

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE *Phyllophaga obsoleta* BLANCHARD (COL: MELOLONTHIDAE)

BIOLOGICAL ACTIVITY EVALUATION OF PLANT EXTRACT ON *Phyllophaga obsoleta* BLANCHARD (COL: MELOLONTHIDAE)

Constain Salamanca¹, María Consuelo Jaramillo¹, Gabriel Jaime Arango¹, Martha Eugenia Londoño², Jaime Arturo Tobón³ y Amilbia Henao³

Resumen

Se evaluó el efecto insecticida y repelente de los extractos polares, medianamente polares y no polares de planta completa de *Calendula officinalis*, *Raphanus sativus* y *Ruta graveolens*, además de semillas de *Annona squamosa*, *Annona cherimolia* y *Annona muricata* sobre larvas de la especie *Phyllophaga obsoleta* en tercer ínstar. Los mayores porcentajes de mortalidad larval se registraron con los extractos medianamente polares de *A. squamosa* (50%) y *A. muricata* (40%) y con los apolares de *A. squamosa* (60%), *R. graveolens* (45%), *R. sativus* (40%) y *A. cherimolia* (40%) a los quince días después de la aplicación; por esta razón se proponen como una nueva alternativa en el manejo de la chiza.

Palabras clave: *Phyllophaga obsoleta*, chizas, extractos vegetales, actividad insecticida.

Abstract

The insecticide and repellent effect was evaluated from polar extract, half polar extract and no polar extract from the whole plant of *Calendula officinalis*, *Raphanus sativus* and *Ruta graveolens*, plus the seeds of *Annona squamosa*, *Annona cherimolia* and *Annona muricata* on the species of *Phyllophaga obsoleta* larvae of third instar. The highest percentages of larvae mortality were registered with half polar extracts of *A. squamosa* (50%) and *A. muricata* (40%) and with non polar extracts of *A. squamosa* (60%), *R. graveolens* (45%), *R. sativus* (40%) and *A. cherimolia* (40%), fifteen days post-application, that is why these are proposed like a new alternative for the handling of white grubs.

Key words: *Phyllophaga obsoleta*, white grubs, plant extracts, insecticide activity.

INTRODUCCIÓN

Como chiza o mojoy se conoce la larva de los insectos del orden Coleoptera, familia Melolonthidae. Estos insectos trozan raíces y tallos de plantas cultivadas, causando daños de importancia económica. En Antioquia (Colombia) se les ha registrado en los municipios de Mutatá, Chigorodó, Carepa, Apartadó, Turbo, El Santuario, San Vicente, El Carmen de Viboral, Rionegro, Marinilla, El Retiro, La Ceja, Guarne, La Unión, Abe-

jorral, Envigado, Medellín, Bello y Santa Rosa de Osos, entre otros (Londoño, 1993 y 1994).

Las pérdidas ocasionadas por las chizas ocurren principalmente en pequeños campos de cultivo de agricultura marginal, tales como café, frijol, tomate, zanahoria, papa, pastos y malezas que constituyen un ambiente favorable para muchos Melolonthidae (Duque, 1989) y (Klein, 1998).

Recibido: febrero de 2000; aprobado para publicación: marzo de 2001.

¹ Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB), Facultad de Química Farmacéutica, Corporación de Patologías Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, apartado 1226. E-mail: gisb@muiscas.udea.edu.co.

² Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Centro de Investigación La Selva, Rionegro, Colombia. E-mail: corpoic1@epm.net.co.

³ Facultad de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Pontificia Bolivariana, apartado 56006, Medellín, Colombia. E-mail: iai@logos.upb.edu.co.

De acuerdo con los diagnósticos de producción de varios cultivos ubicados en el territorio nacional, así como en áreas geográficas específicas, los daños ocasionados por larvas de la familia Melolonthidae constituyen un problema agudo para los productores de las fincas medianas y pequeñas (Nanclares, 1992). La seriedad del problema radica en los daños frecuentes que se perciben cuando ya es tarde para aplicar soluciones prácticas y cuando se ha invertido una parte importante del costo de producción del cultivo (Pardo, 1993, 1994 y 1995).

Una de las especies rizófagas que mayor daño han provocado en la región agrícola del Oriente antioqueño es *Phyllophaga obsoleta* Blanchard (Coleoptera: Melolonthinae). Este insecto se encuentra principalmente entre mayo y octubre en forma de larva, pasando por tres instares, siendo el segundo y el tercero los que más daño causan a los cultivos (Vallejo, 1997).

Esta plaga de difícil control se ha manejado principalmente con insecticidas químicos, los cuales provocan un efecto negativo en el medio ambiente del Oriente antioqueño. Con el fin de buscar nuevas estrategias, que contribuyan al manejo de este problema fitosanitario, los extractos vegetales y las sustancias aisladas de fuentes naturales se proponen como una nueva alternativa útil.

Una de las recientes técnicas utilizadas por los agricultores del Oriente antioqueño para disminuir las poblaciones de chiza, es la aplicación de extractos de plantas, tales como extracto acuoso de rábano (*Raphanus sativus*: Cruciferae), albahaca (*Ocimum basilicum*: Labiatae), fique (Agavaceae) y ajo-ají (Solanaceae), los cuales han mostrado un efecto de irritación que obliga a salir a las larvas a la superficie. Este efecto es de gran importancia, ya que las hace susceptibles a la deshidratación y a la predación, especialmente por pájaros (Londoño, 1997; Higuita, 1993).

También se ha observado en algunas huertas mixtas del Oriente antioqueño, en las que se cultiva fríjol (Leguminosae) asociado con caléndula

(*Calendula officinalis* L.: Compositae) o ruda (*Ruta graveolens* L.: Rutaceae), que ocurre una notable disminución en los daños provocados por la chiza y un mayor rendimiento en el cultivo. Esto resulta muy interesante, ya que se pueden preparar extractos vegetales útiles para el manejo de la chiza (Rendón, 1998).

Se han descubierto muchos extractos vegetales con actividad sobre insectos, tal como varios del género *Annona*, a cuyas semillas se les ha encontrado actividad insecticida e ictiotóxica, motivo por el cual se plantean como una alternativa para el control de estos insectos plaga (Craig *et al.*, 1998; Gupta, 1995).

Actualmente es muy poco lo que se conoce acerca del uso de extractos vegetales como estrategia para el manejo de chizas. Por esta razón se realizó una investigación, en la que se evaluó la actividad insecticida y repelente de extractos vegetales polares, medianamente polares y apolares de plantas utilizadas tradicionalmente por los agricultores del Oriente de Antioquia para el manejo de este insecto, como *C. officinalis*, *R. graveolens* y *R. sativus*, además de otras reportadas con actividad sobre insectos, como la guanábana (*Annona muricata*: Annonaceae), el anón verrugoso (*Annona squamosa*: Annonaceae) y la chirimoya (*Annona cherimolia*: Annonaceae), sobre larvas de la especie *Ph. obsoleta*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material biológico. Para capturar los adultos de *Ph. obsoleta* se utilizaron trampas de luz negra que fueron instaladas en cuatro municipios del Oriente antioqueño (Guarne, Rionegro, Marinilla y El Santuario); los insectos colectados fueron individualizados e identificados según las claves de Ritcher (1966) y Morón (1995). Una vez seleccionadas las parejas por cópula, para lo cual se utilizaron alrededor de 1.000 insectos, se inició el desarrollo de la cría, comenzando por la postura de los huevos hasta la eclosión de la larva de primer instar. A partir de este momento se monitorearon cada semana

hasta obtener larvas de tercer ínstar, de aproximadamente 230 días de edad, de acuerdo con Vallejo *et al.* (1997). Estas larvas fueron utilizadas en el experimento. Todas las larvas fueron alimentadas con raíces de trigo durante todo el periodo de desarrollo, manteniéndose en condiciones de insectario (20 ± 5 °C, 12 horas luz y oscuridad), en el Centro de Investigación "La Selva", de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), de Rionegro (2.100 msnm). En estas condiciones estaban listas para recibir los tratamientos.

Obtención de los extractos vegetales. Las plantas de *C. officinalis*, *R. sativus* y *R. graveolens* se recolectaron en el municipio de Marinilla, y las semillas de *A. muricata*, *A. squamosa* y *A. cherimolia* en el municipio de Santafé de Antioquia. Estas plantas fueron identificadas debidamente en el Herbario de la Universidad de Antioquia. Todo el material vegetal se secó en estufa con circulación de aire a 40 °C durante 72 horas; se trituró finamente y se realizaron percolaciones continuas, inicialmente con hexano para extraer las sustancias apolares, luego con acetato de etilo para las medianamente polares y finalmente con metanol para las polares. Cada percolación se realizó por 72 horas a 26 ± 2 °C. Los solventes se separaron de los extractos por destilación a presión reducida (rotavaporación) hasta estar totalmente libres de solventes, lo cual se determinó por espectroscopía U.V. Por último, se congelaron los extractos a 2 °C hasta su dispersión.

Preparación de los extractos dispersos. Cada extracto vegetal se dispersó en agua destilada y esterilizada con ayuda de tensoactivos, como Polivinilpirrolidona-PVP® para los extractos apolares y Agral 90® para los extractos polares y medianamente polares, en una proporción de 1 mg de extracto por 0.01 mg de tensoactivo. Cada uno de los extractos se preparó en cámara de flujo laminar (25 ± 2 °C) a la concentración de 5 mg/ml en un volumen final de dispersión de 500 ml. Finalmente se selló, llevándose a ultrasonido por cinco minutos hasta completa dispersión, quedando así listas para la aplicación.

Preparación del control. El control se preparó bajo las mismas condiciones de los extractos dispersos, utilizándose agua destilada estéril y tensoactivo (Agral 90® para los extractos polares y medianamente polares y Polivinilpirrolidona-PVP® para los extractos apolares), en la misma proporción que en los extractos dispersos.

Evaluación biológica. Se utilizó un diseño completamente aleatorio, con seis tratamientos, correspondientes a cada extracto vegetal disperso, con tres repeticiones para cada fase de polaridad y con su respectivo control (tabla 1). La unidad experimental estuvo constituida por veinte larvas de *Ph. obsoleta* de tercer ínstar, distribuidas uniformemente en 8 kg de tierra, obtenida en el Centro de Investigación Corpoica "La Selva", la cual se esterilizó previamente en autoclave para disminuir la biocarga de enemigos naturales. Luego se llevó a un recipiente plástico de 16 cm de altura y 35 cm de diámetro, debidamente desinfectado y tapado con una malla metálica para evitar la fuga de insectos.

En total se utilizaron 1.200 larvas: 1.080 correspondientes a los tratamientos y 120 a los controles. Se adicionaron 500 ml del extracto disperso sobre la unidad experimental, una sola vez, en concentración de 5 mg/ml. Asimismo se adicionó un volumen igual en los recipientes correspondientes al control.

El efecto insecticida se evaluó haciendo recuentos de mortalidad a las 24, 48 y 72 horas; y 7, 14 y 28 días después de la aplicación, comparando con el control. Además se descartó la mortalidad provocada por agentes entomopatógenos que pudieron resistir el proceso de autoclavado como hongos, bacterias y nemátodos, haciendo placas en fresco a cada larva muerta y determinando así la mortalidad corregida.

El efecto de repelencia se determinó analizando algunos aspectos en el comportamiento de las larvas, como el desplazamiento hacia la superficie de la tierra durante las primeras cuatro horas después de aplicado el extracto, y comparándose con el control.

Tabla 1. Tratamientos correspondientes a cada extracto vegetal disperso, a la concentración de 5 mg/ml, para cada fase de polaridad

Fase de polaridad	Tratamientos			
	1	2	3	Control
Apolar o hexánica	<i>A. muricata</i>	<i>A. muricata</i>	<i>A. muricata</i>	Agua + PVP®
	<i>A. squamosa</i>	<i>A. squamosa</i>	<i>A. squamosa</i>	
	<i>A. cherimolia</i>	<i>A. cherimolia</i>	<i>A. cherimolia</i>	
	<i>R. graveolens</i>	<i>R. graveolens</i>	<i>R. graveolens</i>	
	<i>C. officinalis</i>	<i>C. officinalis</i>	<i>C. officinalis</i>	
	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	
Medianamente polar o acetato de etilo	<i>A. muricata</i>	<i>A. muricata</i>	<i>A. muricata</i>	Agua + Agral®
	<i>A. squamosa</i>	<i>A. squamosa</i>	<i>A. squamosa</i>	
	<i>A. cherimolia</i>	<i>A. cherimolia</i>	<i>A. cherimolia</i>	
	<i>R. graveolens</i>	<i>R. graveolens</i>	<i>R. graveolens</i>	
	<i>C. officinalis</i>	<i>C. officinalis</i>	<i>C. officinalis</i>	
	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	
Polar o metanólica	<i>A. muricata</i>	<i>A. muricata</i>	<i>A. muricata</i>	
	<i>A. squamosa</i>	<i>A. squamosa</i>	<i>A. squamosa</i>	
	<i>A. cherimolia</i>	<i>A. cherimolia</i>	<i>A. cherimolia</i>	
	<i>R. graveolens</i>	<i>R. graveolens</i>	<i>R. graveolens</i>	
	<i>C. officinalis</i>	<i>C. officinalis</i>	<i>C. officinalis</i>	
	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	<i>R. sativus</i>	

RESULTADOS

El efecto insecticida de cada uno de los extractos sobre *Ph. obsoleta* se expresó en términos de porcentaje de mortalidad larval, correspondiente al valor de mortandad provocado por el extracto y no por otras causas, entre los cuales se encuentran el estrés provocado durante la manipulación de los recuentos y los agentes entomopatógenos que pudieron quedar presentes en la tierra; denominándose entonces mortalidad corregida.

La mayoría de los extractos evaluados mostraron a los catorce días después de la aplicación un porcentaje de mortalidad considerable, motivo por el cual se tomaron únicamente los resultados obtenidos en este tiempo, analizándose estadísticamente según la prueba de Kruskal y Wallis (1952).

Los extractos polares evaluados mostraron en su mayoría y durante todo el ensayo un bajo efecto insecticida, con valores que fluctúan entre 5 y

19%, observándose un mayor efecto con los extractos de *A. muricata* y *R. sativus*, con porcentajes de 19 y 17%, respectivamente (tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad corregida de larvas de *Ph. obsoleta*, a los quince días después de la exposición de extractos vegetales en fase polar. (Datos provenientes de 60 larvas)

Extracto vegetal	% de mortalidad corregida
<i>Calendula officinalis</i>	11.6
<i>Ruta graveolens</i>	10.0
<i>Raphanus sativus</i>	16.6
<i>Annona muricata</i>	18.6
<i>Annona cherimolia</i>	5.0
<i>Annona squamosa</i>	11.6
Testigo	0.0

El efecto insecticida de los extractos medianamente polares fue mayor, en comparación con el obtenido con los extractos polares, con porcentajes de mortalidad entre 13 y 50%. El extracto de *A. squamosa* provocó mayor mortalidad lar-

val, seguida de *A. muricata*, *R. graveolens* y *A. cherimolia*, con valores de 50, 40, 30 y 25%, respectivamente. Para el extracto de *C. officinalis* no se encontró diferencia, ya que el porcentaje de mortalidad fue muy similar al ocasionado en fase polar (figura 1).

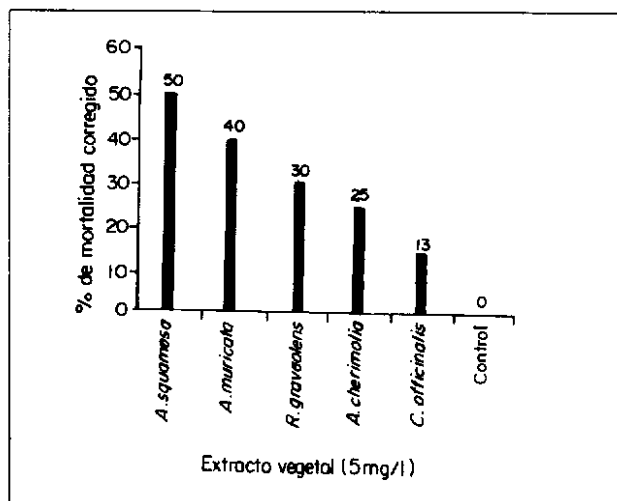


Figura 1. Porcentaje de mortalidad corregida de larvas de *Ph. obsoleta* a los quince días después de la aplicación de extractos vegetales en fase medianamente polar. (Datos provenientes de 60 larvas)

Los extractos apolares alcanzaron casi en su totalidad los mayores porcentajes de mortalidad larval, provocando 60% en *A. squamosa*, seguido de *R. graveolens* con 45% y de *R. sativus* y *A. cherimolia* con 40% cada uno (figura 2).

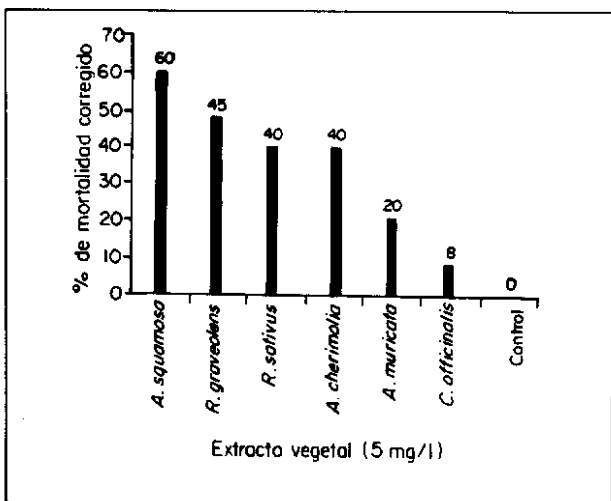


Figura 2. Porcentaje de larvas de *Ph. obsoleta* muertas a los quince días después de la exposición a diferentes extractos vegetales en fase apolar. (Datos provenientes de 60 larvas)

El efecto de repelencia no tuvo manifestación en la variable analizada, ya que no se observaron cambios en el comportamiento de las larvas, tanto en las expuestas a los tratamientos como en el control.

DISCUSIÓN

Los extractos vegetales de semillas de Annonaceae mostraron mayor actividad insecticida que los extractos de planta completa de *R. graveolens*, *C. officinalis* y *R. sativus*, siendo los extractos de baja polaridad más activos que los de mediana polaridad y éstos a su vez más que los polares, por lo que se recomienda seguir desarrollando estudios con los extractos apolares y mediana polaridad.

Los extractos medianamente polares de *A. squamosa* y *A. muricata*, y los extractos apolares de *A. squamosa*, *R. graveolens*, *A. cherimolia* y *R. sativus*, todos a una concentración de 5 mg/ml, provocaron porcentajes de mortalidad muy similares a los obtenidos con otros agentes químicos y biológicos utilizados en el control de este insecto, y en menor tiempo. Por este motivo se consideran promisorios en el manejo de la chiza y más aun si se trabajan conjuntamente con otros agentes de control. Por esto, se deben tener en cuenta para posteriores investigaciones en las que se cuantifique su potencial para controlar ésta y otras especies de plagas rizófagas.

Es posible que la actividad insecticida de los extractos de mediana y baja polaridad de semillas de Annonaceae se deba a la capacidad que tienen de intervenir en procesos metabólicos, como se ha descrito con las acetogeninas aisladas de varias especies de esta familia, las cuales se encuentran en gran cantidad y actúan como potentes inhibidores citotóxicos de la NADH deshidrogenasa mitocondrial ubicada en el complejo I de la cadena respiratoria (Cavé, 1995; Zafra, 1996). Sin embargo, hace falta realizar estudios de aislamiento y caracterización de los metabolitos presentes en estos extractos, además de la evaluación de sus propiedades biológicas.

Actualmente en el Oriente antioqueño se han evaluando varios entomopatógenos promisorios para el control de chiza, como la bacteria *Bacillus popilliae* Dukty y el hongo *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff, que tardan entre cinco y ocho semanas en causar mortalidad, aun cuando los aislamientos utilizados sean nativos. Este hecho indica que se debe dar más tiempo al utilizar extractos vegetales para que se manifieste un efecto mayor. Para evaluar esto último, es decir, el efecto de los extractos y en especial los polares, se sugiere empezar las evaluaciones catorce días después de la aplicación y tomar un par de datos más con intervalos de tiempo iguales, para evitar muertes por causas indirectas como la manipulación, la deshidratación y el estrés en general (Londoño, 1992, 1994 y 1997; Guarín, 1996 y 1997; Hernández, 1992).

Finalmente, consideramos que los extractos vegetales son una alternativa para el manejo de este

insecto, ya que causan porcentajes de mortalidad similares a los provocados por otros agentes de control y en menor tiempo, además de que pueden ser considerados "amables" con el medio ambiente, pues son biodegradables. Sin embargo, se debe reconocer que falta ampliar mucho más en estudios en los que se evalúe su potencia en campo, como también en el diseño y desarrollo de productos de fácil aplicación. Por esto se perfilan como una gran área de investigación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI), a la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, a la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Pontificia Bolivariana, a Corpoica "La Selva" y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS

- Cavé A.** 1995. *Acetogenins from Annonaceae. Phytochemistry of plants used in traditional medicine*. Clarendon Press, Oxford. pp. 228-248.
- Craig H, Feras Q, Alali, Zhe-ming G, McLaughlin J.** 1998. Mono-THF ring Annonaceus from *Annona squamosa*. *Phytochemistry* 47(5):803-809.
- Duque A, Nicholls CI.** 1989. Aspectos generales sobre la biología, el daño y el control de chizas. *Seminario Ingeniero Agrónomo*. Universidad Nacional de Colombia, Seccional Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 89 p.
- Guarín J.** 1996. *Bacillus popilliae* agente causal de la enfermedad lechosa en el complejo chizas del Oriente antioqueño. *Actual Corpoica* 106, julio-septiembre. 23 p.
- Guarín J.** 1997. Estudio de la patogenicidad en el *Bacillus popilliae* Dukty sobre *Phyllophaga obsoleta* Blanchard y medios para su producción. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. p. 12.
- Gupta M.** 1995. *270 plantas medicinales iberoamericanas*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Presencia, Santafé de Bogotá, Colombia. 25 p.
- Hernández P, Rodríguez R.** 1992. Evaluación del hongo *Metarhizium anisopliae* Metschnikoff Sorokin en el control de chizas (Coleoptera: Scarabaeidae). Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 58 p.
- Higuíta A.** 1993. Efecto de extractos naturales sobre la chiza. Tesis (Tecnología Agropecuaria). Universidad Católica de Rionegro, Colombia.
- Klein C, Navia M.** 1998. Impacto de las plagas en la agricultura moderna. *Agricultura de las Américas*, enero-febrero (177):18-19.
- Kruskall WH, Walis WA.** 1952. Use of Rankas in one criterion variance analysis. *J Amer Statist* 47:583-621.
- Londoño ME, Pérez M.** 1992. Multiplicación artesanal de *Metarhizium anisopliae*, hongo que controla la chiza o mojoyoy. Boletín divulgativo, ICA. Regional 4, Medellín, Colombia. 89 p.
- Londoño ME.** 1993. Posibilidades del control biológico en el manejo de la chiza (Col: Scarabaeidae), para el departamento de Antioquia. ICA. *Miscel Soc Col Entomol Comité Regional* (28):85-100.
- Londoño M, Pérez S.** 1994. Reconocimiento de los enemigos naturales de la chiza o mojoyoy (Coleoptera: Scarabaeidae) en el Oriente antioqueño. *Rev Col Entomol* 20(3):199-206.
- Londoño ME, Ríos AM.** 1997. Efecto de diferentes agentes de control biológico sobre *Phyllophaga obsoleta* y *Anomala undulata* (Col: Melolonthidae). *Aconteceres Entomológicos*. Grupo GEUN. Universidad Nacional, Socolen, Fedecafé. Medellín, 30-31 de octubre. pp. 35-42.
- Morón MA.** 1995. Clave para la identificación de los principales géneros con larvas edáficas de Coleoptera Melolonthidae (Scarabaeidae), de Colombia-Adultos. II Curso Nacional sobre Plagas Rizófagas. Corpoica, Colciencias, Socolen. Santafé de Bogotá, nov. 27 a dic. 2. 46 p.
- Nanclares O, Ramírez E.** 1992. Reconocimiento de chizas (Coleoptera: Scarabaeidae) en cuatro municipios del Oriente antioqueño. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad

- Nacional de Colombia, sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. 89 p.
- Pardo L, Franco P, Alarcón A.** 1993. Contribución al conocimiento de las chizas (Coleoptera: Scarabaeidae) de San Antonio-Cauca, Colombia. *Diversidad y manejo de plagas subterráneas*. Instituto de Ecología, Xalapa-Veracruz. pp. 91-104.
- Pardo LC.** 1994. Escarabajos (Coleoptera: Melolonthidae) de importancia agrícola en Colombia. Memorias XXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología-Socolen. Medellín, 1994. pp. 159-193.
- Pardo LC.** 1995. Síntesis de las investigaciones sobre chizas y su importancia económica. Memorias II Curso Nacional sobre Plagas Rizófagas. Corpoica, Colciencias, Santafé de Bogotá, 1995.
- Rendón F.** 1998. Informe convenio CIAT-Secretaría de Agricultura de Antioquia. Semestre II, Medellín, Colombia.
- Ritcher RO.** 1996. *With the grubs and their allies*. Oregonstate Univ. Press, Corvallis. 209 p.
- Vallejo LF.** 1997. Contribución al conocimiento de plagas subterráneas (chizas) (Coleoptera: Scarabeoidea) del Oriente de Antioquia. Tesis (MSc Entomología). Corporación para Investigaciones Biológicas-CIB y Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. 84 p. (no publicada).
- Vallejo F, Orduz J, Madrigal A.** 1997. Observaciones sobre la biología de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae) en el Oriente de Antioquia, Colombia. *Acta Zool Mex* Instituto de Ecología, Xalapa, México (en prensa).
- Zafra M.** 1996. Acetogeninas from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. *Phytochemistry* 42(2):253-271.