

**ESTUDIOS DE FOTOESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *AZADIRACHTA  
INDICA* (NIM) PARA SU USO COMO BIOINSECTICIDA EN EL CONTROL DE  
*SITOPHILUS ORYZAE***

**SILVIA KATHERINE RODRÍGUEZ TRIANA  
LYDA MARÍA ACEVEDO VILLARREAL**

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

**2017**

**ESTUDIOS DE FOTOESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS DE *AZADIRACHTA  
INDICA* (NIM) PARA SU USO COMO BIOINSECTICIDA EN EL CONTROL DE  
*SITOPHILUS ORYZAE***

**SILVIA KATHERINE RODRÍGUEZ TRIANA  
LYDA MARÍA ACEVEDO VILLARREAL**

**Trabajo de grado para optar por el título de Ingeniera Química**

**Directora**

**DEBORA ALCIDA NABARLATZ  
Doctora en Ingeniería Química**

**Codirector**

**JOSÉ GABRIEL LÓPEZ ORTIZ  
Magister (C) en Ingeniería Química.**

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

**2017**

## DEDICATORIA

Para Dios, pues todo sucede por gracia suya y este logro no es la excepción, esto es para su gloria. Por su amor y paciencia, por enseñarme a crecer y a confiar.

Para la virgen María por su amor maternal, por enjugar mis lágrimas y siempre decirme, no temas, lo lograrás.

Para toda mi familia, especialmente para mi papá Orlando Acevedo Rueda, para mi mami Dora Stella Villarreal Sánchez y mi hermano Jesús Fabian Acevedo Villarreal, son mi motor en la tierra, mi más grande tesoro y los amores de mi vida. Gracias, por amarme y creer en mí aun cuando yo no lo hago. No me alcanzan las palabras para decirles cuanto los amo. Esto es por y para ustedes.

Para mi compañera Silvia Katherine Rodríguez Triana, por estos 6 años y medio de amistad, de risas, de consejos, de regaños, de momentos buenos y no tan buenos, que siempre nos hacen crecer. ¡Lo logramos!

Finalmente y no menos importante, para todas y cada una de las personas que confiaron y esperaron este momento tanto como yo, que siempre me ayudaron con una oración o con sus palabras de aliento, mil y mil gracias.

Lyda María Acevedo Villarreal

A Dios por brindarme la fortaleza y paciencia para superar los obstáculos y por bendecir día a día este largo camino.

A mis papás y mis hermanas, por creer en mí y darme su apoyo, ya que, gracias a sus esfuerzos, esto es una realidad. Este logro es por y para ustedes. Los amo muchísimo.

A Paula, mi prima, mi amiga incondicional y mi confidente; y a mis amigos por darme todas esas palabras de aliento para continuar.

A mi compañera Lyda, por estos años de amistad y momentos inolvidables, gracias por la paciencia, la ayuda y todo el empeño dedicado.

A todas las personas que de alguna manera hicieron parte de esta gran etapa de mi vida y me hicieron crecer como persona.

Silvia Katherine Rodríguez Triana

## **AGRADECIMIENTOS**

A la profesora Debora Alcida Navarlatz y al ingeniero José Gabriel López Ortiz por su apoyo continuo y su comprensión. Por direccionar este trabajo y contribuir de mil maneras en el feliz término del mismo.

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

A la escuela de Química por el préstamo de equipos y a Lucía Novoa por la asesoría en las prácticas realizadas en el Laboratorio de Análisis Químico.

A la escuela de Ingeniería Química por el préstamo de equipos y a Joaquín Orozco por su ayuda durante la experimentación realizada en los mismos.

A la empresa Zumotec S. A. por los materiales y solventes suministrados.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN .....	17
1. OBJETIVOS.....	19
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
2. MARCO TEÓRICO .....	20
2.1 ÁRBOL DE NIM .....	20
2.1.1 Generalidades.....	20
2.1.2 Aprovechamiento .....	20
2.2 AZADIRACTINA.....	21
2.3 DEGRADACIÓN DE LA AZA A CAUSA DE LA RADIACIÓN UV. ....	22
2.3.1 Radiación UV .....	22
2.3.2 Concepto de absorbancia .....	22
2.3.3 Fotodegradación de la aza.....	23
2.4 FOTOPROTECTORES.....	24
2.5 SITOPHILUS ORYZAE.....	25
3. METODOLOGÍA .....	27
3.1 MATERIALES Y SUSTANCIAS. ....	27
3.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. ....	28
3.3 PRUEBAS DE FOTODEGRADACIÓN CON LOS EXTRACTOS. ....	29
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA FOTOESTABILIDAD DE LOS FORMULADOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE NIM. ....	29
3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE HPLC.....	32
3.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA EN EL GORGOJO DEL ARROZ.	32

3.6.1 Establecimiento de la colonia.....	32
3.6.2 Pruebas de mortalidad.....	33
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	34
4.1 DEGRADACIÓN DE AZA .....	34
4.2 PRUEBAS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA .....	37
4.3 PRUEBAS DE FOTOESTABILIDAD EN LOS FORMULADOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE NIM.....	40
5. CONCLUSIONES .....	46
6. RECOMENDACIONES.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXOS.....	63

## LISTA DE TABLAS

**Pág.**

Tabla 1. Formula Cual-quantitativa de producto pesticida a partir del extracto etanólico del árbol de Nim para el control del gorgojo del arroz. ....	30
Tabla 2. Concentraciones de las sustancias usadas como fotoprotectores en los formulados a partir del extracto etanólico de Nim. ....	31
Tabla 3. Análisis ANOVA con %M cómo variable de respuesta. ....	41

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Molécula de la AZA.....	21
Figura 2. Metodología desarrollada. ....	27
Figura 3. Cromatogramas de las muestras de extracto etanólico de las hojas de Nim que permanecieron en oscuridad (A) e irradiadas con luz UV-A (360 nm; B) y UV-C (254 nm; C), hasta 16.5 horas de exposición, junto al extracto sin ningún tratamiento (tiempo 0), a temperatura ambiente. ....	34
Figura 4. Efecto insecticida en el control del gorgojo de arroz por impregnación de superficie tras 144 h de contacto con los extractos al 2% p/v, diluidos en etanol al 96% v/v, y sometidos a radiación UV-C, UV-A y OSCURIDAD, versus el tiempo de exposición a estas longitudes de onda, a temperatura ambiente. ....	38
Figura 5. Gráficas de superficie de respuesta para el %M de los individuos del gorgojo de arroz tras 50 horas de contacto con los formulados expuestos a luz UV-C (254nm) durante 3 horas, versus %SM y %T-80 para concentraciones fijas de %V. ....	42
Figura 6. Optimización del %M. ....	44

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
ANEXO A. Árbol de Nim. ....	63
ANEXO B. Producto de la fotodegradación de la AZA.....	64
ANEXO C. Diagrama del diseño de las cámaras de fotodegradación con una distancia de 10 cm entre la fuente lumínica y las muestras.....	65
ANEXO D. Serie de Fibonacci .....	68
ANEXO E. Test Shapiro-Wilk. [40] [41].....	69
ANEXO F. Diseño experimental Box Behnken. ....	70
ANEXO G. Cromatogramas por fluidos supercríticos para la irradiación de AZA a 217 nm tras 0 h (a), 1 h (b), 2 h (c) y 3 h (d) de exposición. ....	71
ANEXO H. Formulación de un bioplaguicida de base de extracto de la hoja del árbol de Nim para el control del gorgojo del arroz. ....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AZA</b>	Azadiractina
<b>%M</b>	Porcentaje de mortalidad
<b>Ind</b>	Individuos (Gorgojo de arroz)
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>AZAD</b>	Azadiractina degradada
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b><math>\lambda</math></b>	Longitud de onda
<b>SM</b>	Salicilato de metilo
<b>T-80</b>	Tween <sup>®</sup> 80
<b>V</b>	Vainillina
<b>T<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención

## RESUMEN

**TITULO:** Estudios de fotoestabilidad de los extractos de *Azadirachta indica* (nim) para su uso como bioinsecticida en el control de *Sitophilus oryzae*.

**AUTORES:** Silvia Katherine Rodríguez Triana \*\*  
Lyda María Acevedo Villarreal.

**PALABRAS CLAVES:** *Azadirachta indica* (Nim), Azadiractina (AZA), *Sitophilus oryzae*, fotoestabilidad, salicilato de metilo, Tween® 80, Vainillina.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la luz UV en los extractos y formulados insecticidas elaborados a partir de las hojas de *Azadirachta indica* para el control de *Sitophilus oryzae*. Inicialmente se prepararon muestras de los extractos solos, las cuales fueron sometidas a radiación UV a longitudes de onda de 254 y 360 nm e intervalos de tiempo con un máximo de 16.5 horas. Mediante análisis HPLC y ensayos biológicos se encontró que la mayor degradación de los extractos ocurre a 254 nm y 3 horas de exposición. Posteriormente, para los formulados se utilizaron como agentes fotoestabilizadores el salicilato de metilo, el Tween® 80 y la vainillina a diferentes concentraciones, según el diseño experimental de tipo *Box Behnken*. Éstos se irradiaron a las condiciones ya estipuladas, y se realizaron pruebas biológicas sobre *Sitophilus oryzae* donde se obtuvo la mayor mortalidad (81.7%) tras 50 horas de contacto. Se encontró que para aumentar la fotoestabilidad y por tanto la actividad insecticida de los formulados a partir del extracto etanólico de hojas de Nim se debe añadir Vainillina en una concentración de 1.6% p/v, Salicilato de metilo en una proporción de 2.7% v/v y el tensoactivo Tween-80 en una concentración de 4.2% v/v. Estas condiciones maximizan el %M hasta 81.7% en 50 horas de contacto con los individuos del gorgojo del arroz. Igualmente se halló el modelo matemático que determina el %M en función de las variables mencionadas, con un  $R^2$  ajustado de 82.83.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Debora Alcida Nabarlatz, Doctora en Ingeniería Química. Codirector: José Gabriel López Ortiz, Magister (C) en Ingeniería Química.

## ABSTRACT

**TITLE:** Study of the photostabilization of the extracts from *Azadirachta Indica* (neem) to be used as bioinsecticide for *Sitophilus oryzae* pest control.

**AUTHORS:** Silvia Katherine Rodríguez Triana \*\*  
Lyda María Acevedo Villarreal.

**KEYWORDS:** *Azadirachta Indica* (Neem), Azadirachtin (AZA), *Sitophilus oryzae*, photostability, methyl salicylate, Tween® 80, Vanillin.

The objective of this work was to evaluate the effect of ultraviolet light on the extracts and formulates elaborated from the leaves of *Azadirachta indica* for the control of *Sitophilus oryzae*. Initially, samples of extracts alone were prepared and exposed to UV radiation, at wavelengths of 254 and 360 nm and time intervals with a maximum of 16.5 hours. Through HPLC analysis and biological tests, it was found that the greatest degradation of the extracts was obtained at 254 nm and 3 hours of exposure. In order to prevent photodegradation, different photo stabilizing agents, as methyl salicylate, Tween® 80 and Vanillin were added to the formulates at different concentrations, according to the *Box Behnken* experimental design. These were irradiated at the already stipulated conditions, and biological tests over *Sitophilus oryzae* were performed, finding that the highest mortality (81.7%) was obtained after 50 hours of contact. It was found that in order to increase the photostability and therefore the insecticidal activity of the formulated from the ethanolic extract of the Nim leaves, Vanillin should be added in a concentration of 1.6% w / v, Salicylate of metals in a ratio of 2.7 % V / V and the Tween-80 surfactant in a concentration of 4.2% v / v. These conditions maximize the % M to 81.7% in 50 hours of contact with the individuals of the rice weevil. The mathematical model that determines the % M as a function of the mentioned variables was also found, with an adjusted R<sup>2</sup> of 82.83.

---

\* Degree work

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Debora Alcida Nabarlatz, PhD in Chemical Engineering. Co-director: José Gabriel López Ortiz, Magister (C) in Chemical Engineering

## INTRODUCCIÓN

Con el paso del tiempo se ha hecho importante el uso de insecticidas que no generen impacto negativo en el medio ambiente. Por tanto, se han elaborado plaguicidas a partir de algunas plantas que presentan esta propiedad en sus constituyentes. Tal es el caso de la *Azadirachta indica* (Nim), cuyos extractos son prometedores para su uso como bioinsecticidas, principalmente por ser un material biológico, natural, económico y sin efecto residual [1].

Sin embargo, su aplicación se ha visto limitada debido a la degradación que presentan sus compuestos activos ante la luz solar [2]. Por ejemplo, el plaguicida DECIS® FORTE, cuyo principio activo es la deltametrina, se aplica en cultivos de pepino al observarse los primeros daños causados por el *Thrips palmi* (Trips del melón), donde solamente se aplica una repetición 7 días después, en una dosis de 0.2-0.3 mL/ha [3]. Si se emplea un producto a base de Nim, como es el NeoNim® 60, éste se debe aplicar en horas de la noche, en una dosis de 1.5 L/ha y realizar una nueva aplicación del producto 7 días después a la misma concentración [2]. Aunque la efectividad en este insecto de ambos plaguicidas en laboratorio es cercana ( $DL_{50\text{deltametrina}}=0.02$  ng/insecto y  $DL_{50\text{Nim}}=0.1$  ng/insecto), la diferencia en los valores de dosificación en campo de los dos productos, se debe principalmente a que la mayoría de los compuestos presentes en los extractos del Nim son fotolábiles, degradándose rápidamente por la acción de la luz UV [4], por lo que se deben agregar en exceso.

En el grupo de investigación INTERFASE se han desarrollado formulados a partir de extractos etanólicos de la hoja del árbol de Nim. Sin embargo, para que estos puedan ser escalados comercialmente, deben ser capaces de mantener su acción insecticida al ser aplicados en campo. Por lo anterior se llevaron a cabo experimentos de fotodegradación donde se analizó el efecto de la radiación UV en

los extractos de Nim, evaluando la degradación mediante pruebas de HPLC y de actividad insecticida en el gorgojo del arroz. En los formulados se evaluó la actividad fotoprotectora del salicilato de metilo (SM), Tween<sup>®</sup> 80 (T-80) y vainillina (V), mediante el efecto en la actividad insecticida, utilizando un diseño experimental tipo *Box Behnken* con un análisis por superficies de respuesta.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la luz UV en los extractos y formulados insecticidas elaborados a partir de las hojas de *Azadirachta indica* para el control del *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz).

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Analizar el comportamiento de los compuestos presentes en los extractos etanólicos de hoja de Nim cuando son expuestos a dos longitudes de onda (254 y 360 nm) mediante cromatografía líquida de alta definición (HPLC).

Evaluar la pérdida de actividad insecticida de los extractos de hoja de Nim en el gorgojo del arroz, debido a la exposición a la radiación UV (254 y 360 nm) en pruebas de impregnación de superficie.

Establecer la concentración de tres compuestos fotoprotectores en un formulado insecticida elaborado a partir de los extractos etanólicos de hoja de Nim, que permita minimizar su fotodegradación debido a la radiación UV aplicada.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ÁRBOL DE NIM

**2.1.1 Generalidades.** La *Azadirachta indica*, también conocida como árbol de Nim (Neem) o margosa, pertenece a la familia *Meliaceae*, es nativo de India y Birmania y se adapta en las zonas tropicales y subtropicales. El árbol permanece frondoso durante todo el año, a menos que pase por una temporada de extrema sequía o por daños provocados por heladas [5]. Sus flores son blancas y pequeñas, y sus frutos son suaves y elipsoidales (ANEXO A).

El Nim tiene ventaja sobre otros árboles, ya que se puede desarrollar de una buena manera en suelos secos, estériles y hasta ácidos; aunque puede morir rápidamente si el suelo permanece constantemente saturado de agua [6].

**2.1.2 Aprovechamiento.** El árbol de Nim es reconocido a nivel mundial, ya que tiene propiedades medicinales, insecticidas y forestales. En su uso medicinal, desde hace muchos años las personas lo han aprovechado por sus cualidades curativas para tratar una gran variedad de enfermedades en humanos y animales. En la actualidad, los científicos continúan descubriendo aplicaciones medicinales de los derivados de Nim, y han demostrado su efectividad como antiséptico, antiviral, antiinflamatorio, antiúlceras, antimicótico y vermífugo [5]. Adicionalmente, algunos extractos de este árbol se usan en la agricultura como bioinsecticidas para proteger los cultivos de las plagas de insectos que generan problemas económicos y de salud.



## 2.3 DEGRADACIÓN DE LA AZA A CAUSA DE LA RADIACIÓN UV.

**2.3.1 Radiación UV.** La radiación es la energía emitida por la materia en forma de ondas electromagnéticas o fotones como resultado de los cambios en las configuraciones electrónicas de los átomos o moléculas. En el caso de la radiación UV, las longitudes de onda datan entre los 200 y 400 nm. Su absorción por parte de átomos y moléculas produce reacciones fotoquímicas (rupturas de enlaces y formaciones de iones) [9].

La fuente más habitual de radiación UV es el sol, aunque también se puede conseguir artificialmente mediante lámparas. Según su longitud de onda se puede subdividir en 3 tipos: UV-A (315-400 nm) es la que produce el envejecimiento (*aging*) y la que llega en mayor cantidad a la superficie terrestre, UV-B (280-315 nm) es la que produce quemaduras (*burning*) y por último UV-C (200-280 nm) a la que algunos autores la denominan como radiación cósmica (*cosmic*) [10]. Esta última es la más energética y nociva para el ADN, plantas y animales. Sin embargo, las probabilidades de que llegue a la superficie terrestre son muy bajas ya que es la más absorbida por el oxígeno y el ozono de la atmósfera [11].

**2.3.2 Concepto de absorbancia.** Es la cantidad de luz que es absorbida por un cuerpo cuando un haz incide sobre él. La parte de la luz restante atraviesa dicho cuerpo. La siguiente ecuación se usa para el cálculo de esta propiedad, a una determinada longitud de onda.

$$A_{\lambda} = -\text{Log}_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

Donde  $I$  es la intensidad de la luz que pasa por la muestra y  $I_0$  es la intensidad de la luz incidente [12].

**2.3.3 Fotodegradación de la aza.** La AZA es una molécula fotolábil, su concentración en los extractos decrece con la exposición a la luz solar y a la radiación UV [13]. Esto ocurre debido a la presencia de algunos radicales absorbentes de luz tales como electrones phi ( $\pi$ ), enlaces éster y anillos epóxido, que al absorber energía lumínica pasan a un estado excitado generando una división en los enlaces insaturados y ocasionando un proceso de oxidación [14], [15].

Estudios realizados por Dureja y Jhonson por HPLC, han demostrado que el tiempo de vida media de este principio activo a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm es de 48 minutos. También descubrieron que a medida que la  $\lambda$  disminuye, el efecto de degradación en la AZA es más notorio, debido al cambio en la molécula donde el grupo (E)-2-metilbut-2-enoato pasa a ser (Z)-2-metilbut-2-enoato [16].

La formación de este fotoisómero de la AZA fue comprobado por Jhonson Sapna *et al.*, quienes usando las técnicas de RMN-HPLC, IR, RMN y de espectrometría de masas, analizaron el efecto de la irradiación de la AZA, aislaron el fotoproducto resultante y encontraron que el compuesto era el análogo (Z)-2-metilbut-2-enoato [17]. (ANEXO B). Estos autores, usando la técnica de cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), establecieron que después de 3 horas de irradiación a la luz UV, se forma una mezcla en equilibrio de AZA y producto fotoisomerizado (2:1) y después de 72 horas se forma una relación (4:1) de los isómeros (E)-2-metilbut-2-enoato y (Z)-2-metilbut-2-enoato [17].

Por otra parte, Dureja *et al.*, observaron que la AZA conserva su actividad biológica al ser expuesta hasta 2 horas a la luz UV, impidiendo el paso de la etapa de pupa a larva en el gorgojo de arroz, es decir que a pesar de la formación del isómero ya mencionado, no se altera la bioactividad en este intervalo de tiempo; sin embargo, después de 2 horas ocurre una pérdida significativa en esta función y su efecto es nulo tras 20 y 30 días de exposición en luz solar [18].

Estos procesos restringen el uso de la AZA como bioinsecticida en los ambientes externos, ya que para garantizar su efecto, y por tanto, una disminución en la cantidad de individuos en las plagas de insectos, la molécula debe permanecer intacta el tiempo que éstos requieran para ingerirla y causar su mortalidad [19]. Por tanto, se han buscado diferentes métodos para proteger esta molécula y de esta manera permitir una mayor duración en su aplicación y contacto con el medio ambiente. Algunas estrategias incluyen la modificación química de la estructura molecular de este principio activo o el uso de sustancias con moléculas absorbentes de luz UV (fotoestabilizadores), que absorben la luz preferentemente y evitan la fotoexcitación del plaguicida, o aceptan el exceso de energía de las moléculas ya excitadas, por diferentes mecanismos de transferencia de energía, alargando la vida útil de la molécula [20].

## **2.4 FOTOPROTECTORES.**

Son sustancias absorbentes de ondas de radiación UV que disipan la energía absorbida inofensiva [21]. Se usan con el propósito de evitar el efecto nocivo de los rayos solares en diferentes objetivos, tales como la piel en el ser humano, y moléculas pertenecientes a diferentes plantas que son sensibles a esta radiación, entre otros.

Se han evaluado diversas sustancias foestabilizadoras en los extractos de semillas de Nim, encontrándose excelentes resultados en cuanto a la disminución notoria en la degradación de AZA, y por tanto, en la prolongación de la vida ambiental de este principio activo. Ejemplos de lo anterior, son el caso de 2-4, dihidroxibenzofenona (UM) cuyo efecto incrementa la vida media de la AZA de 3.87 a 22.4 días en extractos de semilla de Nim, y el caso del fenilsalicilato que presentó los mejores efectos en formulados de Nim, tras un tratamiento de 6 horas

de exposición a la luz UV, en donde la cantidad residual de AZA fue de 2.53% [19], [22].

En este trabajo, se propuso usar tres sustancias con la propiedad de absorber luz UV, para analizar su efecto en el extracto de Nim: Tween<sup>®</sup> 80, salicilato de metilo y vainillina. El Tween<sup>®</sup> 80 es un surfactante no iónico hidrofílico, usado para mejorar las características de humectación, absorción y solubilidad en agua reduciendo la tensión superficial entre líquidos inmiscibles o entre superficies líquidas y sólidas. Igualmente, se utiliza en formulados pesticidas con el objetivo de aumentar la eficacia del ingrediente activo [23]. Respecto al salicilato de metilo, éste se ha empleado a nivel medicinal, doméstico y como protector de rayos UV, debido a que la radiación solar no afecta su composición química gracias a la doble transferencia protónica que regenera su estructura molecular. Este compuesto ha sido motivo de interés para los científicos por su comportamiento fotofísico de generación de dos emisiones fluorescentes desde un mismo estado electrónico excitado, es decir, absorbe energía en forma de radiaciones electromagnéticas y después las emite con una  $\lambda$  distinta (más larga) [24], [25]. Finalmente, la vainillina se destaca por ser una molécula estable, usada como sustancia reveladora de manchas en cromatografía de capa fina de aceites esenciales para identificar los terpenos y sus derivados presentes en éstos. Esta sustancia, reacciona específicamente con algunos componentes, generando un color visible característico [26].

## **2.5 SITOPHILUS ORYZAE.**

El *Sitophilus oryzae*, comúnmente conocido como el gorgojo del arroz (del orden Coleóptera), es inofensivo en sí mismo para los seres humanos. Sin embargo, puede constituirse en una amenaza debido a que a largo plazo puede

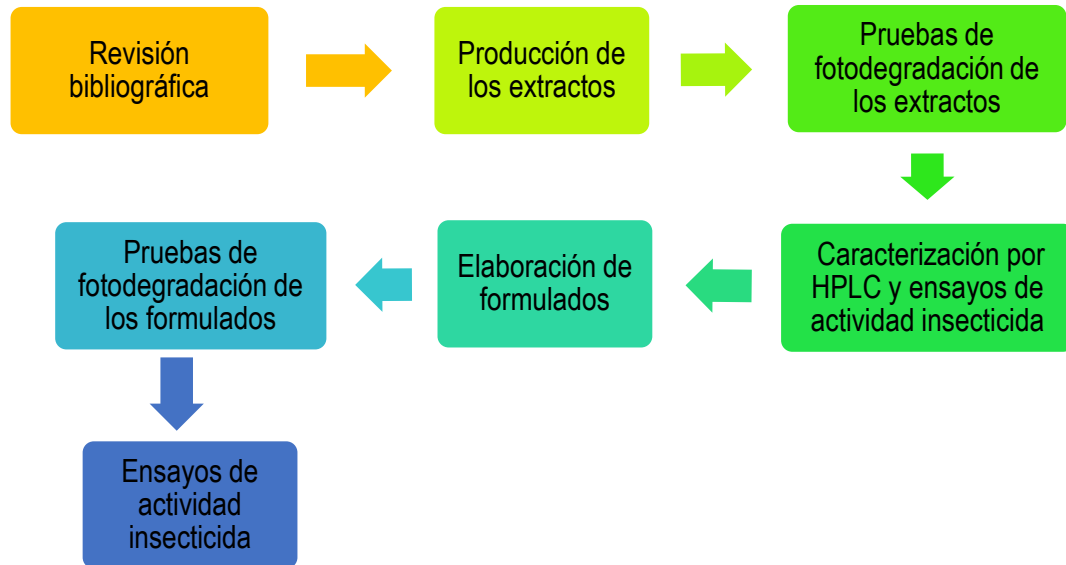
comprometer significativamente los suministros de alimentos. Los individuos adultos de esta especie se alimentan de este cereal y la hembra hace un agujero en el grano para poner sus huevos, después lo sella con una secreción gelatinosa para su protección, permitiendo así el desarrollo de la larva en el interior del grano de arroz [27].

Según la estimación de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), entre el 10-25% de la cosecha mundial de alimentos es destruido anualmente por insectos y roedores. Las plagas de insectos causan daños a los granos almacenados y a los productos procesados, reduciendo su peso seco y su valor nutricional. Entre estos insectos, el gorgojo del arroz se considera como una de las plagas más voraces, llegando a generar grandes problemas económicos en la agricultura [28].

Estudios llevados a cabo por Christos *et al.*, reportan que utilizando pruebas de impregnación en granos de centeno y avena, el gorgojo del arroz presenta un 100% de mortalidad tras 7 y 14 días de contacto con dosis mayores a 100 ppm de AZA, respectivamente. [29].

### 3. METODOLOGÍA

**Figura 2. Metodología desarrollada.**



La metodología empleada para la preparación de las hojas, al igual que los materiales y solventes usados para la producción del extracto, fue la planteada por López J., quien a partir de estos procesos obtuvo el mejor rendimiento de AZA para los extractos etanólicos de la hoja del árbol de Nim por maceración [30].

#### 3.1 MATERIALES Y SUSTANCIAS.

Para preparar las muestras y disolverlas se usó etanol industrial ( $\approx 96\%$ , Zumotec). Adicionalmente, en la producción de los formulados se emplearon como fotoprotectores Tween<sup>®</sup> 80 (grado USP, Sigma Aldrich), Salicilato de metilo

(Protokímica) y Vainillina (Merck). De igual manera se usó una solución de agua y ácido cítrico (0.1 M) para regular el pH (3).

### **3.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.**

Investigaciones anteriores determinaron las condiciones óptimas de extracción que proporcionan el mayor rendimiento. En este procedimiento, las hojas molidas se mezclaron con etanol dentro de una botella ámbar, en una relación 32% p/v y fueron agitadas a 364 rpm durante 48 horas a temperatura ambiente. Finalizado este proceso, la mezcla etanol-hoja se filtró en un tamiz de tela y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, eliminando de esta manera las partículas no solubles obteniéndose una solución homogénea. Seguidamente se llevó esta solución a sequedad mediante rotoevaporación y se rediluyó al 3% p/v en etanol, siendo este último el extracto que se utilizó para las pruebas siguientes [30].

El volumen de extracto para cada muestra fue de 2 mL, las cuales se llevaron a sequedad a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, fueron expuestas a radiación en las cámaras mencionadas. El experimento se hizo por duplicado.

Después del tratamiento, las muestras fueron retiradas y rediluidas en etanol al 2% p/v para ser utilizadas en los ensayos biológicos. Las muestras para análisis por HPLC se rediluyeron en etanol al 2% p/v y se adicionó el estándar interno ( $\alpha$ -terpineol). Posteriormente las muestras se filtraron en un filtro de jeringa, con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se almacenaron en viales de vidrio a una temperatura de  $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3 PRUEBAS DE FOTODEGRADACIÓN CON LOS EXTRACTOS.**

Inicialmente se prepararon las muestras según lo descrito en el inciso 2.2 y se llevaron a las respectivas cámaras UV y oscuridad (ANEXO C). Los intervalos de tiempo seleccionados para la exposición de las mismas a las diferentes  $\lambda$  se establecieron usando la serie de Fibonacci (**ANEXO D**) y mediante la revisión de los resultados presentados por Dureja y Johnson en un ensayo similar [16].

Como control negativo en este experimento se mantuvieron muestras del extracto en oscuridad durante los mismos intervalos de tiempo, con el fin de apreciar y comparar el comportamiento del mismo sin y con el efecto de la luz UV, a 360 nm (UV-A) y 254 nm (UV-C).

Por medio del programa estadístico IBM SPSS 22 se realizaron las pruebas de significancia, usando el test de Shapiro-Wilk (**ANEXO E**) para evaluar la normalidad y homogeneidad de varianza de los tratamientos. A partir del valor de probabilidad (p) se estableció un nivel de confianza del 95% sobre las variables de respuesta.

### **3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA FOTOESTABILIDAD DE LOS FORMULADOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE NIM.**

Se analizó la influencia de la concentración del Salicilato de metilo (SM), Vainillina (V) y Tween<sup>®</sup> 80 (T-80), tres sustancias fotoprotectoras, en el comportamiento del extracto y la AZA, con el objetivo de identificar las concentraciones óptimas que mitiguen la degradación del extracto y aumente el porcentaje de mortalidad (%M). Para esto se realizó un diseño de experimentos del tipo *Box Behnken*. Este diseño

de superficie de respuesta hace una estimación eficaz de coeficientes de primer y segundo orden, generando menos combinaciones que un diseño factorial. Adicionalmente, toma en cuenta los puntos medios de cada variable, asegurando que las condiciones óptimas se encuentren dentro del rango establecido de cada factor [31].

Inicialmente se establecieron los puntos extremos de cada variable, partiendo de la formulación realizada por López J., quien planteó los valores cuali-cuantitativos del formulado insecticida a partir de los extractos del árbol de Nim para el control del gorgojo de arroz, que se presenta a continuación [30].

**Tabla 1. Formula Cuali-cuantitativa de producto pesticida a partir del extracto etanólico del 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% p/v
Tween® 80	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%

Fuente: LÓPEZ José G., «Extracción y producción de extractos de *Azadirachta indica*. Trabajo de Grado maestría en Ingeniería Química,» de *Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química 2017.*

A partir de estos valores, se establecieron los límites de concentración para los compuestos seleccionados, partiendo del porcentaje en el que se encontraba presente el agua y el etanol, los cuales se modificaron, dividiendo el 8.1% correspondiente al etanol, en las 3 sustancias fotoprotectoras, correspondiendo al SM y V un valor máximo de 2.7%, mientras que al T-80, que ya se encontraba presente en esta fórmula con 1.5%, le correspondió un 4.2% como concentración máxima.

**Tabla 2. Concentraciones de las sustancias usadas como fotoprotectores en los formulados a partir del extracto etanólico de Nim.**

Compuesto	Concentración mínima	Concentración máxima
Vainillina	0% v/v	2.7% v/v
Salicilato de metilo	0% v/v	2.7% v/v
Tween® 80	1.5% v/v	4.2% v/v

Se utilizó el software estadístico Minitab 18, para generar las combinaciones de estos datos conforme al diseño (ANEXO F) y para analizar los resultados. Las pruebas se hicieron en el formulado establecido en la tesis de maestría mencionada, donde fue necesario cambiar el porcentaje del etanol y del agua para poder disolver el Tween® 80, que es una sustancia muy viscosa y la Vainillina que se encontraba en estado sólido.

### **3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE HPLC.**

Para observar la degradación de los extractos, las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alta definición (HPLC), utilizando un cromatógrafo líquido HP100 (Agilent), provisto de una bomba cuaternaria, un inyector automático y un módulo detector de arreglo de diodos (DAD, con  $\lambda$  de 210 nm). La separación se realizó en una columna C18 (Agilent, 250 x 4.6 mm), en la cual se inyectaron 10  $\mu$ L de cada muestra. En el procedimiento se usó una solución de acetonitrilo/agua al 40% v/v como fase móvil durante los primeros 5 minutos, posteriormente se utiliza un gradiente lineal hasta 100% de acetonitrilo durante 7 minutos, seguido de 5 minutos de retraso para eliminar residuos de la muestra que puedan quedar en la columna, para un tiempo total de corrida de 17 minutos, a una razón de flujo de 1  $\mu$ L/min. En las muestras se adicionó como estándar interno  $\alpha$ -terpineol (Sigma Aldrich) al 2% v/v. El software empleado para el análisis de datos es ChemStation B.01.03 [32].

### **3.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA EN EL GORGOJO DEL ARROZ.**

**3.6.1 Establecimiento de la colonia.** El material entomológico para estas pruebas fue recolectado e identificado taxonómicamente por Guerrero J. [32]. Con el objetivo de utilizar adultos jóvenes y de una misma edad, los insectos fueron criados a condiciones controladas y se seleccionaron 200 individuos, sin sexar.

A continuación, se distribuyeron equitativamente en dos frascos, adicionando 50 gramos de arroz en cada uno, garantizando así su alimentación y reproducción. Los frascos fueron tapados con tela que se fijó a éstos mediante bandas elásticas evitando así la salida de los gorgojos y la entrada de otros insectos. La colonia se mantuvo en el laboratorio CINTROP del edificio de investigaciones de Guatiguará, en un ambiente de oscuridad y temperatura entre 25°C y 28°C. Con un intervalo de tiempo de 8 días se hizo mantenimiento a cada frasco, pasando los individuos vivos a un nuevo recipiente a las condiciones anteriores y de esta manera permitiendo el desarrollo de los huevos depositados en el frasco anterior.

**3.6.2 Pruebas de mortalidad.** Con el fin de determinar el porcentaje de mortalidad en los insectos se hicieron pruebas de impregnación en superficie después de exponer a radiación los extractos y los formulados. Este ensayo consistió en añadir 100 µL de las muestras en tubos de ensayo de 4 mL, se esperó un tiempo de aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente para que llegara a sequedad, posteriormente se añadieron granos de arroz para garantizar la alimentación de los individuos y finalmente a cada frasco se agregaron 4 insectos. Las pruebas se realizaron por triplicado. Como controles negativos se usaron el etanol y los formulados sin la presencia del extracto.

El porcentaje de mortalidad se calculó mediante la fórmula de Abbott [33] que corrige los errores en el manejo de individuos en base al control negativo.

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

**Ecuación 1.** Mortalidad corregida de Abbott.

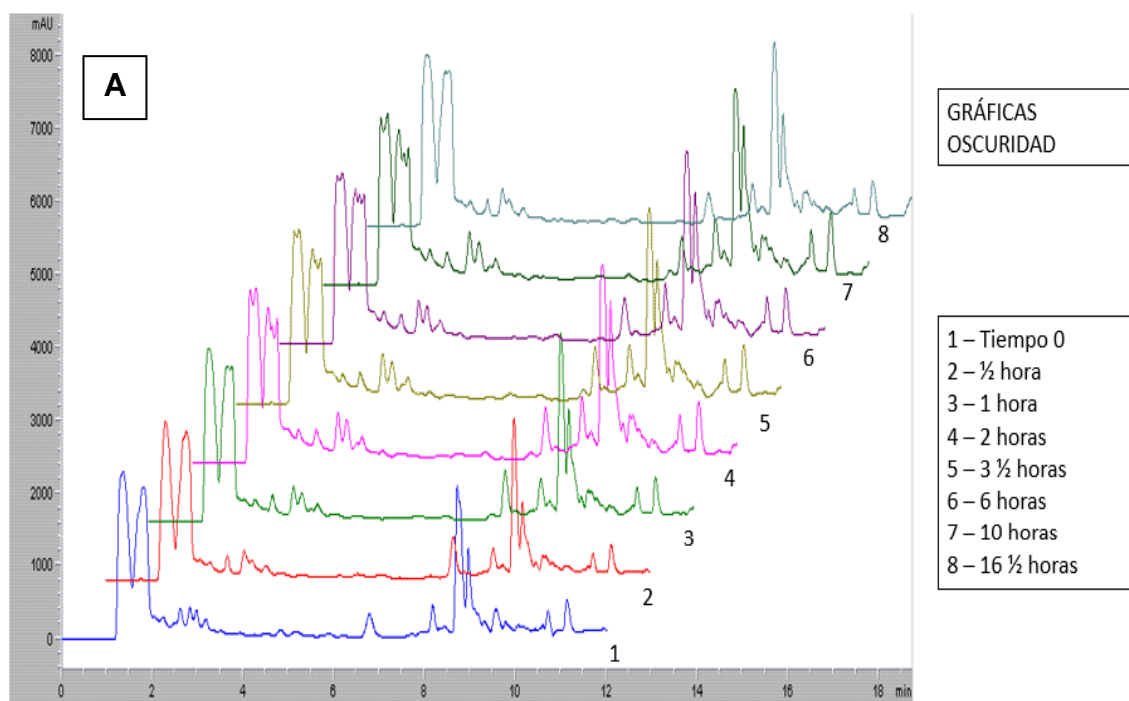
Se hizo un conteo de individuos vivos y muertos cada 48 horas para un tiempo máximo de contacto de 144 horas, ya que en estudios previos se encontró un %M del 50% en este tiempo, para el extracto sin tratamiento [30].

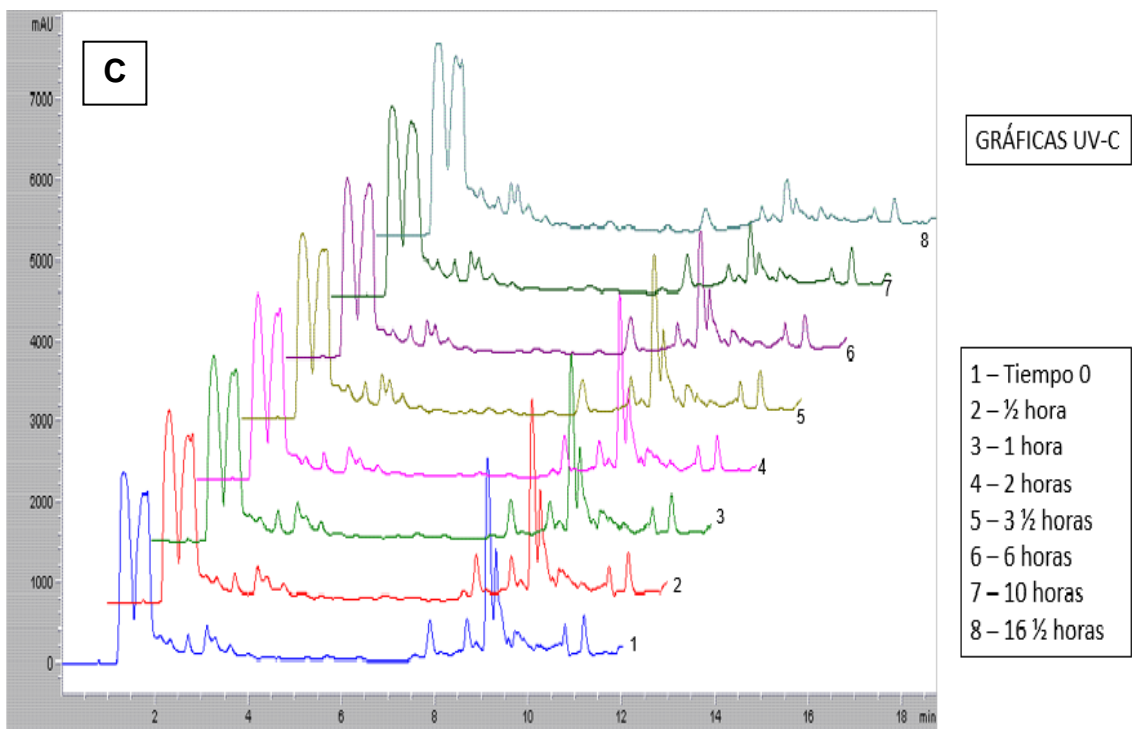
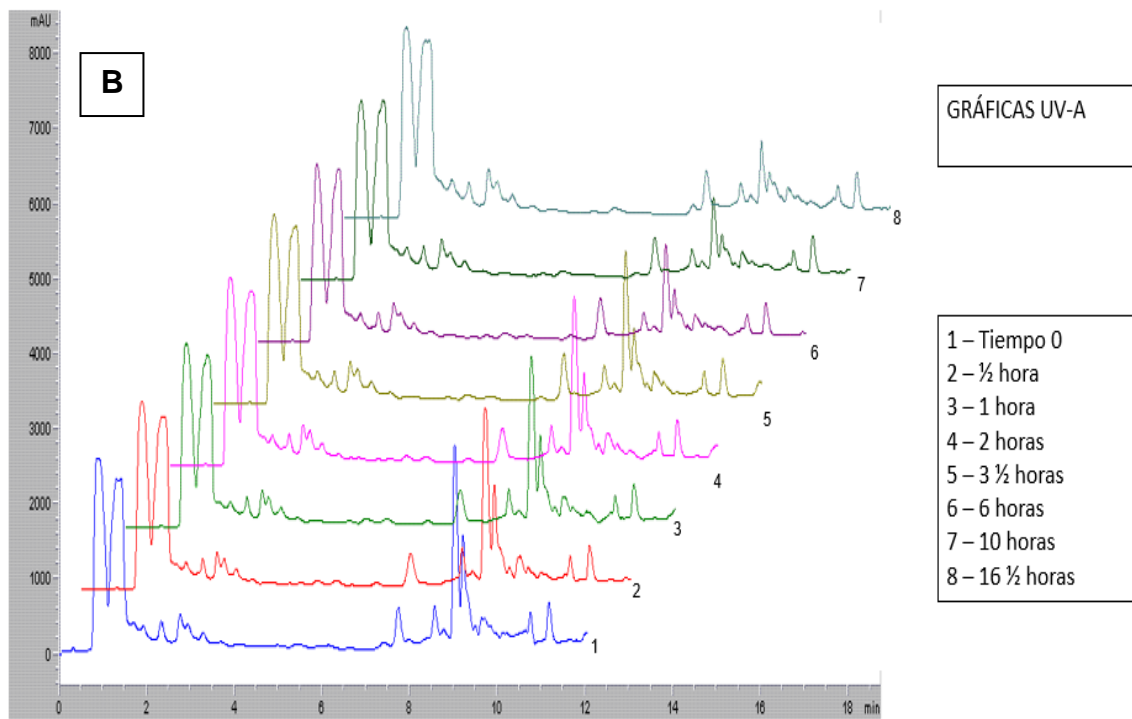
## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 DEGRADACIÓN DE AZA

Tras llevar a cabo los experimentos de fotodegradación, donde se sometieron las muestras del extracto a diferentes  $\lambda$  (254 nm y 360 nm) y tiempos (0 a 16.5 h), se procedió a analizar sus resultados, con el fin de determinar el comportamiento de los compuestos en las preparaciones tras este tratamiento.

**Figura 3. Cromatogramas de las muestras de extracto etanólico de las hojas de Nim que permanecieron en oscuridad (A) e irradiadas con luz UV-A (360 nm; B) y UV-C (254 nm; C), hasta 16.5 horas de exposición, junto al extracto sin ningún tratamiento (tiempo 0), a temperatura ambiente.**





Fuente: Autoras mediante el software ChemStation

Al comparar la figura 2A con las figuras 2B y 2C, es posible apreciar tanto un cambio en el tamaño de los picos, como la formación de algunos de estos, que no se encuentran presentes en las muestras que permanecieron en oscuridad, especialmente en los tiempos de retención ( $T_R$ ) entre 5- 12 minutos, lo que indica que posiblemente, debido a la fotodegradación de los extractos se están formando subproductos cuyas señales se solapan con otras [34]. Este cambio se aprecia más en luz UV-C. Lo anterior coincide con las afirmaciones hechas por Jhonson Shaun *et al.*, quienes en su investigación comprueban, empleando la técnica de cromatografía de fluidos supercríticos, que a luz UV-C y en presencia de una atmósfera no inerte, como ocurre en este caso, se generan productos con características polares [17], que pueden combinarse en el extracto formando apantallamiento con otros componentes.

En otro orden de ideas, al observar más en detalle los cromatogramas, se aprecia que el pico de la AZA ( $T_R$  5.1 min) y el del estándar interno ( $T_R$  9 min), en las muestras sometidas a luz UV-A Y UV-C, tienen cambios con el transcurso del tiempo. Esto puede ser generado por la formación de los productos de fotodegradación ya mencionados. Por tal motivo no fue posible cuantificar el contenido de AZA en los extractos ni la degradación de la misma. En luz UV-A se observa que esta molécula disminuye su concentración 16.5 horas, mientras que en UV-C, no es claro si la señal que emite dicha molécula cambia su  $T_R$  o como se está comportando este metabolito. Estudios realizados por Jhonson Shaun *et al.*, donde irradiaron hasta 3 horas la molécula de AZA aislada a 217 nm (UV-C), encontraron la formación de un Fotoisómero de este limonoide. En los cromatogramas que estos autores obtuvieron mediante la técnica de fluidos supercríticos muestran que a 1 hora de contacto con luz UV-C se forman 2 picos pequeños y después de 2 y 3 horas, la altura de estas señales aumenta (ANEXO G). Sin embargo, no es posible afirmar que lo mismo suceda en este experimento, ya que las condiciones y técnicas usadas por estos autores son diferentes, inclusive el análisis aquí se está utilizando el extracto de Nim completo, donde

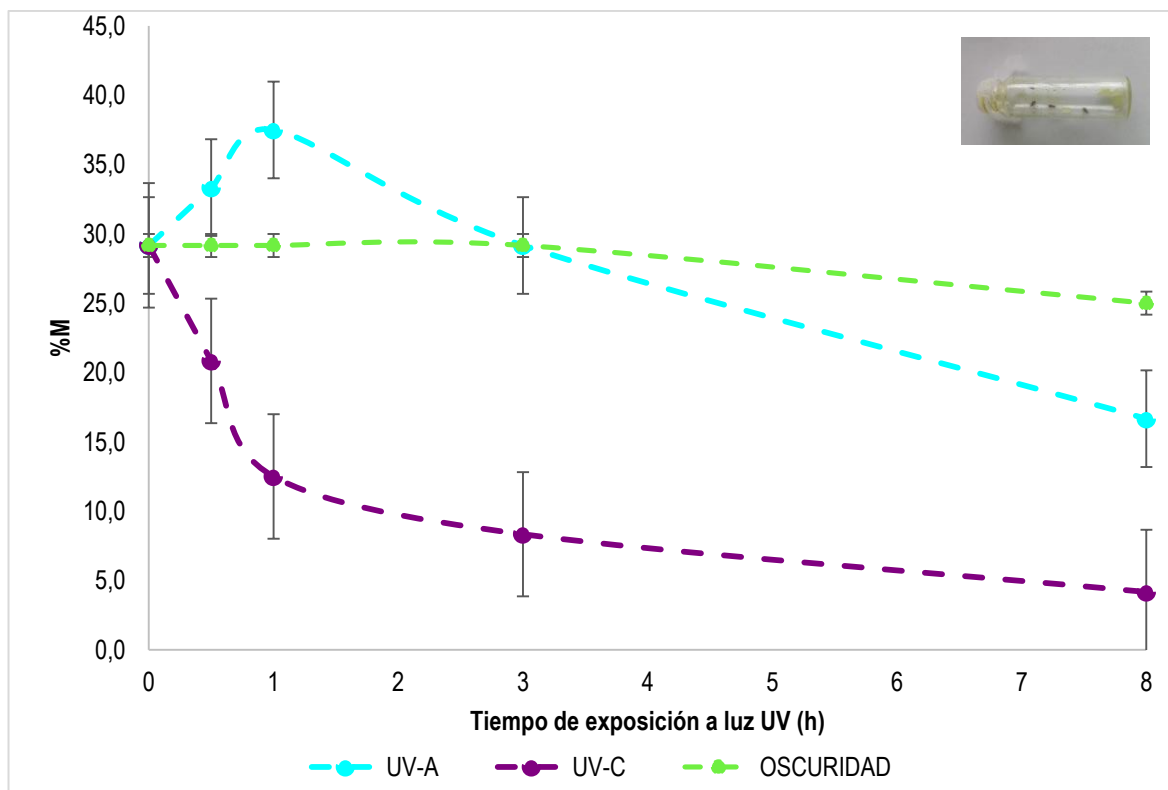
puede estarse generando una mezcla entre componentes y fotoproductos, dificultando de esta manera la cuantificación de cualquier compuesto de forma individual. Lo anterior puede estar soportado por Ríos J, quien somete a radiación UV (A y C) extractos metanólicos de suspensiones de Nim y encuentra, por HPLC, aproximadamente 57 señales, pertenecientes a compuestos diferentes o posibles productos del experimento. Sin embargo, teniendo en cuenta que en cada señal del cromatograma se puede encontrar la combinación de varios componentes, decide estudiar el comportamiento de 7 picos asumiendo que cada uno pertenece a un único metabolito [4].

En este trabajo, teniendo en cuenta que la mayor degradación de los compuestos ocurre entre 3.5 y 16.5 horas, se decidió llevar a cabo las pruebas de actividad biológica sometiendo los extractos a las mismas condiciones de incidencia lumínica hasta 8 horas de exposición.

#### **4.2 PRUEBAS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA**

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los ensayos biológicos por impregnación de superficie no porosa. Por medio de la Figura 3, se pretende observar la acción del extracto degradado, tras un máximo de 8 horas de exposición a radiación UV (254 nm y 360 nm), en el comportamiento del gorgojo de arroz.

**Figura 4. Efecto insecticida en el control del gorgojo de arroz por impregnación de superficie tras 144 h de contacto con los extractos al 2% p/v, diluidos en etanol al 96% v/v, y sometidos a radiación UV-C, UV-A y OSCURIDAD, versus el tiempo de exposición a estas longitudes de onda, a temperatura ambiente.**



En la Figura 3, al comparar el comportamiento entre los tres tratamientos llevados a cabo, se observa que en las muestras que permanecieron en oscuridad el %M es casi constante, lo que indica que posiblemente a estas condiciones, no hay una degradación notoria en los extractos. Por otra parte, en la primera hora de exposición a luz UV-A, se presenta un aumento en el %M, posiblemente causado por la formación de un fotoproducto con una mayor actividad insecticida, sin embargo, después se presenta un descenso continuo en el %M, que es más lento que en luz UV-C. Para éste último caso, se puede apreciar que la disminución de

la actividad insecticida ocurre de forma rápida, pues tras 1 h de exposición, los extractos han perdido más del 57% de su actividad insecticida y tras 3 horas han perdido el 71.6% de esta propiedad. Estos resultados pueden ser apoyados por los encontrados por Ríos J, quien afirma que a una longitud de onda de 368 nm (UV-A), la degradación de las muestras de los extractos metanólicos de Nim es más lenta que cuando se exponen a UV-C. Esto sucede porque probablemente en luz UV-C, los grupos funcionales de la AZA y del extracto como tal, absorben la energía lumínica y la convierten en energía química, permitiendo así que ocurran reacciones de este tipo, mientras que en luz UV-A esta energía no es suficiente para excitar las moléculas y causar reactividad en los componentes o se absorbe de manera más tardía [4].

En otro orden de ideas, en las pruebas irradiadas con luz UV-C ocurre una reducción consecutiva del %M con el paso del tiempo. Este comportamiento probablemente sucede a causa de la formación de un isómero de la AZA y de otros productos polares que se mencionaron en el inciso anterior [16]. Sin embargo, es evidente que la actividad insecticida al final del experimento, en esta longitud de onda, es del 4.2%, mientras que en luz UV-A es del 16.7%. Lo anterior permite intuir que al someter las muestras a radiación UV-A a tiempos mayores a 8 horas, podría resultar que este dato siga disminuyendo.

Sin embargo, a 3 horas de exposición tanto a radiación UV-A, como para luz UV-C, se percibe una disminución significativa en la actividad insecticida de los extractos, es decir, que debido a la degradación que éstos presentan y los subproductos formados, las muestras conservaron su efecto plaguicida en muy baja proporción. Por otra parte, Barnby M. A et al, aseguran que la acción de la AZA perdura hasta 200 h de ser sometida a radiación UV [35].

Estos resultados encontrados mediante ensayos biológicos son consecuentes con los observados mediante HPLC, donde para las dos longitudes de onda en estudio, se evidenciaron cambios en el extracto irradiado a diferentes tiempos, lo cual afectó negativamente el control de los individuos del gorgojo de arroz, disminuyendo la eficacia de los extractos. Estos cambios fueron más notorios cuando las muestras se irradiaron durante 3 horas, a 254 nm.

#### **4.3 PRUEBAS DE FOTOESTABILIDAD EN LOS FORMULADOS A PARTIR DE LOS EXTRACTOS DE HOJA DE NIM.**

Para realizar los experimentos de fotoestabilidad en los extractos ya formulados, se seleccionó una longitud de onda  $\lambda$  de 254 nm y un tiempo de 3 horas, debido a que a estas condiciones se pudo apreciar una notable fotodegradación en los extractos. En esta parte se incluyeron a los formulados a partir del extracto de la hoja de Nim, las sustancias fotoprotectoras que se especificaron en el ítem 2.3, en las concentraciones obtenidas mediante el diseño experimental de Box Behnken. Por medio de ensayos biológicos se analizó el %M generado por estas preparaciones. El conteo de individuos vivos y muertos se hizo tras 50 horas de contacto pues fue el tiempo en el cual se encontró una mortalidad superior al 60% con los extractos formulados [30].

En la Tabla 3 se muestra el análisis ANOVA realizado por el software Minitab 18, para el %M encontrado en el experimento. Con este análisis se precisa la relación entre los factores y la respuesta medida.

**Tabla 3. Análisis ANOVA con %M como variable de respuesta.**

FUENTE	VALOR p	FUENTE	VALOR p	FUENTE	VALOR p
Modelo Lineal	0.109	Modelo cuadrático	0.114	Interacción de 2 factores.	0.378
%SM	0.395	%SM*%SM	0.192	%SM*%T-80	0.146
%T-80	0.060	%T-80*%T-80	0.991	%SM*%V	0.630
%V	0.118	%V*%V	0.045	%T-80*%V	0.472

Con un intervalo de confianza del 95%, los resultados cuyo valor p sea menor a  $\alpha=0.05$  tienen un efecto significativo sobre el %M de la plaga del gorgojo del arroz. Para este caso, solamente el efecto cuadrático del %Vainillina influye significativamente en esta variable. Esto permite intuir que este aditivo generó la mayor fotoprotección en los formulados. El modelo que mejor se ajustó a los datos se presenta en seguida.

$$\%M = 21.6 - 47.3 (\%SM) + 4.9 (\%T) + 47.5 (\%V) + 6.92 (\%SM^2) - 0.05 (\%T^2) - 12.17 (\%V^2) + 7.58 (\%SM*\%T) + 2.26 (\%SM*\%V) - 3.43 (\%T*\%V)$$

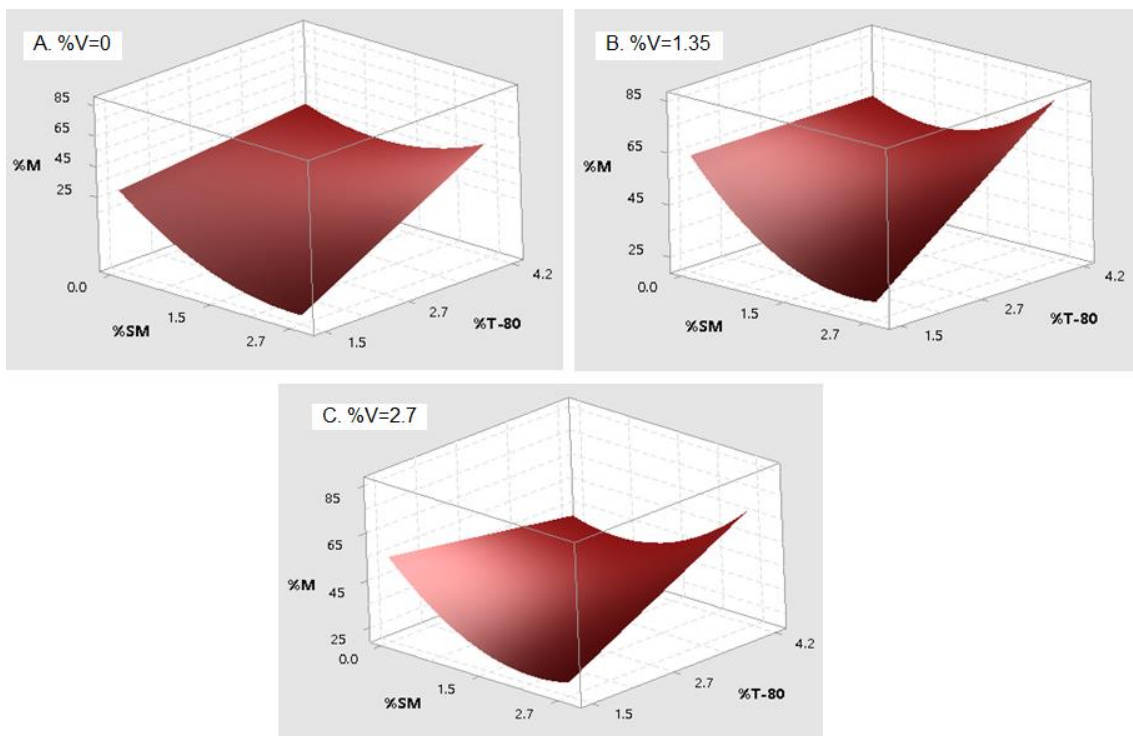
**Ecuación 2.** Modelo Matemático para la obtención del %M en función del %V, %SM Y %T-80.

Este modelo presenta un buen ajuste, con un  $R^2$  de 82.83%, lo que indica que se puede obtener una buena predicción de resultados. También este valor muestra que la variación en la mortalidad de los insectos en relación con los factores predictores, es cercana entre sí.

Partiendo del modelo resultan las gráficas de superficie de respuesta que se enseñan en la Figura 4, en la cual se presenta la relación del %M respecto a las concentraciones de T-80 y SM, manteniendo fijos tres valores del %V. Ésta última variable se mantuvo en 3 valores fijos ya que fue la que mostró el mayor efecto en el %M. Se quiso observar el comportamiento en la respuesta tanto cuando no hay

vainillina presente como cuando se encuentra el %V máximo agregado y un %V promedio.

**Figura 5. Gráficas de superficie de respuesta para el %M de los individuos del gorgojo de arroz tras 50 horas de contacto con los formulados expuestos a luz UV-C (254nm) durante 3 horas, versus %SM y %T-80 para concentraciones fijas de %V.**



En la figura 4 (A, B y C) se aprecia que los valores más altos para el %M se obtienen cuando se encuentran el SM y el T-80 en las máximas concentraciones usadas, y el menor %M ocurre cuando hay 2.7%SM y 1.5%T-80. Sin embargo, la mayor mortalidad encontrada es del  $\approx 80\%$  y se da en B, con una concentración de vainillina de 1.35%, 2.7% salicilato de metilo y 4.2% Tween<sup>®</sup>-80.

Los resultados obtenidos se explican debido a que estas sustancias añadidas en las cantidades estipuladas, efectivamente pueden estar protegiendo de los rayos UV-C las moléculas con propiedad insecticida dentro del formulado, ya que al absorber la radiación UV evitan la fotodegradación de las mismas y la formación de otros subproductos, ocasionando una mayor efectividad en el control de la plaga en estudio.

Por otra parte, cabe resaltar que en los resultados del análisis ANOVA, el valor p del efecto lineal del T-80, si bien es mayor a 0.05, es cercano a este número ( $p=0.06$ ), lo cual deja entrever que el aumento lineal en el % de T-80 influye positivamente en el crecimiento de la variable de respuesta. Por otro lado, si se compara con la formulación presentada por López J. [30], la concentración del T-80 incrementó, por tanto es posible que su función como coadyuvante aumente, generando la disminución de la tensión superficial en los formulados, permitiendo un mejor contacto entre la sustancia y el insecto, favoreciendo así la acción insecticida de los principios activos [36]. Estos resultados difieren de los presentados por Johnson S. *et al.*, quienes analizaron el efecto de varios surfactantes como fotoprotectores de la AZA, encontrando que con el T-80, la AZA remanente después de ser irradiada hasta 2 horas en luz UV-C era del 14.25%, valor que fue menor a la AZA remanente cuando se irradiaba sola (16.32%) [14]. Posiblemente esta diferencia se debe al hecho de disolver el extracto en etanol con los demás aditivos correspondientes al formulado, y no mirar la AZA aislada en una solución de acetona T-80, como lo hicieron estos autores.

Se ha comprobado que la Vainillina tiene una alta actividad antioxidante, debido a su poder reductor [37]. Kumar Santosh *et al.*, encontraron que la Vainillina inhibe las reacciones de oxidación y nitración inducidas por especies reactivas del oxígeno [38]. Por ende, se podría pensar que esta sustancia evita que algunos componentes presentes en el extracto, incluyendo la AZA que es una molécula rica en oxígeno [4], se oxiden, por lo cual, la degradación y formación de

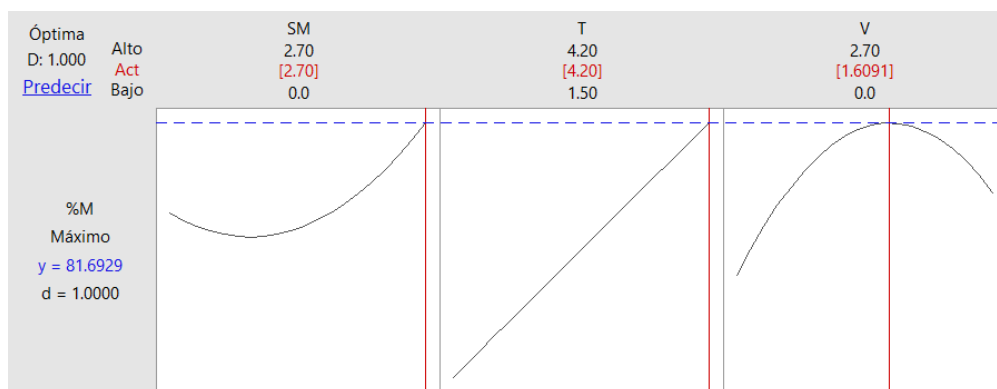
subproductos, al someter a radiación UV-C las muestras, es menor y de esta manera se incrementa la capacidad de estas preparaciones en el control de la plaga del gorgojo de arroz.

En la figura 4-B, se puede apreciar que a una concentración de SM=0% v/v, V=1.35% p/v y T-80= 4.2% v/v, se logró una mortalidad del 65%, es decir, la degradación en las preparaciones es baja, mientras que al aumentar la concentración de salicilato de metilo hasta 2.7, el incremento en la mortalidad fue del 18.8%.

En consecuencia, se esperaba que a valores cercanos al porcentaje promedio de V, y a porcentajes altos de SM y T-80, se obtengan las mejores condiciones para la fotoestabilidad de las preparaciones.

En la Figura 5, utilizando el modelo matemático se maximizó el %M encontrando los valores para cada una de las sustancias fotoestabilizadoras. La línea roja vertical representa la configuración óptima de los valores, los números en color rojo en la parte superior de las columnas muestran la cifra actual de cada factor y la línea punteada de color azul simboliza la respuesta.

**Figura 6. Optimización del %M.**



Como la deseabilidad obtenida es 1 se intuye que la distribución logra resultados favorables en cuanto a la optimización de la mortalidad de los insectos. Por lo anterior, con una concentración de 2.7% v/v de SM, 4.2% v/v de T-80 y 1.6091% p/v de V se obtiene una mortalidad máxima de 81.6929%  $\approx$  81.7%. Este dato es superior al obtenido sin los aditivos estudiados en este trabajo (%M $\approx$ 66%). Por consiguiente, es posible considerar que al añadir estas sustancias en las concentraciones mencionadas, mejora la calidad y eficiencia del producto un 19.21%. Finalmente, en el ANEXO H se presenta la formulación del bioplaguicida para el control del *Sitophilus oryzae*, con los aportes realizados en esta investigación.

## 5. CONCLUSIONES

Los compuestos de los extractos etanólicos de la hoja de Nim expuestos a radiación UV-A (360 nm) y UV-C (254 nm) tras 16.5 horas, mediante HPLC, mostraron un cambio en su concentración con el paso del tiempo de exposición, mientras que el extracto que no recibió incidencia lumínica permaneció casi constante en este mismo lapso. La variación en estas señales posiblemente ocurre por la formación de fotoproductos de degradación que se mezclan en el extracto y pueden solaparse con otros componentes, incrementando o disminuyendo la absorbancia mostrada en los cromatogramas.

La actividad insecticida mostró un decrecimiento en los extractos irradiados en luz UV-A (360 nm) y UV-C (254 nm), donde la pérdida de esta propiedad es más rápida a 254 nm, obteniéndose que tras 1 hora de contacto con esta radiación el %M disminuyó un 57% y a 3 horas de fotodegradación este porcentaje llega hasta 71.6%. Por otro lado, a 1 hora de exposición a 360 nm la mortalidad en los individuos aumentó hasta 37.5%, probablemente debido a la formación de un fotoproducto con una mayor capacidad insecticida, mientras que a 3 horas este valor disminuye hasta 29.2%, igual que el que presentan los extractos sin ningún tipo de tratamiento. Por tanto en radiación UV-A se requiere de tiempos mayores a 3 horas para observar una reducción la actividad biológica de los extractos.

Se encontró que para aumentar la fotoestabilidad y por tanto la actividad insecticida de los formulados a partir del extracto etanólico de hojas de Nim se debe añadir Vainillina en una concentración de 1.6% p/v, Salicilato de metilo en una proporción de 2.7% v/v y el tensoactivo Tween-80 en una concentración de 4.2% v/v. Estas condiciones maximizan el %M hasta 81.7% en 50 horas de contacto con los individuos del gorgojo del arroz. Igualmente se halló el modelo matemático que determina el %M en función de las variables mencionadas, con un

$R^2$  ajustado de 82.83%, lo que indica que se pueden obtener buenas predicciones para esta variable de respuesta mediante esta ecuación.

## 6. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el proceso de irradiación de la AZA partiendo de extractos de la hoja de Nim sometidos a un proceso de purificación o en lo posible aislando esta molécula de los mismos, para de esta manera obtener resultados más certeros en cuanto al comportamiento y fotodegradación de la misma.

De igual manera, se recomienda evaluar el efecto tanto de los aditivos usados, en una mayor concentración, como el de otras sustancias con la propiedad de absorber luz UV en los formulados de Nim, mediante técnicas más avanzadas como por ejemplo RMN, cromatografía acoplada a masas, cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), entre otros.

Se propone también llevar a cabo estudios del efecto de la temperatura y la humedad en los extractos de la hoja de Nim, para determinar la degradación que estos factores pueden generar en los mismos.

Finalmente, se sugiere realizar un estudio de campo para ser analizado y comparado con los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio y de esta manera comprobar la efectividad del formulado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FALASCA, Silvia L. y BERNABÉ, María A. «El árbol del Neem: ¿aceite para Biodiesel o para Bioinsectida?. EN: ResearchGate.[Sitio web]. [Consulta 02 de febrero de 2017 ]. Archivo pdf.Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/266461684\\_El\\_arbol\\_del\\_Neem\\_aceite\\_para\\_Biodiesel\\_o\\_para\\_Bioinsectida](https://www.researchgate.net/publication/266461684_El_arbol_del_Neem_aceite_para_Biodiesel_o_para_Bioinsectida) .

[2] LÓPEZ, María y ESTRADA, Jesús. «LOS BIOINSECTICIDAS DE EN EL CONTROL DE PLAGAS DE INSECTOS EN CULTIVOS ECONÓMICOS. LA HABANA (CUBA).,» *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 2005. Vol. 37, nº 2, pp. 41-49.

[3] «DEAQ. DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES AGRONÓMICAS. DECIS FORTE,» [Sitio web]. [Consulta 02 de febrero de 2017 ]. Disponible en: <http://www.agroquimicos-organicosplm.com/decis-forte-623-3#inicio>

[4] RIOS, Jhon Diego. «Determinación de la fotodegradación de extracto metanólico de suspensiones celulares de *Azadiractha indica* A. Juss (Neem). Trabajo de grado Magister en Ciencias.» Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, 2014.

[5] CRUZ FERNÁNDEZ, Mario,Dr. y SÁNCHEZ, Roberto del Ángel, M C.«El arbol de Nim, establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Campo experimental Huichihuayán y campo experimental Ébano.» *San Luis Potosí, México,2004. 23 p. ISSN 1405-1915.*

[6] KUMAR JHARIYA, Manoj, *et al.* Neem: A Tree for Solving Global Problems. EN: ResarchGate. [Sitio web]. [Consulta: 05 de febrero de 2017 ].Archivo pdf.

Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/279951431\\_Neem-A\\_Tree\\_for\\_Solving\\_Global\\_Problem](https://www.researchgate.net/publication/279951431_Neem-A_Tree_for_Solving_Global_Problem).

[7] ANGÚLO ESCALANTE, Miguel A., et al. Alfonso Gardea, «Contenido de Azadiractina en semillas de Nim (*Azadirachta indica* A. JUSS) colectadas en Sinaloa, México.» En: revista Fitotecnia Mexicana, 2004. Vol. 27, nº 4, pp. 305-311.

[8] CRUZ FERNÁNDEZ, Mario. «Dinámica de la Azadiractina en arboles de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) de México y su efecto contra dos insectos de almacén.» Trabajo de grado Doctor en Ciencias agrícolas con especialidad en parasitología de poscosecha. México: Universidad autonómá de Nuevo León. Facultad de Agronomía, 1998.

[9] «EcuRed. Radiación ultravioleta.» [Sitio web]. [Consulta: 06 de febrero de 2017] Disponible en: [https://www.ecured.cu/Radiaci%C3%B3n\\_ultravioleta](https://www.ecured.cu/Radiaci%C3%B3n_ultravioleta)].

[10] CABRERA, Sergio; LISSI, Eduardo y HONEYMAN, Juan. «Radiación ultravioleta y salud.» [Sitio web]. [Consulta: 10 de febrero de 2017 ]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=KrUfTWbIPhMC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.

[11] CARRASCO, Libertad. «EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA-B EN PLANTAS.» [Sitio web]. [Consulta: 19 de junio de 2017] Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292009000300009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292009000300009&script=sci_arttext).

[12] GONZÁLEZ, Mónica. «Transmitancia y absorbancia.» En: La Guía Química. [Sitio web]. [Consulta: 06 de junio de 2017 ]. Disponible en: <http://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/transmitancia-y-absorbancia>.

- [13] THEJAVATHI, R.; YAKKUNDI, Shirish R. y RAVINDRANATH, B. «Determination of Azadirachtin by reversed-phase high performance liquid chromatography using anisole as internal standard.» En: Journal of Chromatography A. 1995. Vol. 705, pp. 374-379.
- [14] JOHNSON, Sapna y DUREJA, Prem. «Effect of surfactants on persistence of Azadirachtin-A (Neem based pesticide).»En: Journal of Environmental Science and Health. 2002. Vol. 37, nº 1, pp. 75-80.
- [15] SRIVASTAVA, Smita, Dr. y SRIVASTAVA, A. K, Dr. «Stability enhancement of Azadirachtin (a biopesticide) produced in vitro against atmospheric degradation.» En: Annual International Conference on Advances in Biotechnology (BIOTECH ,2011).
- [16] DUREJA, Prem y JOHNSON, Sapna. «Photodegradation of Azadirachtin-A: A neem-based pesticide.» En: Current Science. 2000. Vol. 79, nº 12, pp. 1700-1703.
- [17] JOHNSON, Shaun, et al.«Photo-isomerization of Azadirachtin Studied by High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Field Proton NM R Spectroscopy.» En: Journal of Chemical Society, Perkin Transaction 1. 1994. pp. 1499-1502.
- [18] JOHNSON, Sapna; DUREJA, Prem y DHINGRA, S. «Photostabilizers for Azadirachtin-A (A Neem-Based Pesticide).»En: Journal of Environmental Science and Health. Part B—Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 2003. Vol. B38, nº 4, pp. 451-462.
- [19] SUNDARAM, K.M.S. y CURRY, J. «Effect of some uv light absorbers on the photostabilization of Azadirachtin, A Nemm-based biopesticide.»En: Chemosphere. 1996. Vol. 32, nº 4, pp. 649-659

[20] BANERJEE, Kaushik y DUREJA, Prem. «Photostabilization of Quinalphos by Crystal Violet on the Surface of Kaolinite and Palygorskite.» En: *Journal of Pesitice Science*. 1995. Vol. 43, pp. 333-337.

[21] MAHESHBHAI PATEL, Gautamkumar «Synthesis, characterization and study of biological activity of some lactol, benzil and oxindole derivatives» Trabajo de grado Doctor de filosofia en quimica aplicada. India: M. S. Universidad de Baroda. Departamento de quimica aplicada, 2013.

[22] DEOTA, P.T.; UPDHYAY, P.R. y VALODKAR, V.B., «Effect of ultravioleta light absorbers on photostabilization of Azadirachtin-A in solution (part:II)» En: *Journal Natural Product Research*. 2002. Vol. 17, nº 1, pp. 21-26.

[23] Acofarma, «Fichas de información técnica. Tween,» [Sitio web]. [Consulta: 20 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4086-13a7fe07629597df9e0d232a7707d11bf48fb03b/main/files/Tween.pdf>.

[24] Universidad Autonoma de Madrid, «Salicilato de metilo: de protector solar a memoria molecular,» En: Universia [Sitio web]. [Consulta: 09 de junio de 2017]. Disponible en: <http://noticias.universia.es/ciencia-ntt/noticia/2012/10/02/970320/salicilato-metilo-protector-solar-memoria-molecular.html>.

[25] CATALÁN, J. «On the fluorescence of methyl salicylate: the significance of it IMHB,» *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012. Vol. 14, pp. 8903-8909

[26] ORTUÑO SANCHEZ, Manuel Fransisco. «Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes.,» 2006. [Sitio web]. [Consulta: 09 de junio de 2017]. Disponible en:

<https://books.google.com.co/books?id=cW5TsDKqx9wC&pg=PA107&lpg=PA107&dq=vainillina+absorbe+luz&source=bl&ots=LmY0IThBmk&sig=iQApPobnJAN6N9aIGvFDaLd5WvE&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi3lbe3wrHUAhVGVyYKHeIJD MUQ6AEIITAA#v=onepage&q=vainillina%20absorbe%20luz&f=false>.

[27] LUCAS, Eric y RIUDA VETS, Jordi. «Biological and mechanical control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice.» *Journal of Stored Products Research*. 2002. Vol. 38, pp. 293-304.

[28] IBRAHIN, Sahar I.A. «Bioactivity of Some Essential Oils against the Rice Weevils, *Sitophilus oryzae* L. (Coleóptera: curculionidae),» En: *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2016. Vol. 26, nº 1, pp. 123-126.

[29] ATHANASSIOUA, Christos G, et. al., «Insecticidal Effect of NeemAzal Against Three Stored-Product Beetle Species on Rye and Oats,» En: *Journal of Economic Entomology*. 2005. Vol. 5, nº 98, pp. 1733-1738.

[30] LÓPEZ ORTÍZ, José Gabriel. «Producción y evaluación de extractos de *Azadirachta indica* para su uso como Bioinsecticidas Agroindustriales». Trabajo de Grado maestría en Ingeniería Química, de *Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química*. 2017.

[31] «Soporte de Minitab 17,» 2017. [Sitio web]. [Consulta: 17 de junio de 2017]. Disponible en: <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/doe/response-surface-designs/what-is-a-box-behnken-design/>.

[32] GUERRERO RODRÍGUEZ, Julián Mauricio. «Producción de extractos de *Azadirachta indica* (Nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de *Sitophilus Oryzae*». Trabajo de grado Ingeniería Química. Bucaramanga:

Universidad Industrial de Santander. de *Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química 2016.*

[33] «El Bioensayo en entomología.,» [Sitio web]. [Consulta: 13 de junio de 2017]. Disponible en: [http://www.cm.colpos.mx/moodle/file.php/13/BIOENSAYO/EL\\_BIOENSAYO\\_EN\\_ENTOMOLOGIA.pdf](http://www.cm.colpos.mx/moodle/file.php/13/BIOENSAYO/EL_BIOENSAYO_EN_ENTOMOLOGIA.pdf).

[34] Universitas Miguel Hernandez, «TOXICOLOGÍA AMBIENTAL Y SALUD PÚBLICA. Transmitancia, absorbancia y ley de Lambert-Beer.,» Universidad Miguel Hernandez de Elche. Departamento de Biología Aplicada. [Sitio web]. [Consulta: 23 de junio de 2017]. Disponible en: [http://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P\\_22CursoMateriales/Miguel\\_Angel\\_Sogorb/Wimba/Espectroscopia\\_05.htm](http://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_05.htm).

[35] BARNBY, M. A.; YAMASAKI, R. B. y KLOCKE, J. A. «Biological Activity of Azadirachtin., Three Derivatives., and Their Ultraviolet Radiation Degradation Products Against Tobacco Budworm (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae,» En: *Journal of Economic Entomology*. 1989 Vol. 82, nº 1, p. 60.

[36] BRARI, Jyotika y THAKUR, D. R. «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, nº 3, pp. 365-370.

[37] TRAPERO QUINTANA, Yoagne Maria. «FARMACOCINÉTICA Y TOXICOLOGÍA DEL 4-HIDROXI-3-METOXIBENZALDEHÍDO (VAINILLINA) EN MODELOS IN VIVO» Trabajo de grado Doctor en Ciencias de la Salud. La Habana: Universidad de Oriente. Centro de Biofísica Médica. 2013.

[38] KUMAR, S. Santosh.; PRIYADARSINI, K. Indira. y SAINIS, Krishna B. «Inhibition of Peroxynitrite-Mediated Reactions by Vanillin,» En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004 Vol. 52, pp. 139-145.

[39] «La sucesión de Fibonacci,» [Sitio web]. [Consulta: 10 de junio de 2017]  
Disponible en:  
[http://www.ite.educacion.es/formacion/enred/web\\_espinal/naturaleza/vegetal/fibonacci/fibonacci.htm](http://www.ite.educacion.es/formacion/enred/web_espinal/naturaleza/vegetal/fibonacci/fibonacci.htm).

[40] GUISANDE GONZALEZ, Castor; VAAMONDE LISTE, Antonio y BARREIRO FELPETO, Aldo «Tratamiento de datos con R, STATISTICA y SPSS,» Ediciones Díaz de Santos, 2013. [Sitio web]. [Consulta: 25 de junio de 2017]. Disponible en:  
<https://es.scribd.com/document/268654944/T-r-a-t-a-m-i-e-n-t-o-d-e-d-a-t-o-s-c-o-n-R-Statistica-y-S-P-S-S>.

[41] «Pruebas no paramétricas,» [Sitio web]. [Consulta: 14 de junio de 2017]  
Disponible en:  
[https://previa.uclm.es/actividades0708/cursos/estadistica/pdf/descargas/SPSS\\_Pru\\_ebasNoParametricas.pdf](https://previa.uclm.es/actividades0708/cursos/estadistica/pdf/descargas/SPSS_Pru_ebasNoParametricas.pdf)

## BIBLIOGRAFÍA

Acofarma, «Fichas de información técnica. Tween,» [Sitio web]. [Consulta: 20 de mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4086-13a7fe07629597df9e0d232a7707d11bf48fb03b/main/files/Tween.pdf>.

ANGÚLO ESCALANTE, Miguel A., et al. Alfonso Gardea, «Contenido de Azadiractina en semillas de Nim (*Azadirachta indica* A. JUSS) colectadas en Sinaloa, México.» En: revista Fitotecnia Mexicana, 2004. Vol. 27, nº 4, pp. 305-311.

ATHANASSIOUA, Christos G, et. al., «Insecticidal Effect of NeemAzal Against Three Stored-Product Beetle Species on Rye and Oats,» En: *Journal of Economic Entomology*. 2005. Vol. 5, nº 98, pp. 1733-1738.

BANERJEE, Kaushik y DUREJA, Prem. «Photostabilization of Quinalphos by Crystal Violet on the Surface of Kaolinite and Palygorskite.» En: *Journal of Pest Science*. 1995. Vol. 43, pp. 333-337.

BARNBY, M. A.; YAMASAKI, R. B. y KLOCKE, J. A. «Biological Activity of Azadirachtin., Three Derivatives., and Their Ultraviolet Radiation Degradation Products Against Tobacco Budworm (*Lepidoptera*: Noctuidae) Larvae,» En: *Journal of Economic Entomology*. 1989 Vol. 82, nº 1, p. 60.

BRARI, Jyotika y THAKUR, D. R. «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, nº 3, pp. 365-370.

CABRERA, Sergio; LISSI, Eduardo y HONEYMAN, Juan. «Radiación ultravioleta y salud.» [Sitio web]. [Consulta: 10 de febrero de 2017 ]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=KrUfTWblPhMC&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>.

CARRASCO, Libertad. «EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA-B EN PLANTAS.» [Sitio web]. [Consulta: 19 de junio de 2017] Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292009000300009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-34292009000300009&script=sci_arttext).

CATALÁN, J. «On the fluorescence of methyl salicylate: the significance of it IMHB,» *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2012. Vol. 14, pp. 8903-8909

CRUZ FERNÁNDEZ, Mario, Dr. y SÁNCHEZ, Roberto del Ángel, M C. «El árbol de Nim, establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Campo experimental Huichihuayán y campo experimental Ébano.» *San Luis Potosí, México, 2004. 23 p. ISSN 1405-1915*.

CRUZ FERNÁNDEZ, Mario. «Dinámica de la Azadiractina en árboles de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) de México y su efecto contra dos insectos de almacén.» Trabajo de grado Doctor en Ciencias agrícolas con especialidad en parasitología de poscosecha. México: Universidad autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía, 1998.

DEAQ. DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES AGRONÓMICAS. DECIS FORTE, [Sitio web]. [Consulta 02 de febrero de 2017 ]. Disponible en: <http://www.agroquimicos-organicosplm.com/decis-forte-623-3#inicio>

DEOTA, P.T.; UPDHYAY, P.R. y VALODKAR, V.B., «Effect of ultravioleta light absorbers on photostabilization of Azadirachtin-A in solution (part:II)» En: *Journal Natural Product Research*. 2002. Vol. 17, nº 1, pp. 21-26.

DUREJA, Prem y JOHNSON, Sapna. «Photodegradation of Azadirachtin-A: A neem-based pesticide.» En: *Current Science*. 2000. Vol. 79, nº 12, pp. 1700-1703.

EcuRed. Radiación ultravioleta. [Sitio web]. [Consulta: 06 de febrero de 2017] Disponible en: [https://www.ecured.cu/Radiaci%C3%B3n\\_ultravioleta](https://www.ecured.cu/Radiaci%C3%B3n_ultravioleta)].

El Bioensayo en entomología., [Sitio web]. [Consulta: 13 de junio de 2017]. Disponible en: [http://www.cm.colpos.mx/moodle/file.php/13/BIOENSAYO/EL\\_BIOENSAYO\\_EN\\_ENTOMOLOGIA.pdf](http://www.cm.colpos.mx/moodle/file.php/13/BIOENSAYO/EL_BIOENSAYO_EN_ENTOMOLOGIA.pdf).

FALASCA, Silvia L. y BERNABÉ, María A. «El árbol del Neem: ¿aceite para Biodiesel o para Bioinsectida?. EN: ResearchGate.[Sitio web]. [Consulta 02 de febrero de 2017 ]. Archivo pdf.Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/266461684\\_El\\_arbol\\_del\\_Neem\\_aceite\\_para\\_Biodiesel\\_o\\_para\\_Bioinsectida](https://www.researchgate.net/publication/266461684_El_arbol_del_Neem_aceite_para_Biodiesel_o_para_Bioinsectida) .

GONZÁLEZ, Mónica. «Transmitancia y absorbancia.» En: *La Guía Química*. [Sitio web]. [Consulta: 06 de junio de 2017]. Disponible en: <http://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/transmitancia-y-absorbancia>.

GUERRERO RODRÍGUEZ, Julián Mauricio. «Producción de extractos de Azadirachta indica (Nim) y evaluación de su actividad insecticida para el control de Sitophilus Oryzae». Trabajo de grado Ingeniería Química. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. de *Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química 2016*.

GUISANDE GONZALEZ, Castor; VAAMONDE LISTE, Antonio y BARREIRO FELPETO, Aldo «Tratamiento de datos con R, STATISTICA y SPSS,» Ediciones Díaz de Santos, 2013. [Sitio web]. [Consulta: 25 de junio de 2017]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/268654944/T-r-a-t-a-m-i-e-n-t-o-d-e-d-a-t-o-s-c-o-n-R-Statistica-y-S-P-S-S>.

IBRAHIN, Sahar I.A.«Bioactivity of Some Essential Oils against the Rice Weevils, *Sitophilus oryzae* L. (Coleóptera: curculionidae),» En:*Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2016. Vol. 26, nº 1, pp. 123-126.

JOHNSON, Sapna y DUREJA, Prem. «Effect of surfactants on persistence of Azadirachtin-A (Neem based pesticide).»En: *Journal of Environmental Science and Health*. 2002. Vol. 37, nº 1, pp. 75-80.

JOHNSON, Sapna; DUREJA, Prem y DHINGRA, S. «Photostabilizers for Azadirachtin-A (A Neem-Based Pesticide).»En: *Journal of Environmental Science and Health. Part B—Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*. 2003. Vol. B38, nº 4, pp. 451-462.

JOHNSON, Shaun, et al.«Photo-isomerization of Azadirachtin Studied by High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Field Proton NMR Spectroscopy.» En: *Journal of Chemical Society, Perkin Transaction 1*. 1994. pp. 1499-1502.

KUMAR JHARIYA, Manoj, et al. *Neem: A Tree for Solving Global Problems*. EN: ResearchGate. [Sitio web]. [Consulta: 05 de febrero de 2017 ].Archivo pdf. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/279951431\\_Neem-A\\_Tree\\_for\\_Solving\\_Global\\_Problem](https://www.researchgate.net/publication/279951431_Neem-A_Tree_for_Solving_Global_Problem).

KUMAR, S. Santosh.; PRIYADARSINI, K. Indira. y SAINIS, Krishna B. «Inhibition of Peroxynitrite-Mediated Reactions by Vanillin,» En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004 Vol. 52, pp. 139-145.

La sucesión de Fibonacci, [Sitio web]. [Consulta: 10 de junio de 2017] Disponible en:

[http://www.ite.educacion.es/formacion/enred/web\\_espiral/naturaleza/vegetal/fibonacci/fibonacci.htm](http://www.ite.educacion.es/formacion/enred/web_espiral/naturaleza/vegetal/fibonacci/fibonacci.htm).

LÓPEZ ORTÍZ, José Gabriel. «Producción y evaluación de extractos de *Azadirachta indica* para su uso como Bioinsecticidas Agroindustriales». Trabajo de Grado maestría en Ingeniería Química, de *Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química*. 2017.

LÓPEZ, María y ESTRADA, Jesús. «LOS BIOINSECTICIDAS DE EN EL CONTROL DE PLAGAS DE INSECTOS EN CULTIVOS ECONÓMICOS. LA HABANA (CUBA).,» *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 2005. Vol. 37, nº 2, pp. 41-49.

LUCAS, Eric y RIUDAUVETS, Jordi. «Biological and mechanical control of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice.» *Journal of Stored Products Research*. 2002. Vol. 38, pp. 293-304.

MAHESHBHAI PATEL, Gautamkumar «Synthesis, characterization and study of biological activity of some lactol, benzil and oxindole derivatives» Trabajo de grado Doctor de filosofía en química aplicada. India: M. S. Universidad de Baroda. Departamento de química aplicada, 2013.

ORTUÑO SANCHEZ, Manuel Fransisco. «Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes.,» 2006. [Sitio web]. [Consulta: 09 de junio de 2017]. Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=cW5TsDKqx9wC&pg=PA107&lpg=PA107&dq=vainillina+absorbe+luz&source=bl&ots=LmY0IThBmk&sig=iQApPobnJAN6N9aIGvFDaLd5WvE&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi3lbe3wrHUAhVGVyYKHeIJDMUQ6AEITAA#v=onepage&q=vainillina%20absorbe%20luz&f=false>.

Pruebas no paramétricas, [Sitio web]. [Consulta: 14 de junio de 2017] Disponible en: [https://previa.uclm.es/actividades0708/cursos/estadistica/pdf/descargas/SPSS\\_Pru\\_ebasNoParametricas.pdf](https://previa.uclm.es/actividades0708/cursos/estadistica/pdf/descargas/SPSS_Pru_ebasNoParametricas.pdf)

RIOS, Jhon Diego. «Determinación de la fotodegradación de extracto metanólico de suspensiones celulares de *Azadiractha indica* A. Juss (Neem). Trabajo de grado Magister en Ciencias.» Medellín: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Escuela de Química, 2014.

Soporte de Minitab 17, 2017. [Sitio web]. [Consulta: 17 de junio de 2017]. Disponible en: <http://support.minitab.com/es-mx/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/doe/response-surface-designs/what-is-a-box-behnken-design/>.

SRIVASTAVA, Smita, Dr. y SRIVASTAVA, A. K, Dr. «Stability enhancement of Azadirachtin (a biopesticide) produced in vitro against atmospheric degradation.» En: Annual International Conference on Advances in Biotechnology (BIOTECH ,2011).

SUNDARAM, K.M.S. y CURRY, J. «Effect of some uv light absorbers on the photostabilization of Azadirachtin, A Nemm-based biopesticide.» En: Chemosphere. 1996. Vol. 32, nº 4, pp. 649-659

THEJAVATHI, R.; YAKKUNDI, Shirish R. y RAVINDRANATH, B. «Determination of Azadirachtin by reversed-phase high performance liquid chromatography using anisole as internal standard.» En: Journal of Chromatography A. 1995. Vol. 705, pp. 374-379.

TRAPERO QUINTANA, Yoagne Maria. «FARMACOCINÉTICA Y TOXICOLOGÍA DEL 4-HIDROXI-3-METOXIBENZALDEHÍDO (VAINILLINA) EN MODELOS IN VIVO» Trabajo de grado Doctor en Ciencias de la Salud. La Habana: Universidad de Oriente. Centro de Biofísica Médica. 2013.

Universidad Autónoma de Madrid, «Salicilato de metilo: de protector solar a memoria molecular,» En: Universia [Sitio web]. [Consulta: 09 de junio de 2017]. Disponible en: <http://noticias.universia.es/ciencia-ntt/noticia/2012/10/02/970320/salicilato-metilo-protector-solar-memoria-molecular.html>.

Universitat Miguel Hernández, «TOXICOLOGÍA AMBIENTAL Y SALUD PÚBLICA. Transmitancia, absorbancia y ley de Lambert-Beer.,» Universidad Miguel Hernández de Elche. Departamento de Biología Aplicada. [Sitio web]. [Consulta: 23 de junio de 2017]. Disponible en: [http://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P\\_22CursoMateriales/Miguel\\_Angel\\_Sogorb/Wimba/Espectroscopia\\_05.htm](http://repositorio.innovacionumh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_05.htm).

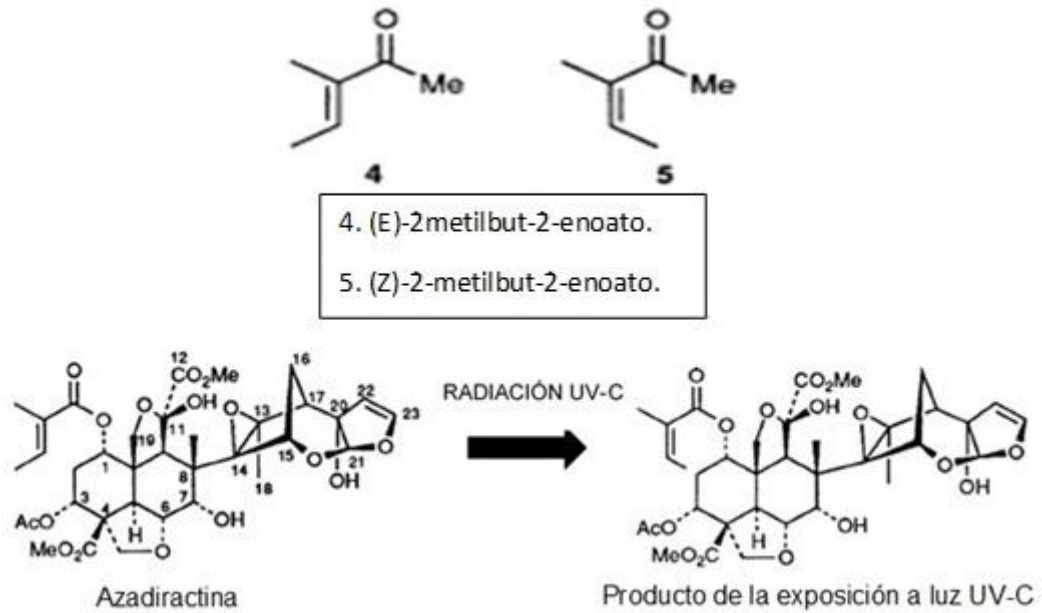
## ANEXOS

### ANEXO A. Árbol de Nim.



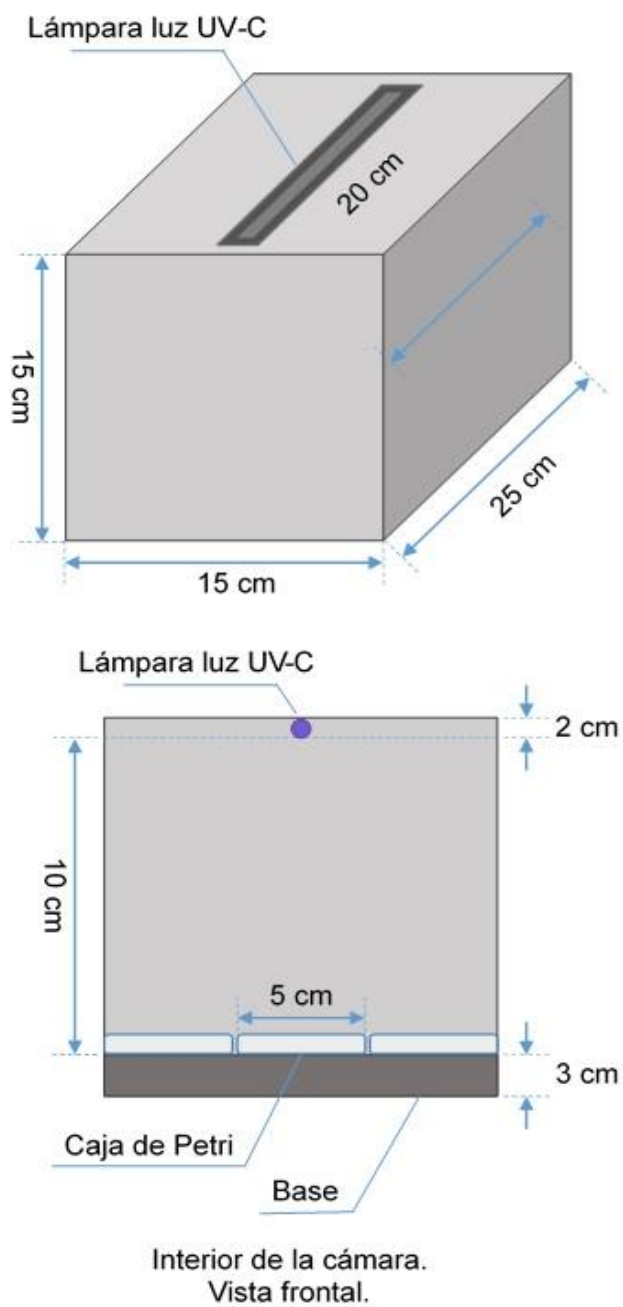
Fuente: GARDEA Casimiro. El árbol de Neem (Nim) (*Azadirachta indica*) "La farmacia del pueblo". [Citado el 01 de abril de 2017]. Disponible en: <https://navegantecalifornio.wordpress.com/2014/06/11/el-arbol-de-neem-nim-azadirachta-indica-la-farmacia-del-pueblo/>

## ANEXO B. Producto de la fotodegradación de la AZA.



Fuente: Shaun JOHNSON; E. David MORGAN; Ian D. Wilson, et al. Photo-isomerization of Azadirachtin Studied by High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Field Proton NM R Spectroscopy. [Citado el 15 de Mayo de 2017] Disponible en: <https://sci-hub.cc/10.1039/P19940001499>

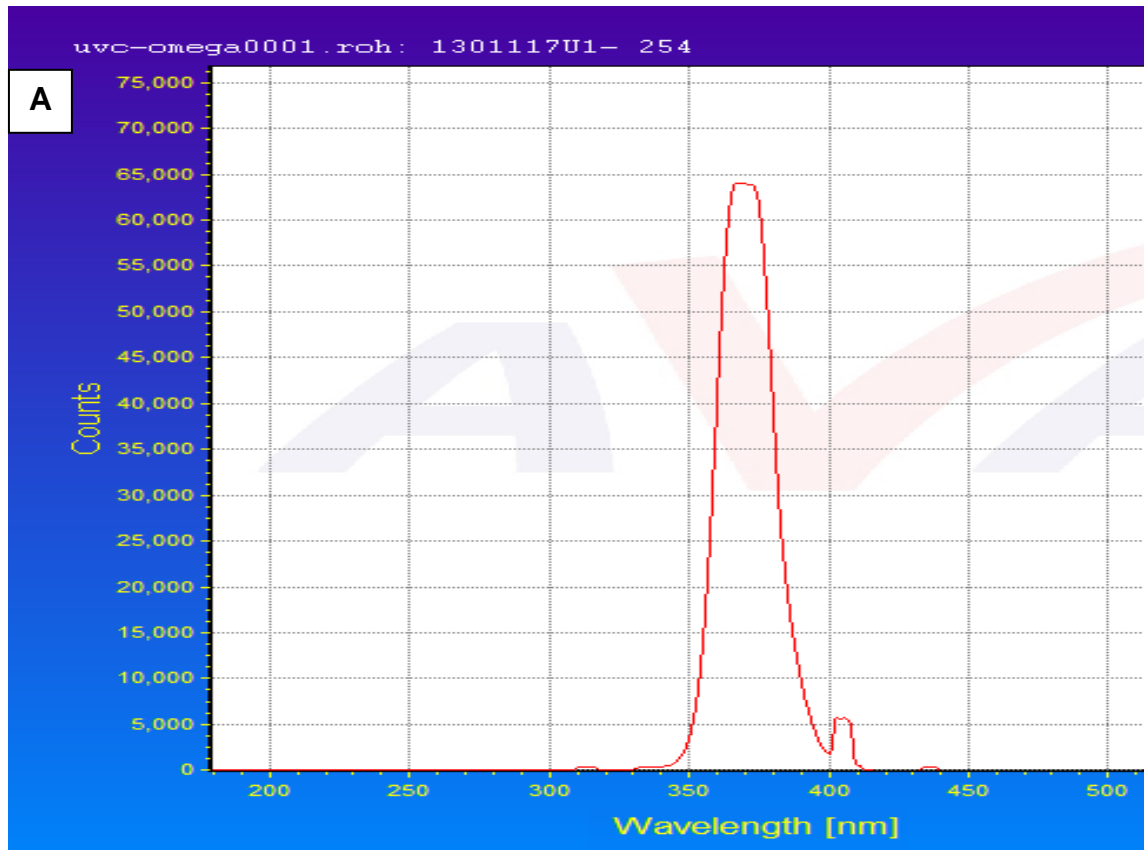
**ANEXO C. Diagrama del diseño de las cámaras de fotodegradación con una distancia de 10 cm entre la fuente lumínica y las muestras.**

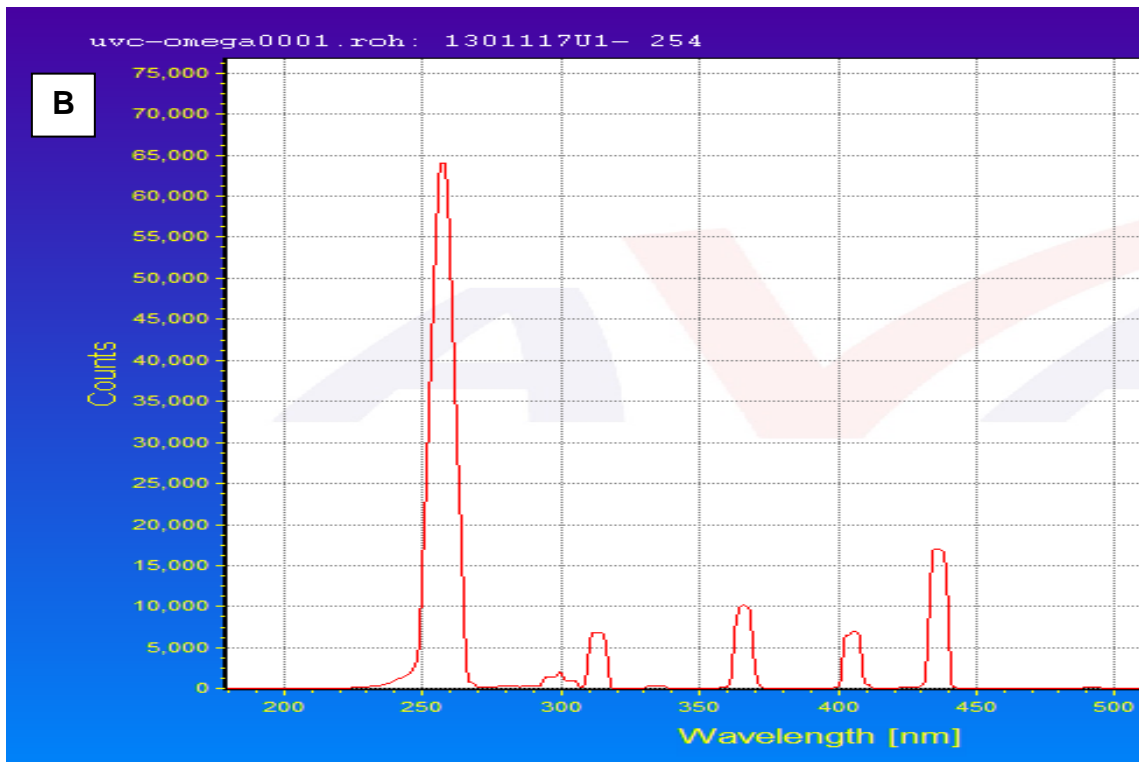


Fuente: Autoras.

Las fuentes utilizadas fueron dos lámparas, una con  $\lambda$  254 nm y otra con  $\lambda$  360 nm, las cuales fueron caracterizadas con un espectrofotómetro Avantes AvaSpec 3648. Estas cámaras estuvieron completamente aisladas de la luz externa, evitando de esta manera algún efecto adicional en las muestras a analizar. También se elaboró una cámara que permaneció sin iluminación interna y externa (oscuridad), en donde se depositaron las muestras denominadas como controles o sin tratamiento.

En las siguientes figuras se presenta el espectro de las fuentes lumínicas de UV-A (A) y UV-C (B) obtenido mediante el espectrofotómetro Avantes AvaSpec 3648.





Estas gráficas muestran la longitud de onda a la que emiten cada una de las lámparas. La gráfica A muestra que la lámpara de UV-A tiene su máximo de emisión en aproximadamente 360 nm, y en la gráfica B se observa que la lámpara de UV-C presenta el máximo de irradiación a aproximadamente 254 nm.

## ANEXO D. Serie de Fibonacci

Es una serie infinita de números naturales, que inicia con el 0 y el uno y los posteriores números son la suma de los 2 anteriores. Varios procesos en la naturaleza siguen esta serie, como por ejemplo la distribución de las hojas alrededor del tallo de las plantas, la reproducción de los conejos, entre otros. [39] Por revisión bibliográfica se conoce que la AZA aislada e irradiada en luz UV se degrada en aproximadamente 48 min, por tanto se quiso analizar el comportamiento partiendo del hecho de que se está estudiando la AZA dentro del extracto de las hojas del árbol de Nim, para lo cual se estableció como punto de partida 30 minutos. Para el propósito de este trabajo, se modificó la unidad por 0.5, equivalente al tiempo mencionado y a partir de este valor se generó la serie mostrada a continuación.

<b>Tiempos Resultantes de la serie de Fibonacci para irradiar las muestras (h)</b>
0
0.5
1
2
3.5
6
10
16.5

Fuente: Autoras

## **ANEXO E. Test Shapiro-Wilk. [40] [41].**

El test de Shapiro-Wilk permite evaluar la normalidad de un conjunto de datos de variables aleatorias continuas de manera gráfica y analítica. En el programa estadístico SPSS se puede realizar si el número de muestras es menor a 50. Para tamaños de muestra mayores a 50 se recomienda usar la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

El estadístico  $W$  de Shapiro-Wilks mide la fuerza del ajuste con una recta. Cuanto más grande sea  $W$  habrá mayor desacuerdo con la recta de normalidad, por lo cual se puede rechazar la hipótesis nula. Esta prueba se considera la más potente para muestras inferiores a 30 casos.

Hipótesis:

$H_0$ : El conjunto de datos sigue una distribución normal.

$H_1$ : El conjunto de datos no sigue una distribución normal.

Se precisa el nivel de confianza ( $\alpha=0.05$ ) y se rechaza o acepta la hipótesis nula de acuerdo al valor de probabilidad ( $p$ ) obtenido así:

Si  $p < \alpha$ :  $H_0$  no es aceptada.

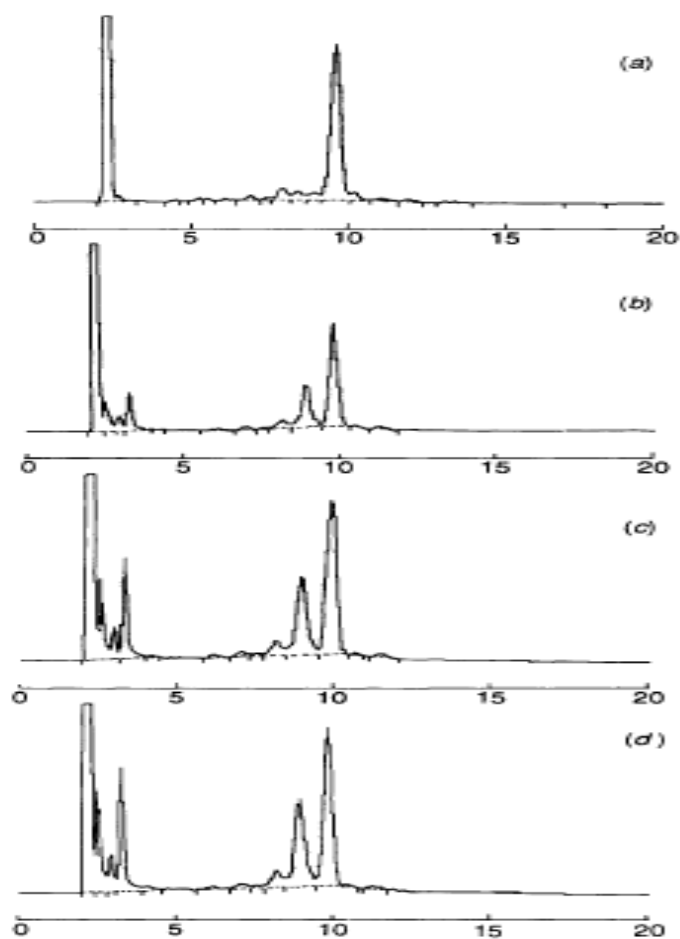
Si  $p > \alpha$ :  $H_0$  es aceptada.

## ANEXO F. Diseño experimental Box Behnken.

<b>DISEÑO EXPERIMENTAL BOX BEHNKEN MINITAB</b>					
<b>OrdenEst</b>	<b>PtType</b>	<b>Bloques</b>	<b>%SM</b>	<b>%T-80</b>	<b>%V</b>
1	2	1	0	1.5	1.35
2	2	1	2.7	1.5	1.35
3	2	1	0	4.2	1.35
4	2	1	2.7	4.2	1.35
5	2	1	0	2.85	0
6	2	1	2.7	2.85	0
7	2	1	0	2.85	2.7
8	2	1	2.7	2.85	2.7
9	2	1	1.35	1.5	0
10	2	1	1.35	4.2	0
11	2	1	1.35	1.5	2.7
12	2	1	1.35	4.2	2.7
13	0	1	1.35	2.85	1.35
14	0	1	1.35	2.85	1.35
15	0	1	1.35	2.85	1.35

Fuente: Software Minitab 17.

**ANEXO G. Cromatogramas por fluidos supercríticos para la irradiación de AZA a 217 nm tras 0 h (a), 1 h (b), 2 h (c) y 3 h (d) de exposición.**



**Fig. 1** SFC chromatograms from azadirachtin irradiation after (a) zero time, (b) 1 h, (c) 2 h, (d) 3 h

Fuente: JOHNSON Shaurin , E. D. MORGAN y I. D. W. et al, «Photo-isomerization of Azadirachtin Studied by High Performance Liquid Chromatography Coupled to High Field Proton NM R Spectroscopy,» *Journal of Chemical Society, Perkin Transaction 1*, pp. 1500

**ANEXO H. Formulación de un bioplaguicida de base de extracto de la hoja del árbol de Nim para el control del gorgojo del arroz.**

<b>COMPUESTO</b>	<b>FUNCIÓN</b>
Extracto de hoja de Nim	Principio activo insecticida
Tween <sup>®</sup> -80	Coadyuvante Tensoactivo. Fotoprotector.
Agua	Diluyente
Etanol	Diluyente
Koralone	Conservante
Ácido cítrico	Regulador de pH
Salicilato de Metilo	Fotoprotector
Vainillina	Fotoprotector