

**PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE *AZADIRACHTA INDICA*
PARA SU USO COMO BIOINSECTICIDAS AGROINDUSTRIALES**

JOSÉ GABRIEL LÓPEZ ORTIZ

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

2017

**PRODUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE *AZADIRACHTA INDICA*
PARA SU USO COMO BIOINSECTICIDAS AGROINDUSTRIALES**

JOSÉ GABRIEL LÓPEZ ORTIZ

DIRECTORA

**PH.D. DEBORA ALCIDA NABARLATZ
GRUPO DE INVESTIGACIÓN INTERFASE**

CODIRECTOR

**DR. JONNY EDWARD DUQUE LUNA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN CINTROP**

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

2017

DEDICATORIA

A mi madre, María Cecilia López Ortiz.

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Debora Nabarlatz, por su apoyo en todo el desarrollo del proyecto, incluso en los momentos personales más difíciles.

Al profesor Jonny Duque y al grupo de investigación CINTROP, por facilitarme las instalaciones, materiales y conocimientos, para llevar a cabo las pruebas entomológicas.

A la profesora Maria Paola Maradei y al grupo de investigación INTERFASE, por el apoyo técnico, préstamo de los laboratorios y equipos.

A Rolando Andrés Acosta, por sus aportes en las pruebas de caracterización de las hojas de nim y el compañerismo que siempre me demostró.

Al Programa de Movilidad de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) de la Universidad Industrial de Santander, por el apoyo para la asistencia a la “International Conference On Chemical And Biochemical Engineering 2015”, realizado en la ciudad de París, Francia.

A la Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas de la Universidad Industrial de Santander por su apoyo para asistir al “V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales 2016”, realizado en la ciudad de Bogotá.

A la empresa ZUMOTEC S.A. y la VIE de la UIS por la financiación del proyecto de investigación 1328.

A las escuelas de Ingeniería Química y Química de la UIS por el préstamo de los equipos y laboratorios.

A los estudiantes de pregrado que con sus trabajos, aportaron al desarrollo de esta investigación.

Por último, a todos mis compañeros y amigos que estuvieron presentes durante el desarrollo de esta investigación y que aportaron desde diferentes áreas del conocimiento y perspectivas personales y profesionales.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	26
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	38
1.1 ÁRBOL DE NIM.....	38
1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS	38
1.3 LIMONOIDES	39
1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS	40
1.4.1 Destilación.	40
1.4.2 Prensado.....	40
1.4.3 Extracción por solventes	41
1.4.4 Extracción con fluidos en condiciones supercríticas	41
1.4.5. Extracción y purificación de metabolitos secundarios a partir del árbol de nim.	42
1.4.6. Caracterización de extractos de nim	45
1.5 FORMULACIÓN DE INSECTICIDAS	48
1.6 PRINCIPIO ACTIVO.....	50
1.7 COADYUVANTES	50
1.7.1 Humectantes	50
1.7.2 Adhesivos	51
1.7.3 Sinergistas	52
2. HIPÓTESIS	53
3. OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVO GENERAL	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
4. ESTABLECIMIENTO DE LOS PROTOCOLOS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y FORMULADOS INSECTICIDAS ELABORADOS A PARTIR DE LAS HOJAS DE NIM.....	55
4.1 METODOLOGÍA	55
4.1.1 Reactivos, materiales y solventes.	55

4.1.2 Producción de los extractos de hoja de nim.	56
4.1.3 Evaluación de los métodos de caracterización fisicoquímica.	56
4.1.3.1 Evaluación del método de caracterización fisicoquímica por HPLC.....	56
4.1.3.2 Evaluación del método de caracterización fisicoquímica por espectrofotometría UV-Vis.....	57
4.1.4 Evaluación de los métodos de caracterización de la actividad insecticida.	59
4.1.4.1. Material entomológico para los ensayos de mortalidad.	59
4.1.4.2 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por aplicación tópica.	60
4.1.4.3 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por impregnación de superficie.....	61
4.1.4.4 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por impregnación de alimento.....	61
4.1.5 Análisis estadístico de los datos.	62
4.1.6 Elección de los protocolos de caracterización fisicoquímica y de actividad insecticida	63
4.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
4.2.1 Elección del estándar interno para HPLC.	63
4.2.2 Obtención de la curva de calibración y cuantificación de la AZA en los extractos por HPLC	66
4.2.3 Evaluación del método de caracterización fisicoquímica por espectrofotometría UV-Vis.....	67
4.2.4 Elección del protocolo de caracterización fisicoquímica.....	72
4.2.5 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por aplicación tópica.	73
4.2.6 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por impregnación de superficie.....	75
4.2.7 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por impregnación de alimento	77
4.2.8 Elección del protocolo de caracterización de la actividad biológica.	78

4.3 CONCLUSIONES	79
5. EVALUACIÓN DE MÉTODOS Y SOLVENTES DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LAS HOJAS DEL NIM A DIFERENTES CONDICIONES DE OPERACIÓN.....	80
5.1 METODOLOGÍA	80
5.1.1 Reactivos, mariales y solventes	80
5.1.2 Caracterización de la hoja de nim.	81
5.1.3 Acondicionamiento del material vegetal.	81
5.1.4 Producción de los extractos de hoja de nim por el método de maceración.	81
5.1.5 Producción de los extractos de hoja de nim por el método Soxhlet.	82
5.1.6 Producción de los extractos a partir de la semilla de nim.....	82
5.1.7 Análisis estadístico de los datos.	82
5.1.8 Elección del método y el solvente de extracción de los compuestos de la hoja del nim.....	83
5.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	83
5.2.1 Caracterización de la hoja de nim.	83
5.2.2 Producción de los extractos de hoja de nim por el método de maceración.	84
5.2.3 Producción de los extractos de hoja de nim por el método Soxhlet.	88
5.2.4 Producción de los extractos a partir de la semilla del nim.....	91
5.2.5 Elección del método y solvente de extracción de los compuestos de la hoja del nim.	93
5.3 CONCLUSIONES	94
6. MAXIMIZACIÓN DE LA AZADIRACTINA PRESENTE EN LOS EXTRACTOS DE HOJA DE NIM MEDIANTE LA MODIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN.....	95
6.1 METODOLOGIA	95
6.1.1 Reactivos, mariales y solventes	95
6.1.2 Diseño experimental tipo Box-Behnken.....	95
6.1.3 Producción y cuantificación de la AZA en los extractos de hoja de nim.	96
6.1.4 Maximización del % AZA y validación del modelo matemático.....	96

6.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	97
6.2.1 Efecto de los parámetros de extracción en el % AZA.	97
6.2.2 Maximización del % AZA de la hoja del nim.	102
6.2.3 Validación de los resultados obtenidos por el modelo matemático	103
6.3 CONCLUSIONES	104
7. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN DE LA AZADIRACTINA PRESENTE EN LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DEL NIM	105
7.1 METODOLOGIA	105
7.1.1 Reactivos, mariales y solventes	105
7.1.2 Producción de los extractos de hoja de nim.	106
7.1.3 Fraccionamiento de los extractos de hoja de nim por solventes.....	106
7.1.4 Fraccionamiento de los extractos de hoja de nim por cromatografía en columna.....	107
7.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	108
7.2.1 Fraccionamiento por solventes de los extractos de hoja de nim	108
7.2.2 Fraccionamiento de los extractos de hoja de nim utilizando cromatografía en columna.....	110
7.3 CONCLUSIONES	112
8. FORMULACIÓN DE UN BIOINSECTICIDA PARA EL CONTROL DE SITOPHILUS ORYZAE (GORGOJO DEL ARROZ) A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE LA HOJA DEL NIM.....	113
8.1 METODOLOGÍA	113
8.1.1 Reactivos, mariales y solventes	113
8.1.2 Determinación de las dosis letales en el gorgojo del arroz	114
8.1.3 Dilucidación del mecanismo de acción insecticida por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).....	115
8.1.4 Evaluación del uso de tensoactivos no iónicos en formulaciones insecticidas con extractos de hoja de nim.....	117
8.1.5 Evaluación del efecto del pH, concentración del conservante y agua en la estabilidad de los formulados insecticidas	118

8.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	121
8.2.1 Determinación de las dosis letales de los extractos de hoja de nim en el gorgojo del arroz	121
8.2.2 Dilucidación del mecanismo de acción insecticida por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).....	123
8.2.3 Evaluación del uso de tensoactivos no iónicos en formulaciones insecticidas con extractos de hoja de nim.....	125
9. CONCLUSIONES GENERALES	139
10. RECOMENDACIONES	140
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
BIBLIOGRAFÍA	153
ANEXOS	166

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa temperatura máxima (A) y HR (B) en Colombia	28
Figura 2. Gorgojo del arroz (<i>Sitophilus oryzae</i>) (A) y granos de trigo después de ser atacados por este insecto (B)	29
Figura 3. Árbol (A), frutos y hojas (B) del nim.....	31
Figura 4. Azadiractina A (A), Azadiractina D (B), Azadiractina H (C), Deacetilnimbin (D), Nimbin (E), Salanin (F)	33
Figura 5. Departamentos del país con potencial para la siembra del nim	35
Figura 6. Metodología general para el establecimiento de los protocolos de caracterización de los extractos y formulados insecticidas elaborados a partirde las hojas de nim.	55
Figura 7. Zona de topicación dorsal (1) y ventral (2) en el gorgojo del arroz	61
Figura 8. Cromatograma del estándar de α -terpineol a 214 nm, con un detector DAD, una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua a un flujo de 1 mL/min. ...	64
Figura 9. Cromatograma del estándar de AZA a 214 nm, obtenido con un detector DAD, una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua a un flujo de 1 mL/min.	65
Figura 10. Cromatograma a $\lambda = 214$ nm del extracto etanólico obtenido por maceración de las hojas delnim (–) y utilizando α -terpineol como estándar interno (–)	

-), con un detector DAD, una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua a un flujo de 1 mL/min.....	66
Figura 11. Curva de calibración para diferentes concentraciones de AZA/ α -terpineol obtenidapor HPLC a una longitud de onda de 214 nm, equipado con un detector DAD, una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua a un flujo de 1 mL/min.	67
Figura 12. Longitud de onda vs Absorbancia de Aza (limonoides), ácido tánico (taninos) y limonenos (terpenos simples), mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando una cubeta de cuarzo de 10 mm.	68
Figura 13. Curvas de calibración de limonoides (AZA) (A), taninos (Ácido tánico) (B) y terpenos simples (limoneno) (C)	69
Figura 14. Longitud de onda vs Absorbancia de los extractos etanólicos y hexanoicos de la hoja de nim.	71
Figura 15. % M contra Tiempo después de la aplicación (h): zona dorsal (A) y ventral (B) en el gorgojo del arroz. T=25°C y HR= 94%	74
Figura 16. % M contra Tiempo después de la aplicación de los tratamientos por impregnación sobre la superficie no porosa. T=25°C y HR= 94%.	76
Figura 17. % M contra Tiempo después de la aplicación de los tratamientos en el pellet de harina. T=25°C y HR= 94%.	78
Figura 18. Metodología general para la evaluación de métodos y solventes de extracción de los compuestos presentes en las hojas del nim.	80

Figura 19. % R de extracción por maceración de hoja de nim con respecto al solvente, la agitación (0 y 500 rpm) y relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v).	84
Figura 20. % AZA obtenido por extracción por maceración de hoja de nim con respecto al solvente, la agitación (0 y 500 rpm) y relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v).	85
Figura 21. % M del gorgojo del arroz por impregnación de superficie de los ER al 3% p/v, extraídos por maceración con respecto al solvente de extracción, la agitación (0 y 500 rpm) y la relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v). T=25°C HR=70%	87
Figura 22. % R de los extractos obtenidos de la hoja de nim por extracción Soxhlet con respecto al solvente de extracción.	89
Figura 23. % AZA extracción por Soxhlet de hoja de nim con respecto al solvente de extracción.	90
Figura 24. % M del gorgojo del arroz por impregnación de superficie de los ER al 3% p/v, extraídos por Soxhlet de la hoja de nim con respecto al solvente de extracción. T=25°C HR=70%.	91
Figura 25. % AZA para los extractos de semilla de nim obtenidos por maceración con etanol a una relación 30% p/v y extracción de Soxhlet con hexano	92
Figura 26. Metodología general para la maximización de la azadiractina presente en los extractos de hoja de nim	95

Figura 27. Superficie de respuesta relacionando el tiempo de extracción vs % relación hoja/solvente a 250 rpm para el % de AZA recuperado de la hoja de nim	100
Figura 28. Superficie de respuesta relacionando el % relación hoja/solvente vs agitación a 30 h de extracción para el % de AZA recuperado de la hoja de nim.	101
Figura 29. Superficie de respuesta relacionando el tiempo de extracción vs agitación a 30% p/v para el % de AZA recuperado de la hoja de nim.	102
Figura 30. Valores de las variables de proceso para maximizar el % AZA.	103
Figura 31. Comparación del resultado experimental del % AZA con el predicho por la maximización del modelo matemático	104
Figura 32. Metodología general utilizada para la evaluación de técnicas de purificación de la azadiractina presente en los extractos de las hojas del nim.	105
Figura 33. Esquema columna de fraccionamiento	107
Figura 34. Diagrama general de fraccionamiento con cada uno de los pesos obtenidos.....	108
Figura 35. Diagrama general del fraccionamiento en columna de cromatografía, a diferentes relaciones de éter de petróleo (A), acetato de etilo (B) y metanol.....	111
Figura 36. Metodología general para la formulación un bioinsecticida para el control de <i>Sitophilus oryzae</i> (gorgojo del arroz) a partir de los extractos de la hoja del nim	113

Figura 37. Mecanismo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.....	115
Figura 38. Lector de microplacasMultiskan™ GO ThermoScientific	116
Figura 39. Concentración de los extractos de hoja de nim diluidos en etanol al 96% v/v contra el porcentaje de mortalidad en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie a las 144 h de exposición	121
Figura 40. Porcentaje de inhibición de la enzima AChE <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones de los extractos de hoja de nim.	124
Figura 41. Formulados insecticidas a partir de los extractos de hoja de nim al 2,6% p/v, con diferentes concentraciones de Tween® 80 y ECOSURF™ SA-9 después de 4 ciclos de 2 h de enfriamiento (5°C) y calentamiento (40°C)	126
Figura 42. Efecto de la actividad insecticida en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie con los formulados: ECOSURF™ SA-9 a 2,5% v/v (FE) y Tween® 80 a 1,5% v/v (FT) con una concentración de extracto (E) del 2,6% p/v después de 144 h de exposición.	127
Figura 43. Gráficas de contorno del % DAZA (A) y PB (B) con respecto al pH y el % C, a un % A constante de 87,5 % v/v, después de 20 días de almacenamiento a una T de 40°C y HR de 70%.	131
Figura 44. Gráficas de contorno del % DAZA (A) y PB (B) con respecto al pH y el % A, a un % C constante de 0,15 % v/v, después de 20 días de almacenamiento a una T de 40°C y HR de 70%.	132
Figura 45. Valores de pH, % C y % A, que permiten minimizar el % DAZA y la PB	133

Figura 46. Comparación de los datos teóricos y experimentales del % DAZA, después de dos meses de almacenamiento a una T de 40°C y una HR 70% (p=0,14).....134

Figura 47. Comparación de los datos teóricos y experimentales de PB, después de dos meses de almacenamiento a una T de 40°C y una HR 70% (p=1,00).135

Figura 48. %M del gorgojo del arroz versus el tiempo de contacto por impregnación de superficie del formulado, el extracto de hojas del nimal 2,6 % v/v, y DEL al 2,6% v/v.....137

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas de extracción según las partes de la planta, método y solvente empleados.	43
Tabla 2. Presentaciones de formulaciones para los insecticidas comerciales más comunes.	49
Tabla 3. Concentración de limonoides, terpenos simples y taninos, en los extractos etanólicos y hexanoicos del nim, utilizando el modelo matemático multivariable según la metodología propuesta por Dai <i>et al.</i>	71
Tabla 4. Comparación métodos de caracterización fisicoquímicos por HPLC y espectrofotometría UV-Vis	72
Tabla 5. Comparación de los métodos de caracterización de la actividad biológica por aplicación tópica, impregnación de superficie y de alimento, de los extractos etanólicos y hexanoicos.	79
Tabla 6. Análisis próximo de la hoja del nim.	83
Tabla 7. Costo de la AZA con respecto al material vegetal (MV) (hoja o semilla) utilizando el método de maceración a una relación 30% p/v utilizando etanol como solvente de extracción	93
Tabla 8. Comparación de los métodos y solventes de extracción para la hoja de nim	93
Tabla 9. Niveles de los parámetros del diseño de experimentos tipo <i>Box-Behnken</i>	96

Tabla 10. Resultados del % AZA a partir de un diseño <i>Box-Behnken</i> variando la agitación, la relación hoja/solvente y tiempo de extracción.....	97
Tabla 11. Análisis de varianza ANOVA para el tiempo de extracción (X1), agitación (X2) y relación hoja/solvente (X3).....	98
Tabla 12. % AZA en el extracto inicial de hoja de nim y en cada una de las fracciones.....	109
Tabla 13. Cantidad de AZA (mg) y pureza (% AZA p/p) en cada una de las fracciones obtenidas con diferentes relaciones de éter de petróleo/acetato de etilo (A:B) y metanol, por medio de cromatografía en columna	111
Tabla 14. Niveles de los parámetros del diseño de experimentos tipo <i>Box-Behnken</i>	118
Tabla 15. DL ₅₀ y DL ₉₀ de los extractos etanólicos de hoja de nim diluidos en etanol al 96% v/v en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie a las 144 h (Chi cuadrado $X^2 = 2,364$).	122
Tabla 16. Ensayo de estabilidad acelerada: Peso de biomasa seco (g) y % DAZA con respecto al pH, % C y % A en formulados de insecticidas a partir de extractos de hojas almacenados por dos meses en una incubadora a $40\pm 2^\circ\text{C}$ y una humedad relativa del $75\pm 5\%$	129
Tabla 17. Fórmula cuali-cuantitativa del formulado insecticida a partir de los extractos de árbol de nim para el control del gorgojo del arroz.	136

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADOS (ENVEJECIMIENTO ACELERADO).....	167
ANEXO B. FICHA TÉCNICA DEL PRESERVANTE KORALONE	171

LISTA DE ABREVIATURAS

% A	Concentración de agua
% AZA	Porcentaje de azadiractina A
% C	Concentración de conservante
% DAZA	Porcentaje de degradación de azadiractina
% M	Porcentaje de mortalidad
% R	Porcentaje de rendimiento de los extractos
A	Agua
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
ACTI	Ioduro de acetilcolina
AE	Acetato de etilo
A _i	Absorbancia del compuesto a una determinada longitud de onda
A _{mezcla}	Absorbancia total de la mezcla a una determinada longitud de onda
AZA	Azadiractina A
C _i	Concentración del compuesto a una determinada longitud de onda
ε	Coefficiente de absorción
DEL	Deltametrina
DL	Dosis letal
DL ₅₀	Dosis letal que provoca el 50% de la mortalidad
DL ₉₀	Dosis letal que provoca el 90% de la mortalidad
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-[2-nitrobenzónico]
E	Extracto
EA	Extracto acuoso
EAE	Extracto acetato de etilo
EE	Extracto etanólico
EH	Extracto hexanoico
ER	Extracto rediluido
ET	Etanol
FE	Formulado con ECOSURF™ SA-9

F ₀	Generación inicial de insectos
FT	Formulado con Tween®
H	Hexano
HLB	Balance hidrófilo-lipófilo (Hydrophilic-Lipophilic Balance)
HPLC	Cromatografía líquida (high-performance liquid chromatography)
HR	Humedad relativa
IC	Índice de confianza
I	Longitud atravesada por la luz
Li	Limonoides
MAL	Malatión
M _{control}	Mortalidad que se presenta en el control negativo
M _{tratamiento}	Mortalidad observada en el tratamiento
MV	Material vegetal (hojas o semillas)
P	Valor estadístico p
PB	Producción de biomasa
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
T	Temperatura
Ta	Taninos
Ts	Terpenos simples
W	Estadístico prueba de Kruskal-Wallis
α	Nivel de significancia
X ²	Chi cuadrado

RESUMEN

TÍTULO: Producción y evaluación de extractos de *Azadirachta Indica* para su uso como bioinsecticidas agroindustriales¹

AUTOR: José Gabriel López Ortiz²

PALABRAS CLAVE: *Azadirachta Indica*, *Sitophilus oryzae*, Bioplaguicida, Extractos vegetales.

RESUMEN: El objetivo principal de esta tesis de maestría es establecer la formulación y un método de producción de un bioinsecticida a escala de laboratorio a partir de los extractos de las hojas de nim, para ser empleado en el control del gorgojo del arroz. Para ello, se han tenido en cuenta los siguientes objetivos específicos: 1. establecer los protocolos que permitan la caracterización fisicoquímica y la determinación de la actividad biológica de los extractos y formulados de hoja de nim en el gorgojo del arroz; 2. evaluar métodos y solventes para la extracción de los compuestos de las hojas del nim, explorando diferentes condiciones de operación; 3. maximizar la azadiractina presente en los extractos de hoja de nim mediante la modificación de los parámetros de extracción utilizando el mejor método establecido; 4. evaluar diferentes métodos de purificación y refinación de los extractos, que permitan mejorar su calidad; y 5. formular un bioinsecticida para el control de *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz) a partir de los extractos de la hoja del nim. Metodológicamente, esta investigación comenzó con la producción de extractos de la hoja de nim; posteriormente, se realizó una evaluación de las pruebas de caracterización fisicoquímicas; un establecimiento de los protocolos de caracterización fisicoquímica; una recolección, identificación y cría los insectos; una evaluación de las pruebas de caracterización de la actividad insecticida; y, por último, el establecimiento los protocolos de caracterización de la actividad insecticida. Como resultado, se formuló un bioplaguicida a partir de los extractos de hoja de nim con un tiempo de vida útil de 18 meses, mostrando que este formulado, tienen un gran potencial para su uso en el control de plagas agroindustriales, como el gorgojo del arroz, permitiendo sustituir los insecticidas convencionales que pueden generar daños al medio ambiente y en la salud humana.

¹ Tesis de maestría.

² Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Debora Alcida Nabarlatz, doctora en Química e Ingeniería de Procesos.

ABSTRACT

TITLE: Production and evaluation of Azadirachta extracts Indicates for use as agroindustrial bioinsecticides³

AUTHOR: José Gabriel López Ortíz⁴

KEYWORDS: Azadirachta Indica, Sitophilus oryzae, Biopesticide, Plant extracts.

ABSTRACT: The main objective of this master's thesis is to establish the formulation and a method of producing a laboratory-scale bioinsecticide from extracts of neem leaves to be used in the control of rice weevil. To do this, the following specific objectives have been taken into account: first, to establish protocols that allow physicochemical characterization and determination of the biological activity of extracts and neem leaf formulations in rice weevil; Secondly, to evaluate methods and solvents for the extraction of compounds from neem leaves, exploring different operating conditions; Third, maximization of the azadirachtin present in neem leaf extracts by modifying the extraction parameters by using the best established method; Fourthly, to evaluate different methods of purification and refining of the extracts, to improve their quality; And, finally, to formulate a bioinsecticide for the control of Sitophilus oryzae (rice weevil) from extracts of neem leaf. Methodologically, this research began with the production of neem leaf extracts; Subsequently, an evaluation of the physicochemical characterization tests was carried out; An establishment of protocols of physicochemical characterization; A collection, identification and breeding of insects; An evaluation of the characterization tests of the insecticidal activity; And, finally, establishing the protocols characterizing the insecticidal activity. As a result, a biopesticide was formulated from the extracts of neem leaf with a shelf life of 18 months, showing that this formulation has great potential for its use in the control of agroindustrial pests, such as rice weevil, Allowing to substitute the conventional insecticides that can generate damages to the environment and in the human health.

³ Thesis of Master Degree

⁴ Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Debora Alcida Nabarlatz, PhD. Studies in Chemical and Process Engineering.

INTRODUCCIÓN

El sector agrícola en Colombia tradicionalmente ha ocupado un renglón muy importante de la economía: según cifras del Departamento Nacional de Estadística (DANE), en el cuarto semestre de 2015 el sector agropecuario aportó el 6,3% del PIB colombiano y, según la Organización Mundial del Comercio (OMC), las exportaciones agroindustriales corresponden, en promedio, al 30% del valor de las exportaciones totales de bienes del país. No obstante, este sector ha sido uno de los más atrasados tecnológicamente y en el que se registra un mayor nivel de desigualdad [1].

Entre las posibles cadenas agrícolas existentes, la de los cereales es de gran importancia en la agroindustria, debido a que éstos son fundamentales para la alimentación humana y animal. Además de su consumo directo, a partir de los cereales se ha desarrollado una gran cantidad de productos industriales como biocombustibles, endulzantes, aceites y polímeros. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) ubica al trigo como el cereal más consumido en el mundo, seguido por el arroz, el maíz, el sorgo, la cebada, el centeno y la avena. Los principales productores de cereales a nivel mundial son Canadá, Argentina, Rusia, Ucrania, Estados Unidos, China y Brasil [2].

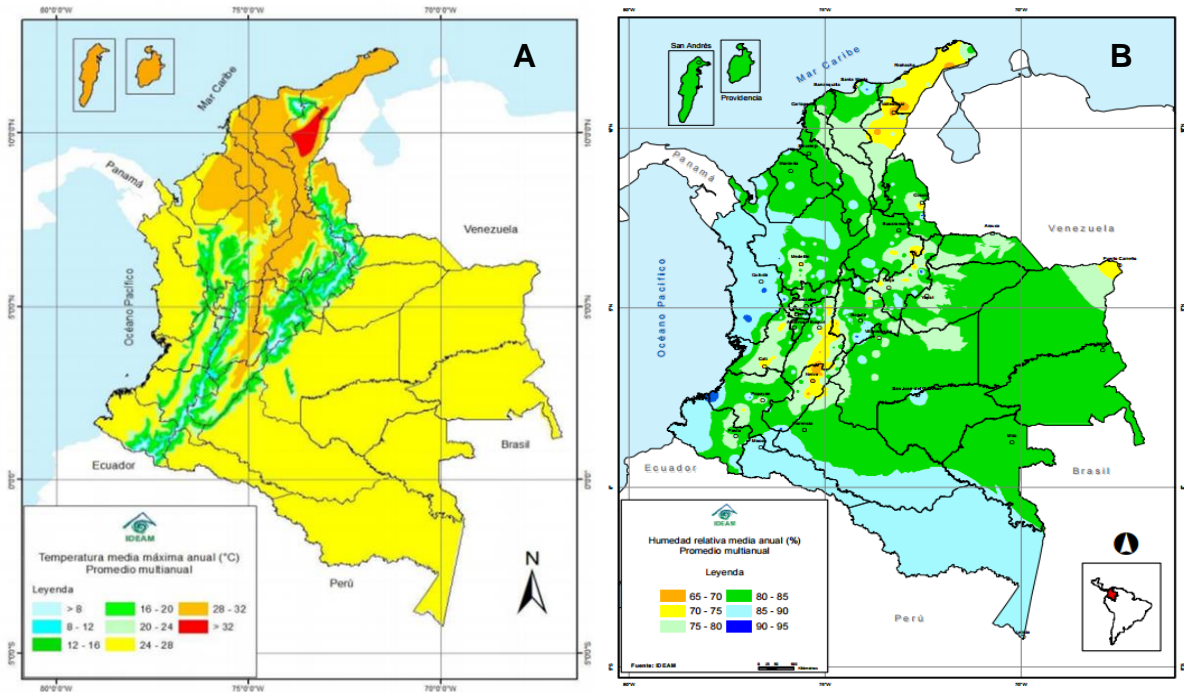
En Colombia, la Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas (Fenalce), estableció que para el año 2015 la producción de maíz fue de 1'766.102 ton, de arroz 1'342.159 ton, y de trigo 16.615 ton.

A pesar de que en los últimos años ha aumentado la producción de cereales en el país, tan sólo se suple el 29% de la demanda interna, dejándole el 71% restante a las importaciones, principalmente provenientes de Estados Unidos y Argentina [3].

Debido a que los cereales se cosechan alrededor de dos veces al año, y que una gran parte del grano es importado, éste tiene que ser almacenado durante prolongados periodos de tiempo. En este sentido, el almacenamiento de granos presenta grandes desafíos a nivel técnico, donde uno de los principales retos es el control de plagas. Según estimaciones de la FAO, las pérdidas en este sector a nivel mundial son del 10 al 30% por la acción de insectos, lo que equivale a la cantidad de granos necesaria para alimentar entre 130 y 390 millones de personas [4]. En Colombia, las pérdidas para el 2015 se estimaron en un 10%. Sin embargo, no hay datos concretos al respecto, pues actualmente el país no cuenta con un programa de monitoreo de plagas poscosecha [5].

Un factor decisivo en la calidad y conservación del grano almacenado es la humedad y la temperatura. Cuando la humedad del grano se encuentra entre 14 y 20%, pueden desarrollarse hongos y bacterias. Los granos con menos del 10% de humedad, son favorables para el desarrollo de insectos. Los climas tropicales húmedos, como el que tiene la mayoría del territorio colombiano (27-30°C y 70-90% de humedad relativa (HR)) proporcionan las condiciones necesarias para el desarrollo de plagas de almacenamiento (Figura 1)[6].

Figura 1. Mapa temperatura máxima (A) y HR (B) en Colombia



Fuente: IDEAM

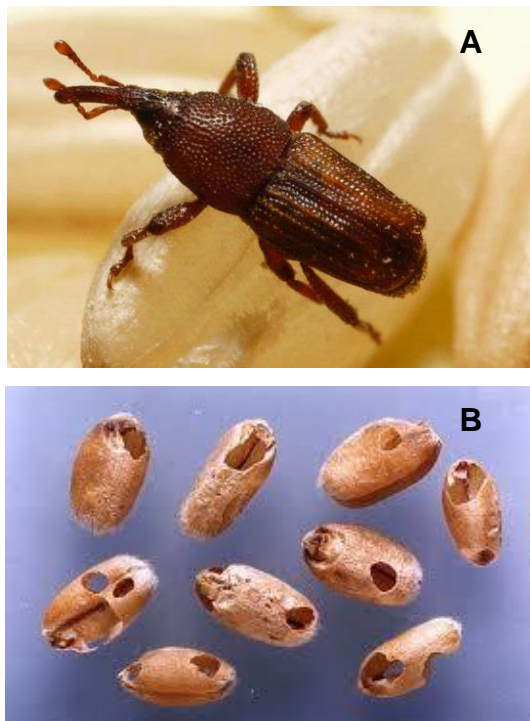
Dentro de las múltiples plagas de grano existentes, están presentes dos grandes órdenes de insectos que económicamente son las de mayor impacto: Coleóptera (escarabajos) y Lepidóptera (mariposas y polillas) [7]. Las plagas de insectos de los granos almacenados se clasifican en dos grupos, según el momento en el que atacan. Las plagas primarias atacan los granos que están intactos. Estos insectos se reproducen muy rápidamente cuando las condiciones son óptimas. Las plagas secundarias se alimentan del grano dañado, ya sea por acción mecánica, en el momento de ser transportado, o por la acción de las plagas primarias. La presencia de plagas de insectos secundarios a menudo indica que el grano no está en condiciones óptimas y no tiene la calidad necesaria para ser comercializado [8].

Entre el grupo de insectos que conforman la plagas primarias, uno de los más importantes es el gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*) por su voracidad [9]. El adulto de este insecto mide de 2,5 a 3,5 mm y su color varía de café a negro, donde los

élitros, que son las alas endurecidas que se encuentran en el dorso, presentan cuatro manchas de color rojizo(Figura 2 A). Existe muy poco dimorfismo sexual, por lo que se hace difícil distinguir entre el macho y la hembra. Su importancia económica y social radica en las pérdidas que produce en cereales tales como el maíz, el trigo, el sorgo, la cebada y el arroz; según la FAO, hasta el 60% de las pérdidas de granos almacenados son causadas por este insecto[10].

Tanto los adultos como las larvas del gorgojo del arroz se alimentan de los granos, sin embargo, es en el estado larvario en el cual este insecto genera la mayor destrucción de los granos, pues se alimenta vorazmente del contenido del grano, dejando la cáscara intacta (Figura 2 B). Los adultos también pueden alimentarse de la harina de los cereales, pero las larvas no pueden desarrollarse, pues necesitan de una superficie dura para poder hacerlo[11].

Figura 2. Gorgojo del arroz (*Sitophilus oryzae*) (A) y granos de trigo después de ser atacados por este insecto (B)



Fuente: www.agrolink.com.br

Una de las estrategias más empleadas para el control de estos insectos es el uso de insecticidas de origen sintético, principalmente fosfina, carbamatos y piretroides [12]. A mediados del siglo XX, cuando se popularizó el uso de estos insecticidas debido a su alta eficiencia y bajo costo, era incipiente la información sobre los efectos de la exposición crónica a estos compuestos en seres humanos [13]. Actualmente, se sabe que muchas de estas sustancias tienen una alta persistencia en el medio ambiente, bio-acumulándose en diferentes eslabones de la cadena trófica, ocasionando graves daños a los ecosistemas durante largos períodos de tiempo [14].

Diferentes estudios han reportado efectos adversos de estos insecticidas sobre la salud humana, tales como problemas neuronales y endocrinos en el desarrollo infantil, cáncer de mama, aumento en la incidencia de la enfermedad de Parkinson, entre otros [15][16]. Además, su uso continuo e indiscriminado ha causado que algunos insectos se vuelvan resistentes a este tipo de sustancias [17].

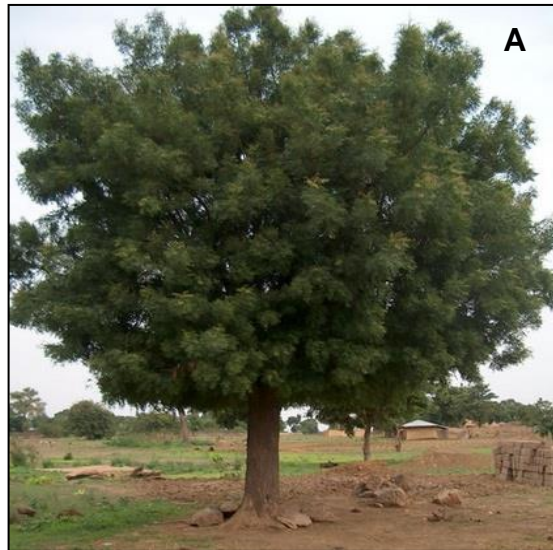
Por esta razón, es necesario profundizar en la investigación y el desarrollo de nuevos insecticidas, destinados al control de plagas en granos almacenados, que sean efectivos, amigables con el medio ambiente y no generen daños en la salud humana. Una alternativa promisoriosa es el uso de bioplaguicidas de origen vegetal, los cuales están compuestos por sustancias químicas llamadas metabolitos secundarios, aislados mediante procesos de extracción y purificación. La presencia y cantidad de los metabolitos secundarios, incluso en plantas de una misma especie, depende de las condiciones medioambientales y de pequeños cambios genéticos. A esta composición específica se le denomina quimiotipo [18].

Colombia, debido a su geografía y variedad de climas, ostenta una gran diversidad botánica, tanto de especies endémicas, como de especies foráneas, que podrían ser usadas para la elaboración de bioplaguicidas. A pesar del gran potencial que tiene el país en este sector, la mayoría de los extractos y aceites esenciales de

origen botánico son importados y los productores nacionales en su mayoría tienen procesos poco tecnificados, con lo cual no puede garantizarse la calidad y la efectividad del producto[19].

Entre las especies vegetales cuyo extracto presenta un mayor potencial para ser empleado como bioplaguicida, se encuentra la *Azadirachta indica* A. Juss (nim) (Figura 3)[20]. Este árbol es originario del sub continente indio y el sudeste asiático. Se desarrolla desde los 0 hasta los 1500 metros sobre el nivel del mar, en suelos con cierto grado de salinidad, en climas semiáridos y con lluvias de 400 a 800 mm anuales.

Figura 3. Árbol (A), frutos y hojas (B) del nim



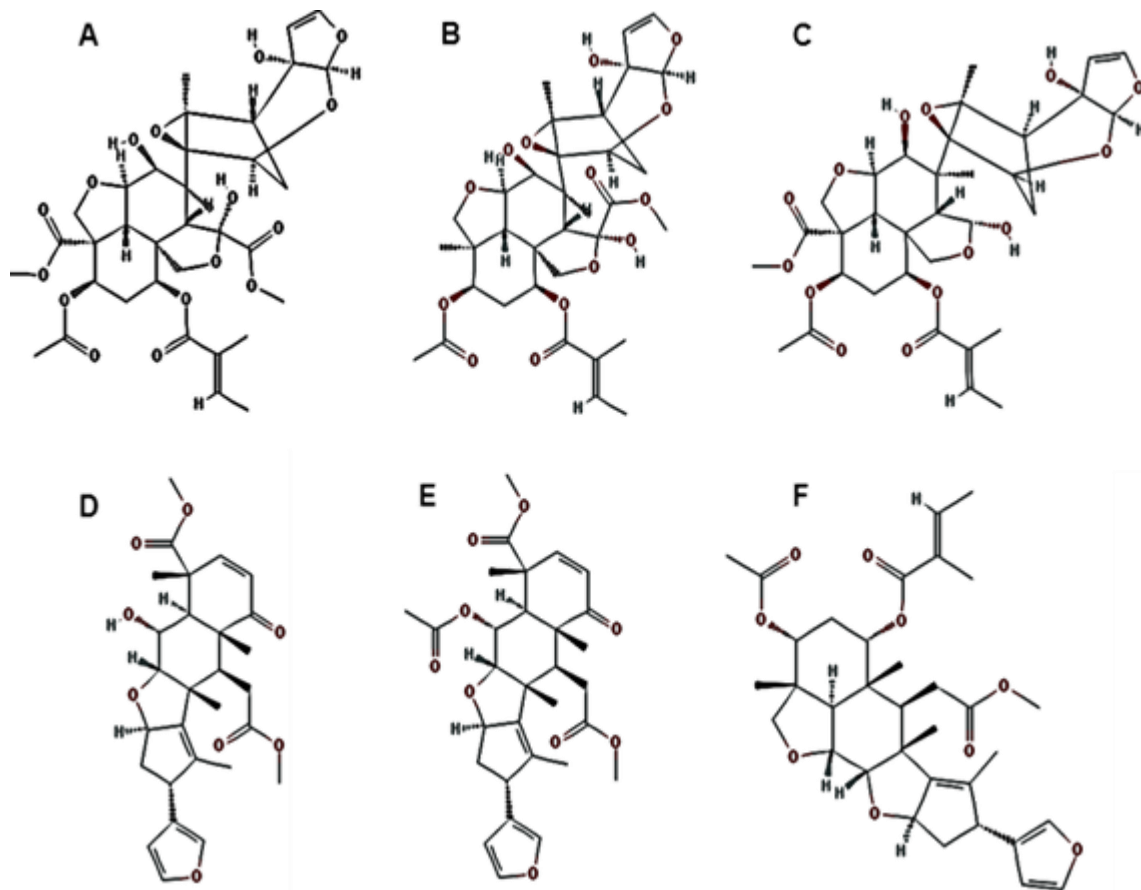


Fuente: www.productosdeneem.com

Desde el punto de vista químico, el árbol del nim produce más de trecientas sustancias, muchas de las cuales tienen actividad biológica anti-alimentaria y afectan el metabolismo inhibiendo el apareamiento, la comunicación sexual, la maduración de los huevos, el desarrollo de las etapas adultas y la síntesis de quitina en diferentes tipos de insectos [21].

Los estudios señalan que los compuestos del nim responsables de la actividad insecticida son los limonoides. La estructura química de los limonoides es homogénea estereoquímicamente y consiste en variaciones de la estructura del núcleo de la furanolactona (Figura 4).

Figura 4. Azadiractina A (A), Azadiractina D (B), Azadiractina H (C), Deacetilnimbin (D), Nimbin (E), Salanin (F)



Fuente: Dai *et al.* [22]

En base a la estructura, los limonoides del nim se pueden clasificar en nueve grupos: *azadirone*, *amoorastatin*, *vepinin*, *vilasinin*, *c-seco meliacin*, *nimbin*, *nimbolinin*, *salannin* y *azadirachtin*[23]. Muchos de estos compuestos no tienen actividad biológica; sin embargo, los pertenecientes a los grupos *azadirachtin*, *nimbin* y *salannin*, son ampliamente conocidos por sus propiedades insecticidas, antibacteriales y antifúngicas.

La azadiractina A (AZA) fue uno de los primeros compuestos extraídos de la semilla del nim. Entre sus características está el afectar diferentes estados del crecimiento de los insectos y tener un potente efecto antialimentario y repelente. La AZA, por tanto, es efectiva contra una gran variedad de especies de insectos. Sin embargo, no afecta a los polinizadores benéficos para las plantas. Akcaet *al.* probaron el efecto tóxico residual de 8 diferentes insecticidas en abejas melíferas (*Apis mellifera*), encontrando que la AZA era la única que no presentaba toxicidad residual [24]. Mann y Dhaliwa, por su parte, realizaron ensayos de mortalidad en abejas melíferas con NeemAzal® (1000 ppm de AZA), encontrando que a la dosis más alta de AZA la mortalidad en abejas fue sólo del 7,58% por exposición directa y del 0,74% cuando las abejas fueron expuestas en un campo de algodón cerrado [25].

Por lo anterior, los extractos de nim podrían ser buenos candidatos para la formulación de bioinsecticidas, pero es necesario que el proceso de extracción empleado separe e incremente el contenido de limonoides, en especial de la AZA. Sundaram estudió el contenido de AZA en diferentes partes de la planta, encontrando que su mayor contenido se encuentra en la semilla, seguido por la hoja, corteza y raíz [26].

Debido a que el nim es un árbol originario de la India y no se introdujo al país hasta hace más o menos dos décadas, han sido pocas las investigaciones que permiten definir los quimiotipos de esta planta según los diferentes tipos de suelos de territorio colombiano. A partir de los estudios de MinAgricultura sobre los departamentos potencialmente aptos para la silvicultura y las características de crecimiento del nim, puede realizarse un mapa tentativo de aquellos departamentos con potencial para la siembra de nim (Figura 5)[27][28]. Actualmente en el país hay hectáreas cultivadas de nim con fines comerciales en Antioquia, Cauca, Tolima, Santander y Cesar[29].

La mayoría de las investigaciones y los productos comerciales a partir del nim emplean extractos obtenidos a partir de las semillas. No obstante, el árbol sólo

(3 años aproximadamente) [31]. Otro factor a tener en cuenta es el precio del kilo de la semilla, el cual es 3 veces mayor que el de la hoja[32].

A pesar de que a nivel comercial existen productos como el Neemazal[®], que se han elaborado a partir de la semilla del nim y tienen comprobada efectividad, en el país son poco conocidas sus propiedades[33][34]. Por otro lado, aún falta información con respecto al quimiotipo de los árboles de nim que crecen en el país y, específicamente, en el departamento de Santander, la cual es de suma importancia para el desarrollo de una industria local alrededor de los extractos de esta planta.

Una empresa local que ha empleado los extractos del nim para el desarrollo de sus productos es Zumotec S.A. Actualmente, éstos se obtienen de forma artesanal, por lo que no se puede garantizar la concentración de los principios activos y, por ende, la calidad de los productos. A pesar de que los consumidores valoran mucho que los productos sean elaborados a partir de principios botánicos, la baja eficiencia de los mismos ha ocasionado que éstos no se hayan logrado posicionar en este nicho de mercado.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo general de este trabajo es establecer un método de producción de un bioinsecticida a escala de laboratorio a partir de los extractos de las hojas del nim, para ser empleado en el control de insectos que afectan el grano almacenado. En el primer capítulo se establecieron los protocolos de caracterización fisicoquímica y de actividad insecticida que se utilizaron en los siguientes capítulos para la caracterización de los extractos de nim y sus formulados. En el segundo capítulo se evaluaron dos métodos de extracción (maceración y Soxhlet), utilizando cuatro solventes diferentes (agua, etanol, acetato de etilo y hexano), con el objetivo de establecer un protocolo de producción de extractos a partir de la hoja. En el tercer capítulo se optimizaron algunas de las variables de extracción (agitación, tiempo de extracción y relación peso hoja/ peso solvente) con el fin de maximizar la cantidad de los limonoides. En el cuarto capítulo

se evaluaron diferentes técnicas de purificación con el fin de aislar los compuestos de interés. En el quinto capítulo se realizó la formulación del bioplaguicida a partir de los extractos de las hojas del nim, teniendo en cuenta factores tales como la dosis letal mínima de los compuestos activos, su estabilidad y humectación.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 ÁRBOL DE NIM

El nim (*Azadirachta indica A. Juss*) es una especie de árbol, perteneciente a la familia Meliácea, de hoja perenne y rápido crecimiento. Puede llegar a una altura de 25 metros, con ramas muy extendidas, que pueden alcanzar de 15 a 20 m. La corteza del nim es moderadamente gruesa, fisurada, de color gris en el exterior y un tono marrón rojizo en el interior. Las hojas son verdes oscuras de 3 a 8 cm de longitud[64].

Es originario de la India y Birmania, se desarrolla en condiciones de baja humedad, suelos arenosos y con cierto grado de salinidad, cualidades que lo han convertido en uno de los mejores candidatos para la recuperación de suelos en procesos de desertificación, por lo que sobrevive en zonas con condiciones subáridas a subhúmedas. El período de crecimiento del nim es de 3 a 4 años y se reporta que puede llegar a vivir hasta 200 años[65]. Estas condiciones permiten desarrollar el cultivo de este árbol en diferentes zonas del país y que su explotación sea más lucrativa en comparación con otras especies de árboles. Su madera es parecida a la caoba, por lo que en la industria maderera es muy apreciado debido a su calidad y durabilidad.

1.2 METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios (MS) son compuestos de bajo peso molecular producidos por las plantas como una respuesta química ante factores externos, por lo cual tienen gran importancia pues intervienen en la atracción de insectos polinizadores, protección contra plagas y agentes patógenos y simbiosis con otros organismos [66].

Los MS se clasifican de manera general en dos: el primer grupo lo conforman los compuestos nitrogenados, entre los que se encuentran los alcaloides, los aminoácidos no proteicos, aminas, glucosinolatos y los glucósidos cianógenos. El segundo grupo está compuesto por los no nitrogenados, entre los que se encuentran los terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. Sin embargo, la estructura básica de los MS puede presentar cambios originados por reacciones químicas, como son la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y glucosilación [67].

Muchos de los cambios en la estructura y su concentración, van a depender de las condiciones de crecimiento de la planta; lo anterior ocasiona, por ejemplo, que una misma especie botánica tenga un quimiotipo (composición química) diferente, dependiendo de la zona geográfica donde se encuentra[68].

El nim produce más de 300 metabolitos secundarios, entre los que se encuentran compuestos azufrados, polisacáridos y limonoides, estos últimos reconocidos por su capacidad insecticida. Entre estos compuestos se destacan la azadiractina, el nimbin y el salannin. Estas sustancias químicas tienen un efecto anti-alimentario en los insectos y afectan su metabolismo inhibiendo el apareamiento, la comunicación sexual, la maduración de los huevos, el desarrollo de las etapas adultas y la síntesis de quitina [69].

1.3 LIMONOIDES

Son sustancias clasificadas como tetranortriterpenos altamente oxidados, abundantes en las plantas de las familias Rutáceas y Meliáceas. Se ha determinado que la biosíntesis de los limonoides en las plantas de nim se realiza en las células secretoras que tienen citoplasma con muchas vesículas, en las cuales se acumulan los terpenoides. Se consideran que estos compuestos se producen en dos rutas, la de los isoprenoides y protolimonoides, asociadas al ácido mevalónico[70]. Uno de

los limonoides del nim, que ha sido más estudiado por sus propiedades insecticidas es la Azadiractina A (AZA). La estructura de esta molécula presenta grupos hidroxilos y éter tetrahidrofurano, con 16 centros estereogénicos, características que hacen muy difícil su síntesis [34].

1.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Para la obtención de metabolitos secundarios a partir de matrices vegetales se emplean métodos de separación, que permiten retirar las sustancias químicas presentes en una matriz vegetal, generalmente sólida o resinosa. Entre los procesos más empleados para este fin se encuentra la destilación, el prensado, la extracción por solventes y con fluidos a condiciones supercríticas [71].

1.4.1 Destilación. Es uno de los métodos más simples pues permite la obtención de varias fracciones volátiles, denominadas aceites esenciales. Se puede realizar de dos formas: la primera es colocando el material vegetal directamente en contacto con el agua, a este tipo se le denomina hidrodestilación. La segunda consiste en generar vapor en una unidad diferente a la principal, el cual es inyectado a través de la matriz vegetal (destilación por arrastre con vapor). En los dos casos el vapor saturado, funciona como agente de arrastre de los compuestos[72].

Una de las ventajas de este proceso es su fácil montaje a nivel industrial, debido a que la cantidad de equipos necesarios y las condiciones técnicas son menores en comparación otros métodos. Como desventaja tiene que algunos compuestos se pueden degradar por efecto de la temperatura, o hidrolizarse, como es el caso de algunos monoterpenos y ésteres.

1.4.2 Prensado. Se usa para obtener metabolitos secundarios por medio de compresión a partir de semillas, cáscaras y cortezas. Este es el método empleado para obtener aceites con propiedades insecticidas a partir de las semillas del

nim[73]. En este proceso se pueden obtener aceites y oleorresinas, y se puede llevar a cabo a altas temperaturas (en caliente) o a temperatura ambiente (en frío). Cuando el prensado se realiza en caliente los rendimientos son mayores, sin embargo, éste tiene como desventaja que los requerimientos son más exigentes desde el punto de vista tecnológico, debido a que algunos compuestos pueden degradarse por el efecto de la temperatura y se produce una mayor cantidad de fosfolípidos. El proceso de prensado en frío tiene como ventajas su bajo costo de operación, bajo consumo de energía y conservación de los compuestos más volátiles. Como desventajas tiene que es un proceso lento y se obtienen bajos rendimientos.

1.4.3 Extracción por solventes. También llamada extracción sólido-líquido, consiste en el uso de solventes químicos para que, mediante difusión, los compuestos solubles se desplacen de la matriz sólida al solvente líquido. En el caso del nim en el sector agropecuario se ha empleado esta técnica utilizando como solvente el agua, sin ningún control del contenido de los principios activos. A escala de laboratorio los solventes más usados son el metanol, el etanol y el hexano [54].

Entre las ventajas que tiene esta técnica se encuentran su fácil implementación a nivel industrial, bajo consumo energético y bajo costo de operación. Entre las desventajas están los tiempos largos de extracción, el costo de los solventes, la toxicidad de los solventes y su disposición final, en especial si se trata de compuestos orgánicos.

1.4.4 Extracción con fluidos en condiciones supercríticas. Los fluidos llevados a condiciones supercríticas presentan un elevado poder disolvente, debido en parte a que tienen baja viscosidad y elevado coeficiente de difusión, lo que permite disolver solutos y penetrar en los poros de los sólidos. En condiciones supercríticas la densidad puede ajustarse realizando pequeños cambios de presión y la

temperatura, lo que permite aislar productos puros, lo anterior es una ventaja para la aplicación de estos fluidos como agentes de extracción.

1.4.5. Extracción y purificación de metabolitos secundarios a partir del árbol de nim. En cuanto a la extracción de los compuestos producidos por el árbol del nim, la mayoría de estudios se han realizado tomando como materia prima la semilla del nim mediante extracción sólido-líquido. El solvente utilizado para las extracciones sólido-líquido permite lograr una selectividad diferente hacia ciertos compuestos. Badshah *et al.*, probaron la toxicidad de los extractos de semilla de nim en el piojo harinoso, *Phenacoccusolenopsis* Tinsley. Para la extracción utilizaron agua, acetona y hexano, empleando el método de maceración, con una relación de 0,16 g de polvo de semillas por mL de cada disolvente, por 72 h. Los resultados obtenidos por los autores mostraron que los extractos acetónicos y hexanoicos causaron el 100% de mortalidad en el insecto de prueba, después de 48 h y una semana de tratamiento, respectivamente. Por otro lado, los extractos acuosos después de una semana tan sólo alcanzaron un 67% de mortalidad. Estos resultados muestran que, según el solvente empleado, se obtendrán diferentes compuestos y concentraciones de los mismos, lo que tendrá un efecto directo en la actividad insecticida.

En la Tabla 1 se presentan diferentes técnicas utilizadas para extraer los compuestos del árbol de nim, las cuales dependen de la parte utilizada del árbol, del solvente y del método de extracción, entre otros. Tal como se puede apreciar la mayoría de estos estudios se han dedicado a la extracción de los compuestos presentes en la semilla o fruto del nim, donde predominan los métodos de extracción sólido-líquido empleando solventes de diferentes polaridades.

Tabla 1. Técnicas de extracción según las partes de la planta, método y solvente empleados.

Parte del árbol	Solvente	Método de extracción	Concentración de AZA	Referencia
Hoja	Agua-etanol (70%, 80%, 90% v/v)	Percolación	No hay presencia	Alves <i>et al.</i> [51]
Fruto	Agua-etanol (70%, 80%)	Maceración asistida por ultrasonido	0,05 g/ml	Paula <i>et al.</i> [52]
Semilla	Diclorometano	Soxhlet	0,89% p/p	Dubhashi <i>et al.</i> [53]
Semilla	Hexano y agua	Soxhlet	422 ppm (hexánico) y 150 ppm (acuoso)	Esparza-Díaz <i>et al.</i> [54]
Semilla	CO ₂ supercrítico	Fluidos supercríticos	5,68 µg/g	Arias <i>et al.</i> [55]
Semilla	Metanol	Maceración asistida por microondas	2,55% p/p	Dai <i>et al.</i> [22]

Fuente: Alves, Paula, Dubhashi, Esparza-Díaz, Arias, Dai

Para que un proceso de extracción pueda ser escalado y pueda cumplir con los parámetros de calidad, es necesario establecer las variables del proceso que permitan la máxima eficiencia de extracción. Hismathet *al.* optimizaron las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de hojas de nim utilizando acetona como solvente, por medio de la metodología de superficie de respuesta. Para esto, aplicaron un diseño central compuesto con el fin de determinar los efectos de la relación hoja/solvente, tiempo de extracción y la temperatura de extracción en el contenido de fenoles totales. Sus resultados muestran que la relación hoja/solvente y el tiempo de extracción fueron las variables más significativas, encontrando como condiciones óptimas una relación de 48,5% p/v, tiempo de extracción de 59,25 minutos, y una temperatura de 41°C [56].

Otros autores como de Paula *et al.* trabajaron en la optimización de la extracción asistida por ultrasonido de AZA de las semillas del árbol de nim. Para este fin utilizó la metodología de superficie de respuesta, con un diseño de tipo *Box-Behnken*, tomando como variables independientes la concentración de etanol, la temperatura y la relación semilla/solvente. El punto óptimo se obtuvo a una concentración del 75% v/v, una temperatura de 30°C y una relación semilla/solvente del 0,55 g/mL [52]. El diseño de superficie de respuesta de tipo *Box-Behnken* permite combinaciones en los puntos medios del rango establecido, lo cual es especialmente útil cuando se sabe cuáles son los límites de operación, permitiendo la estimación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden. Como los diseños *Box-Behnken* suelen tener menos puntos de diseño, pueden ser menos costosos de realizar que los diseños centrales compuestos con el mismo número de factores.

Otra etapa que puede o no incluirse en el proceso en la elaboración de los extractos, es la de purificación. Los extractos son mezclas complejas, en las cuales las moléculas activas pueden encontrarse en presencia de otras sustancias, que tienen poca o ninguna actividad biológica, pero con estructuras químicas casi idénticas [57]. Por otro lado, aunque estas sustancias no tengan actividad biológica, pueden actuar en algunas ocasiones de forma sinérgica con los principios activos de forma positiva, aumentando su actividad biológica o por el contrario actuar de forma negativa, disminuyéndola. Por lo anterior, la decisión para incluir una o varias etapas de purificación en el proceso dependerá de factores económicos y técnicos [58].

Entre las técnicas de purificación más empleadas se encuentran las cromatográficas: un ejemplo es el trabajo de Sharma *et al.* quienes lograron obtener una concentración de AZA del 60% a partir de la purificación de extractos metanólicos de semilla de nim, por medio de cromatografía líquida a presión media en fase inversa (MPLC) [59]. Otros autores que emplearon separación por cromatografía en columna, fueron Jarvis *et al.* quienes a partir de los extractos de

semilla de nim con diclorometano, lograron separar la AZA con un alto grado de pureza, empleando una columna Biotage, utilizando como fase móvil diferentes relaciones de acetato de etilo y éter de petróleo [60]. Otra técnica empleada para la purificación de los extractos de la semilla del nim es por fraccionamiento con solventes. Schroeder y Nakanishi lograron aislar la AZA con una pureza del 70%, obteniendo fracciones con agua, éter de petróleo y acetato de etilo, siendo en esta última la fracción en la cual se detectó la AZA [61]. Como se ha hecho referencia los métodos reportados en la literatura están orientados a la purificación de los extractos de semilla, pues para los extractos de hoja de nim no se encontraron trabajos de este tipo.

1.4.6. Caracterización de extractos de nim. Diversos estudios muestran la importancia de la AZA como molécula con potencial insecticida. Debido a que esta molécula se puede aislar por medio de técnicas cromatográficas a concentraciones que se pueden considerar casi pura (> 90%), la AZA se ha establecido como el patrón para medir la calidad de los extractos y productos insecticidas elaborados a partir del árbol del nim[45][46].

La técnica más empleada para la cuantificación de la AZA presente en los extractos es la cromatografía líquida de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés). El método emplea una columna C-18, una fase móvil de agua/acetonitrilo y un detector de arreglo de diodos (DAD) [47][48]. Para mejorar la precisión y exactitud del método de cuantificación Thejavathi *et al.*, plantearon el uso de anisol como estándar interno [49].

Otros autores como Dai *et al.*, han propuesto otras técnicas como la espectrofotometría UV-Vis [50]. Los métodos antes citados han sido probados en los extractos de semilla, lo cuales tienen una composición diferente a la hoja, por lo que es necesario modificarlos para que se adapten a esta materia prima. Un ejemplo es la presencia de clorofila, la cual en el caso de la semilla es mínima, mientras que

en la hoja este pigmento se encuentra en una alta concentración, pudiendo interferir en las medidas espectrofotométricas.

1.4.7 Actividad biológica presente en los extractos de nim. A partir de los estudios realizados a los extractos de la semilla y hojas del nim, se considera que hay más de 100 limonoides que podrían tener diferentes tipos de actividad biológica [35][36]. Entre las propiedades de los compuestos presentes en el nim se destaca su actividad insecticida y repelente, por sus usos en el control de plagas en el sector agroindustrial. Un ejemplo es el trabajo realizado por Venzon *et al.*, quienes evaluaron los efectos de los extractos de la semilla de nim en dos plagas comunes del cultivo del café, los minadores de hojas (*Leucoptera coffeella*) y el ácaro rojo del café (*Oligonychus ilicis*). Los resultados de las pruebas realizadas en plantas de invernadero, mostraron que en las hojas tratadas con 0,1 g/L de Azadiractina A (AZA), los huevos y las larvas no lograron desarrollarse hasta su estado adulto [37].

Los insecticidas se clasifican según la vía de penetración, el tiempo de acción, su naturaleza o modo de acción en el insecto [38]. Según la vía de penetración la acción de los insecticidas puede ser por ingestión, contacto o inhalación. Para evaluar la mortalidad por contacto se usa la técnica de impregnación de superficie. Kim *et al.*, probaron la actividad insecticida de 30 extractos y 5 aceites esenciales en la mortalidad, por contacto con superficie, de los adultos de *Sitophilus oryzae* (L.) (gorgojo del arroz). Encontraron que las respuestas variaron dependiendo del material vegetal y el tiempo de exposición, encontrándose una mortalidad de hasta el 90% con los extractos de *Acorus calamus* (cálamo aromático), después de 4 días de exposición [39].

Para evaluar la acción de los insecticidas por ingestión, generalmente en insectos que se alimentan de hojas, granos o sus derivados, se utiliza la metodología de impregnación de alimento o sustrato. Athanassious *et al.*, evaluaron el efecto insecticida del NeemAza[®], un insecticida comercial a base de nim, en adultos de

gorgojos del arroz, por impregnación de granos de centeno y avena. Los resultados mostraron un 100% de mortalidad después de 14 días de exposición, a concentraciones superiores de 100 ppm de NeemAzal®[40].

Otros autores evaluaron específicamente las propiedades insecticidas de la AZA. Tineet *al.* estudiaron la AZA en concentraciones subletales por aplicación tópica en adultos de *Blattaorientalis* L. (cucaracha), encontrando efectos tóxicos, además de una reducción significativa del contenido de los ovarios [41]. Nathanet *al.* evaluaron el efecto de la AZA en la mortalidad en hembras del saltamontes marrón (*Nilaparvatalugens*). Las pruebas por aplicación tópica en el área dorsal mostraron mortalidad en los insectos, estableciendo como concentraciones subletales $DL_{50} = 0,47$ ppm y $DL_{90} = 0,96$ ppm [42].

Para explicar el mecanismo de acción insecticida de los extractos del nim y específicamente de la AZA, diversos estudios han señalado que este compuesto estaría inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (AChE) [42][43]. La acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor en muchas sinapsis (colinérgicas) del sistema nervioso autónomo y de las conexiones neuromusculares de los insectos. Dado que la AChE degrada la ACh tras la estimulación del nervio, la inhibición de la AChE debido a la acción de un insecticida permite la acumulación de ACh, generando la sobre estimulación de los nervios del corazón, musculatura, ojos, glándulas, tracto gastrointestinal y sistema respiratorio, lo que al final conlleva a la muerte del insecto [44].

Los estudios anteriormente citados muestran el potencial que tienen los extractos del árbol de nim para ser usados como bioplaguicidas en el control de plagas de cultivos y granos almacenados, generando un impacto positivo al sector agroindustrial.

1.5 FORMULACIÓN DE INSECTICIDAS

La formulación es el proceso por el cual se logra obtener como prototipo la composición cuantitativa (fórmula) de un insecticida a escala de laboratorio, teniendo en cuenta su funcionalidad, su tiempo de vida útil y otras propiedades específicas. La formulación implica la asociación y mezcla de diversas materias primas de origen sintético o natural, entre las que se distinguen los principios activos, los coadyuvantes y aditivos [74].

Como fin último lo que se busca en la formulación es lograr tener un insecticida que tenga un alto nivel de eficacia, que sea de fácil uso, que sea seguro para el uso humano, que cumpla con las normas legales respectivas y que genere la menor contaminación ambiental, al mínimo costo. Este es un concepto que se ha venido utilizando en las últimas décadas, pues anteriormente se les daba gran importancia a factores técnicos y económicos, pasando por alto otros aspectos como los ambientales y su efecto en la salud humana. Los insecticidas como los organofosforados y órgano clorados, eran económicos y de fácil acceso, lo que en una primera etapa permitió aumentar la productividad del campo y controlar vectores de enfermedades. Sin embargo, ahora se sabe que estos insecticidas pueden permanecer durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente e incluso en los alimentos, bio acumulándose en las cadenas tróficas, generando grandes daños a la salud humana y los ecosistemas naturales[75].

Según el área de uso y la forma como se debe aplicar el insecticida, éste puede venir en diferentes presentaciones. Un ejemplo son los insecticidas aplicados en cultivos en el sector agrícola. Estos productos generalmente son aplicados mediante sistemas de aspersión directa, con lo cual se busca cubrir la mayor área del cultivo en el menor tiempo posible. Por lo anterior, para este caso se utilizan insecticidas líquidos a unas condiciones específicas de viscosidad, pues de lo contrario podría tapar las boquillas de los aspersores, ocasionando daños en los

equipos de fumigación. En la Tabla 2 se muestran algunas de las presentaciones más comunes de formulaciones.

Tabla 2. Presentaciones de formulaciones para los insecticidas comerciales más comunes.

Presentación	Descripción
Aerosol	Líquido contenido a presión en un recipiente el cual al accionar una válvula por el efecto de un propelente se dispersa en forma de finas gotas.
Concentrado emulsionable	Líquido homogéneo para ser aplicado como emulsión, luego de ser diluido en agua.
Concentrado soluble	Líquido homogéneo que, al ser diluido en agua, forma una solución verdadera del compuesto activo, pudiendo contener auxiliares de formulación insolubles.
Evaporable	Producto a base de activo(s) volátil(es), cuyos vapores se desprenden de modo controlado en el aire.
Fumígeno	Formulación combustible, generalmente sólida y condiferentes formas, la cual durante su combustión o ignición, libera la(s) sustancias(s) activa(s) en forma de humo.
Gel emulsionable	Formulación gelatinizada para ser aplicada como una emulsión en agua.
Granulado	Formulación sólida, uniforme, en forma de gránulos con dimensiones bien definidas, para aplicación directa.

Fuente: Moscardó, *et al.* [76]

1.6 PRINCIPIO ACTIVO

Son los compuestos, tanto de origen sintético o vegetal, que le dan las propiedades funcionales al producto. En el caso de los insecticidas, son los compuestos que tienen el efecto tóxico sobre los insectos. Los principios activos insecticidas se pueden clasificar, según su modo de acción, en tres grupos. En el primero se encuentran los insecticidas que actúan por contacto, por lo que el insecto debe entrar en contacto directo con el insecticida. Este tipo de productos generalmente vienen en forma líquida, para ser aplicados por pulverización sobre la superficie, con el fin de dejar una capa lo más uniforme posible. En el segundo grupo se encuentran los insecticidas que actúan por ingestión, los cuales deben ser consumidos por el insecto. Generalmente estos productos se presentan en forma sólida o semisólida, en combinación con un alimento atrayente para la plaga de interés. En el tercer grupo se encuentran los insecticidas que actúan por inhalación o fumigación. Estos insecticidas actúan cuando se encuentran en forma gaseosa, por lo que su presentación comercial, generalmente es en forma de sólidos o líquidos que, al ser aplicados, se volatilizan rápidamente[77].

1.7 COADYUVANTES

Son compuestos que pueden aumentar la acción tóxica y la efectividad del principio activo insecticida. Aunque estos compuestos por sí solos tengan poca o nula actividad biológica, cuando se mezclan con el principio activo hacen que éste aumente notoriamente en algunos casos su acción. Los coadyuvantes pueden actuar de forma física (humectantes y adhesivos) o bioquímica (acción sinérgica)[78].

1.7.1 Humectantes. Son compuestos que permiten reducir la tensión superficial de un producto líquido, permitiendo que éste se extienda sobre una superficie sólida de forma uniforme. Cuando se aplica un insecticida líquido por pulverización, al caer

sobre una superficie vegetal (hojas, granos, tallos, etc.), metálica, polimérica o cerámica, lo ideal es que se forme una película, que permita que los principios activos se extiendan de manera uniforme sobre ella. Sin embargo, en la mayoría de ocasiones las superficies tienen un carácter hidrófobo o están cubiertas por una capa cérea, que ocasiona que en lugar de una película se forme una dispersión de gotas, las cuales fácilmente por la acción de la gravedad o viento, se desprenden sin dejar ningún residuo sobre la superficie tratada[77].

Como una medida de la humectación de un líquido se toma el ángulo que se forma entre la tangente al arco del círculo máximo en uno de sus extremos con la superficie, el cual se denomina ángulo de contacto. Se considera que una buena humectación se logra cuando los valores angulares son menores a 90° . Además, otro factor a tener en cuenta para el caso de los insecticidas, es que la coraza de quitina de los insectos tiene un carácter hidrófobo, por lo que para logra el adecuado contacto entre el producto insecticida y el insecto, son muy importantes los humectantes. Entre los compuestos más empleados como humectantes, se encuentran los tensoactivos no iónicos y los alcoholes etoxilados.

1.7.2 Adhesivos. Son compuestos que fijan los principios activos insecticidas sobre una superficie. Debido a la acción del viento o el agua los insecticidas se pueden desprender de la superficie rápidamente, haciendo que el efecto del insecticida dure muy poco tiempo. No obstante, para que los compuestos hagan su efecto, al contacto con el insecto se debe desprender de la superficie, por lo que en la adherencia debe existir un balance[79].

Muchos agentes humectantes también actúan como agentes adhesivos, ya que al evaporarse el solvente, generalmente agua, estos forman una película, que ayuda también a disminuir la rápida evaporación de compuestos muy volátiles. Algunos de los compuestos adhesivos más utilizados son la caseína, las gomas, gelatinas, polímeros sintéticos y derivados de la celulosa[80].

1.7.3 Sinergistas. Son compuestos que refuerzan el poder insecticida, los cuales actúan mediante mecanismos bioquímicos aumentando el valor tóxico del producto. Actualmente se sabe que el modo de acción de muchos de los compuestos sinergistas es la inhibición de las enzimas oxidativas que degradan los compuestos insecticidas en el organismo de los insectos. Lo anterior debido a que algunos de los compuestos sinergistas tienen un parecido estructural con los principios activos, por lo que la inhibición es de tipo competitiva[77].

Sin embargo, una de las principales barreras para que puedan desarrollarse insecticidas comerciales a partir de extractos del nim, es la degradación que sufren algunos de sus principios activos, tanto durante el periodo de almacenamiento, como durante su periodo de uso. Cuando se utiliza el término estable en almacenamiento, se refiere a productos que no han perdido más del 20% de los compuestos activos después de un año de almacenamiento en anaquel a temperatura ambiente (25°C) [62]. Jarvis *et al.* encontraron que la estabilidad de la AZA se reduce sustancialmente por la presencia de disolventes próticos, como el agua y los ácidos. Sin embargo, una excepción que observaron los autores fue la estabilidad de la AZA en alcoholes, en los cuales la AZA se mostró muy estable, incluso en soluciones del 50% v/v de alcohol (etanol) en agua [63].

2. HIPÓTESIS

Mediante la adecuada extracción y caracterización de los compuestos activos presentes en las hojas del nim, es posible formular un bioplaguicida para el control del gorgojo del arroz, plaga de granos almacenados.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la formulación y un método de producción de un bioinsecticida a escala de laboratorio a partir de los extractos de las hojas de nim, para ser empleado en el control del gorgojo del arroz.

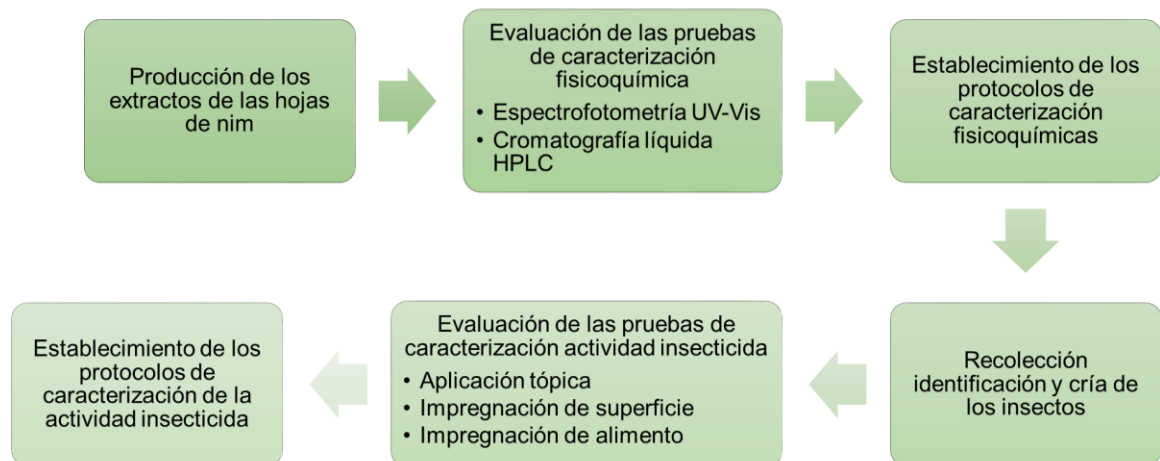
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer los protocolos que permitan la caracterización fisicoquímica y la determinación de la actividad biológica de los extractos y formulados de hoja de nim en el gorgojo del arroz.
- Evaluar métodos y solventes para la extracción de los compuestos de las hojas del nim, explorando diferentes condiciones de operación.
- Maximizar la azadiractina presente en los extractos de hoja de nim mediante la modificación de los parámetros de extracción utilizando el mejor método establecido.
- Evaluar diferentes métodos de purificación y refinación de los extractos, que permitan mejorar su calidad.
- Formular un bioinsecticida para el control de *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz) a partir de los extractos de la hoja del nim.

4. ESTABLECIMIENTO DE LOS PROTOCOLOS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y FORMULADOS INSECTICIDAS ELABORADOS A PARTIR DE LAS HOJAS DE NIM

4.1 METODOLOGÍA

Figura 6. Metodología general para el establecimiento de los protocolos de caracterización de los extractos y formulados insecticidas elaborados a partir de las hojas de nim.



4.1.1 Reactivos, materiales y solventes. Para las extracciones se utilizó etanol industrial ($\approx 96\%$) suministrado por Zumotec S.A. y hexano ($> 99,9\%$, Merck). Como estándares y patrones se emplearon limoneno ($\approx 97\%$, Sigma Aldrich), Azadirachtina (AZA) ($> 95\%$, Sigma Aldrich), ácido tánico ($> 99,9\%$, Sigma Aldrich), α -terpineol ($> 97\%$, Sigma Aldrich) y α -pineno ($> 97\%$, Sigma Aldrich). Como fase móvil para HPLC se usaron agua (tipo I (ultrapura) Milli-Q) y acetonitrilo (grado HPLC, Sigma Aldrich). Para los controles positivos de las pruebas biológicas se usaron los insecticidas sintéticos malatión (MAL) ($> 98\%$, Merck) y deltametrina (DEL) ($> 99,9\%$, Merck). Las hojas de nim fueron recolectadas y suministradas por

Zumotec S.A, provenientes de árboles con más de tres años de haber sido plantados en la zona del Magdalena Medio (Santander, Colombia).

4.1.2 Producción de los extractos de hoja de nim. Los extractos se prepararon por maceración, con hexano y etanol, según la metodología propuesta por Liauwet *al.* [73]. Los extractos fueron preparados mezclando el polvo de hoja de nim con cada uno de los solventes por separado, en recipientes ámbar de 25 mL en una relación de 30% peso de hoja/volumen de solvente. El tiempo de extracción fue de 24 h a temperatura ambiente en reposo. Posteriormente los extractos fueron filtrados utilizando papel filtro de 0,45 μm con el fin de retirar el material vegetal y se llevaron a sequedad mediante rotoevaporación, quedando un sólido de color oscuro al cual se le denomina extracto (E). Este sólido fue rediluido hasta una concentración de 3% p/v en etanol. A continuación, las muestras fueron filtradas en un filtro de jeringa, con un tamaño de poro de 0,45 μm y se almacenaron en viales a una temperatura de 2°C hasta su posterior análisis.

4.1.3 Evaluación de los métodos de caracterización fisicoquímica. Para la caracterización fisicoquímica se evaluaron dos métodos: cromatografía líquida HPLC y espectrofotometría UV-Vis.

4.1.3.1 Evaluación del método de caracterización fisicoquímica por HPLC. Para la determinación del método cromatográfico se partió de lo propuesto por Thejavathi, R. *et al* [49]. El equipo usado es un cromatógrafo líquido de alta resolución de Agilent Technologies, modelo 1100, con inyector automático, bomba cuaternaria y un detector DAD. Para la separación se usó la columna Zorbax C-18 (Agilent, 250 x 4,6 mm), el volumen de inyección fue de 10 μL de muestra y la lectura se realizó a 214 nm. El flujo de la fase móvil fue 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 pico que quedara de la muestra anterior. El software utilizado para el análisis fue Chem Station B.01.03.

Como estándar interno se seleccionaron tres patrones (limoneno, α -terpineol y α -pineno), debido a que en la revisión bibliográfica se encontró que tenían similitud espectral con los compuestos de interés (ya que absorben a 214 nm) y no se encontraban presentes en la muestra, dos características primordiales que debe cumplir el estándar interno. Para ello se inyectaron al cromatógrafo soluciones de AZA (0,5 mg/mL) y de cada uno de los compuestos (0,6 mg/mL), diluidos en etanol, con el fin de identificar los tiempos de retención. A continuación, se inyectaron los extractos rediluidos al 3% en etanol, con el fin de establecer los tiempos de retención y la repuesta de la señal de los compuestos obtenidos de la hoja de nim. A partir de estos datos se estableció el estándar interno más apropiado para esta separación.

Una vez seleccionado el estándar interno, se prepararon 6 soluciones de AZA (0,35%, 0,76%, 1,17%, 1,58% y 2% p/p) en etanol y se agregó una cantidad (2% p/p) igual del compuesto elegido como estándar interno a cada una. Las muestras fueron inyectadas al cromatógrafo y a partir de la relación entre el área de la AZA y el estándar interno, se construyó la curva de calibración.

4.1.3.2 Evaluación del método de caracterización fisicoquímica por espectrofotometría UV-Vis. Para las pruebas espectrofotométricas se utilizó un espectrofotómetro ultravioleta visible Shimadzu UV-2401 PC, operando a una resolución de 1 nm. Se usó una celda de cuarzo de 10 mm. Para la caracterización de los extractos por espectrofotometría UV-Vis, se utilizó la metodología de Dai *et al.*[81]: a una solución de 0,7 mL de extracto de hoja de nim o estándar en etanol, se le adicionó 0,2 mL de una mezcla de vainillina en metanol (0,02 mg/mL). Después de agitar manualmente, la mezcla se dejó a temperatura ambiente por 2 min. Posteriormente se adicionó ácido sulfúrico concentrado (0,3 mL al 98% p/p) en tres alícuotas de 0,1 mL cada una, y se agitó la mezcla por 10 segundos después de

cada adición, formándose dos capas. A continuación, se agregaron 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 compuesto patrón o extracto añadido.

Para hacer la cuantificación de compuestos por espectrofotometría se utiliza la ley de Beer-Lambert, la cual establece que, para las mezclas, como es el caso de los extractos, la absorbancia total a cualquier longitud de onda será la suma de las absorbancias de cada uno de los compuestos, asumiendo que no hay interacciones entre ellos (Ecuación 1).

Ecuación 1. Ley Beer-Lambert de para mezclas de compuestos

$$A_i = \varepsilon C_i l$$

$$A_{\text{mezcla}} = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \varepsilon C_i l$$

Donde:

A_i = absorbancia del compuesto a una determinada longitud de onda

ε = coeficiente de absorción

C_i = la concentración del compuesto a una determinada longitud de onda

l = longitud atravesada por la luz

A_{mezcla} = absorbancia total de la mezcla a una determinada longitud de onda

Dai *et al.* proponen que en los extractos existen terpenos simples, limonoides y taninos [81]. Por lo anterior para la cuantificación de estos grupos de compuestos, se emplearon patrones de limoneno, AZA y ácido tánico, respectivamente, como moléculas modelo representativas de los extractos reales. Para determinar la

longitud de onda a la cual las muestras debían ser leídas, se hizo un barrido desde 200 nm hasta 800 nm. A continuación, se prepararon 6 diluciones para la AZA (0,02, 0,17, 0,33, 0,48, 0,64 y 0,8 mg/mL), para el limoneno (0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,10 y 0,12 mg/mL) y para el ácido tánico (0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 y 0,06 mg/mL) en etanol para todos los casos, y se registró el valor de la absorbancia para la longitud de onda seleccionada para cada compuesto. Con estos datos se construyeron las curvas de calibración para cada compuesto. Por último, para evaluar y validar el método se analizó la concentración de los compuestos en los extractos de la hoja de nim.

4.1.4 Evaluación de los métodos de caracterización de la actividad insecticida.

4.1.4.1. Material entomológico para los ensayos de mortalidad. 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 con mayor persistencia. Se recolectaron muestras y se identificaron los ejemplares colectados, según sus características taxonómicas, confirmando que la especie era *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz). Para esto se consultó un especialista en coleóptera profesor Germano Henrique Rosado-Neto y se visitó la colección entomológica de referencia del Museo Padre Jesus Santiago Moure de la Universidade Federal do Paraná, en Curitiba, Paraná, Brasil.

La colonia del gorgojo se estableció en el Laboratorio del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander (UIS). Para establecer la generación inicial (F_0) de individuos se seleccionaron al azar 400 ejemplares, sin sexar, los cuales fueron separados en grupos de 80 individuos, colocados en recipientes plásticos de 150 mL, con 50 g de arroz y tapados con tela 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. Se llevó a cabo un monitoreo cada 8 días separando los

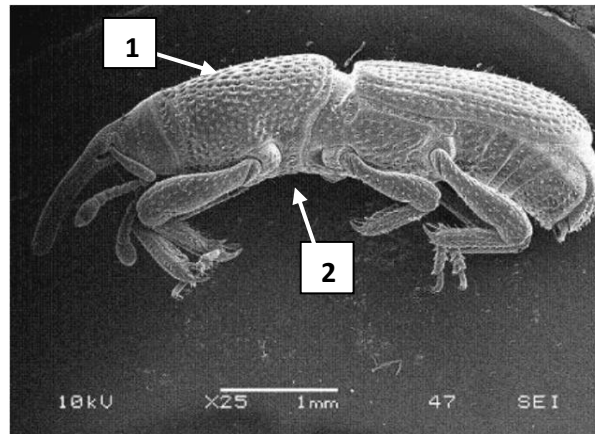
individuos del arroz para ser depositados en un nuevo recipiente con las mismas condiciones al anterior, permitiendo así que los huevos depositados en el arroz del primer recipiente pasen a adultos; buscando utilizar adultos jóvenes, sanos y de una misma edad en los ensayos de mortalidad.

Para la caracterización de la actividad insecticida de los extractos en estos individuos se evaluaron tres métodos: aplicación tópica, impregnación de superficie y de alimento.

4.1.4.2 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por aplicación tópica. Para ello se utilizó el protocolo propuesto por Liu y Ho modificado [82]. Se seleccionaron gorgojos del arroz adultos, sin sexar, los cuales fueron tratados tópicamente en la zona dorsal o ventral (Figura7), con los extractos rediluidos al 3% de las hojas de nimenetanol al 96% (Control (-)). Además, se utilizaron malatión (MAL) y deltametrina (DEL) al 0,02% p/v como controles positivos, pues son insecticidas usualmente usados para el control de este tipo de plagas en los graneros.

Se aplicó 1 μ L de los tratamientos, en cada uno de los insectos, con una microjeringa Hamilton de 5 μ L, provista de descargador repetitivo. Para los extractos se utilizó una concentración del 3% p/v y para los insecticidas 0,02% p/v en etanol para los dos casos. Para los controles se empleó etanol al 96%. Los experimentos se realizaron en total en nueve réplicas, siendo que en cada tratamiento se usaron 36 individuos. Cada bioensayo se realizó por triplicado en días diferentes. Después del tratamiento, los gorgojos se colocaron en vasos plásticos de 1/2 onza, con 0,05 g de alimento (arroz) y fueron cubiertos con tapas perforadas que permitían la respiración. El registro de mortalidad se realizó a las 72, 96 y 144 h postratamiento.

Figura 7. Zona de topicación dorsal (1) y ventral (2) en el gorgojo del arroz



Fuente: Dinuta *et al.* [83]

4.1.4.3 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por impregnación de superficie. 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 μ L de los extractos, insecticidas comerciales y los controles. Para los extractos se utilizó una concentración del 3% p/v y para los insecticidas 0,02% p/v en etanol para los dos casos. Para los controles se empleó etanol al 96%. Los tratamientos se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 minutos. A continuación, fueron introducidos 4 gorgojos por tarro, con 0,05 g de alimento (arroz) y se cerraron con una malla que permitía el intercambio de gases con el exterior. Los experimentos se realizaron en total en nueve réplicas, siendo que en cada tratamiento se usaron 36 individuos. Cada bioensayo se realizó por triplicado en días diferentes. El registro de mortalidad se realizó a las 72, 96 y 144 hpostratamiento.

4.1.4.4 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por impregnación de alimento. A partir de la metodología propuesta por Stadler, para la normalización de las variables ecofisiológicas durante el

desarrollo del gorgojo del arroz, se propuso una nueva metodología, para evaluar el efecto de los tratamientos por ingestión en la misma especie [84]. Para los ensayos de impregnación de alimento 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. Empleando una jeringa de extrusión se obtuvieron pellets con un tamaño de 5 mm x 10 mm aproximadamente. Los pellets se llevaron a un secador hasta que se obtuvo una humedad promedio del 12%. A cada uno se le aplicó 100 μ L y se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 minutos. Para los extractos se utilizó una concentración del 3% p/v y para los insecticidas 0,02% p/v en etanol para los dos casos. Para los controles se empleó etanol al 96%. Para las pruebas se colocó un pellet por insecto. Seguidamente se colocaron 4 gorgojos y los pellets con tratamiento en un vaso plástico de 1/2 onza el cual fue cubierto con una tapa perforada que permitía la respiración. Los experimentos se realizaron en total nueve réplicas, siendo que en cada tratamiento se usaron 36 individuos. Cada bioensayo se realizó por triplicado en días diferentes. El registro de mortalidad se realizó a las 72, 96 y 144 h postratamiento.

4.1.5 Análisis estadístico de los datos. 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) mediante el programa estadístico STATISTIC 11. De acuerdo al valor P se infirió un nivel de confianza del 95% sobre las variables de respuesta.

Para todos los bioensayos el porcentaje de mortalidad (%M) se calculó con la ecuación de Abbott, la cual sustrae a la mortalidad observada en el tratamiento ($M_{tratamiento}$), la mortalidad que se presenta en el control negativo ($M_{control}$), lo cual permite cuantificar la actividad real del insecticida, eliminando cualquier clase de interferencias ambientales o errores de manipulación (Ecuación 2) [85].

Ecuación 2. Ecuación de Abbott

$$\%M = \frac{M_{\text{tratamiento}} - M_{\text{control}}}{100 - M_{\text{control}}} \times 100$$

4.1.6 Elección de los protocolos de caracterización fisicoquímica y de actividad insecticida. A partir de los datos obtenidos de la evaluación de los diferentes métodos de caracterización, se construyeron tablas comparativas para cada uno. Las variables que se presentan en las tablas, fueron tomadas como criterios de selección de los protocolos para la caracterización fisicoquímica y de actividad insecticida, de los extractos, extractos purificados y formulados, en los capítulos subsiguientes.

4.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

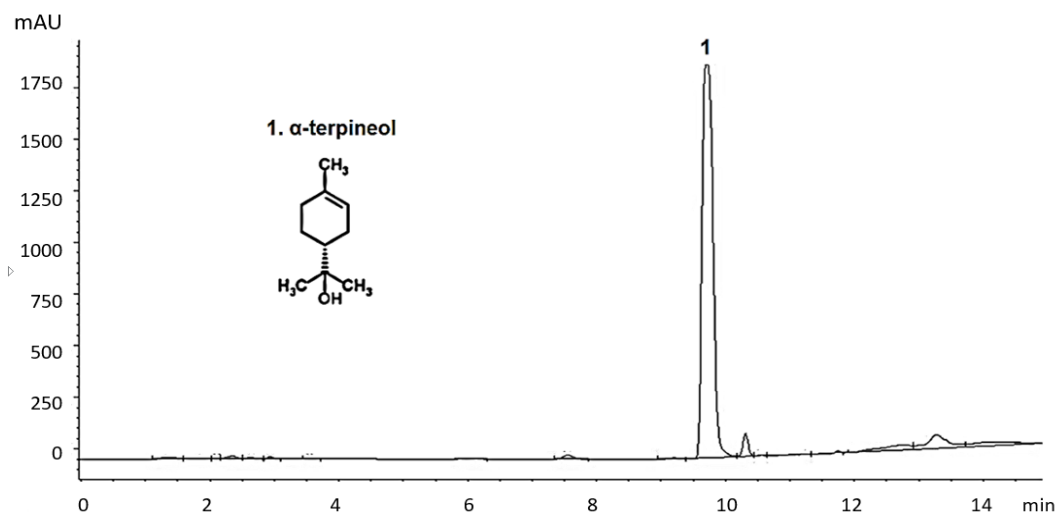
4.2.1 Elección del estándar interno para HPLC. La elección del estándar interno para HPLC es complicada, debido a que el compuesto debe tener propiedades cromatográficas y espectrales similares con los compuestos que se quieren analizar, pero no debe estar naturalmente presente en las muestras. Los compuestos presentes en los extractos del nim son terpenos de gran tamaño (tetranortriterpenos), altamente oxigenados, propios de la familia *Meliaceae*[86].

Esta especificidad de los compuestos, sumado al poco desarrollo que hay en su aislamiento, hace que sea difícil encontrar estándares de compuestos diferentes a los que tiene la planta de nim. No obstante, terpenos de menor tamaño, comunes en aceites esenciales de plantas aromáticas, presentan similaridad espectral (absorben entre 210 nm y 230 nm) con la AZA[87].

Por lo anterior se seleccionaron tres candidatos que cumplieran este requisito como posibles estándares internos: limoneno, α -terpineol y α -pineno. Al ser analizados por HPLC a las condiciones estándar, se encontró que el único que se retenía en la

columna era el α -terpineol a un tiempo de 9,9 minutos, tal como se muestra en la Figura 8. Lo anterior puede explicarse por la afinidad que tienen los grupos OH del compuesto con la fase estacionaria de la columna C-18 (sílice).

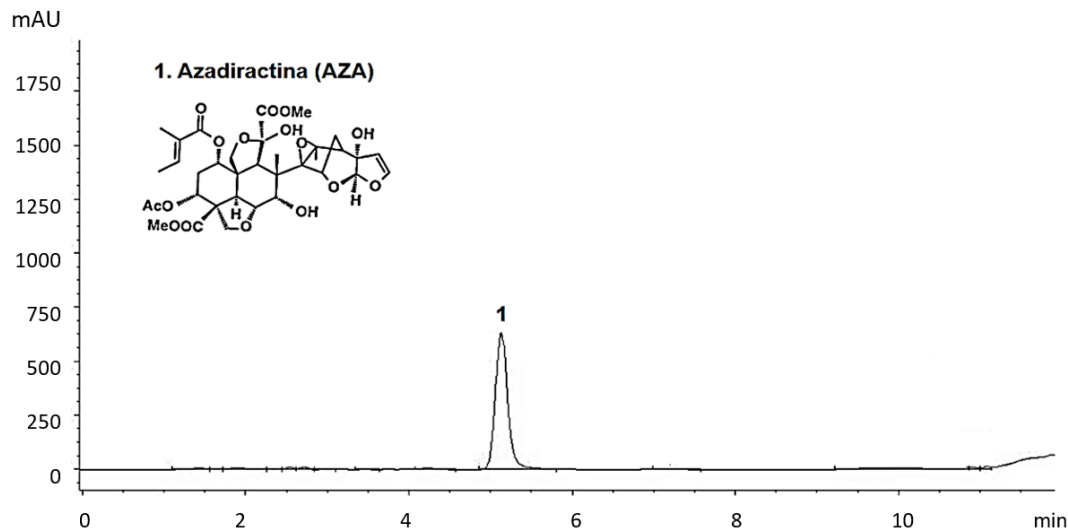
Figura 8. Cromatograma del estándar de α -terpineol a 214 nm, con un detector DAD, una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua a un flujo de 1 mL/min.



Fuente: Guerrero[88]

Para que un compuesto pueda ser utilizado como estándar interno, no debe solaparse con los compuestos de interés, ni con los otros compuestos de la muestra, pues esto genera interferencias que afectan la cuantificación. En la Figura 9 se observa el cromatograma del estándar de AZA, el cual eluye a un tiempo de 5,1 minutos. Cuando se compara con el tiempo de retención del α -terpineol se observa que los picos están separados, pero que esta separación es de apenas 4,8 minutos, lo que permite hacer una adecuada cuantificación del analito, sin que los tiempos de corrida sean muy extensos, lo cual facilita el análisis de las muestras.

Figura 9. Cromatograma del estándar de AZA a 214 nm, obtenido con un detector DAD, una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua a un flujo de 1 mL/min.



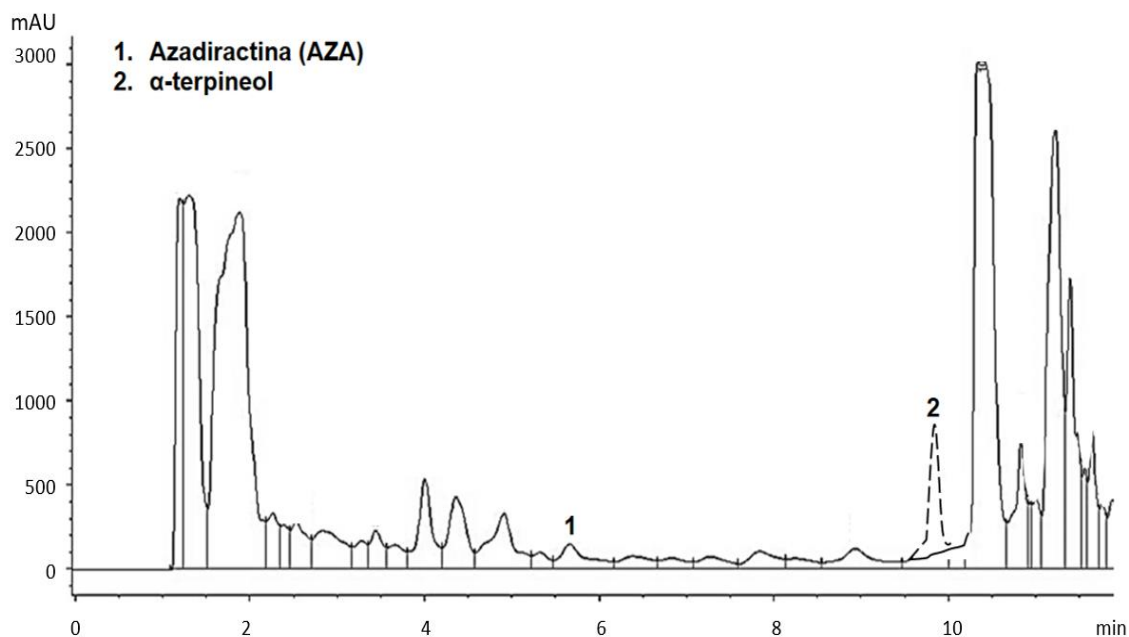
Fuente: Guerrero[88]

En la Figura10 se observa el cromatograma obtenido a 214nm del extracto etanólico de las hojas de nim. Se aprecia que, para en este extracto no eluyen otros compuestos en el mismo tiempo de retención del α -terpineol. También es importante esta respuesta pues debido a que la AZA tiene una estructura y respuesta espectral similar a otros limonoides, se podría usar el α -terpineol como estándar interno para su cuantificación.

Los resultados anteriores muestran que el α -terpineol es un compuesto idóneo para ser usado como estándar interno para la cuantificación de la AZA por HPLC, utilizando una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua, debido a que absorbe a 214 nm, tiene una respuesta similar y se retiene en la columna C18 a un tiempo diferente a otros compuestos presentes en el extracto, los cuales son requisitos necesarios para la cuantificación del compuesto de interés relativo al estándar interno. De igual forma, si se identifican otros limonoides presentes en los

extractos, por técnicas como HPLC acoplado a masas, se podría hacer su cuantificación por este método.

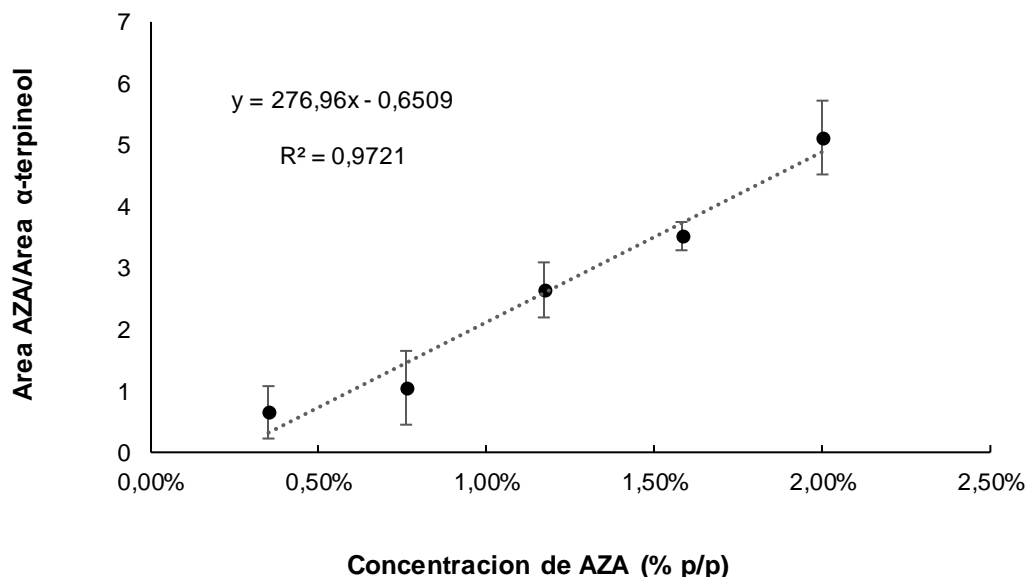
Figura 10. Cromatograma a $\lambda = 214$ nm del extracto etanólico obtenido por maceración de las hojas del nim (—) y utilizando α -terpineol como estándar interno (- - -), con un detector DAD, una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua a un flujo de 1 mL/min.



Fuente: Guerrero[88]

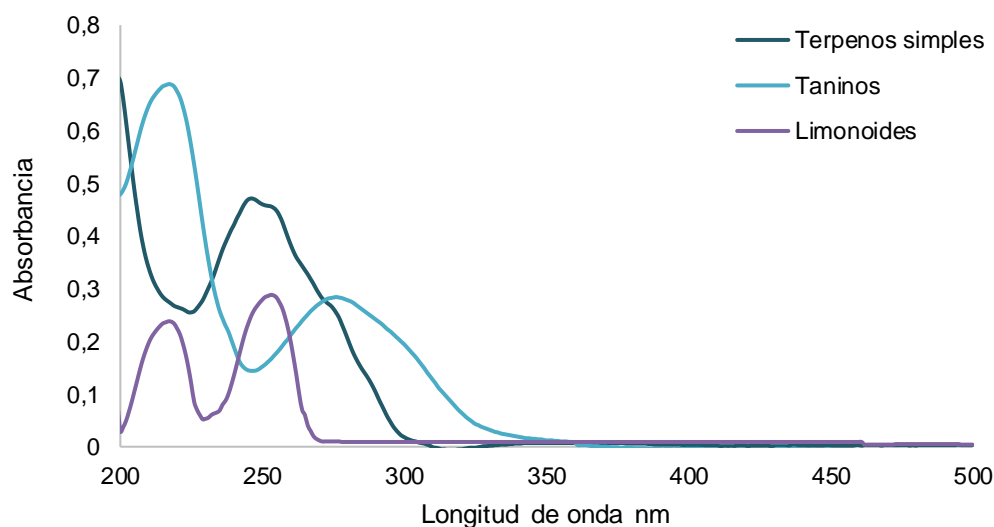
4.2.2 Obtención de la curva de calibración y cuantificación de la AZA en los extractos por HPLC. En la Figura 11 se observa la curva de calibración obtenida para la cuantificación de AZA, utilizando α -terpineol como estándar interno por HPLC. Se observa que el parámetro $R^2 = 0,9721$, lo cual indica que la curva se ajusta bastante bien a los datos experimentales validando el modelo matemático para establecer la concentración de la AZA en las muestras, el cual es válido en un intervalo de concentraciones de 0,5% a 2,5% p/p de AZA/extracto.

Figura 11. Curva de calibración para diferentes concentraciones de AZA/ α -terpineol obtenida por HPLC a una longitud de onda de 214 nm, equipado con un detector DAD, una columna C18 y una fase móvil de acetonitrilo/agua a un flujo de 1 mL/min.



4.2.3 Evaluación del método de caracterización fisicoquímica por espectrofotometría UV-Vis. En la Figura 12 se presentan los espectros de absorción de AZA, ácido tánico y limoneno, los cuales fueron utilizados como patrones para la cuantificación de limonoides, taninos y terpenos simples, respectivamente. Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Dai *et al.*, en los cuales los picos de absorbancia se encuentran en longitudes de onda en el rango visible del espectro, mientras que los obtenidos en este trabajo estaban en el ultravioleta, a pesar que se utilizaron patrones, solventes y métodos de preparación de las muestras idénticos a los empleados por los autores [47].

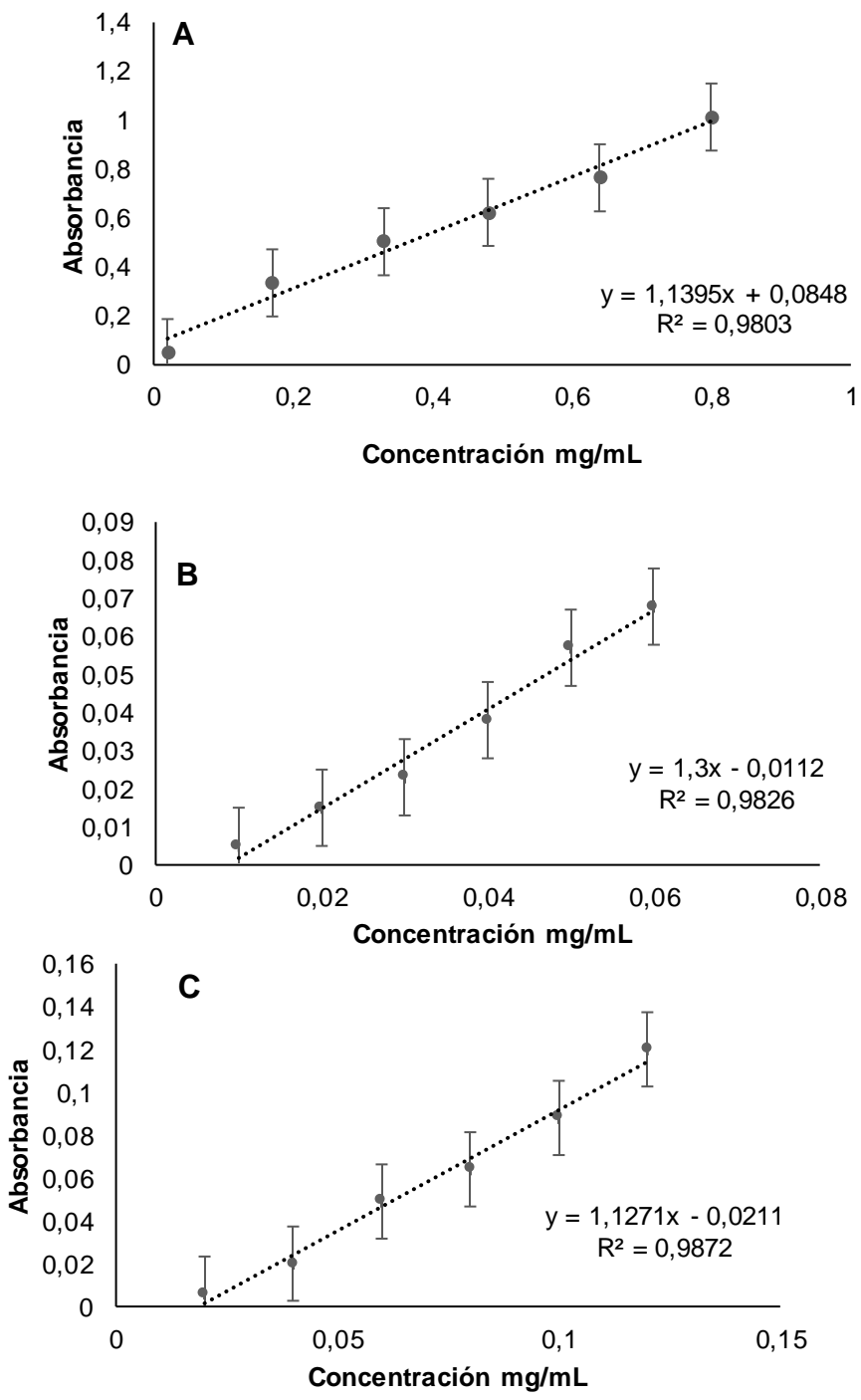
Figura 12. Longitud de onda vs Absorbancia de Aza (limonoides), ácido tánico (taninos) y limonenos (terpenos simples), mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando una cubeta de cuarzo de 10 mm.



Fuente: Guerrero[88]

A partir de los resultados se propusieron otras longitudes de onda diferentes a la literatura, en el rango UV del espectro. Estas longitudes de onda fueron: para los limonoides (con respecto a AZA) de 255 nm, para los taninos (con respecto al ácido tánico) de 221 nm y para los terpenos simples (con respecto al limoneno) de 250 nm. Tomando lectura a las longitudes de onda antes establecidas, se trazaron las curvas de calibración para cada uno, tal como se muestra en la Figura 13, con base en la ley de Beer-Lambert (Ecuación 1). Tal como se observa en la Figura, las curvas para los tres compuestos tienen un buen ajuste lineal, por lo que podrían emplearse para la cuantificación de estos compuestos cuando se encuentran puros.

Figura 13. Curvas de calibración de limonoides (AZA) (A), taninos (Ácidotánico) (B) y terpenos simples (limoneno) (C)



Fuente: Guerrero[88].

A partir de las curvas de calibración y de la ley de Beer-Lambert, se obtuvieron las ecuaciones para la absorbancia para los compuestos analizados. Con estos resultados y siguiendo la metodología de Dai *et al.* se obtuvo un modelo matemático multivariable, tal como se muestra en la Ecuación 3.

Ecuación 3. Modelo matemático multivariable a partir de la ley de Beer-Lambert, para la cuantificación de limonoides (Li), terpenos simples (Ts) y taninos (Ta), en los extractos de nim (E)

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

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

$$C = \begin{bmatrix} C_{Li} \\ C_{Ts} \\ C_{Ta} \end{bmatrix} \varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_{\lambda 1}^{Li} & \varepsilon_{\lambda 1}^{Ts} & \varepsilon_{\lambda 1}^{Ta} \\ \varepsilon_{\lambda 2}^{Li} & \varepsilon_{\lambda 2}^{Ts} & \varepsilon_{\lambda 2}^{Ta} \\ \varepsilon_{\lambda 3}^{Li} & \varepsilon_{\lambda 3}^{Ts} & \varepsilon_{\lambda 3}^{Ta} \end{bmatrix} \quad A = \begin{bmatrix} A_{\lambda 1}^E \\ A_{\lambda 2}^E \\ A_{\lambda 3}^E \end{bmatrix}$$

Donde:

ε = coeficiente de absorbancia

C = concentración del compuesto en el extracto

A = absorbancia del extracto medida a una determinada longitud de onda

$\lambda 1$ = longitud de onda de la Azadiractina como referencia para limonoides (Li)

$\lambda 2$ = longitud de onda del limoneno como referencia para terpenos simples (Ts)

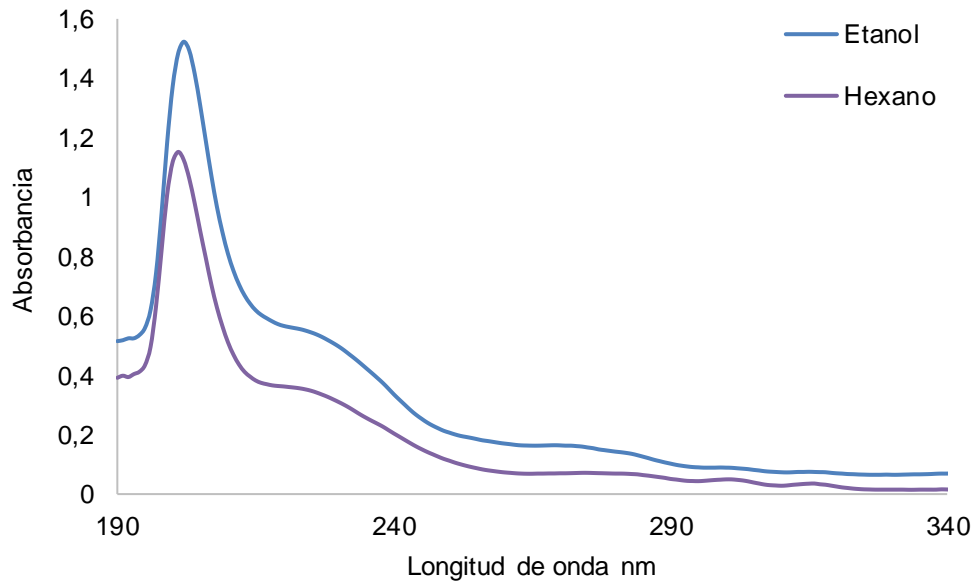
$\lambda 3$ = longitud de onda para Taninos (Ta)

E = extracto de hoja de nim

A continuación, se obtuvieron los espectros de los extractos etanólicos y hexanoicos de las hojas del nim, tal como se muestran en la Figura 14. Con estos valores de absorbancia, utilizando el modelo matemático multivariable (Ecuación 3), se

encontraron los valores de concentración de cada uno de los compuestos que se muestran en la Tabla 3.

Figura 14. Longitud de onda vs Absorbancia de los extractos etanólicos y hexanoicos de la hoja de nim.



Fuente: Guerrero[88]

Tabla 3. Concentración de limonoides, terpenos simples y taninos, en los extractos etanólicos y hexanoicos del nim, utilizando el modelo matemático multivariable según la metodología propuesta por Dai *et al.*

Concentración [mg/ml]	Extracto etanólico	Extracto hexanoico
Limonoides	0.221	0.214
Terpenos simples	0.001	-0.014
Taninos	0.008	0.005

Tal como se observa en la Tabla 3, las concentraciones que se obtienen por el modelo matemático para los compuestos seleccionados, son incongruentes. La base principal para la cuantificación por medio de este método es tener estándares que tengan similitud de todos los compuestos presentes en los extractos, es decir que absorban en el mismo rango del espectro. El error que se observa en los datos del modelo, se puede deber a que se parte de la premisa que los extractos están compuestos por limonoides, taninos y terpenos simples. No obstante, si hay presencia de otros compuestos que también estén absorbiendo a esas mismas longitudes de onda, se generan interferencias, que no permiten que el modelo matemático prediga de forma adecuada la concentración de los compuestos. Como se muestra en los artículos, para los extractos de semilla del nim, que es la base del método planteado por Dai *et al.*, el modelo permite predecir las concentraciones de los compuestos. Pero para el caso de los extractos de la hoja de nim, el modelo no tiene un buen ajuste, debido posiblemente a la presencia de otros compuestos, que generan interferencia y no permiten hacer una cuantificación de los compuestos de interés con este método.

4.2.4 Elección del protocolo de caracterización fisicoquímica. En la Tabla 4 se observa la comparación entre los métodos de caracterización por HPLC y por espectrofotometría UV-Vis.

Tabla 4. Comparación métodos de caracterización fisicoquímicos por HPLC y espectrofotometría UV-Vis

Método analítico	Compuestos que permite analizar	Tipo de análisis	Tiempo de preparación y análisis por muestra
HPLC	AZA	Cuantitativo	14 min
UV-Vis	Limonoides, taninos y terpenos simples	Cualitativo	10 min

El método de espectrofotometría UV-Vis se basa en la absorbancia mostrada por los patrones de sustancias similares a todos los compuestos presentes en la mezcla. Según la literatura consultada, los compuestos serían los terpenos simples (limoneno), los taninos (ácido tánico) y los limonoides (AZA). Sin embargo, cuando se midieron los extractos de hoja de nim, se encontró que el modelo matemático no predecía las concentraciones reales de estos compuestos. Esto debido a que la hoja de nim contiene otras sustancias diferentes a las de los extractos elaborados a partir de la semilla, por lo que este método no sería adecuado para la cuantificación de las sustancias de interés presentes en los extractos de esta investigación.

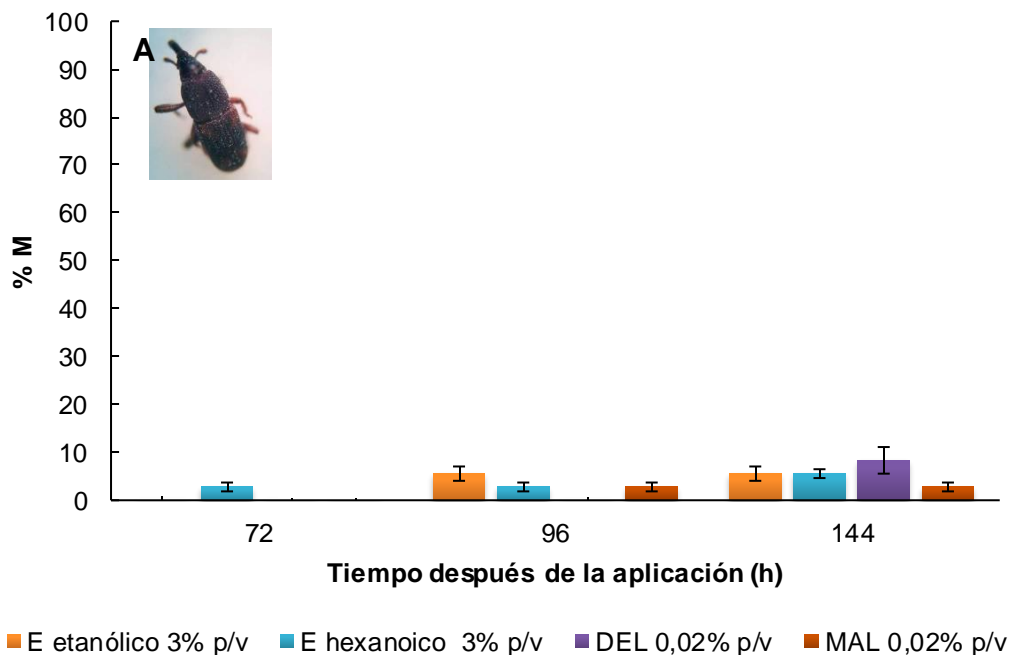
Además, otro método evaluado fue el de HPLC. Este método separa los compuestos de la mezcla, permitiendo analizar cada uno de ellos de forma individual. Debido a que únicamente existía un patrón con alto grado de pureza para la AZA (>90%), sólo para esta sustancia fue posible identificar su tiempo de retención y realizar su cuantificación, a un intervalo de concentraciones entre 0,5 y 2,5% p/p. Aunque otros compuestos con actividad biológica e insecticida pueden estar presentes en los extractos del nim, según autores como Tomé *et al.* establecen que la AZA es el compuesto que posee mayor actividad, por lo que se ha convertido en el referente de la calidad para la medición de la efectividad de los extractos y los productos insecticidas comerciales elaborados a partir de los mismos[89]. Por esta razón, se escogió el método de caracterización por HPLC para la caracterización fisicoquímica del principio activo presente en los extractos de hoja de nim y los formulados que con ellos se elaboraron.

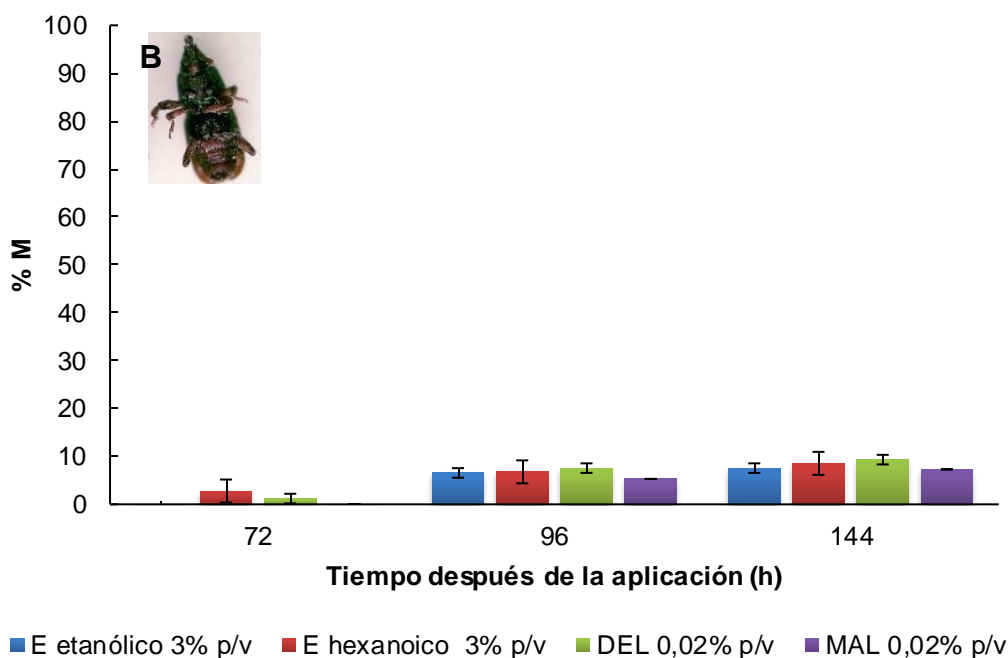
4.2.5 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por aplicación tópica. En la Figura 15 se presentan los resultados de la prueba de mortalidad del gorgojo del arroz por la aplicación tópica de los tratamientos en la zona dorsal y ventral, con respecto al tiempo después de la aplicación. Se observa que la mortalidad en las primeras horas es muy baja para todos los tratamientos, en ambas zonas de aplicación, donde se evidencia que sólo

hasta después de 96 h se presenta actividad insecticida, la cual es inferior al 10% incluso para los insecticidas convencionales. El test de Shapiro-Wilk revela que los datos no presentan una distribución normal ($W=0,819$, $p=0,004$), por lo que se aplica el test de Kruskal-Wallis, que muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos a las diferentes horas.

Los resultados muestran que por aplicación tópica los compuestos insecticidas tienen una baja actividad, lo cual se puede deber principalmente a que la cutícula en estas zonas, en especial para el gorgojo del arroz, son gruesas y endurecidas (muy esclerotizadas), ofreciendo una barrera física a la entrada de sustancias químicas que puedan afectar al insecto [90].

Figura 15. % M contra Tiempo después de la aplicación (h): zona dorsal (A) y ventral (B) en el gorgojo del arroz. $T=25^{\circ}\text{C}$ y $\text{HR}= 94\%$

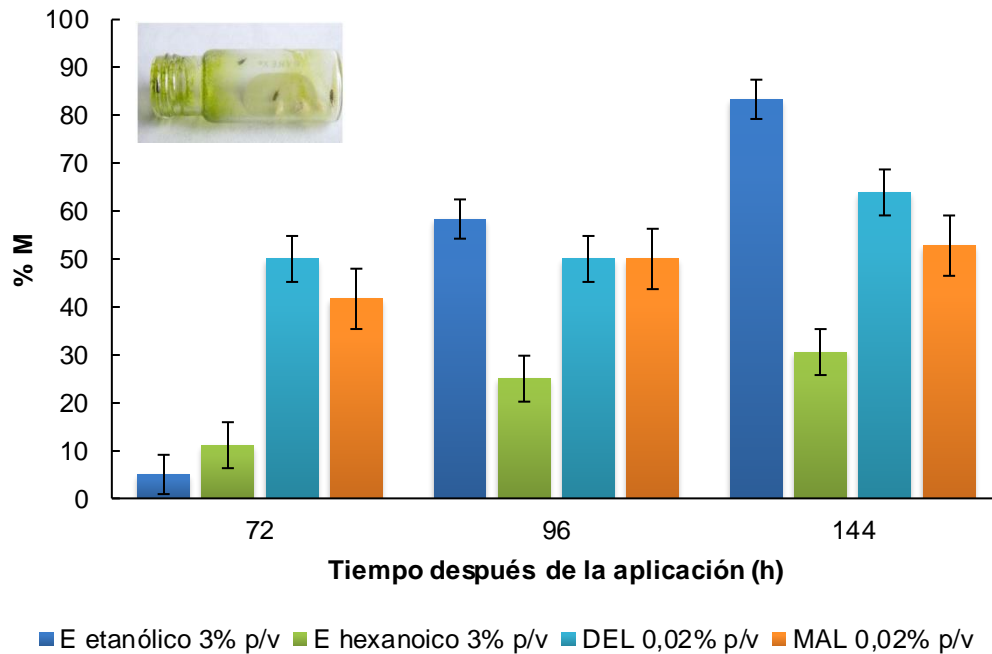




Otros autores han reportado resultados similares a los obtenidos en esta investigación. Pungitore *et al.* evaluaron la mortalidad en gorgojos del arroz, provocada por triterpenos extraídos de una planta autóctona de la pampa argentina, llamada rama blanca (*Junellia aspera*), encontrando mortalidad por ingestión, más no por aplicación tópica [91]. Lo anterior confirma que por esta ruta existe una mayor resistencia a la entrada de sustancias insecticidas, debido a barreras anatómicas propias del insecto, lo que no permite evaluar de manera adecuada la actividad tóxica que puedan tener los compuestos en el organismo del gorgojo.

4.2.6 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por impregnación de superficie. La Figura 16 ilustra los resultados de mortalidad del gorgojo del arroz por impregnación de superficie no porosa, contra el tiempo después de la aplicación de los tratamientos.

Figura 16. % M contra Tiempo después de la aplicación de los tratamientos por impregnación sobre la superficie no porosa. T=25°C y HR= 94%.



Fuente: Guerrero, 2016.

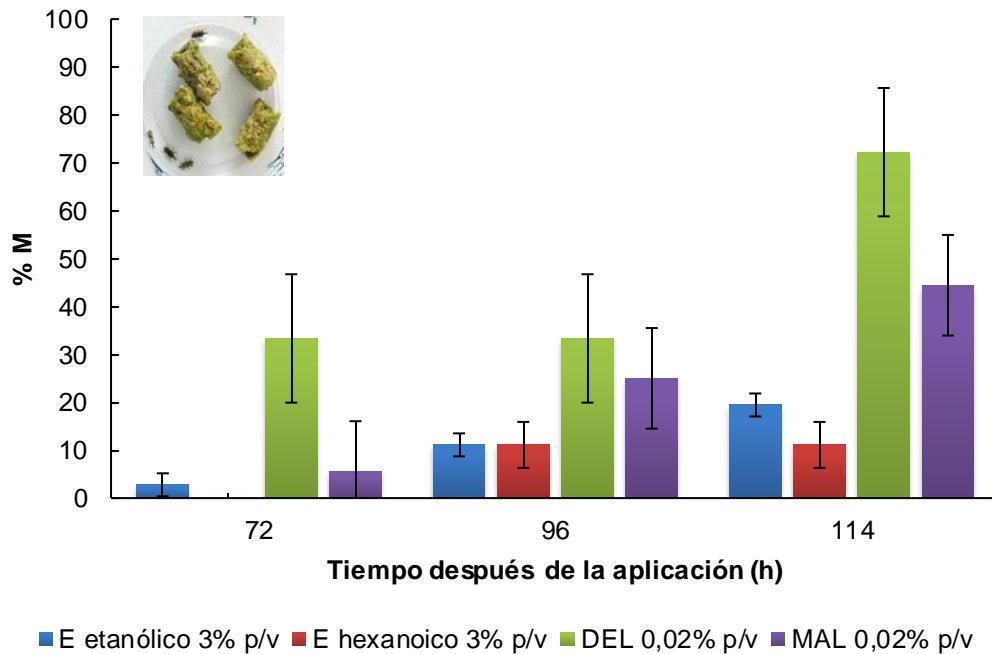
En la Figura 16 se observa que todos los tratamientos presentan mortalidad, obteniéndose la mayor a 144 h para el extracto etanólico con un $83,3\% \pm 4,1$. Para los insecticidas comerciales se ve que el tiempo de respuesta inicial es corto, pues a las 72 h ya se ha alcanzado casi el total de la mortalidad (MAL= $52,7\% \pm 6,1$ y DEL= $63,8\% \pm 4,8$); en cambio los extractos comienzan a tener una actividad insecticida significativa después de las 96 h de aplicación. Este tiempo de respuesta se puede deber al modo de acción de los mismos, pues los insecticidas convencionales son moléculas más volátiles que los limonoides del nim y presentan un efecto fumigante, por lo que es posible que además de la absorción por las extremidades, también estén ingresando por la respiración, cuyo efecto es mucho más rápido que la absorción.

El test de Shapiro-Wilk revela que los datos no presentan distribución normal ($W=0,8899$, $p=0,055$), por lo que se aplica el test de Kruskal-Wallis, mostrando que sólo hay diferencias significativas entre el % M del extractoetanólico a 144 h con el que se da a 72 h ($p=0,0178$), lo cual indica que para utilizar este método para caracterizar la actividad tóxica de los bioinsecticidas producidos a partir del nim, el tiempo de la prueba debe ser como mínimo de 144 h.

4.2.7 Evaluación del método de caracterización de la actividad insecticida de los extractos por impregnación de alimento. En la Figura 17 se observan los resultados para la prueba de mortalidad del gorgojo del arroz por impregnación de alimento (pellet de harina de trigo), contra el tiempo después de la aplicación de los tratamientos. Para este método los extractos presentan a las 114 h una mortalidad del $19,4\% \pm 2,4$ para el extractoetanólico al 3% p/v y del $11,1\% \pm 4,8$ para el extractohexanoico al 3% p/v, la cual es baja comparada con la de la DEL al 0,02% que alcanzó en ese mismo periodo una mortalidad del $72\% \pm 13,4$. Sin embargo la dispersión de los datos es bastante grande, debido al mismo diseño de prueba, pues ésta permite que la mortalidad de los individuos pueda ser provocada por efectos antialimentarios, de contacto, por ingestión y hasta fumigantes, los cuales se dan de forma simultánea. Es posible incluso que debido a los efectos antialimentarios los gorgojos no consumieran la harina del pellet, lo cual significaría que el extracto protegió al pellet de la acción destructiva del insecto.

El test de Shapiro-Wilk muestra que los datos no presentan distribución normal ($W = 0,8159$, $p = 0,004$), por lo que se aplica el test de Kruskal-Wallis, mostrando no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre las variables.

Figura 17. % M contra Tiempo después de la aplicación de los tratamientos en el pellet de harina. T=25°C y HR= 94%.



Fuente: Guerrero[88].

4.2.8 Elección del protocolo de caracterización de la actividad biológica. En la Tabla 5 se observa la comparación entre los métodos de caracterización biológica por aplicación tópica, impregnación de superficie y de alimento. A partir de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se selecciona como método de caracterización de la actividad biológica en cuanto a mortalidad de los extractos y formulados elaborados a partir del nim, la impregnación de superficie no porosa. Este método permite evaluar el efecto en el organismo de los insectos, sin tener falsos negativos, por interacción de los compuestos con barreras anatómicas del gorgojo del arroz. Además, la desviación estándar es más baja en comparación con el método de impregnación de alimento, por lo que se pueden tener datos más

precisos. Para tener medidas concluyentes en cuanto al % M las medidas se deben tomar después de 144 h de haber sido aplicado el tratamiento.

Tabla 5. Comparación de los métodos de caracterización de la actividad biológica por aplicación tópica, impregnación de superficie y de alimento, de los extractos etanólicos y hexanoicos.

Método	% M con los extractos	Desviación estándar del % M	Tiempo de lectura
Aplicación tópica	8,5%	± 4,5%	144 h
Impregnación de superficie	83,3%	± 4,1%	144 h
Impregnación de alimento	19,44%	± 13,5%	144 h

4.3 CONCLUSIONES

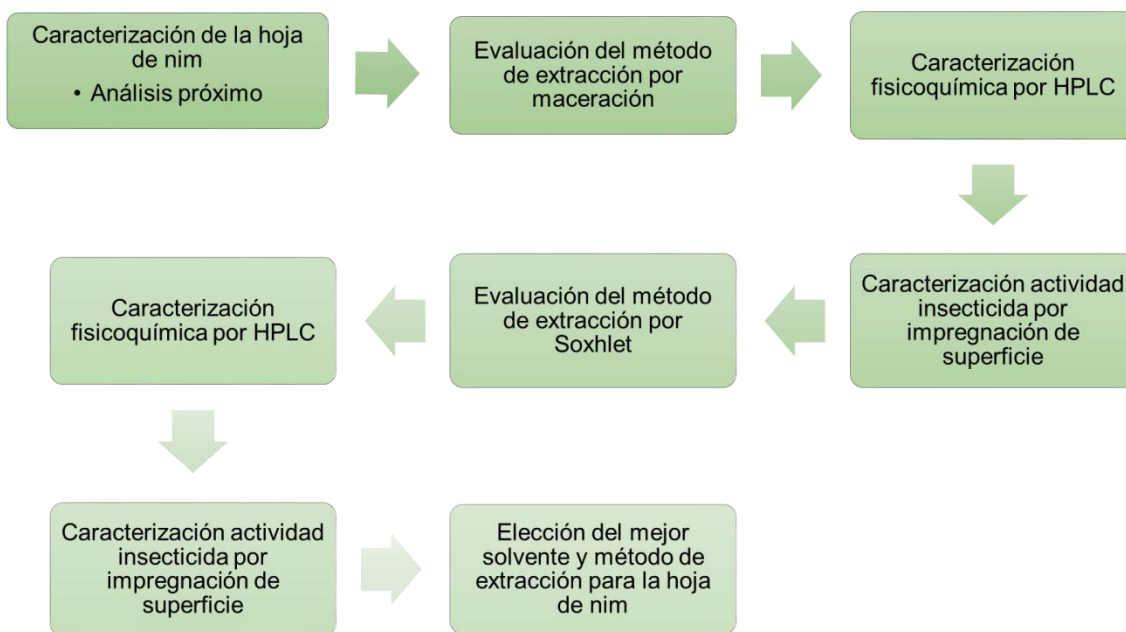
Se estableció como protocolo para la caracterización fisicoquímica de los extractos y formulados elaborados a partir de la hoja del árbol de nim, la metodología por HPLC empleando como estándar interno α -terpineol, pues permite la cuantificación del contenido de AZA en un intervalo de concentraciones de 0,5% a 2,5% p/p.

De los protocolos probados para la caracterización de la actividad biológica en cuanto a mortalidad en el gorgojo del arroz de los extractos y formulados de nim, se seleccionó la impregnación de superficie no porosa, pues para la especie de insecto seleccionada, permite ver la mortalidad debido a los efectos que tienen los extractos en su organismo.

5. EVALUACIÓN DE MÉTODOS Y SOLVENTES DE EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LAS HOJAS DEL NIM A DIFERENTES CONDICIONES DE OPERACIÓN

5.1 METODOLOGÍA

Figura 18. Metodología general para la evaluación de métodos y solventes de extracción de los compuestos presentes en las hojas del nim.



5.1.1 Reactivos, mariales 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 las caracterizaciones por HPLC, se usaron como fase móvil agua (tipo I (ultrapura) Milli-Q) y acetonitrilo (grado HPLC, Sigma Aldrich), y como estándar interno α -terpineol ($> 97\%$, Sigma Aldrich). Las hojas y las semillas del nim fueron recolectadas y suministradas por Zumotec S.A, provenientes de árboles con más de tres años de haber sido plantados en la zona del Magdalena Medio (Santander, Colombia).

5.1.2 Caracterización de la hoja de nim. Las hojas del nim fueron caracterizadas mediante análisis próximo con el fin de establecer su contenido de humedad (ASTM D4442–07), cenizas (ASTM D1102-84), extractivos acuosos (ASTM D1110-84), extractivos orgánicos (ASTM D1107-96), holocelulosa y alfacelulosa (ASTM D1103-60) y lignina klason (ASTM D1106-96).

5.1.3 Acondicionamiento del material vegetal. Las hojas de nim 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.

5.1.4 Producción de los extractos de hoja de nim por el método de maceración.

Para maceración se evaluaron el efecto de la polaridad del solvente (agua destilada (A), etanol (ET), acetato de etilo (AE) y hexano (H)), la agitación (0 y 500 rpm) y relación sólido solvente (10% y 30% peso de hoja/volumen de solvente), empleando un diseño de experimentos 2^k con una repetición. Los extractos se prepararon mezclando el polvo de nim con cada uno de los solventes por separado, en recipientes ámbar de 25 mL en las relaciones establecidas por el diseño. El tiempo de extracción fue de 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente los extractos fueron filtrados utilizando papel filtro de 0,45 μm con el fin de retirar el material vegetal.

Debido a que algunos de los solventes utilizados pueden por sí solos generar mortalidad (como el hexano o el acetato de etilo) en las pruebas de actividad biológica, los extractos crudos se llevaron a sequedad mediante rotoevaporación, quedando un sólido oscuro al cual se le denomina extracto (E), para luego ser rediluido hasta una concentración de 3% p/v, en agua destilada (para el extracto acuoso EA) o etanol al 96% (para el extracto etanólico EE, extracto acetato de etilo EAE

y extracto hexanoicoEH). La caracterización fisicoquímica se realizó por HPLC y la de actividad insecticida por impregnación de superficie, según los protocolos establecidos en el capítulo 1. El cálculo del porcentaje de rendimiento (% R) de extracto se realizó mediante el uso de la ecuación 4.

Ecuación 4. Porcentaje de rendimiento de los E con respecto al peso de hoja seca.

$$\% R = \frac{\text{g de E}}{\text{g de hoja seca}} * 100$$

5.1.5 Producción de los extractos de hoja de nim por el método Soxhlet. Para la extracción por Soxhlet se evaluó el efecto del solvente (A, E, AE y H), donde todas las pruebas se hicieron por duplicado. Las muestras vegetales (10 g) fueron puestas en dedales de papel filtro con diámetro de poro 0,45 μm y fueron sometidas a extracción por 5 h. Al finalizar fueron rotoevaporados hasta sequedad y rediluidos hasta una concentración del 3% p/v tal como se muestra en el numeral anterior. La caracterización fisicoquímica se realizó por HPLC y la actividad insecticida por impregnación de superficie, según los protocolos establecidos en el capítulo 1. El % R se calculó con la ecuación 4.

5.1.6 Producción de los extractos a partir de la semilla de nim. Con el fin de comparar los resultados en cuanto a concentración de AZA obtenidos con la hoja del nim con los obtenidos con la semilla, una vez seleccionadas se prepararon extractos a las mejores condiciones y solventes encontrados en los métodos de maceración y Soxhlet en los numerales anteriores.

5.1.7 Análisis estadístico de los datos. 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) mediante el programa estadístico STATISTIC 8. De acuerdo al valor p se infirió un nivel de confianza del 95% sobre las variables de respuesta. Para el estudio de los datos

obtenidos por maceración se utilizó un análisis de varianza anidado (ANOVA anidado), pues se tiene una variable medida (AZA o % M) y grupos de variables (agitación y relación sólido/solvente) anidadas a una variable nominal de más alto nivel (solvente). El diseño y los análisis se hicieron empleando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión.

5.1.8 Elección del método y el solvente de extracción de los compuestos de la hoja del nim. A partir de los datos obtenidos de la evaluación de los diferentes métodos de extracción, teniendo en cuenta los solventes y condiciones de operación, se construyeron tablas comparativas para cada uno. Las variables que se presentan en las tablas fueron tomadas como criterios de selección del método y solvente de extracción.

5.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.2.1 Caracterización de la hoja de nim. La información obtenida del análisis próximo de la hoja de nim se presenta en la Tabla 6. Como puede observarse, las hojas presentan un alto contenido en compuestos volátiles y un bajo contenido en carbón fijo, lo cual es común para el material vegetal de este tipo, siendo en esta fracción donde se encuentran los compuestos de interés. Los datos de humedad fueron utilizados para hallar los rendimientos de los extractos con respecto a la hoja seca.

Tabla 6. Análisis próximo de la hoja del nim

	% p/p
Humedad	11,6 ± 0,06
Volátiles	81,69 ± 0,1
Carbón fijo	0,13 ± 0,02
Cenizas	9,39 ± 0,08

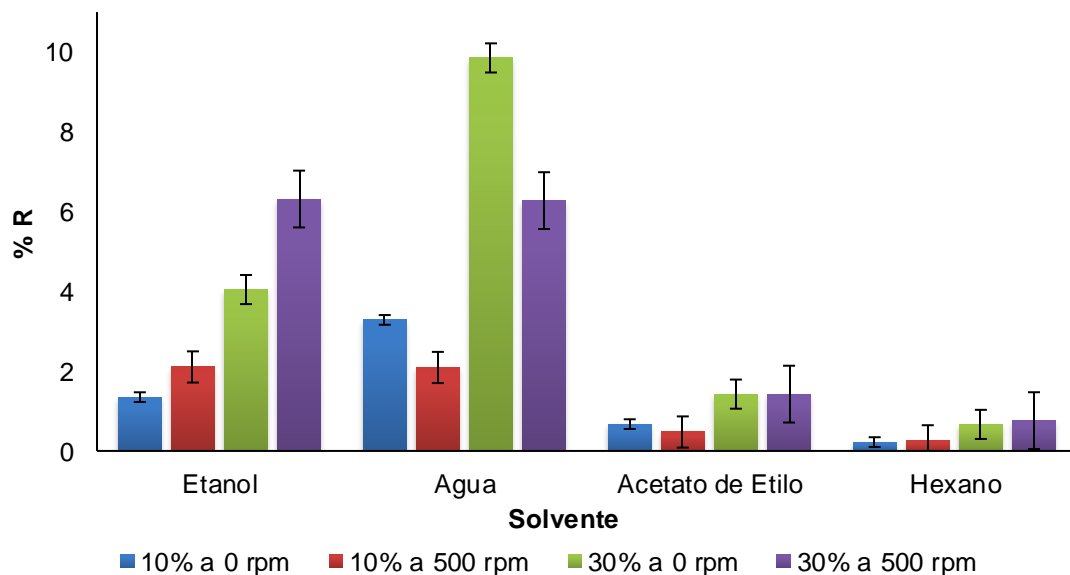
Holocelulosa	35,39 ± 0,48
Alfa celulosa	12,83 ± 0,38
Lignina	17,73 ± 1,16

Fuente: Guerrero[88].

5.2.2 Producción de los extractos de hoja de nim por el método de maceración.

En la Figura 19 se observa el rendimiento de los extractos con respecto al solvente de extracción, la agitación (0 y 500 rpm) y la relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v). El mejor rendimiento obtenido fue del 9,85% ± 0,37 para el EA a 0 rpm, seguido por el EE con 6,31% ± 0,71 a 500 rpm, ambos a una relación del 30% p/v (hoja solvente).

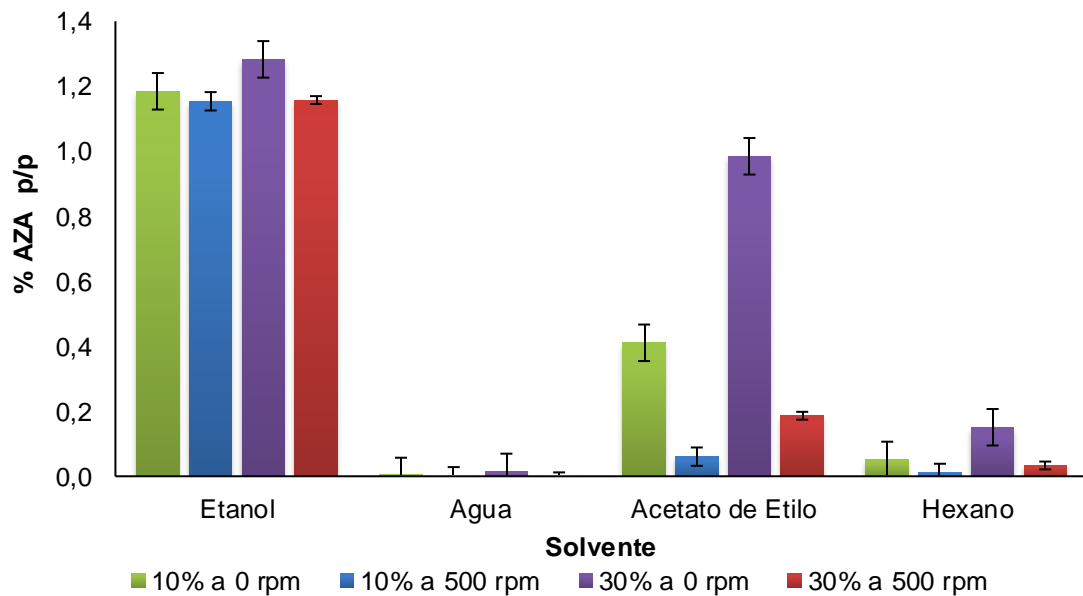
Figura 19. % R de extracción por maceración de hoja de nim con respecto al solvente, la agitación (0 y 500 rpm) y relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v).



Fuente: Guerrero[88]

Sin embargo, cuando se comparan estos resultados con los de la Figura 20, en la cual se presenta el % de AZA obtenido con respecto al solvente utilizado, la agitación (0 y 500 rpm) y la relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v), se observa que la mayor concentración de AZA se obtiene para el EE con un 1,28% \pm 0,37 a 0 rpm y una relación de 30%.

Figura 20. % AZA obtenido por extracción por maceración de hoja de nim con respecto al solvente, la agitación (0 y 500 rpm) y relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v).



Fuente: Guerrero[88]

Los resultados indican que, a pesar de que el mayor rendimiento se obtiene con agua, este solvente no es selectivo para la AZA pues su concentración en el EA es cercana a 0% a las condiciones evaluadas. Dichos resultados concuerdan con los datos encontrados en el trabajo de Esparza *et al.*, quienes obtuvieron un rendimiento del 83% en extractos acuosos de semilla de nim, pero sólo consiguieron 0,05% p/v de AZA, mostrando que, aunque el extracto acuoso tenga rendimientos

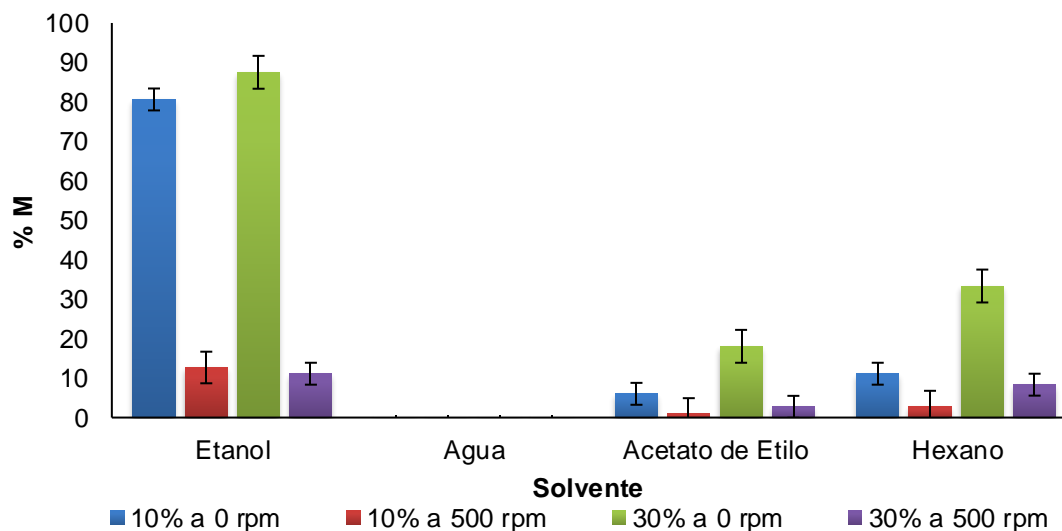
mayores al resto de los extractos, la cantidad de AZA que puede ser encontrada en éstos es muy reducida, independientemente si son extraídos de semilla u hoja[54].

Con referencia a las condiciones de operación, se ve que para el caso de los EE no hay diferencias significativas ($p=0,745$), mientras que para los EAE se ve una diferencia, aunque no significativa ($p=0,073$), de los extractos obtenidos a una relación del 30% p/v, sin agitación (0 rpm).

Mediante un análisis de varianza ANOVA anidado, se determinó el grado de significancia de las variables independientes en la concentración de AZA. El análisis estadístico muestra que el solvente y la relación hoja/solvente tienen un valor p de 0,023 y 0,000, respectivamente. Debido a que el valor p es menor a 0,05 para los dos casos, esto indica que estas variables de proceso tienen un mayor efecto en la concentración de AZA, en especial la relación hoja/ solvente.

La Figura 21 muestra la actividad insecticida obtenida en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie de los extractosrediluidos (ER) al 3% p/v en etanol, con respecto al solvente de extracción, la agitación y la relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v).

Figura 21. % M del gorgojo del arroz por impregnación de superficie de los ER al 3% p/v, extraídos por maceración con respecto al solvente de extracción, la agitación (0 y 500 rpm) y la relación hoja/solvente de extracción (10% y 30% p/v). T=25°C HR=70%



Fuente: Guerrero[88].

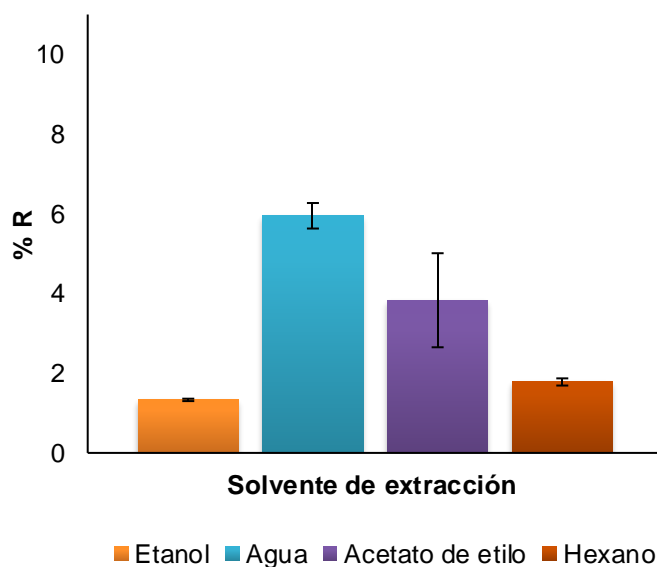
Se observa que la mayor mortalidad fue del 87,5% de los individuos cuando se utilizó etanol como solvente de extracción, a una relación del 10% hoja/solvente, sin agitación. Por otro lado, para los EAE el mayor efecto insecticida fue del 18%, mientras que para los EH fue del 33,3% a una relación 30% hoja/solvente sin agitación. Ningún extracto acuoso presentó mortalidad, lo cual es entendible al comparar estos resultados con los del %AZA, corroborando que efectivamente no hay presencia de AZA u otros limonoides quienes son los responsables de la actividad insecticida.

El análisis de varianza ANOVA anidado muestra que para el % M, las variables que tienen mayor efecto son la agitación y la relación hoja/solvente con un valor p de 0,000 y 0,001, respectivamente. Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los EE obtenidos a una relación de 10% y 30% (p=1,00), a diferencia de lo que sucede con la agitación, pues a 0 rpm es mucho mejor que a

500 rpm ($p= 0,025$). Cuando se comparan los resultados de mortalidad con los resultados del %AZA se observa que entre las condiciones no hay diferencias significativas en la concentración del compuesto, por lo que es posible que esta diferencia en la mortalidad entre los extractos etanólicos con agitación y sin agitación, es que a 500 rpm se rompan algunas estructuras celulares, liberando compuestos que podrían generar interferencia en la absorción o efecto insecticida en el gorgojo del arroz.

5.2.3 Producción de los extractos de hoja de nim por el método Soxhlet. En la Figura 22 se observan los rendimientos obtenidos por el método Soxhlet de hoja con los diferentes solventes. Tal como se obtuvo en la extracción por maceración el mayor % R es para los EA, no obstante, su valor es de 5,9% que es un 4% inferior al valor más alto que se obtiene por maceración. Esta disminución también se aprecia en los EE pues por Soxhlet se obtiene un % R de 1,3% que es 5% menos de lo que se obtiene por maceración para estos extractos. Debido a que la extracción por Soxhlet opera a la temperatura de saturación del solvente, esta disminución en el rendimiento de los EA y EE puede estar relacionada con su temperatura de ebullición, la cual para el agua es de 100°C y para el etanol de 80°C, lo que podría generar la degradación y volatilización de algunos compuestos.

Figura 22. % R de los extractos obtenidos de la hoja de nim por extracción Soxhlet con respecto al solvente de extracción.



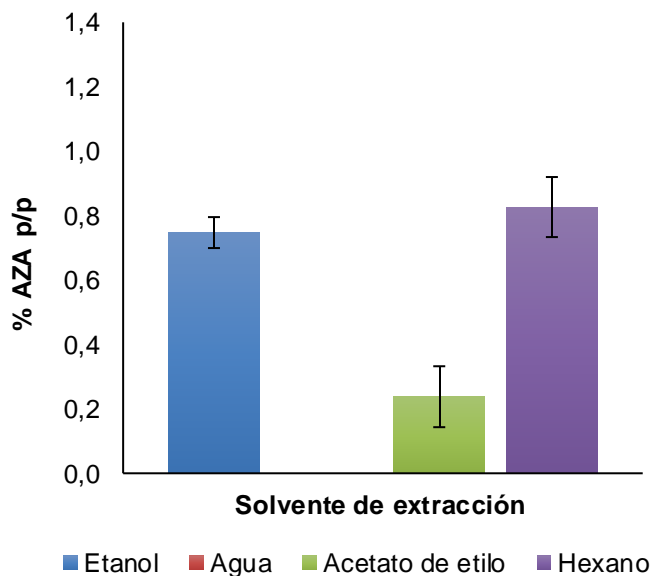
Fuente: Guerrero[88].

Este efecto de la temperatura también se observa para el caso de los EAE y EH pero de forma inversa, pues sus rendimientos aumentan durante la extracción Soxhlet en comparación con la maceración, donde para EAE es de 3,8% (2,4% mayor al obtenido por maceración), y para EH es 1,78% (1% mayor que el obtenido por maceración).

En la Figura 23, se observan el % AZA obtenido por Soxhlet para cada uno de los solventes de extracción. Para este método de extracción el mayor contenido de AZA fue del 0,82% en los extractos obtenidos con hexano. Este porcentaje es mayor que el que se obtuvo con el mismo solvente por maceración, sin embargo, para los otros solventes se presenta una disminución en la concentración de AZA. La mayor disminución se presenta para los EE, quienes por Soxhlet obtuvieron una concentración del 0,74%, que fue 0,54% menor a la obtenida por maceración. Los resultados muestran que utilizar temperaturas mayores a 70°C podría generar la

degradación de la AZA, mientras que temperaturas mayores a 80°C se produce la degradación y volatilización de otros compuestos.

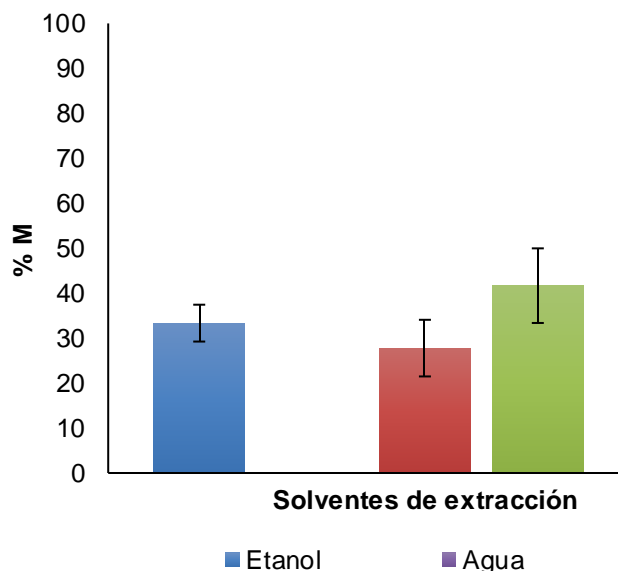
Figura 23. % AZA extracción por Soxhlet de hoja de nim con respecto al solvente de extracción.



Fuente: Guerrero[88].

En la Figura 24 se observa la actividad insecticida producida en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie de los extractos obtenidos por Soxhlet rediluidos al 3% p/v, contra el solvente de extracción. La mayor actividad insecticida la tiene el EE, con un 33% \pm 4,1. Cuando se comparan estos resultados con el método de extracción por maceración, se aprecia una disminución en la actividad insecticida, lo cual es congruente con los resultados que se reportaron de % AZA, lo cual estaría relacionado con las temperaturas de operación de cada solvente. Por otro lado, los extractos por Soxhlet obtenidos con hexano y acetato de etilo tuvieron un aumento en su mortalidad a 41,6% \pm 8,3 y 27,8% \pm 6,3, respectivamente. Ninguno de los extractos acuosos mostró actividad insecticida.

Figura 24. % M del gorgojo del arroz por impregnación de superficie de los ER al 3% p/v, extraídos por Soxhlet de la hoja de nim con respecto al solvente de extracción. T=25°C HR=70%.



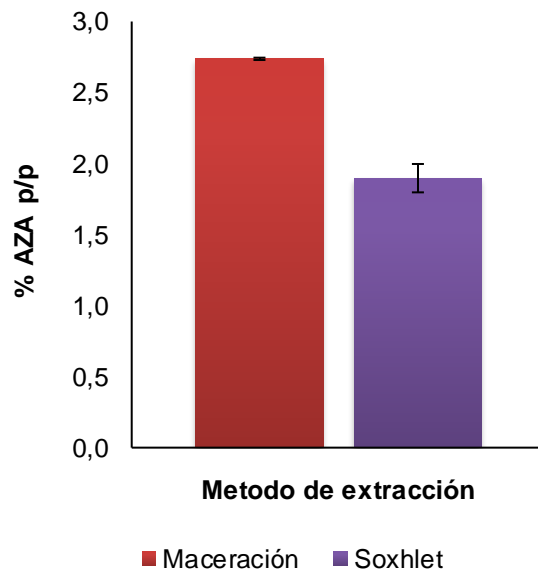
Fuente: Guerrero[88].

5.2.4 Producción de los extractos a partir de la semilla del nim. Para la elaboración de los extractos a partir de la semilla del nim, se siguió en general el mismo protocolo que para las hojas. Para la extracción por maceración se utilizó como solvente de extracción etanol, a una relación del 30% semilla/solvente, un tiempo de 24 h de extracción y sin agitación. Para la extracción por Soxhlet se tomó como solvente hexano a un tiempo de extracción 5 h. Para los extractos obtenidos por maceración el rendimiento fue del % y por Soxhlet el rendimiento fue del %.

Los resultados se presentan en la Figura 25, en la cual se observa que el mayor contenido de AZA se presenta en el extracto obtenido por maceración con etanol, con un 2,72% ± 0,01. Cuando se compara este resultado con el obtenido por la misma técnica utilizando la hoja de nim, se aprecia que el contenido del AZA en la semilla es cercano al doble que el de la hoja, no obstante, se comprueba que las

dos materias primas presentan los mismos compuestos a los cuales se les atribuye la actividad insecticida.

Figura 25. % AZA para los extractos de semilla de nim obtenidos por maceración con etanol a una relación 30% p/v y extracción de Soxhlet con hexano



En la Tabla 7 se hace un análisis de costos solamente con relación a la materia prima, a partir de los resultados obtenidos y de los costos actuales del mercado. Los costos de la materia prima se sacaron a partir de los precios que maneja la empresa ZUMOTEC S.A y de otros productores pequeños ubicados en el departamento de Santander y sur del Cesar. Se puede apreciar que, aunque la cantidad de AZA en las semillas es mayor, esto se compensa con el costo y la disponibilidad de la misma, haciendo que sea desde este parámetro más rentable la producción de los extractos a partir de las hojas.

Tabla 7. Costo de la AZA con respecto al material vegetal (MV) (hoja o semilla) utilizando el método de maceración a una relación 30% p/v utilizando etanol como solvente de extracción

Parte de la planta	Semilla	Hoja
Costo promedio (COL\$/g)	70	20
% R (g de E/g de MV)	7,20%	6,30%
Cantidad de extracto por Kg de MV (g)	72	63
% AZA p/p	2,73%	1,28%
Cantidad de AZA (g)	1,9656	0,8064
Costo del g de AZA en base al MV (COL\$/g de AZA)	35.714	24.801

5.2.5 Elección del método y solvente de extracción de los compuestos de la hoja del nim. A partir de los resultados obtenidos se elaboró la Tabla 8, donde se comparan los mejores resultados para cada uno de los métodos de extracción. Como se observa el método de extracción que permite obtener una mayor concentración de AZA y actividad insecticida es la maceración, utilizando etanol como solvente. Para el caso de Soxhlet el mejor solvente de extracción fue hexano, pero la cantidad de AZA y por ende la capacidad insecticida, no supera lo obtenido con etanol.

Tabla 8. Comparación de los métodos y solventes de extracción para la hoja de nim

Método de extracción	Mayor %AZA	Solvente de extracción	% M
Maceración	1,28%	Etanol	87,5%
Soxhlet	0,82%	Hexano	41,6%

5.3 CONCLUSIONES

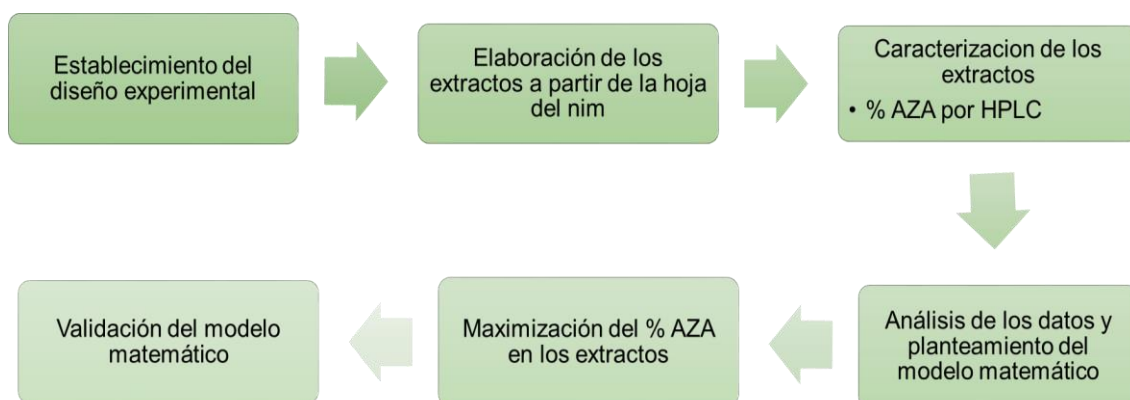
El método más adecuado para la extracción de los compuestos insecticidas de la hoja del nim es la maceración utilizando como solvente etanol, pues tuvo una concentración de AZA de 1,28% p/p y un % M de 87,5%.

Para la extracción por maceración se determinó que para el % AZA el efecto del solvente era significativo, mientras que para el % M era la agitación. Mientras que para las dos variables de respuesta fue significativo el aporte de la relación hoja/solvente.

6. MAXIMIZACIÓN DE LA AZADIRACTINA PRESENTE EN LOS EXTRACTOS DE HOJA DE NIM MEDIANTE LA MODIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN

6.1 METODOLOGIA

Figura 26. Metodología general para la maximización de la azadiractina presente en los extractos de hoja de nim



6.1.1 Reactivos, mariales y solventes. Para las extracciones se utilizó etanol industrial ($\approx 96\%$) suministrado por Zumotec S.A. Para las caracterizaciones por HPLC, se usaron como fase móvil agua (tipo I (ultrapura) Milli-Q) y acetonitrilo (grado HPLC, Sigma Aldrich), y como estándar interno α -terpineol ($> 97\%$, Sigma Aldrich) de acuerdo al protocolo determinado en el capítulo 1. Las hojas del nim fueron recolectadas y suministradas por Zumotec S.A, provenientes de árboles con más de tres años de haber sido plantados en la zona del Magdalena Medio (Santander, Colombia).

6.1.2 Diseño experimental tipo *Box-Behnken*. A partir de los resultados obtenidos en el capítulo anterior, se escogieron como parámetros la relación hoja/solvente (% p/v), agitación (rpm) y el tiempo de extracción (h), con el fin de conocer su influencia

sobre la concentración de azadiractina (% AZA). El diseño *Box-Behnken* consiste en un conjunto de experimentos donde cada par de parámetros es variado entre sus niveles bajo y alto, mientras los demás parámetros experimentales se fijan en el nivel medio. En la Tabla 9 se presentan los niveles para cada una de las variables.

Tabla 9. Niveles de los parámetros del diseño de experimentos tipo *Box-Behnken*.

	Bajo	Medio	Alto
Agitación (rpm)	0	250	500
Relación hoja/solvente(% p/v)	10	30	50
Tiempo de extracción (h)	12	30	48

El diseño fue completamente aleatorio y consistió en 15 combinaciones, incluyendo tres repeticiones del punto central.

6.1.3 Producción y cuantificación de la AZA en los extractos de hoja de nim.

Las extracciones se realizaron por maceración utilizando etanol como solvente, tal como se estableció en el capítulo 2. Los extractos se prepararon mezclando el polvo de hoja de nim con el solvente en recipientes ámbar de 25 mL en las relaciones establecidas por el diseño. El proceso de extracción se realizó a temperatura ambiente. Posteriormente los extractos fueron filtrados utilizando papel filtro de 0,45 μm con el fin de retirar el material vegetal. A continuación, los extractos crudos se llevaron a sequedad mediante rotoevaporación, quedando un sólido oscuro al cual se le denomina extracto (E), para luego ser rediluido hasta una concentración de 3% p/v en etanol al 96%. La cuantificación de la AZA se realizó por HPLC, según los protocolos establecidos en el capítulo 1.

6.1.4 Maximización del % AZA y validación del modelo matemático. El análisis de los resultados experimentales, se realizó por medio de la metodología de superficie de respuesta mediante el software estadístico Minitab 17. Las superficies

de respuesta se graficaron utilizando el software MATLAB 8.2.A partir del modelo matemático, empleando el software estadístico, se encontraron los valores de las variables de operación, en las cuales se maximiza el % AZA. Con los puntos que se establecieron se preparó una muestra, se analizó la concentración de AZA por HPLC y los resultados se compararon con los valores predichos por el modelo.

6.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.2.1 Efecto de los parámetros de extracción en el % AZA. La Tabla 10 muestra el % AZA recuperada en los extractos a las condiciones establecidas en el diseño *Box-Behnken* con respecto al tiempo de extracción (h), agitación (rpm) y relación hoja/solvente (% p/v).

Tabla 10. Resultados del % AZA a partir de un diseño *Box-Behnken* variando la agitación, la relación hoja/solvente y tiempo de extracción

Tiempo de extracción (h)	Agitación (rpm)	Relación hoja/solvente (% p/v)	% AZA (% p/p)	Desviación estándar
12	250	50	1,44	0,23
30	250	30	1,61	0,18
48	0	30	1,64	0,13
30	0	50	1,33	0,12
30	250	30	1,59	0,10
30	500	50	1,69	0,07
30	500	10	1,30	0,06
30	0	10	1,18	0,06
12	250	10	1,38	0,04

Tiempo de extracción (h)	Agitación (rpm)	Relación hoja/solvente (% p/v)	% AZA (% p/p)	Desviación estándar
48	250	10	1,71	0,04
12	0	30	1,18	0,03
12	500	30	1,16	0,03
48	250	50	1,53	0,02
30	250	30	1,61	0,02
48	500	30	1,82	0,01

Como puede observarse, el mayor contenido de AZA en los extractos es 1,82%, obtenido a 48 h, 500 rpm y una relación hoja/solvente de 30% p/v. Para determinar los efectos que tienen las variables sobre el % AZA, se realizó un análisis de varianza ANOVA, con un intervalo de confianza del 95%, donde el nivel de significancia (α) es 0,05, el cual se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de varianza ANOVA para el tiempo de extracción (X1), agitación (X2) y relación hoja/solvente (X3)

Parámetro	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor F	Valor p
Lineal				
X ₁	1	0,59555	22,00	0,000*
X ₂	1	0,10211	3,77	0,066**
X ₃	1	0,04397	1,62	0,217
Cuadrático				
X ₁ ²	1	0,00056	0,02	0,897
X ₂ ²	1	0,15422	6,17	0,022*
X ₃ ²	1	0,04943	1,83	0,192
Interacción				

Parámetro	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Valor F	Valor p
X ₁ X ₂	1	0,01961	0,72	0,405
X ₁ X ₃	1	0,02954	1,09	0,309
X ₂ X ₃	1	0,03177	1,17	0,292
Error puro	17	0,28316		
Total	29	1,56811		

* p<0,05

**p<0,1

Se determinó que el tiempo de extracción muestra un efecto lineal muy significativo ($p=0,000$). Al analizar los efectos de la agitación en el proceso de extracción de la AZA, se aprecia que también tiene un efecto lineal ($p=0,066$), sin embargo, el efecto más significativo es cuadrático ($p= 0,022$). La relación hoja/solvente no tuvo para ninguno de los casos un efecto significativo. Los resultados obtenidos contrastan con los reportados por de Paula *et al.*, quienes trabajando con semilla encuentran que la relación semilla/solvente es muy significativa. Esta diferencia podría estar relacionada con la materia prima, mostrando que a pesar de que la hoja y la semilla contienen compuestos activos en común, como es el caso de la AZA, la morfología de las mismas podría tener una influencia significativa en las condiciones de extracción. A partir del análisis ANOVA se genera un modelo matemático de segundo orden (Ecuación 5) con un R^2 de 85,48%.

Ecuación 5. Modelo matemático de segundo orden del % AZA en los extractos de hoja de nim, teniendo en cuenta la agitación, el % hoja/solvente y el tiempo de extracción, como variables de operación

$$\% \text{ AZA} = 0,795 + 0,0145 X_1 + 0,000814 X_2 + 0,0168 X_3 - 0,000024 X_1^2 - 0,000002 X_2^2 - 0,000205 X_3^2 + 0,000011 X_1X_2 - 0,000169 X_1X_3 + 0,000013 X_2X_3$$

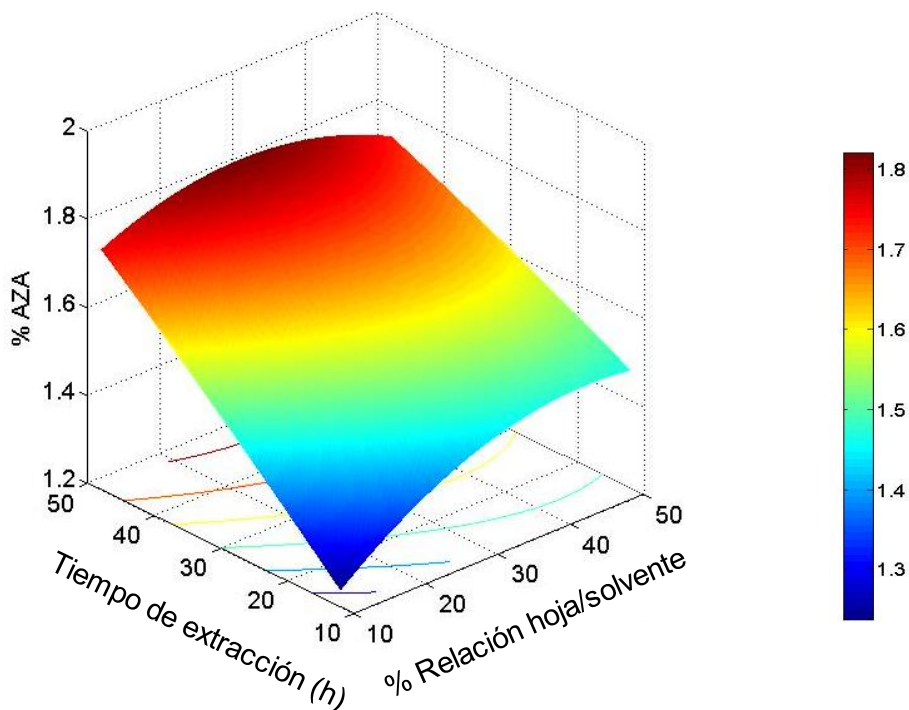
X_1 = Tiempo de extracción (h)

X_2 = Agitación (rpm)

X_3 = Relación hoja/solvente (% p/v)

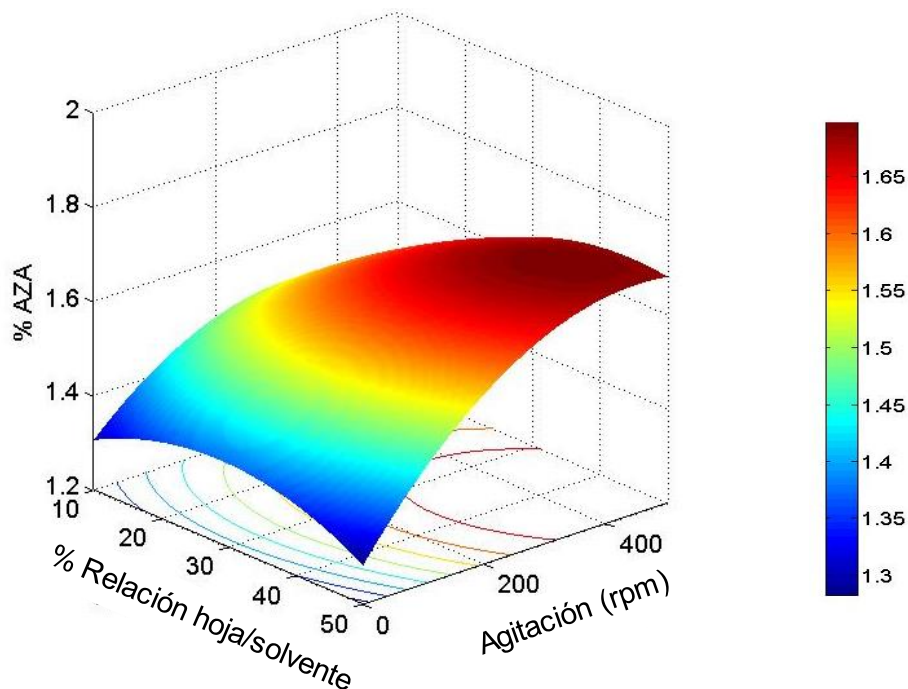
A partir de la Ecuación 5 se obtuvieron las superficies de respuestas y de contornos para los efectos de las variables en el % AZA, las cuales se observan en las Figuras 27 - 29. Tal como se muestra en la Figura 27, al aumentar el tiempo de extracción y la relación hoja/solvente cercana al 30% manteniendo la agitación constante a 250 rpm, aumenta la cantidad de AZA extraída.

Figura 27. Superficie de respuesta relacionando el tiempo de extracción vs % relación hoja/solvente a 250 rpm para el % de AZA recuperado de la hoja de nim



Para el caso de la relación hoja/solvente y la agitación a 30 h de extracción, que se aprecia en la Figura 28, se observa que a mayor velocidad de agitación y relación hoja/solvente por encima del 30% p/v, aumenta el % AZA. La agitación facilita el contacto entre el solvente y la hoja, disminuyendo los efectos disfuncionales externos, lo que mejora la extracción de la AZA. Lo anterior se corrobora cuando se observa el comportamiento sin agitación, en el cual si se aumenta la cantidad de hoja se llega a un valor máximo del % AZA, pero si se aumenta aún más disminuye, lo cual no sucede a velocidades de agitación cercanas a 500 rpm.

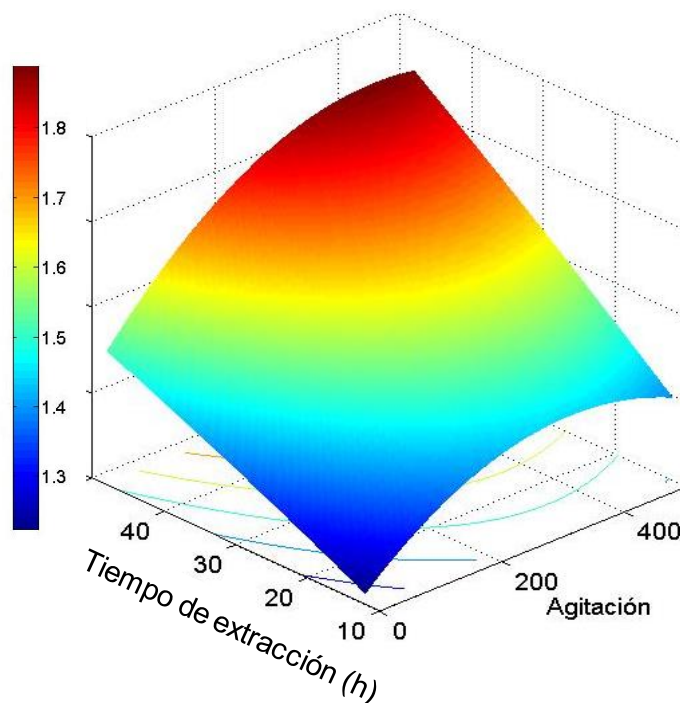
Figura 28. Superficie de respuesta relacionando el % relación hoja/solvente vs agitación a 30 h de extracción para el % de AZA recuperado de la hoja de nim.



En la Figura 29 se presenta el efecto de la agitación contra el tiempo de extracción a una relación hoja/solvente del 30% p/v, donde se muestra que los valores de AZA aumentan a tiempos largos y velocidades de agitación entre 300 y 500 rpm. Se observa que la máxima concentración de AZA se obtiene al aumentar los tiempos

de extracción. Diversos autores han reportado incluso tiempos superiores a una semana, sin embargo, a las 48 h ya se ha extraído la mayor parte de la AZA, además si este proceso se desea llevar a escala industrial tiempos de extracción mayores no serían viables [45].

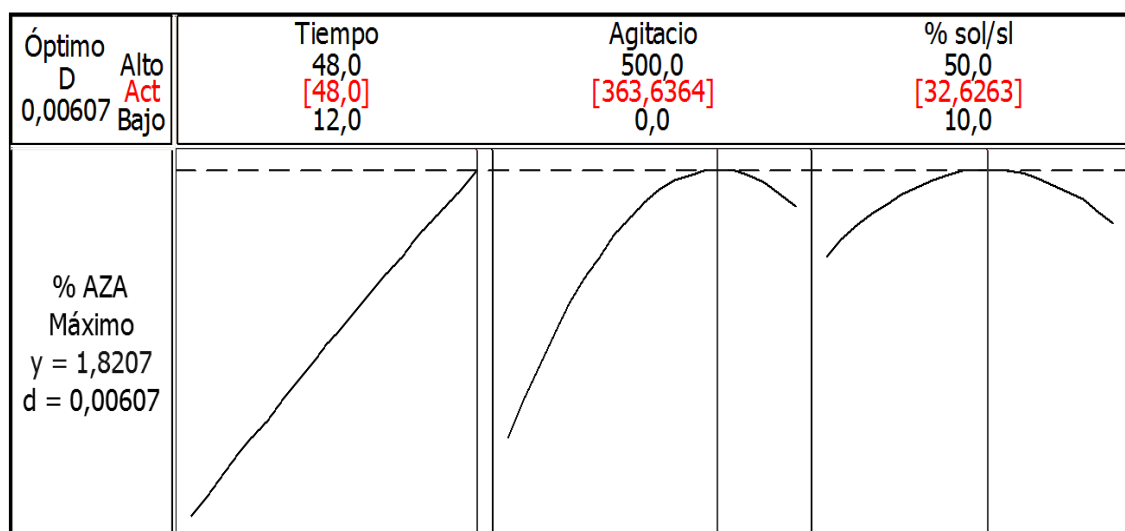
Figura 29. Superficie de respuesta relacionando el tiempo de extracción vs agitación a 30% p/v para el % de AZA recuperado de la hoja de nim.



6.2.2 Maximización del % AZA de la hoja del nim. En la Figura 30 se exponen los resultados obtenidos de la maximización de las variables en los intervalos establecidos, utilizando el software estadístico. La figura muestra el efecto de cada uno de los parámetros (tiempo de extracción, agitación y relación hoja/solvente) en el % AZA. Los puntos en los cuales las líneas verticales y horizontales se cortan en la curva, representan el valor máximo. Los números que aparecen en la parte superior muestran el intervalo que se tomó para cada una de las variables y el número en rojo muestra el valor del parámetro, para el cual se maximiza el % AZA.

Según estos análisis los valores para maximizar la cantidad de AZA se necesita un tiempo de 48 h, una relación hoja/solvente de 32,6% p/v y una velocidad de agitación de 363 rpm. Bajo estas condiciones el máximo teórico de %AZA obtenido será del 1,82% p/p.

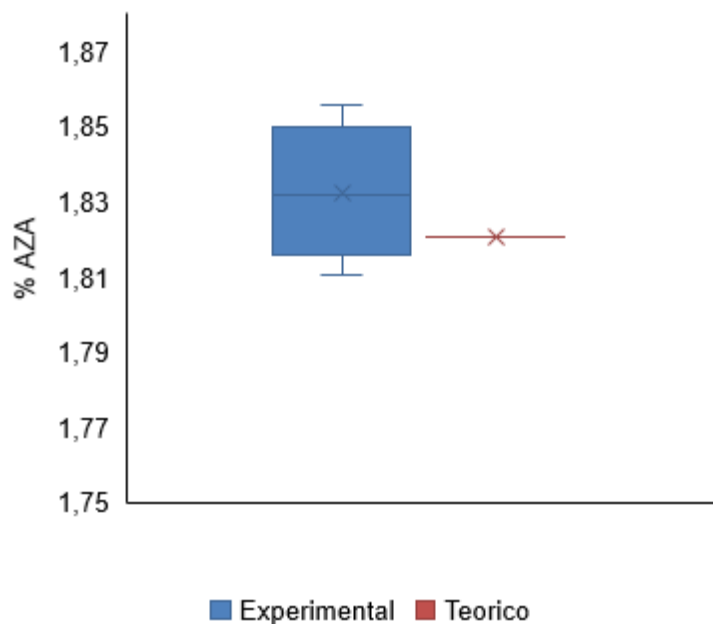
Figura 30. Valores de las variables de proceso para maximizar el % AZA.



6.2.3 Validación de los resultados obtenidos por el modelo matemático. Para la validación se realizó la extracción de la hoja de nim a las condiciones que maximizan el % AZA en los intervalos establecidos, los resultados se presentan en la Figura 31 comparándolos con el resultado teórico.

Tal como se observa en la Figura 31, el valor experimental y el predicho por el modelo están muy cercanos, donde la desviación estándar entre los dos resultados es de $\pm 0,008$. A partir de esto se puede afirmar que el modelo matemático predice de forma adecuada la influencia de las variables en el proceso de extracción de la AZA de las hojas del árbol de nim.

Figura 31. Comparación del resultado experimental del % AZA con el predicho por la maximización del modelo matemático



6.3 CONCLUSIONES

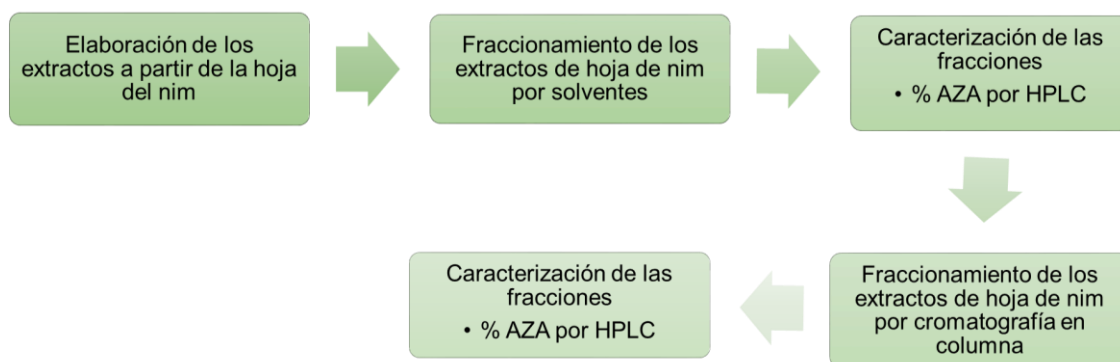
Las condiciones de operación que permiten maximizar el contenido de azadiractina en los extractos etanólicos de la hoja de nim son un tiempo de extracción de 48 h, una relación hoja/solvente del 32,6% p/v y una velocidad de agitación 363 rpm.

La desviación entre los datos teóricos de % AZA, con los obtenidos por la experimentación es de $\pm 0,008$, con lo que se comprueba que el modelo matemático predice de forma adecuada en los intervalos establecidos, la influencia de las variables escogidas en el proceso de extracción de la hoja del nim.

7. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN DE LA AZADIRACTINA PRESENTE EN LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DEL NIM

7.1 METODOLOGIA

Figura 32. Metodología general utilizada para la evaluación de técnicas de purificación de la azadiractina presente en los extractos de las hojas del nim.



7.1.1 Reactivos, mariales y solventes. Para las extracciones se utilizó etanol industrial ($\approx 96\%$) suministrado por Zumotec S.A. Para las caracterizaciones por HPLC, se usaron como fase móvil agua (tipo I (ultrapura) Milli-Q) y acetonitrilo (grado HPLC, Sigma Aldrich), y como estándar interno α -terpineol ($> 97\%$, Sigma Aldrich). Las hojas del nim fueron recolectadas y suministradas por Zumotec S.A, de árboles con más de tres años de haber sido plantados en la zona del Magdalena Medio (Santander, Colombia). Para el fraccionamiento por solventes se utilizaron acetato de etilo ($> 99,9\%$, Merck), éter de petróleo ($> 99,9\%$, Merck) metanol ($> 99,9\%$, Merck) y agua destilada. Para la cromatografía en columna se utilizó como fase estacionaria sílica gel (60 G Merk, tamaño de grano 0,063-0,200 mm) y como fase móvil fueron usados acetato de etilo ($> 99,9\%$, Merck), éter de petróleo ($> 99,9\%$, Merck) y metanol ($> 99,9\%$, Merck).

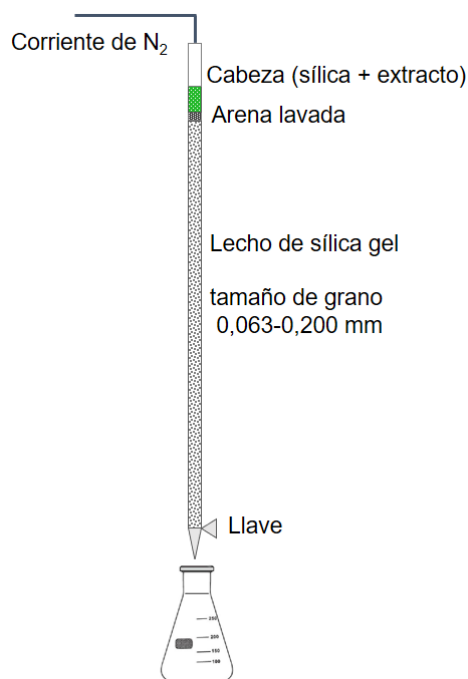
7.1.2 Producción de los extractos de hoja de nim. Las extracciones se realizaron por maceración, utilizando etanol como solvente, a las condiciones que se establecieron en el capítulo 3. Los extractos se prepararon mezclando el polvo de nim con etanol al 96% a una relación de 32,6% p/v, en recipientes ámbar de 25 mL. El proceso de extracción se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando una velocidad de agitación de 363 rpm por 48 h. Posteriormente los extractos fueron filtrados utilizando papel filtro de 0,45 μm con el fin de retirar el material vegetal.

7.1.3 Fraccionamiento de los extractos de hoja de nim por solventes. Esta técnica implica la división del extracto en un número de fracciones físicamente discretas, por medio de separaciones líquido-líquido. Por lo que es necesario establecer una secuencia de solventes que sean inmiscibles entre ellos y tengan una alta selectividad por alguno de los compuestos de la mezcla, por lo cual se siguió la metodología modificada propuesta por Schroeder y Nakanishi[61].

Para todas las particiones la relación entre solventes fue 1:1. El extracto etanólico crudo de la hoja de nim se rotoevaporó hasta sequedad y se sometió a una partición con éter de petróleo y metanol al 95% v/v, con el fin de eliminar los lípidos, grasas y ceras que puedan estar presentes. La mezcla se dejó decantar por XXX hs, en un embudo de decantación con llave con capacidad de 250 mL. A continuación, la fase metanólica se llevó de nuevo a sequedad por rotoevaporación, para realizar una segunda partición con agua y acetato de etilo, con el fin de en esta etapa eliminar los azúcares y proteínas solubles en agua. La mezcla se dejó decantar por XXX hs. Por último, la fase obtenida con el acetato de etilo se rotoevaporó hasta sequedad, se agregó el α -terpineol como estándar interno a una concentración del 2% p/p y se rediluyó en etanol hasta una concentración del 3% p/v, para realizar la cuantificación de la AZA por HPLC mediante el protocolo establecido en el capítulo 1.

7.1.4 Fraccionamiento de los extractos de hoja de nim por cromatografía en columna. Para la evaluación de esta técnica de purificación se empleó la metodología planteada por Jarvis *et al.* [60]. El extracto etanólico crudo se rotoevaporó hasta sequedad. Se tomaron 2 g de extracto y se rediluyó en un volumen pequeño de metanol (5 mL), se le adicionó 3 gramos de sílica gel y se secó en un horno convectivo a 50°C por 24 h; A esta mezcla se la denomina cabeza. Para el fraccionamiento se empleó una columna de 45 cm de longitud por 1,5 cm de diámetro interior rellena con 20 g de sílica gel, activada por 24 h en una estufa a 140°C. Sobre el lecho de sílica se agregó una pequeña cantidad de arena lavada, se llenó con éter de petróleo y se agregó la cabeza, tal como se muestra en la Figura 33. A continuación, la columna se presurizó a 10 psi con nitrógeno y se llevó a cabo la elución secuencialmente con 7 volúmenes de disolventes de menor a mayor polaridad de la siguiente manera: éter de petróleo (100 mL), las mezclas éter de petróleo-acetato de etilo 7:3 (600 mL), 6:4 (400 mL), 5:5 (400 mL), 3:7 (500 mL), 2:8 (400 mL) y por último se lavó con metanol (250 mL).

Figura 33. Esquema columna de fraccionamiento

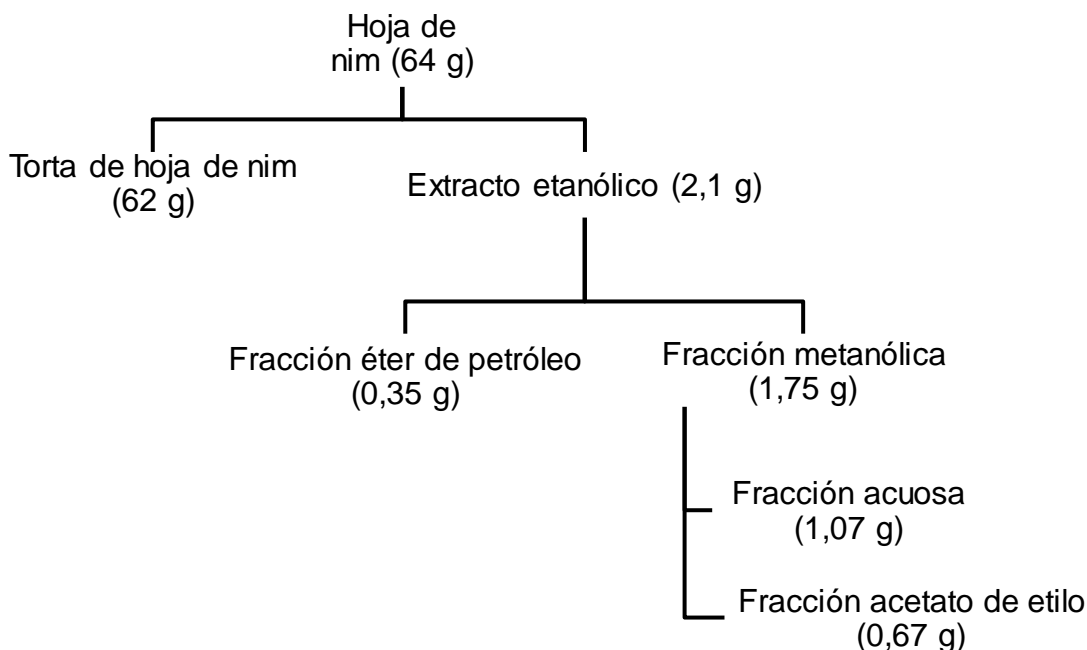


Por último, las fracciones fueron recolectadas por separado y rotoevaporadas hasta sequedad, a las cuales se agregó el α -terpineol como estándar interno a una concentración del 2% p/p y se rediluyó en etanol hasta una concentración del 3% p/v, para realizar la cuantificación de la AZA por HPLC mediante el protocolo establecido en el capítulo 1.

7.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.2.1 Fraccionamiento por solventes de los extractos de hoja de nim. En la Figura 34 se observa el diagrama general de fraccionamiento, con cada uno de los rendimientos encontrados para cada una de las etapas del proceso, tanto para el caso de la hoja de nim después de dejarse secar por 3 h a temperatura ambiente, como para las fracciones después de ser rotoevaporadas.

Figura 34. Diagrama general de fraccionamiento con cada uno de los pesos obtenidos



En la Figura 34 se aprecia que para el caso de la fracción del éter de petróleo la recuperación es de 0,35. Esta fracción está compuesta por los compuestos de más baja polaridad, para este caso los aceites o ceras presentes en la hoja del nim. Esta cantidad es baja en comparación a los reportados en extracciones similares en la literatura con semilla. Las semillas están compuestas principalmente por aceites, por lo que en estos trabajos se recomienda hacer una extracción previa con un solvente de baja polaridad como el hexano o el éter de petróleo, para mejorar el proceso de extracción, mientras que para el caso de la hoja esta cantidad es mínima, por lo que una extracción preliminar con un solvente muy apolar, no tendría un efecto significativo en el proceso [53][60][61].

Por otro lado, para el caso de la fracción acuosa el peso recuperado fue mucho mayor que el obtenido incluso en la fracción de acetato de etilo, en la cual se espera se encuentren los limonoides. Como se observó en el capítulo 2, la solubilidad de los limonoides y de la AZA en el agua es muy baja, por lo que se esperaría que ésta fracción contuviera principalmente azúcares y proteínas solubles en agua. Para comprobar la presencia de la AZA todas las fracciones finales fueron analizadas por HPLC y los resultados se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. % AZA en el extracto inicial de hoja de nim y en cada una de las fracciones.

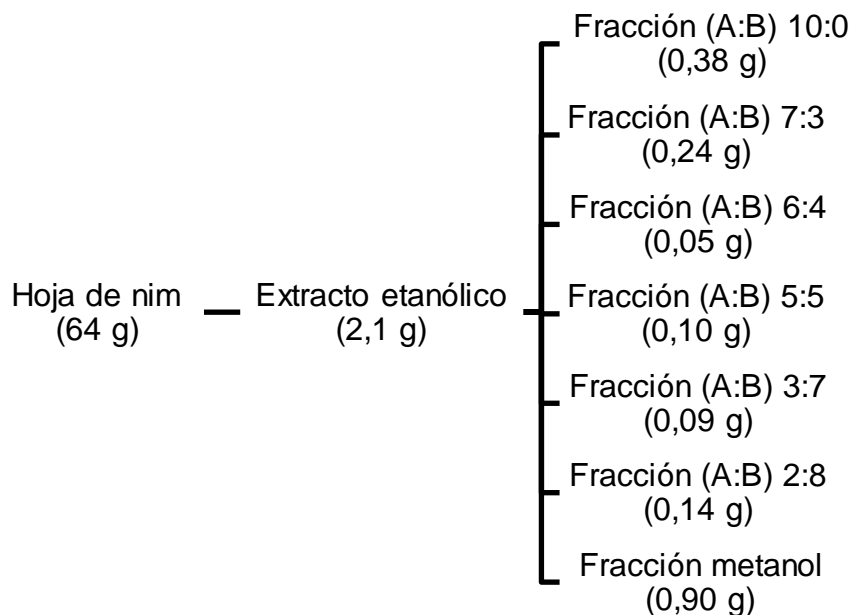
Fracción	% AZA p/p
Extracto inicial	1,80 ± 0,01
Éter de petróleo	0,03 ± 0,00
Agua	0,00 ± 0,00
Acetato de etilo	5,64 ± 0,01

Los análisis por HPLC muestran que la mayor parte de la AZA se encuentra en la fracción obtenida con acetato de etilo, alcanzando una concentración del 5,64% ±

0,01 p/p. Si se compara el porcentaje inicial de AZA en el extracto ($1,8\% \pm 0,01$ p/p) con el obtenido al finalizar el proceso de fraccionamiento, se ve que el aumento fue tan sólo del 3,84% p/p, el cual es un valor muy inferior al 35,7% p/p que obtuvieron autores como Schroeder y Nakanishi en un proceso similar con extractos de semilla [61]. Lo anterior se puede explicar principalmente por la diferencia que existe en la naturaleza de los compuestos presentes en la hoja del nim con los de la semilla. En el caso de la hoja los compuestos reportados en la literatura son principalmente pigmentos (clorofila), taninos, terpenos simples y limonoides, que tienen polaridades cercanas, por lo que es difícil poder separarlos en fracciones por este método [48]. Por otro lado, los compuestos mayoritarios en la semilla del nim son lípidos, que tienen polaridades muy diferentes a los compuestos de interés, siendo posible obtener una mayor selectividad hacia la AZA mediante su extracción con solventes.

7.2.2 Fraccionamiento de los extractos de hoja de nim utilizando cromatografía en columna. En la Figura 35 se presenta el diagrama general del fraccionamiento por columna de cromatografía y las cantidades obtenidas de cada fracción en las diferentes etapas.

Figura 35. Diagrama general del fraccionamiento en columna de cromatografía, a diferentes relaciones de éter de petróleo (A), acetato de etilo (B) y metanol



Tal como se observa, la fracción que contiene mayor cantidad de extracto es la obtenida con metanol, la cual está compuesta por sustancias de mayor polaridad, entre las cuales se encuentran principalmente compuestos de alto peso molecular como son azúcares y proteínas. Por otro lado, cuando se analizan los resultados de % AZA presentados en la Tabla 13, se observa que la fracción con mayor cantidad de %AZA (4,2% p/p) es la que se obtuvo con 5:5. Sin embargo, en total la cantidad de AZA recuperada en esta fracción fue de 100 mg, 4,2 mg menos que la que se obtiene en la fracción de metanol. En esta fracción, a pesar de tener una pureza del 1,9% p/p, contiene la mayor cantidad de AZA con un peso de 900 mg.

Tabla 13. Cantidad de AZA (mg) y pureza (% AZA p/p) en cada una de las fracciones obtenidas con diferentes relaciones de éter de petróleo/acetato de etilo (A:B) y metanol, por medio de cromatografía en columna

Fracción	Peso de la fracción (mg)	% AZA	Peso de la AZA (mg)
10:0	380 ± 15,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
7:3	240 ± 16,4	1,8 ± 0,1	4,4 ± 0,3
6:4	50 ± 2,5	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,0
5:5	100 ± 6,6	4,2 ± 0,3	4,2 ± 0,6
3:7	90 ± 4,3	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,3
2:8	140 ± 9,8	1,5 ± 0,0	2,1 ± 0,1
Metanol	900 ± 31,5	1,9 ± 0,2	17,1 ± 1,2

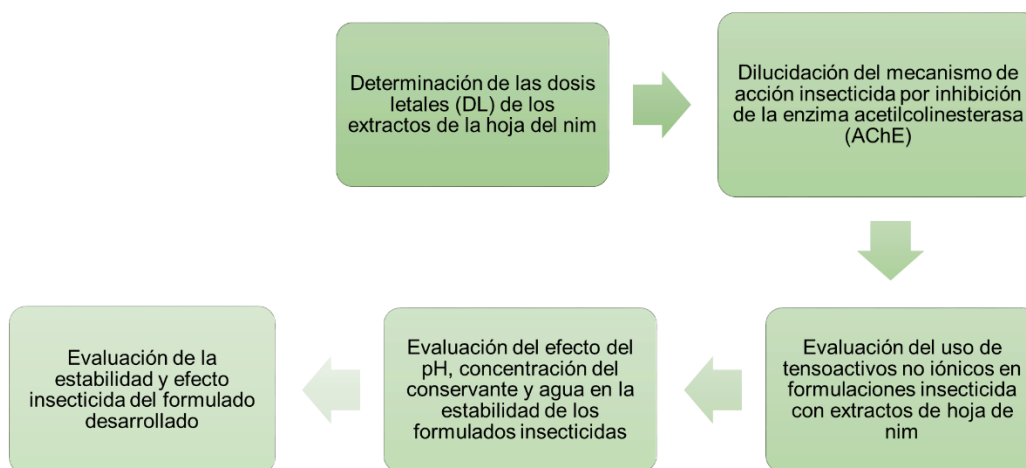
7.3 CONCLUSIONES

Por medio de la técnica de fraccionamiento por solvente se logra un enriquecimiento del 3,84% p/p y con cromatografía en columna se logra un enriquecimiento del 2,4% p/p de AZA en los extractos. Estos porcentajes son bajos, comparado con el tiempo y las dificultades técnicas de los procesos de purificación.

8. FORMULACIÓN DE UN BIOINSECTICIDA PARA EL CONTROL DE *SITOPHILUS ORYZAE* (GORGOJO DEL ARROZ) A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE LA HOJA DEL NIM

8.1 METODOLOGÍA

Figura 36. Metodología general para la formulación un bioinsecticida para el control de *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz) a partir de los extractos de la hoja del nim



8.1.1 Reactivos, mariales y solventes. Para las extracciones se utilizó etanol industrial ($\approx 96\%$) suministrado por Zumotec S.A. Para las caracterizaciones por HPLC, se usaron como fase móvil agua (tipo I (ultrapura) Milli-Q) y acetonitrilo (grado HPLC, Sigma Aldrich), y como estándar interno α -terpineol ($> 97\%$, Sigma Aldrich). Las hojas del nim fueron recolectadas y suministradas por Zumotec S.A, de árboles con más de tres años de haber sido plantados en la zona del Magdalena Medio (Santander, Colombia). Para la cuantificación del % AZA por HPLC, se utilizó como fase móvil agua (tipo I (ultrapura) Milli-Q) y acetonitrilo (grado HPLC, Sigma Aldrich).

Para los ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) se prepararon Buffers de fosfato de sodio y PBS. Para la preparación del Buffer de

fosfato pH=7,0 y pH=7,8 se emplearon NaH_2PO_4 monobásico (> 98%, Sigma Aldrich) y Na_2HPO_4 bibásico (> 98%, Sigma Aldrich). Para la preparación del Buffer PBS pH 7,6 se emplearon K_2HPO_4 (> 98%, Sigma Aldrich), NaH_2PO_4 (> 98%, Sigma Aldrich), NaCl ($\geq 99.5\%$, Merck) y Tween 20 (grado biología molecular, Sigma Aldrich). Se utilizó la enzima Acetilcolinesterasa AChE ($\geq 60\%$ biuret, Sigma Aldrich) y un sustrato compuesto por Na_2HPO_4 (>98%, Sigma Aldrich), ácido 5,5-ditiobis-[2-nitrobenzónico] (DTNB) ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich) y ioduro de acetilcolina (ACTI) ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich).

Para la elaboración de los prototipos de las formulaciones se utilizaron como conservantes KoraloneBio-Clean™ (principio activo Metilisotiazolinona y Clorometilisotiazolinona 1,5%, Rohm and Haas - Dow Chemicals), y soluciones de NaOH 0,1M y ácido cítrico 0,1M para ajustar el pH. Como tensoactivos se utilizaron Tween® 80 (grado USP, Sigma Aldrich) y ECOSURF™ SA-9 (Dow Chemicals). Para las pruebas microbiológicas se emplearon como medios de cultivo para bacterias Agar nutritivo y para hongos y levaduras Sabouraud con cloranfenicol (antibiótico).

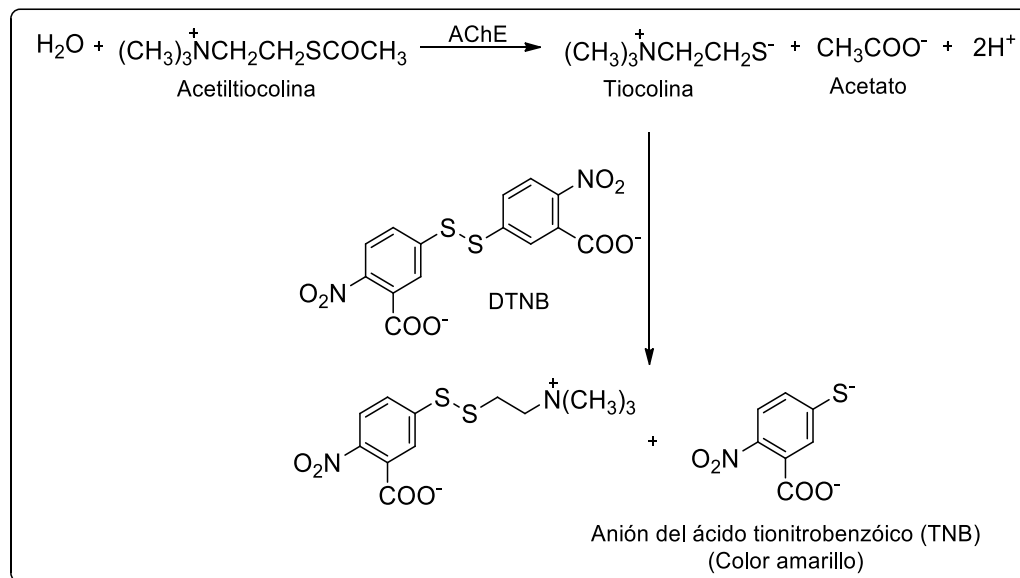
8.1.2 Determinación de las dosis letales en el gorgojo del arroz. La dosis letal (DL) es la cantidad de sustancia que se necesita para generar un determinado % de mortalidad (% M) en una especie de insecto. Así la DL_{50} hace referencia a la concentración necesaria para generar la muerte del 50% de los insectos en el ensayo, por lo que es una manera de medir el potencial tóxico a corto plazo de un insecticida. Para medir las DL se emplearon ensayos de impregnación de superficie tal como se establecieron en el capítulo 1. Se utilizaron tubos de ensayo de vidrio de 4 mL a los cuales se les aplicó 100 μL de solución a 5 concentraciones subletales aleatorias de los extractos en etanol al 96% v/v (3%, 2,6%, 1,9%, 1,2% y 0,8% p/v). Como control negativo se empleó solamente etanol al 96% v/v.

Los tratamientos se dejaron secar a temperatura ambiente por 10 minutos. A continuación, fueron introducidos 8 gorgojos por tarro, con 0,08 g de alimento (arroz)

y se cerraron con una malla que permitía el intercambio de gases con el exterior. Los experimentos se realizaron en total en nueve réplicas, por lo que en cada tratamiento se usaron 72 individuos. Cada bioensayo se realizó por triplicado en días diferentes. El registro de mortalidad se realizó a las 144 h pos tratamiento. El % M se obtuvo con la ecuación de Abbott (Ecuación 2). Los resultados se sometieron a un análisis estadístico Probit con el programa computacional MINITAB, obteniéndose las dosis subletales (DL₉₀ y DL₅₀) de los extractos de hoja de nim para el gorgojo del arroz.

8.1.3 Dilucidación del mecanismo de acción insecticida por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Para la determinación de la AChE se utilizó la metodología modificada de Ellman, que se basa en un ensayo colorimétrico, donde en lugar de utilizar acetilcolina (compuesto que no presenta propiedades espectroscópicas características), se utiliza la acetiltiocolina como sustrato alternativo (Figura 37)[92].

Figura 37. Mecanismo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

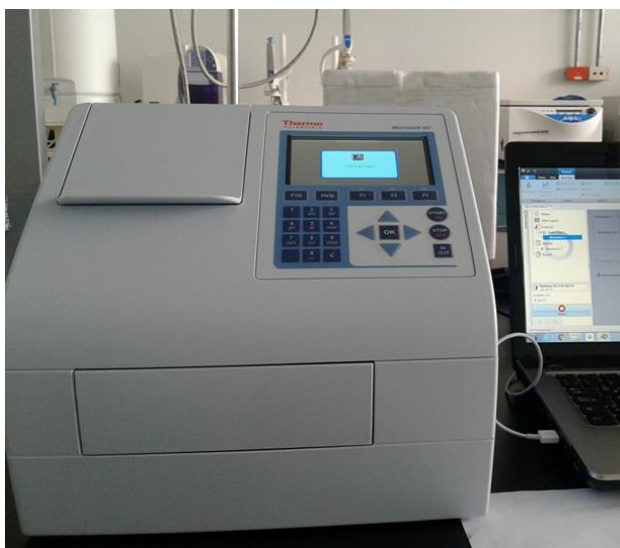


Fuente: López *et al.* [92]

En dicho mecanismo, para permitir su detección por medio de espectrofotometría se acopla una reacción a la conversión. La acetiltiocolina se hidroliza por medio de la AChE produciendo sus respectivos compuestos tiol. Éste es interceptado por el ácido 5,5´ditiobis [2-nitrobenzóico] (DTNB) formando un enlace bisulfuro y liberando el anión TNB de color amarillo.

Para medir la actividad enzimática se empleó el método de Ellman modificado por López *et al.* [93][92]. Las absorbancias se midieron a 412 nm en un lector de microplacas (espectrofotómetro Multiskan™ GO Thermo Scientific) (Figura 38). Cada una de las microplacas contaba con 96 pocillos.

Figura 38. Lector de microplacas Multiskan™ GO ThermoScientific



Para medir la actividad enzimática de los extractos de hoja de nim, se efectuó la mezcla en las microplacas de la muestra (disoluciones seriadas en buffer PBS), enzima AChE (0,25 mM en buffer fosfato) y buffer PBS (8 mM K_2HPO_4 , 2,3 mM NaH_2PO_4 , 0,15 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7,6). Las placas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se añadió a cada pocillo una solución de sustrato (0,1 M Na_2HPO_4 , 0,5 M ácido 5,5-ditiobis-[2-nitrobenzoico] (DTNB), 0,6

mM ioduro de acetilcolina (ACTI) en agua destilada, pH 7,5). Los compuestos fueron evaluados por triplicado en disoluciones seriadas de 30 ppm, 15 ppm, 8 ppm, 4 ppm y 2 ppm. El porcentaje de inhibición enzimática se calculó con la Ecuación 6.

Ecuación 6. Porcentaje de inhibición

$$\% \text{ de inhibición} = \left(1 - \frac{\text{U/ml con inhibidor}}{\text{U/ml sin inhibidor}} \right) \times 100$$

Donde U es la unidad de actividad enzimática.

8.1.4 Evaluación del uso de tensoactivos no iónicos en formulaciones insecticidas con extractos de hoja de nim. Entre las formulaciones más empleadas se encuentran los concentrados emulsionables, sin embargo, éstos utilizan disolventes orgánicos que son perjudiciales para el hombre y su medio ambiente, por lo que las nuevas formulaciones de plaguicidas se realizan a base de agua. Dado que en los capítulos anteriores se ha demostrado la baja miscibilidad que tienen los compuestos insecticidas del nim en agua[94], se evaluaron los efectos de dos tensoactivos en las formulaciones insecticidas con extractos de hojas de nim que tuvieran un balance hidrófilo-lipófilo (HLB por sus siglas en inglés) entre 10 y 15: Tween® 80 (HLB=15) y ECOSURF™ SA-9 (HLB=11). Estos tensoactivos fueron seleccionados por ser hidrófilos, no iónicos, buena capacidad de dispersión y baja toxicidad [95].

Para la preparación de las muestras se tomaron volúmenes iguales de los extractos, los cuales fueron rotoevaporados hasta sequedad. Para las muestras con tensoactivos se rediluyeron en diferentes relaciones de estos. A continuación, se agregó agua hasta obtener cinco mezclas con una concentración constante de extracto, correspondiente a la dosis letal 50 (DL₅₀) en el gorgojo del arroz, pero con diferente concentración de tensoactivo así: 0%, 1,5 %, 2,5%, 3,5% y 4,5% v/v.

Finalmente las mezclas se agitaron a 500 rpm por 20 min con un agitador magnético a temperatura ambiente, con el fin de homogenizarlas[96].

Para medir la estabilidad de las formulaciones, las muestras fueron sometidas a 4 ciclos de enfriamiento (5°C) y calentamiento (40°C), cada uno de 2 h[95]. Al final se realizó una inspección visual para ser evaluada la ocurrencia de sedimentación o cremado. A continuación, se escogieron para cada uno de los tensoactivos la menor concentración a la cual los formulados presentaron estabilidad en la prueba anterior. A los formulados seleccionados se les evaluó su actividad insecticida en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie, según la metodología establecida en el capítulo 1. Como controles se tomó el extracto al 2,6% p/v diluido en etanol (DL₅₀) y soluciones de los tensoactivos sin extracto a las mismas concentraciones establecidas para los formulados.

8.1.5 Evaluación del efecto del pH, concentración del conservante y agua en la estabilidad de los formulados insecticidas. Para establecer los valores óptimos del pH, la concentración de conservante (%C) y de agua (%A), que permitieran maximizar la estabilidad fisicoquímica y microbiológica de los formulados insecticidas a partir de los extractos de hoja de nim, se realizaron pruebas de estabilidad aceleradas y se escogió un diseño de superficie de respuesta tipo *Box-Behnken*. En la Tabla 14 se presentan los niveles para cada una de las variables.

Tabla 14. Niveles de los parámetros del diseño de experimentos tipo *Box-Behnken*

	Bajo	Medio	Alto
pH	3	6	9
%A (% v/v)	80	87,5	95
%C (% v/v)	0	0,15	0,30

El diseño fue completamente aleatorio y consistió en 15 combinaciones, incluyendo tres repeticiones del punto central y se realizó por duplicado. Para la preparación de las muestras, se estableció que el volumen total fue de 25 mL. Los extractos se rotoevaporaron hasta sequedad y se agregó el porcentaje de tensoactivo establecido en el numeral anterior. A continuación, se agregó el conservante y el agua destilada en las proporciones establecidas en el diseño experimental. Luego se ajustó el pH, utilizando soluciones de hidróxido de sodio 0,1 M y ácido cítrico 0,1 M con un phmetro digital (Schott Instruments). Por último, las muestras se aforaron a 25 mL con alcohol etílico al 96% y se envasaron en recipientes de polietileno opacos.

Las pruebas de estabilidad acelerada se utilizan en la industria, en especial la farmacéutica, para establecer el tiempo de vida útil del producto. Para las pruebas de estabilidad, realizadas siguiendo el protocolo establecido por el Ministerio de la Protección Social de Colombia, las muestras se almacenaron por dos meses en una incubadora a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del $75\pm 5\%$ [97]. Las condiciones empleadas permiten aumentar la cinética de degradación del principio activo y el desarrollo de microorganismos, por lo que, en dos meses, se puede simular el comportamiento que el producto tendría en dos años de almacenamiento en anaquel.

Para probar la estabilidad de la AZA, se empleó el método de caracterización por HPLC que se estableció en el capítulo 1. Para la cuantificación del porcentaje de degradación de la AZA (%DAZA), se utilizó la Ecuación 7.

Ecuación 7. Porcentaje de degradación de AZA (%DAZA)

$$\%DAZA = \left(\frac{AZA_{\text{inicial}} - AZA_{\text{final}}}{AZA_{\text{inicial}}} \right) \times 100$$

Para la medición de la generación de microorganismos en los formulados, se empleó la metodología de cuantificación de biomasa por peso seco. Las muestras fueron filtradas al vacío, utilizando un filtro de papel punto azul, que permite la retención de partículas de entre 2 y 3 μm . Previamente los filtros se depositaron en cajas de Petri, se secaron en una estufa a 120°C por 24 h y se registró su peso. Después de ser filtradas las muestras se pusieron a secar a las mismas condiciones por 24 h y se registró el peso. La producción de biomasa (PB) se calculó con la Ecuación 8.

Ecuación 8. Producción de biomasa

$$PB(g) = (\text{Peso de filtro} + \text{biomasa seca})(g) - \text{Peso del filtro}(g)$$

Fuente: Farras y Giménez [98]

Para la generación del diseño de experimentos y el análisis estadístico, se utilizó el software Minitab 11. Las variables de respuesta se minimizaron con lo cual se obtiene mayor estabilidad del producto insecticida. Para validar los resultados obtenidos por el modelo matemático por superficie de respuesta, se preparó el formulado con los valores óptimos encontrados, se realizaron los estudios de estabilidad acelerada por 20 días a 40°C y se caracterizaron las muestras en cuanto a PB y % DAZA. Los valores de los resultados experimentales se compararon con los predichos por el modelo minimizado. Con estas mismas muestras se encontró el tiempo de vida útil del producto insecticida, utilizando la metodología del Ministerio de la Protección Social (Anexo 1) [97].

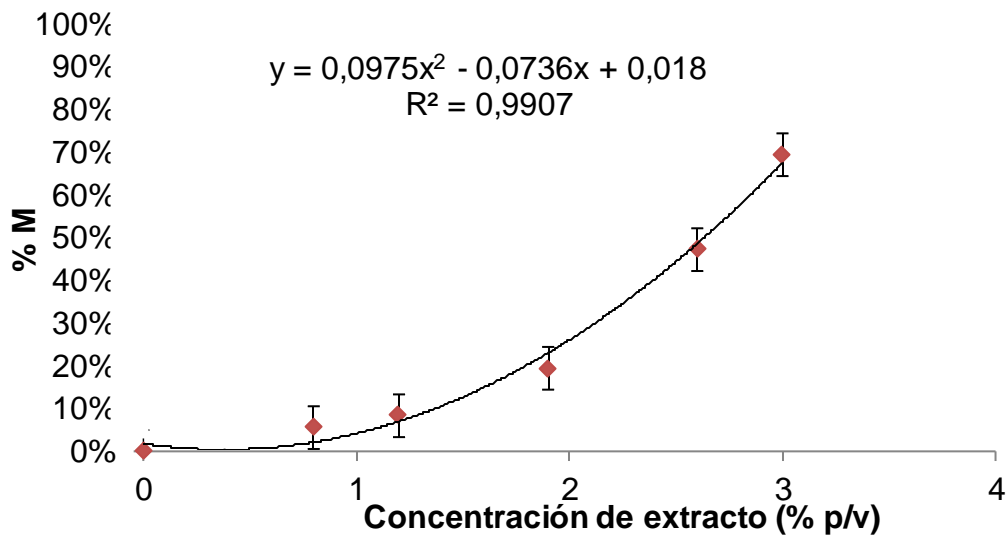
8.1.6. Evaluación de la actividad insecticida del producto formulado en el gorgojo del arroz. Con los resultados obtenidos se estableció la fórmula cualitativa del insecticida a partir de los extractos de hoja del nim. Se preparó el formulado insecticida y utilizando los protocolos establecidos en Capítulo 1, se

evaluó la mortalidad en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie, a tiempos de exposición de 12, 24, 48, 72 y 144 h de exposición por contacto.

8.2 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.2.1 Determinación de las dosis letales de los extractos de hoja de nim en el gorgojo del arroz. La curva de concentración de extracto (% p/v) contra el porcentaje de mortalidad (%M) del gorgojo del arroz por impregnación de superficie no porosa a las 144 h de exposición, se presenta en la Figura 39. En esta figura se muestra que el efecto insecticida aumenta de forma cuadrática a medida que aumenta la cantidad del extracto etanólico de las hojas del árbol de nim. Tal como se muestra en la figura en el control, cuando no hay presencia del extracto, no se presentó mortalidad.

Figura 39. Concentración de los extractos de hoja de nim diluidos en etanol al 96% v/v contra el porcentaje de mortalidad en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie a las 144 h de exposición



A partir de los datos de mortalidad del gorgojo del arroz por impregnación de superficie, utilizando un análisis Probit, se encontraron las DL₅₀ y DL₉₀ que se presentan en la Tabla 15. Los resultados muestran que la DL₅₀ después de 144 h de exposición, fue de 2,6% ± 0,13 p/v y la DL₉₀ fue de 3,9% ± 0,31 p/v.

Tabla 15. DL₅₀ y DL₉₀ de los extractos etanólicos de hoja de nim diluidos en etanol al 96% v/v en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie a las 144 h (Chi cuadrado $X^2 = 2,364$).

	% p/v	IC 95% (índice de confianza)	
DL ₅₀	2,6 ± 0,13	2,37	2,94
DL ₉₀	4,0 ± 0,31	3,52	4,85

Azmi *et al.*, por su parte, evaluaron el efecto insecticida de un extracto de semilla de nim comercial (Neem RB-a) en comparación con un piretroide comercial (Coopex) en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie. Los resultados obtenidos mostraron que mientras con el piretroide obtenían una DL₅₀ de 6,128 µg/cm², para el extracto de nim no se evidenció mortalidad a ninguna concentración [99]. Estos resultados difieren de los obtenidos en este trabajo, pues en esta investigación los resultados obtenidos, muestran que los extractos de hoja de nimaún a bajas concentraciones poseen un efecto tóxico por contacto el gorgojo del arroz.

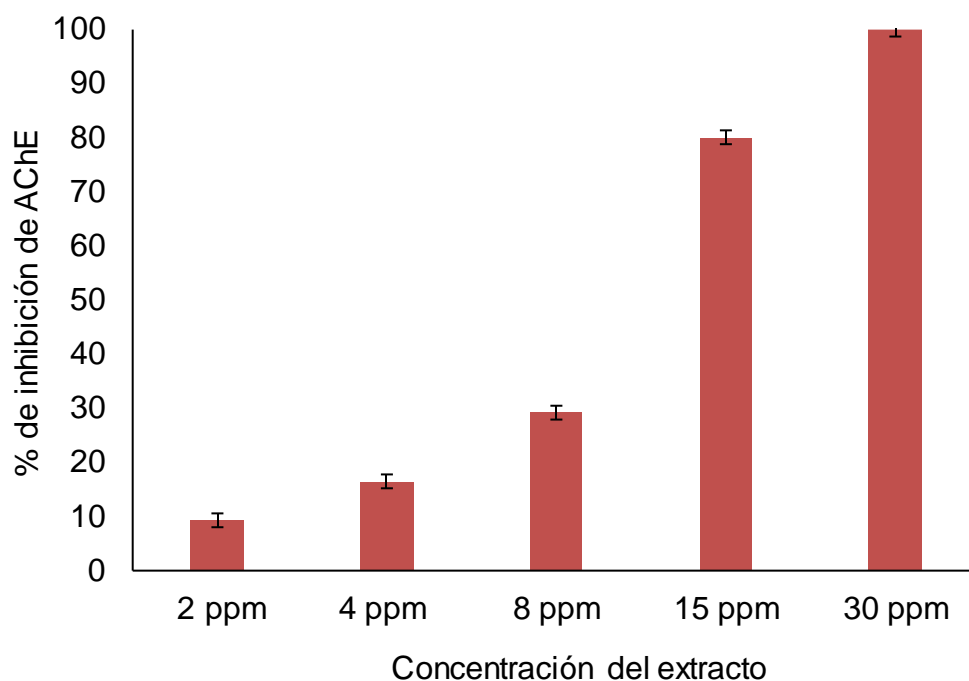
Por otro lado, Athanassiou *et al.* evaluaron la actividad insecticida del NeemAzal, el cual es un reconocido insecticida preparado a base de extractos de semilla de nim, por contacto en adultos del gorgojo del arroz. Este producto tiene una concentración de AZA de 2000 ppm, por lo que el producto fue diluido con agua destilada para ajustar las concentraciones a 50, 100 y 200 ppm. Sus resultados muestran que a 144 h la mortalidad es aproximadamente del 50% a una concentración de 50 ppm [33]. En esta investigación, la concentración necesaria de AZA fue de 468 ppm para obtenerla DL₅₀, lo cual es muy superior a lo que reportan otros autores. Lo anterior

se puede deber a que el NeemAzal, al ser un producto ya formulado, puede contener otros coadyuvantes como tensoactivos que mejoran la humectación y la penetración del producto en los tejidos del insecto, por lo que se necesitaría una menor concentración de AZA para conseguir el mismo efecto.

8.2.2 Dilucidación del mecanismo de acción insecticida por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). Existen muchos mecanismos de acción por los cuales un insecticida provoca la muerte del insecto. Los compuestos presentes en los extractos del nim pueden tener una amplia gama de efectos y dianas moleculares, los cuales no han sido ampliamente estudiados. Los compuestos producidos por el nim son ampliamente conocidos por afectar las etapas del crecimiento, pues afectan la acción de ciertas hormonas como la de la muda (ecdisona), generando que los insectos no puedan pasar de las etapas inmaduras o malformaciones a la etapa adulta. Sin embargo, esto no explica la muerte de los insectos debido al efecto de los extractos de nim cuando son expuestos a éstos en su etapa adulta, tal como se ha demostrado en esta investigación.

Cuando se observan al microscopio los gorgojos del arroz muertos por la exposición a los extractos de hoja de nim, se aprecia que sus extremidades generalmente se encuentran extendidas, algo que también se evidencia cuando se exponen a insecticidas neurotóxicos como el malatión, tal como se expuso en el capítulo 1. Estos efectos generalmente se producen por la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), lo cual provoca una sobre estimulación de los músculos, generando convulsiones y parálisis, lo que al final provoca la muerte del insecto. Teniendo en cuenta lo anterior se evaluó la inhibición *in vitro* de extractos de hoja de nim en esta enzima y los resultados se presentan en la Figura 40.

Figura 40. Porcentaje de inhibición de la enzima AChE *in vitro* a diferentes concentraciones de los extractos de hoja de nim.



Los resultados muestran que los compuestos presentes en los extractos de las hojas del nim inhibieron la actividad de la AChE. Los porcentajes de inhibición aumentaron al aumentar la concentración de extracto, sin embargo, incluso a la concentración más baja de 2 ppm se observó un 9,27% de inhibición, mientras que con la concentración más alta de 30 ppm se alcanzó el 100% de inhibición de la enzima AChE. Esto indica que la inhibición de la enzima AChE podría ser uno de los mecanismos por los cuales los extractos de nim producen la muerte de los insectos.

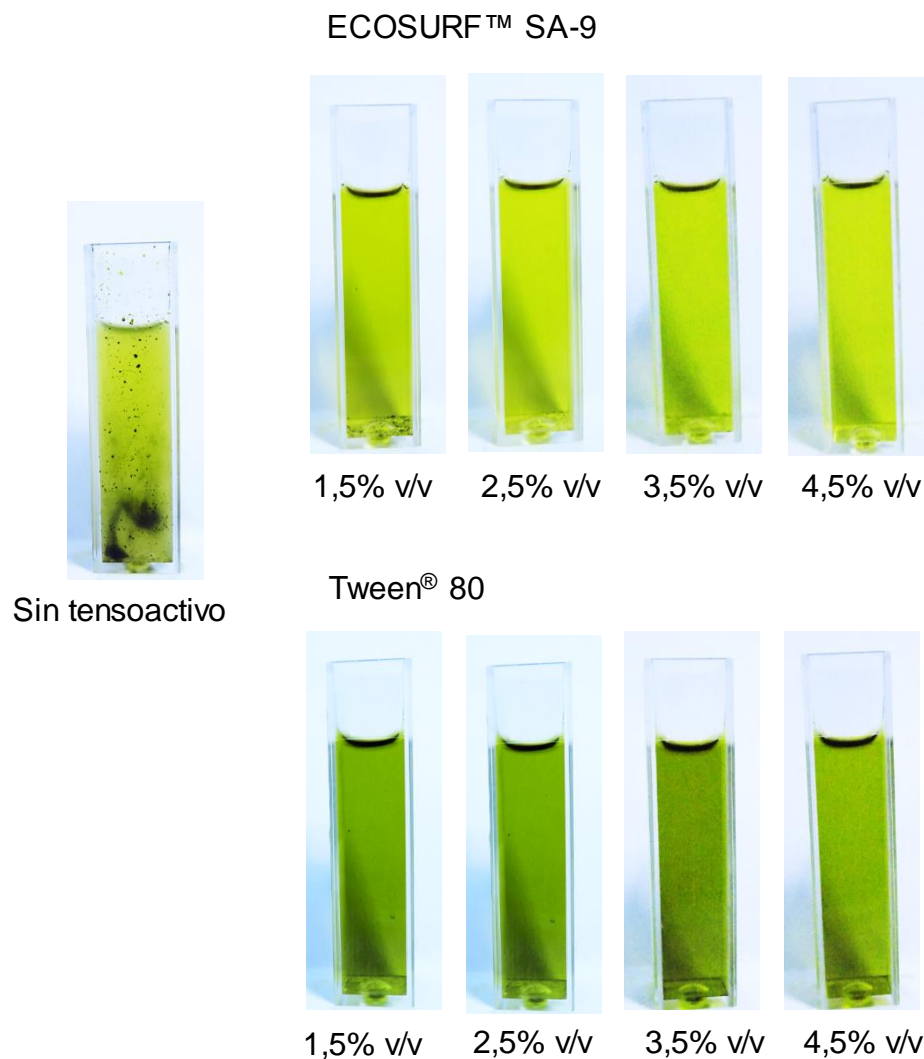
En estudios *in vivo*, autores como Shafeek *et al.* evaluaron la inhibición de la AChE por la aplicación tópica de la AZA en la *Periplaneta americana* (cucaracha americana). Sus resultados mostraron que a 4 ppm de AZA no se presentó ninguna alteración significativa en la actividad de AChE [43]. No obstante, Nathan *et al.*

encontraron por aplicación tópica de AZA en *Nilaparvatalugens* (saltamontes marrón) a una concentración de 0,5 ppm, que se inhibía significativamente la actividad de la AChE[42].

La diferencia entre los resultados obtenidos por los autores muestra que, aunque el compuesto tenga acción inhibitoria en la AChE, su efecto *in vivo*, dependerá en gran medida de la especie y de la ruta de entrada. Como se mostró en el capítulo 1 para el caso del gorgojo del arroz, tanto por aplicación tópica dorsal y ventral los insecticidas no muestran ningún efecto, a diferencia del método de contacto con una superficie impregnada con los compuestos. Esto indica que dependiendo de la especie, los insectos pueden tener zonas de su cuerpo más esclerotizadas que otras, lo que influirá en la efectividad de la actividad insecticida del compuesto.

8.2.3 Evaluación del uso de tensoactivos no iónicos en formulaciones insecticidas con extractos de hoja de nim. En la Figura 41 se aprecian las formulaciones insecticidas obtenidas a una concentración de extracto de 2,6% p/v (DL₅₀) a las diferentes concentraciones de los dos tensoactivos evaluados, después de 4 ciclos de calentamiento-enfriamiento.

Figura 41. Formulados insecticidas a partir de los extractos de hoja de nim al 2,6% p/v, con diferentes concentraciones de Tween® 80 y ECOSURF™ SA-9 después de 4 ciclos de 2 h de enfriamiento (5°C) y calentamiento (40°C)

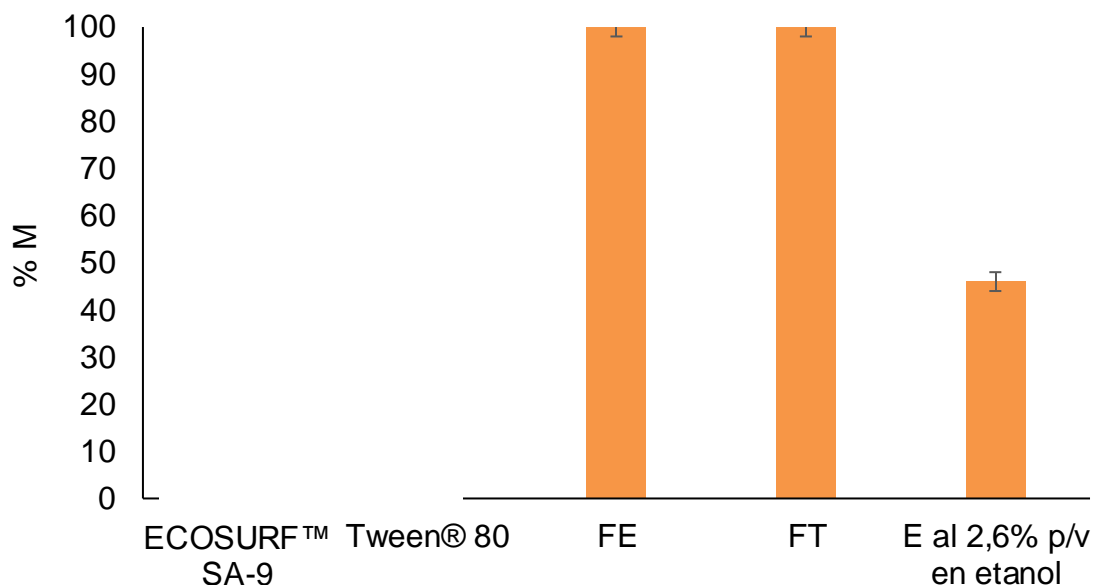


En la figura se observa que cuando no se agrega tensoactivo, no se da una dispersión homogénea de los extractos y se presenta la sedimentación de los mismos. Lo anterior se entiende por la baja solubilidad de los extractos de la hoja de nim en agua, lo que hace necesario el uso de tensoactivos en las formulaciones insecticidas. Para el caso de los formulados en los cuales se utilizó ECOSURF™

SA-9 como tensoactivo, a la menor concentración (1,5% v/v) se observó que se presenta sedimentación de una parte del extracto, mientras que para el resto de concentraciones del tensoactivo no se observaron precipitados. Por otro lado, los insecticidas formulados con Tween® 80, incluso a la menor concentración, permanecieron homogéneos y no se evidenció la presencia de sedimentos.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionó la menor concentración de tensoactivo posible para evitar la precipitación de los extractos: para el ECOSURF™ SA-9 se escogió la concentración del 2,5% v/v y para el Tween® 80 se escogió la concentración del 1,5% v/v. En la Figura 42 se presentan los resultados de las pruebas de actividad insecticida de los formulados en los gorgojos del arroz por impregnación de superficie después de 144 h de exposición.

Figura 42. Efecto de la actividad insecticida en el gorgojo del arroz por impregnación de superficie con los formulados: ECOSURF™ SA-9 a 2,5% v/v (FE) y Tween® 80 a 1,5% v/v (FT) con una concentración de extracto (E) del 2,6% p/v después de 144 h de exposición.



En la Figura 42 se observa que la mortalidad de los formulados utilizando los dos tensoactivos fue del 100%. Al comparar estos resultados con el extracto a la misma

concentración (2,6% p/v) sin el agregado de tensioactivos, se observa que al agregar los tensioactivos la mortalidad se duplica. Al evaluar el efecto tóxico de la solución de tensioactivos en agua sin extracto, se aprecia que no se presenta mortalidad en el gorgojo del arroz. Brariy Thakur probaron el efecto tóxico del Tween 80 en el gorgojo del arroz por contacto con superficie, encontrando que incluso a concentraciones altas de $5 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ del tensioactivo la mortalidad fue de tan sólo el $12\% \pm 2,1$, similar a los resultados obtenidos en esta investigación [100]. Lo anterior confirma que los tensioactivos empleados no tienen por sí solos actividad insecticida, pero los mismos funcionan como coadyuvantes en la formulación de los extractos de la hoja de nim.

El aumento de la mortalidad del gorgojo del arroz al aplicar los extractos de hoja de nim con el agregado de un tensioactivo, se puede explicar por varios mecanismos. En primer lugar, los tensioactivos mejoran la dispersión de los extractos cuando se aplican sobre una superficie, pues al reducirse la tensión superficial, se forma una capa homogénea en lugar de gotas dispersas [80]. Este efecto permite que los insectos tengan mayor contacto con los compuestos insecticidas, lo que conlleva al aumento de la mortalidad. Por otro lado, la cutícula de los insectos está cubierta por una capa lipídica hidrofóbica que sirve como una barrera natural para la adsorción de compuestos por parte del insecto. Al agregar un tensioactivo, éste podría formar una capa hidrófoba sobre los compuestos activos del nim, lo cual facilitaría la adsorción de los compuestos insecticidas [101].

Aunque los dos tensioactivos tienen un comportamiento similar como coadyuvantes en cuanto a la acción insecticida, para el caso del Tween[®] 80 se necesita una concentración menor en la formulación en comparación con el ECOSURF[™] SA-9. Por lo anterior se establece como tensioactivo el Tween[®] 80 a una concentración del 1,5% v/v para la formulación final del insecticida a partir de los extractos de las hojas del nim.

8.2.4 Evaluación del efecto del pH, concentración del conservante y agua en la estabilidad de los formulados insecticidas. En la Tabla 16 se presentan los resultados para cada uno de los puntos del diseño, en cuanto al peso de biomasa seca y %DAZA, obtenidos en colaboración con Rodríguez. Los resultados muestran que la mayor cantidad de biomasa producto de la degradación del extracto se presenta a un pH de 9, a una % C del 0,30% v/v y una % A del 87,5% v/v. La mayor degradación de la AZA se produjo a un pH de 6, una % C de 0,30 % y una % A del 95% v/v.

Tabla 16. Ensayo de estabilidad acelerada: Peso de biomasa seco (g) y % DAZA con respecto al pH, % C y % A en formulados de insecticidas a partir de extractos de hojas almacenados por dos meses en una incubadora a $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa del $75\pm 5\%$

pH	% C (v/v)	% A (v/v)	Peso Biomasa (g)	% DAZA
3	0,30	87,5	$2,9 \pm 0,0$	$41,3 \pm 2,3$
3	0,15	95,5	$1,9 \pm 0,1$	$46,4 \pm 3,7$
3	0,15	80,0	$4,0 \pm 0,1$	$37,2 \pm 0,9$
3	0,00	87,5	$2,3 \pm 0,0$	$37,4 \pm 2,2$
6	0,15	87,5	$2,7 \pm 0,1$	$54,3 \pm 3,2$
6	0,15	87,5	$2,9 \pm 0,1$	$75,8 \pm 2,4$
6	0,00	95,0	$3,5 \pm 0,2$	$85,7 \pm 2,5$
6	0,30	80,0	$4,9 \pm 0,4$	$53,9 \pm 2,0$
6	0,15	87,5	$2,1 \pm 0,1$	$65,5 \pm 0,6$
6	0,00	80,0	$3,5 \pm 0,2$	$82,9 \pm 2,6$
6	0,30	95,0	$1,0 \pm 0,3$	$93,9 \pm 3,4$
9	0,15	95,0	$1,3 \pm 0,1$	$79,9 \pm 0,0$
9	0,15	80,0	$2,4 \pm 0,2$	$65,4 \pm 3,2$
9	0,30	87,5	$5,0 \pm 0,2$	$86,0 \pm 0,0$
9	0,00	87,5	$1,7 \pm 0,5$	$86,7 \pm 0,2$

Fuente: Rodríguez.

Con los puntos experimentales encontrados se establecieron los modelos matemáticos para evaluar la estabilidad de los formulados relacionando el peso seco de biomasa generada (Ecuación 9) y el % DAZA (Ecuación 10), con los cuales se generaron las respectivas superficies de respuesta (Figuras 43-45).

Ecuación 9. Modelo matemático que describe la producción de biomasa (PB) dependiendo del pH, concentración de conservante (% C) y concentración de agua (% A). R² de 72,22%

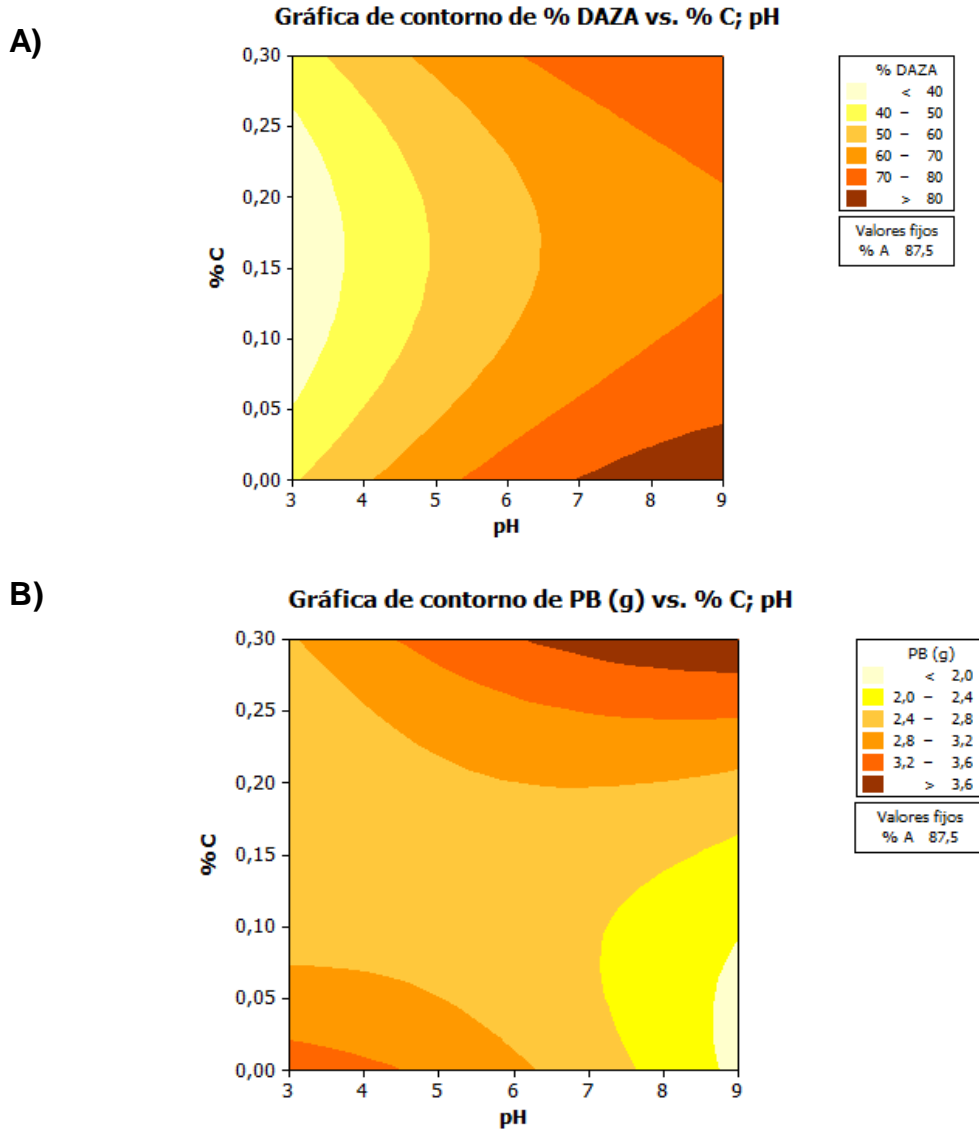
$$PB = -10,8 - 0,74(\text{pH}) + 63,32(\%C) + 0,37(\%A) - 0,04(\text{pH}^2) + 19,70(\%C)^2 - 0,002(\%A^2) + 1,48(\text{pH})(\%C) + 0,01(\text{pH})(\%A) - 0,86(\%C)(\%A)$$

Ecuación 10. Modelo matemático que muestra el porcentaje de degradación del AZA (% DAZA) dependiendo del pH, concentración de conservante (% C) y concentración de agua (% A). R² de 92,82%

$$\% \text{ DAZA} = 804,14 + 19,41(\text{pH}) - 817,50(\%C) - 18,60(\%A) - 0,71(\text{pH})^2 + 633,01(\%C)^2 + 0,11(\%A)^2 - 2,58(\text{pH})(\%C) - 0,05(\%C)(\%A) + 7,13(\%C)(\%A)$$

En la Figura 43 se observan las gráficas de contorno para la PB y el % DAZA generados con respecto al pH y % C (% v/v), manteniendo constante el % A en un valor de 87,5% v/v. En la Figura 43-A se observa que la mayor PB se da a un pH alcalino cercano a 9 y altas concentraciones de conservante cercanas a 0,30% v/v. Por otro lado, a baja concentración de conservante y un pH cercano a 9 disminuye la PB. A su vez, en el centro de la gráfica se aprecia una zona de baja PB. En la Figura 43-B se aprecia que cuando aumenta el pH, aumenta el % DAZA. Los menores % DAZA se producen a pH ácido, cercano a 3 y una concentración de conservante de 0,15% v/v.

Figura 43. Gráficas de contorno del % DAZA (A) y PB (B) con respecto al pH y el % C, a un % A constante de 87,5 % v/v, después de 20 días de almacenamiento a una T de 40°C y HR de 70%.

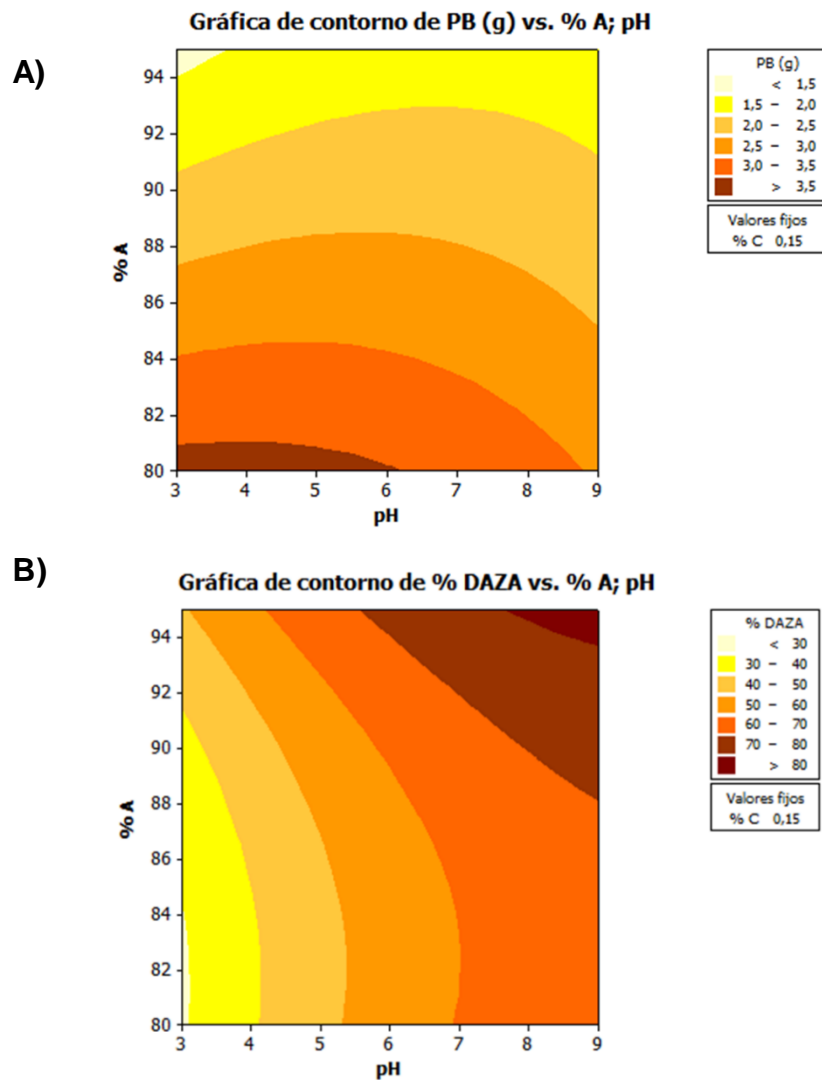


Fuente: Rodríguez.

El efecto del % C y el pH se puede explicar teniendo en cuenta que el conservante KoraloneBio-Clean™ es un producto que actúa de forma óptima a pH neutro y ácido a valores cercanos a 0,15% v/v (ficha técnica Anexo 2).

En la Figura 44 se presentan los gráficos de contorno para la PB y % DAZA con respecto al pH y % A (% v/v), manteniendo constante el % C en un valor de 0,15% v/v. En la Figura 44-A se aprecia que cuando aumenta el porcentaje de agua a pH ácido, disminuye la PB. En la Figura 44-B se observa que para el % DAZA, aumenta con el pH y el % A.

Figura 44. Gráficas de contorno del % DAZA (A) y PB (B) con respecto al pH y el % A, a un % C constante de 0,15 % v/v, después de 20 días de almacenamiento a una T de 40°C y HR de 70%.

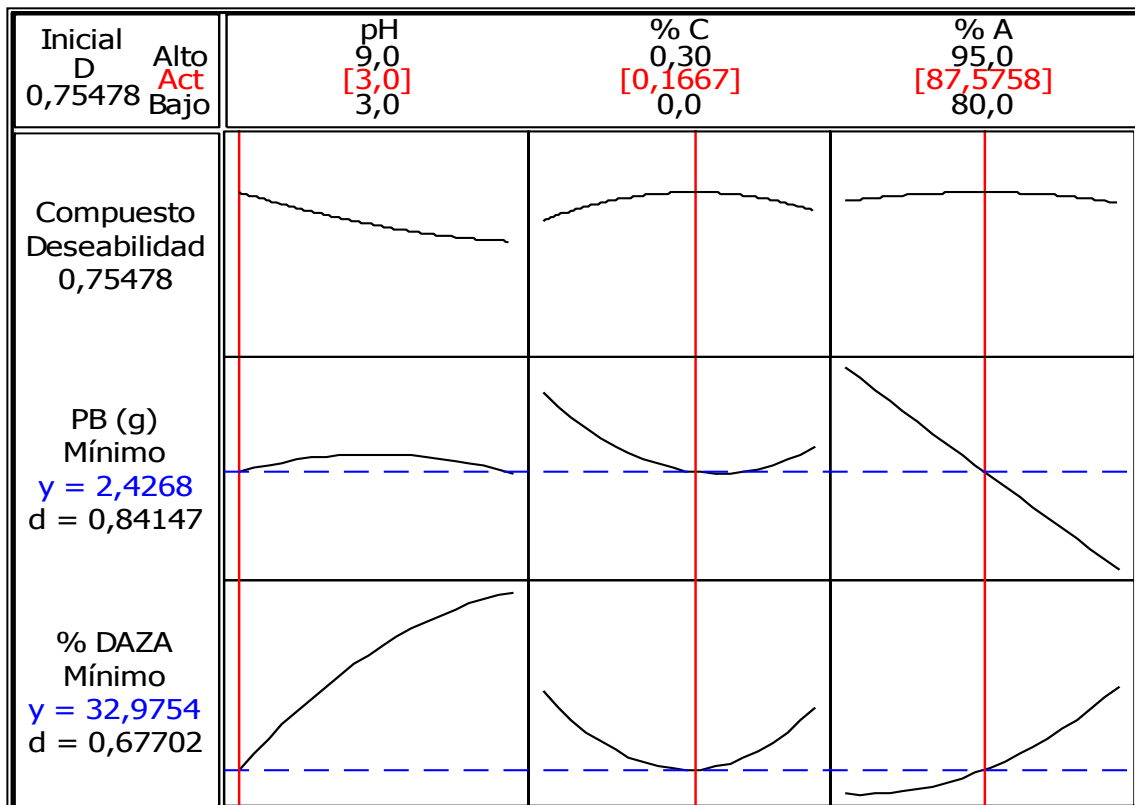


Fuente: Rodríguez

La azadiractina es una molécula altamente oxigenada, por lo que, al aumentar el contenido de agua, se favorece su hidrólisis. Szeto y Wan estudiaron la hidrólisis de la AZA a diferentes pH, encontrando que a 35°C, la reacción de hidrólisis siguió una cinética de pseudo-primer siendo las constantes de velocidad mayores a pH alcalino que a pH ácido [102].

En la Figura 45 se observan los resultados de la variación de los parámetros (pH, %C y %A) que permiten la minimización de la PB y el % DAZA en los intervalos establecidos, los cuales fueron obtenidos utilizando el software estadístico Minitab 11. Se observa que según el modelo matemático los valores a los cuales el producto es más estable son un pH de 3, una %C del 0,16% v/v y un % A del 87% v/v.

Figura 45. Valores de pH, % C y % A, que permiten minimizar el % DAZA y la PB



Fuente: Rodríguez

En la Figura 46 se presentan los resultados de % DAZA y en la Figura 47 los del PB después de dos meses de almacenamiento a una T de 40°C y una HR 70%, a las condiciones óptimas de pH (3,0), %C (0,16% v/v) y % A (87,57% v/v), comparados con los resultados mínimos teóricos ($PB_{\text{teórico}}= 0,84$ g y $\% \text{ DAZA}_{\text{teórico}}= 32,97\%$) que arroja el modelo matemático.

Figura 46. Comparación de los datos teóricos y experimentales del % DAZA, después de dos meses de almacenamiento a una T de 40°C y una HR 70% ($p=0,14$).

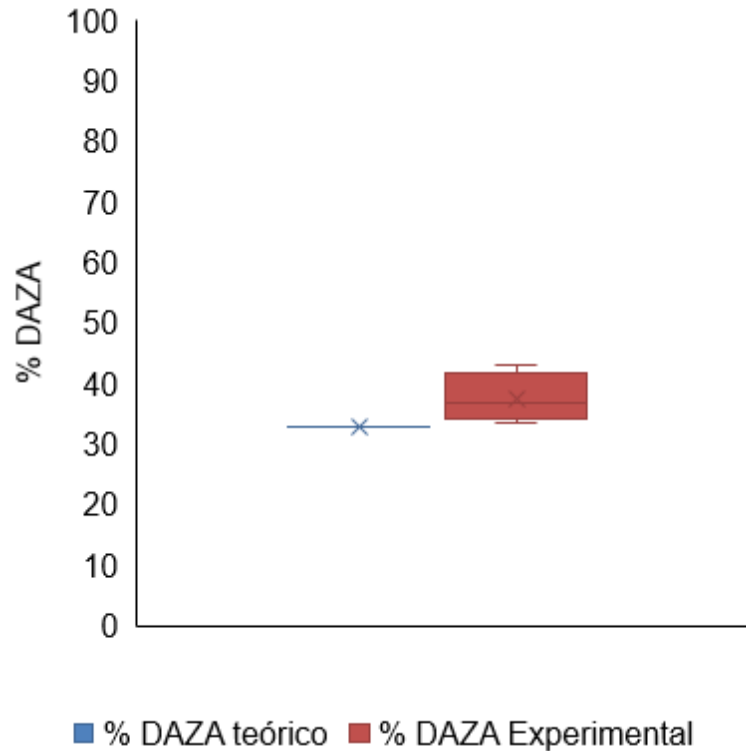
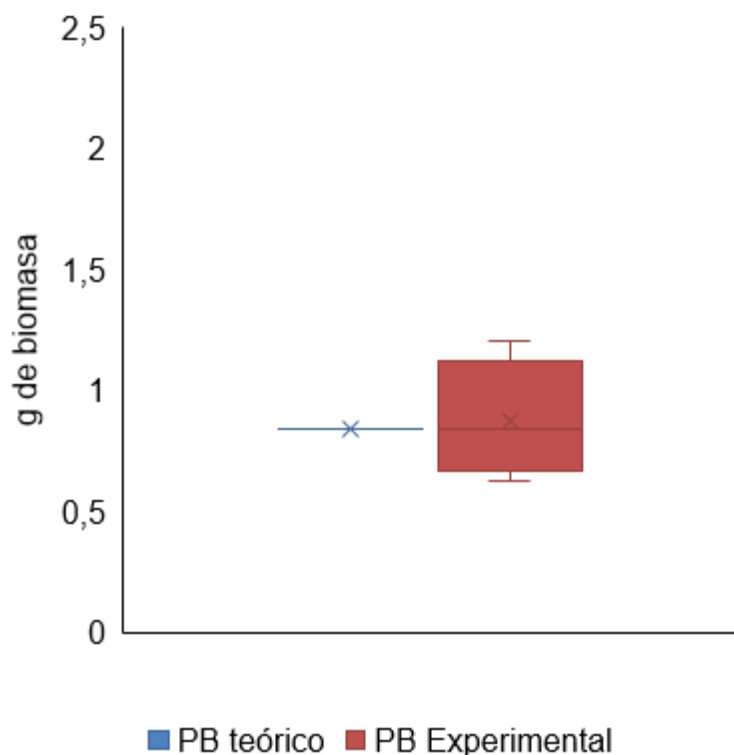


Figura 47. Comparación de los datos teóricos y experimentales de PB, después de dos meses de almacenamiento a una T de 40°C y una HR 70% ($p=1,00$).



Los valores de respuesta experimentales con los predichos por el modelo no presentan diferencias significativas ($p>0,05$) para las dos variables de respuesta. Por lo anterior se puede decir que el modelo predice de forma adecuada el efecto del pH, % C y % A en la estabilidad de los formulados a partir de los extractos de hoja de nim en almacenamiento. Con estos resultados y utilizando la metodología del Ministerio de la Protección Social para estudios de estabilidad, se calculó que el tiempo de vida útil del producto es de 24 meses.

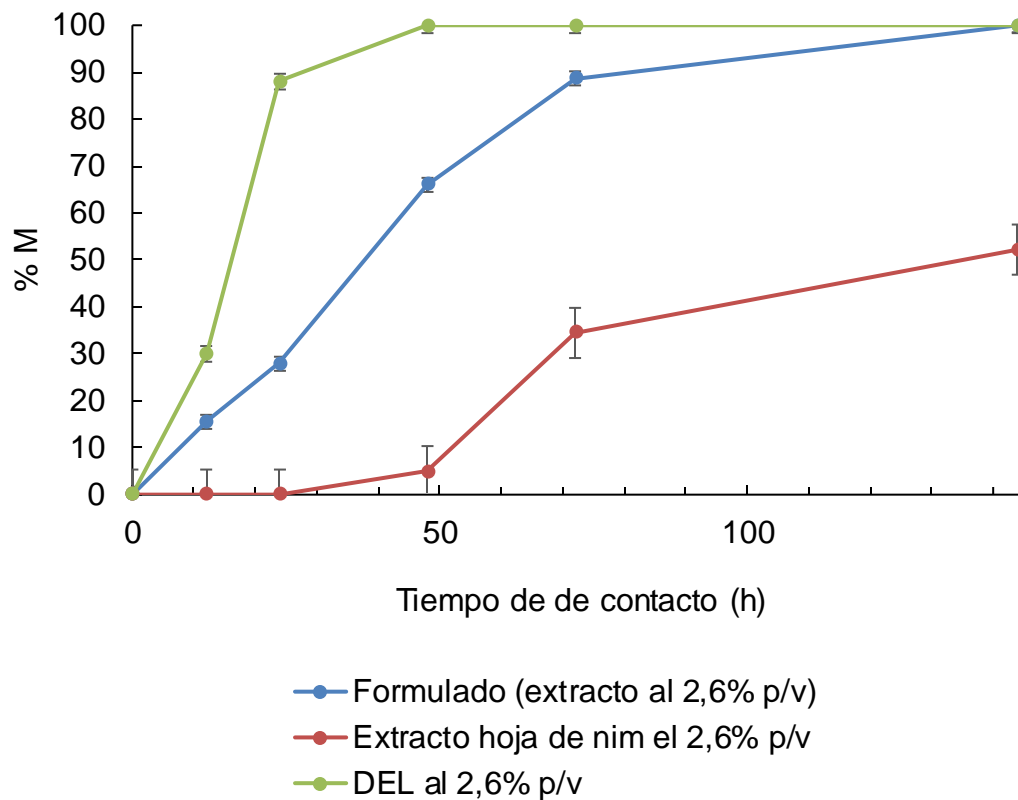
8.2.5 Evaluación de la actividad insecticida del formulado a partir de extractos de hoja de nim en el gorgojo de arroz. En la Tabla 17 se encuentra la fórmula cuali-cuantitativa del formulado insecticida a partir de los extractos de hoja de nim.

Tabla 17. Fórmula cuali-cuantitativa del formulado insecticida a partir de los extractos de árbol de nim para el control del gorgojo del arroz.

Compuesto	Función	Concentración
Extracto de hoja de hoja de nim	Principio activo insecticida	2,6% v/v
Tween 20	Coadyuvante tensoactivo	1,5% v/v
Agua	Diluyente	87,5% v/v
Etanol	Diluyente	8,1% v/v
Koralone	Conservante	0,30% v/v
Ácido cítrico	Regulador del pH	Hasta pH 3
	Total	100%

Con esta formulación se preparó el insecticida y se probó su actividad en cuanto a mortalidad por contacto con superficie, en el gorgojo del arroz. En la Figura 48 se observan los resultados en la mortalidad del gorgojo del arroz por impregnación de superficie obtenidos con el insecticida formulado a partir de los extractos de hoja de nim, comparándolos con los que se obtienen con el insecticida comercial deltametrina (DEL) al 2,6% p/v en etanol y los extractos de hoja de nim al 2,6% p/v en etanol sin aditivos.

Figura 48. %M del gorgojo del arroz versus el tiempo de contacto por impregnación de superficie del formulado, el extracto de hojas del nimal 2,6 % v/v, y DEL al 2,6% v/v.



Los resultados de la prueba muestran que el formulado logra la misma mortalidad que la Deltametrina a concentraciones iguales a las 144 h de ensayo. También se aprecia que la actividad insecticida del formulado duplica la actividad insecticida conseguida con los extractos de hoja de nim sin ningún aditivo. Lo anterior se debe a que, a pesar de que los aditivos por sí solos no tienen actividad insecticida, aumentan la actividad insecticida de los extractos de nimal actuar como coadyuvantes, aumentando la mortalidad de los mismos. Posiblemente este efecto se deba a que el tensoactivo permite que los extractos se dispersen mejor en una superficie y además puedan adsorberse mejor por el insecto.

8.3 CONCLUSIONES

Se encontró que para los extractos de la hoja del nim la DL₅₀ fue 2,6% p/v y la DL₉₀ fue 4% p/v. Se encontró que los extractos de hoja de nim inhibieron la enzima AChE comercial en pruebas *in vitro*, lo cual es una prueba preliminar que indica que este podría ser el mecanismo de acción insecticida de los compuestos presentes en la hoja del nim.

Se determinó que para aumentar la estabilidad del formulado y su actividad insecticida se debe agregar el tensoactivo Tween 80 a una concentración de 1,5% v/v. A su vez, en pruebas de estabilidad acelerada se establecieron el valor del pH de 3, la concentración de conservante de 0,3% v/v y agua de 87,5% v/v, lo que permite minimizar la degradación del formulado. Finalmente, el producto formulado permitió alcanzar el 100% de mortalidad en aplicación en superficie, siendo igualmente efectivo que el insecticida comercial para el tratamiento de la plaga del gorgojo del arroz.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Se estableció un proceso para la extracción por maceración de los compuestos insecticidas a partir de las hojas del árbol de nim que permite maximizar el contenido de AZA, empleando como solvente de extracción etanol, a una relación hoja/solvente del 32,6% p/v, un tiempo de extracción de 48 h y una velocidad de agitación de 363 rpm. Además, se pudieron establecer protocolos para la caracterización de los extractos en cuanto al contenido de AZA por HPLC utilizando un estándar interno de α -terpineol y evaluando su actividad insecticida en el gorgojo del arroz.

Con los extractos de la hoja de nim se formuló un bioinsecticida que presentó mortalidad por contacto en el gorgojo del arroz, con resultados comparables a la del tаметrina, insecticida químico perteneciente a la familia de los piretroides ampliamente empleados en el control de plagas en el sector agroindustrial. Se determinó que los tensoactivos no iónicos empleados en la formulación tienen una función como coadyuvantes mejorando la estabilidad de la solución y aumentando la actividad insecticida del formulado. El formulado insecticida tiene un tiempo de vida útil de 18 meses a un valor de pH de 3, una concentración de conservante de 0,3% v/v y una concentración de agua del 87,5% v/v.

Por último, puede concluirse que los extractos de hoja de nim en formulados bioplaguicidas, tienen un gran potencial para su uso en el control de plagas agroindustriales como el gorgojo del arroz, permitiendo sustituir los insecticidas convencionales que pueden generar daños al medio ambiente y en la salud humana.

10. RECOMENDACIONES

Para complementar los resultados obtenidos en la inhibición de la AChE por parte de los extractos de la hoja del nim, se recomienda realizar estudios *in vivo*, que permitan establecer el mecanismo de acción de estos compuestos en el organismo del insecto.

Con el fin de dar continuidad a esta investigación se recomienda realizar pruebas en otras especies de insectos plagas del sector agroindustrial, en especial otras plagas que afecten a los granos almacenados, evaluando su efecto en diferentes estadios de su ciclo de vida.

Se recomienda realizar pruebas de campo con el bioinsecticida formulado, para establecer posibles interacciones con el medio y otros factores que podrían afectar su desempeño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. Pérez Correa, “Una visión del desarrollo rural en Colombia,” *Cuadernos de Desarrollo Rural*, no. 41, 2012.
- [2] FAO, “Perspectivas de cosechas y situación alimentaria,” no. 2, 2015.
- [3] C. D. G. Tovar and B. S. O. Colonia, “Producción y procesamiento del maíz en Colombia,” *Revista Científica Guillermo de Ockham*, vol. 11, no. 1, 2015.
- [4] FAO, “Agricultura Orgánica: una herramienta para el desarrollo rural sostenible y la reducción de la pobreza,” *Memorias de taller celebrado Del 19 al 21 de mayo de 2003, Turrialba, Costa Rica*, p. 111p., 2003.
- [5] Fenalce, “Área, producción y rendimientos de cereales y leguminosas en Colombia. Información semestral por producto y por departamentos (2002 - 2014).,” 2015.
- [6] FAO, *Semillas En Emergencia, Manual técnico*. 2011.
- [7] R. Albajes, “Integrated Pest Management integrated pest management,” in *Sustainable Food Production*, Springer, 2013, pp. 1003–1034.
- [8] J. D. Sedlacek, P. A. Weston, and R. J. Barney, “Lepidoptera and psocoptera,” *Integrated management of insects in stored products*, pp. 41–70, 1995.
- [9] R. Yan, Z. Huang, H. Zhu, J. A. Johnson, and S. Wang, “Thermal death kinetics of adult *Sitophilus oryzae* and effects of heating rate on thermotolerance,” *Journal of Stored Products Research*, vol. 59, pp. 231–236, 2014.
- [10] S. R. Davis, “Rostrum structure and development in the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionoidea: Dryophthoridae),” *Arthropod Structure and Development*, vol. 40, no. 6, pp. 549–558, 2011.
- [11] N. B. Singh and R. N. Sinha, “Carbohydrate, lipid and protein in the developmental stages of *Sitophilus oryzae* and *S. granarius* (Coleoptera: Curculionidae),” *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 70, no. 1, pp. 107–111, 1977.
- [12] H. van den Berg, M. Zaim, R. S. Yadav, A. Soares, B. Ameneshewa, A.

- Mnzava, J. Hii, A. P. Dash, and M. Ejov, "Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases," *Environmental health perspectives*, vol. 120, no. 4, pp. 577–582, 2012.
- [13] S. James, W. Takken, F. H. Collins, and M. Gottlieb, "Needs for monitoring mosquito transmission of malaria in a pre-elimination world," *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 90, no. 1, pp. 6–10, 2014.
- [14] A. K. Chopra, M. Sharma, and S. Chamoli, "Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system—an overview," *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 173, no. 1–4, pp. 905–916, 2011.
- [15] A. F. Hernández, T. Parrón, A. M. Tsatsakis, M. Requena, R. Alarcón, and O. López-Guarnido, "Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health," *Toxicology*, vol. 307, no. 0, pp. 136–145, May 2013.
- [16] Y. Oulhote and M. F. Bouchard, "Urinary Metabolites of Organophosphate and Pyrethroid Pesticides and Behavioral Problems in Canadian Children," *Environmental Health Perspectives*, vol. 121, no. 11–12, pp. 1378–1384, 2013.
- [17] R. N. C. Guedes, J. G. Lima, J. P. Santos, and C. D. Cruz, "Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae)," *Journal of Stored Products Research*, vol. 31, no. 2, pp. 145–150, 1995.
- [18] M. F. Vicente, A. Basilio, A. Cabello, and F. Peláez, "Microbial natural products as a source of antifungals," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 9, no. 1, pp. 15–32, Jan. 2003.
- [19] W. Roca, "Estudio de las capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina," *Informe preparado para la Corporación Andina de Fomento (CAF) y la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). Centro Internacional de la Papa–CIP, Lima. Perú*, 2003.
- [20] K. Biswas, I. Chattopadhyay, R. K. Banerjee, and U. Bandyopadhyay,

- “Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*),” *Current Science*, vol. 82, no. 11, pp. 1336–1345, 2002.
- [21] D. Villamil, N. Naranjo, and M. Van Satrahlen, “Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (*Azadirachta*,” *EntomoBrasilis*, vol. 0, pp. 0–4, 2012.
- [22] J. Dai, V. a. Yaylayan, G. S. V Raghavan, J. R. J. Paré, Z. Liu, and 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,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 10, pp. 4584–4588, 2001.
- [23] H. Schmutterer, “The neem tree: *Azadirachta indica* A. Juss and other meliaceae plants: sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes,” *Weinheim (Germany)*. VCH., 1995.
- [24] I. Akca, C. Tuncer, A. Guler, and I. Saruhan, “Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae),” *J. Anim. Vet. Adv*, vol. 8, no. 3, pp. 436–440, 2009.
- [25] G. S. Mann and G. S. Dhaliwal, “Safety of azadirachtin to honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus, foragers,” *Pesticide Research Journal*, vol. 13, no. 1, pp. 118–121, 2001.
- [26] K. M. S. Sundaram, “Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects,” *Journal of Environmental Science & Health Part B*, vol. 31, no. 4, pp. 913–948, 1996.
- [27] G. Tovar-Corso, “Aproximación a la silvicultura urbana en Colombia,” *Bitácora Urbano Territorial*, vol. 1, no. 22, 2013.
- [28] C. R. M. Pulido, “La silvicultura como elemento crítico para la sostenibilidad y el manejo del bosque,” *Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)*, vol. 5, no. 1, pp. 147–153, 2015.
- [29] C. P. Flórez-Flórez, J. D. León-Peláez, N. W. Osorio-Vega, and M. F.

- Restrepo-Llano, "Dinámica de nutrientes en plantaciones forestales de *Azadirachta indica* (Meliaceae) establecidas para restauración de tierras degradadas en Colombia," *Rev. Biol. Trop.*, vol. 61, no. 2, pp. 515–529, 2013.
- [30] G. Prakash and A. K. Srivastava, "Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures," *Process Biochemistry*, vol. 40, no. 12, pp. 3795–3800, 2005.
- [31] S. M. P. Carneiro, F. A. A. Carvalho, L. C. L. Santana, A. P. L. Sousa, J. M. M. Neto, and M. H. Chaves, "The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A. Juss.)," *Biological research*, vol. 45, no. 2, pp. 111–116, 2012.
- [32] R. Pavela, "Limitation of Plant Biopesticides," in *Advances in Plant Biopesticides*, Springer, 2014, pp. 347–359.
- [33] C. G. Athanassiou, D. C. Kontodimas, N. G. Kavallieratos, and M. A. Veroniki, "Insecticidal effect of NeemAzal against three stored-product beetle species on rye and oats.," *Journal of economic entomology*, vol. 98, no. 5, pp. 1733–1738, 2005.
- [34] A. Koodalingam, R. Deepalakshmi, M. Ammu, and A. Rajalakshmi, "Effects of NeemAzal on marker enzymes and hemocyte phagocytic activity of larvae and pupae of the vector mosquito *Aedes aegypti*," *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 17, no. 2, pp. 175–181, 2014.
- [35] N. Yadav, S. Kumar, R. Kumar, P. Srivastava, L. Sun, P. Rapali, T. Marlowe, A. Schneider, J. R. Inigo, and J. O'Malley, "Mechanism of neem limonoids-induced cell death in cancer: Role of oxidative phosphorylation," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 90, pp. 261–271, 2016.
- [36] Y. López-Pantoja, M. Angulo-Escalante, C. Martínez-Rodríguez, J. Soto-Beltrán, and C. Chaidez-Quiroz, "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, no. 4, pp. 117–125, 2007.
- [37] M. Venzon, M. C. Rosado, M. A. M. Fadini, A. I. Ciociola, and A. Pallini, "The

- potential of NeemAzal for the control of coffee leaf pests,” *Crop protection*, vol. 24, no. 3, pp. 213–219, 2005.
- [38] R. Nauen, A. Elbert, A. McCaffery, R. Slater, and T. C. Sparks, “IRAC: insecticide resistance, and mode of action classification of insecticides,” *Modern Crop Protection Compounds, Volumes 1-3, Second Edition*, pp. 935–955, 2012.
- [39] S.-I. Kim, J.-Y. Roh, D.-H. Kim, H.-S. Lee, and Y.-J. Ahn, “Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*,” *Journal of Stored Products Research*, vol. 39, no. 3, pp. 293–303, 2003.
- [40] C. G. Athanassiou, A. S. Papagregoriou, and C. T. Buchelos, “Insecticidal and residual effect of three pyrethroids against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored wheat,” *Journal of Stored Products Research*, vol. 40, no. 3, pp. 289–297, 2004.
- [41] S. Tine, N. Aribi, and N. Soltani, “Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L.(Dictyoptera, Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 85, pp. 19816–19824, 2014.
- [42] S. S. Nathan, M. Y. Choi, H. Y. Seo, C. H. Paik, K. Kalaivani, and J. D. Kim, “Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål),” *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 70, no. 2, pp. 244–250, 2008.
- [43] A. Shafeek, R. P. J. Prasanthi, G. H. Reddy, C. S. Chetty, and G. R. Reddy, “Alterations in acetylcholinesterase and electrical activity in the nervous system of cockroach exposed to the neem derivative, azadirachtin,” *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 59, no. 2, pp. 205–208, 2004.
- [44] S. W. Kim, J. Kang, and I. K. Park, “Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity,” *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol. 16, no. 4, pp. 443–448, 2013.

- [45] C. M. Boursier, D. Bosco, a. Coulibaly, and M. Negre, "Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A?," *Crop Protection*, vol. 30, no. 3, pp. 318–322, 2011.
- [46] J. Dai, V. A. Yaylayan, G. S. Vijaya Raghavan, J. R. Pare, and Z. Liu, "Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin-related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 49, no. 3, pp. 1169–1174, 2001.
- [47] O. Schaaf, A. P. Jarvis, S. A. van der Esch, G. Giagnacovo, and 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," *Journal of Chromatography A*, vol. 886, no. 1, pp. 89–97, 2000.
- [48] H. Soni, K. Mishra, S. Sharma, and A. K. Singhai, "Characterization of Azadirachtin from ethanolic extract of leaves of *Azadirachta indica*," *Journal of Pharmacy Research*, vol. 5, no. 1, pp. 199–201, 2012.
- [49] R. Thejavathi, S. R. Yakkundi, and B. Ravindranath, "Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard," *Journal of Chromatography A*, vol. 705, no. 2, pp. 374–379, 1995.
- [50] J. Dai, V. A. Yaylayan, G. S. V. Raghavan, and J. R. Parè, "Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, no. 9, pp. 3738–3742, 1999.
- [51] P. D. Alves, M. G. L. Brandão, E. a. Nunan, and C. D. Vianna-Soares, "Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 19, no. 2 B, pp. 510–515, 2009.
- [52] J. A. M. de Paula, L. F. Brito, K. L. F. N. Caetano, M. C. de Moraes Rodrigues, L. L. Borges, and E. C. da Conceição, "Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss.(Meliaceae)

- and its determination by a validated HPLC-PDA method,” *Talanta*, vol. 149, pp. 77–84, 2016.
- [53] S. Dubhashi, V. Pranay, M. Singaiah, and J. Satwik, “Studies on extraction and HPLC Analysis of Azadirachtin from Kernels of Neem Seeds,” *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research Jan-Mar*, vol. 3, no. 1, 2013.
- [54] G. Esparza-Díaz, J. López-Collado, J. a. Villanueva-Jiménez, F. Osorio-Acosta, G. Otero-Colina, and E. Camacho-Díaz, “Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss.,” *Agrociencia*, vol. 44, no. 7, pp. 821–833, 2010.
- [55] D. Arias, G. Vázquez, W. Acosta, L. Montanez, R. Alvarez, and V. Pérez, “Determinación del Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*),” *Revista INGENIERÍA UC*, vol. 16, no. 3, pp. 22–26, 2009.
- [56] I. Hismath, W. M. Wan Aida, and C. W. Ho, “Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves.,” *International Food Research Journal*, vol. 18, no. 3, 2011.
- [57] L. Zhang, A. S. Ravipati, S. R. Koyyalamudi, S. C. Jeong, N. Reddy, J. Bartlett, P. T. Smith, M. de la Cruz, M. C. Monteiro, and Á. Melguizo, “Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs,” *Asian Pacific journal of tropical medicine*, vol. 6, no. 9, pp. 673–681, 2013.
- [58] G. Brusotti, I. Cesari, A. Dentamaro, G. Caccialanza, and G. Massolini, “Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 87, pp. 218–228, 2014.
- [59] V. Sharma, S. Walia, J. Kumar, M. G. Nair, and B. S. Parmar, “An efficient method for the purification and characterization of nematocidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 14, pp. 3966–3972, 2003.
- [60] A. P. Jarvis, E. D. Morgan, and C. Edwards, “Rapid separation of triterpenoids

- from neem seed extracts,” *Phytochemical Analysis*, vol. 10, no. 1, pp. 39–43, 1999.
- [61] D. R. Schroeder and K. Nakanishi, “A simplified isolation procedure for azadirachtin,” *Journal of natural products*, vol. 50, no. 2, pp. 241–244, 1987.
- [62] C. Gallardo, C. Rojas, and A. Flórez, “La temperatura cinética media en los estudios de estabilidad a largo plazo y almacenamiento de los medicamentos,” *Vitae (Medellín)*, vol. 11, no. 1/2, pp. 67–72, 2004.
- [63] A. P. Jarvis, S. Johnson, and E. D. Morgan, “Stability of the natural insecticide azadirachtin in aqueous and organic solvents,” *Pesticide science*, vol. 53, no. 3, pp. 217–222, 1998.
- [64] E. C. Reyes, S. W. Valero, and D. A. Garay, “Estudio preliminar de las propiedades físicas de la especie *Azadirachta indica* (Neem) procedente del estado Falcón (Venezuela),” *Revista Forest. Venez.*, vol. 47, no. 2, pp. 23–29, 2003.
- [65] A. Gehlot, R. K. Gupta, A. Tripathi, I. D. Arya, and S. Arya, “Vegetative propagation of *Azadirachta indica*: effect of auxin and rooting media on adventitious root induction in mini-cuttings,” *Advances in Forestry Science*, vol. 1, no. 1, pp. 1–9, 2014.
- [66] M. A. Zabala, M. J. A. Velásquez, A. M. A. Cardona, J. M. R. Flórez, and C. M. Vallejo, “Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales,” *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*, vol. 62, no. 1, pp. 4881–4895, 2009.
- [67] G. Sepúlveda-Jiménez, H. Porta-Ducoing, and M. Rocha-Sosa, “La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas,” *Rev Mex Fitopatol*, vol. 21, pp. 355–363, 2004.
- [68] C. Ruiz, F. Tunarosa, J. Martínez, and E. Stashenko, “Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia organoides* HBK, obtenidos por diferentes técnicas de extracción,” *Scientia et Technica*, vol. 1, no. 33, 2007.
- [69] Y. M. Linton, A. J. Nisbet, and A. J. Mordue, “The effects of azadirachtin on

- the testes of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål),” *Journal of Insect Physiology*, vol. 43, no. 11, pp. 1077–1084, 1997.
- [70] P. Dayanandan, A. Stephen, and B. Muruganandam, “Location of neem triterpenoids and other secretory structures,” *Singh, R, P., Chari, M, S., Raheja, A, K., Kraus, W ed (s). Neem and environment*, vol. 1, pp. 141–149, 1993.
- [71] J. Zhao, L. C. Davis, and R. Verpoorte, “Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites,” *Biotechnology Advances*, vol. 23, no. 4, pp. 283–333, 2005.
- [72] M. E. Torrenegra, C. Granados, M. R. Osorio, and G. León, “Comparación de la Hidro-destilación Asistida por Radiación de Microondas (MWHd) con Hidro-destilación Convencional (HD) en la Extracción de Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*,” *Información tecnológica*, vol. 26, no. 1, pp. 117–122, 2015.
- [73] M. Y. Liauw, F. A. Natan, P. Widiyanti, D. Ikasari, N. Indraswati, and F. E. Soetaredjo, “Extraction of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) using n-hexane and ethanol: studies of oil quality, kinetic and thermodynamic,” *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 49–54, 2008.
- [74] M. Roustan, J. C. Pharamond, and A. Liné, “Techniques de l’ingénieur, traité de génie des procédés,” *Doc. J*, vol. 3, p. 803, 1999.
- [75] B. A. Cohn, “Developmental and environmental origins of breast cancer: DDT as a case study,” *Reproductive Toxicology*, vol. 31, no. 3, pp. 302–311, Apr. 2011.
- [76] M. T. O. Moscardó, R. J. Peydró, M. A. T. Llácer, and J. M. Marí, “Situación actual en España de los aerosoles insecticidas registrados en Sanidad Ambiental para uso doméstico,” *Revista española de salud pública*, vol. 77, no. 3, pp. 383–391, 2003.
- [77] B. Ballantyne, T. C. Marrs, and T. Syversen, *General and applied toxicology*, 2nd ed. Londres: Macmillan, 2000.
- [78] H. Riedl, S. Pons, and J. A. Hernández, “Efecto del momento de aplicación,

- utilización de coadyuvantes y volumen de tratamiento en el efeactividad de tebufenocida para el control de *Cydia Pomonella* (L.)(Lepidoptera: Tortricidae),” *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, vol. 24, no. 4, pp. 921–934, 1998.
- [79] D. H. Lewis, “Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers,” *Drugs and the pharmaceutical sciences*, vol. 45, pp. 1–41, 1990.
- [80] T. Liu and P. A. Stansly, “Insecticidal activity of surfactants and oils against silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii*) nymphs (Homoptera: Aleyrodidae) on collards and tomato,” *Pest management science*, vol. 56, no. 10, pp. 861–866, 2000.
- [81] J. Dai, V. a. Yaylayan, G. S. V. Raghavan, J. R. Parè, and Z. Liu, “Multivariate calibration for the determination of total azadirachtin-related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 3, pp. 1169–1174, 2001.
- [82] Z. L. Liu and S. H. Ho, “Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst),” *Journal of Stored Products Research*, vol. 35, no. 4, pp. 317–328, 1999.
- [83] A. Dinuta, H. Bunescu, M. Proorocu, I. Bodis, and S. Oros, “RESEARCHES CONCERNING THE EXTERNAL MORPHOLOGY OF GRANARY WEEVIL’S ADULT (*SITOPHILUS GRANARIUS* L.), A MAJOR PEST OF THE STORED CEREALS,” *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, vol. 65, no. 1, 2008.
- [84] T. Stadler, “Normalización de las variables ecofisiológicas durante el desarrollo de *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae),” *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, vol. 14, no. 4, pp. 541–552, 1988.
- [85] W. S. Abbott, “A method of computing the effectiveness of an insecticide,” *J. econ. Entomol*, vol. 18, no. 2, pp. 265–267, 1925.
- [86] L. Liu, Y.-L. Zhao, G.-G. Cheng, Y.-Y. Chen, X.-J. Qin, C.-W. Song, X.-W. Yang, Y.-P. Liu, and X.-D. Luo, “Limonoid and Steroidal Saponin from

- Azadirachta indica,” *Natural products and bioprospecting*, vol. 4, no. 6, pp. 335–340, 2014.
- [87] J. Maria Beltrame, R. Almir Angnes, L. U. Rovigatti Chiavelli, W. Ferreira da Costa, M. Ferreira da Rosa, V. da Silva Lobo, and A. Mateus Pomini, “Photodegradation of essential oil from marjoram (*Origanum majorana* L.) studied by GC-MS and UV-VIS spectroscopy,” *Revista latinoamericana de química*, vol. 41, no. 2, pp. 81–88, 2013.
- [88] J. M. Guerrero, “Producción de extractos de *Azadirachta indica* (nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de *Sitophilus oryzae*,” Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, 2016.
- [89] H. V. V. Tomé, J. C. Martins, A. S. Corrêa, T. V. S. Galdino, M. C. Picanço, and R. N. C. Guedes, “Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*,” *Crop Protection*, vol. 46, pp. 63–69, 2013.
- [90] G. Dal Bello, S. Padin, P. Juarez, N. Pedrini, and M. De Giusto, “Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus oryzae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains,” *Biocontrol science and technology*, vol. 16, no. 2, pp. 215–220, 2006.
- [91] C. R. Pungitore, M. García, J. C. Gianello, M. E. Sosa, and C. E. Tonn, “Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae),” *Journal of Stored Products Research*, vol. 41, no. 4, pp. 433–443, 2005.
- [92] S. López, J. Bastida, F. Viladomat, and C. Codina, “Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts,” *Life Sciences*, vol. 71, no. 21, pp. 2521–2529, 2002.
- [93] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone, “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochemical pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 88–95, 1961.
- [94] M. J. Hopkinson, H. M. Collins, and Goss, *Pesticide Formulations and Application Systems*. American Society for Testing & Materials, 1997.
- [95] T. F. Tadros, *Interfacial Phenomena and Colloid Stability: Industrial*

Applications. De Gruyter, 2015.

- [96] S. Johnson and P. Dureja, "Effect of surfactants on persistence of azadirachtin-A (neem based pesticide)," *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 37, no. 1, pp. 75–80, 2002.
- [97] Ministerio de la Protección Social, *Documento técnico guía de estabilidad de medicamentos*. 2009, pp. 1–121.
- [98] R. P. Farràs and A. J. Giménez, *Bioquímica de los microorganismos*. Reverté, 1997.
- [99] M. A. Azmi, S. N. H. Naqvi, M. F. Khan, K. Akhtar, and F. Y. Khan, "Comparative toxicological studies of RB-a (Neem Extract) and Coopex (Permethrin+ Bioallethrin) against *Sitophilus oryzae* with reference to their effects on oxygen consumption and GOT, GPT activity," *Turkish Journal of Zoology*, vol. 22, no. 4, pp. 307–310, 1998.
- [100] J. Brari and D. R. Thakur, "Insecticidal potential properties of citronellol derived ionic liquid against two major stored grain insect pests," *Journal of Entomology and Zoology Studies*, vol. 4, pp. 365–370, 2016.
- [101] S. O. Andersen, "Biochemistry of insect cuticle," *Annual review of entomology*, vol. 24, no. 1, pp. 29–59, 1979.
- [102] S. Y. Szeto and M. T. Wan, "Hydrolysis of azadirachtin in buffered and natural waters," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 44, no. 4, pp. 1160–1163, 1996.

BIBLIOGRAFÍA

ABBOTT, W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. En: J. econ. Entomol. 1925. vol. 18, no. 2.

AKCA, I.; TUNCER, C.; GULER, A.; SARUHAN, I. Residual toxicity of 8 different insecticides on honey bee (*Apis mellifera* Hymenoptera: Apidae). En: Journal of Animal Veterinary Advice. 2009. vol. 8, no. 3.

ALBAJES, R. Integrated Pest Management integrated pest management. En: Sustainable Food Production, Springer, 2013.

ALVES, P.; BRANDÃO, M.; NUNAN, E.; VIANNA-SOARES, C. Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts," Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2009. vol. 19, no. 2 B.

ANDERSEN, S. Biochemistry of insect cuticle. En: Annual review of entomology. 1979. vol. 24, no. 1.

ARIAS, D.; *et. al.* Determinación del Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*). En: Revista INGENIERÍA UC. 2009. vol. 16, no. 3.

ATHANASSIOU, C.; KONTODIMAS, D.; KAVALLIERATOS, N.; VERONIKI, M. Insecticidal effect of NeemAzal against three stored-product beetle species on rye and oats. En: Journal of economic entomology. 2005. vol. 98, no. 5.

ATHANASSIOU, C.; PAPAGREGORIOU, A.; BUCHELOS, C. Insecticidal and residual effect of three pyrethroids against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera:

Curculionidae) on stored wheat. En: Journal of Stored Products Research. 2004. vol. 40, no. 3.

AZMI, M. *et. al.* Comparative toxicological studies of RB-a (Neem Extract) and Coopex (Permethrin+ Bioallethrin) against *Sitophilus oryzae* with reference to their effects on oxygen consumption and GOT, GPT activity,” Turkish Journal of Zoology, vol. 22, no. 4, 1998.

BALLANTYNE, B.; MARRS, T.; SYVERSEN, T. General and applied toxicology, 2nd ed. Londres: Macmillan, 2000.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). En: Current Science. 2002. vol. 82, no. 11.

BOURSIER, C.; BOSCO, D.; COULIBALY, A.; NEGRE, M. Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A? En: Crop Protection. 2011. vol. 30, no. 3

BRARI, J.; THAKUR, D. Insecticidal potential properties of citronellol derived ionic liquid against two major stored grain insect pests. En: Journal of Entomology and Zoology Studies. 2016. vol. 4.

BRUSOTTI, G.; *et. al.* Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. En: Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2014. vol. 87.

CARNEIRO, S. *et. al.* The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). En: Biological research. 2012. vol. 45, no. 2.

CHOPRA, A.; SHARMA, M.; CHAMOLI, S. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system—an overview. En: Environmental Monitoring and Assessment. 2014. vol. 173, no. 1–4.

COHN, B. Developmental and environmental origins of breast cancer: DDT as a case study. En: Reproductive Toxicology. Abril, 2011. vol. 31, no. 3.

DAI, J.; YAYLAYAN, V.; RAGHAVAN, G.; PARÈ, J. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999. vol. 47, no. 9.

DAI, J.; *et. al.* 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. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001. vol. 49, no. 10.

DAL BELLO, G.; *et. al.* Biocontrol of *Acanthoscelides obtectus* and *Sitophilus oryzae* with diatomaceous earth and *Beauveria bassiana* on stored grains. En: Biocontrol science and technology. 2006. vol. 16, no. 2.

DAVIS, S. Rostrum structure and development in the rice weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionoidea: Dryophthoridae). En: Arthropod Structure and Development. 2011. vol. 40, no. 6.

DAYANANDAN, P.; STEPHEN, A.; Muruganandam, B. Location of neem triterpenoids and other secretory structures,. En: Neem and environment. 1993. vol. 1.

DE PAULA, J.; *et. al.* Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss.(Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method. En: *Talanta*. 2016. vol. 149.

DINUTA, A.; BUNESCU, H.; PROOROCU, M; BODIS, I.; OROS, S. "Researches concerning the external morphology of granary weevil's adult (*Sitophilus Granarius* L.), a major pest of the stored cereals. En; *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture*, 2008. vol. 65, no. 1.

DUBHASHI, S.; PRANAY, V.; SINGAIAH, M.; SATWIK, J. Studies on extraction and HPLC Analysis of Azadirachtin from Kernels of Neem Seeds. En: *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. Enero-marzo, 2013. vol. 3, no. 1.

ELLMAN, G.; COURTNEY, K.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. En: *Biochemical pharmacology*. 1961. vol. 7, no. 2.

ESPARZA, G.; *et. al.* Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss. En: *Agrociencia*. 2010. vol. 44, no. 7.

FAO, *Agricultura Orgánica: una herramienta para el desarrollo rural sostenible y la reducción de la pobreza*. Turrialba (Costa Rica): Memorias de taller celebrado (19 – 21, mayo, 2003).

FAO, *Perspectivas de cosechas y situación alimentaria*. 2015. no. 2.

FAO, *Semillas En Emergencia, Manual técnico*. 2011.

FARRÀS, R.; GIMÉNEZ, A. *Bioquímica de los microorganismos*. Reverté, 1997.

FENALCE. Área, producción y rendimientos de cereales y leguminosas en Colombia. Información semestral por producto y por departamentos (2002 - 2014), 2015.

FLÓREZ, C.; LEÓN, D.; OSORIO, N.; RESTREPO, M. Dinámica de nutrientes en plantaciones forestales de *Azadirachta indica* (Meliaceae) establecidas para restauración de tierras degradadas en Colombia. En: *Revista de Biología Tropical*. 2013. vol. 61, no. 2.

GALLARDO, C.; ROJAS, C.; FLÓREZ, A. La temperatura cinética media en los estudios de estabilidad a largo plazo y almacenamiento de los medicamentos. En: *Vitae*. 2004. vol. 11, no. 1/2.

GEHLOT, A.; *et. al.* Vegetative propagation of *Azadirachta indica*: effect of auxin and rooting media on adventitious root induction in mini-cuttings. En: *Advances in Forestry Science*. 2014. vol. 1, no. 1.

GUEDES, R.; LIMA, J.; SANTOS, J.; CRUZ, C. Resistance to DDT and pyrethroids in Brazilian populations of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). En: *Journal of Stored Products Research*. 1995. vol. 31, no. 2.

GUERRERO, J. Producción de extractos de *Azadirachta indica* (nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de *Sitophilus oryzae*. Proyecto de grado Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2016.

HERNÁNDEZ, A.; *et. al.* Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health. En: *Toxicology*. Mayo, 2013. vol. 307, no. 0.

HISMATH, I.; WAN AIDA, W.; HO, C. Optimization of extraction conditions for phenolic compounds from neem (*Azadirachta indica*) leaves. En: International Food Research Journal. 2011. vol. 18, no. 3.

HOPKINSON, M.; COLLINS, H.; GOSS, L. Pesticide Formulations and Application Systems. En: American Society for Testing & Materials. 1997.

JAMES, S.; TAKKEN, W.; COLLINS, F.; GOTTLIEB, M. Needs for monitoring mosquito transmission of malaria in a pre-elimination world. En: The American journal of tropical medicine and hygiene. 2014. vol. 90, no. 1.

JARVIS, A.; JOHNSON, S.; MORGAN, E. Stability of the natural insecticide azadirachtin in aqueous and organic solvents. En: Pesticide science. 1998. vol. 53, no. 3.

JARVIS, A.; MORGAN, E.; EDWARDS, C. Rapid separation of triterpenoids from neem seed extracts. Phytochemical Analysis. 1999. vol. 10, no. 1.

JOHNSON. S.; DUREJA, P. Effect of surfactants on persistence of azadirachtin-A (neem based pesticide). En: Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2002. vol. 37, no. 1

KIM, S. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. En: Journal of Stored Products Research. 2003. vol. 39, no. 3.

KIM, S.; KANG, J.; PARK, I. Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. En: Journal of Asia-Pacific Entomology. 2013. vol. 16, no. 4.

KOODALINGAM, A.; DEEPALAKSHMI, R.; AMMU, M.; RAJALAKSHMI, A. Effects of NeemAzal on marker enzymes and hemocyte phagocytic activity of larvae and pupae of the vector mosquito *Aedes aegypti*,” *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2014. vol. 17, no. 2.

LEWIS, D. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. En: *Drugs and the pharmaceutical sciences*. 1990. vol. 45.

LIAUW, M.; *et. al.* Extraction of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) using n-hexane and ethanol: studies of oil quality, kinetic and thermodynamic. En: *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*. 2008. vol. 3, no. 3.

LINTON, Y.; NISBET, A.; MORDUE, A. The effects of azadirachtin on the testes of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). En: *Journal of Insect Physiology*. 1997. vol. 43, no. 11.

LIU, L., *et. al.* Limonoid and Steroidal Saponin from *Azadirachta indica*. En: *Natural products and bioprospecting*. 2014. vol. 4, no. 6.

LIU, T; STANSKY, P. Insecticidal activity of surfactants and oils against silverleaf whitefly (*Bemisia argentifolii*) nymphs (Homoptera: Aleyrodidae) on collards and tomato. En: *Pest management science*. 2000. vol. 56, no. 10.

LIU, Z.; HO, S. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). En: *Journal of Stored Products Research*. 1999. vol. 35, no. 4.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. En: Life Sciences. 2002. vol. 71, no. 21.

LÓPEZ, Y; *et. al.* 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*. 2007. vol. 32, no. 4.

MANN, G.; DHALIWAL, G. Safety of azadirachtin to honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus, foragers. En: *Pesticide Research Journal*. 2001. vol. 13, no. 1.

MARIA, J.; *et. al.* Photodegradation of essential oil from marjoram (*Origanum majorana* L.) studied by GC-MS and UV-VIS spectroscopy. En: *Revista latinoamericana de química*. 2013. vol. 41, no. 2.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Documento técnico guía de estabilidad de medicamentos. Bogotá. 2009.

MOSCARDÓ, M.; PEYDRÓ, R.; LLÁCER, M.; MARÍ, J. Situación actual en España de los aerosoles insecticidas registrados en Sanidad Ambiental para uso doméstico. *Revista española de salud pública*. 2003. vol. 77, no. 3.

NATHAN, S., *et. al.* Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). En: *Ecotoxicology and environmental safety*. 2008. vol. 70, no. 2

NAUEN, R.; *et. al.* IRAC: insecticide resistance, and mode of action classification of insecticides. En: *Modern Crop Protection Compounds*. 2013. vol. 1-3.

OULHOTE Y.; BOUCHARD, M. Urinary Metabolites of Organophosphate and Pyrethroid Pesticides and Behavioral Problems in Canadian Children. En: Environmental Health Perspectives. 2013. vol. 121, no. 11–12.

PAVELA, R. Limitation of Plant Biopesticides. En: Advances in Plant Biopesticides, Springer, 2014.

PÉREZ, E. Una visión del desarrollo rural en Colombia. En: Cuadernos de Desarrollo Rural. 2012. no. 41.

PRAKASH, G.; SRIVASTAVA, A. Statistical media optimization for cell growth and azadirachtin production in *Azadirachta indica* (A. Juss) suspension cultures. En: Process Biochemistry. 2005. vol. 40, no. 12.

PULIDO, C. La silvicultura como elemento crítico para la sostenibilidad y el manejo del bosque. En: Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA). 2015. vol. 5, no. 1.

PUNGITORE, C.; *et. al.* Insecticidal and antifeedant effects of *Junellia aspera* (Verbenaceae) triterpenes and derivatives on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). En: Journal of Stored Products Research. 2005. vol. 41, no. 4.

REYES, E.; VALERO, S.; GARAY, D. Estudio preliminar de las propiedades físicas de la especie *Azadirachta indica* (Neem) procedente del estado Falcón (Venezuela). En: Revista Forest. Venezuela. 2003. vol. 47, no. 2.

RIEDL, H.; PONS, S.; HERNÁNDEZ, J. Efecto del momento de aplicación, utilización de coadyuvantes y volumen de tratamiento en el efectividad de tebufenocida para el control de *Cydia Pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). En: Boletín de sanidad vegetal. Plagas. 1998. vol. 24, no. 4.

ROCA, W. Estudio de las capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina. Informe preparado para la Corporación Andina de Fomento (CAF) y la Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). Lima: Centro Internacional de la Papa-CIP, 2003.

ROUSTAN, M.; PHARAMOND, J.; LINÉ, A. Techniques de l'ingénieur, traité de génie des procédés. En: Doc. J. 1999. vol. 3.

RUIZ, C.; TUNAROSA, F.; MARTÍNEZ, J.; STASHENKO, E. Estudio comparativo por GC-MS de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de *Lippia origanoides* HBK, obtenidos por diferentes técnicas de extracción. En: *Scientia et Technica*. 2007. vol. 1, no. 33.

SCHAAF, O. *et. al.* Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (*Azadirachta indica*) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. En: *Journal of Chromatography A*. 2000. vol. 886, no. 1.

SCHMUTTERER, H. The neem tree: *Azadirachta indica* A. Juss and other meliaceous plants: sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. En: Weinheim (Germany). VCH., 1995.

SCHROEDER, D.; NAKANISHI, K. A simplified isolation procedure for azadirachtin. En: *Journal of natural products*. 1987. vol. 50, no. 2.

SEDLACEK, J.; WESTON, P.; BARNEY, R. Lepidoptera and psocóptera. En: *Integrated management of insects in stored products*, 1995.

SEPÚLVEDA, G.; PORTA, H.; ROCHA, M. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. En: *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2004. vol. 21.

SHAFEEK, A.; PRASANTHI, R.; REDDY, G.; CHETTY, C. Alterations in acetylcholinesterase and electrical activity in the nervous system of cockroach exposed to the neem derivative, azadirachtin. En: *Ecotoxicology and environmental safety*. 2004. vol. 59, no. 2.

SHARMA, V.; *et. al.* An efficient method for the purification and characterization of nematicidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. vol. 51, no. 14.

SINGH, N.; SINHA, R. Carbohydrate, lipid and protein in the developmental stages of *Sitophilus oryzae* and *S. granarius* (Coleoptera: Curculionidae). En: *Annals of the Entomological Society of America*, vol. 70.

SONI, H.; MISHRA, K.; SHARMA, S.; SINGHAI, A. Characterization of Azadirachtin from ethanolic extract of leaves of *Azadirachta indica*. En: *Journal of Pharmacy Research*. 2012. vol. 5, no. 1.

STADLER, T. Normalización de las variables ecofisiológicas durante el desarrollo de *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). En: *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*. 1988. vol. 14, no. 4.

SUNDARAM, K. Azadirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environmental behaviour and biological effects. En: *Journal of Environmental Science & Health Part B*. 1996. vol. 31, no. 4.

SZETO, S.; WAN, M. Hydrolysis of azadirachtin in buffered and natural Waters. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1996. vol. 44, no. 4.

TADROS, T. Interfacial Phenomena and Colloid Stability: Industrial Applications. De Gruyter, 2015.

THEJAVATHI, R.; YAKKUNDI, S.; RAVINDRANATH, B. Determination of azadirachtin by reversed-phase high-performance liquid chromatography using anisole as internal standard," Journal of Chromatography. 1995. vol. 705, no. 2.

TINE, S.; ARIBI, N; SOLTANI, N. Laboratory evaluation of azadirachtin against the oriental cockroach, *Blatta orientalis* L.(Dictyoptera, Blattellidae): Insecticidal activity and reproductive effects. En: African Journal of Biotechnology. 2014. vol. 10, no. 85.

TOMÉ, H.; *et. al.* Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. En: Crop Protection. 2013. vol. 46.

TORRENEGRA, M.; GRANADOS, C.; OSORIO, M.; LEÓN, G. Comparación de la Hidro-destilación Asistida por Radiación de Microondas (MWHd) con Hidro-destilación Convencional (HD) en la Extracción de Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. En: Información tecnológica. 2015. vol. 26, no. 1.

TOVAR, C.; COLONIA, B. Producción y procesamiento del maíz en Colombia. En: Revista Científica Guillermo de Ockham. 2015. vol. 11, no. 1.

TOVAR, G. Aproximación a la silvicultura urbana en Colombia. En: Bitácora Urbano Territorial. 2013. vol. 1, no. 22.

VAN DEN BERG, H.; *et. al.* Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. En: Environmental health perspectives. 2012. vol. 120, no. 4.

VENZON, M.; *et. al.* The potential of NeemAzal for the control of coffee leaf pests. En: Crop protection. 2005. vol. 24, no. 3.

VICENTE, M.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELÁEZ, F. Microbial natural products as a source of antifungals. En: Clinical Microbiology and Infection. Enero, 2003. vol. 9, no. 1.

VILLAMIL, D.; NARANJO, N.; VAN SATRAHLEN, M. Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (*Azadirachta*). En: EntomoBrasilis, 2012. vol. 0.

YADAV, N. *et. al.* Mechanism of neem limonoids-induced cell death in cancer: Role of oxidative phosphorylation. En: Free Radical Biology and Medicine. 2016. vol. 90.

YAN, R, *et. al.* "Thermal death kinetics of adult *Sitophilus oryzae* and effects of heating rate on thermotolerance," Journal of Stored Products Research, vol. 59, 2014.

ZABALA, M. *et. al.* Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales," Revista de la Facultad Nacional de Agricultura. 2009. vol. 62, no. 1.

ZHANG, L.; *et. al.* Anti-fungal and anti-bacterial activities of ethanol extracts of selected traditional Chinese medicinal herbs. En: Asian Pacific journal of tropical medicine. 2013. vol. 6, no. 9,

ZHAO, J.; DAVIS, L.; VERPOORTE, R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances. 2005. vol. 23, no. 4.

ANEXOS

ANEXO A. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADOS (ENVEJECIMIENTO ACELERADO)

Forman parte de los estudios formales de estabilidad y son estudios diseñados para incrementar la velocidad de la degradación química y los cambios físicos de un producto empleando condiciones extremas de almacenamiento, como parte del programa de evaluación de estabilidad. El objetivo de estos estudios es predecir la vida útil tentativa del producto en condiciones normales de almacenamiento.

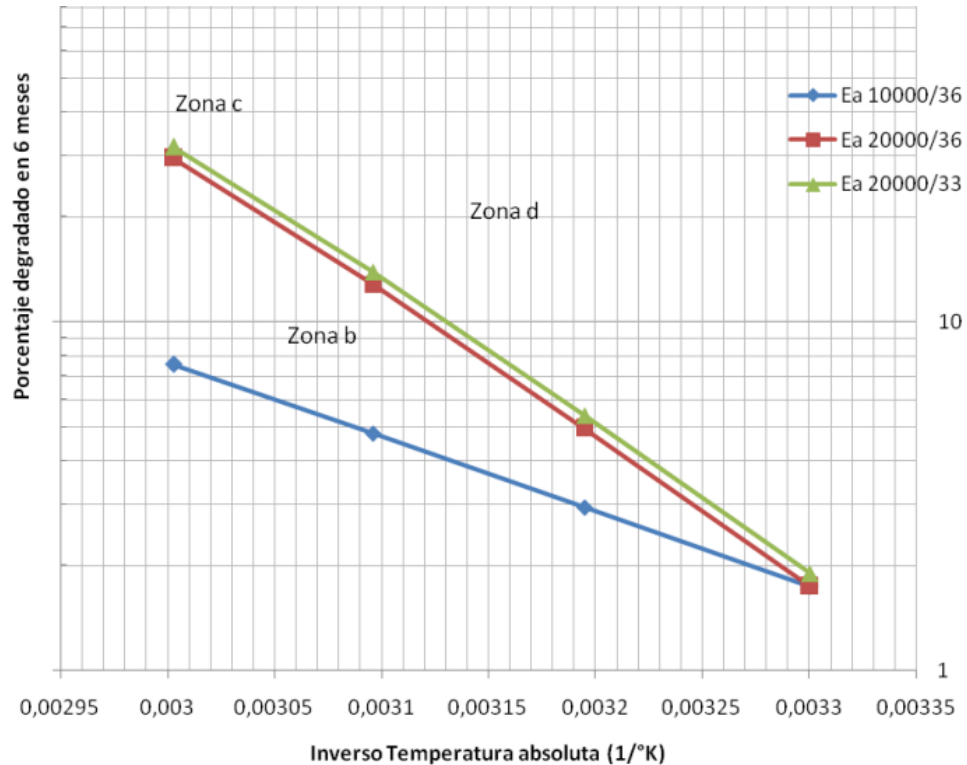
Diseño Experimental

Método de muestreo de un solo punto a los dos meses y dos temperaturas.

1. Se seleccionan dos temperaturas (33°C y 40°C) de almacenamiento cuya diferencia debe ser mínimo de 7°C y apropiadas a la estabilidad física que presenta el producto.
2. Se coloca una muestra representativa a las condiciones seleccionadas y se establece un muestreo a los dos meses de almacenamiento.
3. Con los datos obtenidos a una misma temperatura, se efectúa la comparación estadística, para establecer que no se detecta una diferencia estadísticamente significativa entre ellos. Cuando no se detecta una diferencia estadísticamente significativa entre los lotes analizados, se efectúa el cálculo del porcentaje degradado en cada muestra en referencia al valor original existente. Con los datos del porcentaje degradado a dos meses a cada temperatura, se calcula el promedio global degradado a dos meses con los límites de confianza del 95%, incluyendo todos los datos.

4. El promedio obtenido a cada temperatura, con los límites de confianza del 95% se ubica en la gráfica de la Figura A.

Figura A. Estabilidad acelerada.

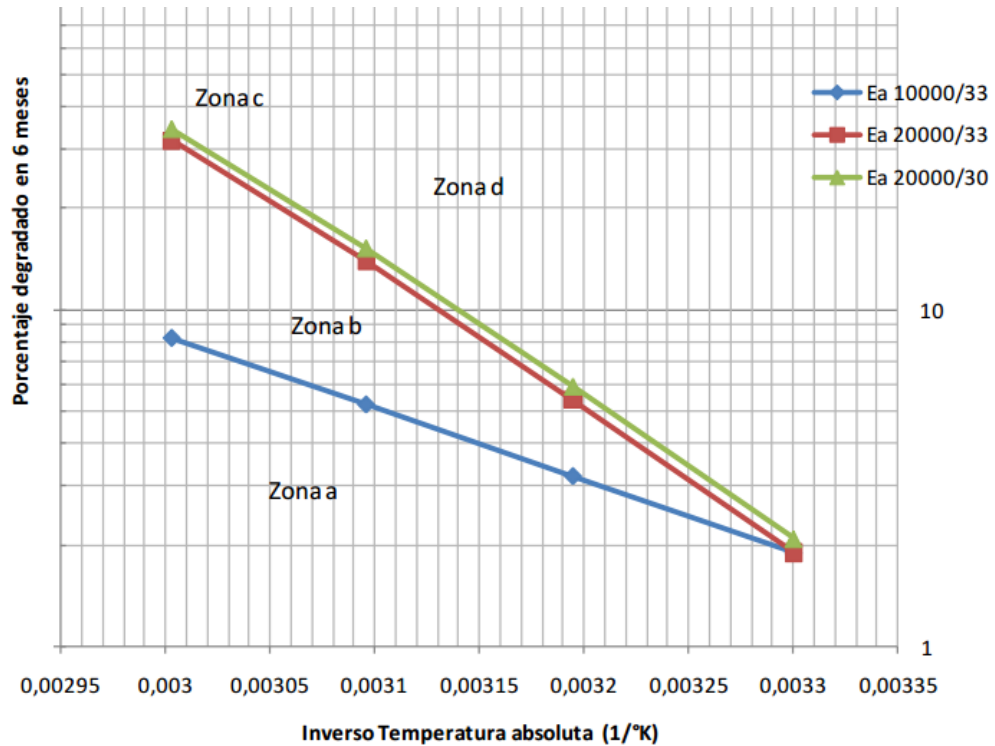


5. Si ambos resultados caen dentro de la zona de aceptación (a), o si un resultado cae dentro de la zona de aceptación (a) y otro dentro de la zona de aceptación (b) se le puede asignar al producto una vida útil de 36 meses contados a partir de la fecha de fabricación del lote.

6. Si ambos resultados caen dentro de la zona de aceptación (b) o (c) o uno en la zona (b) y el otro en la (c), al producto se le puede asignar una vida útil de 33 meses, contados a partir de la fecha de fabricación del lote.

7. Si un resultado cae en la zona de aceptación (c) y otro en la zona de rechazo (d) o ambos caen en la zona de rechazo (d), se debe utilizar ahora la gráfica de la Figura B.

Figura B. Estabilidad acelerada



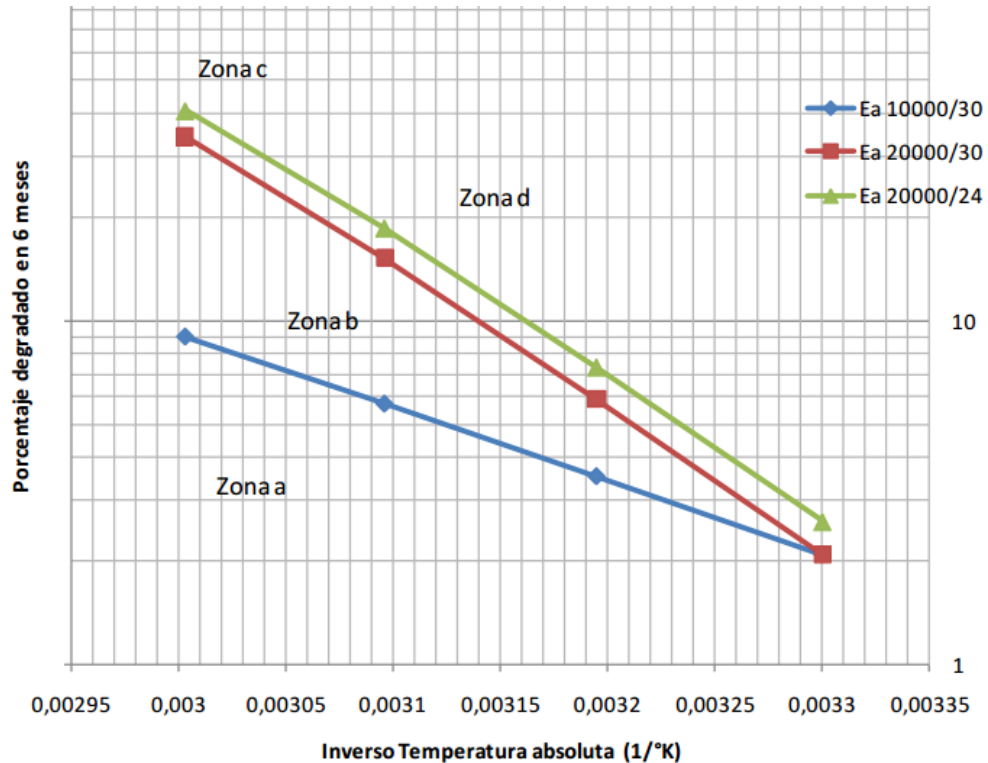
8. Una vez ubicados los dos puntos en la gráfica de la Figura B, si ambos resultados caen dentro de la zona de aceptación (a), o si un resultado cae dentro de la zona de aceptación (a) y otro dentro de la zona de aceptación (b) se le puede asignar al producto una vida útil de 33 meses contados a partir de la fecha de fabricación del lote.

9. Si ambos resultados caen dentro de la zona de aceptación (b) o (c) o uno en la zona (b) y el otro en la (c), al producto se le puede asignar una vida útil de 30 meses, contados a partir de la fecha de fabricación del lote.

10. Si un resultado cae en la zona de aceptación (c) y otro en la zona de rechazo (d) o ambos caen en la zona de rechazo (d), se debe utilizar ahora la gráfica de la Figura C. 11. Si ambos resultados caen dentro de la zona de aceptación (a), o si un resultado cae dentro de la zona de aceptación (a) y otro dentro de la zona de

aceptación (b) se le puede asignar al producto una vida útil de 30 meses contados a partir de la fecha de fabricación del lote.

Figura C. Estabilidad acelerada



11. Si ambos resultados caen dentro de la zona de aceptación (a), o si un resultado cae dentro de la zona de aceptación (a) y otro dentro de la zona de aceptación (b) se le puede asignar al producto una vida útil de 30 meses contados a partir de la fecha de fabricación del lote.

12. Si ambos resultados caen dentro de la zona de aceptación (b) o (c) o uno en la zona (b) y el otro en la (c), al producto se le puede asignar una vida útil de 24 meses, contados a partir de la fecha de fabricación del lote.

13. Si un resultado cae en la zona de aceptación (c) y otro en la zona de rechazo (d) o ambos caen en la zona de rechazo (d), al producto no se le puede asignar una vida útil superior de 24 meses y mucho menos por esta modalidad.

ANEXO B. FICHA TÉCNICA DEL PRESERVANTE KORALONE



Microbial Control

KORALONE™ B-120 Preservative In-can Preservative for Household and Industrial & Institutional Products

CAS No. 2634-33-5

EINECS: 220-120-9

General

KORALONE™ B-120 Preservative is an effective antimicrobial agent recommended and widely used in preservation of household products. It is a clear 20% glycolic solution of 1,2-benzisothiazolin-3-one. KORALONE B-120 Preservative is a formaldehyde-free preservative and does not contain any halogen that accumulate in the environment.

Benefits

- Highly effective against bacteria, yeasts and moulds.
- Non specific mode of action, resulting in reduced microbial resistance potential.
- Formaldehyde and formaldehyde releasers free.
- Readily incorporated in household formulations due to its liquid form.
- High purity active ingredient, made evident by its clear light color.
- Compatible and effective with anionic, ester quaternary surfactants, non ionic surfactants and commonly used household product ingredients.
- Stable over a wide range of pH (4 to 12) and temperature conditions up to 50°C.
- Safe to use at recommended use levels.
- Environmentally acceptable: rapidly degrades, does not bioaccumulate and is non persistent in the environment.

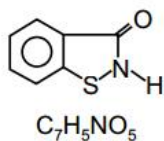
Appearance of KORALONE B-120 Preservative compared with equivalent industry grade



Industry Standard

KORALONE B-120 Preservative

Structure



Formulation and Properties

Chemical Composition

1,2-benzisothiazolinon-3-one (BIT) 20% active ingredient

Inert Ingredients

Propylene glycol and water balance

Physical Properties

The following are typical physical properties of KORALONE™ B-120 Preservative; they are not to be considered product specifications.

Appearance Clear amber liquid
 Boiling Point..... 100°C
 Viscosity at 25°C 250 mPA.s
 Freezing point..... minus 10°C
 Solubility miscible in water at any ratio
 pH at 25°C (@10% in water)..... 12.5
 Density at 20°C 1.14 g/ml

Microbiological Efficacy

KORALONE B-120 Preservative exhibits outstanding antimicrobial activity, inhibiting a wide variety of gram positive and gram negative bacteria, yeast and moulds. The following tables give for bacteria and fungi the minimum inhibitory concentration (MIC) in ppm active ingredient and in % product as supplied, which inhibited the growth of various micro organisms in M9G Mineral salt media and the minimum bactericidal concentration (MBC) which killed bacteria in M9G Mineral salt media. As shown, KORALONE B-120 Preservative inhibits and killed a wide variety of bacteria at low active ingredient levels.

MIC & MBC Efficacy on Bacteria M9G media pH 7.0

Bacteria Strains	ATCC No.	MIC VALUES 24 hours contact time		MBC VALUES 5 days contact time	
		ppm a.i.	% product	ppm a.i.	% product
<i>Burkholderia cepacia</i>	25416	15	0.0075	31	0.0155
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	9	0.0045	37	0.0185
<i>Escherichia coli</i>	8739	4.5	0.0022	10.5	0.0052
<i>Enterobacter cloacae</i>	13047	9	0.0045	33	00.16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	6	0.003	19	0.0095
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	32	0.015	89	0.044
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	17397	13	0.0065	15	0.0075
<i>Pseudomonas putida</i>	12633	17	0.0085	51	0.0255

Efficacy on Mould and Yeast M9G media pH 5.5

Mould	ATCC No.	MIC VALUES 7 days contact time	
		ppm a.i.	% product
<i>Alternaria alternata</i>	11680	80	0.004
<i>Aspergillus niger</i>	16404	89	0.044
<i>Chaetomium globosum</i>	6205	10.5	0.005

Yeast	ATCC No.	MIC VALUES 5 days contact time	
		ppm a.i.	% product
<i>Rhodotorula rubra</i>	9449	25	0.0125
<i>Candida albicans</i>	2091	51	0.025

Bacteriostatic and fungistatic tests performed by serially diluting test compounds in Mineral salts media (M9G)+1% yeast extract and 1:100 inoculation with 24-hour broth cultures of test bacterium. Fungistatic tests performed by serially diluting test compounds in potatoes dextrose broth and 1:100 inoculation with 24-hour broth yeast, or mould spore suspension prepared from 7- to 14-day malt culture slants. Minimum inhibitory concentration levels determined visually after 1-day incubation at 30°C for bacteria, 5 days at 25°C for yeast and 7 days for moulds.

Recommended Use Levels	KORALONE B-120 Preservative should be dosed in the range of 0.05% to 0.15% as supplied, which is equivalent to 100 ppm to 300 ppm active ingredient. Since the components of household formulations could vary considerably and may have impact on the effect of preservatives, we advise each manufacturer to confirm the efficacy and stability of KORALONE B-120 Preservative in use. KORALONE B-120 Preservative exhibits excellent performance with cobiocides like MCI/MI, bronopol, glutaraldehyde etc.
Safety & Labeling	Please refer to the Safety Data Sheet and product label.
Handling	The processing and use of industrial chemicals requires adequate technical and professional knowledge. In general, avoid eye and skin contact, wear safety goggles, gloves and protective clothing. In case of eye or skin contact, despite precautionary measures, wash immediately and thoroughly with plenty of warm water and obtain medical attention.
Shelf Life	KORALONE B-120 Preservative in original containers under appropriate storage conditions will have a shelf life of 24 months.
Storage	KORALONE B-120 Preservative should be stored at room temperature in tightly sealed original containers. Protect from frost and heat. Any supplies which do freeze must be mixed thoroughly after thawing before they can be used without any loss in efficacy.