-práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos de la broca del café. Chinchiná, Colombia. CENICAFE, p.115-121.
10. Calderón, J.S. Céspedes C.L. Rosas R. Gómez-Garibay F. Salazar J.R, 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*. 56: 382-394.
11. Centro Nacional de Investigaciones de Café. CENICAFE. 1990. Manual de capacitación en control biológico. Ed. H. F. Ospina. Chinchiná, Colombia. CENICAFE-CAB-ODA, 174p.
12. Decazy, B.1990. Descripción, biología, ecología y control de la broca del cafeteo *H. hampei* (Ferrari). En: 50 años de Cenícafé 1938-1988. Conferencias conmemorativas. CENICAFE, Chinchiná, Caldas. p 133-139.
13. Dias, dos Santos P. R. Moreira D.L. Guimaraes E. F. Kaplan M. A. C. 2001. *Phytochemistry*, 58: 547-551.
14. Duque, O. 2001. Análisis económico de doce prácticas para mejorar el desempeño de las fincas cafeteras. Centro Nacional de Investigaciones de Café. CENICAFE, Chinchiná, Caldas, 57p.

15. Echeverri, D., Montes F., Buitrago L., Mejía I., Gonzales M. P. 2005. Café para cardiólogos. *Revista Colombiana de cardiología*. 11: 357-365.
16. Escobar, L. K. 1988. *Passifloraceae en Flora de Colombia* 10 Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, 138p.
17. Folstar, P. 1985. Lipids. In: Clarke R.J. Macrae R, eds. *Coffee*. Vol 1: Chemistry. London: Elsevier. p 203-222.
18. García, H. 1992. *Flora medicinal de Colombia, Botánica médica*, 2ª Ed, tercer mundo editors, Colombia. p222-463.
19. González, A. Reina M. Gutiérrez y Fraga M.B. 2002. Natural insecticidas: Estructure diversity, effects and estructure-activity relationships. A case study. *Studies in Natural Products Chemistry*; 26: 849-879.
20. Grob, K. Lanfranchi M. Egli J. Artho A. 1991. Determination of food contamination by mineral oil from jute sacks using coupled LC-GC. *Z Lebensm Unters Forsch*. 193: 213-219.
21. Hinman, D. C. 1993. CO₂ sorption in roast and ground coffee. *In: Colloque Scientifique Internatinal surle café*. 15: 694-701.
22. Iannacone, J. Quispe, C. 2004. Efecto insecticida de dos extractos vegetales sobre el gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae) en Perú. *Rev. Per. Ent.* 44: 81-87.
23. Jennings, C. Rosengren K.J. Norelle L. Daly L. Plan M. Stevens J. Scanlon M.J. Waite C. Norman D.G. Anderson M.A. Craik D.J. 2005. Isolation, solution and Insecticidal Activity of Kalata B2, a Circular Protein with a Twist: Do Möbius Strips Exist in Nature? *Biochemistry* 44: 851-860.

24. Kraup, C. P. 1997. Hortalizas de estación cálida. Biología y diversidad cultural. P. Universidad Católica de Chile, Vicerrectoría Académica, Facultad de Agronomía, Santiago, Chile, 111p.
25. McCarthy J.P. 1991. Adinolfi J. McMullin S.L. NCA survey of pesticides residues in brewed coffees. 14Th ASIC Symp: 154-182.
26. Mañas, A. Belmonte J. Roure J. 1990. Estudio aeropolínico de Urticáceas en algunas localidades de la Península Ibérica y Baleares. 3. 323-328p.
27. Nishimura, O., Mihara S., 1990. Investigation of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones in roasted coffee. Journal Agricole Food Chemistry. 38: 1038-1041.
28. Peysson, R.S. 2001. Historia del café. En el mundo del café. Barcelona: Ultramar Eds. S.A, 5-21p.
29. Portilla, R.M. 1999. Mass rearing technique for *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: Bethilidae) on *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) developed using artificial diet. Revista colombiana de Entomología. 2:57-66.
30. Quintero, G. I. Calidad en taza de algunas mezclas de variedades de café de la especie *Coffea arabica* L. 51:5-19.
31. Ramírez, S. 2004. Manual de Biopesticidas, tecnología para protección de cultivos 2ª Ed, proyecto Agroforestal C-23, Bolivia. 3-49p.
32. Rangel, C. H. Garzón. 1994 Aspectos de la estructura, de la diversidad y de la dinámica de la vegetación del Parque Regional Natural Ucumarí. p 85-108.

33. Rubio, G. J. Bustillo, P. Vallejo, E. Benavides, M. Acuña, Z. 2007. Morfología del sistema digestivo de *Hipotheremus hampei* (Ferrari).58: 66-74.
34. Salazar, M. R. Arcila, P. J. Riaño, N. Bustillo, P.A..1993. Crecimiento y desarrollo del fruto del café y su relación con la broca. Avances técnicos Cenicafé.194:1-4.
35. Stahl, E. 1969. Thin-layer chromatography. 2^a edición. Toppa Printing Co. Singapoore, 1014p.
36. Sen, N.P. Seaman S.W. 1981. Volatile N-Nitrosamines in dried foods. Journal Association Analytic Chemistry. 64: 1238-1242.
37. Shimoda M. Shibamoto T. 1990. Isolation and identification of headspace volatiles from brewed coffee with an on-column GC/MS method. Journal Agricole Food Chemistry. 38: 802-804.
38. Terada, H. Tsubouchi H. , Yamamoto K. , Hisada K. , Sakabe Y. 1986. Liquid chromatographic determination of ochratoxin-A in coffee beans and coffee products. Journal Association Analytic Chemistry. 69: 960-964.
39. Viani, R. 1991. The composition of coffee. In: caffeine, coffee, and health. S. Garatini Ed. New York: Raven Press, Ltd. P 17-41.
40. Wagner, H y Bladt, S. 1996. Plant drug analysis. Springer, Berlin, 384p.

ANEXOS

Anexo A. Procedimiento para preparación de dieta artificial



Anexo B. Datos estadísticos obtenidos del ensayo de broca con los extractos de diclorometano.

			Repetición	
			I	II
			Proporción	Proporción
Extracto DCM	Control Negativo	Perforación	.55	.56
		Broca	.08	.06
	Control Positivo	Perforación	.10	.21
		Broca	.70	.63
	Testigo	Perforación	.54	.51
		Broca	.07	.08
	141	Perforación	.46	.39
		Broca	.15	.15
	142	Perforación	.57	.46
		Broca	.12	.09
	143	Perforación	.52	.39
		Broca	.14	.17
	144	Perforación	.55	.53
		Broca	.06	.10
	145	Perforación	.49	.41
		Broca	.18	.13
	146	Perforación	.45	.34
		Broca	.11	.11
	147	Perforación	.50	.48
		Broca	.15	.14
	148	Perforación	.47	.39
		Broca	.07	.10
	149	Perforación	.36	.37
		Broca	.15	.13
	150	Perforación	.51	.43
		Broca	.08	.13
	151	Perforación	.50	.48
		Broca	.09	.11
	152	Perforación	.58	.52
		Broca	.21	.13
	153	Perforación	.41	.47
		Broca	.14	.09
	154	Perforación	.64	.52
		Broca	.05	.09
	155	Perforación	.62	.50
		Broca	.08	.10
	156	Perforación	.35	.32
		Broca	.16	.15
	157	Perforación	.57	.44
		Broca	.10	.12
	158	Perforación	.52	.51
		Broca	.07	.07
	159	Perforación	.50	.42
		Broca	.11	.11
	160	Perforación	.38	.49
		Broca	.19	.10
	161	Perforación	.50	.41
		Broca	.09	.11
	162	Perforación	.67	.49
		Broca	.11	.08
	163	Perforación	.37	.33
		Broca	.11	.12

Anexo C. Datos estadísticos obtenidos del ensayo de broca con los extractos de metanol.

			Repetición	
			I	II
			Proporción	Proporción
Extracto MeOH	Control Negativo	Perforación	.48	.50
		Broca	.10	.07
	Control Positivo	Perforación	.10	.08
		Broca	.70	.81
	Testigo	Perforación	.54	.53
		Broca	.07	.08
	141	Perforación	.56	.51
		Broca	.09	.12
	142	Perforación	.54	.44
		Broca	.13	.09
	143	Perforación	.43	.46
		Broca	.10	.10
	144	Perforación	.63	.51
		Broca	.09	.10
	145	Perforación	.49	.45
		Broca	.17	.16
	146	Perforación	.57	.54
		Broca	.12	.09
	147	Perforación	.47	.42
		Broca	.10	.11
	148	Perforación	.49	.46
		Broca	.14	.08
	149	Perforación	.52	.48
		Broca	.10	.05
	150	Perforación	.51	.50
		Broca	.14	.08
	151	Perforación	.52	.41
		Broca	.11	.09
	152	Perforación	.60	.50
		Broca	.11	.09
	153	Perforación	.51	.51
		Broca	.09	.10
	154	Perforación	.52	.47
		Broca	.06	.09
155	Perforación	.50	.50	
	Broca	.13	.08	
156	Perforación	.57	.45	
	Broca	.13	.10	
157	Perforación	.56	.46	
	Broca	.07	.10	
158	Perforación	.71	.59	
	Broca	.07	.06	
159	Perforación	.41	.49	
	Broca	.13	.06	
160	Perforación	.41	.39	
	Broca	.15	.12	
161	Perforación	.51	.40	
	Broca	.10	.10	
162	Perforación	.49	.46	
	Broca	.15	.14	
163	Perforación	.51	.47	
	Broca	.10	.10	