

**ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE FORMULADOS BIOINSECTICIDAS  
ELABORADOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE *Azadirachta indica* (NIM)**

**ANDREA CAROLINA RODRÍGUEZ RUIZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2016**

**ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE FORMULADOS BIOINSECTICIDAS  
ELABORADOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE *Azadirachta indica* (NIM)**

**ANDREA CAROLINA RODRÍGUEZ RUIZ**

**Trabajo de grado para optar al título de:  
Ingeniera Química**

**Director  
DEBORA ALCIDA NABARLATZ  
Doctora en Ingeniería Química**

**Codirector  
JOSÉ GABRIEL LÓPEZ ORTIZ  
Magíster (c) en Ingeniería Química**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2016**

Para mis papás, Francisca y Gregorio, los más grandes ejemplos de valor y perseverancia. Por enseñarme la importancia de la familia, y porque están para mí cada vez que los necesito como apoyo y consuelo. Por el esfuerzo que realizan cada día por mí y mis hermanos. Este logro es nuestro.

A mis hermanos, Oscar, Felipe y Marcela, por todos los momentos y recuerdos, porque sin ustedes la vida no sería lo mismo.

A mi tía Esperanza, por ser una mujer luchadora.

Para Carlos Fernando, por todo el amor, por ser amigo, confidente y fuerza cuando siento que no puedo. A su familia, Don Eugenio y Doña Marlene, por todo el cariño brindado y por permitirme ser parte de la familia.

Para Silvia y Fabiola, por su amistad duradera e incondicional.

Para todos los que ya no están, mi tía Carmen, mi tía María, mi abuela Ninfa, mi tío Carlos, y con quienes desearía poder compartir este logro.

Gracias por hacer parte de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la profesora Debora Alcida Nabarlatz y el Ingeniero José Gabriel López Ortiz por las experiencias brindadas y el conocimiento compartido durante el desarrollo del proyecto. Por el acompañamiento y apoyo para la culminación del trabajo.

Al grupo de investigación INTERFASE y a sus miembros por la colaboración y el préstamo de instalaciones.

A la profesora Mabel Quintero, por su tiempo y asesoría para la realización de las pruebas de actividad microbiológica.

A la escuela de Química por el préstamo de equipos, y a Lucía Novoa por la asesoría durante las mediciones que se realizaron en el Laboratorio de Análisis Químico.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	16
1.1 OBJETIVO GENERAL	16
1.1.1 Objetivos Específicos	16
2. ESTADO DEL ARTE	17
3. MARCO TEÓRICO	19
3.1 EL ÁRBOL DE NIM	19
3.1.1 Características	19
3.1.2 Aprovechamiento	19
3.2 AZADIRACTINA	20
3.3 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD	20
3.4 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	20
3.4.1 Hongos	21
3.4.2 Bacterias	21
3.4.3 Tinción Gram	21
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	22
4.1 SOLVENTES UTILIZADOS	22

4.2	PRETRATAMIENTO DE LAS HOJAS	22
4.3	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	23
4.4	DISEÑO EXPERIMENTAL	23
4.5	PRUEBAS DE ESTABILIDAD	24
4.6	CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA GENERADA	24
4.7	CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	25
4.8	CUANTIFICACIÓN DE AZADIRACTINA	25
4.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
5.	RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	27
5.1	BIOMASA GENERADA	27
5.2	CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA	31
5.3	DEGRADACIÓN DE AZADIRACTINA	37
6.	CONCLUSIONES	42
7.	RECOMENDACIONES	43
	BIBLIOGRAFÍA	48
	ANEXOS	51

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Análisis ANOVA para PB.	27
<b>Tabla 2.</b> Caracterización de la colonia 1.	33
<b>Tabla 3.</b> Caracterización colonia 2.	31
<b>Tabla 4.</b> Caracterización colonia 3.	34
<b>Tabla 5.</b> Caracterización colonia 4.	32
<b>Tabla 6.</b> Caracterización colonia 5.	35
<b>Tabla 7.</b> Análisis ANOVA para %DAZA.	37

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema de la metodología empleada.	22
<b>Figura 2.</b> Superficie de respuesta y contorno para PB contra pH y % C para valores fijos de % A (v/v).	29
<b>Figura 3.</b> Determinación de las mejores condiciones para minimizar la degradación (tomando PB como variable respuesta).	31
<b>Figura 4.</b> Presencia de colonias de bacterias en la muestra pH 6 - 0,3% C - 80% A.	32
<b>Figura 5.</b> Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 1.	33
<b>Figura 6.</b> Presencia de colonias de bacterias en la muestra pH 9 - 0,3% C – 87,5% A.	33
<b>Figura 7.</b> Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 2.	31
<b>Figura 8.</b> Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 3.	35
<b>Figura 9.</b> Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 4.	32
<b>Figura 10.</b> Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 5.	35
<b>Figura 11.</b> Superficie de respuesta y contorno para % DAZA contra % C*% A a valores fijos de pH.	38
<b>Figura 12.</b> Determinación de las mejores condiciones para minimizar %DAZA.	40
<b>Figura 13.</b> Determinación de las mejores condiciones para minimizar PB y % DAZA a la vez.	41

## LISTA DE ANEXOS

	Página
<b>Anexo A.</b> Azadirachta indica: árbol, hojas, flor y frutos.	51
<b>Anexo B.</b> Molécula de azadiractina.	51
<b>Anexo C.</b> Puntos del diseño generados por el software, relaciones y proporciones de las formulaciones.	52
<b>Anexo D.</b> Protocolo general para la preparación de medios de cultivo.	52
<b>Anexo E.</b> Protocolo de preparación medio PDA.	53
<b>Anexo F.</b> Protocolo de preparación medio Sabouraud.	54
<b>Anexo G.</b> Protocolo de siembra por estría en superficie.	54
<b>Anexo H.</b> Protocolo de tinción para caracterización microbiológica.	55
<b>Anexo I.</b> Cromatógrafo líquido, Agilent 1100	55
<b>Anexo J.</b> Curva de calibración y cromatograma, medición de AZA por HPLC (DAD 210 nm)	56
<b>Anexo K.</b> Estado final filtros usados para la cuantificación de la biomasa generada.	57
<b>Anexo L.</b> Descripción del conservante Koralone.	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AZA</b>	Azadiractina
<b>PB</b>	Peso biomasa
<b>% DAZA</b>	Porcentaje de degradación azadiractina
<b>% C</b>	Porcentaje de conservante
<b>% A</b>	Porcentaje de agua
<b>EE</b>	Extracto etanólico
<b>PDA</b>	Agar papa dextrosa
<b>SC</b>	Sabouraud con cloranfenicol

## RESUMEN

**Título:** ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE FORMULADOS BIOINSECTICIDAS ELABORADOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE *Azadirachta indica* (NIM)\*

**Autor:** ANDREA CAROLINA RODRÍGUEZ RUIZ\*\*.

**Palabras claves:** *Azadirachta indica* (nim), extracto, formulado insecticida, estabilidad, Box-Benhken, superficie de respuesta.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar mediante estudios de estabilidad los factores que afectan los formulados insecticidas, obtenidos a partir de los extractos de las hojas de nim cuando son almacenados. Para eso se prepararon muestras a diferentes valores de pH (3, 6, 9), porcentaje de conservante (% C) (0%; 0,15%; y 0,3%) y porcentaje de agua (% A) (80%; 87,5%; 95%) según un diseño experimental tipo Box-Behnken. Las muestras se dejaron en incubación durante 20 días a 40°C, de manera que las características de la degradación se aceleraran y aparecieran en corto tiempo. Mediante HPLC se cuantificó la cantidad de azadiractina (AZA) en las muestras para determinar su porcentaje de degradación (% DAZA) con respecto al contenido inicial. Igualmente, se pesó la biomasa (PB) generada en las muestras y se caracterizaron mediante análisis microbiológicos. La muestra que mostró mayor degradación (mayor PB) fue la obtenida a pH 9; 0,3% C y 87,5% A, mostrando que solamente se desarrollaron bacterias de tipo bacilos. Empleando la metodología de superficie de respuesta, se ajustaron los modelos a los datos obtenidos, de manera que una predicción de las mejores condiciones para el almacenamiento fuera posible. Se encontró que la estabilidad de los extractos de hoja de nim se ve afectada por los mismos parámetros y las mismas condiciones que los extractos de semilla, y que para una formulación insecticida valores de pH 3, 0,2% C y 94% A, minimizan el PB y el % DAZA.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Debora Alcida Nabarlatz

## ABSTRACT

**Title:** STABILITY STUDIES OF BIOINSECTICIDAL FORMULATIONS WITH EXTRACS FROM *Azadirachta indica* (NEEM)

**Author:** ANDREA CAROLINA RODRÍGUEZ RUIZ\*\*.

**Key words:** *Azadirachta indica* (neem), extract, insecticidal formulation, stability, Box Behnken, response surface.

The factors that affect insecticidal formulations obtained from neem leaves extracts were studied by stability studies in the present paper. Samples with different pH values (3, 6, 9), preservative percentage (%C) (0%, 0,15% and 0,3% v/v) and water percentage (%A) (80%, 87,5%, 95% v/v) were prepared following a Box-Behnken experimental design. The samples were incubated for 20 days at 40°C, to accelerate degradation. The amount of azadirachtin (AZA) for determinate the percentage of degradation (%DAZA) respect the original content was quantified with HPLC. The same way, the biomass that was generated in the sample (PB) were weighed and characterized by microbiological analysis. The sample that showed more degradation (higher PB) was at pH 9, 0,3% C and 87,5% A, showing that only bacillus type bacteria were developed. The models that adjust to the data were obtained using the methodology of response surface, so that a prediction of the best storage conditions were possible. It was found that the stability of neem leaf extracts is affected by the same parameters and the same conditions as the seed extracts, and an insecticidal formulation for pH 3, 0.2% C and 94% A, minimize the PB and the %DAZA.

---

\*\* Faculty of Physico-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Debora Alcida Nabarlatz

## INTRODUCCIÓN

Para el control de plagas de granos almacenados, el principal método de control han sido los insecticidas de origen sintético, los cuales en su mayoría poseen efectos secundarios negativos en los ecosistemas y generan daños en la salud humana. Una alternativa son los insecticidas elaborados a partir de metabolitos secundarios producidos por plantas, los cuales son biodegradables y seguros para el ser humano [1]. La *Azadirachta indica* (nim) es un árbol que posee compuestos con acción insecticida, denominados limonoides, siendo la azadiractina (AZA) uno de los más estudiados [2]. Por lo anterior, se han desarrollado una gran variedad de productos comerciales a partir de los extractos provenientes principalmente de las semillas del nim (como Neemex® o NeemAzal®). No obstante, su introducción al mercado ha estado en parte limitada por la degradación de los compuestos activos durante el tiempo en bodega.

En trabajos anteriores desarrollados en el grupo INTERFASE, se han estudiado las propiedades insecticidas de los extractos de hoja de nim para el control del gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*), obteniendo una mortalidad del 86% por contacto. Sin embargo, para que pueda formularse un producto comercial, es necesario establecer las condiciones que permitan garantizar al usuario que adquiere un producto cuya calidad no se ha visto comprometida durante el almacenamiento.

Por esta razón, en el presente trabajo se evaluó la estabilidad de formulados elaborados a partir de extractos de las hojas del nim, mediante estudios de estabilidad acelerada. Para ello, se prepararon muestras con diferentes valores de pH, porcentaje de agua (% A) y porcentaje de conservante (% C); y se establecieron como variables de respuesta el PB y el % DAZA. Mediante la metodología de superficie de respuesta, se determinó la influencia de cada una de las variables, lo cual permitirá que los formulados puedan almacenarse durante períodos de tiempo prolongados sin perder su actividad insecticida.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto del pH, concentración del conservante y agua en la estabilidad de formulados insecticidas elaborados a partir de extractos provenientes de las hojas del árbol de nim durante su almacenamiento.

#### **1.1.1 Objetivos específicos**

1. Estudiar el comportamiento de los formulados de nim en ensayos de estabilidad acelerada, a diferentes condiciones de pH, concentración de conservante y agua.
2. Evaluar la influencia del pH, concentración del conservante y agua, en la proliferación de bacterias y hongos, empleando análisis microbiológicos.
3. Establecer las condiciones de pH, concentración de conservante y de agua, que permitan minimizar la degradación y garantizar la calidad de los formulados durante el almacenamiento.

## 2. ESTADO DEL ARTE

Comercialmente, es posible encontrar productos obtenidos a partir de extractos de semilla del nim que tienen como principio activo la AZA, en presentación de concentrado emulsionable para aplicar una vez se haya disuelto en agua [3]. Esto se debe a que después de que el concentrado se encuentra disuelto no es recomendable su almacenamiento. La FAO reporta que la vida media del principio activo en soluciones acuosas de NeemAzal® a 30°C disminuye de 10,7 días en pH 4, a tan sólo 0,96 días al aumentar el pH hasta 8 [4].

Los estudios realizados hasta el momento se han centrado principalmente en la estabilidad de la AZA, probando el efecto de variables que pueden contribuir en su degradación. Por ejemplo, R. O. Larson en la patente U.S 4556562 de Bikwood, Ltda, describe que para extractos provenientes de la semilla, ciertas condiciones como el pH y la concentración de AZA en la solución afectan su estabilidad. En el mismo estudio se determinó que a concentraciones de 2000 a 4000 ppm de AZA en un rango de pH de 3,5 a 6 se obtiene una formulación acuosa estable en almacenamiento [5].

La patente U.S 6811790 de EID Parry (India Ltda), describe una formulación pesticida libre de solventes orgánicos, tal que después de ser almacenada un año en un recipiente cerrado a temperatura de 25°C, al menos el 90% del peso de AZA original se conserva, mientras que en condiciones aceleradas a 54°C existía aún el 25% en peso del contenido de AZA original luego de 28 días [6].

Aun así, el uso comercial de preparaciones que contienen AZA se ha visto limitado debido a la inestabilidad de la molécula durante el almacenamiento, ya que se ha encontrado que el agua es la principal causante de la degradación de la AZA y estas preparaciones son disoluciones orgánicas con un alto contenido de agua. En la patente E.S 2205036 de la Oficina Española de Patentes y Marcas, se logró una

formulación sólida con un 5% en peso de disolventes polares y un 1% de agua en la que tras dos semanas de almacenamiento a 55°C en contenedor cerrado el 75% de AZA permaneció sin degradarse [7]. Además de las mencionadas, existen varias patentes que establecen las mejores condiciones para mantener el contenido de AZA en formulaciones insecticidas a partir de los extractos de semilla de nim, e incluso se han estudiado mejoras en el método de extracción [8, 9, 10].

En cuanto a la hoja de nim, la forma más común de usarla como insecticida ha sido de forma artesanal, mezclando el polvo de ésta con agua y aplicándola inmediatamente sobre las plantas. Buscando tecnificar el proceso de extracción el grupo de investigación INTERFASE, de la Universidad Industrial de Santander, en colaboración con la empresa ZUMOTEC, probó diferentes métodos de extracción para producir extractos a partir de hoja, evaluando su acción insecticida contra el gorgojo del arroz, encontrando que para la extracción por maceración con etanol no sólo se obtenían los mejores rendimientos de azadiractina, sino que además se producía la mayor mortalidad de individuos [11].

En Colombia, existen regulaciones para la calidad de los productos, y el Ministerio de la Protección Social en su “Guía para el desarrollo y presentación de los estudios de estabilidad de medicamentos” detalla los procedimientos que se deben seguir para determinar los factores que afectan la estabilidad de un producto. Empresas como Delivery Technologies, SGS, y Laboratorios Decno S.A.S, se encuentran certificados para realizar toda clase de estudios de estabilidad, por lo que en realidad, los estudios de estabilidad son una práctica común y necesaria hoy en día además de un requisito para la aceptación de un nuevo producto.

Debido a la poca información que se tiene acerca de la estabilidad de los formulados a partir de los extractos de la hoja de nim y los estudios citados anteriormente, que muestran la estrecha relación que hay entre las variables como el pH, el % C y el % A, y la estabilidad de la molécula de AZA, se plantea el presente trabajo.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 EL ÁRBOL DE NIM

*Azadirachta indica*, conocido también como nim, margosa o lila india, es un árbol tropical originario del sur de India. Perteneciente a la familia *Meliaceae*, subfamilia *Melioideae* posee gran resistencia a la sequía y se adapta a diversas condiciones, pero a temperaturas menores de 4°C presenta deshoje [12]. En Colombia, este árbol ha sido cultivado con fines de forestación y como material de estudio para usos insecticidas [13, 14].

**3.1.1 Características.** Como es una especie oriunda de zonas tropicales demanda mucha luz y temperaturas mayores a 20°C; puede vivir de 100 a 200 años y crecer hasta 20 m de alto. En cuanto al fruto, un árbol maduro de nim produce anualmente hasta 50 kg de éste [15], el cual es parecido a la aceituna que pasa de verde a amarillo cuando madura y almacena de una a tres semillas cuya corteza es de color castaño. El tallo contiene de 20 a 31 hojas verdes asimétricas de márgenes dentados, y flores de cinco pétalos color rosa blanquecino [16] (Anexo A).

**3.1.2 Aprovechamiento.** El árbol de nim suscita un gran interés debido al beneficio que se puede hacer de sus distintas partes, y no sólo de su madera. Por ejemplo, en países de Asia las flores hacen parte de la dieta diaria y se considera que las frutas pueden mejorar desórdenes urinarios. Además, a partir de los aceites y extractos se han hecho diversas preparaciones medicinales para combatir problemas de piel, diabetes, malaria, problemas cardiacos y respiratorios e incluso la obesidad [17]. Pero todos estos efectos medicinales se deben a los compuestos presentes en el árbol, de los cuales cerca de 300 han sido aislados y caracterizados [18]. Salanin, nimbin y las azadiractinas (de la A a la K) son los más conocidos e incluso, recientemente han sido estudiadas para la lucha contra el cáncer [19]. Sin embargo, el efecto más destacado ha sido su acción insecticida y repelente, siendo la azadiractina A, el principio activo más eficiente en este caso [20].

### **3.2 AZADIRACTINA**

Azadiractina A (AZA), compuesto limonoide tetranortriterpenoide altamente oxidado (Anexo B), y de fórmula molecular  $C_{35}H_{44}O_{16}$ , es un metabolito secundario que está presente en las semillas y hojas del árbol [21]. Afecta la fisiología de las plagas tratadas, reduciendo el crecimiento e interrumpiendo la síntesis de la hormona ecdisona, lo que modifica la muda y aumenta la mortalidad; además, en los insectos adultos afecta la reproducción (acción comprobada en más de 200 especies) [22].

### **3.3 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD**

Existen diferentes estudios de estabilidad y su implementación depende del objetivo que se quiera alcanzar. Los estudios de Preformulación y Desarrollo de Producto son los ensayos preliminares, ya que en estos se definen factores como las condiciones bajo las cuales se mantiene la estabilidad del principio activo y de la formulación, el método de producción, la forma de presentación más adecuada, y los auxiliares de formulación más compatibles (aditivos), de manera que si se considera el uso de un agente conservante, se realice seguimiento y control de su eficacia antimicrobiana. Además, pueden ejecutarse a condiciones de almacenamiento exageradas, de manera que los efectos que se puedan presentar a largo plazo sean forzados y aparezcan en corto tiempo [23].

### **3.4 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA**

Este tipo de seguimiento se hace cuando la formulación incluye un conservante, para determinar la presencia de microorganismos (hongos o bacterias). El análisis de población microbiana para hongos y bacterias inicia con la siembra en superficie o extensión en medios de cultivo selectivos para su crecimiento [24].

**3.4.1 Hongos.** La identificación de hongos se hace mediante una observación microscópica del micelio. Los hongos pueden ser unicelulares (como las levaduras) o pluricelulares, que dependiendo de la estructura de la hifa se pueden ser filamentosos, dimórficos o setas.

**3.4.2 Bacterias.** La identificación de colonias de bacterias se hace en función de las características que permita diferenciar una colonia de otra, tales como morfología, color, viscosidad, forma de los bordes y tamaño: pequeñas (<1 mm), medianas (1-2 mm) y grandes (>2 mm). Para la identificación de la morfología celular, se requiere observarlas al microscopio. En el portaobjetos se aplican unas gotas de suero fisiológico y en este se suspende una pequeña muestra de la colonia, la cual se fija o inmoviliza a la acción del fuego, ubicando el portaobjetos sobre la llama de un mechero, para luego ser clasificadas según la tinción de Gram [25].

**3.4.3 Tinción de Gram.** Es el método más utilizado para la clasificación de bacterias, el cual depende de la composición de la pared celular. La tinción debe realizarse en cultivos frescos y consiste en la aplicación de cuatro componentes: cristal violeta que tiñe todas las bacterias en azul, seguido de lugol, que fija este colorante a la pared celular, un agente decolorante el cual decolorará un solo tipo de bacterias, en donde las Gram positivas (Gram +) no decoloran y conservan la tinción cristal violeta, mientras que las Gram negativas (Gram -) que han sido decoloradas adquieren la nueva tinción rosa-rojo al aplicar la safranina, que es el colorante de contraste.

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

El desarrollo del trabajo siguió las etapas que se muestran en la figura 1.

**Figura 1.** Esquema de la metodología empleada.



### 4.1 SOLVENTES UTILIZADOS

Para la extracción se utilizó etanol industrial ( $\approx 96\%$ , Zumotec). Para la preparación de muestras se utilizó como conservante Koralone Bio-Clean™ (cuyo principio activo es Metilisotiazolinona y Clorometilisotiazolinona 1,5%, Rohm and Haas-Dow Chemicals), y soluciones de NaOH 0,1 M y ácido cítrico 0,1 M. Para cuantificar por HPLC se utilizó un estándar de AZA ( $> 95\%$ , Sigma Aldrich), las muestras se diluyeron en metanol para análisis (Merck) y se utilizó como estándar interno  $\alpha$ -terpineol ( $> 97\%$ , Sigma Aldrich). Como medios de cultivos para la caracterización microbiológica se utilizaron Sabouraud con cloranfenicol (SC), agar papa dextrosa (PDA) y agar nutritivo para bacterias, preparados en la Escuela de Microbiología de la Facultad de Salud. Para la tinción de las bacterias presentes se utilizaron los colorantes cristal violeta y safranina, lugol como fijador y alcohol-acetona.

### 4.2 PRETRATAMIENTO DE LAS HOJAS

La hoja fresca se dejó secar a temperatura ambiente y a la sombra durante siete días. Luego, se separaron las hojas de los tallos y se molieron en un molino de

cuchillas (Willey Mill, Arthur Thomas), donde se hicieron pasar por una malla de 1 mm, que sería el tamaño final del material. La hoja molida se almacenó en botellas ámbar a la sombra y temperatura ambiente, ya que la azadiractina contenida en ellas es sensible a la luz.

### **4.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO**

Las condiciones para la extracción se establecieron en un trabajo de grado realizado anteriormente, de las cuales se seleccionaron las que permitieron obtener el mayor rendimiento [26]. Para ello, las hojas molidas y secas se mezclaron en botellas ámbar con etanol en una relación 32% p/v y se dejaron en agitación a 364 rpm durante 48 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la mezcla de etanol - hoja se pasa inicialmente por un tamiz de tela para eliminar la parte gruesa y después se centrifuga a 5000 rpm durante 10 min para eliminar las partículas más finas. Del sobrenadante se toma el extracto etanólico (EE), el cual se utiliza en las preparaciones y se caracteriza posteriormente.

### **4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL**

Debido a que las variables evaluadas fueron pH, cantidad de agua y porcentaje de conservante en la formulación, se escogió un diseño de superficie de respuesta Box-Behnken. Este diseño permite determinar las mejores condiciones generando una menor cantidad de combinaciones que un diseño factorial simple, ya que se centra en los puntos medios de cada variable; es decir genera combinaciones en las que no todas las variables tomen los valores extremos del rango a la vez, asegurando que todos los puntos de diseño se encuentren dentro de la región de interés.

Se utilizó el software estadístico Minitab 17 para establecer las combinaciones según el diseño, en el cual se especificaron los puntos extremos de las variables de entrada. De acuerdo a la literatura, con valores de pH entre 3,5 y 6 se encuentra que la AZA de extractos insecticidas provenientes de la semilla es estable en agua [27], por esta razón se escogieron valores de pH de manera que se mirara el efecto

del medio ácido (pH 3) y el medio básico (pH 9). Se seleccionó el conservante Koralone-Bio Clean, debido a que la empresa Zumotec lo utiliza dentro de sus productos. La dosis recomendada por el fabricante es 0,15% v/v, por lo tanto, se decidió que el rango a evaluar estuviera entre concentración nula (0% v/v) y en exceso del componente (0,3% v/v). Como se quiere lograr una formulación insecticida de aplicación directa (que no requiera ser diluida para su uso) y económicamente viable, usar volúmenes grandes de agua dentro de ella reduce el costo [28], por esto se estableció que el intervalo de agua en la formulación estaba delimitado por 80% v/v a 95% v/v. En el Anexo C se presentan los puntos del diseño generados por el software.

#### **4.5 PRUEBAS DE ESTABILIDAD**

Para la preparación de los formulados, se determinó un volumen de muestra de 25 mL, y las preparaciones se hicieron por duplicado según el diseño experimental. En una probeta se midió la cantidad de EE correspondiente, se agregó la respectiva cantidad de conservante y se aforó con agua destilada hasta 25 mL. Las cantidades empleadas según los porcentajes del diseño experimental se presentan en el anexo C. Por último se ajustó el pH con soluciones de hidróxido de sodio 0,1 M y ácido cítrico 0,1 M con un pHmetro digital (Schott Instruments). Para los estudios de estabilidad acelerada se emplea una temperatura de 40°C y una humedad relativa de 75%, por lo que las muestras se envasaron en recipientes de polietileno opacos y fueron puestas en una incubadora a las condiciones antes mencionadas durante un período de 20 días [29].

#### **4.6 CUANTIFICACIÓN DE BIOMASA GENERADA**

En la cuantificación de la biomasa generada se siguió la metodología propuesta por Zhu y Lee [30]. Para la separación de la biomasa se empleó papel filtro punto azul, que permite la retención de partículas de entre 2 y 3  $\mu\text{m}$  (el diámetro de las bacterias de interés está entre 2,5 y 5  $\mu\text{m}$ ). Los filtros se depositaron en cajas de petri, fueron puestos a secar por 24 h a 105°C en un horno conectivo, con el fin de retirar la

humedad y se registró su peso. Una vez filtradas las muestras al vacío, los filtros fueron colocados nuevamente en el horno, para determinar el peso seco celular tras desecación de las células a 105°C hasta peso constante, la diferencia en peso del filtro antes y después es el peso seco de la biomasa generada. Las muestras con mayor cantidad de biomasa fueron caracterizadas, con el fin de identificar los microorganismos presentes.

#### **4.7 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA**

El desarrollo de esta parte se hizo con la colaboración de la profesora Mabel Quintero en los Laboratorios de Biotecnología de la Escuela de Ingeniería Química, y la preparación de los medios empleados se describe en los anexos D a F. Para determinar la presencia de hongos, se realizaron siembras por estría (de acuerdo al anexo G) en dos medios: SC y PDA, en los cuales se sembraron 10 µL y 100 µL de muestra, respectivamente. De igual manera, se sembraron por duplicado 100 µL de muestra en agar nutritivo para bacterias, para comprobar la existencia de éstas. Los medios se dejaron en la incubadora durante una semana a las mismas condiciones que estuvieron las muestras durante la degradación. Para la caracterización de las colonias que crecieron, se tomó una muestra de la colonia, se depositó en el porta objetos y se inmovilizó para después realizar la tinción según el protocolo descrito en el anexo H. Finalmente se observaron en el microscopio con lente 100x que requiere de aceite de inmersión en el porta objetos para un mejor enfoque.

#### **4.8 CUANTIFICACIÓN DE AZADIRACTINA**

Para la cuantificación de azadiractina, las muestras fueron rotoevaporadas hasta sequedad, agregando  $\alpha$ -terpineol como estándar interno al 2% p/p respecto al peso de la muestra seca. A continuación, las muestras fueron rediluidas en metanol en una proporción del 3% p/v.

La cuantificación de la AZA se hizo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), para lo cual se usó un cromatógrafo

líquido de Agilent Technologies, modelo 1100 (Anexo I), que cuenta con un inyector automático, una bomba cuaternaria y un detector de diodos (con longitudes de onda de 210 y 214 nm). Para la separación se usó la columna Zorbax C-18 (Agilent, 250 x 4,6 mm), donde se inyectaron 10 µL de muestra. El método usado consiste en una fase móvil a razón de 1 mL/min de acetonitrilo/agua al 40% v/v durante 5 minutos, para después aumentar el porcentaje de acetonitrilo en un gradiente lineal durante 3 minutos hasta llegar al 100% y mantenerlo durante 4 minutos. El tiempo total de corrida es de 12 minutos, seguido de 5 minutos de pos-corrida al 40% v/v de acetonitrilo/agua para eliminar cualquier residuo de la muestra. El software utilizado para el análisis fue ChemStation B.01.03.

El porcentaje de degradación de azadiractina (% DAZA) se determina mediante la ecuación mostrada a continuación. Primero se determinó la cantidad de azadiractina presente en cada una de las muestras a partir de la curva de calibración (Anexo J). Luego, teniendo en cuenta una muestra control, que fue medida antes de la degradación se hace el respectivo cálculo.

$$\%DAZA = \frac{\%AZA_{Inicial} - \%AZA_{Muestra}}{\%AZA_{Inicial}} * 100$$

#### **4.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis de los datos se hizo con la metodología de superficie de respuesta mediante el software Minitab 17. Este programa toma los valores de los factores y de las variables de respuesta, y por regresión múltiple genera un modelo que se ajuste lo mejor posible a los datos. Además, establece un intervalo de confianza del 95%, para determinar a partir del valor de probabilidad (P) cuáles efectos son significativos en las respuestas. A partir del modelo, el software grafica la variable de respuesta en función de los factores para observar el comportamiento de ésta, y de igual manera, determinar las mejores condiciones según el objetivo deseado.

## 5. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En la extracción, se obtuvo un rendimiento de 3,73% g extracto seco/g hoja seca, y a partir de 236,1 g de hoja molida se produjeron 410 mL de EE, el cual se envasó en botellas ámbar y se mantiene refrigerado, para su uso en las formulaciones.

Una vez realizados los experimentos de estabilidad acelerada, donde se varió el pH, cantidad de conservante y cantidad de agua, y tomando como variables de respuesta la biomasa generada (PB) y el porcentaje de degradación del principio activo (%DAZA) en las muestras pasados los 20 días, se procedió a analizar los datos. Los resultados se muestran a continuación.

### 5.1 BIOMASA GENERADA

Luego de la filtración, los filtros secos (Anexo K) fueron pesados para obtener la cantidad de biomasa generada (PB) durante la degradación. Los valores obtenidos se ingresaron al software Minitab, el cual realizó el análisis ANOVA respectivo, que se presenta en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Análisis ANOVA para PB.

Efecto	Valor P	Efecto	Valor P	Efecto	Valor P
Modelo	0,002*				
Lineal	0,002	Cuadrático	0,224	Interacción	0,006
pH	0,690	pH*pH	0,466	pH*%C	0,035*
%C	0,113	%C*%C	0,061	pH*%A	0,384
%A	0,000*	%A*%A	0,925	%C*%A	0,004*

\* Efectos significativos sobre la variable de respuesta.

Al establecer un intervalo de confianza del 95%, el nivel de significancia ( $\alpha$ ) es 0,05. De esta forma, los factores cuyo valor de probabilidad (valor P) sea menor a 0,05

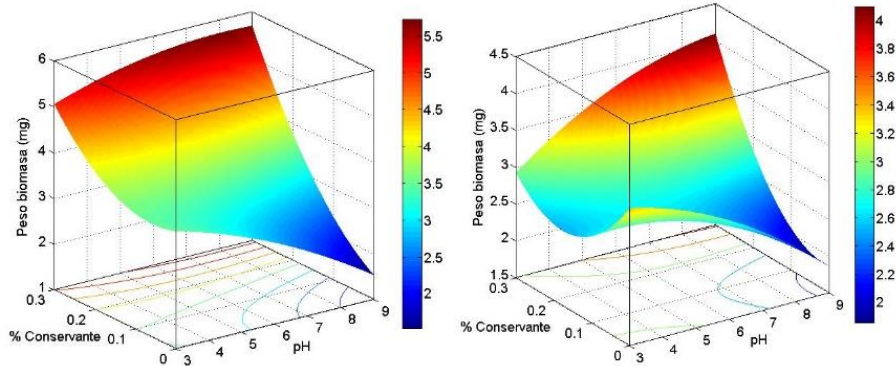
tienen un efecto significativo sobre la respuesta. En este caso, el efecto lineal del % de agua (% A), la interacción % C\*% A y la interacción pH\*% C son significativos. Las interacciones indican que el efecto de uno de los parámetros sobre la variable de respuesta depende del efecto de otro parámetro, por ejemplo, en la interacción %C \*%A el efecto del conservante sobre el peso de biomasa generada depende del valor de agua en el que se encuentre, mientras que en el caso pH\*% C, son los valores de conservante los que definen el efecto del pH sobre la respuesta. Además, a partir del análisis, se genera el modelo que mejor se ajuste a los datos, el cual se presenta a continuación.

$$PB=12,4-0,97(pH)+61,2(\%C)-0,148(\%A)-0,0254(pH)^2+27,1(\%C)^2+0,00052(\%A)^2+1,486(pH)(\%C)+0,0117(pH)(\%A)-0,86(\%C)(\%A)$$

Este modelo presenta un bajo ajuste, con un R<sup>2</sup> de 67,92%. Esto se debe a que el diseño experimental escogido sólo permite calcular hasta los coeficientes de segundo orden, lo que se podría mejorar con un diseño experimental que permita el cálculo de coeficientes de mayor orden.

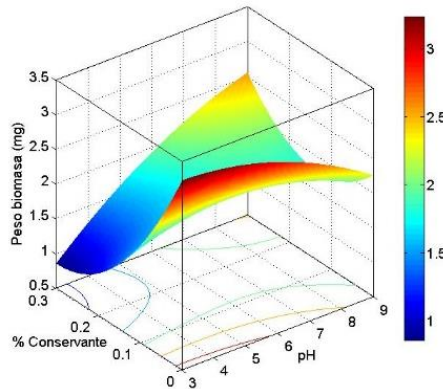
A partir del modelo, se obtienen las gráficas de superficie de respuesta y de contorno en las que se observan cómo se relaciona la variable de respuesta (PB) con respecto a dos factores, manteniendo constante uno de ellos. A continuación se presentan las superficies para valores fijos del % de agua (v/v) en la mezcla.

**Figura 2.** Superficie de respuesta y contorno para PB contra pH y % C para valores fijos de % A (v/v).



**a) 80% A**

**b) 87,5% A**



**c) 95% A**

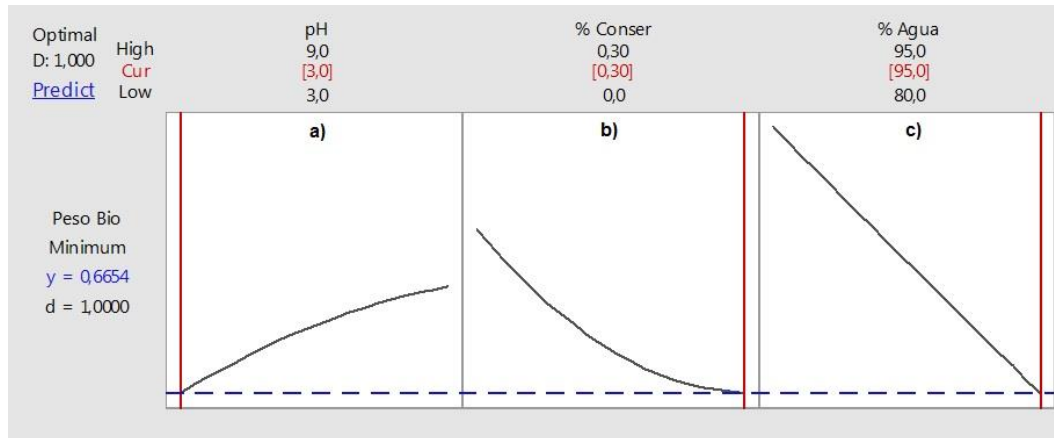
En las gráficas se observa que PB tiende a disminuir si se aumenta el % A. En cuanto al comportamiento de la respuesta con respecto al pH, ésta depende del valor de conservante y del porcentaje de agua en el que se está observando. De esta manera, los menores valores de biomasa se presentan a 80% v/v de agua, pH 9, 0,3% v/v de conservante (1,6 mg), y 95% v/v de agua, 0,3% v/v de conservante y pH 3 (0,8 mg). Las mayores cantidades de PB se presentan a 0,3% C, pH 9 para 80% v/v y 87,5% v/v de agua (5,5 mg y 4,2 mg respectivamente); y para 95% A, pH 3 y sin conservante (3 mg).

La generación de biomasa durante la degradación, se debe a la acción de microorganismos naturales que existen en las muestras. Por lo tanto, para entender los comportamientos que se observan en la figura 2, es necesario comprender el comportamiento del consorcio microbiano que exista en las preparaciones. Se sabe que una forma de clasificación de microorganismos se hace respecto al pH que requieran para su desarrollo (acidófilos para pH bajo y alcalófilos para pH alto). Existe una clase de bacterias Gram positivas, denominadas actinobacterias, que crecen en rangos de pH de 5 a 9, las cuales se asemejan a los hongos al presentar filamentos en su morfología, con lo que se entretrejen y forman grandes aglomerados [31]; además, presentan resistencia a conservantes, ya que producen sustancias que inhiben las bacterias con las que compiten [32,33].

Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, es posible que este tipo de bacterias esté presente en las muestras, junto con otros tipos de microorganismos. Es lógico que a menor cantidad de agua se produzca mayor biomasa, ya que existe mayor porcentaje de extracto, es decir, mayor disponibilidad de materia orgánica como sustrato. Sin embargo, aunque el conservante presenta gran actividad antimicrobiana (Anexo L), puede ser que no afecte las actinobacterias, razón por la cual se reporta el mayor PB a pH 9. Al no existir conservante en la formulación, el crecimiento de estas bacterias se ve delimitado por la acción de los demás microorganismos, y por eso se produce la menor cantidad de biomasa en pH 9. Al aumentar el % de agua, la cantidad de extracto es menor, por lo tanto existe más competencia de los microorganismos por sustrato, por eso al 95% A (v/v) y un 0,3% C (v/v), se genera poca biomasa a pH 3, ya que no se desarrollan actinobacterias.

Por otro lado, se determinaron las condiciones a las cuales la cantidad de biomasa generada fuese mínima. Para esto, el software se basa en el modelo propuesto, y por el método de función de deseabilidad, siendo 0 no deseado y 1 deseado, predice los valores de los factores que cumplan con el objetivo planteado.

**Figura 3.** Determinación de las mejores condiciones para minimizar la degradación (tomando PB como variable respuesta).



En la figura, cada celda representa el comportamiento de la variable de respuesta respecto a uno de los factores, siendo la celda a) PB contra pH, b) a PB contra %C, y c) para PB contra %A. La línea vertical roja corresponde al valor del parámetro para los cuales se hace la predicción, mientras que la línea punteada azul es el valor de la respuesta que podría alcanzarse según lo planteado.

En este caso, se obtiene una deseabilidad de 1, lo que indica que la predicción cumple con satisfacción el objetivo propuesto: minimizar la biomasa producto de la degradación. Esto se logra a pH 3, con 0,3% v/v de conservante y 95% v/v de agua, valores en los cuales el PB se reduce hasta 0,67 mg por cada 25 mL de formulado, que es realmente una cantidad muy pequeña, por lo que la calidad del producto en cuanto a su aspecto no se ve comprometida.

## 5.2 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

Uno de los aspectos importantes dentro de los estudios de estabilidad es recrear al máximo posible las condiciones en las que el producto será manejado: aditivos,

conservante, empaque, entorno y forma de producción, entre otros. Debido a esto, las condiciones a las que se prepararon las muestras no fueron de completa asepsia, propias de un laboratorio, sino se buscó simular un ambiente industrial con el fin de verificar el potencial de degradación por hongos y bacterias luego de almacenamiento.

En ese sentido, la caracterización microbiológica se realizó a aquellas muestras que presentaron mayor producción de biomasa durante la degradación, que fueron la muestra 10: pH 6; 0,3% C; 80% A (con 5,3 mg), y la muestra 14: pH 9; 0,3% C; 87,5% A (con 4,85 mg). En el análisis microbiológico, ambas muestras dieron positivo para bacterias, encontrando que en la muestra 10 creció una colonia, mientras que en la muestra 14 crecieron colonias de 4 morfologías diferentes.

- Muestra pH 6 - 0,3% C - 80% A:

**Figura 4.** Presencia de colonias de bacterias en la muestra pH 6 - 0,3% C - 80% A.

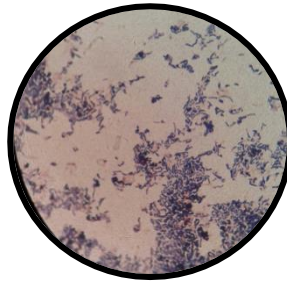


La caracterización de la colonia se hace al observar su morfología colonial (descripción a simple vista) y morfología celular (vista en microscopio) después de la tinción de Gram, según lo descrito en la sección 1.4. Para la colonia 1 se reporta lo siguiente:

**Tabla 2.** Caracterización de la colonia 1.

<b>Bacilos curvados Gram +</b>	
<b>Color</b>	Blanco
<b>Tamaño</b>	Grande
<b>Consistencia</b>	Blanda
<b>Bordes</b>	Lobulado
<b>Aspecto</b>	Opaco

**Figura 5.** Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 1.



- Muestra pH 9 - 0,3% C – 87,5% A:

**Figura 6.** Presencia de colonias de bacterias en la muestra pH 9 - 0,3% C – 87,5% A.



La colonia 4 se extendió dentro de la caja de petri, creando un tapete. A esto se le conoce como efecto swarming, lo que hace difícil aislar una única colonia y produce “contaminación” de las demás colonias. A continuación se presentan las caracterizaciones correspondientes a las bacterias que crecieron en la muestra.

**Tabla 3.** Caracterización colonia 2.

<b>Bacilos Gram + filamentosos</b>	
<b>Color</b>	Naranja
<b>Tamaño</b>	Mediana
<b>Consistencia</b>	Dura
<b>Bordes</b>	Cerebriforme
<b>Aspecto</b>	Opaco

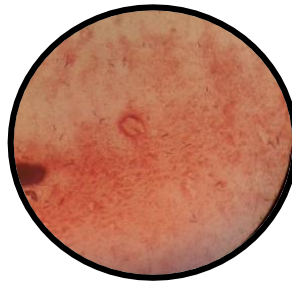
**Figura 7.** Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 2



**Tabla 4.** Caracterización colonia 3.

<b>Bacilos Gram + rectos</b>	
<b>Color</b>	Crema
<b>Tamaño</b>	Pequeña
<b>Consistencia</b>	Blanda
<b>Bordes</b>	Lobulado
<b>Aspecto</b>	Opaco

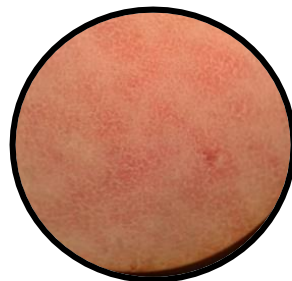
**Figura 8.** Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 3.



**Tabla 5.** Caracterización colonia 4.

<b>Bacilos Gram -</b>	
<b>Color</b>	Amarillo
<b>Tamaño</b>	Grande
<b>Consistencia</b>	Mucoide
<b>Bordes</b>	Lobulado
<b>Aspecto</b>	Traslúcido

**Figura 9.** Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 4.



**Tabla 6.** Caracterización colonia 5.

<b>Bacilos Gram -</b>	
<b>Color</b>	Amarillo
<b>Tamaño</b>	Mediana
<b>Consistencia</b>	Mucoide
<b>Bordes</b>	Lobulado
<b>Aspecto</b>	Traslúcido

**Figura 10.** Vista en microscopio con lente 100x de la colonia 5.



Como diagnóstico de la caracterización no se reportó la presencia de hongos, ya que en los medios SC y PDA no se apreció crecimiento. Se encontró que todas las colonias son del tipo bacillus, es decir, su presencia en las muestras posiblemente se deba a mala práctica, o manejo inadecuado de las muestras y de los implementos; ya que estas bacterias son de tipo ambiental y se encuentran comúnmente sobre las superficies o en los utensilios empleados.

Es necesario mencionar que las muestras en las que crecieron bacterias son de pH 6 a 9, rango en el que se produce crecimiento de actinobacterias y concuerda con el análisis realizado en el apartado anterior. Además, la colonia 2 coincide con la descripción realizada de actinobacterias, ya que presenta tinción violeta es una bacteria Gram positiva, y en su morfología se observan una clase de filamentos, por lo que se podría considerar que esta colonia pertenece a ese tipo de bacterias.

Aunque son bacterias de tipo ambiental, algunas de estas, especialmente las Gram negativas, podrían ser patógenas o desarrollar características patógenas, que afectarían a quien manipule el producto, por lo tanto se propone como medida para reducir su presencia en las formulaciones, la desinfección de superficies y la esterilización de envases e implementos.

### 5.3 DEGRADACIÓN DE AZADIRACTINA

Por el tratamiento realizado a las formulaciones para esta parte (rotoevaporadas y rediluidas al 3%), un único control aplica para todas las preparaciones. La cantidad de AZA en la muestra control corresponde a 1,8% p/v, y la degradación de cada muestra se calculó según lo descrito en la sección 2.8. Los datos obtenidos se ingresaron al software Minitab que realizó el análisis ANOVA que se presenta.

**Tabla 7.** Análisis ANOVA para %DAZA.

Efecto	Valor P	Efecto	Valor P	Efecto	Valor P
Modelo	0,000				
Lineal	0,000	Cuadrático	0,062	Interacción	0,966
pH	0,000*	pH*pH	0,278	pH*%C	0,782
%C	0,458	%C*%C	0,021*	pH*%A	0,981
%A	0,006*	%A*%A	0,376	%C*%A	0,673

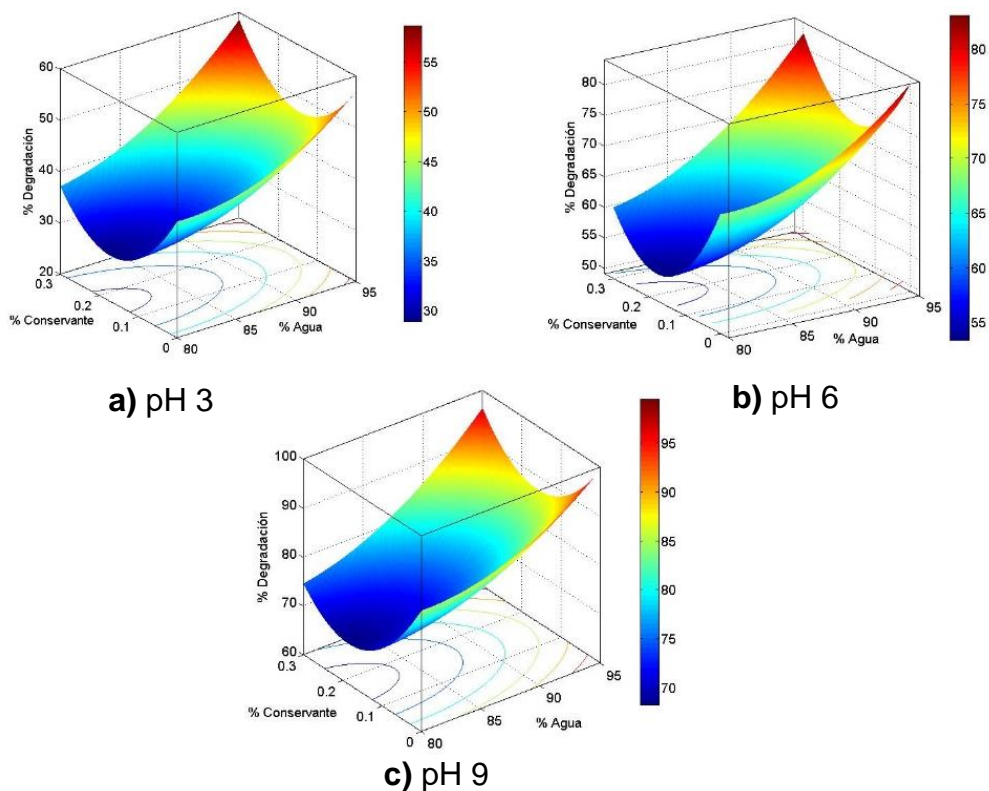
\* Efectos significativos sobre la respuesta.

Para este caso, los efectos lineales del pH y del % A son significativos, y a diferencia del PB, no se presentan efectos significativos de interacción, pero si un efecto cuadrático, el del %C. El modelo que mejor ajustado a los datos se presenta a continuación:

$$\%DAZA=459+13,1(\text{pH})-281(\%C)-11,2(\%A)-0,534(\text{pH})^2+480(\%C)^2+0,694(\%A)^2-2,58(\text{pH})(\%C)+0,004(\%pH)(\%A)+1,58(\%C)(\%A)$$

Al igual que para la biomasa, presenta un ajuste bajo con un R<sup>2</sup> de 76,68% y se debe también al diseño experimental escogido. Las superficies de respuesta se obtuvieron con base a este modelo y a continuación se presentan las gráficas para valores fijos de pH.

**Figura 11.** Superficie de respuesta y contorno para % DAZA contra % C\*% A a valores fijos de pH.

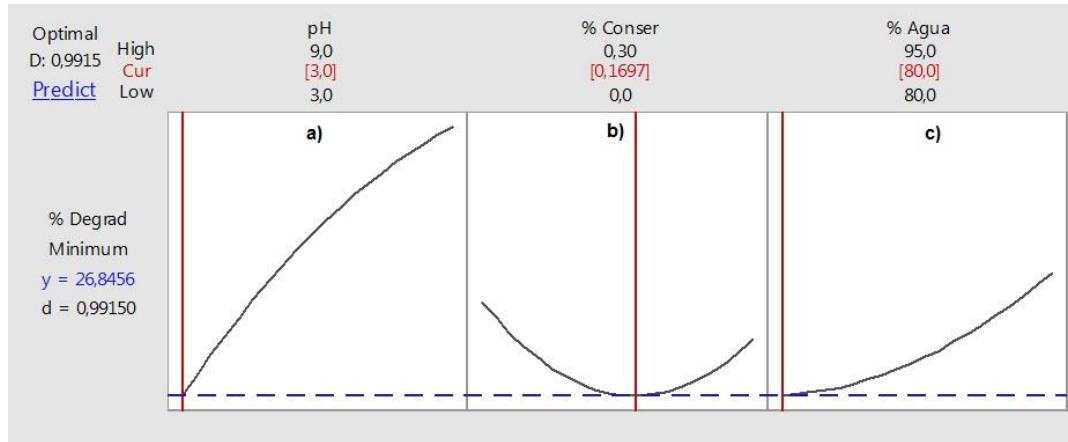


Se observa que las superficies presentan el mismo comportamiento para todos los valores de pH, esto se debe a que no existen efectos de interacción entre los factores. Las relaciones % DAZA - pH y % DAZA - % A son proporcionales, es decir, a medida que se aumenta el pH aumenta la degradación de la molécula, siendo de igual forma respecto al agua. En todos los casos, la menor degradación se presenta en 0,15% v/v de conservante y 80% v/v de agua, siendo de 30% a pH 3, 55% a pH 6 y 70% a pH 9. Los porcentajes más altos de degradación se presentan en los valores extremos de conservante (0% y 0,3% v/v) con la mayor cantidad de agua (95% v/v), siendo 55% para pH 3, 80% para pH 6, y 95% para pH 9.

Los resultados observados se explican debido a que la azadiractina es una molécula altamente oxigenada, y al estar en contacto con agua se hidroliza en diversos productos, dependiendo del pH del medio [34]. Estos datos concuerdan con lo reportado por Sundaram et al. [35], quienes evaluaron la cinética de degradación de AZA en soluciones acuosas a valores de pH 4, 7 y 10; y encontraron que la tasa de degradación por hidrólisis de AZA aumenta con el pH, pasando de días a pH 4, a sólo horas a pH 10. Esto lo atribuyen a que en la hidrólisis catalizada por bases, la presencia de grupos  $\text{OH}^{(-)}$  en el medio atacan los anillos epóxidos y los grupos ésteres que tiene la molécula de AZA y causan cambios estructurales irreversibles, mientras que en la hidrólisis catalizada por ácidos, las reacciones que se presentan son débiles e incluso reversibles, lo que contribuye a la estabilidad de AZA.

Teniendo en cuenta lo anterior, se espera que las mejores condiciones para la estabilidad de la AZA sean pH ácido, bajo contenido de agua y concentración de conservante de 0,15% v/v. Para confirmarlo, con ayuda del programa Minitab se determinaron los valores que minimizan el % DAZA. En la figura 12 se presenta la predicción realizada por el software.

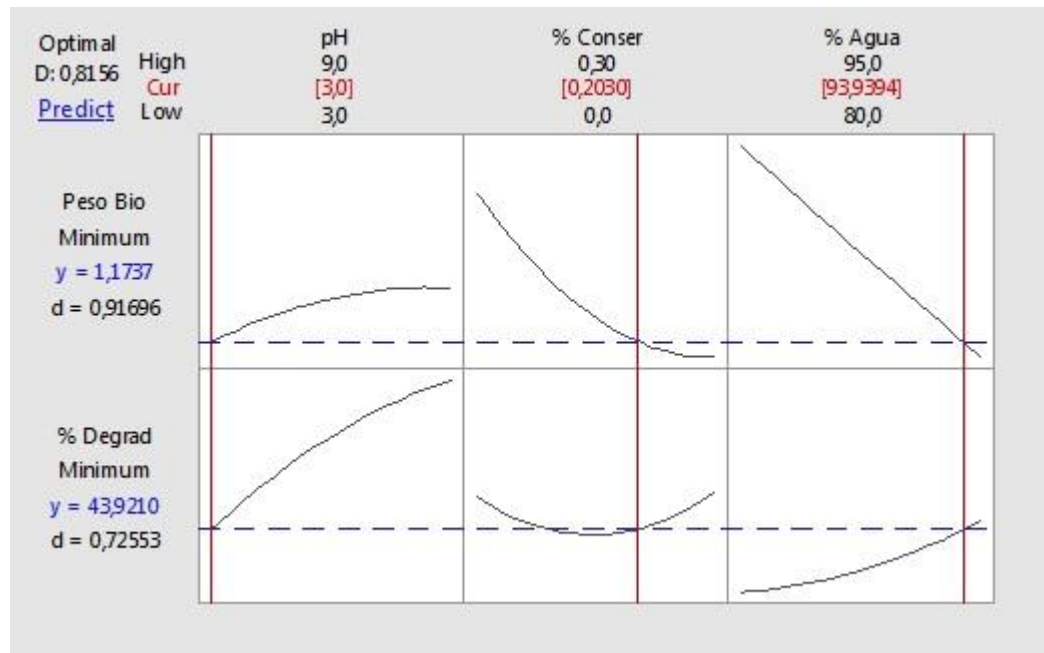
**Figura 12.** Determinación de las mejores condiciones para minimizar %DAZA.



A partir de la figura se observan los comportamientos de la variable de respuesta respecto a cada una de las variables independientes y se encuentra que, con una deseabilidad de 0,991, el valor mínimo de % DAZA que se puede obtener es 26,85% y se alcanza a valores de pH 3, 0,17% C y 80% A, que son los resultados esperados.

Uno de los objetivos del estudio es determinar las condiciones a las que los extractos de hoja de nim pueden ser almacenados sin que se presenten estas dos características (degradación biológica o química) (PB, % DAZA), o se presenten lo menos posible. Para esto, el programa analiza los modelos de las dos variables y encuentra los valores, de manera que la deseabilidad compuesta D, sea la mayor obtenida. Esto resulta un poco más complejo, ya que el efecto del % A es contrario para cada respuesta, ya que mientras un 95% de agua reduce la biomasa que se genera, en este valor la azadiractina se hidroliza con mayor facilidad. En la figura 13 se presentan los valores determinados por el software.

**Figura 13.** Determinación de las mejores condiciones para minimizar PB y % DAZA a la vez.



Con una deseabilidad de 0,8156, las mejores condiciones para el almacenamiento de los formulados de nim son pH 3, 0,2% de conservante y 93,94% de agua, para obtener 1,17 mg de biomasa generada y un porcentaje de degradación del principio activo de 43,92%. Esto se debe a que se pretende alcanzar un compromiso entre la degradación del principio activo, y el crecimiento de microorganismos.

La finalidad del estudio realizado es obtener las condiciones para desarrollar un insecticida comercial a base de los extractos provenientes de las hojas de nim para control de *Sitophylus oryzae*, una especie de gorgojo que ataca los granos de arroz. La aplicación del insecticida debe hacerse sobre las superficies en las que se encuentre almacenado, y no directamente sobre el grano, ya que el conservante utilizado se usa principalmente para la elaboración de productos industriales, y no para conservación de alimentos.

## 6. CONCLUSIONES

El pH y la cantidad de agua en la formulación de extractos de nim son factores que afectan mayormente la estabilidad de la azadiractina, mostrando que a valores altos de estas dos variables se da una mayor degradación del compuesto.

Según el modelo establecido se pudo determinar que la producción de biomasa es mayor al aumentar el pH, disminuir la cantidad de agua y de conservante. Al caracterizar las muestras se encontró que existían bacterias Gram positivas del tipo filamentosas.

Se encuentra que de manera individual, las condiciones que generarían menor cantidad de biomasa son pH 3, 0,3% conservante y 95% agua, mientras que para minimizar la degradación de la azadiractina la mejor combinación de factores es pH 3, 0,17% conservante y 80% agua. En cambio, para el almacenamiento del extracto teniendo en cuenta un compromiso de minimización de ambas variables (degradación de la azadiractina y biomasa generada) las mejores condiciones son pH 3, con 0,2% de conservante y 94% agua.

Por último, se comprueba la importancia de los estudios de estabilidad en el desarrollo de nuevos productos, ya que estos evalúan las variables que afectan la calidad de los compuestos, permitiendo encontrar los mejores auxiliares para la formulación

## **7. RECOMENDACIONES**

Se recomienda estudiar el efecto de otros aditivos que puedan mejorar la estabilidad de la formulación y el principio activo, bajo la misma condición de temperatura y tiempo de degradación que las pruebas realizadas. De igual manera, se recomienda continuar con los estudios de estabilidad incluyendo otro tipo de conservantes que sean compatible con alimentos para permitir su aplicación directamente en granos o plantas.

Igualmente, se recomienda la realización de un análisis microbiológico más detallado para la completa identificación de las bacterias, y comprobar si son de tipo patógeno o no.

Además, una vez determinados los auxiliares de formulación, realizar el estudio para determinar el tiempo de conservación del bioinsecticida.

## CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CORTÉS, Nicolás. Ventajas y desventajas de los insecticidas químicos y naturales. Veracruz, México. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias químicas. Licenciatura en Ingeniería ambiental 2011. 83 p.
- [2] TAIZ, Lincoln. ZEIGER, Eduardo. Plant physiology. Tercera edición. Sinauer Associates. Sunderland, Estados Unidos 2002. Volumen 1.
- [3] BARREK, Sami. et al. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Vernaison, Francia. Servicio Central de análisis, 2003. 11 p.
- [4] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Specifications and Evaluation for Agricultural Pesticides, Azadirachtin. 2010.23 p.
- [5] OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS. Stable anti-pest neem seed extract. Inventor R.O LARSON. US 06/590,808. Fecha de solicitud: Marzo 19, 1984. Estados Unidos, Patente de Concesión US4556562, Mayo 3 1985.
- [6] OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS. Storage stable pesticide formulations containing azadirachtin. Inventores S. R. DAMARIA; S. SRINIVASA et al. US 09/536,351. Estados Unidos, Patente de Concesión US 6811790, Noviembre 2, 2004.
- [7] OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS. Estabilidad mejorada de un sólido que contiene azadiractina. Inventores J.F. WALTER; M.T. ROLAND. ES 96918051.Fecha de solicitud: Junio 5,1996. España, Patente de Concesión ES 2205036, Agosto 20, 1997.
- [8] OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS. Co-extraction of azadirachtin and neem oil. Inventores M. ROLAND; J. BLOUIN. US 08/036,795. Fecha de solicitud: Marzo 25, 1993. Estados Unidos, Patente de Concesión US 5397571, Marzo 14, 1995.
- [9] OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS. Fórmula de azadiractina inalterable. Inventores C. G. CARTER; N. P. LUTHRA, et al. ES 90111511. Fecha de solicitud: Junio 16, 1996. España, Patente de Concesión ES 2058686, Noviembre 11, 1994.

- [10] OFICINA DE PANTENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS. Method for the production of storage stable azadirachtin from seed kernels of the neem tree. Inventor H. Kleeberg. US 08/601,488. Fecha de solicitud: Febrero 14, 1996. Estados Unidos, Patente de Concesión US 5695763, Diciembre 9, 1997.
- [11] GUERRERO, Julián. Producción de extractos de *Azadirachta indica* (nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de *Sitophilus oryzae*. Trabajo de Grado Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química 2014.
- [12] PURI, H. Plant sources. En: The Divine Tree *Azadirachta indica*. CRC Press, 1999. p 9-21.
- [13] GIRALDO, Francisco; CATAÑO, Carlos et al. Determinación de azadirachtina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en semillas de árbol de neem (*A. indica*) cultivada en Colombia. Medellín, Colombia. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, 2002.
- [14] FERNÁNDEZ, Diana; GONZÁLEZ, César. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del extracto foliar del árbol *Azadirachta indica* contra algunos hongos fitopatógenos. Trabajo de grado Microbiología industrial. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial 2008.
- [15] SMALL, Ernest. Neem. En: Top 100 Exotic Food plants. CRC Press, 2011. P 409-414.
- [16] PURI, H. Plant sources. En: The Divine Tree *Azadirachta indica*. CRC Press, 1999. p 9-21.
- [17] PURI, H. Traditional uses. En: The Divine Tree *Azadirachta indica*. CRC Press, 1999. p 77-85.
- [18] GIRALDO, Francisco; CATAÑO, Carlos et al. Determinación de azadirachtina por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en semillas de árbol de neem (*A. indica*) cultivada en Colombia. Medellín, Colombia. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, 2002.
- [19] PATEL, S. M., VENKATA, K. C. N; et al. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. Seminars in Cancer Biology. <http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.03.002>. Manuscrito en revisión.

- [20] ARIAS, Daniel; VÁSQUEZ, Greta; et al. Determinación de azaridactina de los aceites esenciales del árbol de neem (*Azadirachta indica*). Carabobo, Venezuela. Revista Ingeniería UC. Universidad de Carabobo, 2009.
- [21] CRUZ, Mario. Dinámica de la azaridactina en árboles de nim (*Azadirachta indica* A Juss) de México y su efecto contra dos insectos de almacén. Trabajo de grado Doctor en Ciencias agrícolas con especialidad en parasitología de poscosecha. México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de agronomía, 1998.
- [22] ESPARZA, Gabriela. Uso comercial de azadiractina y su integración a los agroecosistemas tropicales. Trabajo de grado Doctora en Ciencias. Veracruz, México: Colegio de Posgraduados, 2010.
- [23] MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Guía para el desarrollo y presentación de lo estudios de estabilidad de medicamentos. Bogotá D.C, Colombia, 1994. 46 p.
- [24] Diversidad microbiana y taxonomía. Recuento en placa. [Citado el 29 de abril de 2016]. Disponible en: [http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=467&Itemid=523](http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=467&Itemid=523)
- [25] Prácticas de Microbiología 2009-2010. [Citado el 29 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/micro2/practicas.pdf>.
- [26] GUERRERO, Julián. Producción de extractos de *Azadirachta indica* (nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de *Sitophilus oryzae*. Trabajo de Grado Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química 2014.
- [27] MORGAN, David. Azadirachtin, a scientific gold mine. En: Bioorganic and Medicinal Chemistry. Noviembre 17 de 2008.
- [28] MOORE, R.J; WIKILSON, J.B. La utilización del agua en la industria cosmética. En: Cosmetología de Harry. Traducido por Marta Rodríguez y Darío Rodríguez. Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid, 1990.
- [29] MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Guía para el desarrollo y presentación de lo estudios de estabilidad de medicamentos. Bogotá D.C, Colombia, 1994. 46 p.
- [30] LEE, Y.K; ZHU, C.J. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. En: Journal of Applied Phycology, 1997. Vol 9, no.2. p 189-194.

- [31] GONZÁLEZ, Yesmy. Los actinomicetos: Una visión como promotores de crecimiento vegetal. Trabajo de grado Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria 2010.
- [32] QIU, Peng; FENG, Zhi-Xiang; et al. Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China. En: Chinese Journal of Natural Medicines, 2015. Vol 13, no.2. p 942-953.
- [33] FUENTES, M.S; BENIMELI, C.S; et al. Isolation of pesticide-degrading actinomycetes from a contaminated site: Bacterial growth, removal and dechlorination of organochlorine pesticides. En: International Biodeterioration and Biodegradation, 2010. Vol. 64, no. 6. p 434-441.
- [34] SZETO, Sunny; WAN, Michael. Hydrolysis of azadirachtin in buffered and natural waters. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. Vol 44. p 1160-1163.
- [35] SUNDARAM, K.M.S; SLOANE, L; CURRY, J. Kinetics of azadirachtin hydrolysis in model aquatic systems by high performance liquid chromatography. En: Journal of liquid chromatography, 1995. Vol. 18, no. 2. p 363-376.
- [36] Manual de Laboratorio Microbiología. Universidad del Valle. [Citado el 1 de Mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.etpcba.com.ar/DocumentosDconsulta/ALIMENTOS-PROCESOS%20Y%20QU%C3%8DMICA/Manual-de-Microbiolog%C3%ADa.pdf>
- [37] Manual de Prácticas Laboratorio de Microbiología. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. [Citado el 1 de Mayo de 2016]. Disponible en: <http://bivir.uacj.mx/Reserva/Documentos/rva2011296.pdf>
- [38] Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. [Citado el 1 de Mayo de 2016]. Disponible en: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>

## BIBLIOGRAFIA

BARREK, Sami. et al. Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Vernaison, Francia. Servicio Central de análisis, 2003. 11 p.

CRUZ, Mario. Dinámica de la azaridactina en árboles de nim (*Azadirachta indica* A Juss) de México y su efecto contra dos insectos de almacén. Trabajo de grado Doctor en Ciencias agrícolas con especialidad en parasitología de poscosecha. México: Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de agronomía, 1998.

ESPARZA, Gabriela. Uso comercial de azadiractina y su integración a los agroecosistemas tropicales. Trabajo de grado Doctora en Ciencias. Veracruz, México: Colegio de Posgraduados, 2010.

GONZÁLEZ, Yesmy. Los actinomicetos: Una visión como promotores de crecimiento vegetal. Trabajo de grado Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá D.C: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria 2010.

GUERRERO, Julián. Producción de extractos de *Azadirachta indica* (nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de *Sitophilus oryzae*. Trabajo de Grado Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química 2014.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Guía para el desarrollo y presentación de lo estudios de estabilidad de medicamentos. Bogotá D.C, Colombia, 1994. 46 p.

OFICINA DE PANTENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS. Method for the production of storage stable azadirachtin from seed kernels of the neem tree.

Inventor H. Kleeberg. US 08/601,488. Fecha de solicitud: Febrero 14, 1996. Estados Unidos, Patente de Concesión US 5695763, Diciembre 9, 1997.

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS. Co-extraction of azadirachtin and neem oil. Inventores M. ROLAND; J. BLOUIN. US 08/036,795. Fecha de solicitud: Marzo 25, 1993. Estados Unidos, Patente de Concesión US 5397571, Marzo 14, 1995.

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS. Stable anti-pest neem seed extract. Inventor R.O LARSON. US 06/590,808. Fecha de solicitud: Marzo 19, 1984. Estados Unidos, Patente de Concesión US4556562, Mayo 3 1985.

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE ESTADOS UNIDOS. Storage stable pesticide formulations containing azadirachtin. Inventores S. R. DAMARIA; S. SRINIVASA et al. US 09/536,351. Estados Unidos, Patente de Concesión US 6811790, Noviembre 2, 2004.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS. Estabilidad mejorada de un sólido que contiene azadiractina. Inventores J.F. WALTER; M.T. ROLAND. ES 96918051. Fecha de solicitud: Junio 5, 1996. España, Patente de Concesión ES 2205036, Agosto 20, 1997.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS. Fórmula de azadiractina inalterable. Inventores C. G. CARTER; N. P. LUTHRA, et al. ES 90111511. Fecha de solicitud: Junio 16, 1996. España, Patente de Concesión ES 2058686, Noviembre 11, 1994.

ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. Specifications and Evaluation for Agricultural Pesticides, Azadirachtin. 2010.23 p.

PURI, H. Plant sources. En: The Divine Tree *Azadirachta indica*. CRC Press, 1999.

SUNDARAM, K.M.S; SLOANE, L; CURRY, J. Kinetics of azadirachtin hydrolysis in model aquatic systems by high performance liquid chromatography. En: Journal of liquid chromatography, 1995. Vol. 18, no. 2. p 363-376.

SZETO, Sunny; WAN, Michael. Hydrolysis of azadirachtin in buffered and natural waters. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996. Vol 44. p 1160-1163.

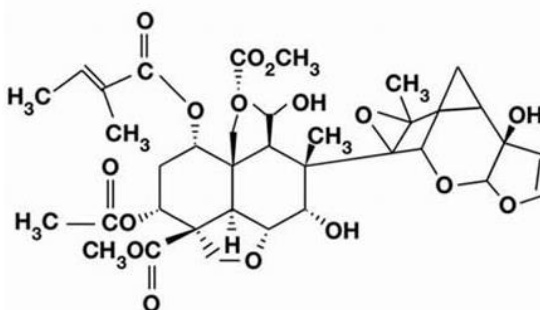
## ANEXOS

**Anexo A.** *Azadirachta indica*: árbol, hojas, flor y frutos.



Fuente: Orgánicos del trópico [Citado el 16 de Abril de 2016]. Disponible en: <http://organicosdeltropico.com/productos/arbol-de-neem/attachment/neem-1/>

**Anexo B.** Molécula de azadiractina.



Fuente: Breve reseña sobre Productos Formulados a base de aceite de Neem, Integración Química S.R.L [Citado el 16 de Abril de 2016] Disponible en: [http://www.integracionquimica.com.ar/web/index.php?option=com\\_content&view=article&id=114:breve-resena-sobre-productos-formulados-en-base-a-aceite-de-neem&catid=48:prensa&Itemid=163](http://www.integracionquimica.com.ar/web/index.php?option=com_content&view=article&id=114:breve-resena-sobre-productos-formulados-en-base-a-aceite-de-neem&catid=48:prensa&Itemid=163)

**Anexo C.** Puntos del diseño generados por el software, relaciones y proporciones de las formulaciones.

N° muestra	pH	% C	% A	% EE	Agua (mL)	EE (mL)	Conservante (mL)
1	3	0,15	80	20	20	5	37,5x10 <sup>-3</sup>
2	3	0,15	95	5	23,75	1,25	37,5x10 <sup>-3</sup>
3	3	0,3	87,5	12,5	21,88	3,12	75x10 <sup>-3</sup>
4	3	0	87,5	12,5	21,88	3,12	0
5	6	0	80	20	20	5	0
6	6	0	95	5	23,75	1,25	0
7	6	0,15	87,5	12,5	21,88	3,12	37,5x10 <sup>-3</sup>
8	6	0,15	87,5	12,5	21,88	3,12	37,5x10 <sup>-3</sup>
9	6	0,15	87,5	12,5	21,88	3,12	37,5x10 <sup>-3</sup>
10	6	0,3	80	20	20	5	75x10 <sup>-3</sup>
11	6	0,3	95	5	23,75	1,25	75x10 <sup>-3</sup>
12	9	0,15	95	5	23,75	1,25	75x10 <sup>-3</sup>
13	9	0,15	80	20	20	5	37,5x10 <sup>-3</sup>
14	9	0,3	87,5	12,5	21,88	3,12	75x10 <sup>-3</sup>
15	9	0	87,5	12,5	21,88	3,12	0

**Anexo D.** Protocolo general para la preparación de medios de cultivo.

Medios de cultivo	Erlenmeyer
Cajas de petri	Agitadores de vidrio
Autoclave	Agua destilada
Plancha de calentamiento	Balanza
Mecheros	Espátula
Torundas estériles	Guantes de látex
Probeta	

- En un recipiente, pesar el medio de cultivo según la necesidad.
- Medir en probeta el volumen necesario de agua estéril para la cantidad del medio de cultivo a preparar.
- Añadir el volumen de agua lentamente manteniendo en agitación.
- Tapar con torunda estéril y llevar a la autoclave a 121°C y 45 minutos.
- Terminada la esterilización del medio, dejar enfriar, en un mesón previamente desinfectado con alcohol al 70%.
- Servir en condiciones estériles aproximadamente 20 ml de medio de cultivo por cada caja de petri, cuidando de no dejar medios muy gruesos o muy delgados.
- Tapar las cajas de petri, tomar una y llevar a incubación por 37° C como control de que no está contaminado el medio de cultivo, guardar las restantes en nevera hasta su uso.

#### **Anexo E.** Protocolo de preparación medio PDA.

Proporciones para 1 L de medio:

200 g de papa sin pelar.

10 g de dextrosa.

18 g de agar.

1 L de agua destilada.

- Lavar y cortar las papas.
- Agregar el agua destilada y hacer hervir por 20 min.
- Colar.
- Disolver la dextrosa y el agar en el líquido colado.
- Agregar de 3 a 4 gotas de ácido láctico al 25% y homogeneizar.
- Depositar en las cajas de Petri.
- Esterilizar en autoclave durante 15 min a 15 libras de presión.

## **Anexo F.** Protocolo de preparación medio Sabouraud.

Para un litro de medio:

- 5 g de peptona.
- 5 g de tripteina.
- 40 g de glucosa.
- 0,05 g de cloranfenicol.
- 15 g de agar.
- 1 L de agua destilada.

- Disolver el Sabouraud en el agua destilada.
- Depositar en las cajas de Petri.
- Esterilizar en autoclave durante 15 min a 15 libras de presión.

## **Anexo G.** Protocolo de siembra por estría en superficie.

Medios de cultivo sólidos

Muestra líquida

Mecheros

Pipetas

Hisopos

Incubadora

- Prender los mecheros para esterilizar el área de trabajo.
- Tomar con la pipeta el volumen de muestra requerido para la siembra y depositarlo en el medio de cultivo estéril.
- Realizar las estrías moviendo el hisopo en forma de zigzag, de manera que se impregne toda la superficie del medio con la muestra.
- Realizar entre 4 y 5 series de estrías, teniendo en cuenta de rotar la caja de petri.
- Cerrar la caja de petri y llevar a incubación hasta que se observe crecimiento.

## **Anexo H.** Protocolo de tinción para caracterización microbiológica.

Coloración de Gram compuesta de 4 reactivos.

- Agregar el colorante (cristal violeta), esperar un minuto y lavar.
- Agregar el mordiente (lugol), esperar un minuto y lavar.
- Agregar el decolorante (alcohol acetona), contar hasta 3 y lavar.
- Agregar el colorante de contraste (safranina) por 30 segundos y lavar.

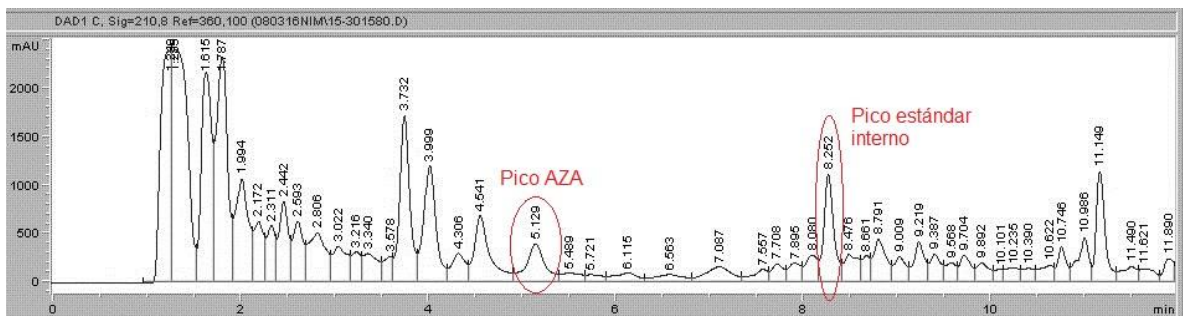
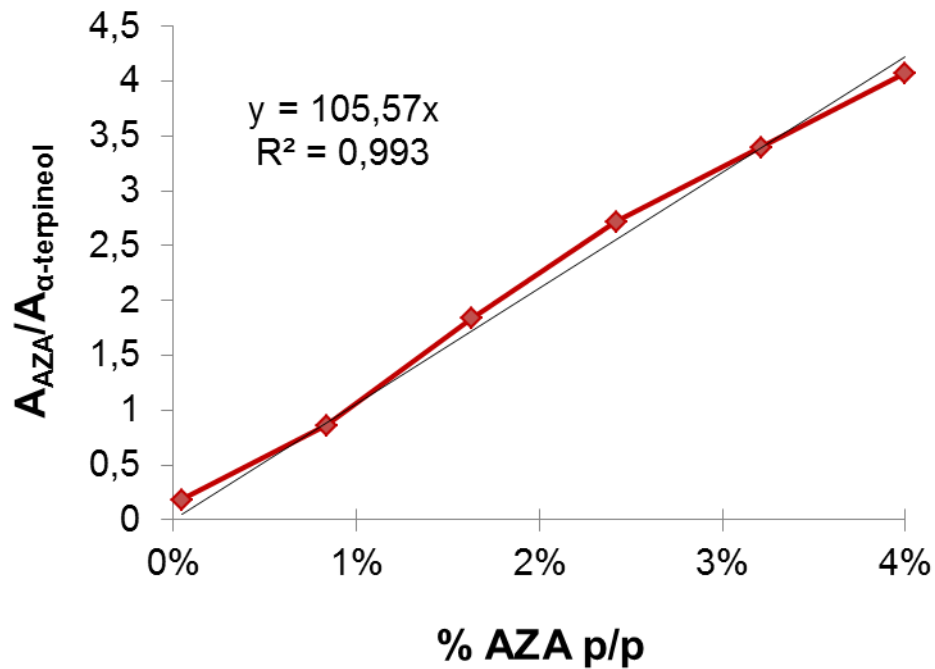
\*Los protocolos de la caracterización microbiológica fueron tomados de las referencias [36, 37, 38]

## **Anexo I.** Cromatógrafo líquido, Agilent 1100



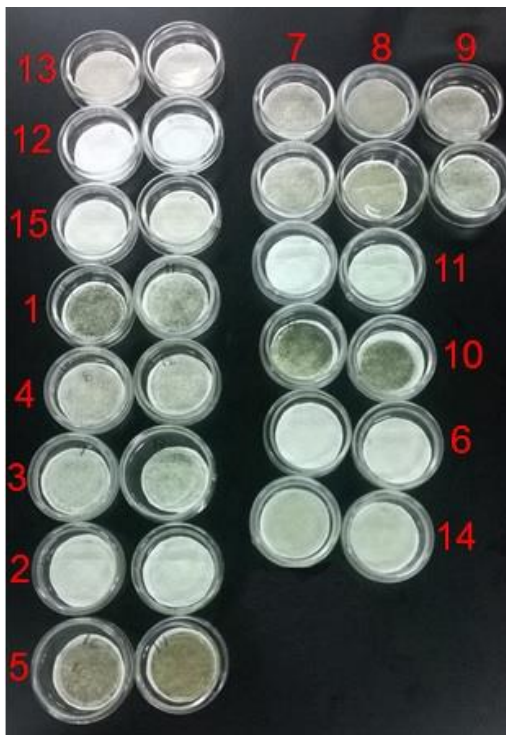
**a)** Reservorios para fase móvil. **b)** Bomba cuaternaria. **c)** Compartimiento para muestras. **d)** Inyector automático. **e)** Detector de arreglo de diodos. **f)** Ubicación de columna.

**Anexo J.** Curva de calibración y cromatograma, medición de AZA por HPLC (DAD 210 nm)



\*Este cromatograma corresponde a la muestra pH 3 – 0,15% C – 80% A.

**Anexo K.** Estado final filtros usados para la cuantificación de la biomasa generada.



\*La numeración se hace de acuerdo a la establecida en el anexo C: Puntos del diseño generados por el software, relaciones y proporciones de las formulaciones.

**Anexo L.** Descripción del conservante Koralone.

\*Datos provistos por el fabricante.

### ***Identificación Química***

Los ingredientes activos de KORALONE BIO-CLEAN™ son dos isotiazolinonas, identificados por nomenclatura del sistema IUPAC como 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona.

### ***Propiedades físicas y químicas***

Apariencia: Líquido entre azul pálido y verde

Gravedad específica a 25°C: 1,02

pH (de manufactura): 2,5-4,5

Ingrediente activo: 1,5%

### ***Miscibilidad/Solubilidad***

KORALONE BIO-CLEAN™ es totalmente miscible en agua, baja miscibilidad en alcoholes y glicoles y tiene poca solubilidad en hidrocarburos.

### ***Estabilidad***

Estable al menos un año a temperatura ambiente y al menos 6 meses a 50°C.

### ***Aplicaciones típicas de uso***

Limpiadores y pulidores: limpiadores de todo propósito, pulidores de piso y muebles, jabones y ceras para carros.

Productos de lavandería: detergentes líquidos de lavandería, suavizantes.

Jabones líquidos: lavalozas, jabones y limpiadores para manos.

### ***Propiedades microbiológicas***

KORALONE BIO-CLEAN™ exhibe una excepcional actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y mohos.