

**PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE AZADIRACHTA INDICA (NIM) Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD INSECTICIDA PARA EL CONTROL DE
SITOPHILUS ORYZAE**

JULIÁN MAURICIO GUERRERO RODRÍGUEZ

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

2016

**PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE AZADIRACHTA INDICA (NIM) Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD INSECTICIDA PARA EL CONTROL DE
SITOPHILUS ORYZAE**

JULIÁN MAURICIO GUERRERO RODRÍGUEZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Ingeniero Químico**

Director

Debora Alcida Nabarlatz

Ph.D. Ingeniería Química

CO-directores

José Gabriel López Ortiz

Ingeniero Químico

Jonny E. Duque Luna

Ph. D. Entomología

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

2016

Gracias a mi familia por ese apoyo incondicional y continuo. A mis primos, Mauricio, Camilo y Juan Carlos por siempre estar ahí. A mi madre, por ser ella. A mi papá, a mi tía María Teresa y mi abuela Sara, que aunque no llegaron a verlo, esto es por y para ellos.

AGRADECIMIENTOS

A la prof. Debora Alcida Nabarlatz, al Ing. José Gabriel López y al prof. Jonny Duque por su apoyo y continuo acompañamiento en el desarrollo de este proyecto.

Al grupo de investigación INTERFASE, al centro de investigación CINTROP y a sus respectivos integrantes por su constante colaboración y préstamo de instalaciones.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander, en conjunto con la empresa Zumotec S.A, por su apoyo económico en el proyecto No.1328 en el cual estaba enmarcado este trabajo.

Igualmente, a la decanatura de ingenierías fisicoquímicas por el auxilio económico otorgado para la presentación del proyecto en los eventos académicos.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS.....	17
1.1. GENERAL.....	17
1.2. ESPECÍFICOS:.....	17
2. ESTADO DEL ARTE.....	18
3. MARCO TEÓRICO	20
3.1. ÁRBOL DE NIM:	20
3.1.1. Descripción general	20
3.1.2. Condiciones de desarrollo y hábitat.	20
3.1.3. Propiedades.....	20
3.1.4. Compuestos activos.....	21
3.2. GORGOJO DEL ARROZ:	21
3.2.1. Descripción general.	21
3.2.2. Ciclo de vida.	22
4. METODOLOGÍA	23
4.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	23
4.2. MATERIALES Y SOLVENTES	24
4.3. PRODUCCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE NIM.....	24
4.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS.....	25
4.5. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	26

4.5.1. Material entomológico para los bioensayos.	26
4.5.2. Caracterización de la actividad biológica de los extractos.	27
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
5. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	29
5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.....	29
5.1.1. Rendimientos de los extractos obtenidos.....	29
5.1.2. Caracterización de los extractos obtenidos.....	30
5.1.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):.....	30
5.1.2.2. Espectrofotometría uv-vis.....	32
5.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS:.....	34
5.2.1. Contacto con superficie no porosa.....	34
5.1.2. Impregnación del sustrato.....	37
6. CONCLUSIONES	40
7. RECOMENDACIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	54

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Análisis próximo obtenido a partir de termogravimetría.	29
Tabla 2. % Rendimientos del sólido seco obtenido a partir de cada extracto según el método de extracción (% Rendimiento [g extracto seco/g hoja seca] \pm Desviación Estándar).....	30
Tabla 3. % AZA en cada E según el método de extracción (% AZA [g/mL] \pm Desviación Estándar).....	31

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama de la descripción global de las etapas realizadas.	23
Figura 2. Gráfica de Longitud de onda vs Absorbancia de maceración como método de extracción respecto a cada uno de los extractos rediluidos.	33
Figura 3. Gráfica de Longitud de onda vs Absorbancia de Soxhlet como método de extracción respecto a cada uno de los extractos rediluidos.	34
Figura 4. Actividad insecticida de cada extracto rediluido y método de extracción para la prueba por contacto con superficie no porosa. Test de Shapiro-Wilk: $W=0,90246$, $p=0,01778$. *Existen diferencias estadísticamente significativas $p<0,05$	35
Figura 5. Actividad insecticida de cada extracto rediluido por el método de extracción por maceración a temperatura ambiente para la prueba de contacto con superficie no porosa en función del tiempo de contacto.	36
Figura 6. Actividad insecticida de cada extracto rediluido según el método de extracción para la prueba por Sustrato o alimentación. Test de Shapiro-Wilk: $W=0,57356$ $p=,00002$. No existen diferencias estadísticamente significativas.	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Árbol, hojas, frutos y flor de nim	54
Anexo B. Molécula de AZA	55
Anexo C. Desarrollo y duración aproximada de los ciclos de vida del gorgojo del arroz, mostrando 4 estadios larvales, una etapa prepupa, pupa y adulta, respectivamente.....	56
Anexo D. Análisis próximo de la hoja de Nim por Termogravimetría	57
Anexo E. Tabla de características fisicoquímicas de los solventes utilizados.	58
Anexo F. Cromatograma estándar de AZA.....	59
Anexo G. Cromatograma estándar de alfa-terpineol.....	60
Anexo H. Cromatograma ERE con alfa-terpineol como patron.....	61
Anexo I. Cromatograma ERE sin patrón.....	62
Anexo J. Gráfica de Longitud de onda vs Absorbancia de los patrones de AZA, limoneno y ácido tánico obtenida mediante espectrofotometría	63
Anexo K. Curva de calibración Limoneno. Longitud de onda 250 nm.....	64
Anexo L. Curva de calibración AZA. Longitud de onda 255nm.....	65
Anexo M. Curva de calibración ácido tánico. Longitud de onda 221 nm.....	66
Anexo N. Test de normalidad [44].....	67
Anexo O. Coeficiente de correlación de Pearson	69
Anexo P. Gráfica de concentración de AZA extraída por Soxhlet en función de la temperatura de ebullición de los solventes utilizados.	70
Anexo Q. Gráfica de Longitud de onda vs Absorbancia del E.R.E y de los compuestos que generan interferencias en el mismo extracto, junto a la matriz y tabla de resultados de caracterización espectrofotometría	71
Anexo R. Test de Kruskal – Wallis.....	73

Anexo S. Múltiple comparación de valores p, para la prueba biológica de impregnación de superficie no porosa, según análisis no paramétrico Kruskal – Wallis	74
Anexo T. Estructura molecular de Malation y Deltametrina, respectivamente.	75
Anexo U. Múltiple comparación de valores p, para la prueba biológica de impregnación de sustrato, según análisis no paramétrico Kruskal – Wallis.....	76

RESUMEN

TITULO: Producción de extractos de *Azadirachta indica* (nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de *Sitophilus oryzae**

AUTOR: Julián Mauricio Guerrero Rodríguez**

PALABRAS CLAVE: *Azadirachta indica* (nim), *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz), bioinsecticida, extractos y azadiractina (AZA).

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto tóxico de los extractos provenientes de las hojas de *Azadirachta indica* (nim), como sustituto de los insecticidas convencionales aplicados en *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz) y como alternativa para mitigar los efectos nocivos de los insecticidas sintéticos. Se realizaron extracciones sólido-líquido con agua, etanol, acetato de etilo y hexano por maceración por 24 horas a temperatura ambiente y extracción Soxhlet por 5 horas. Los extractos fueron llevados a sequedad por rotaevaporación y rediluidos a una concentración de 3% p/v. Para medir la toxicidad en los individuos se emplearon los métodos de impregnación de sustrato y de superficies no porosas. Como controles positivos se utilizaron Deltametrina y Malatión a 10 ppm. Para caracterizar los extractos y determinar la presencia de AZA, compuesto al que se le atribuye la actividad insecticida, se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). De la misma manera, se utilizó espectrofotometría UV-Vis para determinar la presencia de otros compuestos activos. Después de 144 horas de exposición, el mayor efecto tóxico correspondió al extracto etanólico por maceración con 83%±8 de mortalidad por contacto con superficie no porosa, el cual mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles negativos, confirmando su actividad insecticida en gorgojos del arroz adultos. Igualmente, de este extracto se obtuvieron 1,28%±0,01 p/v de AZA, la mayor cantidad de este compuesto respecto a los demás extractos. Los resultados muestran que los extractos de hoja de nim, tienen efecto insecticida y podrían ser un reemplazo a los insecticidas convencionales para el control del gorgojo del arroz.

* Trabajo de grado

** Facultad De Ingenierías Físicoquímicas. Escuela De Ingeniería Química. Director Debora Alcida Nabarlatz

ABSTRACT

TITLE: Production of extracts from *Azadirachta indica* (neem) and evaluation of insecticidal activity to control *Sitophilus oryzae**

AUTHOR: Julián Mauricio Guerrero Rodríguez**

KEYWORDS: *Azadirachta indica* (neem), *Sitophilus oryzae* (rice weevil), biopesticide, extracts and azadirachtin (AZA).

This work aimed to evaluate the toxic effect of the extracts from the leaves of *Azadirachta indica* (neem), as a substitute for conventional insecticides applied in *Sitophilus oryzae* (rice weevil) and as an alternative to mitigate the harmful effects of synthetic insecticides. Solid-liquid extraction with water, ethanol, ethyl acetate and hexane by soaking for 24 hours at room temperature and Soxhlet extraction for 5 hours. The extracts were diluted at a concentration of 3% w / v by rotary evaporation. The methods of impregnation substrate and contact of nonporous surfaces were used to measure the toxicity. As positive controls were used Malathion and Deltamethrin at 10 ppm. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to characterize the extracts and AZA, the compound attached to the insecticidal activity. We used UV-Vis spectrophotometry to determine the presence of other active compounds. After 144 hours of exposure, the greater toxic effect corresponded to ethanol extract by maceration with 83% mortality ± 8 in contact with non-porous surface, which showed statistically significant differences compared to negative controls, confirming their insecticidal activity Weevils adult rice. Similarly, this extract were obtained $0.01 \pm 1.28\%$ w/v AZA, the more of this compound to the other extracts. The results show that leaf extracts of neem have insecticidal and could be a replacement to conventional insecticides to control rice weevil

* Work degree

** Faculty of Engineering Physicochemical. School of Chemical Engineering. Director Debora Alcida Nabarlatz

INTRODUCCIÓN

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) se estima que las pérdidas de granos almacenados pueden ser hasta del 30%, siendo la principal causa la acción de plagas de insectos [1]. Entre las plagas del grano se destaca el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*) por su voracidad. Su importancia económica y social radica en las pérdidas que produce en cereales como el maíz, el trigo, el sorgo, la cebada y el arroz [2].

En la actualidad, el principal método para el control de plagas de grano almacenado, es el uso de insecticidas sintéticos. Sin embargo la utilización excesiva de estas sustancias produce efectos nocivos en la salud humana [3]. Además el empleo de los plaguicidas en la industria agrícola provoca serias consecuencias ambientales y en la calidad del agua [4]. Por esta razón, los recientes desarrollos en este campo de estudio se han encaminado en la búsqueda de alternativas amigables con el ambiente como lo son los compuestos producidos por la *Azadirachta indica* (nim), como la azadiractina.

Zumotec S.A, empresa Santandereana, que actualmente utiliza los extractos de nim como principio insecticida, elaborándolos de manera artesanal, por lo que están en la búsqueda de la tecnificación del proceso para lograr un mayor rendimiento del mismo y asegurar su calidad. Por lo anterior este trabajo busca evaluar dos métodos de extracción (maceración y Soxhlet) utilizando cuatro solventes diferentes (agua, etanol, acetato de etilo y hexano) para conseguir maximizar el rendimiento de extracto a partir de la hoja del nim. Asimismo, se evaluó la actividad biológica de los extractos obtenidos mediante dos pruebas

biológicas (Impregnación de superficie y sustrato) para el control de *Sitophilus oryzae*.

1. OBJETIVOS

1.1. GENERAL

Evaluar diferentes técnicas y solventes que permitan obtener extractos a partir de la hoja de *azadirachta indica* (nim) para ser utilizados como bioinsecticidas en el control del *Sitophilus Oryzae* (Gorgojo de arroz).

1.2. ESPECÍFICOS:

- Evaluar diferentes solventes (agua, etanol, acetato de etilo y hexano), así como técnicas de extracción (maceración y Soxhlet), para la producción de extractos con potencial insecticida.
- Caracterizar los extractos obtenidos con el fin de determinar contenido en AZA por HPLC y la presencia de otros compuestos por espectrofotometría UV-Vis.
- Evaluar la mortalidad en individuos de *Sitophilus Oryzae* (Gorgojo de arroz) por aplicación de los extractos obtenidos en pruebas de laboratorio de impregnación de superficie y de sustrato.

2. ESTADO DEL ARTE

Varios autores han obtenido extractos de nim a partir de diferentes partes de la planta, entre ellos las hojas, la corteza, el tallo y la raíz [5-7]. Generalmente los extractos de nim se obtienen de las semillas, sin embargo estas son escasas, pues el árbol las produce solo después de 5 años de haber sido plantado, con cosecha cada seis meses [8]. Estudios han demostrado que las hojas contienen algunos de los compuestos activos que están presentes en las semillas, el follaje es permanente todo el año (excepto a bajas temperaturas), por lo que hay mayor disponibilidad de material vegetal [6].

A escala industrial, los procesos de extracción utilizan solventes como alcohol, éter e hidrocarburos [9]. La naturaleza del solvente en una extracción es muy importante según su propósito: pueden usarse solventes de polaridad media como el etanol o el acetato de etilo y obtener un extracto con una mayor variedad de compuestos polares y no polares; otra opción es obtener un extracto más selectivo, con solventes de polaridad extremas como el agua o el hexano (con el cual se extraen grasas, lípidos y compuestos apolares) [10].

Se han utilizado diversos métodos de extracción con la finalidad de obtener los mejores rendimientos de los extractos. La más común es por maceración, pero también han sido probadas extracciones por percolación, ultrasónica, decocción o asistidas por microondas [7, 11]. Asimismo, la extracción Soxhlet se ha usado para encontrar fracciones oleosas dentro de los extractos [12,13]: Iqbal *et al.*, obtuvieron extractos etanólicos de semilla, mostrando entre el 60-80% de repelencia en gorgojos de la harina (*Tribolium castaneum*), desde la primera hasta la octava semana de tratamiento [14]. De forma similar, Hossain *et al.*, obtuvieron un rendimiento de 7,5% de extracto metanólico por Soxhlet de hoja de nim

después de 72 horas de extracción [15], mostrando que tiempos muy prolongados de extracción aumentan muy poco los rendimientos de los extractos obtenidos.

Según la aplicación del plaguicida, se pueden adaptar diferentes pruebas biológicas para su evaluación. La prueba por contacto de superficie es un método muy utilizado por varios autores: Encina Romero *et al.*, reportaron mortalidades del 95% en ácaros, con extractos acuosos puros de hoja de nim, a una concentración de 1 g hoja/mL agua [16]. Otro tipo de prueba ha sido la impregnación de sustrato o de los granos atacados por las plagas: Athanassiou *et al.*, realizaron pruebas impregnando granos de avena y centeno con NeemAzal, un plaguicida a base de nim, el cual logró una mortalidad del 100% en el gorgojo del arroz después de 7 días de exposición a una concentración de 200 ppm de AZA, reportando el incremento de la mortalidad con un aumento de la dosis y el tiempo de exposición a los tratamientos [17].

Se han realizado diversos estudios que incluyen la caracterización mediante espectrofotometría y HPLC de los diferentes extractos de *Azadirachta indica* [18, 19]. Esparza-Díaz *et al.*, alcanzaron un rendimiento del 24% respecto al sólido seco y 565 ppm de AZA en el extracto hexanoico por soxhlet, mientras que a partir de un extracto acuoso obtuvieron un rendimiento del 83% respecto al sólido seco y 150 ppm de AZA, ambos a partir de semillas [12, 13]. En la mayoría de los casos, la cuantificación de limonoides con respecto a la AZA ha sido realizada por HPLC utilizando una columna C18 equipado con un detector UV-Vis a una longitud de onda entre 210 nm y 217 nm, con una fase móvil de agua/acetonitrilo en diferentes proporciones y/o gradientes, dependiendo del estudio [20-25]. Thejavathi *et al.*, analizaron diferentes muestras de AZA con las mismas condiciones utilizando anisol como estándar interno para su cuantificación [26].

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ÁRBOL DE NIM:

3.1.1. Descripción general

Nombre botánico: *Azadirachta indica* A.Juss

Nombre

común: Nim

Familia: Meliaceae, **Sub-familia:** Melioideae

Género: *Azadirachta*.

Especie: *indica*

El nim es un árbol de rápido crecimiento que puede alcanzar 15 a 20 metros de altura (Anexo 1). Tiene abundante follaje todas las temporadas del año, pero en condiciones severas se deshoja a pesar de tener una notable resistencia a la sequía. El ramaje es amplio, el tallo de hojas contiene de 20 a 31 hojas verdes asimétricas y márgenes dentados. Las flores son blancas y su fruto es una drupa parecida a la aceituna, pero es desagradable al gusto [27, 28].

3.1.2. Condiciones de desarrollo y hábitat. El nim se puede adaptar a un amplio rango de climas y condiciones del suelo. Comúnmente visto en regiones sub-áridas y sub-húmedas, soportando hasta 7 u 8 meses de sequía. Sobrevive en suelos duros, estériles, incluyendo arena, sitios rocosos y secos [19]. En Centro y Sur América existen plantaciones en Guatemala, Nicaragua y Honduras; Colombia, Bolivia, Ecuador, Argentina y Brasil [8].

3.1.3. Propiedades. Preparaciones a partir de las distintas partes del árbol de nim han mostrado usos médicos y biológicos. Diversos insectos presentan

susceptibilidad frente a las propiedades de la planta, la cual tiene capacidades insecticidas [5], larvicidas [6], repelentes [29], antialimentarias e inhibidoras de crecimiento [30]. Médicamente ha mostrado propiedades citopatológicas [31], antimicrobianas [32], antidiabéticas, antihelmínticas, antiinflamatorias, antifúngicas [33], dermatológicas, al igual que se le han encontrado capacidades como espermicida [28].

3.1.4. Compuestos activos. Hasta la fecha, han sido identificados y aislados alrededor de 300 compuestos del nim a raíz de sus innumerables cualidades y propiedades [18]. Algunos de estos compuestos son sustancias organosulfuradas y polisacáridos, pero los que más representan su actividad biológica son los limonoides, triterpenoides altamente oxidados que constituyen la tercera parte de los compuestos separados e identificados.

Uno de los limonoides más importantes del nim es la AZA (Anexo 2). A este compuesto se le atribuye la capacidad insecticida y antialimentaria proveniente de los extractos de la planta, entre otros. Así mismo, diversos estudios han demostrado su relación con la ecdisoma, hormona fundamental en los insectos para su crecimiento, al imitar su comportamiento y alterar el ciclo de vida en sus estados larvarios [34].

3.2. GORGOJO DEL ARROZ:

3.2.1. Descripción general.

Nombre común: Gorgojo del arroz

Orden: Coleoptera

Familia: Curculionidae

Género: *Sitophilus*

Especie: *oryzae*

El *Sitophilus oryzae* pertenece al orden Coleóptera, el cual contiene a las más comunes e importantes plagas de grano almacenado [35]. Los gorgojos del arroz son insectos pequeños (2-3 mm) de color rojizo-marrón a negro con suaves colores amarillos o rojos en sus costados, tórax y dorso. En su estado larval no tiene piernas, por lo cual permanece dentro del grano mientras madura.

3.2.2. Ciclo de vida. El gorgojo hembra adulto puede vivir alrededor de 4 a 5 meses, produciendo entre 250 y 400 huevos [36]. Cuando va a ubicar un huevo, hace un orificio en un grano con sus poderosas mandíbulas y lo deposita dentro de este [37]. El huevo eclosiona 3 días después y se empieza a alimentar dentro del grano. La etapa de pupa dura entre 5 y 16 días, para después hacerse adulto y permanece 3 o 4 días más dentro del grano mientras endurece su cutícula y madura (Anexo 3) [38].

4. METODOLOGÍA

La metodología utilizada siguió las siguientes etapas (Ver Figura 1).

Figura 1. Diagrama de la descripción global de las etapas realizadas.



4.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Las hojas de nim fueron recolectadas y suministradas por la empresa Zumotec S.A., de árboles con más de tres años de edad, ubicados en el municipio de Piedecuesta, Santander. Las muestras fueron colocadas en bolsas negras de polietileno, en las que fueron transportadas hasta el laboratorio, donde fueron secadas a temperatura ambiente y a la sombra durante 7 días. Posteriormente se molieron hasta obtener un tamaño de partícula de 1 mm en molino de cuchillas. Finalmente, el polvo resultante fue almacenado en botellas ámbar a temperatura ambiente y fue realizado su análisis próximo (Anexo 4) para determinar los porcentajes de humedad, cenizas, materia volátil y carbono fijo.

4.2. MATERIALES Y SOLVENTES

Para las extracciones se utilizó etanol industrial ($\approx 96\%$) suministrado por Zumotec S.A., Acetato de etilo ($> 99,9\%$, Merck), Hexano ($> 99,9\%$, Merck) y agua destilada. Para determinar la presencia de terpenos simples, limonoides, y taninos en los extractos se utilizaron como estándares limoneno ($\approx 97\%$, Sigma Aldrich), AZA ($> 95\%$, Sigma Aldrich) y ácido tánico ($> 99,9\%$, Sigma Aldrich), respectivamente. Para los controles positivos de las pruebas biológicas se usaron los insecticidas sintéticos MALAT ($> 98\%$, Merck) y DELTA ($> 99,9\%$, Merck). Para cuantificar AZA se utilizó como estandar interno α -terpineol ($> 97\%$, Sigma Aldrich).

4.3. PRODUCCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE NIM

Se evaluaron dos métodos de extracción: maceración y Soxhlet. Para la maceración, los extractos fueron preparados mezclando el polvo de nim con cada uno de los solventes por separado (agua destilada, etanol, acetato de etilo y hexano) (Anexo 5), en recipientes ámbar de 25 mL en una relación de 30% peso de hoja/volumen de solvente. El tiempo de extracción fue de 24 horas a temperatura ambiente en reposo. Posteriormente los extractos fueron filtrados utilizando papel filtro de $0,45 \mu\text{m}$ con el fin de retirar el material vegetal. La extracción por Soxhlet se realizó empleando los mismos solventes en cada caso. Se utilizaron papel filtro de $0,45 \mu\text{m}$ para inmovilizar el material vegetal y un tiempo de extracción de 5 horas. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

Debido a que algunos de los solventes utilizados pueden por si solos generar mortalidad en la pruebas de actividad biológica, los extractos se llevaron a sequedad mediante rotoevaporación, para luego ser rediluidos hasta una

concentración de 3% p/v, en agua destilada (para el extracto acuoso) o etanol al 96% (para los extractos obtenidos con etanol, hexano y acetato de etilo).

4.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS

Para la caracterización fisicoquímica, primero se determinó el contenido de AZA mediante HPLC y el patrón de la misma molécula (Anexo 6), según la metodología propuesta por Thejavathi, R. *et al.* [26] modificada, utilizando el patrón de α -terpineol (Sigma Aldrich) como estándar interno (Anexo 7) para la identificación del tiempo de retención de las respectivas moléculas y el análisis de sus áreas correspondientes respecto a los extractos (Anexo 8 y 9).

Los análisis de las muestras fueron realizados en un cromatógrafo líquido de alta resolución HP1100 (Agilent) equipado con una bomba cuaternaria, inyector automático y un módulo detector de diodos (DAD, longitud de onda de 214 nm). La separación se realizó en una columna C18 (Agilent, 250 x 4,6 mm). Para el método se utilizó una elución isocrática con acetonitrilo/agua (40:60 v/v) como fase móvil por 5 min, seguido de un gradiente lineal hasta el 100% de acetonitrilo en 3 min (incremento de 20% por min) para un tiempo total de corrida de 12 min, incluyendo un tiempo de retraso de 2 min para eliminar los picos del solvente, utilizando una razón de flujo de 1 μ L/min. Se inyectaron 10 μ L de cada muestra de extracto. El análisis de datos se realizó utilizando el software ChemStation B.01.03.

La caracterización fisicoquímica de los extractos mediante espectrofotometría UV-Vis se realizó utilizando la metodología de Dai *et al.* [39] modificada. Para ello, a una solución de 0,7 mL de extracto de hoja en metanol se le adicionan 0,2 mL de una mezcla de vainillina en metanol (0,02 mg/mL). Después de agitar manualmente, esta se deja a temperatura ambiente por 2 min. Posteriormente se

adiciona ácido sulfúrico concentrado (0,3 mL, al 98% p/p) en tres alícuotas de 0,1 mL cada una, y se agita la mezcla por 10 segundos después de cada adición. A continuación se agregan 0,7 mL de metanol para convertir la mezcla de dos fases en una solución homogénea. Finalmente se deja por 5 min a temperatura ambiente para la posterior medición de absorbancia por espectrofotometría UV-Vis. El blanco corresponde a la misma solución sin el extracto añadido. Para este procedimiento se utilizó un espectrofotómetro ultravioleta visible Shimadzu UV-2401 PC, utilizando un rango de longitudes de onda desde 200 nm, operando a una resolución de 1 nm. Se usó una celda de cuarzo de 10 mm.

Se uso como estándar limoneno, AZA y ácido tánico para determinar la presencia de terpenos simples, limonoides, y taninos en los extractos, respectivamente. Se generaron gráficas de absorbancia contra longitud de onda (Anexo 10) al igual que las curvas de calibrado de absorbancia contra concentración [mg/ml] para cada patrón (Anexos 11, 12 y 13), para posteriormente cuantificar el contenido de cada uno en los extractos obtenidos.

4.5. PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

4.5.1. Material entomológico para los bioensayos. Para la recolección del material biológico se realizaron visitas a los centros de acopio de granos en el área metropolitana de Bucaramanga, para determinar cuál era la plaga de insectos que más afectaba este sector. Se recolectaron muestras y se realizó la identificación taxonómica. La especie seleccionada para los bioensayos fue el *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz). Con el objetivo de establecer una cría del insecto y utilizar los descendientes de los individuos colectados en los bioensayos, se creó una colonia de *Sitophilus oryzae* en el laboratorio del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander (UIS) realizando una selección de 400 ejemplares, los

cuales fueron separados y criados en recipientes plásticos de 150 mL, para un total de 100 individuos por recipiente, tapados con tela que fue atada con bandas de goma para evitar el escape de gorgojos y la entrada de otros insectos. Se mantuvieron en un ambiente controlado de 25 °C a 27 °C y oscuridad continua. Como base alimenticia se les suministró 50 gramos de arroz comercial asegurando la alimentación y reproducción de los individuos. Se llevó a cabo un monitoreo cada 8 días separando los individuos del arroz para ser depositados en un nuevo recipiente con las mismas condiciones al anterior, permitiendo así que los huevos depositados en el arroz del primer recipiente pasen a adultos; esto con el fin de utilizar adultos jóvenes, sanos y de una misma edad en los experimentos.

4.5.2. Caracterización de la actividad biológica de los extractos. Para evaluar la actividad adulticida de los extractos en el gorgojo del arroz, se realizaron bioensayos de impregnación de superficies no porosas y de sustratos (pellets de trigo). Para los ensayos de impregnación de superficie no porosa se utilizaron tubos de ensayo de vidrio de 4 mL a los cuales se les aplicó 100 µL del extracto, que se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para los ensayos de impregnación de sustrato se utilizaron pellets de harina de trigo comercial que se hicieron previamente en el laboratorio. La harina fue mezclada con agua destilada hasta que la masa obtuvo una consistencia homogénea. Mediante extrusión se obtuvieron pellets con un tamaño de 5 mm x 10 mm aproximadamente. Se llevaron a un secador hasta que se obtuvo una humedad del 12%. A cada uno se le aplicó 100 µL del extracto rediluido y se dejó secar a temperatura ambiente. Para cada prueba se colocó un pellet para cada insecto.

Se utilizaron 100 µL de agua destilada y etanol al 96% respectivamente, como controles negativos y se utilizaron 100 µL de cada uno de los insecticidas

sintéticos DELTA y MALAT diluidos a 10 ppm en acetona cada uno, como controles positivos.

Con 4 insectos por tubo o envase, se realizaron 2 réplicas de cada tratamiento, cada réplica ejecutada 3 días diferentes para un total de 36 gorgojos para cada extracto, insecticida y control.

La mortalidad (M) causada por los extractos rediluidos se calculó y ajustó mediante la fórmula de Abbott [40], la cual corrige los errores de manipulación de los insectos utilizando el control negativo como referencia (Ecuación 1).

$$M_{\text{ajustada}} = \frac{M_{\text{observada}} - M_{\text{control}}}{100 - M_{\text{control}}}$$

Ecuación 1. Ecuación de Abbott

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la realización de las pruebas de significancia de cada uno de los tratamientos, se analizaron las premisas de normalidad y homogeneidad de varianza (Test de Shapiro-Wilk) (Anexo 14) mediante el programa estadístico STATISTICA 8. De acuerdo al valor P se infirió un nivel de confianza del 95% sobre las variables de respuesta. Adicionalmente, se realizaron los análisis del grado de relación entre variables según el coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 15).

5. RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

5.1.1. Rendimientos de los extractos obtenidos. En la Tabla 1 se ve representado el análisis próximo de la hoja de nim realizado mediante termogravimetría (TGA). Los datos que se obtuvieron de dicho análisis fueron utilizados para hallar los rendimientos de los extractos respecto a la hoja seca.

Tabla 1. Análisis próximo obtenido a partir de termogravimetría.

Análisis	Peso [mg]	%Humedad	%Volátiles	%Carbón Fijo	%Cenizas
Hoja de nim	18,23	11,07	81,69	0,13	7,10

En la Tabla 2 se pueden observar los rendimientos del sólido seco obtenido a partir de la hoja seca para cada extracto en función del método de extracción y del solvente utilizado. Al pasar de maceración a Soxhlet, EE, EAE y EH mostraron un aumento de sus rendimientos. Por otro lado, EA presentó el comportamiento opuesto disminuyendo su rendimiento. Aunque los extractos etanólicos y hexanólicos obtenidos por Ayoola *et al.* fueron a partir de semilla de nim, también mostraron buenos resultados al alcanzar rendimientos del 38% a partir de hexano y del 15% a partir de etanol como solventes por extracción Soxhlet [41].

Tabla 2. % Rendimientos del sólido seco obtenido a partir de cada extracto según el método de extracción (% Rendimiento [g extracto seco/g hoja seca] ± Desviación Estándar).

Extracto	Método de extracción	
	Maceración Rendimiento [%]	Soxhlet Rendimiento[%]
EA	8,53 ± 2,64	1,33 ± 0,03
EE	3,68 ± 0,73	5,95 ± 0,32
EAE	1,73 ± 0,57	3,83 ± 1,18
EH	0,61 ± 0,11	1,78 ± 0,09

Los rendimientos de la extracción por maceración pueden ser atribuidos a que una mayor cantidad de compuestos son más afines a solventes polares. Esto se ve reflejado en el bajo rendimiento del EH. En la extracción Soxhlet, se ve una fuerte disminución del rendimiento en el EA, que puede estar relacionada con la temperatura (100 °C), la cual puede generar la degradación de algunos compuestos.

5.1.2. Caracterización de los extractos obtenidos

5.1.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): La Tabla 3 se observan las concentraciones de AZA, cuantificadas por HPLC, en función del método y solvente de extracción. En la mayoría de los extractos encontró la presencia de AZA, a excepción del EA.

Tabla 3. % AZA en cada E según el método de extracción (% AZA [g/mL] \pm Desviación Estándar).

Extracto	Método de extracción	
	Maceración AZA[%]	Soxhlet AZA[%]
EA	0	0
EE	1,28 \pm 0,01	0,75 \pm 0,05
EAE	1,16 \pm 0,14	0,24 \pm 0,09
EH	0,10 \pm 0,003	0,83 \pm 0,09

Al comparar dichos resultados con los rendimientos de extracción, se observa que aunque el EA por maceración es el que tiene el mayor rendimiento (8,53% \pm 2,64), sin embargo no contiene AZA. El caso contrario ocurre con el EE por maceración, el cual aun que tiene un rendimiento más bajo que el EA (3,68% \pm 0,73), tiene el mayor contenido de AZA (1,28% \pm 0,01). Con lo cual se puede establecer que hay compuestos en la hoja que mostraron afinidad por solventes polares (agua), no obstante la AZA muestra afinidad por solventes con polaridades cercanas a los alcoholes.

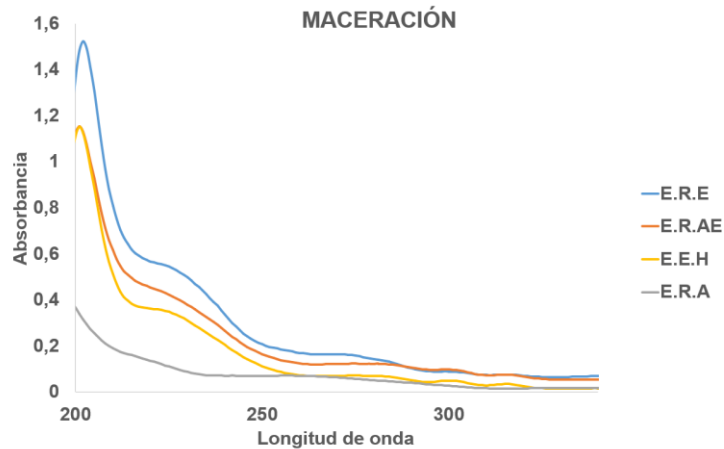
Dichos resultados concuerdan con los datos encontrados en en el trabajo de Esparza Días *et al.*, quienes obtuvieron un rendimiento del 83% en extractos acuosos de semilla de nim, pero solo consiguieron 0,05% p/v de AZA, mostrando que aunque el extracto acuoso tenga rendimientos mayores al resto de los extractos, la cantidad de AZA que puede ser encontrada en estos es muy reducida, independientemente si son extraídos de semilla u hoja [13].

Igualmente, en todos los extractos se observó una disminución en la cantidad de AZA obtenida a partir de Soxhlet respecto a maceración, donde según el coeficiente de correlación de Pearson ($\rho = -0,83$), la temperatura de extracción por Soxhlet tiene una relación inversa y un fuerte efecto negativo en la cantidad de

AZA que pueda obtenerse de esta extracción (Anexo 16). El aumento de la temperatura muestra una mejora en la extracción de AZA al observar los resultados de EH (0,10% a 0,83%), pero temperaturas más altas afectan la cantidad de AZA, la cual disminuye significativamente en los demás extractos que habían conseguido mejores rendimientos por maceración a temperatura ambiente al pasar de 1,28% a 0,75% y de 1,16% a 0,24% en EE y EAE, respectivamente. Los resultados de este trabajo muestran que temperaturas mayores a 70 °C podrían generar la degradación de la AZA y temperaturas mayores a 80 °C degradarían muchos más compuestos, como los encontrados en EA.

5.1.2.2. Espectrofotometria uv-vis: La metodología de Dai, *et al.* [39] modificada es sugerida para la cuantificación de compuestos presentes en los extractos del nim, empleando patrones de ciertas moléculas que se les asemejen como lo son AZA (limonoides), ácido tánico (taninos) y limoneno (terpenos simples). Aunque se utilizaron patrones y solventes idénticos a los empleados por los autores, las longitudes de onda reportados por ellos se encuentran en el rango visible del espectro, mientras que los obtenidos en este trabajo estaban en el ultravioleta. Además de lo descrito anteriormente, en el extracto obtenido se presentan compuestos que generan interferencias debido a la utilización de la hoja y no la semilla como lo describe el autor (Anexo 17). Razón por la cual no se puede realizar la adecuada cuantificación mediante la técnica, puesto que no se disponía del material y equipos necesarios para realizar la purificación e identificación de estos compuestos.

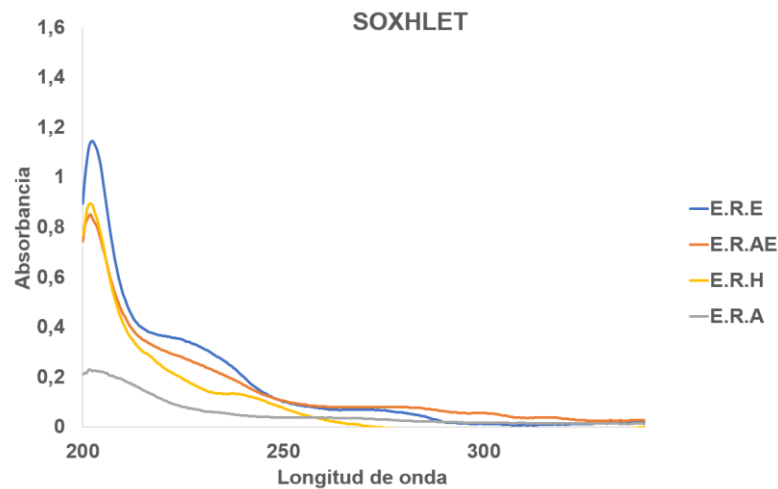
Figura 2. Gráfica de Longitud de onda vs Absorbancia de maceración como método de extracción respecto a cada uno de los extractos rediluidos.



De los resultados obtenidos, las Figuras 2 y 3 representan las gráficas de absorbancia en función de la longitud de onda de cada extracto vegetal obtenido por maceración y soxhlet, respectivamente. ERE obtuvo una absorbancia de 1,5 con la extracción por maceración, mientras por extracción Soxhlet su absorbancia disminuyó a 1,2 aproximadamente. Lo mismo ocurrió con los ERAE, ERH Y ERA al disminuir sus absorbancias de 1,2 a 0,9 y de 0,4 a 0,2, respectivamente. Según la ley de Beer-Lambert, la absorción de una muestra es directamente proporcional a su concentración. Al comparar los espectros para cada método de extracción, los resultados de los extractos obtenidos por Soxhlet mostraron una disminución en las absorbancias de las sustancias que emiten en el rango de longitudes de onda trabajadas, lo cual sugiere una disminución en la concentración de los compuestos que estén emitiendo en dichas longitudes de onda.

Aunque por este método de caracterización no se pudiera cuantificar ninguno de los compuestos anteriormente descritos, resultados similares se encontraron en este trabajo donde el incremento de la temperatura afectaría directamente la composición de los extractos degradándolos significativamente.

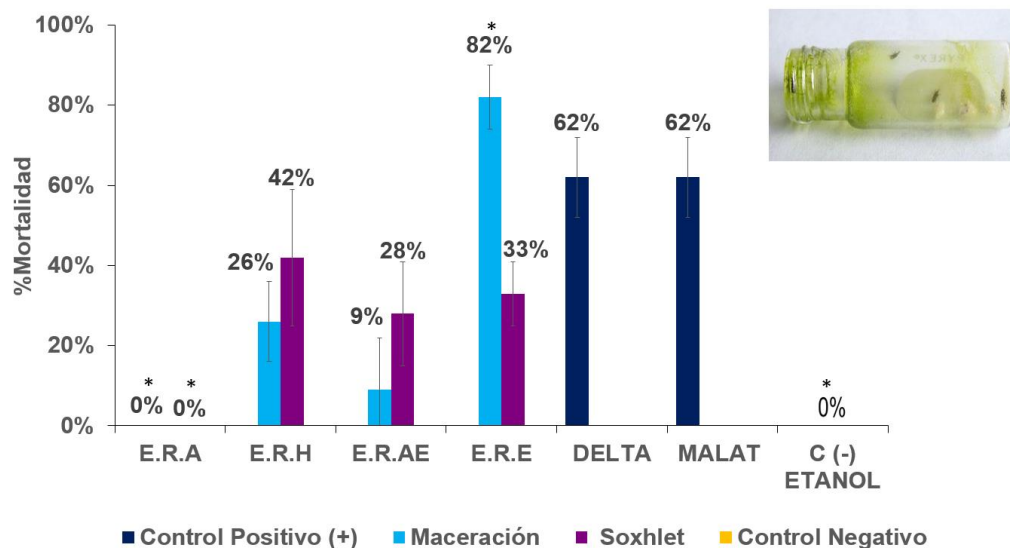
Figura 3. Gráfica de Longitud de onda vs Absorbancia de Soxhlet como método de extracción respecto a cada uno de los extractos rediluidos.



5.2. PRUEBAS BIOLÓGICAS:

5.2.1. Contacto con superficie no porosa. La Figura 4 representa la actividad insecticida por contacto con superficie no porosa como prueba biológica. En esta, se observa que el ERE por maceración mostró la mayor actividad biológica, con un $82\% \pm 8$ de mortalidad. Los extractos obtenidos utilizando hexano y acetato de etilo, presentan una mortalidad menor, correspondiente al $26\% \pm 10$ y $9\% \pm 10$, respectivamente. El utilizar Soxhlet como método de extracción, mostró una disminución en la actividad insecticida del ERE hasta el $33\% \pm 8$, resultado que estaría relacionado con la alta temperatura de ebullición del solvente que afectaría la extracción de compuestos activos, tal como se evidenció anteriormente. Por otro lado los extractos por Soxhlet obtenidos con hexano y acetato de etilo tuvieron un aumento en su mortalidad a $42\% \pm 17$ y $28\% \pm 13$, respectivamente. Ningún ERA evidenció actividad insecticida (Figura 4).

Figura 4. Actividad insecticida de cada extracto rediluido y método de extracción para la prueba por contacto con superficie no porosa. Test de Shapiro-Wilk: $W=0,90246$, $p=0,01778$. *Existen diferencias estadísticamente significativas $p<0,05$.

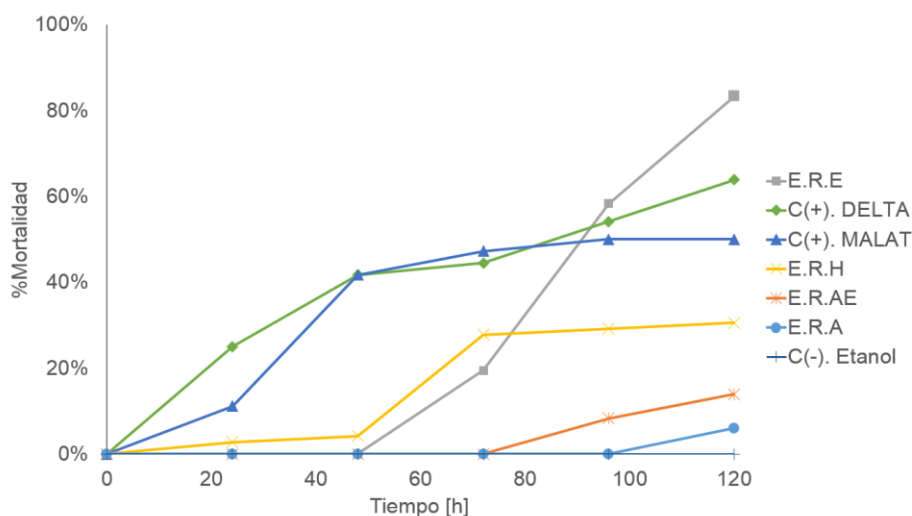


Del test de normalidad de Shapiro - Wilk se obtuvo un $p= 0,02<0,05$, lo cual muestra que los datos no representan una distribución normal. Según el test no paramétrico de Kruskal – Wallis (Anexo 18), se observó que los tratamientos que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, fueron el ERE por maceración, ambos ERA y los controles negativos (Anexo 19). Aun así, ninguno de los extractos obtenidos por extracción Soxhlet mostró tener diferencias significativas entre ellos.

El método de extracción por Soxhlet, en comparación con el método por maceración, es un método de extracción que aumenta la solubilidad de los solventes al aumentar la temperatura: aun así, sus resultados no fueron tan eficientes como la extracción por maceración con etanol a temperatura ambiente. Tal como se observó anteriormente con la caracterización fisicoquímica, estos resultados muestran que los compuestos insecticidas presentes en la hoja del nim

son más afines al etanol, que a los demás solventes más polares y apolares. Al existir diferencias estadísticamente significativas respecto al control negativo se puede asegurar que el ERE presenta actividad insecticida frente a gorgojo del arroz.

Figura 5. Actividad insecticida de cada extracto rediluido por el método de extracción por maceración a temperatura ambiente para la prueba de contacto con superficie no porosa en función del tiempo de contacto.



En la Figura 5 se observa un aumento progresivo de la mortalidad al aumentar el tiempo de exposición, donde los primeros registros de actividad se obtuvieron 24 horas después de la aplicación de los extractos. Como puede observarse, los insecticidas sintéticos tienen un efecto rápido en el gorgojo del arroz, mientras que los extractos muestran un efecto retardado. Esta reacción puede ser atribuida al menor tamaño de la molécula de MALAT y a la DELTA (Anexo 20) con respecto a AZA, con lo que estas pequeñas sustancias podrían ser más fácilmente asimiladas por los insectos que las de mayor tamaño. Aun así, el ERE y el ERH obtenidos por maceración muestran un aumento muy pronunciado en la mortalidad después de las 72 horas de aplicación. No obstante, el ERH muestra un límite de efectividad a las 96 horas, mientras el ERE supera incluso a los insecticidas sintéticos a partir

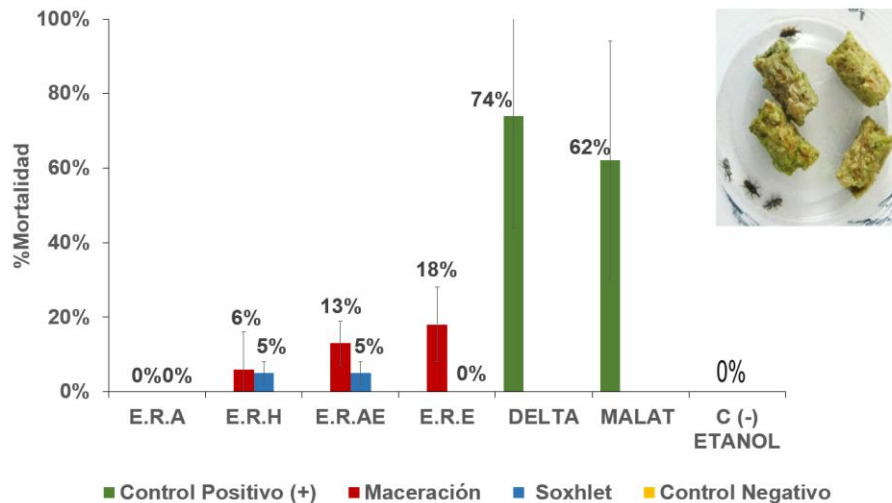
de las 120 horas de aplicación. Los resultados ilustran una dependencia entre la mortalidad alcanzada y el número de horas de exposición al extracto.

Rolf *et al.*, mostraron que tras la aplicación en polvo de Malathion en el gorgojo del arroz a 10 ppm, obtienen una mortalidad en los sujetos de prueba del 100% tras 48 horas de aplicado el insecticida [42]. Aunque no fue el insecticida con mayor efectividad, se evidenció su alto poder residual tras 150 días de aplicado. Igualmente, Aldana *et al.*, probaron el alto poder insecticida de los polvos de MALAT y DELTA tras 24 horas de exposición en concentraciones de 10 y 0,5 ppm, respectivamente, obteniendo mortalidades del 100% [43]. Comparando el efecto generado por los insecticidas, se puede inferir que los insectos utilizados en este trabajo tienen una menor susceptibilidad a estos químicos respecto a otros gorgojos del arroz utilizados en otros trabajos, con lo que la alta efectividad del ERE alcanzada es de mayor relevancia.

5.1.2. Impregnación del sustrato. La Figura 6 representa la actividad insecticida obtenida por impregnación de sustrato como prueba biológica. Para este ensayo también se identificó la maceración como método de extracción utilizando etanol como solvente como los factores con mayor actividad biológica con un $18\% \pm 10$ de mortalidad. Los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos y se observa una notoria disminución en la efectividad respecto a la prueba por contacto de superficie no porosa. Para esta prueba con sustrato, los extractos que también mostraron ligera actividad insecticida fueron el ERAE y el ERH con mortalidades del $13\% \pm 6$ y $6\% \pm 10$, respectivamente.

Los extractos obtenidos utilizando la extracción por Soxhlet mostraron una leve actividad insecticida en todos los tratamientos. Tanto el ERE como el ERA, ambos por Soxhlet, no mostraron actividad mientras que el ERH y el ERAE tuvieron una mortalidad del $5\% \pm 3$ cada uno (Figura 6). Los controles positivos mostraron tener una efectividad mucho más notoria que los diferentes extractos de esta prueba.

Figura 6. Actividad insecticida de cada extracto rediluido según el método de extracción para la prueba por Sustrato o alimentación. Test de Shapiro-Wilk: $W= 0,57356$ $p=,00002$. No existen diferencias estadísticamente significativas.



Aunque se ha evidenciado cierta mortalidad por impregnación de sustrato, no se puede comprobar si efectivamente los insectos se alimentaron del pellet impregnado con extracto rediluido, lo que justificaría la poca mortalidad de la prueba y las dispersiones de los datos. La metodología aplicada para la impregnación de sustrato es nueva y no ha sido evaluada anteriormente por ningún trabajo, por lo que los datos obtenidos en esta investigación son tratados como pruebas preliminares. De esta manera, no se sabe exactamente el efecto que el sustrato pudo generar en el insecto. Cabe la posibilidad que los gorgojos no consumieran la harina del pellet, lo cual significaría que el extracto protegió al pellet de la actividad del insecto.

Para ninguna de las pruebas biológicas por impregnación de sustrato, utilizando diferentes métodos de extracción o solventes se cumplieron las premisas de normalidad (Shapiro - Wilk) por lo que los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, mostrando que ningún extracto o control muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Anexo 21).

Al analizar los datos biológicos y fisicoquímicos se evidencia que el agua no es el solvente adecuado para la extracción de compuestos activos al obtener poca selectividad respecto a AZA y actividad biológica nula, a diferencia del etanol, que mostró mayor contenido de AZA y efectividad biológica por contacto de superficie no porosa, por lo tanto el mejor método de extracción es maceración con etanol para la obtención de un bioinsecticida en el control del gorgojo de arroz.

6. CONCLUSIONES

A partir de este estudio exploratorio, puede afirmarse que el mejor método de los estudiados para la extracción de los compuestos insecticidas de las hojas del nim es maceración, empleando como solvente etanol al 96%.

La caracterización por HPLC empleando como estándar interno α -terpineol, mostró la presencia AZA en los extractos, a excepción de los obtenidos utilizando agua como solvente de extracción, siendo el EE por maceración el que presenta una mayor concentración con un 1,28% p/v.

La mayoría de los extractos de hoja de nim mostraron mortalidad en adultos del gorgojo del arroz, dependiendo del método de extracción, al igual que el solvente utilizado, siendo el ERE obtenido por maceración con un 82% el de mayor actividad biológica en los ensayos de impregnación de superficie no porosa.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda trabajar en la optimización del proceso de extracción por maceración utilizando etanol, que permita la maximización de la AZA. Posibles métodos de purificación del extracto ayudarían a la separación de compuestos, así como la mejora de los métodos de caracterización.

Igualmente, se recomienda realizar trabajos más especializados en la morfología del insecto para comprender el modo de acción de los extractos y mejorar la efectividad de los mismos. Un mayor estudio debe llevarse a cabo para poner a prueba el potencial insecticida de los extractos variando el nivel de dosificación en diferentes etapas de su ciclo de vida.

Finalmente, un estudio comparativo entre los resultados de laboratorio y pruebas en campo es recomendado para comprobar la efectividad y el método de aplicación.

CITAS

- [1] FAO, «Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural», ROMA, 1993.
- [2] A. D. P. Bermudez Sierra, «Análisis del sector cereales.», 2015.
- [3] F. Díaz Barriga, «Factores de Exposición y Toxicidad del DDT y de la Deltametrina en Humanos y en Vida Silvestre», San Luis Potosi, Mexico, 2005.
- [4] E. . Ongley, «Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. Estudio FAO (Riego y Drenaje - 55)», 2011.
- [5] S. Achio, E. Ameko, F. Kutsanedzie, y S. Alhassan, «Insecticidal effects of various neem preparations against some insects of agricultural and public health concern», *Interntional J. Res. Biosci.*, vol. 1, n.º 2, pp. 11-19, 2012.
- [6] Azhari H. Nour, «Larvicidal activity of extracts from different parts of Neem (*Azadirachta indica*) against *Aedes Aegypti* mosquitoes' larvae», *Sci. Res. Essays*, vol. 7, n.º 31, pp. 2810-2815, 2012.
- [7] J. Dai, V. a. Yaylayan, G. S. V Raghavan, J. R. J. Paré, Z. Liu, y J. M. R. Bélanger, «Influence of operating parameters on the use of the Microwave-Assisted Process (MAP) for the extraction of azadirachtin-related limonoids from neem (*Azadirachta indica*) under atmospheric pressure conditions», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, n.º 10, pp. 4584-4588, 2001.
- [8] Nationar Research Council, «NEEM A Tree for solving global problems, report of an adhoc panel of the Board on Science and Technology for International Development Academy Press», Washington, DC, 1992.
- [9] FACT Net's Sheet, «*Azadirachta indica*: neem, a versatile tree for the tropics and subtropics.», 1997.
- [10] C. M. Boursier, D. Bosco, a. Coulibaly, y M. Negre, «Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A?», *Crop Prot.*, vol. 30, n.º 3, pp. 318-322, 2011.

- [11] W. Chaisawangwong y W. Gritsanapan, «Extraction method for high free radical scavenging activity of Siamese neem tree flowers.», *J. Sci. Technol.*, vol. 31, n.º 4, pp. 419-423, 2009.
- [12] G. Esparza-díaz, J. A. Villanueva-jiménez, J. López-, y D. A. Rodríguez-lagunes, «Azadirachtin Extraction Using Cold Press and Soxhlet Methods», *J. Biopestic. Int.*, vol. 2010, n.º 01, pp. 45-51, 2010.
- [13] G. Esparza-Díaz, J. López-Collado, J. a. Villanueva-Jiménez, F. Osorio-Acosta, G. Otero-Colina, y E. Camacho-Díaz, «Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss.», *Agrociencia*, vol. 44, n.º 7, pp. 821-833, 2010.
- [14] J. Iqbal, A. Qayyum, y S. Z. Mustafa, «Repellent effect of ethanol extracts of plant materials on *Tribolium castaneum* (Herbst) (Tenebrionidae: Coleoptera)», *Pak. J. Zool.*, vol. 42, n.º 1, pp. 81-86, 2010.
- [15] M. A. Hossain, W. A. S. Al-Toubi, A. M. Weli, Q. A. Al-Riyami, y J. N. Al-Sabahi, «Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem», *J. Taibah Univ. Sci.*, vol. 7, n.º 4, pp. 181-188, 2013.
- [16] R. L. Encina Romero, M. B. Ramirez de Lopez, y C. D. Pino Quintana, «Efecto de dos extractos acuosos de meliáceas sobre *Tetranychus* spp. (Acari: Tetranychidae) en condiciones de laboratorio.», *Genome Biol.*, vol. 13, n.º 2, pp. 1-16, 2011.
- [17] C. G. Athanassiou, D. C. Kontodimas, N. G. Kavallieratos, y M. A. Veroniki, «Insecticidal effect of NeemAzal against three stored-product beetle species on rye and oats.», *J. Econ. Entomol.*, vol. 98, n.º 5, pp. 1733-1738, 2005.
- [18] J. Dai, «Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Neem and the Development of a Colorimetric Method for the Determination of Azadirachtin Related Limonoids (AZRL)», Macdonald Campus of McGill University, 1999.
- [19] M. C. Fernandez, «Dinamica de la azadiractina en arboles de Nim de Mexico y su efecto contra dos insectos de almacen.», Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 1998.

- [20] J. Dai, V. a. Yaylayan, G. S. V. Raghavan, y J. R. Parè, «Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, n.º 9, pp. 3738-3742, 1999.
- [21] O. Schaaf, a P. Jarvis, S. a van der Esch, G. Giagnacovo, y N. J. Oldham, «Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.», *J. Chromatogr. A*, vol. 886, n.º 1-2, pp. 89-97, 2000.
- [22] F. Giraldo, C. Castaño, G. Morales, C. Lopez, y E. Galeano, «Determinación de azadirachtina por cromatografía líquida de alta eficiencia. (HPLC) en semillas de árbol de NEEM (*A. Indica*) cultivadas en Colombia», *Vitae*, vol. 9, n.º 1, pp. 59-63, 2002.
- [23] N. Kaushik, «Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC.», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 374, n.º 7-8, pp. 1199-1204, 2002.
- [24] C. B. Wandscheer, J. E. Duque, M. a N. Da Silva, Y. Fukuyama, J. L. Wohlke, J. Adelman, y J. D. Fontana, «Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*», *Toxicon*, vol. 44, n.º 8, pp. 829-835, 2004.
- [25] J. C. T. Silva, G. N. Jham, R. D. A. L. Oliveira, y L. Brown, «Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography», *J. Chromatogr. A*, vol. 1151, n.º 1-2, pp. 203-210, 2007.
- [26] R. Thejavathi, S. R. Yakkundi, y B. Ravindranath, «Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard», *J. Chromatogr. A*, vol. 705, n.º 2, pp. 374-379, 1995.
- [27] H. Schmutterer, *The Tree and Its Characteristics, in The Neem Tree*. Weinheim, FRG.: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 1995.
- [28] H. . Puri, *Neem The Divine Tree*, 3.^a ed. Hardwood Academic, 1999.

- [29] M. Akhtar, M. Arshad, A. B. Muhammad Raza, M. I. Chaudhary, N. Iram, N. Akhtar, y T. Mahmood, «Repellent effects of certain plant extracts against rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae)», *Int J Agric Appl Sci*, vol. 5, n.º 1, pp. 69-73, 2013.
- [30] M. Barrabí y Javier Arece-garcía, «Actividad antihelmíntica in vitro de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A . Juss). I . Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario», *Rev. Salud Anim.*, vol. 35, n.º 2, pp. 103-108, 2013.
- [31] R. D. Ndione, M. Ndiaye, O. Faye, J. M. Afoutou, y A. Dieye, «Larvicidal and cytopathologic effects of Suneem 1 % (neem : *Azadirachta indica* , A . Juss , Meliaceae) on mosquitoes vectors of diseases», *J. Herb. Med.*, vol. 2, n.º 3, pp. 43-58, 2013.
- [32] Y. López-pantoja, M. Angulo-escalante, y C. Martínez-rodríguez, «Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A . Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22.», *Bioquímica*, vol. 32, n.º 4, pp. 117-125, 2007.
- [33] N. K. Mondali, a. Mojundar, S. K. Chatterjer, a. Banerjee, J. K. Datta, y S. Gupta, «Antifungal activities and chemical characterization of Neem leaf extracts on the growth of some selected fungal species in vitro culture medium», *J. Appl. Sci. Environ. Manag.*, vol. 13, n.º 1, pp. 49-53, 2009.
- [34] A. J. Mordue(Luntz) y A. J. Nisbet, «Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects», *An. da Soc. Entomológica do Bras.*, vol. 29, n.º 4, pp. 615-632, 2000.
- [35] M. N. Sallam, «Insect Damage. Post-harvest Operations. FAO», 2005.
- [36] P. G. Koehler, «Rice Weevil , *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculinoidea)», Gainesville, 2012.
- [37] S. R. Davis, «Rostrum structure and development in the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionoidea: Dryophthoridae)», *Arthropod Struct. Dev.*, vol. 40, n.º 6, pp. 549-558, 2011.

- [38] K. Jadhav, «Biology and Management of rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. in pop sorghum.», University Of Agricultural Sciences, 2006.
- [39] J. Dai, V. a. Yaylayan, G. S. V. Raghavan, J. R. Parè, y Z. Liu, «Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin-related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, n.º 3, pp. 1169-1174, 2001.
- [40] W. . Abbott, «Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide.», *J. Econ. Entomol.*, vol. 18, pp. 265-267, 1925.
- [41] A. A. Ayoola, V. C. Efevbokhan, O. T. Bafuwa, y O. T. David, «A Search for Alternative Solvent To Hexane During Neem Oil Extraction Effect of Temperature on Oil Yield», *Int. J. Sci. Technol.*, vol. 4, n.º 4, pp. 66-70, 2014.
- [42] G. B. Rolf, J. Mendoza S, y R. Carrasco S, «Control químico de *Sitophilus oryzae* (L.) espolvoreando insecticidas sobre semillas de arroz», *Rev. Peru. Entomol.*, vol. 17, n.º 1, pp. 100-102, 1974.
- [43] H. Aldana, R. Pinto, C. Acuña, y M. Cabezas, «Comparación de seis insecticidas protectantes en el control de *Sitophilus oryzae* (L). Y *Sitotroga cerea* / ella (Oliver)», *Agron. Colomb.*, vol. 2, pp. 144-150, 1993.
- [44] C. Guisande Gonzáles, A. Vaamonde Liste, y A. Barreiro Felepeto, *Tratamiento de Datos con R, STATISTICA Y SPSS*. 2013.
- [45] A. N. Hurtado y F. C. Domínguez Sánchez, «Análisis de correlación y regresión», en *Probabilidad y estadística para ingeniería. Un enfoque moderno*, 2009, pp. 13-18.

BIBLIOGRAFÍA

ABBOTT W. ., «Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide.», J. Econ. Entomol, vol. 18, pp. 265-267, 1925.

ACHIO S., E. AMEKO, F. KUTSANEDZIE, Y S. ALHASSAN, «Insecticidal effects of various neem preparations against some insects of agricultural and public health concern», Interntional J. Res. Biosci., vol. 1, n.o 2, pp. 11-19, 2012.

AKHTAR M., M. ARSHAD, A. B. MUHAMMAD RAZA, M. I. CHAUDHARY, N. IRAM, N. AKHTAR, Y T. MAHMOOD, «Repellent effects of certain plant extracts against rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae)», Int J Agric Appl Sci, vol. 5, n.o 1, pp. 69-73, 2013.

ALDANA H., R. PINTO, C. ACUÑA, Y M. CABEZAS, «Comparación de seis insecticidas protectantes en el control de *Sitophilus oryzae* (L). Y *Sitotroga cerea* / *ella* (Oliver)», Agron. Colomb., vol. 2, pp. 144-150, 1993.

ATHANASSIOU C. G., D. C. KONTODIMAS, N. G. KAVALLIERATOS, Y M. A. VERONIKI, «Insecticidal effect of NeemAzal against three stored-product beetle species on rye and oats.», J. Econ. Entomol., vol. 98, n.o 5, pp. 1733-1738, 2005.

AYOOLA A. A., V. C. EFEOVBOKHAN, O. T. BAFUWA, Y O. T. DAVID, «A Search for Alternative Solvent To Hexane During Neem Oil Extraction Effect of Temperature on Oil Yield», Int. J. Sci. Technol., vol. 4, n.o 4, pp. 66-70, 2014.

BARRABÍ M. Y ARECE-GARCÍA JAVIER, «Actividad antihelmíntica in vitro de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario», *Rev. Salud Anim.*, vol. 35, n.o 2, pp. 103-108, 2013.

BERMUDEZ SIERRA A. D. P., «Análisis del sector cereales.», 2015.

C. M. BOURSIER, D. BOSCO, A. COULIBALY, Y M. NEGRE, «Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A?», *Crop Prot.*, vol. 30, n.o 3, pp. 318-322, 2011.

CHAISAWANGWONG W. Y W. GRITSANAPAN, «Extraction method for high free radical scavenging activity of Siamese neem tree flowers.», *J. Sci. Technol.*, vol. 31, n.o 4, pp. 419-423, 2009.

DAI J., «Microwave-Assisted Extraction (MAE) of Neem and the Development of a Colorimetric Method for the Determination of Azadirachtin Related Limonoids (AZRL)», Macdonald Campus of McGill University, 1999.

DAI J., V. A. YAYLAYAN, G. S. V RAGHAVAN, J. R. J. PARÉ, Z. LIU, Y J. M. R. BÉLANGER, «Influence of operating parameters on the use of the Microwave-Assisted Process (MAP) for the extraction of azadirachtin-related limonoids from neem (*Azadirachta indica*) under atmospheric pressure conditions», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, n.o 10, pp. 4584-4588, 2001.

DAI J., V. A. YAYLAYAN, G. S. V. RAGHAVAN, J. R. PARÈ, Y Z. LIU, «Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin-related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay», *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, n.o 3, pp. 1169-1174, 2001.

DAI J., V. A. YAYLAYAN, G. S. V. RAGHAVAN, Y J. R. PARÉ, «Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel», J. Agric. Food Chem., vol. 47, n.o 9, pp. 3738-3742, 1999.

DAVIS S. R., «Rostrum structure and development in the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionoidea: Dryophthoridae)», Arthropod Struct. Dev., vol. 40, n.o 6, pp. 549-558, 2011.

DÍAZ BARRIGA F., «Factores de Exposición y Toxicidad del DDT y de la Deltametrina en Humanos y en Vida Silvestre», San Luis Potosi, Mexico, 2005.

ENCINA ROMERO R. L., M. B. RAMIREZ DE LOPEZ, Y C. D. PINO QUINTANA, «Efecto de dos extractos acuosos de meliáceas sobre *Tetranychus* spp. (Acari: Tetranychidae) en condiciones de laboratorio.», Genome Biol., vol. 13, n.o 2, pp. 1-16, 2011.

ESPARZA DÍAZ G., J. A. VILLANUEVA-JIMÉNEZ, J. LÓPEZ-, Y D. A. RODRÍGUEZ-LAGUNES, «Azadirachtin Extraction Using Cold Press and Soxhlet Methods», J. Biopestic. Int., vol. 2010, n.o 01, pp. 45-51, 2010.

ESPARZA-DÍAZ G., J. LÓPEZ-COLLADO, J. A. VILLANUEVA-JIMÉNEZ, F. OSORIO-ACOSTA, G. OTERO-COLINA, Y E. CAMACHO-DÍAZ, «Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss.», Agrocienza, vol. 44, n.o 7, pp. 821-833, 2010.

FACT NET'S SHEET, «*Azadirachta indica*: neem, a versatile tree for the tropics and subtropics.», 1997.

FAO, «Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural», ROMA, 1993.

FERNANDEZ M. C., «Dinamica de la azadiractina en arboles de Nim de Mexico y su efecto contra dos insectos de almacen.», Universidad Autonoma de Nuevo Leon, 1998.

GIRALDO F., CASTAÑO C., MORALES G., LOPEZ C., Y GALEANO E., «Determinación de azadirachtina por cromatografía líquida de alta eficiencia. (HPLC) en semillas de árbol de NEEM (A. Indica) cultivadas en Colombia», Vitae, vol. 9, n.o 1, pp. 59-63, 2002.

GUISANDE GONZÁLES C., A. VAAMONDE LISTE, Y A. BARREIRO FELEPETO, Tratamiento de Datos con R, Statistica Y Spss. 2013.

HOSSAIN M. A., W. A. S. AL-TOUBI, A. M. WELI, Q. A. AL-RIYAMI, Y J. N. AL-SABAHI, «Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of Omani neem», J. Taibah Univ. Sci., vol. 7, n.o 4, pp. 181-188, 2013.

HURTADO A. N. Y F. C. DOMÍNGUEZ SÁNCHEZ, «Análisis de correlación y regresión», en Probabilidad y estadística para ingeniería. Un enfoque moderno, 2009, pp. 13-18.

IQBAL J., A. QAYYUM, Y S. Z. MUSTAFA, «Repellent effect of ethanol extracts of plant materials on Tribolium castaneum (Herbst) (Tenebrionidae: Coleoptera)», Pak. J. Zool., vol. 42, n.o 1, pp. 81-86, 2010.

JADHAV K., «Biology and Management of rice weevil, Sitophilus oryzae L. in pop sorghum.», University Of Agricultural Sciences, 2006.

KAUSHIK N., «Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC.», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 374, n.o 7-8, pp. 1199-1204, 2002.

KOEHLER P. G., «Rice Weevil, *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculinoidea)», Gainesville, 2012.

LÓPEZ-PANTOJA Y., ANGULO-ESCALANTE M., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ Y C., «Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22.», *Bioquímica*, vol. 32, n.o 4, pp. 117-125, 2007.

MONDALI N. K., A. MOJUNDAR, S. K. CHATTERJEE, A. BANERJEE, J. K. DATTA, Y S. GOPTA, «Antifungal activities and chemical characterization of Neem leaf extracts on the growth of some selected fungal species in vitro culture medium», *J. Appl. Sci. Environ. Manag.*, vol. 13, n.o 1, pp. 49-53, 2009.

MORDUE A. J. (LUNTZ) Y A. J. NISBET, «Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects», *An. da Soc. Entomológica do Bras.*, vol. 29, n.o 4, pp. 615-632, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, «NEEM A Tree for solving global problems, report of an adhoc panel of the Board on Science and Technology for International Development Academy Press», Washington, DC, 1992.

NDIONE R. D., M. NDIAYE, O. FAYE, J. M. AFOUTOU, Y A. DIEYE, «Larvicidal and cytopathologic effects of Suneem 1 % (neem : *Azadirachta indica*, A. Juss, Meliaceae) on mosquitoes vectors of diseases», *J. Herb. Med.*, vol. 2, n.o 3, pp. 43-58, 2013.

NOUR A. H., «Larvicidal activity of extracts from different parts of Neem (*Azadirachta indica*) against *Aedes Aegypti* mosquitoes' larvae», *Sci. Res. Essays*, vol. 7, n.o 31, pp. 2810-2815, 2012.

ONGLEY, E. «Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. Estudio FAO (Riego y Drenaje - 55)», 2011.

PURI H., *Neem The Divine Tree*, 3.a ed. Hardwood Academic, 1999.

ROLF G. B., J. MENDOZA S, Y R. CARRASCO S, «Control químico de *Sitophilus oryzae* (L.) espolvoreando insecticidas sobre semillas de arroz», *Rev. Peru. Entomol.*, vol. 17, n.o 1, pp. 100-102, 1974.

SALLAM M. N., «Insect Damage. Post-harvest Operations. FAO», 2005.

SCHAAF O., A P. JARVIS, S. A VAN DER ESCH, G. GIAGNACOVO, Y N. J. OLDHAM, «Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.», *J. Chromatogr. A*, vol. 886, n.o 1-2, pp. 89-97, 2000.

SCHMUTTERER H., *The Tree and Its Characteristics*, in *The Neem Tree*. Weinheim, FRG.: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, 1995.

SILVA J. C. T., G. N. JHAM, R. D. A. L. OLIVEIRA, Y L. BROWN, «Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (*Azadirachta indica*) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography», *J. Chromatogr. A*, vol. 1151, n.o 1-2, pp. 203-210, 2007.

THEJAVATHI R., S. R. YAKKUNDI, Y B. RAVINDRANATH, «Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard», J. Chromatogr. A, vol. 705, n.o 2, pp. 374-379, 1995.

WANDSCHEER C. B., J. E. DUQUE, M. A N. DA SILVA, Y. FUKUYAMA, J. L. WOHLKE, J. ADELMANN, Y J. D. FONTANA, «Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*», *Toxicon*, vol. 44, n.o 8, pp. 829-835, 2004.

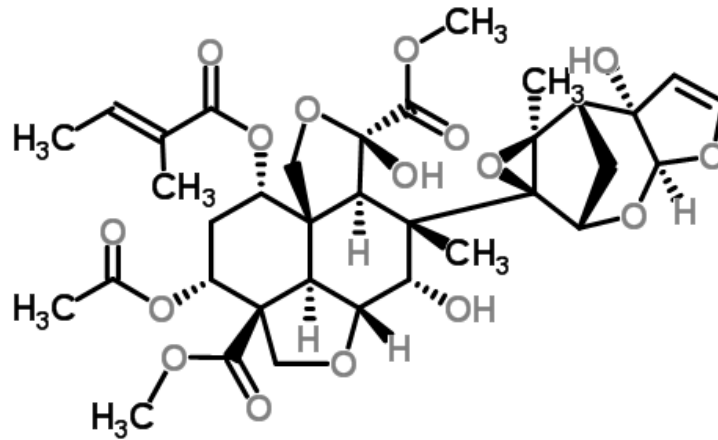
ANEXOS

Anexo A. Árbol, hojas, frutos y flor de nim



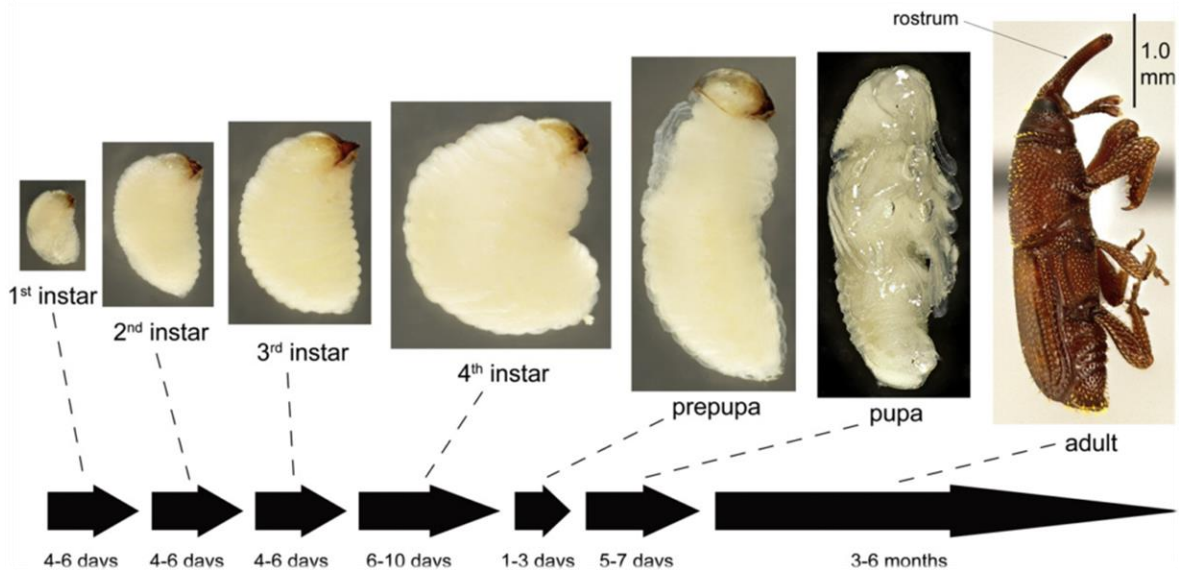
Fuente: [Citado el 10 de Enero de 2016] Disponible en <
<http://ecologicocartagena.blogspot.com.co/2014/06/arbol-del-neem-el-arbol-del-siglo-xxi.html>

Anexo A. Molécula de AZA



Fuente: CAPSU-NEEM. Árbol de neem. 14 de enero de 2015 [Citado el 10 de Enero de 2016] Disponible en < http://www.arbol-de-neem.com/2015_01_01_archive.html >

Anexo B. Desarrollo y duración aproximada de los ciclos de vida del gorgojo del arroz, mostrando 4 estadios larvales, una etapa prepupa, pupa y adulta, respectivamente



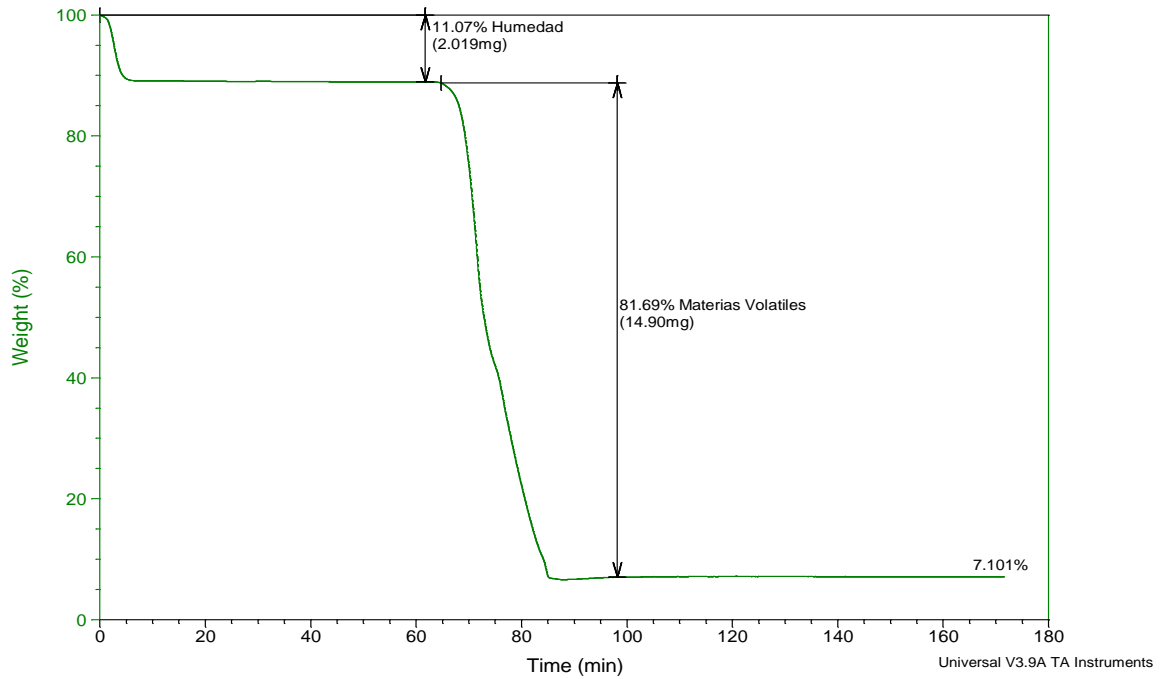
Fuente: S. R. Davis, "Rostrum structure and development in the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionoidea: Dryophthoridae)," *Arthropod Struct. Dev.*, vol. 40, no. 6, pp. 549–558, 2011.

Anexo C. Análisis próximo de la hoja de Nim por Termogravimetría

Sample: Analisis Proximo Hoja de Nim
Size: 18.2370 mg
Method: Gilles 2Cmin

TGA

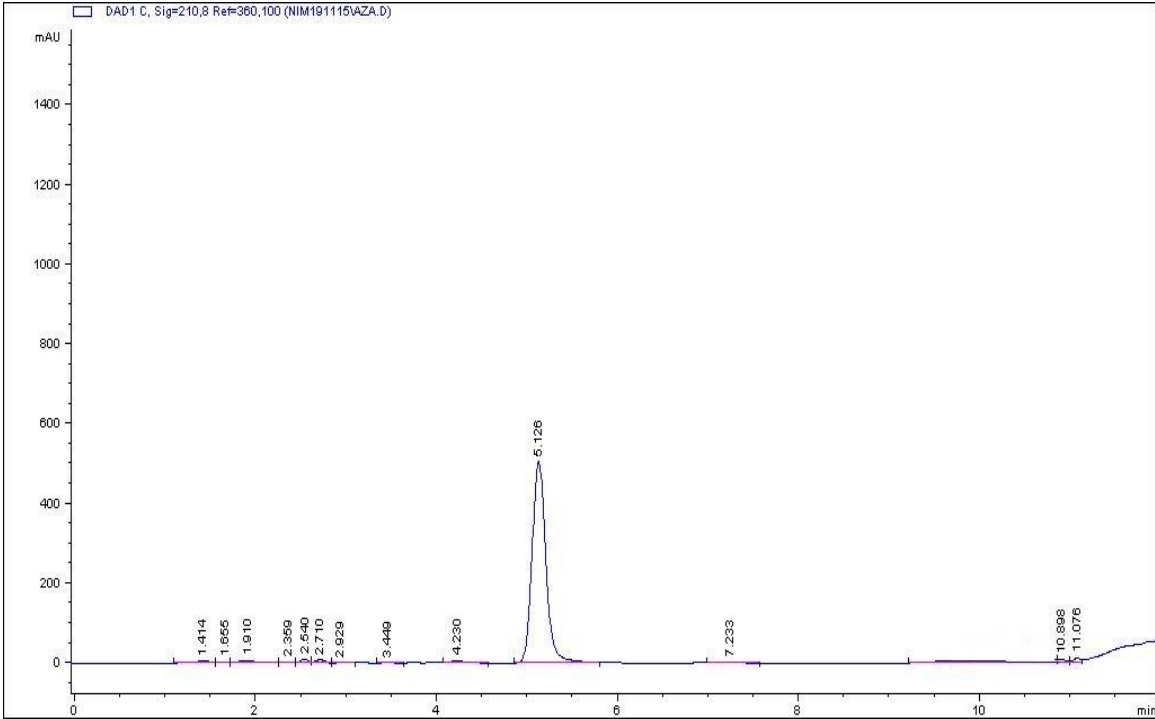
File: G:\Analisis Proximo Hoja de Nim.001
Operator: G.A.M.
Run Date: 30-Nov-06 06:46
Instrument: 2050 TGA V5.1A



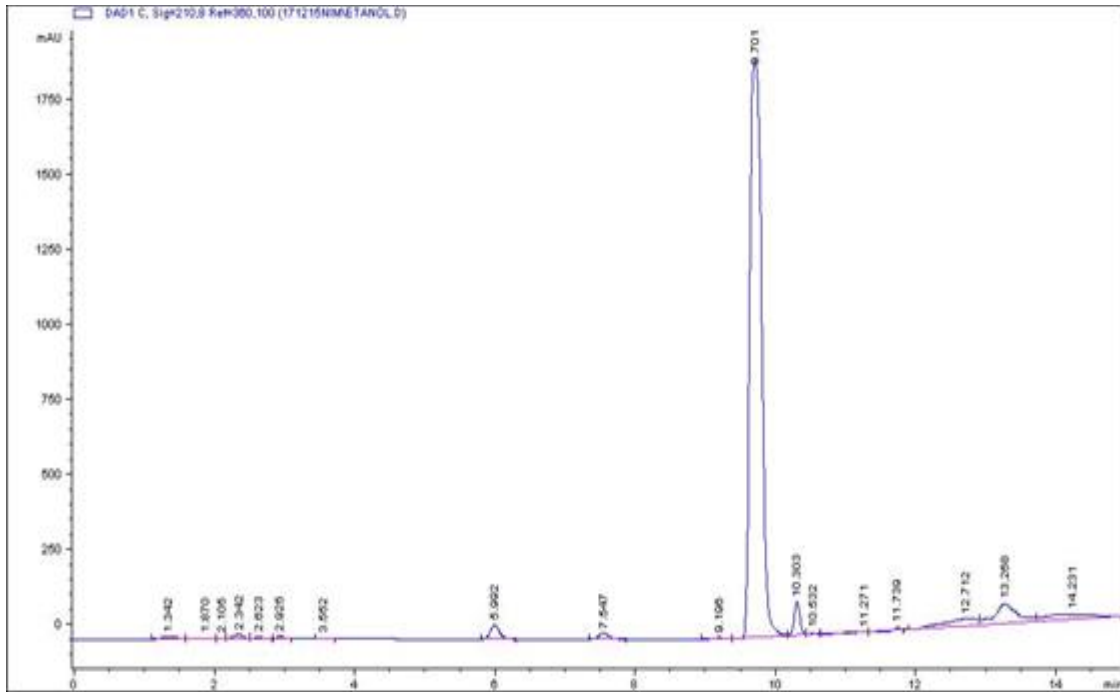
Anexo D. Tabla de características fisicoquímicas de los solventes utilizados.

Sustancia	Índice de Polaridad	Punto de ebullición [°C]
<i>N-hexano</i>	0,0	68,7
<i>Acetato de Etilo</i>	4,3	77,1
<i>Etanol</i>	5,2	78,7
<i>Agua</i>	9	100

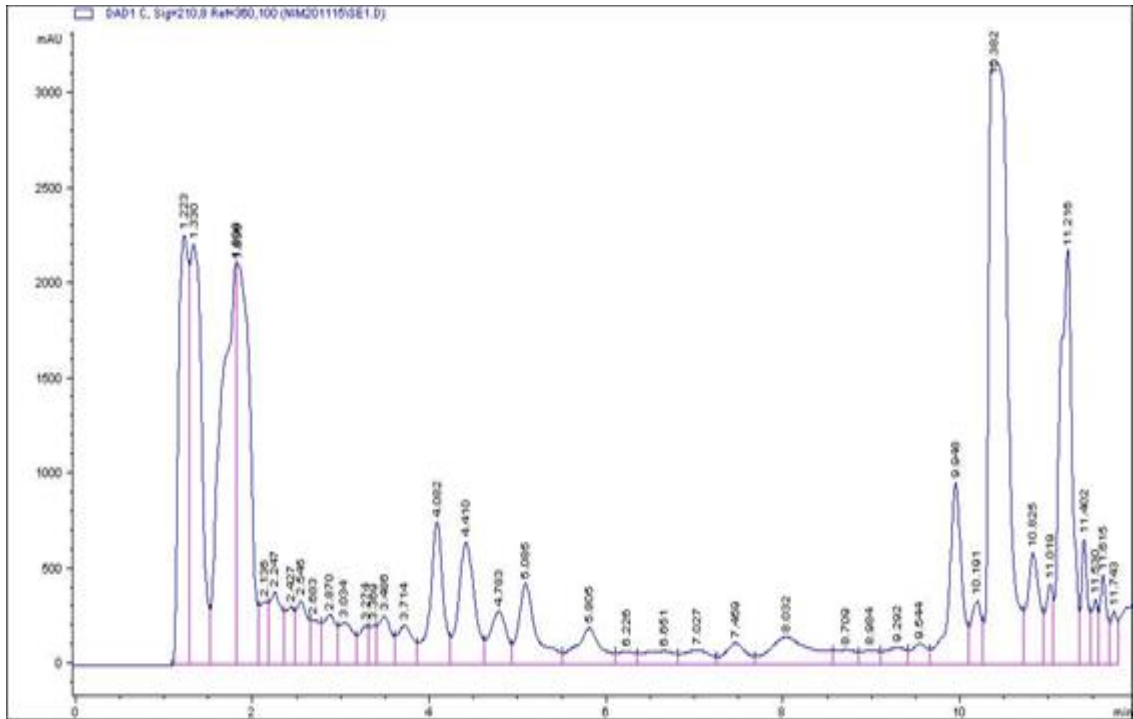
Anexo E. Cromatograma estándar de AZA



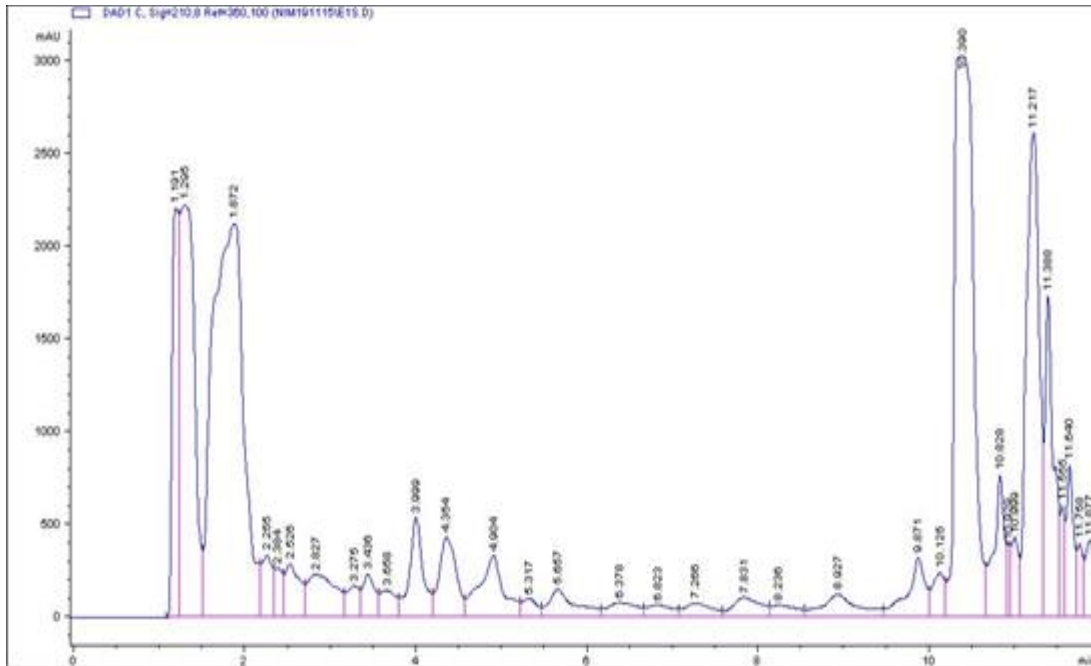
Anexo G. Cromatograma estándar de alfa-terpineol.



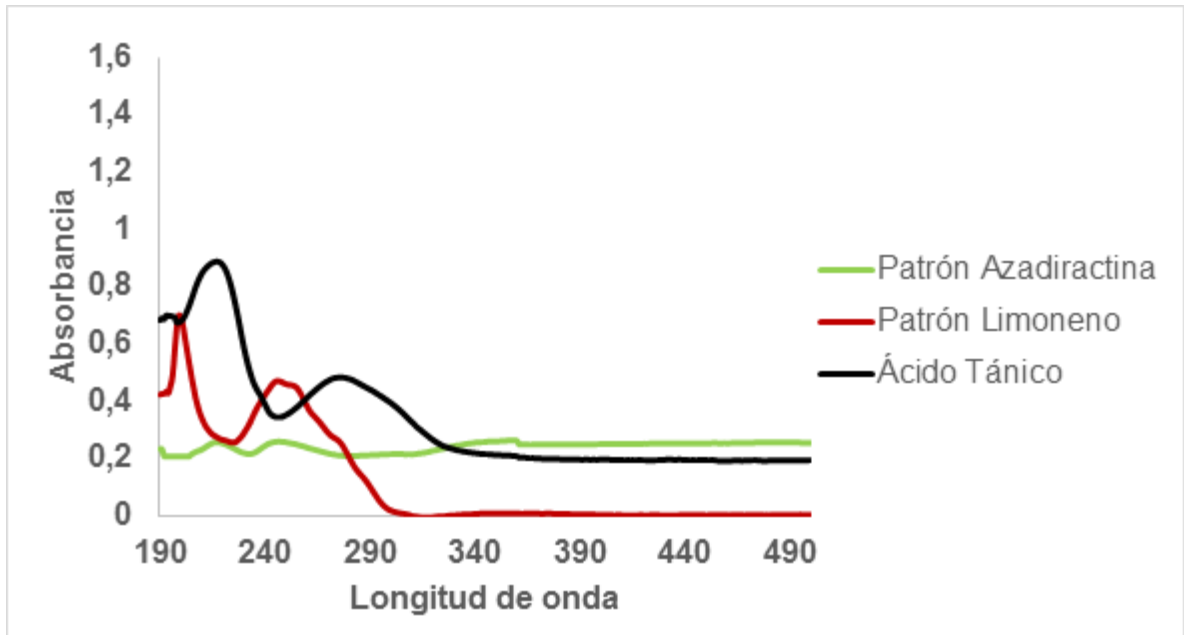
Anexo H. Cromatograma ERE con alfa-terpineol como patron.



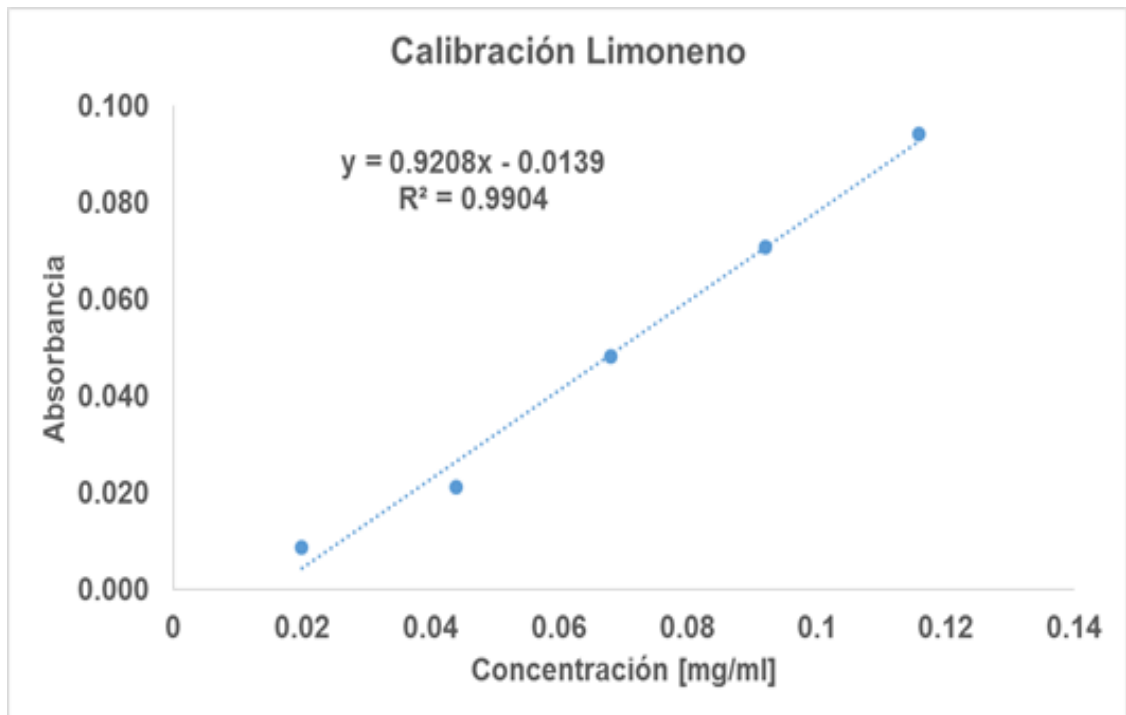
Anexo I. Cromatograma ERE sin patrón.



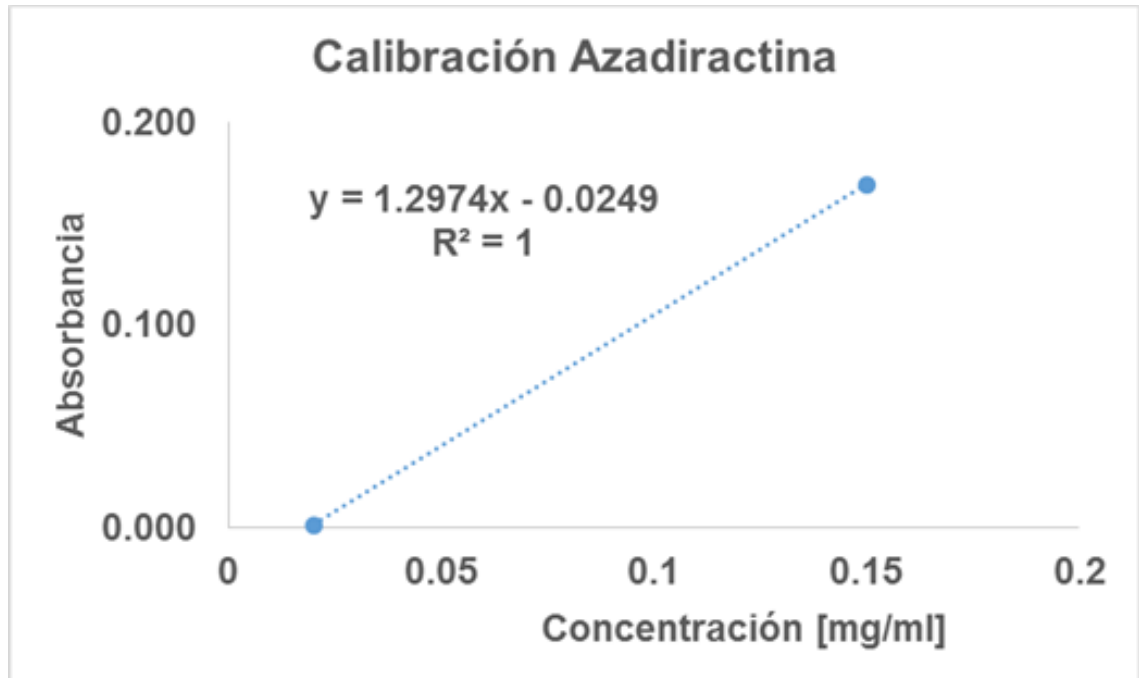
Anexo J. Gráfica de Longitud de onda vs Absorbancia de los patrones de AZA, limoneno y ácido tánico obtenida mediante espectrofotometría



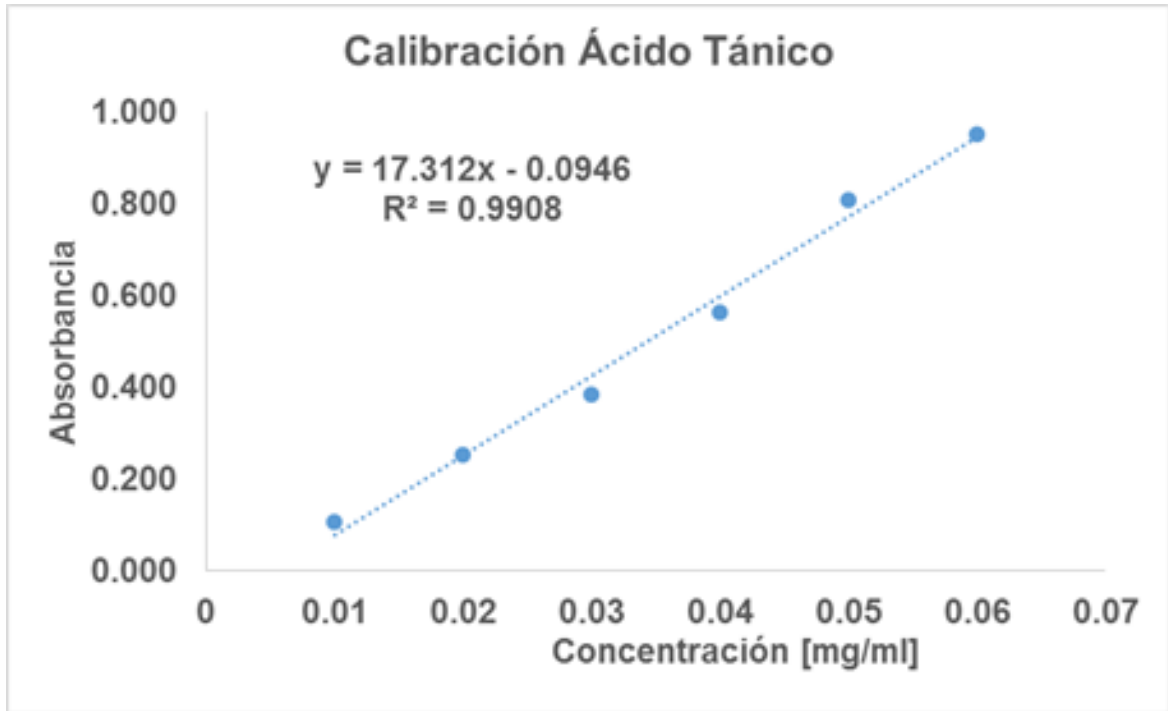
Anexo K. Curva de calibración Limoneno. Longitud de onda 250 nm.



Anexo L. Curva de calibración AZA. Longitud de onda 255nm.



Anexo M. Curva de calibración ácido tánico. Longitud de onda 221 nm



Anexo F. Test de normalidad [44].

Existen diferentes pruebas de significación para contrastar la hipótesis de la normalidad de variables aleatorias continuas: Kolmogorov-Smirnov, Corrección de Lilliefors y Shapiro Wilks.

- ✓ Shapiro – Wilks: Determina si una muestra aleatoria presenta distribución normal. El estadístico W de Shapiro-Wilks mide la fuerza del ajuste con una recta. Cuanto mayor sea el valor de este estadístico mayor desacuerdo habrá con la recta de normalidad, por lo que se rechazará la hipótesis nula. Para muestras pequeñas ($n < 50$) se recomienda Shapiro. Para muestras mayores se recomienda Kolmogorov con la corrección de Lilliefors.

- Hipótesis:

H_0 : La muestra aleatoria tiene una distribución normal.

H_1 : La muestra aleatoria no tiene una distribución normal.

- Estadístico de prueba:

$$W = \frac{(\sum a_{n-i+1}(x_{n-i+1} - x_i))^2}{\sum(x - \bar{x})^2}$$

Donde:

a_{n-i+1} = Cuantil esperado de x_i

x_{n-i+1} = Dato mayor de la muestra ordenada

x_i = Dato menor de la muestra ordenada

x = Dato de la muestra ordenada

\bar{x} = Media de la muestra

- Decisión: Si $W_o \leq W_t, \alpha$. W_t = Tablas de Shapiro – Wilks. Cuantiles de W
Rechazamos H_0 .

Se especifica el nivel de confianza ($\alpha=0,05$) y se rechazan los todos los valores menores o iguales a W_t con un alfa de .05

Calcular W_t y comparar con W_o de la tabla con un alfa de 0,05 y N número de datos.

Cuando se ejecutan las pruebas con STATISTICA se obtiene el valor del estadístico y el valor p de probabilidad asociado. Se rechaza H_o si el valor p de probabilidad es menor que el nivel de significación elegido aplicando la siguiente regla de decisión:

Si $p > \alpha$ Aceptamos H_o

Si $p \leq \alpha$ Rechazamos H_o

Anexo G. Coeficiente de correlación de Pearson[45]

La correlación estadística determina la relación o dependencia que existe entre las dos variables, es decir, determina si los cambios en una de las variables influyen en los cambios de la otra. En caso de que suceda, diremos que hay correlación entre las variables. En el caso de que se esté estudiando dos variables aleatorias X y Y sobre una población; el coeficiente de correlación de Pearson se simboliza con la letra $\rho_{X,Y}$, varía en el intervalo [-1,1] y se calcula con la siguiente expresión:

$$\rho_{X,Y} = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \sigma_Y} = \frac{\text{Covarianza } XY}{\text{Desv. Est } X * \text{Desv. Est } Y}$$

Interpretación:

Si $r = 1$, existe una correlación positiva fuerte. Relación directa.

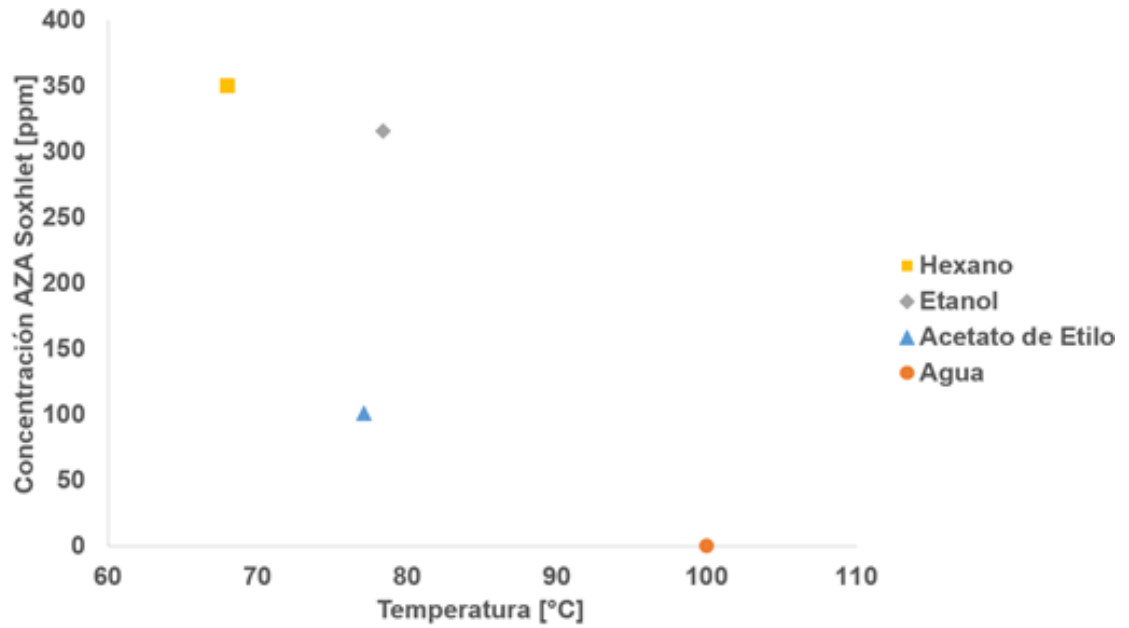
Si $0 < r < 1$, existe una correlación positiva.

Si $r = 0$, no existe relación lineal. Pero esto no necesariamente implica que las variables son independientes: pueden existir todavía relaciones no lineales.

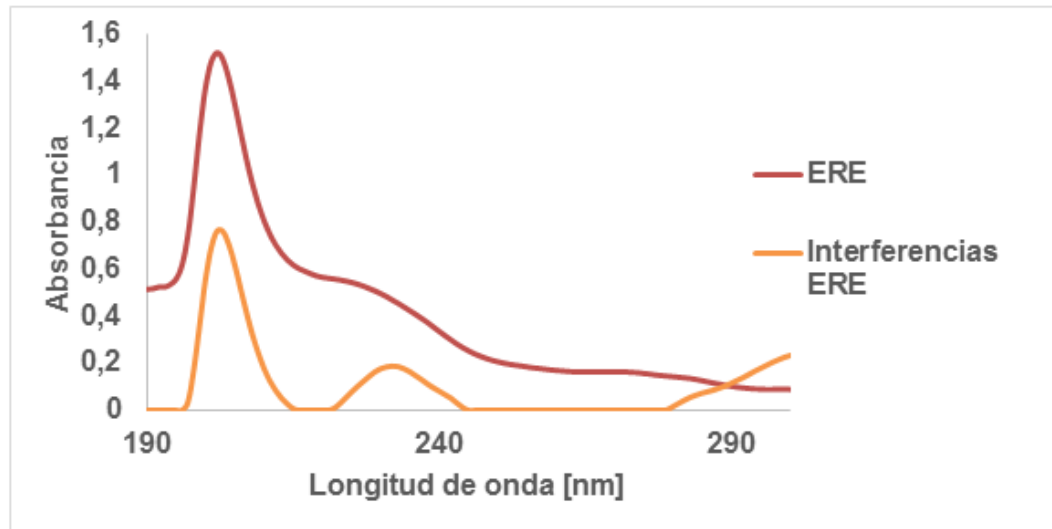
Si $-1 < r < 0$, existe una correlación negativa.

Si $r = -1$, existe una correlación negativa fuerte. Relación inversa.

Anexo H. Gráfica de concentración de AZA extraída por Soxhlet en función de la temperatura de ebullición de los solventes utilizados.



Anexo Q. Gráfica de Longitud de onda vs Absorbancia del E.R.E y de los compuestos que generan interferencias en el mismo extracto, junto a la matriz y tabla de resultados de caracterización espectrofotometría



Fuente: según metodología de Dai et al.[39] modifica

$$A = \epsilon l C$$

$$C = \epsilon^{-1} A$$

$$C = \begin{bmatrix} C_{AZA} \\ C_{TS} \\ C_{TAN} \end{bmatrix} \quad \epsilon = \begin{bmatrix} \epsilon_{\lambda 1}^{AZA} & \epsilon_{\lambda 1}^{TS} & \epsilon_{\lambda 1}^{TAN} \\ \epsilon_{\lambda 2}^{AZA} & \epsilon_{\lambda 2}^{TS} & \epsilon_{\lambda 2}^{TAN} \\ \epsilon_{\lambda 3}^{AZA} & \epsilon_{\lambda 3}^{TS} & \epsilon_{\lambda 3}^{TAN} \end{bmatrix} \quad A = \begin{bmatrix} A_{\lambda 1}^{E.Ri} \\ A_{\lambda 2}^{E.Ri} \\ A_{\lambda 3}^{E.Ri} \end{bmatrix}$$

Donde:

$\lambda 1$ = Longitud de onda Azadiratina

$\lambda 2$ = Longitud de onda Terpenos Simples

$\lambda 3$ = Longitud de onda Taninos

E. Ri = Extracto rediluido extraído con solvente *i*

Concentración [mg/ml]	ERE	ERA	ERH	ERA
Aza	0.221	0.223	0.214	0.005
TS	0.001	-0.006	-0.014	0.069
TAN	0.008	0.006	0.005	0.004

Mediante el arreglo matemático realizado por la matriz de Dai *et al.*, se eliminan las contribuciones por parte de las sustancias que se encuentren identificadas con ayuda de los espectro de los patrones, así el resto de las contribuciones que se hallen en el espectro resultante harán parte de los demás compuestos que representarían a las interferencias de la muestra.

Anexo I. Test de Kruskal – Wallis[44].

Prueba no paramétrica, es decir que las muestras no tienen comportamiento de distribución normal, para diferenciar tres o más grupos independientes.

La prueba de Kruskal-Wallis es el método más adecuado para comparar poblaciones cuyas distribuciones no son normales. Incluso cuando las poblaciones son normales, este contraste funciona muy bien. Permite decidir si puede aceptarse la hipótesis de que k muestras independientes proceden ser de la misma población o de poblaciones idénticas con la misma mediana.

- Hipótesis:

H_0 : Las k medianas son todas iguales

H_1 : Al menos una de las medianas es diferente

- El estadístico de prueba es:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(N+1)$$

Donde

N = Total de datos de las muestras

n_j = Numero de datos de cada muestra

R_j = Sumatoria de rangos de cada muestra

Cuando los tamaños muestrales son grandes, el estadístico H se aproxima a una distribución χ^2_{r-1} , por lo que para un nivel de significancia α , la región de contraste es $H \geq \chi^2_{r-1}$.

- Decisión:

Si $H \geq \chi^2_{r-1}$, se rechaza la hipótesis nula.

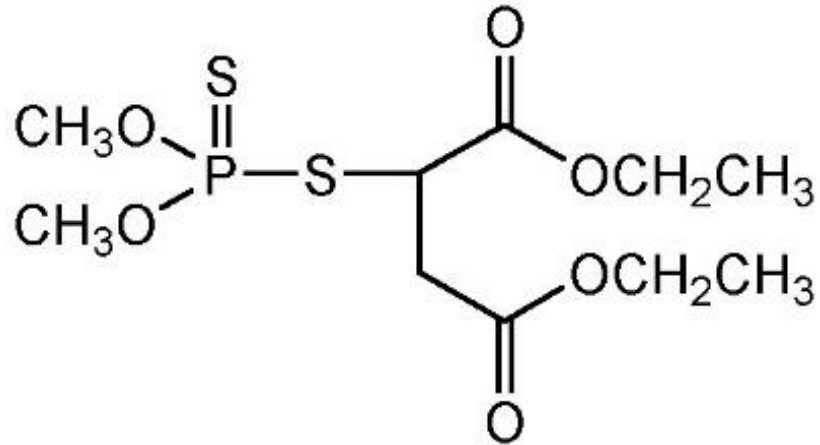
Si $H \leq \chi^2_{r-1}$, se acepta la hipótesis nula.

Anexo J. Múltiple comparación de valores p, para la prueba biológica de impregnación de superficie no porosa, según análisis no paramétrico Kruskal – Wallis

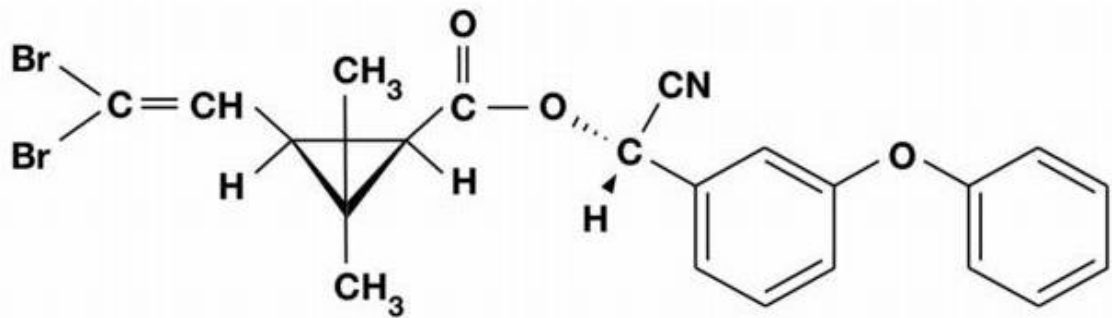
M= Maceración; S=Soxhlet. Valores de $p < 0,05$ muestran diferencias significativas entre sí. Obtenido del programa estadístico STATISTICA.

Depend.: %Mortalidad	Agua-M R:4,0000	Agua-S R:4,0000	Hexano-M R:14,000	Hexano-S R:17,500	Acetato de Etilo-M R:7,8333	Acetato de Etilo-S R:13,833	Etanol-M R:25,000	Etanol-S R:15,833	Malation R:22,500	Deltametrina R:22,500
Agua-M		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,034734	1,000000	1,000000	1,000000
Agua-S	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,034734	1,000000	1,000000	1,000000
Hexano-M	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Hexano-S	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Acetato de Etilo-M	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,269108	1,000000	1,000000	1,000000
Acetato de Etilo-S	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Etanol-M	0,034734	0,034734	1,000000	1,000000	0,269108	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
Etanol-S	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
Malation	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
Deltametrina	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Anexo K. Estructura molecular de Malation y Deltametrina, respectivamente.



Malation. Fuente: [Citado el 10 de Enero de 2016] Disponible en <
<http://www.chemservice.com/malathion-n-12346-100mg.html>



Deltametrina. Fuente: [Citado el 10 de Enero de 2016] Disponible en <
<http://fitogest.imaginenetwork.com/it/sostanze-attive/deltametrina/93>

Anexo L. Múltiple comparación de valores p, para la prueba biológica de impregnación de sustrato, según análisis no paramétrico Kruskal – Wallis.

M= Maceración; S=Soxhlet. Valores de $p < 0,05$ muestran diferencias significativas entre sí. Obtenido del programa estadístico STATISTICA.

Depend.: %Mortalidad	Agua-M R:8,5000	Agua-S R:8,5000	Hexano-M R:16,167	Hexano-S R:11,500	Acetato de Etilo-M R:13,333	Acetato de Etilo-S R:11,500	Etanol-M R:22,000	Etanol-S R:8,5000	Malation R:25,000	Deltametrina R:26,000
Agua-M		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Agua-S	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Hexano-M	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Hexano-S	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Acetato de Etilo-M	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Acetato de Etilo-S	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Etanol-M	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
Etanol-S	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
Malation	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000
Deltametrina	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	