

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE *PROSOPIS LAEVIGATA* EN *SPODOPTERA FRUGIPERDA* SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

DAVID O. SALINAS SÁNCHEZ,^{1,2*} LUCILA ALDANA LLANOS,³
MA. ELENA VALDÉS ESTRADA,³ MARÍA C. HERNÁNDEZ REYES,³
JUAN CARLOS JUÁREZ DELGADO¹ Y TANNIA A. RODRÍGUEZ FLORES²

¹Departamento de Recursos Naturales del Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla y ²Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, ³Departamento de Interacciones Planta-Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional.

*Autor para Correspondencia: David O. Salinas Sánchez, Departamento de Recursos Naturales del Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209, Cuernavaca Morelos, México, Tel/Fax: 7773297019; correo electrónico: osval1671@hotmail.com, davidos@buzon.uaem.mx.

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE *PROSOPIS LAEVIGATA* EN *SPODOPTERA FRUGIPERDA* SMITH (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)

RESUMEN: Se determinó la actividad insecticida a 500 ppm de dos extractos orgánicos (acetona y metanol) de *Prosopis laevigata*, los resultados mostraron que el extracto acetónico ocasionó una mortalidad larval del 96%, el metanólico del 33% y 45% de pupas muertas en *Spodoptera frugiperda*. El fraccionamiento fitoquímico del extracto acetónico dio como resultado la purificación de seis reuniones menos complejas que el extracto original, observándose a una concentración de 300 ppm un efecto larval antialimentario de las reuniones R3 R5 y R6 y un 57% de mortalidad larval de la reunión R4. A una concentración de 100 ppm, se observó un bajo peso larval de las reuniones R3 y R6 observándose en este caso la misma actividad con la reunión R2, lo que podría indicar una inhibición alimentaria. A esta misma concentración las reuniones R3 y R4 presentaron un 40 y 56% de mortalidad larval respectivamente, lo cual indica que existe actividad tóxica. Las perspectivas de este trabajo indican que *P. laevigata* contiene metabolitos con actividad insecticida.

PALABRAS CLAVE: metabolitos secundarios, productos naturales, antialimentario.

INSECTICIDE ACTIVITY OF *PROSOPIS LAEVIGATA* ON *SPODOPTERA FRUGIPERDA* SMITH (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE)

ABSTRACT: Insecticide activity was determined at 500 ppm for two organic extracts (acetone and methanol) from *Prosopis laevigata*, the results showed that the extract acetonic caused a larval mortality of 96%, the methanol caused 33% and 45% of dead pupae in *Spodoptera frugiperda*. Phytochemical fractionation of the extract resulted acetonic purification of six meetings less complex than the original extract, with a concentration of 300 ppm larval antifeedant effect of the R3 meeting R5 and R6 and a 57% mortality of larval meeting R4. At a concentration of 100 ppm, was observed in a larval weight of meeting R3 and R6 in this case showing the same activity with the R2 meeting, which might indicate an inhibition in food. At this same concentration meetings R3 and R4 had a 40 and 56% larval mortality respectively, indicating that there is toxic activity. The prospects of this work indicate that *P. laevigata* containing metabolites with insecticide activity.

KEY WORDS: secondary metabolites, natural products, antifeedant.

INTRODUCCIÓN

El árbol de mezquite pertenece a la familia Fabaceae, y género *Prosopis*, su nombre proviene de la palabra azteca Misquitl (López Franco *et al.*, 2006). Es nativo de zonas áridas y semiáridas del mundo. Es un árbol de 4-12 m de altura. Este recurso es abundante en: Estados Unidos, México, Perú, Chile, Argentina, Brasil, Australia, Haití, Paquistán y en la India (INE, 1994).

La importancia ecológica del mezquite en el medio ambiente se debe a que es planta fijadora de nitrógeno, enriquece el suelo a su alrededor, promueve el crecimiento de matorrales asociados a ella y por tanto previene la erosión del suelo; asimismo actúa como planta hospedera de numerosas especies de aves y roedores (Golubov *et al.*, 2001). Se emplea en la obtención de madera, leña, carbón, miel; sus frutos se utilizan en la elaboración de diversos alimentos para consumo humano y como forraje (Rodríguez y Maldonado, 1996). En condiciones de estrés el árbol secreta en su corteza un exudado gomoso conocido como goma de mezquite, que contiene taninos en contenidos de 0.5 a 2% (Goycoolea *et al.*, 1998, 2000; Córdova, 2004), lo que se ha considerado como una limitante para su aplicación en la industria alimenticia debido a su posible toxicidad (Anderson y Weiping, 1989). De la vaina del mezquite se obtiene harinas integrales, jarabe, sustituto de café y proteína, particularmente en el norte de Perú (Becker y Grosjean, 1980); y Estévez *et al.*, 2004.

En estudios realizados de *P. laevigata* se evaluó como especie forrajera y se reportan un 2% de taninos y un 3.2% de fenoles, los cuales tienen efectos positivos sobre el pasaje ruminal de las proteínas, reciclaje de urea y sobre la producción y sanidad animal (González-Gómez *et al.*, 2006). Del extracto metanólico de las raíces se ha logrado identificar un alcaloide piridina llamado trigonelina, el cual también fue identificado en las partes aéreas de este árbol (Orozco-Villafuerte *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2003).

Se sabe que estos metabolitos secundarios tienen un rol importante en el mecanismo defensivo de las plantas (Jacobson, 1989). Muchas plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que poseen propiedades biológicas tóxicas contra insectos plaga (Céspedes *et al.*, 2000). El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad bioinsecticida de extractos de *P. laevigata* sobre gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* plaga del maíz.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de la especie vegetal. El material botánico de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst fue colectado en el mes de junio de 2007 en el poblado de Huixastla, Municipio de Tlaquiltenango Morelos, perteneciente a la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (RE-BIOSH). La especie fue identificada por el Biol. Juan Carlos Juárez investigador del CEAMISH. Un ejemplar fue depositado en el Herbario HUMO "Graciela Calderón" del CEAMISH-UAEM bajo el número de registro 22363.

Preparación de los extractos orgánicos. Se seleccionaron las partes de la planta (hojas, tallos, ramas), se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 días en un cuarto oscuro, después se trituraron. En una primera etapa el material vegetal fue desgrasado con *n*-hexano y posteriormente se utilizó acetona y metanol. La maceración de las partes aéreas de esta planta con los disolventes antes mencionados, se realizó durante tres días. El disolvente fue eliminado por destilación a presión reducida en un rota evaporador marca Buchi 205 el excedente del disolvente fue retirado en su totalidad a temperatura ambiente hasta obtener el extracto completamente seco, finalmente se determinó el rendimiento de cada extracto.

Fraccionamiento fitoquímico del extracto acetonico de *Prosopis laevigata*. Este fue realizado por técnicas cromatográficas convencionales

(cromatografía en columna y en capa fina). El extracto se adicionó en una columna empacada con sílica gel (malla 70-230, Marca MERCK). Cuatro g de extracto de acetona fueron adicionados en una columna empacada con 30g de sílica gel suspendida en *n*-hexano, a la cual se le adicionó un sistema de polaridad ascendente. El extracto se adsorbió 1:1 con el mismo gel de sílice y una vez aplicado, la elusión de la columna principio con *n*-hexano y posteriormente se le adicionaron gradientes de polaridad aumentando la misma con acetona, extrayéndose 223 fracciones de 50 ml c/u, al final se lavó con metanol. El monitoreo de estas fracciones se realizó mediante cromatografía en capa fina analítica, permitiendo analizar los componentes químicos de tal forma que se pudieron reunir en grupos de similar constitución química, lográndose agrupar seis reuniones de menor complejidad que el extracto original (Cuadro 1).

Cuadro 1

Fraccionamiento Fitoquímico del extracto acetónico *Prosopis laevigata*.

| 761 g planta seca/8.075 g de extracto aislado, 4 g de extracto adicionado | | |
|---|----------|---|
| COLUMNA ORIGINAL, 223 fracciones de 50 ml | | |
| Reunión | Fracción | Polaridad del sistema |
| 1 | 1-51 | <i>n</i> -hexano 100% |
| 2 | 52-79 | <i>n</i> -hexano:acetona 95:05, 85:15 |
| 3 | 80-122 | <i>n</i> -hexano:acetona 85:15, 75:25 |
| 4 | 123-161 | <i>n</i> -hexano:acetona 75:25, 65:35 |
| 5 | 162-193 | <i>n</i> -hexano:acetona 65:35, 60:40 |
| 6 | 194-223 | <i>n</i> -hexano:acetona 50:50, acetona 100%, metanol 100% |

Cría de *Spodoptera frugiperda* en laboratorio. Para iniciar la cría en laboratorio del gusano cogollero se realizaron colectas de campo en cultivos de maíz ubicados en áreas de influencia de Yautepec, Morelos. Las larvas colectadas se colocaron en palanganas de plástico. Se llevaron al laboratorio, donde se separaron y colocaron en cajas petri y se alimentaron con dieta artificial hasta que puparon.

Los adultos emergidos de *S. frugiperda*, se colocaron en bolsas enceradas para el apareamiento y oviposición, para su alimentación se introdujo un recipiente de plástico con un algodón húmedo de azúcar al 5 %. (Burton y Perkins, 1987). Las masas de huevos fueron cortadas de las bolsas y colocadas en cajas petri para su eclosión. Al emerger las larvas fueron colocadas 2 a 3 larvas en viales estériles que contienen una dieta meridica (Burton y Perkins, 1987) se incubaron en condiciones controladas de temperatura, humedad relativa (25°C ±1.5°C y 70% ±5 % H. R.) y un fotoperíodo luz-oscuridad de 12:12 h en una cámara de cría, dejando pasar 2 o 3 generaciones, esto se realizó con el fin de tener la cría sana, libre de otros factores que causan mortalidad (enemigos naturales y/o enfermedades).

Bioensayos de actividad bioinsecticida. Los extractos crudos de acetona y metanol de *P. laevigata* se evaluaron a 500 ppm contra *S. frugiperda*. Las larvas utilizadas para el bioensayo fueron obtenidas de la cría establecida en el laboratorio. En los bioensayos se utilizaron cajas circulares de 2.5 cm de diámetro, con 15 ml de dieta meridica a la que se le adicionó el extracto orgánico el cual se mezcló al ser licuado con los demás ingredientes, se colocó una larva del primer estadio y se selló con parafilm. El control fue dieta meridica sin extracto. Las cajas selladas se colocaron en una cámara climática a las mismas condiciones controladas que la cría. El diseño experimental fue completamente al azar con 2 tratamientos (acetona, metanol) y 2 repeticiones, las

variables de respuesta fueron: peso de las larvas a los 7 y 14 días, % mortalidad larval y % de pupas inviábiles. Lo mismo se le realizó a las reuniones obtenidas del proceso cromatográfico de los extractos más activos, evaluando dos diferentes concentraciones: 300 y 100 ppm. A los resultados se les aplicó análisis estadísticos de varianza y comparación de medias (DMS $P > 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dos extractos de la planta *P. laevigata* fueron aislados, obteniéndose 8.075g de acetona y 12.75g metanol. El rendimiento de dichos extractos se muestra en el Cuadro 2.

Los resultados obtenidos a 500 ppm (Cuadro 3), muestran que el extracto acetónico ocasiono mortalidad larval elevada (96%). En el caso de las larvas sobrevivientes se observa una diferen-

cia significativa entre los pesos de éstas a los 7 y 14 días, siendo menor en los tratamientos con respecto al testigo. La mortalidad de las pupas obtenidas fue del 100%. Por otro lado, el extracto metanólico presentó un 33% de mortalidad larval y un 45% de pupas muertas. En cuanto a las larvas sobrevivientes se observa una diferencia significativa entre los pesos larvales a los 7 y 14 días, siendo menor en los tratamientos, con respecto al testigo.

Los resultados obtenidos de la evaluación de las 6 reuniones aisladas del extracto activo de acetona de *P. laevigata* muestran que en la reunión (R1 y R2) el bioensayo a 300 ppm, (Cuadro 4) pudiera existir un efecto fagoestimulante con respecto al testigo; las reuniones R3, R5 y R6 presentaron una inhibición en la alimentación, dado que el peso larval de estas tres reuniones estuvo por debajo del testigo, además de que en

Cuadro 2

Rendimiento de los extractos obtenidos de *Prosopis laevigata*

| Nombre Científico | Disolvente | peso planta seca g | peso del extracto g | Rendimiento % |
|---------------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------|
| <i>Prosopis laevigata</i> | <i>n</i> -hexano | 761.0 | 4.10 | 0.538 |
| | Acetona | 761.0 | 8.07 | 1.061 |
| | Metanol | 761.0 | 12.75 | 1.675 |

Cuadro 3

Efecto de extractos de *Prosopis laevigata* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*.

| Tratamientos 500ppm | Peso 7 días g* | Peso 14 días g* | Mortalidad larval (%) | Pupas muertas (%) |
|---------------------|----------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| Extracto Acetónico | 0.0002c | 0.0007c | 96 | 100 |
| Extracto Metanólico | 0.0026b | 0.0629b | 33 | 45 |
| Testigo | 0.0055a | 0.1760a | 0 | 0 |

* Letras iguales no existe diferencia estadística significativa ($P > 0.05$).

Cuadro 4

Efecto de las reuniones del fraccionamiento del extracto acetónico de *Prosopis laevigata* a 300ppm sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*.

| Tratamiento 300 ppm | Peso de larvas 7 días (g)* | % mortalidad larval |
|---------------------|----------------------------|---------------------|
| R1 | 0.0943a | 20 |
| R2 | 0.0940a | 15 |
| R3 | 0.0151c | 0 |
| R4 | 0.0319b | 57 |
| R5 | 0.0182c | 3 |
| R6 | 0.0193c | 10 |
| Testigo | 0.0417b | 0 |

* Letras iguales no existe diferencia estadística significativa (P>0.05).

este bioensayo se observó un desarrollo acelerado en la etapa larval lo cual no permitió obtener el peso a los 14 días ya que presentaron una etapa temprana de prepupa. La reunión 4 presentó un porcentaje de mortalidad apreciable del 57%, (Cuadro 4). En el bioensayo a 100 ppm, se observó que las reuniones R2, R3 y R6, causaron inhibición de la alimentación, dado el bajo peso larval mostrado a los 7 días, y un posible efecto tóxico en la reuniones R3 y R4 que ocasionaron un 40 y un 56 % de muerte larval (Cuadro 5).

El bioensayo a 300 ppm, determinó la mortalidad en la etapa de pupa, observándose en la reunión R3, un 76% y en la R5 y R6 un 48%; la reunión R3 a su vez presentó un 71% de adultos deformes (Cuadro 6). A 100 ppm, (Cuadro 7) es posible observar que varias reuniones fueron activas, tal es el caso de la reunión R1, R5 y R6 las cuales presentaron un 76, 39 y 40% de mortalidad en la etapa de pupa respectivamente. También fue posible verificar que la reunión R3 volvió a presentar un 38% de adultos deformes a esta concentración (Cuadro 7).

Cuadro 5

Efecto de las reuniones del fraccionamiento del extracto acetónico de *Prosopis laevigata* a 100 ppm sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*.

| Tratamiento 100 ppm | Peso de larvas 7 días g* | % mortalidad larval |
|---------------------|--------------------------|---------------------|
| R1 | 0.0268cd | 13 |
| R2 | 0.0192d | 10 |
| R3 | 0.0237d | 40 |
| R4 | 0.0374bc | 56 |
| R5 | 0.1007a | 6 |
| R6 | 0.0219d | 10 |
| Testigo | 0.0417b | 0 |

* Letras iguales no existe diferencia estadística significativa (P>0.05).

Los resultados de este trabajo muestran que *Prosopis laevigata* presenta una alta actividad larvicida en *S. frugiperda* y coincide con lo reportado por Gutiérrez *et al.*, (2005) quienes reportaron que extracto clorofórmico de hojas y

Cuadro 6

Efecto de reuniones del extracto acetónico de *Prosopis laevigata* a 300 ppm sobre pupas de *Spodoptera frugiperda*.

| Tratamiento 300 ppm | Peso de pupas g* | % pupas muertas | % adultos deformes |
|---------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
| R1 | 0.2573 ^a | 13 | 0 |
| R2 | 0.2318 ^b | 12 | 0 |
| R3 | 0.1970 ^d | 76 | 71 |
| R4 | 0.2038 ^{cd} | 15 | 27 |
| R5 | 0.2414 ^{ab} | 48 | 33 |
| R6 | 0.2253 ^{bc} | 48 | 28 |
| Testigo | 0.2253 ^{bc} | 0 | 0 |

* Letras iguales no existe diferencia estadística significativa (P>0.05).

Cuadro 7

Efecto de reuniones del extracto acetónico de *Prosopis laevigata* a 100 ppm sobre pupas de *Spodoptera frugiperda*.

| Tratamiento 100 ppm | Peso de pupas g* | % pupas muertas | % adultos deformes |
|---------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| R1 | 0.2250a | 76 | 30 |
| R2 | 0.2380a | 24 | 27 |
| R3 | 0.2256a | 28 | 38 |
| R4 | 0.1956b | 23 | 0 |
| R5 | 0.1890b | 39 | 0 |
| R6 | 0.2281a | 40 | 31 |
| Testigo | 0.2253a | 0 | 0 |

* Letras iguales no existe diferencia estadística significativa ($P>0.05$).

extractos hexánicos de semillas de *P. juliflora* a 200 ppm causaron un 100% de mortalidad en ninfas de *Bemisia tabaci*.

Los extractos acetónico y metanólico mostraron actividad insecticida, pero el acetónico causó mortalidad más alta en las etapas de larva y pupa, a partir del fraccionamiento del extracto crudo se encontró que la R4 a 300 y 100ppm ocasionó un mayor porcentaje de mortalidad larval, las reuniones R3, R5 y R6 a 300ppm y la R1 a 100ppm mostraron mayor porcentaje de mortalidad en pupas. De acuerdo al criterio propuesto por Silva *et al.*, (2003) quienes señalan como prometedores los extractos que causen una mortalidad superior al 40% se puede indicar que estos tratamientos evaluados sobrepasan el umbral fijado.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación recibió soporte financiero del proyecto: SIP20080430 de la Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional.

LITERATURA CITADA

- ANDERSON, D. Y W. WEIPING. 1989. The characterization of proteinaceous *Prosopis* mesquite gums which are not permitted food additives. *Food Hydrocolloid*, 3: 235-242.
- BECKER R. Y O. K. GROSJEAN. 1980. A compositional study of pods of two varieties of mesquite (*Prosopis glandulosa*, *P. velutina*). *Journal Agricultural Food Chemistry*, 28:22-25.
- BURTON, L. Y D. PERKINS. 1987. Rearing the corn earworm and fall armyworm for maize resistance studies. Proceedings of the International Symposium on Methodologies for Developing Host Plant Resistance to Maize Insects. CIM-MYT. México. 35-37 pp.
- CÉSPEDES, C. L., J. S. CALDERÓN, L. LINA Y E. ARANDA. 2000. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp (Meliaceae). *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48: 1903-1908.
- CÓRDOVA, M. 2004. Clasificación y caracterización físico-química de la goma de mezquite (chúcata) cruda y ultrafiltrada. Tesis. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 110 pp.
- ESTÉVEZ A. M., C. SÁENZ, M. L. HURTADO, B. ESCOBAR S. ESPINOZA Y C. SUÁREZ. 2004. Extraction methods and some physical properties of mesquite (*Prosopis chilensis* (mol) stuntz) seed gum. *Journal Scientific Food Agricultural*, 84:1487-1492.
- GOLUBOV, J., M. MANDUJANO, L. EGUIARTE. 2001. The paradox of mesquite (*Prosopis* spp): Invading species of biodiversity enhancers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 69: 21-28.
- GONZÁLEZ-GÓMEZ, J., A. AYALA-BURGOS, E. GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ. 2006. Total phenols and condensed tannins in tree species with potential as forage sources in the tropics region Tierra Caliente Michoacán, México. *Livestock Research for Rural Development*. 18:1-8.
- GOYCOOLEA, F., A. CALDERÓN DE LA BARCA, J. BALDERAMA, J. VALENZUELA, G. HERNÁNDEZ. 1998. Processing and functional behaviour of low-tannin mesquite gum. pp. 305-313. In P. A. Williams, G. O. Phillips (Eds.) *Gums and Stabilizers for the food Industry* 9. Royal Society of Chemistry. Cambridge, RU.
- GOYCOOLEA, F., A. CÁRDENAS, G. HERNÁNDEZ, J. LIZARDI, G. ÁLVAREZ, F. SOTO. 2000. Polisacáridos aislados del mezquite y de otras plantas del desierto. II Simposio Internacional Utilización y Aprovechamiento de la Flora Silvestre de las Zonas Áridas. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. pp. 245-260.
- GUTIÉRREZ O. M., R. FIGUEROA, L. ALDANA, C. LUNA, J. M. RAMOS Y M. O. CAMACHO. 2005. Actividad insecticida de

- Prosopis juliflora* (Sw.) D. C. (Fabaceae) sobre bemisia tabaci Gennadius (Homoptera:Aleyrodidae). Resúmenes 51 Annual Meeting Interamerican Society for Tropical Horticulture.
- INE (1994) Mezquite *Prosopis* spp. Cultivo alternativo para las zonas áridas y semiáridas de México. Instituto Nacional de Ecología. México pp. 30.
- JACOBSON, M. 1989. Botanical pesticides: past, present and future. In: Insecticides of plants origin. Arnason, J. T. and Philogene, B. J. R. (Ed). *American chemical society*. pp. 1-10.
- LÓPEZ-FRANCO Y. L., MA. VALDEZ, J. HERNÁNDEZ, A. CALDERÓN DE LA BARCA, M. RINUADO AND F. M. GOY-COLEA. 2006. Macromolecular dimensions and mechanical properties of monolayer films of Sonorean mesquite gum. *Macromolecular Bioscience* 4: 865-874.
- OROZCO-VILLAFUERTE, F. J., E. CRUZ-SOSA, PONCE-ALQUICIRA AND E. J. VERNON-CARTER. 2003. Mesquite gum: fractionation and characterization of the gum exuded from *Prosopis laevigata* obtained from plant tissue culture and from wild trees. *Carbohydrate Polymers* 54: 327-333.
- RODRÍGUEZ, F., AND A. MALDONADO. 1996. Overview of past, current and potential uses of mesquite in México. In Felker R. Moss. (Eds.) *Prosopis: Semiarid Fuel wood and Forage Tree Building Consensus for the Disenfranchised*. Center for Semi-arid Forest Resources. Texas A & M University. Washington, DC. EEUU. pp. 6.41-6.52.
- ROJAS, R., G. CERDA, T. FRIAS, L. DENDOOVEN, P. OLALDE, AND V. RAMOS. 2003. Changes in the concentration of trigonelline in a semi-arid leguminous plant (*Prosopis laevigata*) induced by an arbuscular mycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. *Mycorrhiza*. 13:49-52.
- SILVA, G., A. LAGUNES, J. RODRÍGUEZ, D. RODRÍGUEZ. 2003. Evaluación de polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky. En maíz almacenado. *Ciencia e investigación agraria*. V. 30 p.153-160.