

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15
			VERSIÓN	02
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN		FECHA	03/04/2017
			PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ	APROBÓ	
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad	Líder de Calidad	

## RESUMEN TRABAJO DE GRADO

**AUTORES:**

**NOMBRE(S)** ANA MARÍA **APELLIDOS** ALVARES CÁRDENAS

**FACULTAD:** CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**DIRECTOR:**

**NOMBRE(S)** NELSON ALFONSO **APELLIDOS** VEGA CONTRERAS

**TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS):** EFECTO IN VITRO DE METABOLITO SECUNDARIO AZADIRACTINA SOBRE *Planococcus lilacinus*

**RESUMEN.** Se evaluó la azadiractina, sustancia presente en las semillas del árbol Neem *Azadirachta indica*, como estrategia para combatir a *Planococcus lilacinus*. Las prácticas convencionales y tradicionales que se realizan para la erradicación de plagas, afectan los suelos. Por eso se realizó un proceso de 3 tratamientos con dosificaciones de aceite de Neem al 1, 3 y 5 %, Después se analizó que el tratamiento con mayor dosificación es el más efectivo para el control de la especie.

**PALABRAS CLAVES:** *zadiracta indica*, Aceite de neem, Cochinilla, In vitro, *Azadirachthina*

**CARACTERÍSTICAS**

**PÁGINAS:** 57 **PLANOS:**      **ILUSTRACIONES:**      **CD ROOM:**

EFFECTO IN VITRO DE METABOLITO SECUNDARIO AZADIRACTINA SOBRE  
*Planococcus lilacinus*

ANA MARÍA ALVARES CÁRDENAS

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2023

EFFECTO IN VITRO DE METABOLITO SECUNDARIO AZADIRACTINA SOBRE  
*Planococcus lilacinus*

ANA MARÍA ALVARES CÁRDENAS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Ingeniera Biotecnológica

Director

NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS

Magister

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA  
2023



**ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO**

**FECHA:** 08 de junio del 2023

**HORA:** 05:00 P.M.

**LUGAR:** UFPS - CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – SB 302

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**TITULO:** “EFECTO IN VITRO DE METABOLITO SECUNDARIO AZADIRACTINA  
SOBRE *Planococcus lilacinus*.”

**MODALIDAD:** INVESTIGACIÓN

**JURADO:** ADRIANA ZULAY ARGUELLO NAVARRO  
JESUS ARTURO RAMIREZ SULVARAN  
ANTONIO NAVARRO DURAN

**ENTIDAD:** UFPS

**DIRECTOR:** Nelson Alfonso Vega Contreras

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Ana María Alvarez Cárdenas	1611404	4.2

**OBSERVACIONES:** APROBADO.

**FIRMA DE LOS JURADOS**

Adriana Zulay Arguello Navarro

Jesus Arturo Ramirez Sulvaran

Antonio Navarro Duran

**Vo. Bo Coordinador Comité Curricular**

## **Agradecimientos**

Principalmente le doy gracias a Dios por darme salud y permitirme llegar hasta este día rodeada de las personas que amo y por llenarme de fortaleza y sabiduría a lo largo del camino.

Al MSc. Nelson Alfonso Vega Contreras por ser un excelente docente al brindarme el apoyo, dedicarme su tiempo y realizar sugerencias positivas a lo largo de todo el proyecto.

A mis padres por el apoyo y acompañamiento durante el proceso a quienes debo este triunfo profesional.

## Tabla de contenido

	<b>pág.</b>
Resumen	10
Introducción	11
1. Problema	13
1.1 Título	13
1.2 Descripción de la investigación	13
1.3 Formulación del problema	14
1.4 Justificación	14
1.5 Objetivos	16
1.5.1 Objetivo General	16
1.5.2 Objetivos específicos	16
1.6 Alcances y limitaciones	16
1.6.1 Alcances	16
1.6.2 Limitación	17
2. Marco referencial	18
2.1 Antecedentes	18
2.1.1 Ámbito internacional	18
2.1.2 Ámbito Nacional	20
2.2 Marco teórico	22
2.3 Marco legal	33
3. Diseño Metodología	35
3.1 Tipo de estudio	35

3.2 Población y muestra	35
3.2.1 Población	35
3.2.2 Muestra	35
3.3 Hipótesis	36
3.4 Variables	36
3.4.1 Diseño experimental	36
3.5 Fases de la investigación	37
4. Resultados y discusión	40
4.1 Recolección y adecuación de la materia prima	40
4.1.1 Secado y molido de la almendra	40
4.2 Extracción de la <i>Azadiractha indica</i>	43
4.3 Recolección de <i>Planococcus lilacinus</i> (cochinilla)	43
4.4 Aplicación de tratamientos	44
5. Conclusiones	52
6. Recomendaciones	53
Referencias	54

## Lista de tablas

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Descripción Taxonómica	24
Tabla 2. Tratamiento 1 (1% de azadiractina)	45
Tabla 3. Variación estadística tratamiento 1 con el programa IBM SPSS STATISTICS29.0.1.0	45
Tabla 4. Tratamiento 2 (3% de Azadiractina)	47
Tabla 5. Variación estadística tratamiento 2 IBM SPSS STATISTICS29.0.1.0	47
Tabla 6. Tratamiento 3 (5 % de Azadiractina)	48
Tabla 7. Variación estadística de los diferentes tratamientos IBM SPSS STATISTICS29.0.1.0	49
Tabla 8. Tratamiento 5 (20% control positivo Insecticida Agrícola-Confidor)	50
Tabla 9. Tratamiento 4 (control negativo H <sub>2</sub> O)	50
Tabla 10. Análisis Estadístico de mortalidad por tiempo de exposición	51

## Lista de figuras

	<b>pág.</b>
Figura 1. Árbol de Neem	23
Figura 2. Semillas , verdes y maduras del árbol del Neem	24
Figura 3. Equipo de extracción por Soxhlet.	27
Figura 4. Semillas de Café.	30
Figura 5. <i>Planococcus lilacinus</i>	32
Figura 6. Mapa de procesos para la extracción de aceite de Neem para aplicarlo a <i>Planococcus lilacinus</i> de manera in vitro	37
Figura 7. Recolección de semillas de <i>Azadirachthina indica</i> <i>Para el procesamiento</i>	40
Figura 8. Curva de secado de la semilla de <i>Azadirachthina indica</i>	41
Figura 9. Secado de las semillas del Neem. a) peso de las semillas. b) semillas en el horno.	41
Figura 10. a) Moliendo semillas b) Harina obtenida de semillas de Neem.	42
Figura 11. a) Proceso de extracción del aceite b) Aceite obtenido	42
Figura 12. a) Planta de Café b) Plagas de cochinillas recolectadas	43
Figura 13. Tratamientos aplicados 1%,3%,5% con mezclas de glicerina y etanol	44
Figura 14. Mortalidad de individuos por concentración y tiempo de exposición	51

## Resumen

Se evaluó la azadiractina, sustancia presente en las semillas del árbol Neem *Azadirachta indica*, como estrategia para combatir a *Planococcus lilacinus*, el cual afecta a la especie *Coffea arabica*. Acomodándose en las raíces de los árboles de café se alimentan de la savia, causando su debilitamiento general. Afecta principalmente las etapas de floración, fructificación y crecimiento vegetativo. En plantas jóvenes con altas infestaciones las hojas se tornan cloróticas. *Planococcus lilacinus* se establece en Norte de Santander por ser uno de los principales departamentos con un clima cálido, altos vientos y humedad relativa alta brindándole buenas condiciones que facilitan su supervivencia y propagación.

Las prácticas convencionales y tradicionales que se realizan para la erradicación o mitigación de plagas, afectan los suelos. Por eso se realizó un proceso de extracción, luego se crearon 3 tratamientos con diferente dosificación de aceite de Neem al 1, 3 y 5 %, Después se conocieron las interpretaciones estadísticas se analizaron y se muestra que el mayor efecto de mortalidad a una concentración del 5% a los 15 minutos con el efecto de la Azadiractina depende de su dosificación y del control a la especie a la que se aplique

## Introducción

El café fue introducido en Colombia en el siglo XVIII, el cual es la columna vertebral del comercio exterior, es el principal producto comercial a nivel mundial, de acuerdo con Piñeros (2016), este se ha venido consolidando por medio del sector caficultor como uno de los pilares de la economía colombiana mediante la agroindustria, Es así como a través del tiempo ha incrementado su demanda a nivel internacional. (Bayona & Figueroa, 2022.)

Según Velázquez y travez, 2019. El café es el producto agrícola de mayor exportación, de los cuales le siguen, flores y frutas tropicales, su importancia económica llega al punto de ser una gran fuente de divisas. Sin embargo, existen ciertos retos para culminar con éxito las cosechas, debido a las pérdidas que se pueden presentar por no controlar las plagas en una fase temprana, esto dado a que la expresión plaga es netamente un concepto antrópico, en donde en un principio se refería solo a los insectos que provocaba pérdidas económicas en los cultivos, pero actualmente, cuando se hace referencia a plaga se tiene un campo mucho más abierto. Al observar el impacto que se produce en el sector agroindustrial y sobre todo en los cultivos de exportaciones, se ha comenzado a buscar alternativas para erradicarlas o controlarlas. (Garson, 2022).

*Planococcus lilacinus*, es una plaga que comúnmente es llamada cochinilla que afecta a la especie *Coffea arábica* esta se ubica en las raíces de los árboles y se alimentan de la savia, causando su debilitamiento general, afecta principalmente las etapas de floración, fructificación y crecimiento vegetativo. En plantas jóvenes con altas infestaciones las hojas se tornan cloróticas y se produce aborto floral e inclusive muerte de la planta de manera regresiva. (Cedicafe, 2019).

*Planococcus lilacinus* se establece en Norte de Santander por ser uno de los principales departamentos con un clima cálido, altos vientos y humedad relativa alta brindándole buenas condiciones que facilitan su supervivencia y propagación. Las prácticas convencionales y tradicionales que se realizan para la erradicación o mitigación de plagas, afectan los suelos ya que la aplicación de productos químicos para obtener un mayor rango de control de las diferentes plagas existentes, además de tener consecuencias en la salud humana y afectar el medio Ambiente. (Molina et al, 2022).

En relación a la problemática expuesta se plantea realizar el estudio del metabolito secundario de Azadiractina presente en el *Azadirachta indica* con el fin de evaluar su índice de repelencia contra *Planococcus lilacinus*. El cual se realiza por procesos de laboratorio, en donde inicialmente se recolecta la materia prima (semilla del árbol *Azadirachta indica*), las cuales se llevarán a un proceso de secado, con el fin de aplicar molienda y tamizados, para poder lograr la extracción de Azadiractina, seguidamente se realizan 3 tratamientos en diferentes concentración con 2 controles, a fin de poder analizar el índice de repelencia del metabolito.

## 1. Problema

### 1.1 Título

Efecto in vitro de metabolito secundario azadiractina sobre *Planococcus lilacinus*

### 1.2 Descripción de la investigación

*Planococcus lilacinus*, es una plaga que se puede distinguir con otras especies por tener setas alargadas. La seta dorsal mayor de 50  $\mu\text{m}$ , patas robustas, poros translúcidos en la tibia y coxa posterior, ausentes en el fémur, sin conductos tubulares dorsales. El cuerpo es robusto, conspicuamente redondeado en vista lateral, rojo marrón o marrón claro, cera harinosa que cubre todo el cuerpo y 18 filamentos laterales de la misma longitud (Reyes et al- 2011). Existen diversas sustancias presentes en la *Azadirachta indica*, debido a su alta cantidad y complejidad de la actividad biológica, por esta razón se considera que su extracto posee una sustancia de amplio espectro por su modo de actuar, el cual ataca los insectos principalmente de cuatro maneras las cuales son: anti alimentario o fagodisuasivo, regulador de crecimiento del insecto, esterilizante e inhibidor de acción; debido a los limonoides, estos son compuestos fotoquímicos fabricados por las plantas y sus frutos, que otorgan un potencial para el control de plagas, que generan un desbalance y una desviación en la ruta de sintetización de la hormona ecdisona la cual cumple con la función de realizar el ciclo biológico, también se ve reflejado en la disminución del desarrollo hormonal afectando la síntesis de quitina (Lores et al 2014). Estas afectaciones se ven reflejadas de maneras diversas en la plaga dependiendo de la fase metamórfica en la cual se encuentre. La *Azadirachta indica* resalta las propiedades y cualidades que representa en beneficio para las comunidades campesinas, en alternativas de cambio,

protección del medio ambiente, recuperador de suelos degradados por actividades extractivas o mal manejo de los suelos y aumento en la productividad de los cultivos. En la actualidad diversas comunidades se ven gravemente afectadas por problemas fitosanitarios y la falta de fumigación o labores culturales para el control de insectos, plagas entre otras incluida la cochinilla la cual causa daño en todas sus fases fenológicas especialmente en la época de verano, ya que el clima es el ideal para la reproducción. Es por ello que se pretende estudiar la Azadiracthina como metabolito secundario de la semilla del árbol Neem, el cual estudios demuestran que inhibe la metamorfosis de los insectos.

### **1.3 Formulación del problema**

¿Qué efecto tendrá el metabolito de *Azadirachta indica* en la plaga *Planococcus lilacinus* presente en *coffea arabica*?

### **1.4 Justificación**

Se pretende proponer una posible estrategia para control de plagas en el cultivo de *Coffea Arábica* especialmente para *Planococcus lilacinus* la cual constituya una manera amigable con el medio ambiente, con el fin de aminorar una de las grandes problemáticas que se presenta actualmente para el control de las plagas que son los agroquímicos, ya que en la actualidad estos presentan una gran carga de sustancias contaminantes que dejan en la atmósfera, suelos y agua, además de la desaparición de especies silvestres por efecto directo de la expansión hacia nuevas zonas de cultivo e intoxicación por residuos químicos. (Campos, 2018), de igual manera se pretende resaltar, las buenas acciones que se pueden realizar de manera amigable con el medio

ambiente, para así comenzar a proponer acciones para la sustitución de los procedimientos tradicionales en el campo, donde la mayoría de las consecuencias, con afectaciones para la salud y proliferación de la biodiversidad debido a la cantidad de químicos que se manipulan, en donde se ve reflejada la afectación en la calidad del uso reflejado en la reducción de la fertilidad de los mismos, destrucción de ecosistemas naturales, contaminación de recursos hídricos (Izquierdo, 2017).

Es por ello, que debido a las secuelas generadas por la utilización de plaguicidas o insecticidas sea hace necesario plantear estudios para la creación de alternativas viables para el control de plagas en cultivos, el cual no genere impacto negativo en el medio ambiente. Dado a que los procesos biotecnológicos son los encargados de diseñar, innovar y mejorar, procesos, bioprocesos, procedimientos y productos con componentes biológicos de aplicación industrial o de servicio que implique el desarrollo científico, por lo que se requiere realizar una aplicación tecnológica con el fin de evaluar el potencial repelente de la *Azaridactina* como componente activo de posible biopesticida. Esta investigación se realizará un estudio para el control de la plaga *Planococcus lilacinus* debido a que en el departamento de Norte de Santander se destaca por su calidad y reconocimiento a nivel mundial de dicha especie cafetera, siendo así el café uno de los pilares en la economía de los países tropicales de América latina (López & Herrera, 2017),

Por otra parte, el rendimiento económico del cultivo de café de la especie *Coffea Arábica* debido a sus largas temporadas de sequías que las variaciones de las velocidades del viento y de la concentración del CO<sub>2</sub> conlleva a una adaptación de la plaga (Constantino et al, 2011), para lo cual el desarrollo del presente estudio se tendrá en cuenta las siguientes fases: recolección y adecuación de la materia prima, secado, tamizado y molienda de las semillas, extracción del

aceite y análisis de repelencia del metabolito para la plaga *Planococcus lilacinus* de manera in vitro.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto in vitro del metabolito *Azadirachta indica* sobre *Planococcus lilacinus* (cochinilla)

### **1.5.2 Objetivos específicos**

✓ Establecer un protocolo para la extracción del metabolito *Azadirachtina* componente básico de bioplagicidas

✓ Identificar la dosis letal 50 para la cochinilla (*Planococcus lilacinus*)

## **1.6 Alcances y limitaciones**

### **1.6.1 Alcances**

El presente proyecto de investigación busca conocer la afectación que tendrá de manera invitro la *Azadirachta indica* en *Planococcus lilacinus*

### **1.6.2 Limitación**

La adquisición del presente proyecto radica en la consecución de *Planococcus lilacinus* ya que es un plaga que comúnmente se encuentra en cultivos de café específicamente en las raíces de los árboles.

## 2. Marco referencial

### 2.1 Antecedentes

Para la elaboración del presente proyecto se tendrán en cuenta los siguientes antecedentes

#### 2.1.1 *Ámbito internacional*

*Efecto del nim (Azadirachta indica JUSS.) Sobre Bemisia tabaci Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) y Controladores Biológicos en el Cultivo del Melón Cucumis.* (Melo, 2017).

Breve introducción y los resultados del proyecto

Esta investigación se realizó en Lodana, cantón Santa Ana, provincia de Manabí, durante los meses de octubre a diciembre del 2016, a nivel de campo e invernadero. Se estudió el efecto de derivados del árbol de nim sobre las poblaciones de la mosca blanca *Bemisia tabaci* y sus controladores biológicos, además del efecto disuasivo de estas sustancias en la oviposición de *B. tabaci* en el cultivo de melón. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar en arreglo grupal, con cuatro repeticiones. Los tratamientos estudiados fueron extracto acuoso de semillas de nim en dosis de 25; 50; 75 y 100 g L<sup>-1</sup>. Además se incluyó un testigo químico (imidacloprid 1 mL L<sup>-1</sup>) y un testigo con aplicaciones de agua. Se determinó, que, de los extractos acuosos, la dosis de 100 g L<sup>-1</sup> fue el tratamiento más eficaz, sólo superado por el testigo químico en el control de ninfas y adultos de *B. tabaci*. (pág. 33)

*Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (Azadirachta indica A. Juss) sobre Collaria scenica Stal (Hemiptera: Miridae).* (Montero, Naranjo, & Van, Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (Azadirachta indica A. Juss) sobre Collaria scenica Stal (Hemiptera: Miridae), 2012)

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto insecticida del extracto etanólico de semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre ninfas de la chinche de los pastos *Collaria scenica* Stal. Para eso, elaboraron un extracto a partir de frutos inmaduros de Neem mediante rota evaporación. El extracto fue diluido en tres concentraciones de ppm que corresponden a los tratamientos. Por medio de cromatografías en capa delgada se determinó la presencia de Azaridactina. Se realizó un experimento DCA de 4 tratamientos y 5 repeticiones que incluyó las tres concentraciones del extracto y un control. En cada repetición se usaron 15 ninfas, colocadas aleatoriamente en cajas plásticas herméticas con alimento y la concentración correspondiente. Diariamente se realizó una aplicación del extracto y se registró porcentaje de mortalidad, número de exuvias y número de individuos que llegaron al estado adulto en cada tratamiento. Los resultados fueron analizados con prueba Kruskal-wallis y Games-Howell para cada variable. Las tres concentraciones del extracto de semillas de Neem presentaron un efecto negativo sobre el desarrollo de las chinches. (pág. 125)

*Efecto del Aceite de Nim Azadirachta Indica A. Juss., Sobre la Termita de Madera Seca Incisitermes Marginipennis (Latreille) (Isoptera: Kalotermitidae).* (Arcos-Roa<sup>1</sup>, Méndez-Montiel<sup>2</sup>, & Campos-Bolaños, 2001)

En bioensayos realizados durante ocho semanas bajo condición selectiva y confinamiento, se evaluó el efecto del aceite de nim, *Azadirachta indica* A. Juss., en concentraciones de 0.5 %, 1.0 %, 1.5 %, 2.0 %, y 3.0 % con los objetivos de inhibir la alimentación, causar mortalidad y regular el crecimiento de la termita de madera seca *Incisitermes marginipennis* (Latreille). El sustrato de alimentación utilizado fue papel filtro. En ambos bioensayos, los resultados mostraron que el papel consumido por las termitas fue mayor en los no impregnados (testigo) que en el impregnado con aceite de nim (tratamientos). En cuanto a la mortalidad registrada por la ingestión de papel impregnado, ésta se atribuye al efecto de inanición y no a la toxicidad de las cinco soluciones de nim. No se encontró efecto significativo ( $\alpha=0.05$ ) como regulador del crecimiento de las termitas a las dosis experimentadas. Con base en lo anterior, se concluye que las concentraciones probadas con aceite de nim aplicado a papel como sustrato alimenticio para la termita *I. marginipennis* tiene un efecto de inhibición en la alimentación.

*Comportamiento poblacional de la broca del café (Hypothenemus Hampei) ante efectos del Biocida Neem (Azadirachta Indica) E Higuierilla (Ricinus Communis) en Condiciones Edafoclimáticas del Distrito Monzón – 2018.* (Alejo, 2019)

La investigación tuvo el propósito de evaluar el efecto de biocida neem (Azadirachta indica) e higuierilla (Ricinus communis) en el comportamiento poblacional de la broca de café (Hypothenemus hampei) en condiciones edafoclimáticas de Chaupiyacu, siendo el tipo de investigación aplicada, nivel experimental y el Muestreo Aleatorio Simple (MAS), para la prueba de hipótesis se utilizó el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA) y el Análisis de Variancia (ANDEVA) para determinar la diferencia estadística entre repeticiones y tratamientos al nivel de significancia del 0,05 y 0,01 y para la comparación de las medias de los tratamientos se utilizó Duncan. Las variables evaluadas fueron: Número de cerezo brocado, numero de broca por cerezo, posición de ataque y porcentaje de incidencia. Los tratamientos fueron T0, T1N1, T2N2, T3H1 y T4H2. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento T2N2 (4L de extracto de neem) reporta mayor efectividad en el control de la broca de café. (pág.4)

### **2.1.2 Ámbito Nacional**

*Concentración De Azadiractina, Efectividad Insecticida Y Fitotoxicidad De Cuatro Extractos De Azadirachta indica A. JUSS.* (Esparza, y otros, 2010)

La preparación de bioinsecticidas efectivos a base de neem (Azadirachta indica A. Juss.) requiere extraer y concentrar sus activos, debido a que no se encuentran en altas cantidades de forma natural. Para ello se compararon los extractos de neem por extrusión simple, extrusión metanólica en frío (metanólico), Soxhlet-hexano (hexánico) y acuosa (acuoso) en cuanto a la concentración de azadiractina (AZA) y su efectividad insecticida sobre Aphis gossypii Glover, así como posibles efectos tóxicos sobre Ixora coccinea L. El diseño experimental fue completamente al azar, se realizó un análisis de varianza con los datos y las medias se compararon con la prueba de Tukey (p $\leq$ 0.05). Los análisis de los extractos por HPLC mostraron concentraciones significativamente diferentes de 2478, 565, 422 y 150 ppm de AZA en el extracto metanólico, hexánico, oleoso y acuoso. El bioensayo para determinar el efecto insecticida y la fitotoxicidad de los extractos consistió en exponer

10 ninfas de *A. gossypii* a hojas de *I. coccinea* tratadas con cada extracto a dosis de 0.01, 0.1 y 0.2 mg de AZA en 5 cm<sup>2</sup>, y un testigo con agua, con tres repeticiones. La mortalidad se midió a 24, 48 y 72 h. Sólo el extracto oleoso produjo lesiones en 35 % del área foliar tratada con daño medio y nivel 5 de fitotoxicidad en *I. coccinea*. Se encontraron diferencias significativas en la mortalidad de *A. gossypii* por tipo de extracto, tiempo y dosis, así como en las interacciones dosis tiempo y dosis tipo de extracto. El extracto con el mayor potencial insecticida fue el metanólico (0.2 mg AZA), con 100 % de mortalidad a 48 y 72 h ( $p \leq 0.0001$ ). La aplicación simultánea del metanol en extrusión extrae más AZA de la semilla de *A. indica*, lo cual promueve una mayor actividad insecticida. (pág.821)

Montero, Naranjo, Van Strahlen, (2012). *Efecto insecticida del extracto de semillas de Neem (Azadirachta indica) sobre Collaria scenica, Stal (Hemiptera: Miridae)*.

El presente trabajo se desarrolló con el objetivo de evaluar el efecto insecticida del extracto etanólico de semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre ninfas de la chinche de los pastos *Collaria scenica* Stal. Para eso, se elaboró un extracto a partir de frutos inmaduros de Neem mediante rota evaporación. El extracto fue diluido en tres concentraciones de ppm que corresponden a los tratamientos. Por medio de cromatografías en capa delgada se determinó la presencia de Azaridactina. Se realizó un experimento DCA de 4 tratamientos y 5 repeticiones que incluyó las tres concentraciones del extracto y un control. En cada repetición se usaron 15 ninfas, colocadas aleatoriamente en cajas plásticas herméticas con alimento y la concentración correspondiente. Diariamente se realizó una aplicación del extracto y se registró porcentaje de mortalidad, número de exuvias y número de individuos que llegaron al estado adulto en cada tratamiento. Los resultados fueron analizados con prueba Kruskal-wallis y Games-Howell para cada variable. Las tres concentraciones del extracto de semillas de Neem presentaron un efecto negativo sobre el desarrollo de las chinches. El tratamiento más concentrado (250 ppm) fue el más eficaz presentando una mortalidad del 97%, menor número de exuvias y menor número adultos al final del ensayo. (pág.125)

Capataz, Orozco, Vergara y Hoyos. (2007). *Antifeedant effect of cell suspension extracts of Azadirachta indica on Spodoptera frugiperda JE Smith under laboratory conditions. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*.

El objetivo de este estudio fue investigar y determinar la capacidad de las suspensiones celulares de *A. indica* para la producción de azadiractina sometidas a condiciones de elicitación de régimen de luz y temperatura. Realizaron el análisis químico de los extractos de las suspensiones y se evaluó su actividad biológica mediante bioensayos de escogencia en larvas de segundo instar de *S. frugiperda*. Este trabajo aporta a la investigación información acerca de la cantidad apropiada que debe tener un biopesticida a la hora de probar su efectividad. (pág.3710)

## 2.2 Marco teórico

### **Árbol del Neem *Azadirachta Indica*.**

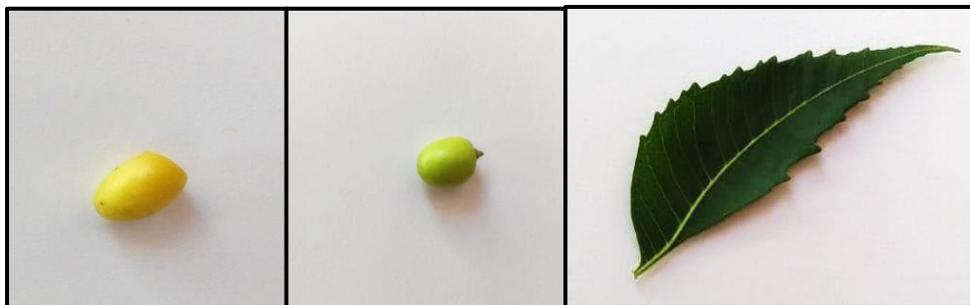
El árbol del Neem *Azadirachta indica* es originario de las zonas áridas de India, Pakistán y África, donde se ha cultivado por miles de años. Su actividad bioinsecticida representa un interés particular para el control de insectos plaga, en este sentido la azadiractina (Aza) es reconocida como el compuesto activo más importante. Sin embargo, existen limitaciones agroclimáticas para su producción tradicional a partir de semillas, por lo que su producción a partir de cultivos de células vegetales in vitro surge como una alternativa promisoriosa (O. Sánchez & M.Rodríguez, 2007). Este es un árbol de rápido crecimiento, de tamaño mediano y fuste recto, puede alcanzar entre 10 y 15 m de altura y de 30 a 80 cm de diámetro. Generalmente se encuentra siempre verde, excepto durante un período de extrema sequía. La corteza es gris, ligeramente agrietada, hojas pinnadamente compuestas, con flores blancas, los frutos son drupas oblongas y de color amarillo Actualmente es considerado uno de los árboles más prometedores por su uso múltiple; madera de buena calidad y de fácil trabajo, además de su potencial para la producción de insecticida natural, aceite, jabón dentífrico y leña con alto poder calorífico (Luis, 1997). El Neem es un árbol que se caracteriza por poseer una alta resistencia a la sequía. Normalmente sobrevive en zonas con condiciones subáridas a subhúmedas. El crecimiento de esta planta generalmente

depende de la cantidad de agua subterránea, a pesar que El Neem puede desarrollarse en diferentes tipos de suelo, sobrevive mejor en suelos bien drenados, profundos y arenosos, aceptando también cierto grado de salinidad (Sur, 2011).



**Figura 1. Árbol de Neem**

Respecto a la temperatura que le favorece, son entre 21 y 32 °C durante todo el año, pero puede llegar a tolerar temperaturas más altas, aunque no presenta la misma tolerancia si fuese el caso temperaturas menores de 4 °C, debido a que si este fuese el caso el árbol se deshoja y puede llegar a morir. Requiere de zonas en las que haya mucha luz solar y de poca agua ya que si se le satura con mucha agua puede llegar a morir, por ello es que se puede adaptar en regiones donde haya lluvia de un rango 450 a 1.200 mm e incluso en regiones donde la lluvia es tan baja como 200 a 250 mm. (Arias, 2015).



**Figura 2. Semillas , verdes y maduras del árbol del Neem**

**Tabla 1. Descripción Taxonómica**

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Sapindales
<b>Familia</b>	Meliaceae
<b>Género</b>	Azadirachta  A.Juss.

### **Métodos de extracción.**

Los aceites esenciales se caracterizan por sus propiedades físicas, como densidad, viscosidad, índice de refracción y actividad óptica”. Ortuño (2006). La extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas se realiza por diferentes métodos los cuales son:

Destilación por arrastre de vapor: la vaporización sucede de manera selectiva por el componente volátil, gracias a la acción directa del vapor del agua debido a que condensa generando una diferencia entre el calor latente ocasionando dos gases las cuales son la orgánica y la acuosa, al ser un producto destilado (volátil) permite la separación del producto (aceite) del agua, posee ventajas como el procedimiento es de bajo costo por lo que su método es sencillo pero su desventaja es que el rendimiento es bajo en comparación de los otros métodos de extracción.

Extracción de fluidos supercríticos: Es posible la extracción del aceite esencial por este método debido a que se trabajan temperaturas y presiones críticas siendo controladas por un regulador de contrapresión y un calentador, se puede realizar con CO<sub>2</sub> las ventajas de este método es que los tiempos de extracción son reducidos, obtención de rendimientos mayores, seleccionando sustancias y composición de los extractos, cambiando sus parámetros requiriendo menos energía, siendo su principal desventaja es que los compuestos de alto nivel molecular se extrae junto con el aceite esencial.

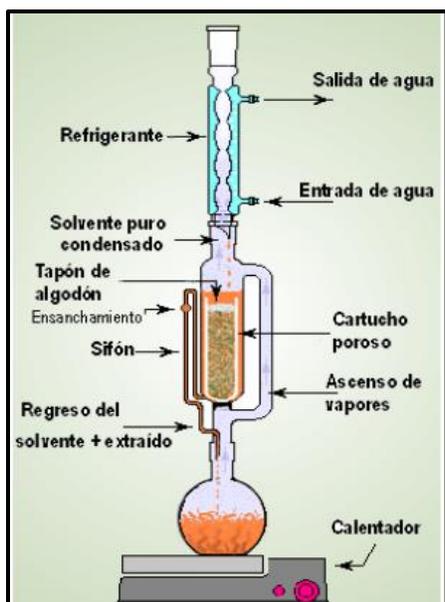
Extracción por microondas: La extracción de aceites esenciales por este método sucede debido a al calentamiento de la sustancia la cual es el disolvente orgánico junto con la materia

prima de donde se quiere extraer el aceite esencial, haciendo una adaptación a un microondas convencional donde se debe perforar su parte superior para adaptar un matraz de fondo plano con un aparato de refrigeración, sellando los vacíos que se presenten evitando así fugas de calor y alterando los resultados de los procedimientos, la ventaja que presenta esta extracción es que se consume menos energía y el tiempo de evaporación se reduce considerablemente, su desventaja presente es que es un método más industrial por ende se necesitan equipos especializados o en su defecto adaptaciones.

Extracción con disolventes: El método se lleva a cabo cuando la muestra prima esta seca y molida colocándose en contacto con el disolvente orgánico con el cual se realiza el procedimiento de la extracción, realizándolo por el método de Soxhlet en donde se recupera el disolvente por medio de rota vapores, su principal ventaja es el nivel de rendimiento que maneja y su desventaja es manejable ya que es el costo del disolvente.

La extracción Soxhlet: es la técnica que consiste en montar el soporte universal y la manta de calentamiento luego depositar las perlas de ebullición en el matraz de balón Colocamos el Matraz en la manta de calentamiento , llenar o poner cantidad suficiente del solvente para colocar una de las pinzas de tres dedos en el soporte ajustamos la boca del matraz con las pinzas para que no se mueva , se posiciona otras pinzas de la misma manera y ajustar el extractor Soxhlet, para que quede fijo, sin riesgos de caer, Se deposita dentro del Soxhlet el cartucho de celulosa con la muestra dentro en la parte superior situar el refrigerante, fijamente y por último conectamos las mangueras al refrigerante, que a su vez va al reciclador. Se calienta el disolvente extractante, situado en el matraz, se condensan sus vapores que caen, gota a gota, sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del

disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente. de separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza.



**Figura 3. Equipo de extracción por Soxhlet. Fuente (Núñez, 2008)**

De igual modo, puede ser usada como técnica preparativa de muestra como paso previo al análisis mediante otra técnica instrumental, (Núñez, 2008), por ejemplo, la extracción de la *Azadiractina* proveniente del árbol del Neem *Azadirachta indica* se recolectan las semillas maduras y verdes para iniciar un proceso de secado con exposición al sol; para la extracción de la misma se utilizara el método de Soxhlet utilizando como solvente el hexano, como resultado se obtendrá el aceite donde se valorará la cuantificación de extracción, para que finalmente a través de una interpretación estadística conoceremos su concentración y así proceder a la

elaboración de un biopesticida orgánico que combatirá la plaga de *Leucoptera coffeella* que se hacen presentes en los cultivos del café (*Coffea arabica*).

El neem, cuyo principal ingrediente es la azadiractina es extraído del árbol de neem, que pertenece a la familia Meliace. No produce mortalidad rápida en la plaga, si no tiene un efecto in-hibitorio de la alimentación y del desarrollo de muchas larvas. Además reduce la fecundidad y afertilidad del adulto. La azadiractina tiene una estructura parecida a la hormona de los insectos que controla el proceso de la muda y actúa como quemador de la verdadera hormona. La rotenona es un insecticida orgánico, natural y biodegradable, extraída de plantas leguminosas tropicales, de los géneros *Lonchocarpus* y *Derris*. Actúa por contacto e ingestión sobre el sistema nervioso de los insectos, impidiendo el desarrollo e inhibiendo la respiración celular y causa, parálisis y muerte (por inhibición de la acetilcolinesterasa) (Reyes,1998).

Hendrixetal.(1990) sostienen que la fauna del suelo está compuesta por un gran número de organismos que permanecen la totalidad de su ciclo de vida en el mismo. La mayoría de estos organismos participan directamente o indirectamente en la descomposición y mineralización de los restos vegetales. Las clasificaciones de la fauna de suelos que realizan de manera arbitraria. Los organismos del suelo suelen agruparse tendiendo a unos límites un tanto arbitrarios en: macro fauna, mayormente verte-brados, que viven total o parcialmente en el suelo; meso fauna, principalmente pequeños invertebrados, tales como artrópodos, anélidos. Nematodos y moluscos; los microorganismos forman la micro fauna: protozoos y algunos nematodos, y la micro flora: actinomicetos, algunos hongos y algas.

Wangetal. (2001) muestran que las trampas tipo pitfall son buenos estimadores de la riqueza de especies en diferentes ambientes ecológicos, permitiendo determinar la artropofauna asociada al suelo en un cultivo agrícola o en un ambiente natural. El efecto del impacto de la azadiractina, es una alternativa como plaguicidas químicos convencionales durante todas las etapas fenológicas

### **Cultivo del café - *Coffea arabica***

El café, tiene como nombre científico *Coffea arabica*, sus primeras evidencias fueron en el siglo XV de allí se extendió por todo el mundo árabe y para el año 1616. En Holanda lograron reproducirlo en la India y en indonesia. Apoderándose totalmente del mercado global desde ese momento y por 100 años aproximadamente. Para el año 1615, el comercio veneciano lleva el café a Europa. Y ya para el año 1668 ya se consumía en el continente americano. Pero sólo se empezó a producir en forma significativa alrededor del año 1720. En el mencionado continente en la Isla de Martinica, traído de la mano de Gabriel Mathieu. Posteriormente el comercio holandés lo distribuiría a través de América del Sur y Central.

El café es un arbusto perennifolio o verde aromático que desde hace muchos siglos atrás ha sido importante con venta para los super mercados y consumo en todo el mundo, Hoy en día el café lo podemos encontrar de diferentes presentaciones como en forma de infusión, granos, en polvo etc. Lo que lo convierte el fruto más comercializado de la historia en la humanidad El café tiene grandes implicaciones sociales. En primer lugar, posee gran valor simbólico a través de la historia de la humanidad. Para millones de personas tomar una taza de café por la mañana es un rito o costumbre personal. Además de que se justifique su consumo como incentivo adicional

para enfrentar las jornadas laborales. El proceso de producción del cultivo, empaquetado, distribución y comercialización son actividades de carácter global; que afectan a diversas culturas, grupos sociales y organizaciones dentro de esas mismas culturas, que se interrelacionan mediante el Café. Como es el caso de que gran parte del café que es consumido en Europa y los Estados Unidos; es importado de Sudamérica y otras partes del mundo. Su importancia nutricional la relaciona negativamente con la cafeína si se consume en exceso. Sin embargo, también se le asocian algunas propiedades beneficiosas; como la lucha contra las cefaleas, incluso contra la diabetes, las enfermedades cardiovasculares hasta el cáncer y la cirrosis. Una tasa de infusión de café posee un 94,5 % de agua; además de una cantidad importante de potasio y otros elementos.



**Figura 4. Semillas de Café. Fuente: (González, 2015)**

### **Planococcus lilacinus**

*Planococcus lilacinus*, es una plaga común mente conocido como cochinillas que son insectos polífagos que viven generalmente sobre la raíz formando colonias muy abundantes, son de talla muy pequeña, en su estado adulto miden de 3 a 5 milímetros generalmente cubiertos con

secreciones harinosas, están provistas de un estilete que introducen en las raíces para alimentarse de la sabia. Las larvas y adultos de las cochinillas excretan una sustancia dulce que atrae a las hormigas, estableciéndose entre ambos insectos una simbiosis, beneficiándose mutuamente. El papel de las hormigas es cuidar y transportar a las cochinillas de un lugar a otro. La capacidad reproductiva de las cochinillas varía de 40 a 600 huevos puestos en masa y protegidos del ambiente que les rodea por una estructura harinosa, de igual manera su ciclo de vida puede durar entre 30 y 60 días para algunas especies. Las especies más difundidas en las áreas cafetaleras son las cochinillas de la pivotante de la raíz *Dysmicoccus cryptus* y las de la cabellera de la raíz *Geococcus coffeae*. Para la implementación de un programa de control de las cochinillas, debe considerarse el muestreo como una herramienta fundamental. Las medidas de prevención para evitar la dispersión de la plaga deben incluir muestreos en los – viveros de café antes de su establecimiento en campo definitivo. Para evitar pérdidas en plantaciones establecidas, el muestreo debe ser implementado. En el boletín se presenta información relacionada con el muestreo y medidas de control de las cochinillas de la raíz del cafeto, con el objetivo de lograr un efectivo control de la plaga.

Las hembras de \*P. citri\* pueden producir entre 300 y 600 huevos, dentro de estructuras algodonosas u ovisacos. Estos huevos pueden ser producidos con o sin la intervención de machos. En menos de 10 días eclosionan las ninfas migratorias que se mueven por la planta ubicando sitios de alimentación. Una vez las ninfas comienzan a alimentarse secretan cera y producen mielecilla. Las etapas de desarrollo de las hembras son huevo, ninfa migratoria, ninfa I, ninfa II, ninfa III y hembra adulta.

En el caso de los machos, posterior a la etapa II, forma un pupoide, estructura compuesta por delicados filamentos y de forma tubular, donde en el interior se produce la metamorfosis. Existe un dimorfismo sexual marcado, dado que el macho no es globoso sino alargado y tiene la capacidad de volar.

La cochinilla del café se alimenta de las partes tiernas de las plantas donde succiona la savia. Afecta principalmente las etapas de floración, fructificación y crecimiento vegetativo. En plantas jóvenes con altas infestaciones las hojas se tornan cloróticas y se produce aborto floral e inclusive muerte de la planta de manera regresiva. Cuando el ataque es en bayas y flores se presenta una reducción considerable de la producción. En algunas ocasiones cuando la plaga es muy abundante se encuentran atacando las raíces, lo que ocasiona debilitamiento o muerte de la planta. Los síntomas en los cocos y el cacao se describen como el desprendimiento del botón y el secado de la inflorescencia y la muerte de las puntas de las ramas. Las colonias densas forman parches llamativos en las frutas; la excreción copiosa de melaza puede resultar en el desarrollo de fumagina cerca de las colonias y la atracción de las hormigas.



**Figura 5. Planococcus lilacinus.**

## 2.3 Marco legal

Las referencias legales que se aplican para el desarrollo de este proyecto son las siguientes:

**Decreto 1843 DE 1991:** Por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII Y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas

**Resolución 0578 de 2004:** Por la cual se hace un cambio en la clasificación toxicológica de un plaguicida y se prohíbe la importación, fabricación, formulación, comercialización y uso de una sustancia de tipo plaguicida.

**Resolución 03759 de 2003:** Por la cual se dictan disposiciones sobre el Registro y Control de los Plaguicidas Químicos de uso Agrícola, en donde se deja establecido su debido procedimiento para la elaboración y comercialización del plaguicida

**Ley 99 de 1993:** Por la cual se crea el Ministerio del Medio Ambiente, se reordena el Sector Público encargado de la gestión y conservación del medio ambiente y los recursos naturales renovables, se organiza el Sistema Nacional Ambiental, SINA, y se dictan otras disposiciones

**Resolución 3079 de 1995:** Por la cual se dictan disposiciones sobre la industria, comercio y aplicación de bioinsumos y productos afines, de abonos o fertilizantes, enmiendas, acondicionadores del suelo y productos afines; plaguicidas químicos, reguladores fisiológicos, coadyuvantes de uso agrícola y productos afines.

**Decreto número 1496 de 2018:** Por el cual se adopta el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos y se dictan otras disposiciones en materia de seguridad química

**Certificación ECOCERT para Productos Agrícolas Ecológicos (IASC. 2004):** Esta certificación facilita a productores y comercializadores acceder a nuevos mercados, pues por medio de esta, garantizan que sus procesos son de alta calidad y así mismo su producto cumple con los requerimientos que exigen tanto los reglamentos internacionales como empresas reconocidas en el sector industrial.

**Decreto 3075 de 1997:** Se estipula todo lo referente a la regulación de las actividades que puedan generar riesgo por el consumo de alimentos.

**Resolución 2674 del 2013:** Se modifica parcialmente el Decreto 3075 de 1997.

La resolución 2674 tiene por objeto establecer los requisitos sanitarios que deben cumplir las personas naturales y/o jurídicas que ejercen actividades de fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte, distribución y comercialización de alimentos y materias primas de alimentos y los requisitos para la notificación, permiso o registro según el riesgo a la vida de las personas.

### 3. Diseño Metodología

#### 3.1 Tipo de estudio

El tipo de investigación que se empleo es de tipo Cuasi Experimental, en la cual no se tocan todas las variables por lo que se caracteriza por ser una investigación en la cual se estudió la manipulación de un biopesticida para el control de la plaga *Planococcus lilacinus*. Presente en *Coffea Arabica* utilizando la extracción de la Azadiractina provenientes del árbol del Neem *Azadiractha indica* para lo cual se utilizó el metanol como disolvente en el proceso de extracción de la *Azadiractha indica* como componente básico en la elaboración del biopesticida.

#### 3.2 Población y muestra

##### 3.2.1 Población

La población a tener en cuenta en el desarrollo de este proyecto serán las semillas de *Azadiractha indica* provenientes del árbol Neem.

##### 3.2.2 Muestra

Para este proyecto se tomará como muestra 5 kg de semilla de *Azadiractha indica* con la cual se realiza el proceso de secado y posterior extracción del componente básico del extracto del metabolito Azadiractina.

### 3.3 Hipótesis

**Ha:** La extracción del metabolito Azadiracthina garantizará la efectividad en el control de la plaga *Planococcus lilacinus* en el cultivo de *Coffea Arabica*

**Ho:** La extracción del metabolito Azadiracthina no garantizará la efectividad en el control de la plaga *Planococcus lilacinus* en el cultivo de *Coffea Arabica*

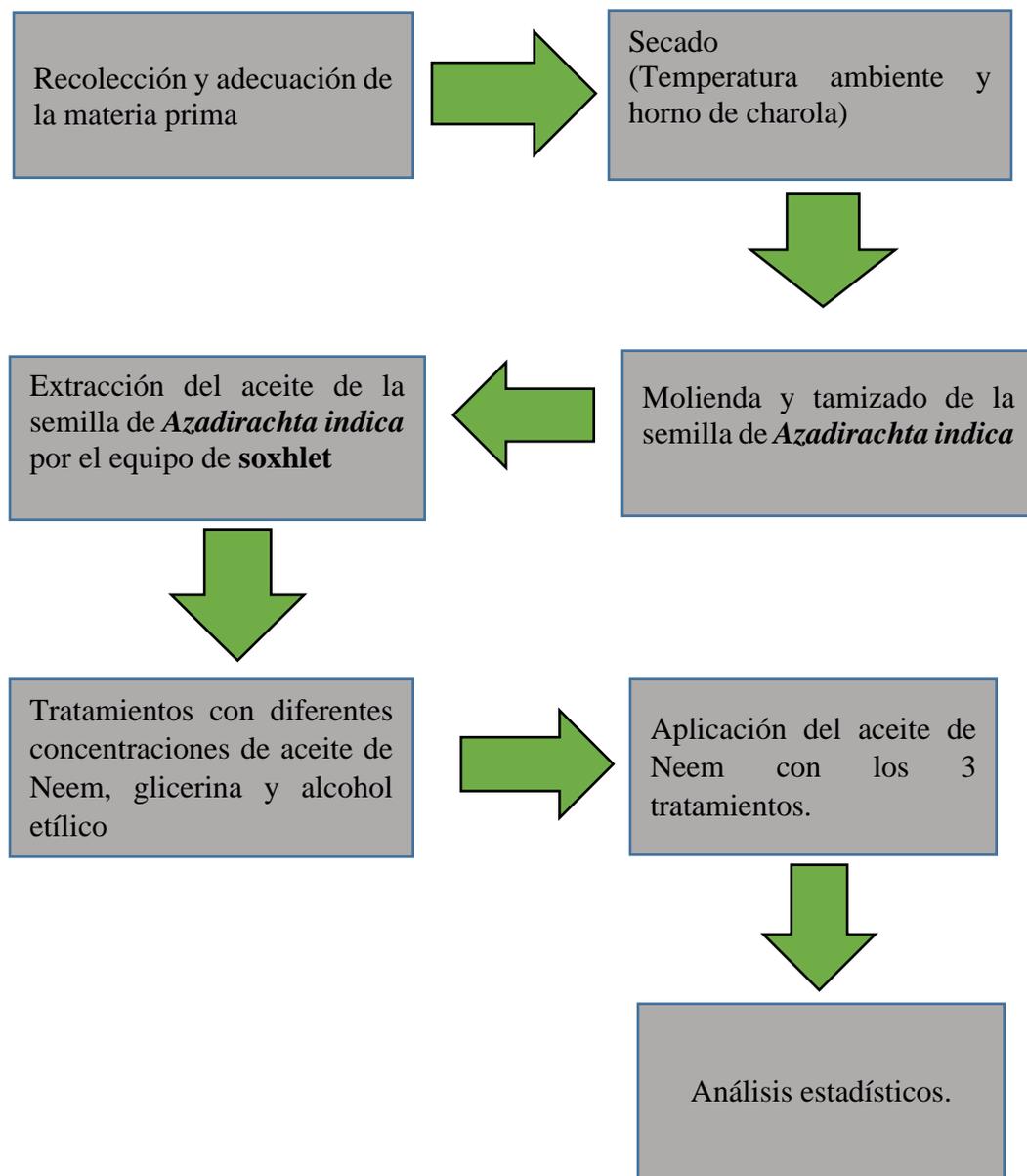
### 3.4 Variables

Para el desarrollo de esta investigación se tendrá en cuenta como variables dependientes el pH y la concentración, como variables independientes la temperatura y la luz estas variables serán de gran relevancia.

#### 3.4.1 Diseño experimental

Se realizará un análisis estadístico de los datos obtenidos en cada tratamiento aplicado en *Coffea Arabica* esta se realizará por medio del paquete estadístico Anova 1 Factor para determinar las diferencias mínimas significativas con un porcentaje de error del 5%, confianza del 95% donde se mostrará el mejor tratamiento de acuerdo a los resultados obtenidos.

### 3.5 Fases de la investigación



**Figura 6. Mapa de procesos para la extracción de aceite de Neem para aplicarlo a *Planococcus lilacinus* de manera in vitro**

**Fase 1** Recolección y adecuación de la materia prima

Esta fase consiste en recolectar y adecuar la materia prima que son las semillas maduras y no maduras de *Azadirachta indica* la cual se le elimina su capsula para llegar a la semilla el cual será la azadiracthia el metabolito secundario.

### **Fase 2** *Secado y extracción del aceite*

En el periodo de secado la materia prima recolectada pasa por el proceso de secado el cual se llevó a cabo por medio de la técnica por horno de charola en donde el calor emitido de la maquinaria realiza la función de extracción del agua.

### **Fase 3** *Molienda y tamizado de la semilla de Azadirachta indica*

En la etapa de Molienda y tamizado se busca un molino, donde se introducen las semillas secas hasta que salgan como harina

### **Fase 4** *Extracción del aceite de la semilla de Azadirachta indica por el equipo de Soxhlet*

En la etapa de extracción se lleva a cabo por medio del método de Soxhlet el cual separa solido-liquido utilizando un disolvente orgánico el cual es el etanol

### **Fase 5** *Aplicación de tratamientos*

e realizó la aplicación de tres tratamientos a dosificación diferentes la cual se siguió la metodología planteada por Olaya Méndez (2003) mezclando extracto aceite del Neem al 3% , 30% de glicerina y 67% de alcohol etílico. Para ello se aplicaron 3 tratamientos al 1%, 3%,5%

los cuales fueron mezclados glicerina y alcohol etílico además se trabajo con un control positivo y un control negativo ( H<sub>2</sub>O), para el primer tratamiento se preparó con 1ml extracto de aceite de Neem, 24ml de glicerina y 75ml de alcohol etílico, en el segundo tratamiento con 3ml de aceite de Neem, 30 ml de glicerina y 67 ml de alcohol etílico y el tratamiento 3 se utilizaron 5 ml de aceite de Neem 30 ml de glicerina y 65ml de alcohol etílico.

#### **Fase 6** *Aplicación del aceite de Neem con los 3 tratamientos y los controles*

En esta etapa se aplica los 3 tratamientos por 3 repeticiones, también se hacen 3 controles que 1 es con agua, el 2 con el insecticida-*confidor* que utilice para controlar la cochinilla donde se recolecta y 3 donde no se le aplica nada.

#### **Fase 7** *Análisis estadísticos.*

Se realizará el análisis estadístico del proceso realizado teniendo en cuenta los tratamientos aplicados utilizando el paquete estadístico SPSS

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Recolección y adecuación de la materia prima

Se realizó la recolección de la materia prima en este caso las semillas del Neem, el cual contiene el metabolito azadiractina. Cabe resaltar que no se pudo recolectar 5 kilos ya que en el momento de la recolección los arboles de Neem no se encontraban en cosecha lo que fue difícil encontrar semillas. Para ello se emplearon 1.065 kilos de fruto de *Azadiracthina indica* a la cual le fue retirada la almendra, posteriormente sometidos a un fraccionamiento manual, para la extracción de la semilla de la almendra para ser llevados a proceso de secado, y molido.

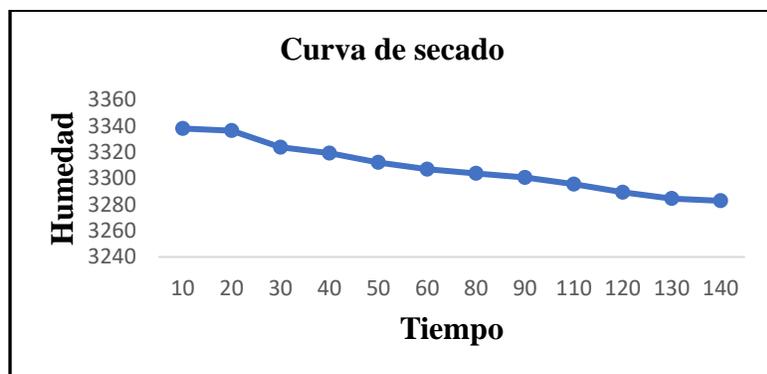


**Figura 7. Recolección de semillas de *Azadiracthina indica* para el procesamiento**

#### 4.1.1 *Secado y molido de la almendra*

La semilla se limpió y se pesó obteniéndose un peso inicial de 1.065 kilos, llevándose al horno para el secado el cual se realizó por el método de la curva característica de secado siguiendo la metodología planteada por López Cravioto (2018) con algunas modificaciones para lo cual se utilizó un secado de charolas, modelo PS-ECE-001/PE y serie GEN-0412-237, a una

temperatura de 70°C por un tiempo de 140 horas con el cual se buscó reducir la humedad, evidenciando que en los primeros 10 minutos la masa se mantiene constante y al transcurrir el tiempo se observándose descenso de la humedad, hasta obtener una masa constante, reduciendo la humedad para así proceder al proceso de extracción figura 3.



**Figura 8. Curva de secado de la semilla de *Azadiracthina indica***

En este proceso entraron 1065.0 g de semilla y se obtuvo 842.5 g de semilla seca, indicando que en el proceso de secado se presenta una pérdida significativa de masa por disminución de humedad, por lo que de acuerdo con Sue, T. T. (1992), si la humedad es baja menor es el riesgo de contaminación. Seguidamente se retiraron del horno obteniéndose semillas secas el cual disminuyeron su peso a 850.6 gramos ver figura 4.



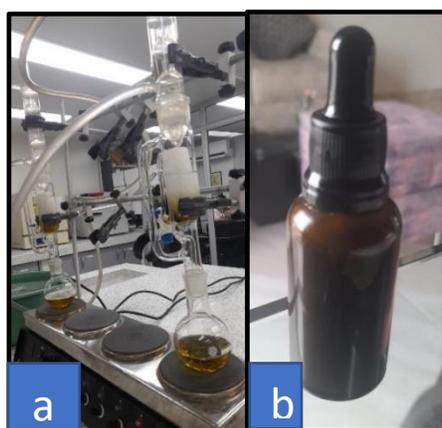
**Figura 9. Secado de las semillas del Neem. a) peso de las semillas. b) semillas en el horno.**

Seguidamente la semilla se sometió a molienda para su respectiva reducción de tamaño en un molino manual de rodillo hasta la obtención de una harina. Figura 5.



**Figura 10. a) Moliendo semillas b) Harina obtenida de semillas de Neem.**

Del proceso de molienda seca realizada, se obtuvo la harina con partículas con tamaños entre 250 y 850  $\mu\text{m}$ , lo que permite facilitar la extracción de constituyentes como aceites Castillo Gómez (2017).



**Figura 11. a) Proceso de extracción del aceite b) Aceite obtenido**

#### 4.2 Extracción de la *Azadiractha indica*

Como resultado del proceso de extracción se obtuvo un total de 100 ml de aceite de Neem, en el cual se utilizó el metanol como solvente que de acuerdo con Eloff (1998) y Cowan (1999), el metanol es más eficiente que el etanol y la acetona ya que extrae mayor cantidad de compuestos químicos, y que además promueve la extracción del metabolito contenido en la semilla-endocarpio este se da mediante la interacción de los grupos hidroxilos presentes en AZA y en metanol (Schroeder y Nakanishi, 1987). El cual fue utilizado en los tratamientos en *Planococcus lilacinus*

#### 4.3 Recolección de *Planococcus lilacinus* (cochinilla)

Para la recolección de las muestras biológicas (cochinillas) fueron recolectadas en frascos pequeños donde fueron colocadas en tierra aplicando gotas de agua para conservarlas hasta aplicar los diferentes tratamientos.



Figura 12. a) Planta de Café b) Plagas de cochinillas recolectadas

#### 4.4 Aplicación de tratamientos

Se colocaron cinco muestras de *Planococcus lilacinus* en cada frasco en el cual se aplicaron de 10 gotas de cada tratamiento al interior de cada frasco dejando caer en forma circular para posteriormente observar el efecto del aceite sobre las cochinillas.



**Figura 13. Tratamientos aplicados 1%,3%,5% con mezclas de glicerina y etanol**

En la aplicación de los diferentes tratamientos se utilizaron cinco individuos realizándose observación de los efectos por cada tratamiento cada cinco minutos. En la aplicación del tratamiento al 1% del extracto Azadiracthina indica a los 5 minutos no se observó mortalidad, en ninguna de las tres replicas por lo que no se presentó afectación alguna, a los 10 minutos se observó mortalidad en dos individuos en las tres réplicas a los 15 minutos el número de individuos en mortalidad fue de 5 individuos a los 20 se observó tres individuos muertos en cada replica, transcurridos 25 minutos la mortalidad se dio en un 100% como se observa en la tabla 2.

**Tabla 2. Tratamiento 1 (1% de azadiractina)**

<b>N° de individuos</b>	<b>Mortalidad T1-replica 1</b>	<b>Mortalidad T1- replica 2</b>	<b>Mortalidad T1- replica 3</b>	<b>Tiempo de exposicion (Min)</b>
5	0	0	0	5
5	1	0	1	10
5	2	1	2	15
5	3	3	3	20
5	3	3	3	25

**Tabla 3. Variación estadística tratamiento 1 con el programa IBM SPSS STATISTICS29.0.1.0**

<b>Análisis estadístico</b>				
<b>Variable dependiente:</b>		<b>Datos</b>		
<b>FactorA</b>	<b>FactorB</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. estándar</b>	<b>N</b>
1	5	00	000	3
	10	67	.577	3
	15	1.67	.577	3
	20	2.67	.577	3
	25	2.67	.577	3
	30	4.00	1.000	3
	35	5.00	.000	3
	Total	2.38	1.746	21

Total	5	00	.000	3
	10	67	.577	3
	15	1.67	.577	3
	20	2.67	.577	3
	25	2.67	.577	3
	30	4.00	1.000	3
	35	5.00	.000	3
	Total	2.38	1.746	21

En la aplicación del tratamiento 2 al 3% del extracto *Azadiracthina indica* a los 5 minutos se observó mortalidad en dos de los individuos por cada replica, a los 10 minutos de exposición se observó un incremento en la mortalidad de un individuos por cada replica, al realizar la observación en el tiempo de 15 minutos en las tres réplicas se presentó una variación en mortalidad a los 15 minutos el número de individuos en mortalidad fue de 5 individuos, pasados 20 minutos se observó un incremento de 4 individuos muertos en dos de las tres replicas que a relación del tiempo de exposición de 25 minutos la mortalidad fue total como se observa en la tabla 4.

**Tabla 4. Tratamiento 2 (3% de Azadiractina)**

N° de Individuos	Mortalidad T2-replica 1	Mortalidad T2- replica 2	Mortalidad T2- replica 3	Tiempo de exposicion (Min)
5	2	2	2	5
5	3	3	3	10
5	3	4	4	15
5	4	5	5	20
5	5	5	5	25

**Tabla 5. Variación estadística tratamiento 2 IBM SPSS STATISTICS29.0.1.0**

Análisis estadístico				
Variable dependiente:		Datos		
FactorA	FactorB	Media	Desv. Estándar	N
1	5	.00	.000	3
	10	.67	.577	3
	15	1.67	.577	3
	20	2.67	.577	3
	25	2.67	.577	3
	30	4.00	1.000	3
	35	5.00	.000	3
	Total	2.38	1.746	21
Total	5	.00	.000	3

	10	.67	.577	3
	15	1.67	.577	3
	20	2.67	.577	3
	25	2.67	.577	3
	30	4.00	1.000	3
	35	5.00	.000	3
	Total	2.38	1.746	21

En cuanto a la aplicación del tratamiento 3 al 5% del extracto *Azadiracthina indica* se observó una variación con respecto a los tratamientos 1 y 2 significativa puesto que a los 5 minutos se observó mortalidad en dos de los individuos por cada replica, a los 10 minutos de exposición se observó un incremento en la mortalidad con una variación en las réplicas donde la mortalidad fue de alrededor de 80% del total de las réplicas, finalmente a un tiempo de exposición de 15 minutos la mortalidad fue total un individuos por cada replica, indicando mayor efectividad a una concentración del 5% como se observa en la tabla 6.

**Tabla 6. Tratamiento 3 (5 % de Azadiractina)**

<b>N° de Individuos</b>	<b>Mortalidad T3-replica 1</b>	<b>Mortalidad T3- replica 2</b>	<b>Mortalidad T3- replica 3</b>	<b>Tiempo de exposicion (Min)</b>
5	2	2	2	5
5	3	5	5	10
5	5	5	5	15

A continuación en la tabla 7, se observa la variación estadística de los diferentes tratamientos aplicados en la cual no se observa una diferencia estadísticamente significativa mayor del 5% lo que demuestra la efectividad del metabolito sobre *Planococcus lilacinus*, que de acuerdo con Ruiz et al (2008) el metabolito de Azadiracta exhibe una acción plaguicida que podría variar su efecto dependiendo su concentración.

**Tabla 7. Variación estadística de los diferentes tratamientos IBM SPSS STATISTICS29.0.1.0**

Análisis Estadístico				
Variable dependiente:		Datos		
FactorA	FactorB	Media	Desv. estándar	N
5	5	2.00	.000	3
	10	4.33	1.155	3
	15	5.00	.000	3
	Total	3.78	1.481	9
Total	5	2.00	.000	3
	10	4.33	1.155	3
	15	5.00	.000	3
	Total	3.78	1.481	9

Así mismo este tratamiento mostro también mayor efectividad en relación con el control positivo (insecticida agrícola- *confidor*), el cual la afectación se dio a un tiempo de exposición de 95 minutos como se observa en la tabla 8.

**Tabla 8. Tratamiento 5 (20% control positivo Insecticida Agrícola-Confidor)**

<b>N° de Individuos</b>	<b>T5-replica 1</b>	<b>Tiempo de exposicion (Min)</b>
5	0	5
5	0	10
5	0	15
5	0	20
5	0	25
5	0	30
5	0	35
5	5	95

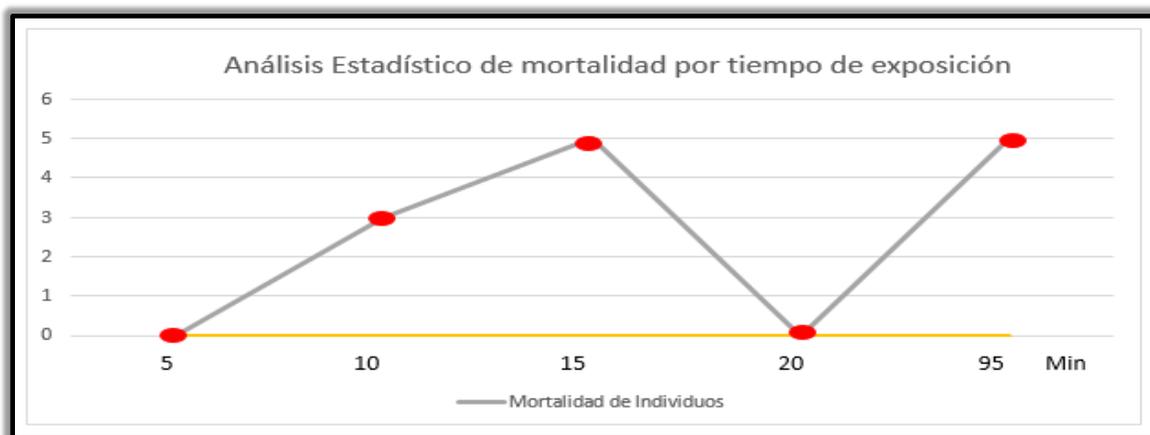
Así mismo se trabajó con un control negativo el cual fue H<sub>2</sub>O en donde no se presentó afectación en los individuos en los tiempos de exposición.

**Tabla 9. Tratamiento 4 (control negativo H<sub>2</sub>O)**

<b>N° de Individuos</b>	<b>Mortalidad T4-replica 1</b>	<b>Tiempo de exposicion (Min)</b>
5	0	5
5	0	10
5	0	15

**Tabla 10. Análisis Estadístico de mortalidad por tiempo de exposición**

Tratamientos	N° de individuos	Mortalidad de Individuos	Tiempo de exposición (Min)
1	5	0	5
2	5	3	10
3	5	5	15
4 (Control Negativo)	5	0	20
5 (Control Positivo)	5	0	95



**Figura 14. Mortalidad de individuos por concentración y tiempo de exposición**

Con relación a ello en la figura 14 se muestra el mayor efecto de mortalidad a una concentración del 5% a los 15 minutos con respecto al control positivo el cual fue a los 95 minutos siendo estadísticamente significativo, por lo que de acuerdo con esparza-Díaz et al 2010, el efecto de la *Azadiracthina* depende de su dosificación y del control a la especie a la que se aplique.

## 5. Conclusiones

- ✓ Se logró establecer un protocolo de extracción del Aceite del Neem *Azadiracta Indica* con el fin de implementar 3 tratamientos a dosificaciones diferentes y observar su posible efecto en *Planococcus lilacinus*
  
- ✓ Se determinó que el tratamiento con mayor dosificación de 5% de *Azadiracta Indica* fue identificado como la dosis letal 50 ya que fue presento mayor efectividad con respecto a los demás tratamientos incluso frente al control positivo.
  
- ✓ Se observó una variación estadísticamente significativa entre los diferentes tratamientos, demostrando una efectividad mayor el tratamiento de mayor concentración
  
- ✓ El extracto del árbol Neem *Azadiracta Indica* como metabolito secundario en el control de *Planococcus lilacinus* actúo de manera inmediata lo que permite establecer que este extracto se presenta como una alternativa ecológica viable en el control de plagas.

## **6. Recomendaciones**

✓ Se recomienda en una futura investigación estudiar ensayos pilotos en campo para el cultivo del café.

✓ Para reducir la incidencia del ataque de Cochinilla en el cultivo de café, se recomienda la aplicación del aceite de Neem en la dosis de 5%.

## Referencias

- Arcos, J.; Méndez, J.; Campos, R. (2001). *Efecto del Aceite de Nim Azadirachta Indica A. Juss., Sobre la Termita de Madera Seca Incisitermes Marginipennis (Latreille) (Isoptera: Kalotermitidae)*. Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 7(2), 139-143.
- Obtenido de  
[https://www.researchgate.net/publication/290436115\\_EFECTO\\_DEL\\_ACEITE\\_DE\\_NIM\\_Azadirachta\\_indica\\_A\\_JUSS\\_SOBRE\\_LA\\_TERMITA\\_DE\\_MADERA\\_SECA\\_Incisitermes\\_marginipennis\\_Latreille\\_ISOPTERA\\_KALOTERMITIDAE](https://www.researchgate.net/publication/290436115_EFECTO_DEL_ACEITE_DE_NIM_Azadirachta_indica_A_JUSS_SOBRE_LA_TERMITA_DE_MADERA_SECA_Incisitermes_marginipennis_Latreille_ISOPTERA_KALOTERMITIDAE)
- Alejo, G. (2019). *Comportamiento poblacional de la broca del café (Hypothenemus Hampei) ante efectos del Biocida Neem (Azadirachta Indica) E Higuierilla (Ricinus Communis) en Condiciones Edafoclimaticas del Distrito Monzón – 2018*. Huánuco - Perú: Universidad Nacional Hermilio Valdizán. Obtenido de  
<https://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13080/5185/TAG00808A39.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Arias, I. C. (23 de mayo de 2015). *Come flores*. Obtenido de <https://comesflores.wordpress.com/>
- Campos, M. A. R. (2018). El uso de pesticidas en la agricultura y su desorden ambiental. *Enfermería la Vanguardia*, 6(2), 40-47.
- Capataz, J., Orozco, F., Vergara, R., & Hoyos, R. (2007). Antifeedant effect of cell suspension extracts of *Azadirachta indica* on *Spodoptera frugiperda* JE Smith under laboratory

conditions. *Fac.Nal.Agr.*, 60(1), 3703-3715. Obtenido de  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v60n1/a06v60n1.pdf>

Constantino, L., Flórez, J., Benavides, P., & Bacca, R. (2011). Minador de las hojas del café: Una plaga potencial por efectos del cambio climático. *Avances Técnicos Cenicafe*, 1-12. Obtenido de <https://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/330/1/avt0409.pdf>

Cowan, M. (1999). Los productos vegetales como agentes antimicrobianos. *Revisiones de microbiología clínica*, 12 (4), 564-582.

Eloff, JN (1998). Un método de microplaca sensible y rápido para determinar la concentración inhibitoria mínima de extractos de plantas para bacterias. *Planta médica*, 64 (08), 711-713

Esparza, G., López, J., Villanueva, J., Osorio, F., Otero, G., & Camacho, E. (2010). Concentración De Azadiractina, Efectividad Insecticida Y Fitotoxicidad De Cuatro Extractos De *Azadirachta indica* A. JUSS. *Agrociencia*, 44(7), 821-833. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/302/30219731008.pdf>

Garson, D. (2022). *Factor Analysis and Dimension Reduction in R: A Social Scientist's Toolkit*. Taylor & Francis.

Izquierdo, J (2017). *Contaminación de los suelos agrícolas provocados por el uso de los agroquímicos en la parroquia San Joaquin*. Universidad politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador

- López, D. (2018). *Secado convectivo de vainas de mezquite (Prosopis laevigata Humb. y Bonpl. ex Willd). Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca: Instituto Politécnico Nacional*. Obtenido de [http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/LITER\\_CIIDIROAX/350/L%20c3%b3pez%20Cravioto%20D.%20202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/LITER_CIIDIROAX/350/L%20c3%b3pez%20Cravioto%20D.%20202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Melo, L. (2017). Efecto del nim (*Azadirachta indica* JUSS.) Sobre *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae) y Controladores Biológicos en el Cultivo del Melón Cucumis. *Ciencias de la Vida*, 25(1), 33-44. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/4760/476051824003/html/>
- Montero, D., Naranjo, N., & Van Strahlen, M. (2012). Efecto insecticida del extracto de semillas de Neem (*Azadirachta indica*) sobre *Collaria scenica*, Stal (Hemiptera: Miridae). *EntomoBrasilis*, 5, 125-129. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5509359>
- Núñez, C. (2008). *Extracciones con equipo Soxhlet*. Obtenido de <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-de-carabobo/quimica-organica/extraccion-con-equipo-soxhlet/8968500>
- Piñeros, C. (2016). *El sector cafetero colombiano como economía periférica en el sistema mundial de Wallerstein entre los años 2000-2014*. Bogotá: Universidad Militar Nueva Granada. Obtenido de <https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/15349/Pi%20c3%b1erosGonzalezCamiloAndres2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Reyes, M. (1998). *Efecto de dosis insecticidas botánicos roten y neem sobre "Mosca Blanca" (Homoptera: Aleyrodidae) y "Mosca Minadora" (Diptera: Agromyzidae) plagas del cultivo de tomate en la [ 997. Lima, Perú: Universidad Nacional Federico Villarreal.*
- Reyes, O., Hernandez, J., & Navarro, L. (2011). *" Frost Control" Semillero de investigación.* Girardot: Corporación Universitaria Minuto de Dios .
- Ruiz, P. A. T., Restrepo, L. N. Z., Sánchez, R. A. H., Rodríguez, F. C. Y., Tafur, J. C., & Sánchez, F. O. (2008). Determinación de la dl50 y tl50 de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61(2), 4564-4575.
- Schroeder, DR y Nakanishi, K. (1987). Un procedimiento de aislamiento simplificado para la azadiractina. *Productos Naturales*, 50 (2), 241-244.
- Sur, R. d. (11 de junio de 2011). *Azul vital*. Obtenido de <http://www.azulvital.com/2011/06/elarbol-milagroso-nim-neem-de-la-india.html>
- Wang, C.; Strazanac, J.; Butler, L. (2001). A comparison of pitfall traps with bait traps for study of flying insect communities. *Journal of Economic Entomology*, 94, 761-765.