

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**



**“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE
AZADIRACTINA A PARTIR DE SEMILLAS DEL ÁRBOL DE
PARAÍSO (*Melia azedarach* Linn.)”.**

Fermín Estuardo Labín Melgar

Químico

Guatemala, febrero de 2020

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE
AZADIRACTINA A PARTIR DE SEMILLAS DEL ÁRBOL DE
PARAÍSO (*Melia azedarach* Linn.)”.**

INFORME DE TESIS

**Presentado por:
Fermín Estuardo Labín Melgar**

**Para optar al título de
Químico**

Guatemala, febrero de 2020

**HONORABLE
JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Licdo. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovani Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merarí Caceros Castañeda	Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS

Por brindarme con las capacidades necesarias para aprender y comprender los conocimientos adquiridos y el desarrollo en cada proceso de mi vida.

A mi madre Timotea Melgar y mi padre José Guillermo Labín.

Por el inconmensurable regalo de la vida, valores, apoyo y sobre todo enseñarme a ser una persona de bien en toda la extensión de la palabra.

A mis hermanos, María Amelia, José Guillermo, Mario Rolando y mi cuñado José Alfredo.

Por el apoyo que me han brindado cada uno en su momento, por cada momento de alegría o tristeza, pero sobre todo por formar parte de mi vida, gracias por todo.

A mis tíos, Adela Gómez de Labín, Carolina Juárez de Melgar y Mario Melgar, a mis primos Walter Labín, Evelin Santizo de Labín y Brenda Lucía González.

Por todo su apoyo en momentos cruciales de mi vida, por todas sus muestras de cariño y por ayudarme a seguir adelante sin importar los desafíos que se me presentaron.

A mis asesores, Licdo. Oswaldo Efraín Martínez Rojas y Licda. Rosa Patricia Navas Najera.

Por transmitirme de su conocimiento, por su apoyo y paciencia durante este proceso y mi vida universitaria, por sus consejos para seguir adelante a pesar de las adversidades.

A mi Alma Mater, “*Inter Cæteras Orbis Conspicua Carolina Coactemalensis Academia*”.

A ti, Universidad de San Carlos de Guatemala, que me albergaste en tus aulas para adquirir nuevos conocimientos y experiencias para ahora poder “*Id y Enseñad a todos*”.

AGRADECIMIENTOS

A los departamentos de Análisis Inorgánico, Química General, Química Orgánica, Análisis instrumental y Fisicoquímica, Toxicología, Bioquímica, la Unidad de Análisis Instrumental y al Herbario BIGU de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Por facilitar las instalaciones, equipos, reactivos y apoyo para la realización de esta investigación, les estaré eternamente agradecido.

A todo el personal del Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al departamento de Análisis Aplicado de la Escuela de Química Farmacéutica. Por haber abierto las puertas a mí persona, siendo estudiante y permitirme utilizar el equipo de cromatografía líquida de alta eficacia, muchas gracias.

A mis compañeros, Diego, Edgar, Ricardo, Gabriel, Celeste y Yancy, a todos mis amigos, entre ellos a Thania Juárez, Marcela Vásquez, María Estebana, Alexander Acú, Carol López, Fabiola Morales, Mario Valle, Pablo Mejicanos, Axel Juárez, Rodrigo, Alvaro, José León, Sergio, Saraí, Vilma, Patricia Navas, Alejandra Díaz, Ana Cecilia, Luis Rizzo, Francisco Overdick, María José Calderón, Wendy, Diana y muy especial a Dafne, Sergio, Fran, Ángel, Alberto, Ale, Manuel, Laia, Assumpta, Marcos, Danilo y Lydia. Por todo el apoyo que me brindaron, antes, durante esta etapa, por cada momento de risas y bromas, por haber sido parte de cada experiencia y espero sigamos cosechando aún más.

A todo el personal docente y administrativo, tanto de la Escuela de Química como de la Facultad, en especial a Licda. Diana Pinagel, Licda. Patricia Navas, Licda. Idolly Carranza, Licda. Marta del Cid, Licda. Miriam Marroquín, Licdo. Oswaldo Martínez, Licda. Nohemí Orozco, Licda. Flor Lara, Licda. Rosa María, Dra. Silvia, Vilma Gómez, Giovanni Santizo, Francisco Barrios, Carlos Palencia, Gilda Barrios, Delmy Martínez, Rolando, Sergio, y Luis. Por todo el conocimiento que me transmitieron, por los consejos y por todo el apoyo que me brindaron, a cada uno, muchas gracias por todo.

A toda mi familia, tíos, primos, sobrinos, en especial a Claudia (Cathy) Montenegro y David Gramajo. A todos muchas gracias por su apoyo antes, durante y después de cada momento de mi vida, porque de cada experiencia se aprende.

A las familias, Esstermangs Castillo, Santiso y Santiso Quán y Escribá Solis. Les estoy muy agradecido por hacerme sentir parte de su familia, por brindarme su apoyo y cariño.

Índice

	Págs.
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	4
A. Generalidades del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarachta</i>)	4
1. Clasificación taxonómica	4
2. Familia Meliaceae	4
3. Genero <i>Melia L</i>	4
4. Paraíso (<i>Melia azedarach L.</i>)	5
a) Nombres comunes	5
b) Descripción	5
c) Usos varios atribuidos a la especie <i>Melia azedarach</i>	7
i. Azadiractina	8
B. Análisis de Metabolitos Secundarios en Material Vegetal	11
1. Principales grupos de metabolitos secundarios en el género <i>Melia L.</i>	13
a) Aceites esenciales totales	13
b) Alcaloides	14
c) Esteroides y triterpenoides	15
C. Métodos de extracción para azadiractina	17
1. Método con solvente por medio de equipo Soxhlet	17
a) Selección del solvente	17
b) Características de la matriz	18
c) Condiciones de operación	18
2. Método por Fluidos Supercríticos con co-solvente	18
D. Método de cuantificación de Azadiractina	19
1. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	19
2. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)	20

	Págs.
IV. Justificación	22
V. Objetivos	24
A. Objetivo general	24
B. Objetivo específico	24
VI. Hipótesis	25
VII. Materiales y Métodos	26
A. Población	26
B. Muestra	26
C. Materiales	26
1. Equipo	26
2. Reactivos	27
3. Estándares	28
4. Cristalería	28
D. Métodos	29
1. Caracterización por estudio fitoquímico	29
a) Etapa 1: identificación y obtención de material vegetal fresco	29
b) Etapa 2: secado y molienda	29
c) Etapa 3: determinación cualitativa de familias de metabolitos	
Secundarios	30
i. Investigación de aceites esenciales totales	30
ii. Investigación de alcaloides	30
iii. Investigación de esteroides y triterpenoides	31
2. Extracción y cuantificación	32
a) Etapa 1: Extracción etanólica por equipo Soxhlet	32
b) Etapa 2: Extracción por fluidos supercríticos con dióxido de carbono como solvente y etanol como co-solvente	32
c) Etapa 3: Cuantificación de azadiractina por método de Cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC-UV)	33

	Págs.
3. Diseño experimental	34
a) Diseño de muestreo	34
b) Diseño	34
c) Análisis de Resultados	35
VIII. Resultados	37
IX. Discusión de resultados	45
X. Conclusiones	49
XI. Recomendaciones	51
XII. Referencias	52
XIII. Anexos	56
A. Preparación de Reactivos	56
B. Preparaciones caseras y su aplicación de repelentes de frutos de árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	59
i. Extracto acuoso	59
ii. Extracto alcohólico	59
C. Imágenes de resultados de pruebas de caracterización de metabolitos secundarios	61
D. Reportes de cromatogramas de Azadiractina en HPLC	64
E. Espectros de fraccionamiento de aceite esencial en GC-MS / HS-GC-MS	90
F. Certificado de análisis de calidad del estándar de Azadiractina	99

Índice de tablas

	Págs.
Tabla n.° 01: Reactivos, cantidad y calidad o pureza a utilizar	1
Tabla n.°02: Compuestos de la caracterización de aceite esencial total en semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.).	37
Tabla n.° 03: Caracterización de alcaloides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	37
Tabla n.° 04: Caracterización de esteroides y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	37
Tabla n.°05: Concentraciones de azadiractina en semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.) por equipo de Fluidos Supercríticos	38
Tabla n.°06: Concentraciones de azadiractina en semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.) por equipo Soxhlet	39
Tabla n.° 07: Concentraciones promedio de azadiractina en semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	40
Tabla n.°08: Análisis estadístico descriptivo de concentraciones promedio de azadiractina en semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	40
Tabla n.°09: Análisis del coeficiente de correlación intraclase	41
Tabla n.°10: Prueba t para la diferencia de medias de los valores promedios de concentración de los métodos de extracción	41

Índice de figuras

	Págs.
Figura n.° 01: Estructura química de la azadiractina	1
Figura n.° 02: Gráfico del método estadístico Bland-Altman	42
Figura n.° 03: Cromatograma de estándar a 100 mg/L por HPLC con detector de UV a $\lambda_{214\text{ nm}}$.	43
Figura n.° 04: Reporte de curva de calibración de Azadiractina.	44
Figura n.° 05: Resultados de prueba Mayer para alcaloides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	61
Figura n.° 06: Resultados de prueba Dragendorff para alcaloides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	61
Figura n.° 07: Resultados de prueba Wagner para alcaloides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.).	62
Figura n.° 08: Resultados de prueba Liebermann-Burchard para esteroides Y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.).	62
Figura n.° 09: Resultados de prueba Salkowski para esteroides y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.).	63
Figura n.° 10: Resultados de prueba Carr-Price para esteroides y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.).	63
Figura n.° 11: Reporte de curva de calibración de Azadiractina.	64
Figura n.° 12: Reporte estándar de Azadiractina de 12.5 mg/L.	65
Figura n.° 13: Reporte estándar de Azadiractina de 25 mg/L.	66
Figura n.° 14: Reporte estándar de Azadiractina de 50 mg/L.	67
Figura n.° 15: Reporte estándar de Azadiractina de 75 mg/L.	68
Figura n.° 16: Reporte estándar de Azadiractina de 100 mg/L.	69
Figura n.° 17: Reporte de muestra 1 del método por Fluidos Supercríticos	70
Figura n.° 18: Reporte de muestra 2 del método por Fluidos Supercríticos	71

	Págs.
Figura n.º 19: Reporte de muestra 3 del método por Fluidos Supercríticos	72
Figura n.º 20: Reporte de muestra 4 del método por Fluidos Supercríticos	73
Figura n.º 21: Reporte de muestra 5 del método por Fluidos Supercríticos	74
Figura n.º 22: Reporte de muestra 6 del método por Fluidos Supercríticos	75
Figura n.º 23: Reporte de muestra 7 del método por Fluidos Supercríticos	76
Figura n.º 24: Reporte de muestra 8 del método por Fluidos Supercríticos	77
Figura n.º 25: Reporte de muestra 9 del método por Fluidos Supercríticos	78
Figura n.º 26: Reporte de muestra 10 del método por Fluidos Supercríticos	79
Figura n.º 27: Reporte de muestra 1 del método por Soxhlet	80
Figura n.º 28: Reporte de muestra 2 del método por Soxhlet	81
Figura n.º 29: Reporte de muestra 3 del método por Soxhlet	82
Figura n.º 30: Reporte de muestra 4 del método por Soxhlet	83
Figura n.º 31: Reporte de muestra 5 del método por Soxhlet	84
Figura n.º 32: Reporte de muestra 6 del método por Soxhlet	85
Figura n.º 33: Reporte de muestra 7 del método por Soxhlet	86
Figura n.º 34: Reporte de muestra 8 del método por Soxhlet	87
Figura n.º 35: Reporte de muestra 9 del método por Soxhlet	88
Figura n.º 36: Reporte de muestra 10 del método por Soxhlet	89
Figura n.º 37: Espectro de fraccionamiento GC-MS de aceite esencial de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	90
Figura n.º 38: Espectro de fraccionamiento GC-MS de aceite esencial de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	91
Figura n.º 39: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátil de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	92
Figura n.º 40: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátil de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	93
Figura n.º 41: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátil de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	94

	Págs.
Figura n.º 42: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátil de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	95
Figura n.º 43: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátil de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	96
Figura n.º 44: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátil de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	97
Figura n.º 45: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátil de semillas del árbol de Paraíso (<i>Melia azedarach</i> L.)	98
Figura n.º 46: Certificado de Análisis de Calidad del estándar de Azadiractina	99
Figura n.º 47: Certificado de Análisis de Calidad del estándar de Azadiractina	100
Figura n.º 48: Certificado de Análisis de Calidad del estándar de Azadiractina	101
Figura n.º 49: Certificado de Análisis de Calidad del estándar de Azadiractina	102
Figura n.º 50: Certificado de identificación de <i>Melia azedarach</i> Linn. por Herbario BIGU, Escuela de Biología, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC	103

I. Resumen

En la investigación se realizó la caracterización cualitativa de alcaloides, aceites esenciales totales, esteroides, triterpenoides tetra y pentacíclicos como primera parte de este estudio, el cual se describió como un estudio descriptivo, transversal, no experimental, también se evaluaron dos métodos extracción de azadiractina, con equipo soxhlet y extracción con fluidos supercríticos a partir de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azadirach* Linn.) que se describió como un estudio descriptivo, transversal, experimental.

Se determinó que entre ambos métodos de extracción no existe una equivalencia o concordancia estadística, esto al evaluarse las concentraciones de azadiractina obtenidas entre ambos métodos por medio de correlación intraclase, análisis de diferencia de medias y el método estadístico Bland-Altman.

Con el análisis estadístico descriptivo se observó que el método de extracción por Fluidos Supercríticos presentó valores de varianza y desviación estándar mayores al método de Soxhlet, por lo cual se consideró el método menos reproducible, sin embargo extrajo una cantidad de azadiractina promedio de 130.658 mg/L y 275.088 mg/Kg en solución concentrada y material seco respectivamente, las cuales son mayores a la cantidad extraída por método Soxhlet, por lo que el método de extracción por Fluidos Supercríticos se consideró más efectivo en el proceso de extracción de azadiractina.

La caracterización de aceites esenciales extraídos de las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) presentó compuestos con base en tiofenos y tetrazoles en aceites esenciales volátiles y la presencia de compuestos sesquiterpenos en aceites esenciales no volátiles, de los cuales se encuentran reportados estudios sobre su actividad biocida. En los extractos metanólicos obtenidos por el método de Fluidos Supercríticos se obtuvieron resultados positivos para la presencia de alcaloides y triterpenoides tetra y pentacíclicos.

II. Introducción

El género *Melia* Linn., de la familia Meliaceae, constituye un grupo grande de plantas alóctonas, por sus orígenes en India, sin embargo, se encuentra naturalizada en varios países de América como Guatemala, en regiones de oriente y del sur principalmente, utilizados inicialmente como arboles de sombra, sin embargo, géneros como *Azadirachta* Linn. o *Melia* Linn. se les ha empleado tradicionalmente como antihelmíntico y antiséptico, en uso humano, así como repelente, antialimentario o pesticida en el área agrícola. (Prajapati, Tripathi, Aggarwal, & Khanuja, 2005)

En la literatura se encuentran reportados resultados de análisis sobre estudios fitoquímicos efectuados principalmente en hojas, corteza y fruto, con lo cual han determinado el efecto antialimentario en insectos fitófagos, principalmente en los órdenes Ortóptera, Hemíptera, Himenóptera, Díptera, Coleóptera, Lepidóptera y Tisanóptera, en donde para *Oryzophagus oryzae* y *Spodoptera frugiperda* se encontró que el LC₅₀ es de 0.90 µg/mL de extractos de las hojas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) (Berlitz, Oliboni de Azambuja, Sebben, Vargas de Oliveira, & Fiuza, 2012); En otro estudio a partir de 8.8 gramos de extracto de frutos del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) se vio un efecto sobre insectos de los órdenes Lepidóptera, Coleóptera y Homóptera (Carpinella, Defago, Valladares, & Palacios, 2003); así mismo se han observado efectos insecticidas contra larvas del mosquito del dengue *Aedes aegypti* mostrando mejores efectos a 25 °C con 0.166 % peso de extracto etanólico de las semillas. (Wandscheer, et al., 2004)

A algunas familias de metabolitos secundarios se les atribuyen actividades pesticidas, como alcaloides, terpenoides, flavonoides, aceites esenciales, sesquiterpenos, furanos, compuestos fenólicos, principalmente. (Vázquez-Luna, Pérez-Flores, & Díaz-Sobac, 2007) En Guatemala no se han realizado estudios fitoquímicos de los metabolitos presentes en los extractos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.), sin embargo hay estudios realizados en otros

países en los cuales se han reportado variaciones de las familias de metabolitos secundarios en la especie *Melia azedarach* Linn. y no se encuentran estudios en Guatemala que comparen la obtención de azadiractina por diferentes métodos como Soxhlet y Fluidos Supercríticos, considerando que el área agrícola de Guatemala corresponde a un 32 % del territorio nacional como área de cultivos agrícolas, ha surgido de forma tradicional el uso de plantas o partes de plantas como medios de protección o ayuda en cultivos, como es el caso del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) del cual se han utilizado las hojas, corteza del tallo así como los frutos o sus semillas, sin tener el método más adecuado en la obtención de azadiractina.

Para el estudio se identificó el árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) con ayuda del Herbario BIGU de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y se recolectaron los frutos en el municipio de Ipala, Chiquimula; se despulparon los frutos obteniendo las semillas, estas se secaron y molieron y luego se realizaron las extracciones metanólicas. Una vez establecido con cuales trabajar, se caracterizaron por reacciones vía húmeda las familias de metabolitos secundarios: alcaloides, esteroides y triterpenoides de acuerdo a la metodología descrita en el Manual de Operaciones de Tamizaje Fitoquímico del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales – LIPRONAT, así como aceites esenciales totales por medio de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), esta primera parte se comprendió como un estudio descriptivo, transversal, no experimental; en la segunda parte de la investigación se evaluaron dos métodos de extracción de azadiractina, por Soxhlet y Fluidos Supercríticos con co-solvente de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.), cuantificando la azadiractina por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia conocida por sus siglas en inglés como (HPLC) con detector ultravioleta utilizando un estándar de azadiractina como patrón externo, comprendiéndose como un estudio descriptivo, transversal y experimental en este segundo proceso del estudio.

III. Antecedentes

A. Generalidades del Árbol de Paraíso (*Melia azedarach*)

1. Clasificación taxonómica

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Rosanae

Orden: Sapindales

Familia: Meliaceae

Género: *Melia* Linn. (Missouri Botanical Garden, 2015)

2. Familia Meliaceae

Son árboles o arbustos; con hojas alternas, raras veces opuesto; con flores regulares, raramente polígama; de semillas solitarias o múltiples en cada celda, de endospermo carnoso, embriones rectos o transversales, cotiledones carnosos. (Standley & Steyermark, 1946)

3. Género *Melia* Linn.

Árboles; hojas alternas, pinnadas o bipinnadas, los folíolos enteros o dentados; flores perfectas, vistosas, en panículas axilares, púrpura; 5-6 sépalos; 5-6 pétalos, distinto, retorcido, la difusión; estambre tubo cilíndrico, dilatado arriba, 10-12-dentado, cada hendidura de dientes; 10-12 anteras, insertado dentro del tubo cerca de su ápice; disco anular; 3-6 ovario unicelular, la esbelta estilo, los estigmas de 5-6 lobuladas; 2 óvulos en cada celda, superpuesta; frutas drupáceas, que contienen 1-6 celdas unicelular; semillas generalmente solitarias en cada cavidad; carnoso endospermo; cotiledones foliáceas, el cilíndricos radícula, superior. (Standley & Steyermark, 1946)

4. Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

a) Nombres comunes

El nombre *Melia* es el nombre griego de fresno (*Fraxinus ornus*). *Melia azedarach* Linn. se llama diversamente persa lilac (lila persa), lilac (lila), chinaberry tree, paradise-tree (árbol de paraíso), white cedar (cedro blanco), umbrella tree (árbol sombrilla), bead tree (árbol de perlas), syringa, hoop tree (árbol aro), China tree (árbol de china), pride of India (el orgullo de la India) (Engl.), Lilas des Indes, lilas de Chine, lilas de Perse, paraíso, margosier (Fr.), lilaila, Aleli, pasilla, paraíso, paraíso, violeta (Sp.), Kechil Mindi (malayos.), y Persischer Zedrachbaum, Chinesischer Holunder, Paternosterbaum, Paradiesbaum, Persischer Flieder (Gen), etc. en la India el nombre común más conocido es dharek, en Brasil cinamomo, y en el sur de China ku-lian. (Ascher, Schmutterer, Zebitz, & Naqvi, 1995)

b) Descripción

El nombre específico, *Azedarach*, es de origen árabe. Es un árbol que se propaga fácilmente por semillas, es probable que poco después de la conquista de América, el árbol fue introducido en México y América Central desde la Península Ibérica.

Nativa del Antiguo Mundo (principalmente India y algunos otros países asiáticos), es cultivada y naturalizada en zonas tropicales y cálidas de América. Cultivado comúnmente en Guatemala desde el nivel del mar hasta los 1.800 metros, y naturalizado en muchos lugares, especialmente en setos o matorrales de tierras bajas; Petén; Alta Verapaz; Baja Verapaz; Izabal; Zacapa; Chiquimula; Jalapa; Jutiapa; Santa Rosa; Escuintla; Guatemala; Sacatepéquez; Suchitepéquez; Retalhuleu; San Marcos.

El árbol se encuentra en Guatemala en los parques y cerca de viviendas, debido a sus hermosas flores y con dulce aroma. No es un árbol de sombra satisfactoria porque las ramas son frágiles y fácilmente se quiebran desde el tronco, pero el árbol resiste el abandono y maltrato por cambios en el clima en periodos largos.

El árbol por lo general alcanza una altura de unos 8 a 15 m (cultivares de China e India). En algunas zonas, especialmente en el hemisferio sur, *M. azedarach* Linn. puede llegar incluso a 25-30 m. La circunferencia puede alcanzar más de 3.20m. La corteza es relativamente suave; el duramen es de color rojizo. Las partes jóvenes a menudo estrellado-pilosos al principio, hojas grandes, sobre todo 2-pinnadas, las hojuelas lanceoladas u ovals, 3-8 cm. largo, agudo y largo acuminado, aguda a subcordadas en la base, lobuladas; panículas de 10-25 cm. largo, muchas flores, flores pediceladas; sépalos 2-3 milímetros de largo, lanceoladas a ovadas; pétalos 8-12 milímetros de largo, de color púrpura o, a veces blanquecina; tubo de estambre generalmente de color morado oscuro; ovario glabro; drupas globosas, 1,5-2 centímetros de diámetro, amarillo, liso, en lugar translúcido, sulcadas. (Standley & Steyermark, 1946)

Los frutos o drupas maduros de color amarillo son del tamaño de una cereza, globular a oval, y contienen, encerrado en un endocarpo muy duro de tres a cinco semillas de alargadas-ovales negras. Los frutos maduros pueden permanecer durante varios meses en los árboles. Los granos tienen un contenido de aceite de aproximadamente 40 %. (Standley & Steyermark, 1946) (Ascher, Schmutterer, Zebitz, & Naqvi, 1995)

Tiempo de floración es entre diciembre y marzo en el hemisferio norte, pero algunas florecen durante todo el verano o incluso durante todo el año. Las flores perfumadas son lila o rosa y dispuestas en panículas axilares. La caída de las hojas se lleva a cabo en la región mediterránea durante octubre y noviembre. Algunas formas en las zonas tropicales húmedas no arrojan regularmente sus hojas.

c) Usos varios atribuidos a la especie *Melia azedarach* Linn.

Frutas y corteza de *M. azedarach* Linn. se utilizan como un antihelmíntico tradicional, pero también se le conoce su propiedad venenosa para los seres humanos y el ganado. De hecho, *M. azedarach* Linn. ya no se utiliza para tales fines medicinales debido a su alta toxicidad para los animales de sangre caliente. Los frutos maduros son más tóxicos para los mamíferos que los verdes. La semilla se utiliza como un cordón en collares y rosarios. (Carpinella, Defago, Valladares, & Palacios, 2003)

La corteza ha sido utilizada en algunas regiones de estupefaciente en peces. Se afirma que una decocción de las frutas rociadas sobre las plantas los protegerá de los ataques de gusanos cortadores y otros insectos nocivos. El aceite se utiliza como combustible, y como un antihelmíntico y antiséptico. Otras partes del árbol chinaberry también fueron utilizadas con fines medicinales en Asia, por ejemplo, las hojas como antipirético y antihelmíntico (cabras, ganado, hombre).

La química de los componentes insecticidas en la familia Meliaceae, con énfasis en *Melia azedarach* Linn. y *Azadirachta indica* Linn. en usos como repelente y propiedades antialimentarias y

pesticidas de *M. Azedarach* Linn. y sus productos. (Ascher, Schmutterer, Zebitz, & Naqvi, 1995).

La lista de grupos de metabolitos secundarios conocida es larga y variada, de acuerdo a las distintas clasificaciones que se han hecho de los mismos. Por ello, a continuación, se presentan únicamente los grupos más comunes, y aquellos que se consideran fundamentales para la investigación, basándose en los resultados de estudios de tamizaje fitoquímico que se han efectuado en otras especies de la familia Meliaceae. (Glasby, 2005, pp. 47, 154, 258, 433, 449, 567, 665, 680, 771, 1200, 1265)

i. Azadiractina

Se encuentra principalmente en extractos del árbol de neem de la India (*Azadirachta indica* Linn.), sin embargo, también está presente en la mayoría de especies de la familia Meliaceae. El ingrediente activo clave de los extractos es azadiractina, un nortriterpenoide que exhibe efectos reguladores del crecimiento de insectos, propiedades insecticidas y repelentes de insectos.

La azadiractina se degrada rápidamente por la luz, la oxidación, y la alcalinidad y el proceso de extracción tiene un costo elevado, así como difícil de sintetizar. El repelente, antialimentarias, inhibidores de la ovoposición, y esterilizantes efectos de extractos de neem tienden a ser de corta duración.

Aunque azadiractina está registrada como un regulador del crecimiento de insectos para el uso de cultivos alimentarios en muchos países, los estudios con azadiractina en ectoparásitos de animales se han limitado a las ovejas piojo morder *Bovicola ovis*,

el moscardón de ovejas *Lucilia cuprina*, y las pulgas del gato Ctenocephalides. (Plimmer, Gammon, & Ragsdale, 2003)

Propiedades físicas de la azadiractina

Peso molecular: 720,72 g / mol

Formula molecular: $C_{35}H_{44}O_{16}$

Forma: Polvo amarillo-verde con un olor fuerte similar a ajo.

DL₅₀ oral aguda para las ratas: > 5.000 mg / kg

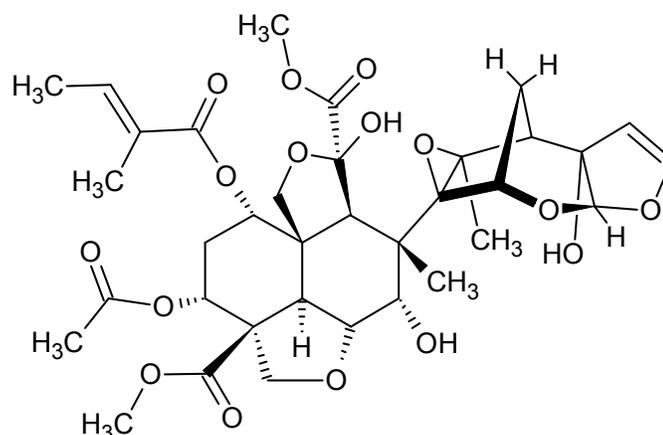
CAS Number: 11141-17-6

Punto de fusión: 154-158 °C

Longitud máxima de absorción Ultravioleta λ_{max} : 214 nm

Rotación específica: -53° (5 mg/ml, cloroformo, 25 °C) (Plimmer, Gammon, & Ragsdale, 2003)

Figura n.º 01: Estructura química de la azadiractina



Fuente: Elaboración propia con guía en Merck & CO. (2001). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (thirteenth ed.). (M. J. O'Neil, Ed.) Whitehouse Station, New Jersey, United States of America: Merck Research Laboratories Division. Disponible en: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m2156/azadirachtin?q=unauthorize>

Debido a la composición de azadiractina en los frutos del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) se han preparado de forma casera extractos acuoso y etanólicos como se muestran en el anexo B.

En 2012, Berlitz et al. realizaron el estudio Mortalidad de *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleóptera: Curculionidae) y *Spodoptera frugiperda* (J E Smith, 1797) (Lepidóptera: Noctuidae) en exposición de larvas a *Bacillus thuringiensis* y extractos de *Melia azedarach* en el cual lograron determinar que los extractos acuosos de *Melia azedarach* fueron efectivos con un LC₅₀ de 0.90 µg/mL, con lo que consideraron que se puede usar dicho extracto para el control de dichas especies de insectos.

En 2011, Díaz menciona en su estudio Triterpenoides de frutos de *Melia azedarach*: su potencial como agentes de control de insectos revela que el fraccionamiento sistemático de extractos etanólicos llevó a la obtención de una fracción rica en limonoides con actividad contra diferentes insectos modelo. Mostró fuerte deterrencia frente a larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidóptera: Noctuidae) y adultos de *Epilachna paenulata* (Coleóptera: Coccinellidae) en bioensayos. Además, inhibió el asentamiento de *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi* (Homóptera: Aphididae).

En 2004, en un estudio de la Acción larvicida de extractos etanólicos de endocarpios frutales de *Melia azedarach* y *Azadirachta indica* Linn. en contra del dengue *Aedes aegypti* de Wandscheer et al. “lograron identificar que los extractos etanólicos de *Melia azedarach* mostraron una mayor tasa de

muerte de larvas alimentadas a 25 °C que los extractos de *Azadirachta indica* Linn.”.

Carpinella et al. (2003) realizaron un estudio sobre las propiedades antialimentarias e insecticidas de Limonoides de *Melia azedarach* (Meliaceae) con uso potencial en el manejo de plagas, con lo cual probaron la actividad antialimentaria del extracto de la fruta en una variedad de insectos herbívoros e granívoros, logrando que 16 de 17 especies pertenecientes a tres órdenes consumieran significativamente menos comida al ser tratados con el extracto hexánico, entre las especies se encuentran: Orden coleóptera: Familia Curculionidae, *Sitophylus oryzae* L., *Pantomorus leucoloma* Boheman, *Priocyphus bosqui* (Hustache); Familia Tenebrionidae, *Tribolium confusum* Duval; Familia Coccinelidae, *Epilachna paenulata* (Germ); Familia Chrysomeliadae, *Diabrotica speciosa* (Germar), *Chrysodina* sp., *Epitrix argentiniensis* Bryan, *Eumolpinae* sp., *Plagioneda erythroptera* (Blanchard), *Xanthogalleruca luteola* (Müller); Orden Ortóptera: Familia Romaleidae, *Cromachris miles* (Drury); Orden Lepidóptera: Familia Arctiidae, *Spilosoma virginica* (Fabricius); Familia Noctuidae, *Anticarsia gemmatalis* (Hubner), *Rachiplusia nu* Guenée, *Spodoptera frugiperda* Smith; Familia Pieridae, *Colias lesbias* (Fabricius).

B. Análisis de Metabolitos Secundarios en Material Vegetal

En los organismos vivos se producen una serie de compuestos a partir de los metabolitos primarios (carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos), estas familias de metabolitos son llamados metabolitos secundarios, los cuales poseen funciones varias, específicas y propias de

los organismos en los que se encuentran. (Bruneton, 1993) (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005)

La presencia de ciertas familias de compuestos químicos (metabolitos secundarios principalmente) presentes en las plantas es en lo que generalmente radica la importancia terapéutica de las plantas con lo cual se pueden observar las diferentes propiedades farmacológicas que puedan tener las plantas o sus partes, dichos compuestos individualmente se les reconoce como principios activos. (Bruneton, 1993)

El estudio fitoquímico es de las etapas analíticas iniciales de la investigación de la química de los productos naturales, el cual permite determinar cualitativamente los principales grupos o familias de constituyentes químicos (metabolitos secundarios fundamentalmente) presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de interés. (Bruneton, 1993)

El estudio fitoquímico consiste en la extracción de los componentes químicos de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones por vía húmeda que por medio de coloración, precipitaciones, etc. permitan la evaluación rápida, sensible, reproducible y de bajo costo de los mismos. Así mismo, puede hacerse uso de métodos espectrométricos. (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005)

1. Principales grupos de metabolitos secundarios en el género *Melia*

a) Aceites esenciales totales

Los aceites esenciales es una familia de metabolitos secundarios de gran importancia en diferentes industrias como la farmacéutica y la cosmética, entre otras; estos son obtenidos a partir de material vegetal verde o seco, por medio de arrastre por vapor o bien procedimientos mecánicos, dichos compuestos a temperatura ambiente son líquidos, volátiles, con índices de refracción altos, liposolubles entre otras propiedades. (Bruneton, 1993, págs. 478-482)

Según indica Bruneton (1993) “Los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variables de constituyentes que pertenecen, de manera casi exclusiva, a dos grupos caracterizados por orígenes biogénicos distintos: el grupo de los terpenoides por una parte y el grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, mucho menos frecuentes, por otra.” (pág. 482)

El principal método de extracción utilizado es la destilación por arrastre de vapor o hidrodestilación, en la cual el material vegetal es sumergido en agua y llevándolo a ebullición, permitiendo el arrastre de pequeñas cantidades de los aceites volátiles, posteriormente al condensar se separan por diferencia de densidad, actualmente se utilizan equipos como el “Clevenger” en el cual se recibe el condensado en un solvente apolar o bien recientemente utilizado el equipo Likens-Nickerson para el proceso de destilación-extracción simultáneos en el cual como su nombre lo indica se destila por arrastre de vapor y se extrae con el solvente que se está destilando continuamente. (Heinz Kubeczka, 2016)

b) Alcaloides

Los alcaloides son una de las familias de metabolitos secundarios de mayor importancia dentro de los metabolitos secundarios, debido a su interés por diferentes actividades farmacológicas o de interés agroindustrial. Los alcaloides llamados verdaderos son aquellas sustancias nitrogenadas, alcalinas y de origen natural, que poseen una estructura compleja y su átomo de nitrógeno forma parte de un sistema heterocíclico. Biosintéticamente se forman a partir de aminoácidos, pueden encontrarse como sales o en estado normal.

Existen otros compuestos llamados pseudoalcaloides los cuales poseen características muy similares a los alcaloides verdaderos pero no se derivan de aminoácidos, así como los llamados protoalcaloides que son aminas simples cuyo nitrógeno no se encuentra en un sistema heterocíclico y son alcalinos y se forman a partir de aminoácidos.

Los alcaloides poseen propiedades que les confieren actividades a nivel del sistema nervioso central tanto como sedantes o estimulantes, a nivel del sistema autónomo como anticolinérgicos, ganglioplegicos entre otros y algunos son anestésicos locales, antitumorales antipalúdicos, amebicidas y antifibrilantes, entre otras actividades, como protección y regulación contra insectos y parásitos de las plantas.

Se considera que existen entre 4,000 diferentes alcaloides que pueden representar del 0.1 al 3 % del peso seco de una planta; su presencia se considera reducida a menos del 10 % de las especies botánicas. (Bruneton, 1993, p. 773)

Las extracciones de alcaloides se basan en que habitualmente en que se encuentran en estado de sales, en su basicidad y en disolventes orgánicos; puede llevarse a cabo con un disolvente (diclorometano, cloroformo, benceno o dióxido de etilo) en medio alcalino o en medio ácido con una disolución alcohólica o hidroalcohólica acidificada. Los ensayos de análisis macro y semimicro se llevan a cabo por medio de reacciones como la del reactivo de Mayer que tienen como resultado una coloración de blanco a crema con turbidez, formación de precipitado o complejos de este color lo cual indica un resultado positivo, con el reactivo de Dagendorff con resultados de coloración rojo-naranja, turbidez, formación de precipitado o complejo de este color, lo cual indica un resultado positivo y con el reactivo de Wagner como resultado positivo se observa una turbidez, formación de precipitado o complejo de coloración marrón y así como por cromatografía en capa fina, en la cual se utilizan estándares de alcaloides como medio de comparación tanto con los reactivos de pruebas vía húmeda como en la cromatografía de capa fina. (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005)

c) Esteroides y triterpenoides

Los esteroides y triterpenoides son compuestos que se basan en una gran variedad de esqueletos, aproximadamente 40 diferentes, todos con por lo menos 30 carbonos; estos compuestos poseen como precursor al 3S-2,3-epóxido-2,3-dihidroescualeno, o eventualmente del escualeno, casi siempre se encuentran hidroxilados en 3 debido a la apertura del ciclo.

Los triterpenoides presentan una gran variedad estructural debida principalmente a la conformación adoptada por el

epoxiescualeno o escualeno antes de la ciclación. Los ciclos tetra- y pentacíclicos son característicos de los triterpenoides. Los esteroides poseen una unidad estructural bastante común y marcada, sin embargo todos poseen el mismo esqueleto base.

Generalmente a los esteroides se les considera que son triterpenoides tetracíclicos que han llegado a perder como mínimo tres metilos en C-4 y en C-14. Dentro de la importancia de los esteroides y los triterpenoides se encuentran las propiedades terapéuticas como citostáticos, antivirales, insecticidas, molusquicidas y analgésicos, entre otros; anticonceptivos, anabolizante y antiinflamatorios. (Bruneton, 1993)

Los ensayos de análisis son por medio de reacciones de color por medio de las pruebas de Liebermann Burchard la cual desarrolla una coloración rosa o púrpura que indica saponinas triterpenoidales; colores verde y azul verdoso indican posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico, con Salkowski desarrolla un coloración rojo a rojo oscuro lo cual es indicativo de esteroides, así como una coloración verde para triterpenoides tetra y pentacíclicos y con Carr-Price desarrollo de coloración azul, indicando posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B. (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005) (Dwivedi, Dwivedi, & Kalita, 2007)

C. Métodos de extracción para azadiractina

1. Método por medio de equipo Soxhlet

Para la extracción por medio de Soxhlet se deben de considerar ciertos aspectos como: la selección del solvente, la matriz sólida y las condiciones de operación.

a) Selección del solvente

En la búsqueda del solvente se debe de considerar, seleccionar el que logre el mejor balance en ciertas características deseadas como: alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad extraer con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo.

Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos. El solvente ampliamente utilizado para extraer aceites de las plantas es el n-hexano. El n-hexano tiene un rango en el punto de ebullición bastante estrecho, de aproximadamente 63–69 °C y es un excelente solvente de los aceites en lo que se refiere a su solubilidad y facilidad de recuperación. Sin embargo, el n-hexano, el elemento principal del n-hexano comercial, está ubicado como el número uno en la lista de los 189 contaminantes del aire más riesgosos por la Agencia Americana de Protección del ambiente.

El uso de solventes alternativos tales como: isopropanol, etanol e incluso el agua, se ha incrementado debido a asuntos del medioambiente, la salud, y a preocupaciones de seguridad.

b) Características de la matriz

La extracción con Soxhlet se ve fuertemente influenciado por las características de la matriz y de las dimensiones de las partículas debido a la difusión interna del material puede llegar a ser el paso limitante durante el proceso de la extracción.

c) Condiciones de operación

Durante la extracción con Soxhlet, el solvente se recupera normalmente por evaporación. Las temperaturas de extracción y evaporación tienen un efecto significativo en la calidad final de los productos.

2. Método por Fluidos Supercríticos con co-solvente

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión.

Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción. Los fluidos supercríticos tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión

El dióxido de carbono (CO_2) es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con

diferentes grados de pureza, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles, se puede obtener a partir de procesos de fermentación alcohólica y ayuda a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando son extraídos. (Velasco, Villada, & Carrera, 2007)

Algunos solventes como etanol, metanol, isopropanol al utilizarse como co-solventes permiten mejorar las extracciones con dióxido de carbono por fluidos supercríticos. (McHugh & Krukoniš, 1994, p. 110)

Entre las ventajas de los fluidos supercríticos están:

- a) Poseen alto coeficiente de difusión y viscosidad más baja que los líquidos;
- b) Ausencia de tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción dada la rápida penetración de estos al interior de los poros de la matriz heterogénea;
- c) La selectividad durante la extracción puede ser manipulada dada la variación de las diferentes condiciones de operación temperatura y presión afectando la solubilidad de varios componentes en el fluido supercrítico;
- d) La extracción con fluidos supercríticos no deja residuos químicos;
- e) La extracción con dióxido de carbono (CO₂) supercrítico permite su fácil recuperación por procesos de reciclaje. (Velasco, Villada, & Carrera, 2007)

D. Método de cuantificación de Azadiractina

1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia o High Performance Liquid Chromatography (HPLC) es una técnica en columna utilizada frecuentemente en muchas áreas de la química como la química

analítica, química orgánica y en aquellas áreas en donde se necesita realizar análisis cualitativos y cuantitativos. La cromatografía líquida de alta eficacia es utilizada para separar y cuantificar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica, con los diferentes solventes o mezclas de los mismos que se utilizan como fase móvil.

Entre los disolventes más utilizados se encuentran el agua, el metanol y el acetonitrilo. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)

2. Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía gaseosa o gas chromatography (GC); es una técnica en la cual se encuentra una fase estacionaria en una columna capilar con soporte generalmente de cobre y siendo la fase móvil un gas al cual se le denomina gas acarreador. Esta técnica frecuentemente usada en muchas áreas de la química como la química analítica, química orgánica y en aquellas en donde se necesita realizar análisis cualitativos y cuantitativos de compuestos que se pueden volatilizar. La cromatografía gaseosa es utilizada para separar los componentes volátiles de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones entre las sustancias analizadas, la columna cromatográfica y la fase móvil.

El Cromatógrafo de gases puede tener diferentes tipos de detectores, entre ellos está la espectrometría de masas, cuando este está acoplado al cromatógrafo de gases, dicho detector permite la identificación de moléculas al fraccionarlas por un bombardeo de electrones, separándolas por unos cuadrupolos con lo cual se detectan las fracciones de menor carga, considerando que cada molécula tendrá un

fraccionamiento generalizado se comparan las señales detectadas contra una base de datos y se obtiene los valores proximales de las moléculas.

Entre los gases utilizados están hidrógeno, helio, argón, nitrógeno o dióxido de carbono; estos no deberán generar interacciones en el proceso, de fácil disponibilidad, alta pureza y económico. (Skoog, Holler, & Crouch, 2008)

IV. Justificación

En Guatemala el árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) se ha cultivado desde el nivel del mar hasta los 1.800 metros, en 15 de los 22 departamentos, entre ellos: Zacapa, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa y Escuintla. El árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) pertenece a la familia Meliaceae (Standley & Steyermark, 1946), siendo el género *Melia* Linn. uno de los que también presentan el compuesto azadiractina, tanto en la corteza del tallo, como en hojas, frutos y semillas, debido a la presencia de este compuesto se ha utilizado el árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) como cerco vivo en la protección de cultivos al tener este compuesto propiedad repelente de insectos (Ascher, Schmutterer, Zebitz, & Naqvi, 1995).

Las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) se han utilizado artesanalmente en maceraciones acuosas y etanólicas en la producción de repelentes de insectos como productos afín de plaguicidas para la protección de cultivos (Ibáñez & Zoppolo, 2008) con lo cual se ha logrado aprovechar sus propiedades o actividades contra insectos, por lo cual una evaluación de dos métodos de extracción en la obtención de extractos con azadiractina a partir de las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) permitiría establecer la equivalencia entre ambos métodos con respecto a la cantidad de azadiractina extraída, esto se evaluará por medio de su cuantificación por cromatografía líquida de alta eficacia y el estándar de azadiractina y con ello poder ayudar en la formulación de algún producto afín a plaguicidas para el control de insectos, el cual ayudaría a poder mantener un manejo integral de plagas (Alatorre Rosas, Bravo Mojica, Leyva Vásquez, & Huerta de la Peña) en la diversidad de cultivos agrícolas de Guatemala, debido a la producción agrícola en el país que ocupa un área agrícola correspondiente a un 32 % del territorio nacional como área de cultivos agrícolas, de lo cual la producción de

algunos cultivos representa en millones de dólares estadounidenses en divisas para el país. (Instituto Nacional de Estadística - INE, 2013, pág. 44)

Así mismo la caracterización de alcaloides, aceites esenciales totales, esteroides y triterpenoides las cuales han presentado actividades biológicas en el control de insectos como lo son alcaloides, aceites esenciales totales, esteroides y triterpenoides, (Bakkali, Averbeck, Averbeck, & Idaomar, 2008) (Isman, 2006) (Prajapati, Tripathi, Aggarwal, & Khanuja, 2005) por medio de pruebas vía húmeda y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas a partir de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.), permitirá conocer si estas familias de metabolitos secundarios se encuentran presentes o no en las semillas de dicha especie, como han sido previamente identificadas en otras especies de la familia Meliaceae (Glasby, 2005, pp. 47, 154, 258, 433, 449, 567, 665, 680, 771, 1200, 1265), debido a que en otros estudios se han encontrado que especies de ciertas regiones no poseen ciertos metabolitos. (Maregiani, Zamuner, & Angarola, 2010, pág. 69)

Es importante conocer el mejor método de extracción de azadiractina a partir de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.), el cual puede ser aplicado a nivel agroindustrial.

V. Objetivos

A. Objetivo general

1. Comparar dos métodos de extracción de azadiractina, Soxhlet y Fluidos Supercríticos con metanol como co-solvente a partir de las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).

B. Objetivo específico

1. Cuantificar la azadiractina por cromatografía líquida de alta eficacia de los extractos obtenidos por los métodos Soxhlet y Fluidos supercríticos.
2. Caracterizar aceites esenciales totales, alcaloides, esteroides y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).

VI. Hipótesis

Debido a la naturaleza del estudio para la primera parte de la investigación no se cuenta con datos o registros sobre la composición o las familias de metabolitos secundarios que puedan estar presentes en las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) en Guatemala, por lo cual no se considera el establecer una hipótesis.

Para la segunda parte de la investigación al no contar con datos o registros sobre porcentajes de rendimiento o cantidades de azadiractina en extracciones a partir de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) en Guatemala, no existe un registro o datos de comparación por lo cual no se establece una hipótesis.

VII. Materiales y Métodos

A. Población

Los árboles de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).

B. Muestra

475 g de material fresco de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.), procedentes del municipio de Ipala, departamento de Chiquimula, Guatemala.

C. Materiales

1. Equipo

- a) Estufa eléctrica (plancha de calentamiento) con agitador magnético marca Corning, Thermolyne y/o Cimarec.
- b) Cromatógrafo líquido de alta resolución, marca Shimadzu modelo LC-20AT, detector UV con lámpara de deuterio y longitud de onda de trabajo entre 170 a 700 nm.
- c) Jeringa para cromatografía de 50 microlitros.
- d) Cromatógrafo de Gases, marca Perkin Elmer, modelo Clarus 580.
 - i. Headspace Sampler Turbo Matrix 40 Trap.
 - ii. Espectrómetro de masas, marca Perkin Elmer, modelo Clarus SQ 8S.
- e) Equipo de extracción Soxhlet.
- f) Equipo de extracción de aceites esenciales Clevenger.
- g) Equipo de extracción por Fluidos Supercríticos.
- h) Balanza semianalítica Ohaus modelo Scout II, de 0 a 250 g.
- i) Rotavapor Büchl 461.
- j) Lámpara Ultravioleta entre 254 a 365 nanómetros.
- k) Equipo de seguridad personal (Bata, guantes, lentes y mascarilla de gases de careta).

2. Reactivos

Tabla n.º 01: Reactivos, cantidad y calidad o pureza a utilizar.

Reactivo	Cantidad (gramos o mililitros)	Calidad y Pureza
Acetonitrilo	500 mL	HPLC, 99.9 %
Ácido Acético	200 mL	A.C.S., 99 %
Ácido clorhídrico	200 mL	A.C.S., 37 %
Ácido nítrico	60 mL	A.C.S., 90 %
Ácido Sulfúrico	50 mL	A.C.S., 98 %
Agua	500 mL	HPLC, 100 %
Anhídrido Acético	50 mL	A.C.S., 99 %
Cloroformo	300 mL	A.C.S., 99 %
Cloruro de Mercurio	6 g	A.C.S., 99 %
Metanol	3000 mL	A.C.S., 98 %
Metanol absoluto	200 mL	A.C.S., 99 %
Hidróxido de amonio	50 mL	A.C.S., 30 %
Nitrato de Bismuto	9 g	A.C.S., 99 %
Tricloruro de Antimonio	6.0 g	A.C.S., 30 %
Yodo	12 g	A.C.S., 99 %
Yoduro de potasio	35 g	A.C.S., 99 %

Fuente: Elaboración propia.

3. Estándares

- Para alcaloides.
- Para Esteroides y triterpenoides.
- Para cuantificación: Azadiractina (A 7430) 95 % Sigma Aldrich.

4. Cristalería

- Vasos de precipitados de 10, 50, 100 y 250 mL
- Pipetas de 1, 2, 3, 5 y 10 mL
- Balones aforados de 10, 25 y 50 mL
- Vidrio de reloj
- Probetas de 10, 25 y 50 mL
- Balones de fondo redondo CORNING 24/40, de 100 mL y 1 L
- Condensador CORNING 24/40
- Ampolla de decantación de 500 mL
- Varillas de vidrio
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Micropipetas de vidrio con bulbo
- Frascos de vidrio de 30 y 120 mL, color ámbar con tapa
- Capilares sin heparina
- Mechero de gas
- Atomizador
- Papel filtro cualitativo Wathman 1
- Papel parafilm
- Pinzas para tubo de ensayo
- Caja de Petri con agar sangre
- Gradilla para 10 tubos de ensayo de 10 mL
- Tamices
- Termómetro graduado de entre -5 a 360 °C.

D. Métodos

1. Caracterización por Estudio fitoquímico

a) Etapa 1: Identificación y obtención de material vegetal fresco

Identificar –basándose en caracteres morfológicos específicos– por medio de muestras a herborizar de ramas con hojas, flor y/o fruto del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.), procedentes del municipio de Ipala, departamento de Chiquimula, con asesoría del Ing. Agr. Mario Véliz Pérez, Coordinador-Curador del Herbario BIGU (ver figura n.º 50, Anexos) y obtener el material vegetal, mediante colecta directa de las semillas de árboles de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) en su hábitat natural. Transportar el material colectado en sacos que permitan la ventilación del contenido (evitando exponerlo al sol). Limpiar manualmente el material vegetal de fragmentos de otras plantas, hojas podridas, tierra u otros elementos que puede traer adheridos.

b) Etapa 2: secado, molienda y tamizado

Secar todas las semillas del material vegetal colectado ya limpio, a temperatura ambiente y en sombra, o de ser necesario, en horno con salida de vapor a temperatura inferior a 55°C. Una vez seco, molerlo manualmente hasta donde sea posible, o con ayuda de un procesador de alimentos, cuchillos u otros accesorios cortantes, según sea necesario. Luego con ayuda de un tamiz separar partículas semifinas (con tamaño de partícula entre 3 y 5 milímetros).

c) Etapa 3: determinación cualitativa de familias de metabolitos secundarios

i. Investigación de aceites esenciales totales:

Se realiza extracción por medio de la utilización del equipo para extracción de aceites esenciales Clevenger, en el cual se utilizaran 100 gramos de material vegetal seco tamizado, agua y capturado en una pequeña cantidad de hexano.

El análisis cualitativo se realiza por medio de la utilización de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas, una vez obtenido el espectrograma se compara contra las bibliotecas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (National Institute of Standards and Technology –NIST) de Estados Unidos de América y de pesticidas con que cuenta el departamento de Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

ii. Investigación de alcaloides:

Ensayos macro y semimicro: pesar 1 g de material vegetal seco. Agregar 2 gotas de disolución de hidróxido de amonio al 10 % p/v, luego añadir 25 mL de metanol a 60°C. Filtrar con papel filtro Whatman 1 y acidificar el filtrado con HCl 2N. La disolución resultante dividirla en 4 tubos y evaluar de la siguiente manera:

Tubo 1: agregar 5 gotas del reactivo de Mayer's (*ver preparación en Anexo A, inciso 2*). *Resultado:* cambio de coloración a blanco-crema, turbidez o formación de precipitado o complejos de este color indican presencia de alcaloides.

Tubo 2: agregar 5 gotas del reactivo de Dragendorff (*ver preparación en Anexo A, inciso 3*). *Resultado*: cambio de coloración a rojo-naranja, turbidez o formación de precipitado o complejos de este color indican presencia de alcaloides.

Tubo 3: agregar 5 gotas del reactivo de Wagner (*ver preparación en Anexo A, inciso 4*). *Resultado*: cambio de coloración a marrón turbidez o formación de precipitado o complejos de este color indican presencia de alcaloides.

Tubo 4: únicamente la alícuota de la muestra (tubo control). Usar como controles positivos, disoluciones de estándares de alcaloides, a las que se les efectúan las mismas pruebas. Observar durante 2 horas. (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005)

iii. Investigación de esteroides o triterpenoides:

Liebermann Burchard: a 0.5 g de muestra seca colocados en un tubo de ensayo, aplicar unas gotas de ácido acético y 3 mL de anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:1). *Resultado*: desarrollo de coloración rosa o púrpura indica saponinas triterpenoidales; colores verde y azul verdoso indican posibles esteroides conteniendo 2 enlaces C=C conjugados o formados por deshidratación con ácido sulfúrico.

Salkowski: a 0.5 g de muestra seca o 1 mL de extracto agregar 2 mL de cloroformo y luego agregar cuidadosamente gota a gota 0.5 a 1.0 mL de ácido sulfúrico concentrado, si observa al cambio de coloración detener la adición de ácido sulfúrico concentrado. *Resultado*: desarrollo de color rojo indica la presencia de

compuestos esteroides, verde oscuro indica la presencia de compuestos terpenoidales, turbidez blanquecina triterpenoides.

Carr-Price: agrega 2 mL de tricloruro de antimonio al 30 % p/v en cloroformo a 1 mg de muestra en cloroformo. Resultado: desarrollo de coloración azul, indicando posibles derivados del colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B. (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005) (Dwivedi, Dwivedi, & Kalita, 2007)

2. Extracción y cuantificación

a) Etapa 1: Extracción etanólica por medio de equipo Soxhlet

- i. Cargar cartucho con 10 g de muestra,
- ii. Colocar solvente en balón del equipo.
- iii. Armar equipo.
- iv. Calentar el sistema.
- v. Verificar evaporación del solvente.
- vi. Anotar la cantidad de sifonadas, hasta llegar a 30.
- vii. Anotar el tiempo de extracción.
- viii. Enfriar sistema y luego desarmar equipo
- ix. Trasvasar, envasar en recipiente ambar y etiquetar extracto.
- x. Lavar equipo.
- xi. Posteriormente se puede reconcentrar el extracto por medio de un rotavapor.
- xii. Realizar 10 repeticiones.

b) Etapa 2: Extracción por fluidos supercríticos con dióxido de carbono como solvente y metanol como co-solvente

- i. Armar la primera parte del equipo con el conector de salida.
- ii. Pesar 10 g de muestra.

- iii. Medir 15 mL de metanol.
- iv. Colocar la muestra y posteriormente el metanol.
- v. Conectar con entrada de gas.
- vi. Colocar manta de calentamiento
- vii. Calentar hasta 45-65 °C.
- viii. Cargar el dióxido de carbono hasta alcanzar una presión de 1050 psi.
- ix. Verificar calentamiento, aumentar la presión a 1150 psi y cerrar llave de paso.
- x. Dejar extracción por 1 hora, para lograr una extracción homogénea del material.
- xi. Liberar gas, lentamente por acarreamiento del metanol.
- xii. Quitar manta de calentamiento.
- xiii. Desarmar equipo.
- xiv. Limpiar equipo.
- xv. Trasvasar, envasar en recipiente ámbar y etiquetar extracto.
- xvi. Realizar 10 Repeticiones.

c) Etapa 3: Cuantificación de azadiractina por método de Cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC-UV)

- i. Disolver 0.1 mg de estándar de Azadiractina (A 7430) 95 % Sigma Aldrich en 1 mL de fase móvil agua:acetonitrilo 60:40, para concentración de 500 mg/L.
- ii. Realizar curva de calibración con diluciones en rango de 12.5 a 100 mg/L del estándar de Azadiractina (A 7430) 95 % Sigma-Adrich.
- iii. Medir de 45 µL e inyectar en el (HPLC-UV).
Condiciones del (HPLC-UV)

Fase móvil agua:acetonitrilo en proporción 60:40 respectivamente.

Flujo 1 mL/min.

Longitud de onda: 214 nm (Kaushik, 2002) (Sigma-Aldrich, 2018)

- iv. En el análisis de los extractos seguir procedimiento a partir del paso iii.

3. Diseño experimental

a) Diseño de muestreo

El diseño de muestreo es no probabilístico por conveniencia

b) Diseño

Se planteó un diseño descriptivo, transversal y no experimental para el estudio fitoquímico de las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) dividido en tres etapas: 1) identificación y obtención del material vegetal fresco, por medio de muestras herborizadas del árbol y posterior identificación con ayuda del Ing. Agr. Mario Véliz Pérez. 2) secado, molienda y tamizado de las muestras, éstas se procederán a secar a temperatura ambiente y en sombra y de ser necesario en horno, moliendo y tamizando el material seco posteriormente; y 3) el análisis cualitativo de la composición química mediante pruebas vía húmeda y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) para las familias de metabolitos secundarios de Alcaloides, Esteroides, Triterpenoides y Aceites Esenciales Totales, de acuerdo a metodología descrita en el Manual del 2005 de Operaciones de Tamizaje Fitoquímico del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales –LIPRONAT–.

Para la segunda parte de la investigación se plantea un diseño descriptivo, transversal y experimental para la evaluación de dos métodos de extracción de azadiractina a partir de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) y su cuantificación, dividiéndolo en tres etapas: 1) Extracción etanólica por equipo Soxhlet, realizando 10 extracciones, con 10 gramos en cada extracción y su posterior reconcentración de ser necesaria. 2) Extracción por Fluidos Supercríticos con dióxido de carbono como solvente supercrítico y metanol como co-solvente, realizando 10 extracciones con 10 gramos de material seco en cada extracción; y 3) Cuantificación por método de cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC-UV).

c) Análisis de Resultados

La interpretación de las pruebas vía húmeda y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de acuerdo a metodología descrita en el Manual del 2005 de Operaciones de Tamizaje Fitoquímico del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales –LIPRONAT– permitirá establecer de forma cualitativa la presencia o ausencia de las familias de metabolitos secundarios a investigar que se encuentren en los extractos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).

La cuantificación de azadiractina por medio de cromatografía líquida de alta eficacia con detector ultravioleta (HPLC-UV) de los extractos tanto metanólicos con equipo Soxhlet, así como por Fluidos Supercríticos con dióxido de carbono como solvente y metanol como co-solvente permitirá conocer la equivalencia entre los dos métodos de extracción de azadiractina, por medio de un análisis de coeficiente correlación intraclase de dos factores sobre la cantidad

de azadiractina extraída de las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.), así mismo se utilizará el método gráfico de Bland-Altman y diferencia de medias para poder complementar el análisis de los resultados para establecer si pueden usarse indistintamente los métodos o si hay diferencias.

VIII. Resultados

Tabla n.º 02: Compuestos de la caracterización de aceites esenciales totales en semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).

Volátiles	Fijos
Hexadecanoato de butilo	Hederagenin
Ácido 5-(1,1-dimetiletoxy)-2-tiofenocarboxílico	D-(-)-Citramalic acid
Metamfepramona	α -Copaene
2,5-Bis(1,1-dimetiletoxy)-tiofeno	3-Demethylthiocolchicine
Trans-2-metil-3-propiloxirano	Bicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one
Etanodioato de heptilo y propilo	β -Caryophyllene
5-amino-2-metil-2H-1,2,3,4-tetrazol	Spiro[indan-1,2'-(1,3)-dithiane]
O-(2-metilpropil)-hidroxilamina	δ -Elemene
5-hidrazino-1H-1,2,3,4-tetrazol	Bisnortilidine

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Departamento de Toxicología, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC

Tabla n.º 03: Caracterización de alcaloides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).

	Mayer	Dragendorff	Wagner
Quinina	Positivo	Positivo	Positivo
Extracto	Positivo	Positivo	Positivo
Blanco	Negativo	Negativo	Negativo

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigaciones Químicas y Ambientales, Departamento de Análisis Inorgánico, Escuela de Química, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

Tabla n.º 04: Caracterización de esteroides y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).

	Liebermann Burchard	Salkowski	Carr-Price
Colesterol	Positivo	Positivo	Positivo
Azadiractina	Negativo	Negativo	Negativo
Extracto	Positivo	Positivo	Negativo
Blanco	Negativo	Negativo	Negativo

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigaciones Químicas y Ambientales, Departamento de Análisis Inorgánico, Escuela de Química, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

Tabla n.°05: Concentraciones de azadiractina en semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) por equipo de Fluidos Supercríticos

Corrida	Tiempo de retención	Áreas	Solución diluida (FD 4/10) (mg/L)	Solución Concentrada (mg/L)	Material seco (mg/Kg)
1.1	10.631	861939	55.963	139.908	294.524
1.2	10.628	847338	55.015	137.538	289.534
1.3	10.643	876109	56.883	142.208	299.365
2.1	10.569	636494	41.241	103.103	217.142
2.2	10.577	661543	42.864	107.160	225.688
2.3	10.574	648548	42.022	105.055	221.255
3.1	10.515	613314	39.721	99.303	209.049
3.2	10.506	604111	39.125	97.813	205.912
3.3	10.519	622825	40.337	100.843	212.291
4.1	10.591	833868	54.129	135.323	285.042
4.2	10.589	832790	54.059	135.148	284.674
4.3	10.574	833036	54.075	135.188	284.758
5.1	10.572	726329	47.104	117.760	247.864
5.2	10.580	741610	48.095	120.238	253.078
5.3	10.537	723954	46.950	117.375	247.053
6.1	10.626	935034	60.729	151.823	319.630
6.2	10.623	910091	59.109	147.773	311.103
6.3	10.619	906442	58.872	147.180	309.856
7.1	10.675	804510	52.215	130.538	274.822
7.2	10.684	812229	52.716	131.790	277.458
7.3	10.679	811659	52.679	131.698	277.264
8.1	10.668	869422	56.452	141.130	297.156
8.2	10.671	878185	57.021	142.553	300.152
8.3	10.662	864432	56.128	140.320	295.451
9.1	10.600	827738	53.729	134.323	282.760
9.2	10.613	831651	53.983	134.958	284.097
9.3	10.591	814936	52.898	132.245	278.387
10.1	10.661	944180	61.336	153.340	322.814
10.2	10.654	939854	61.055	152.638	321.335
10.3	10.668	945134	61.398	153.495	323.141

Fuente: Datos experimentales obtenidos en departamento de análisis aplicado, Escuela de Química Farmacéutica, Fac. C.C.Q.Q y Farmacia, USAC.

Tabla n.°06: Concentraciones de azadiractina en semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) por equipo Soxhlet

Corrida	Tiempo de retención	Áreas	Solución diluida (FD 4/10) (mg/L)	Solución Concentrada (mg/L)	Material seco (mg/Kg)
1.1	10.299	221417	14.129	35.323	70.610
1.2	10.307	228829	14.602	36.505	72.974
1.3	10.346	234236	14.947	37.368	74.698
2.1	10.353	226246	14.433	36.083	72.165
2.2	10.361	233504	14.896	37.240	74.480
2.3	10.347	219161	13.981	34.953	69.905
3.1	10.360	196601	12.504	31.260	62.489
3.2	10.697	206396	13.127	32.818	65.602
3.3	10.363	200956	12.781	31.953	63.873
4.1	10.308	225123	14.349	35.873	71.731
4.2	10.296	218502	13.927	34.818	69.621
4.3	10.287	214846	13.694	34.235	68.456
5.1	10.357	208525	13.276	33.190	66.320
5.2	10.344	200781	12.783	31.958	63.858
5.3	10.368	212420	13.524	33.810	67.559
6.1	10.375	218964	13.939	34.848	69.688
6.2	10.362	201935	12.855	32.138	64.269
6.3	10.369	208156	13.251	33.128	66.248
7.1	10.367	207593	13.194	32.985	65.944
7.2	10.350	195714	12.439	31.098	62.170
7.3	10.355	198703	12.629	31.573	63.120
8.1	10.297	210459	13.402	33.505	66.997
8.2	10.308	216599	13.793	34.483	68.951
8.3	10.292	206486	13.149	32.873	65.732
9.1	10.351	201510	12.834	32.085	64.157
9.2	10.363	213474	13.596	33.990	67.966
9.3	10.358	211920	13.497	33.743	67.472
10.1	10.327	213183	13.571	33.928	67.835
10.2	10.320	207811	13.229	33.073	66.125
10.3	10.334	216215	13.764	34.410	68.799

Fuente: Datos experimentales obtenidos en departamento de análisis aplicado, Escuela de Química Farmacéutica, Fac. C.C.Q.Q y Farmacia, USAC.

Tabla n.° 07: Concentraciones promedio de azadiractina en semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

Muestras	Método de extracción por fluidos supercríticos		Método de extracción por soxhlet	
	Solución Concentrada (mg/L)	Concentración en material seco (mg/Kg)	Solución Concentrada (mg/L)	Concentración en material seco (mg/Kg)
1	139.884	294.474	36.398	72.760
2	105.106	221.362	36.092	72.183
3	99.319	209.084	32.010	63.988
4	135.219	284.825	34.975	69.936
5	118.458	249.332	32.986	65.912
6	148.925	313.530	33.371	66.735
7	131.342	276.515	31.885	63.745
8	141.334	297.586	33.620	67.227
9	133.842	281.748	33.273	66.532
10	153.158	322.430	33.803	67.586

Fuente: Datos calculados por programa Excel, Microsoft Office 2010.

Tabla n.°08: Análisis estadístico descriptivo de concentraciones promedio de azadiractina en semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

	Método de extracción por fluidos supercríticos		Método de extracción por soxhlet	
	Solución Concentrada	Material seco	Solución Concentrada	Material seco
Media	130.658	275.088	33.841	67.660
Error típico	5.632	11.855	0.488	0.977
Mediana	134.530	283.286	33.495	66.981
Desviación estándar	17.809	37.489	1.542	3.088
Varianza de la muestra	317.146	1405.401	2.377	9.537
Coefficiente de asimetría	-0.730	-0.730	0.569	0.564
Mínimo	99.319	209.084	31.885	63.745
Máximo	153.158	322.430	36.398	72.760
Nivel de confianza (95.0 %)	±12.740	±26.818	±1.103	±2.209
Nivel de confianza (99.0 %)	±18.302	±38.527	±1.584	±3.174

Fuente: Datos calculados por programa Excel, Microsoft Office 2010.

Tabla n.º09: Análisis del coeficiente de correlación intraclase

	Correlación intraclase ^a	Intervalo de confianza 95 %		Prueba F con valor verdadero 0			
		Límite inferior	Límite superior	Valor	gl1	gl2	Sig.
Medidas individuales	0.001 ^b	-0.012	0.047	1.03	9	9	0.48
Medidas promedio	0.001	-0.024	0.089	1.03	9	9	0.48

Modelo de efectos aleatorios de dos factores en el que tanto los efectos de las extracciones como los efectos de la toma de las muestras son aleatorios.

a. Coeficientes de correlación intraclase utilizando una definición de acuerdo absoluto.

b. El estimador es el mismo, ya esté presente o no el efecto de interacción.

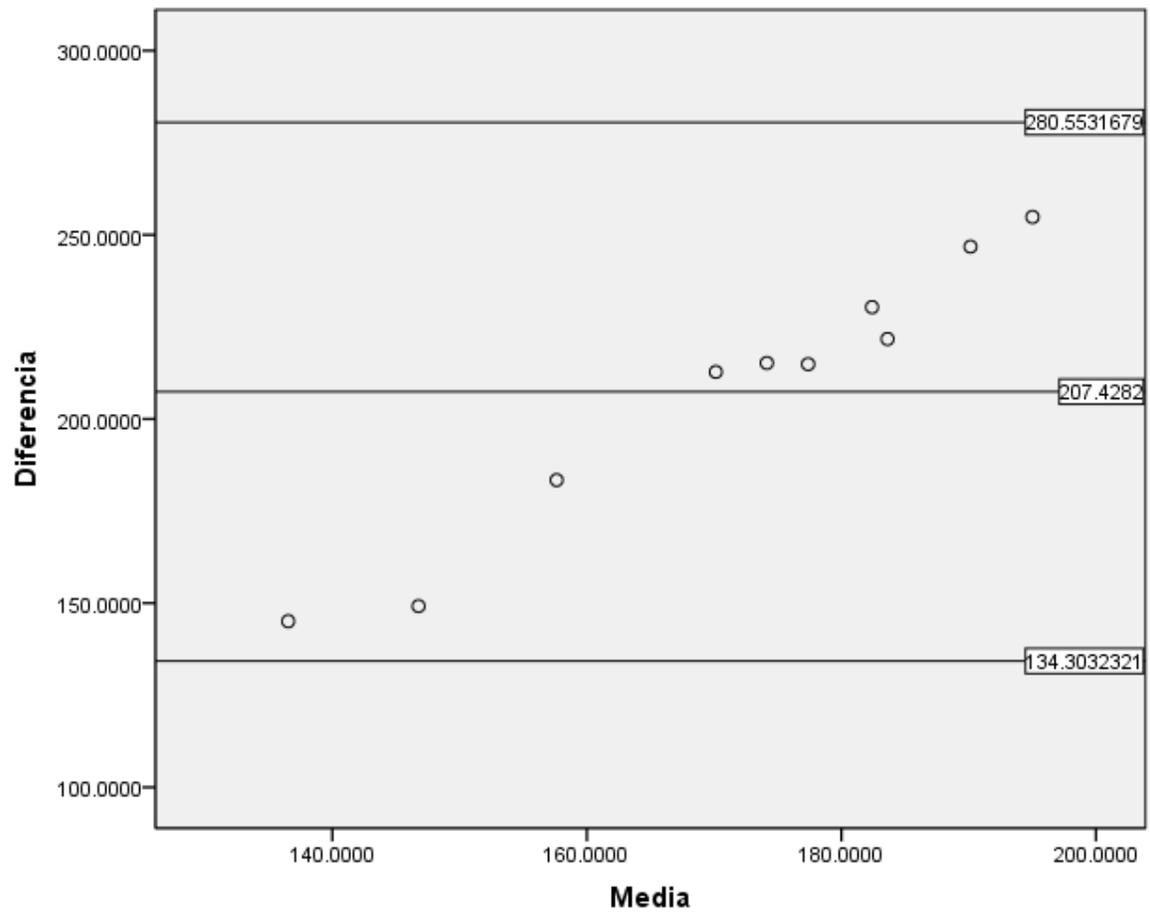
Fuente: Datos calculados por medio de programa SPSS Statistics, IBM versión 19.

Tabla n.º10: Prueba t para la diferencia de medias de los valores promedios de concentración de los métodos de extracción

	Valor de prueba = 0							
	T	gl	Significancia (bilateral)	Media de Diferencia de medias	Desviación típ.	Error típ. de la media	95 % Intervalo de confianza para la diferencia	
							Inferior	Superior
Diferencia	17.582	9	< 0.001	207.4282	37.308657	11.7980333	180.739195	234.117205

Fuente: Datos calculados por medio de programa SPSS Statistics, IBM versión 19.

Figura n.º02: Gráfico del método estadístico Bland-Altman



Fuente: Datos calculados por medio de programa SPSS Statistics, IBM versión 19.

Figura n.º 03: Cromatograma de estándar a 100 mg/L por HPLC con detector de UV a $\lambda_{214\text{ nm}}$.

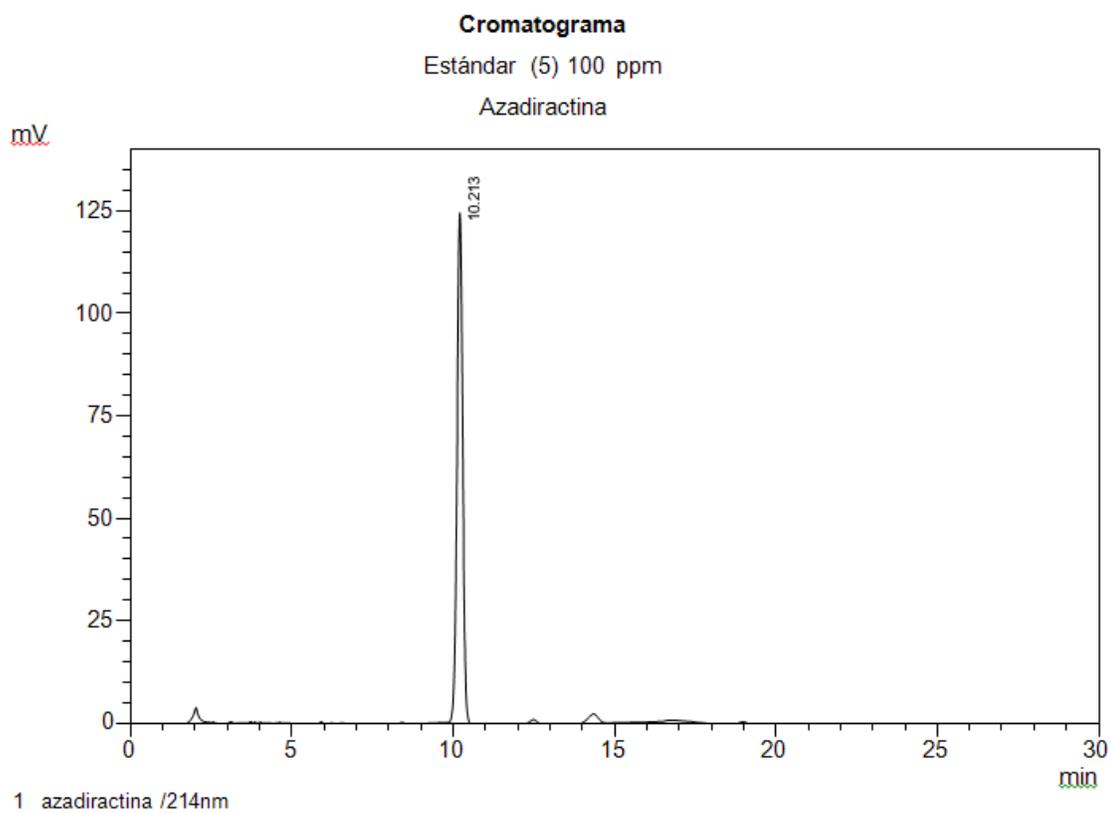


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD5.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.213	1529740	Azadiractina	99.591	mg/L
Total		1529740			

Figura n.º 04: Reporte de curva de calibración de Azadiractina.

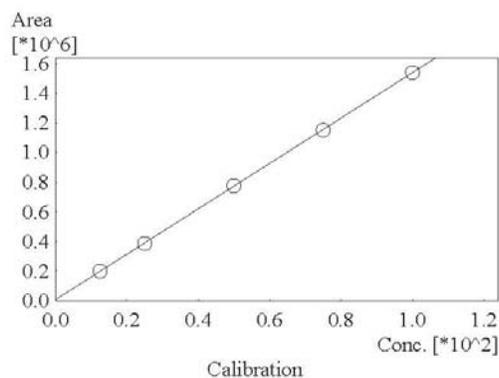
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
 DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
 TESIS FERMIN LABIN
 EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD5.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : azadiractina
 Sample ID : STD05
 Tray# : 0
 Vail # : 0
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : STD5.lcd
 Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 18/10/2019 15:57:19
 Data Processed : 30/10/2019 17:33:03

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : Azadiractina
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=1.5306.8*x+5318.71$
 Rr1=0.9999857 Rr2=0.9999713
 MeanRF:15486.1 RFSD:199.193 RFRSD:1.28627
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc. (Ratio)	MeanArea	Area
1	12.500	197847.8	197848
2	25.000	385274.4	385274
3	50.000	774298.3	774298
4	75.000	1150018.1	1150018
5	100.000	1537194.4	1537194

IX. Discusión

En las tablas n.º 02, 03 y 04 se pueden ver las familias de metabolitos secundarios que se caracterizaron, siendo aceites esenciales totales, alcaloides, esteroides y triterpenoides tetra y pentacíclicos, para lo cual se utilizaron extractos metanólicos obtenidos con el método de extracción por fluidos supercríticos, debido a que este método presentó la mayor concentración de azadiractina con respecto al método de extracción Soxhlet, con un promedio de 130.658 mg/L contra 33.841 mg/L respectivamente, como se observa en la tabla n.º 08. Esta caracterización de familias de metabolitos secundarios permitió conocer la presencia o ausencia en dichos extractos de las principales familias de metabolitos secundarios que presentan actividad biocida.

La determinación de aceites esenciales totales por cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas, identificó posibles compuestos volátiles y no volátiles, de los cuales algunos posibles compuestos con tiofenos y tetrazoles en su estructura molecular, así como sesquiterpenos los cuales se muestran en la tabla n.º 02 y en las figuras n.º 41-49 de los espectros de masas. Los compuestos que presentan dichos grupos funcionales han sido motivo de revisiones bibliográficas y estudios según Varala et al y Mishra et al, respectivamente, donde se evaluó la actividad biocida de estos.

En la prueba para alcaloides, se obtuvieron resultados positivos como se observa en la tabla n.º 03 para las pruebas de Mayer, Dragendorff y Wagner. Se pudo observar con la prueba de Mayer una turbidez debido a la formación de precipitado blanquecino en el tubo de quinina y del extracto metanólico comparado al tubo control incoloro y transparente, como se observa en la figura n.º 05 en anexos. Para la prueba de Dragendorff, se observó la formación de precipitado y coloración rojiza para el tubo con quinina, en el tubo con extracto metanólico se observó una turbidez por formación de precipitado y una coloración color naranja oscuro en comparación al tubo control sin precipitado y coloración amarilla como se aprecia en la figura n.º 06 en anexos. Por último, para la prueba de Wagner se

observa en la figura n.º 07 en anexos una coloración naranja oscura para los tubos de quinina y extracto metanólico comparado al tubo control naranja claro, resultando en una prueba positiva. Con esto se comprobó la presencia de alcaloides en los extractos metanólicos por medio de reacciones vía húmeda. (Bruneton, 1993) (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005)

Para la caracterización de esteroides y triterpenoides tetra y pentacíclicos en la tabla n.º 04 se muestran los resultados positivos para la presencia de compuestos triterpenoides tetra y pentacíclicos, al observarse en la prueba Liebermann-Burchard una coloración verde oscura en el extracto que indica respuesta para compuestos triterpenoides tetra y pentacíclicos y/o esteroides, así como positivo para el estándar de colesterol al obtenerse una coloración verde según se observa en figura n.º 08 en anexos, estos resultados se confirman por medio de las pruebas de Salkowski al obtener coloraciones verde oscuro para triterpenoides tetra y pentacíclicos y rojo-naranja para esteroides según se observa en figura n.º 09 en anexos y la prueba de Carr-Price presentó resultados no concluyentes para el extracto metanólico debido a que presentó una reacción indeterminada y no presentó una coloración azul como se observa para derivados del colestano según se observa en figura n.º 10 en anexos. (Bruneton, 1993) (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005) (Dwivedi, Dwivedi, & Kalita, 2007)

La cuantificación de azadiractina en los extractos metanólicos por los métodos de extracción tanto por fluidos supercríticos como por Soxhlet, luego de la preparación respectiva de las muestras se analizó por triplicado en HPLC con detector ultravioleta. Obteniéndose la curva de calibración según se observa la figura n.º 04 para la cuantificación de azadiractina con un coeficiente de correlación de 0.9999713 y un tiempo de retención de 10.213 para el estándar de 100 mg/L de azadiractina que se observa en figura n.º 03, como parámetros para su identificación en los cromatogramas de cada muestra que se aprecian en las figuras n.º 17 a la 36 en anexos.

En las tablas n.º 5 y 6 se muestran las concentraciones de las muestras con factor de dilución de 2/5, con lo cual se obtuvieron las concentraciones de las disoluciones concentradas y sobre material seco de las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.), dichas concentraciones se obtuvieron por el método de estándar externo, obteniéndose las concentraciones de azadiractina dentro de los puntos de la curva de calibración.

En el análisis estadístico descriptivo según se observa en tabla n.º 8, se muestra el valor de distribución asimétrica igual para la solución concentrada y la concentración del material seco en cada método de extracción, por lo cual se realizó el análisis de los resultados en base a las concentraciones sobre material seco para ambos métodos de extracción, debido a que este valor de distribución asimétrica indica una misma distribución de concentraciones con respecto a la media para la solución concentrada y la concentración en material seco.

En la tabla n.º 8 se observan los valores mínimos de concentración de azadiractina de 209.084 y 63.745 mg/Kg en material seco y valores máximos de concentración de azadiractina de 322.430 y 72.760 mg/Kg en material seco para método por fluidos supercríticos y Soxhlet respectivamente, lo cual en conjunto con los valores de la desviación estándar, la varianza y el coeficiente de asimetría, se identifica una diferencia entre ambos métodos de extracción con respecto a la reproducibilidad y la cantidad de azadiractina extraída, debido a que si bien el método de extracción por Soxhlet se establece con mejor reproducibilidad, ha proporcionado menor cantidad de azadiractina extraída y la mayor cantidad de muestras tienen su concentración por debajo de la media aritmética de 67.660 mg/L, mientras que el método de fluidos supercrítico si bien posee una menor reproducibilidad y mayor varianza en las concentración, presenta la mayor cantidad de azadiractina extraída y con la mayoría de valores de concentración por arriba de la media aritmética de 275.088 mg/L, por lo que el método de extracción por fluidos supercríticos se presenta como eficaz al corresponder a valores de azadiractina cercanos a materiales vegetales de Brasil e India (Fernandes da Silva, Forim, Cass, Fernandes, & Vieira, 2010) y posterior uso en

protección de cultivos o manejo integral de plagas (Ibáñez & Zoppolo, 2008) (Alatorre Rosas, Bravo Mojica, Leyva Vásquez, & Huerta de la Peña).

Para la evaluación de los métodos de extracción se establecieron los análisis de coeficiente de correlación intraclase, prueba t para la diferencia de medias de los valores promedios de concentración y el método estadístico Bland-Altman, estos análisis confirman que existe una diferencia entre ambos métodos, es decir no existe una equivalencia o concordancia entre ambos métodos de extracción, al encontrarse un valor del coeficiente de correlación intraclase de 0.001 tanto para las medidas individuales como las medidas promedio como se observa en la tabla n.° 09, mientras que la prueba t en la diferencia de medias en la tabla n.° 10 muestra que existe una diferencia entre ambos métodos al obtener un valor de significancia menor a 0.001 estableciéndose nuevamente la no equivalencia o no concordancia entre ambos métodos.

En la figura n.° 02 se muestra el gráfico de dispersión según el método estadístico Bland-Altman en el cual se puede apreciar que los métodos de extracción no son equivalentes al observarse que la mayoría de valores obtenidos en el análisis de la diferencia de medias se encuentran dispersos al valor de la media aritmética de 207.4282 mg/L, con esto se confirma que los métodos de extracción de azadiractina son procesos no equivalentes estadísticamente.

X. Conclusiones

- A. La extracción de azadiractina por Soxhlet y Fluidos Supercríticos no muestra una relación de equivalencia estadística al obtenerse un coeficiente de correlación intraclase de 0.001 tanto en las medidas individuales como medidas promedio, así como un valor de significancia (p) < 0.001 en la prueba t de diferencia de Medias.
- B. El análisis estadístico Bland-Altman presentó diferencia en la extracción de azadiractina entre ambos métodos de extracción, debido a que la mayoría de los valores obtenidos se encuentran con valores menores o mayores a la media aritmética de 207.4282 mg/L de dicho análisis, estableciendo que los métodos no son equivalentes para este estudio.
- C. El análisis estadístico de los datos de concentración obtenidos por HPLC-UV presentó que el equipo de extracción por Fluidos Supercríticos obtuvo la mayor cantidad promedio de azadiractina extraída de 275.088 mg/Kg en material seco, por lo cual se considera el más eficaz en este proceso de extracción.
- D. Se identificaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas diferentes posibles compuestos volátiles y no volátiles con base en tiofenos, tetrazoles y sesquiterpenos como aceites esenciales totales de las semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).
- E. Se confirmó la presencia de alcaloides en los extractos metanólicos obtenidos por el método de extracción de Fluidos Supercríticos, por medio de las pruebas de Mayer, Dragendroff y Wagner.

- F. Se confirmó la presencia de compuestos triterpenoides tetra y pentacíclicos por medio de las pruebas Liebermann-Burchard y Salkowski al presentar coloraciones diferentes al estándar de colesterol.

XI. Recomendaciones

- A. Realizar estudios de actividad biocida, ya sea como insecticida, herbicida o microbicida de los extractos metanólicos extraídos por Fluidos Supercríticos para determinar si es factible su uso en formulaciones.
- B. Realizar estudio de actividad biocida, ya sea como insecticida, herbicida o microbicida de los aceites esenciales totales para determinar si es factible su uso en formulaciones.
- C. Realizar diversas extracciones de limonoides a partir de semillas de diferentes especies de la familia Meliaceae y evaluar su concentración de azadiractina.
- D. Promover estudios multidisciplinarios para realizar diferentes tipos de formulaciones de extractos de semillas de árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.) y evaluar su efectividad de como insecticida natural in vitro e in vivo.

XII. Referencias

- [1] Alatorre Rosas, R., Bravo Mojica, H., Leyva Vásquez, J. L., & Huerta de la Peña, A. (s.f.). *Manejo integrado de Plagas*. Motecillo, México, México: Dirección General de Apoyos para el Desarrollo Rural, Subsecretaría de Desarrollo Rural, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
- [2] American Psychological Association. (2010). *Manual de publicaciones de la American Psychological Association* (Tercera ed.). (S. Viveros Fuentes, Ed., & M. Guerra Frías, Trad.) Traducción de: Publication manual of the American Psychological Association. 6th ed. México: El Manual Moderno.
- [3] Ascher, K. R., Schmutterer, H., Zebitz, C. W., & Naqvi, S. H. (1995). Melia SPP. En K. S. Ascher, M. B. Isman, M. Jacobson, C. M. Ketkar, W. Kraus, H. Rembold, R. C. Saxena, & H. Schmutterer (Ed.), *The Neem Tree: Azadirachta indica A. Juss. and other Meliaceae Plants* (págs. 605-642). Weinheim, Republica Federal de Alemania: VHC Verlagsgesellschaft.
- [4] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- [5] Berlitz, D. L., Oliboni de Azambuja, A., Sebben, A., Vargas de Oliveira, J., & Fiuza, L. M. (2012). Mortality of *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) and *Spodoptera frugiperda* (J E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae Exposed to *Bacillus thuringiensis* and Extracts of *Melia azedarach*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(5), 725-731.
- [6] Bruneton, J. (1993). *Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales* (Segunda ed.). (Á. Villar del Fresno, E. Carretero Accame, & M. Rebuella Lizabe, Trads.) Zaragoza, España: Acribia.
- [7] Carpinella, M. C., Defago, M. T., Valladares, G., & Palacios, S. M. (2003). Antifeedant and Insecticide Properties of a Limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with Potential Use for Pest Management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 369-374.

- [8] Departamento de Toxicología "Julio Valladares Márquez". (14 de Abril de 2015). Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- [9] Díaz, M., & Rossini, C. (2011). Triterpenoides de frutos de *Melia azedarach*: su potencial como agentes de control de insectos. *Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay*(6), 56-59.
- [10] Dwivedi, P., Dwivedi, S. K., & Kalita, M. C. (2007). *Biodiversity and Environmental Biotechnology*. Jodhpur: Scientific Publishers.
- [11] Fernandes da Silva, M. F., Forim, M. R., Cass, Q. B., Fernandes, J. B., & Vieira, P. C. (2010). Simultaneous quantification of azadirachtin and 3-tigloylazadirachtol in Brazilian seeds and oil of *Azadirachta indica*: application to quality control and marketing. *Analytical Methods*, 2(7), 860-869.
- [12] Glasby, J. S. (2005). *Dictionary of Plants Containing Secondary Metabolites*. London, United Kingdom: Taylor & Francis.
- [13] Heinz Kubeczka, K. (2016). History and Sources of Essential Oil Research. En K. H. Can Baser, & G. Buchbauer (Edits.), *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications* (pág. 1109). Boca Raton, Florida, Estados Unidos de América: CRC Press.
- [14] Ibáñez, F., & Zoppolo, R. (2008). *Manejo de plagas en agricultura orgánica: extractos de "Paraíso" para control de insectos*. Montevideo, Uruguay: Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria -INIA.
- [15] Instituto Nacional de Estadística - INE. (2013). *Encuesta Nacional Agropecuaria*. Guatemala: Gobierno de la República de Guatemala.
- [16] Isman, M. B. (2006). Botanical Insecticides, Deterrents AND Repellents in Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66.

- [17] Kaushik, N. (2002). Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 1199-1204.
- [18] Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT. (2005). *Manual de Operaciones: Tamizaje Fitiquímico*. Guatemala: Editorial Universitaria.
- [19] Maregiani, G., Zamuner, N., & Angarola, G. (2010). Efecto de extractos acuosos de dos meliaceas sobre *Meloidogyne incognita* (Nematoda, Meloidogynadeae). *Revista Latinoamericana de Química*, 38(1), 68-73.
- [20] McHugh, M. A., & Krukonis, V. J. (1994). *Supercritical Fluid Extraction. Principles and Practice* (Second ed.). Newton: Butterworth-Heinemann.
- [21] Merck & CO. (2001). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* (thirteenth ed.). (M. J. O'Neil, Ed.) Whitehouse Station, New Jersey, United States of America: Merck Research Laboratories Division.
- [22] Mishra, R., Tomar, I., Singhai, S., & Jha, K. (2011). Synthesis, properties and biological activity of thiophene: A review. *Der Pharma Chemica*, 3, 38-54.
- [23] Missouri Botanical Garden. (04 de Agosto de 2015). *Tropicos.org*. Recuperado el 30 de Julio de 2015, de <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=20400407&langid=66>
- [24] Plimmer, J. R., Gammon, D. W., & Ragsdale, N. N. (2003). *Encyclopedia of Agrochemicals* (Vol. I). (J. R. Plimmer, Ed.) Hoboken, New Jersey, USA: John Wiley & Sons.
- [25] Prajapati, V., Tripathi, A. K., Aggarwal, K. K., & Khanuja, S. P. (2005). Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology*, 96, 1749–1757.
- [26] Sigma-Aldrich. (25 de October de 2018). Certificate of Analysis. (R. Schwenninger, Ed.) Buchs, Switzerland.

- [27] Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental* (Sexta ed.). México: Cengage Learning Latin America.
- [28] Standley, P. C., & Steyermark, J. A. (1946). Flora of Guatemala. En C. N. Museum, *Fieldiana: Botany* (Vol. 24, págs. 444-456). Chicago, Illinois, Estados Unidos de America: Chicago Natural History Museum.
- [29] United States Environmental Protection Agency. (Septiembre de 2008). *Azadirachtin Summary Document Resitration*. Obtenido de Pesticides: Registration Review: http://epa.gov/oppsrrd1/registration_review/azadirachtin/index.htm
- [30] Varala, R., & Bollikolla, H. B. (2018). A Click Chemistry Approach to Tetrazoles. *Recent Advances*, 51-75.
- [31] Vázquez-Luna, A., Pérez-Flores, L., & Díaz-Sobac, R. (2007). Biomoléculas con actividad insecticida: Una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 5(4), 306-313.
- [32] Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 18(1), 53-65.
- [33] Wandscheer, C. B., Duque, J. E., da Silva, M. A., Fukuyama, Y., Wohlke, J. L., Adelman, J., & Fontana, J. D. (2004). Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon*(44), 829-835.

XIII. Anexos

A. Preparación de Reactivos

1. Mayer: (*yoduro de mercurio y potasio*)

- Disolver 0.14 g de HgCl_2 en 6 mL de agua.
- Disolver 0.5 g de KI en 1 mL de agua.
- Mezclar las dos disoluciones y aforar a 10 mL.

El reactivo solo debe añadirse a disoluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos.

La disolución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Solo debe agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso del mismo.

El cloruro de mercurio es irritante y corrosivo. Puede absorberse por la piel. Es sumamente tóxico para el ambiente. *Evitar todo contacto, trabajar con equipo completo de seguridad.*

2. Dragendorff: (*yoduro de bismuto y potasio*)

- Disolución A: disolver 0.65 g de nitrato básico de bismuto en 2 mL de ácido nítrico concentrado.
- Disolución B: disolver 2.72 g de KI en 5 mL de agua destilada.
- Mezclar ambas disoluciones, dejarlas reposar 15 minutos y decantar el sobrenadante dentro de un balón aforado de 10 mL
- Aforar el balón con agua destilada.

La disolución es estable en un recipiente oscuro y refrigerado durante 6 meses.

El ácido nítrico es corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Es oxidante y ácido fuerte capaz de atacar metales. *Trabajar*

bajo campana de extracción de gases y con equipo completo de seguridad.

3. Wagner: (yodo-yoduro de potasio)

- Pesar 0.127 g de I_2 y adicionarles 0.2 g de KI disueltos en 5 mL de agua destilada.
- Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con agua destilada.

El yodo es irritante y causa quemaduras severas por contacto o inhalación (sublima fácilmente). Es oxidante y reacciona violentamente con acetaldehído, fósforo, aluminio, amoníaco y metales alcalinos. Por calentamiento intenso libera gases tóxicos. Tóxico para organismos acuáticos. *Trabajar con equipo completo de seguridad. No descartar en el drenaje.*

4. Ácido clorhídrico al 2 N:

- Medir 16.82 mL de ácido clorhídrico al 37 % y disolver en 35 mL de agua desmineralizada.
- Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón de 100 mL y aforarlo con agua desmineralizada.

El ácido clorhídrico es un líquido corrosivo, causa quemaduras severas por contacto o inhalación, causando perforaciones en el tracto digestivo por ingesta, libera gases ácidos. Trabajar con equipo completo de seguridad. Neutralizar antes de desechar en drenajes.

5. Hidróxido de Amonio al 10 % p/v:

- Pesar 1.0 g de hidróxido de amonio y disolverlos en 6 mL de agua destilada.

- Trasvasar cuantitativamente la disolución a un balón aforado de 10 mL y aforarlo con agua destilada.

El hidróxido de amonio es base fuerte disuelto en agua, corrosivo y causa quemaduras severas por contacto o inhalación. Ataca a la mayoría de metales liberando hidrógeno inflamable. Muy tóxico para organismos acuáticos. *Trabajar con equipo completo de seguridad. No descartar en el drenaje.* (Laboratorio de Investigación en Productos Naturales - LIPRONAT, 2005)

B. Preparaciones caseras y su aplicación de repelentes de frutos de árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

1. Extracto acuoso

Triturar bien 1kg de frutos maduros de Paraíso. La trituración debe ser hasta obtener un particulado de 1 milímetro aproximadamente y se debe romper bien el carozo ya que los componentes activos se encuentran mayoritariamente en las semillas.

Poner los frutos molidos en 4 litros de agua durante una noche (12-14 horas) a temperatura ambiente. Filtrar y al líquido obtenido diluirlo, agregando 2 litros de agua por cada litro de extracto. Aplicar directamente sobre el cultivo por medio de mochila aplicador hasta punto de goteo.

En cultivos hortícolas 3 litros son suficientes para aplicar en unos 30 m². En árboles frutales la misma aplicación de 3 litros daría para cubrir de 4 - 6 árboles.

2. Extracto alcohólico

Moler 100g de frutos maduros de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.). La trituración debe ser hasta obtener un particulado fino, de 1 milímetro aproximadamente y se debe romper bien el carozo de cada fruto.

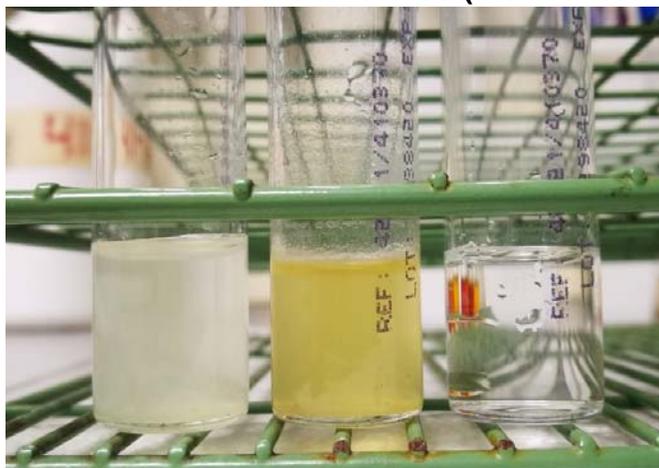
Poner los frutos molidos en 300ml de alcohol etílico 95 % durante una semana a temperatura ambiente en un recipiente bien tapado. Todos los días agitar unos minutos el macerado. Filtrar y guardar el líquido en un frasco oscuro. Para su aplicación diluir 10 ml por litro de

agua y aplicar directamente sobre el cultivo por medio de mochila aplicador hasta punto de goteo.

En cultivos hortícolas 3 litros son suficientes para aplicar en unos 30 m². En árboles frutales la misma aplicación de 3 litros daría para cubrir de 4-6 árboles. (Ibáñez & Zoppolo, 2008, pág. 8)

C. Imágenes de resultados de pruebas de caracterización de metabolitos secundarios

Figura n. ° 05: Resultados de prueba Mayer para alcaloides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).



Tubo de izquierda a derecha con Quinina (positivo), extracto metanólico (positivo), blanco (negativo). Fuente: Fotografía tomada por Fermín Labín en Laboratorio de Investigaciones Químicas y Ambientales, Departamento de Análisis Inorgánico, Escuela de Química, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

Figura n. ° 06: Resultados de prueba Dragendorff para alcaloides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).



Tubo de izquierda a derecha con Quinina (positivo), extracto metanólico (positivo), blanco (negativo). Fuente: Fotografía tomada por Fermín Labín en Laboratorio de Investigaciones Químicas y Ambientales, Departamento de Análisis Inorgánico, Escuela de Química, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

Figura n. ° 07: Resultados de prueba Wagner para alcaloides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).



Tubo de izquierda a derecha con Quinina (positivo), extracto metanólico (positivo), blanco (negativo). Fuente: Fotografía tomada por Fermín Labín en Laboratorio de Investigaciones Químicas y Ambientales, Departamento de Análisis Inorgánico, Escuela de Química, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

Figura n. ° 08: Resultados de prueba Liebermann-Burchard para esteroides y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).



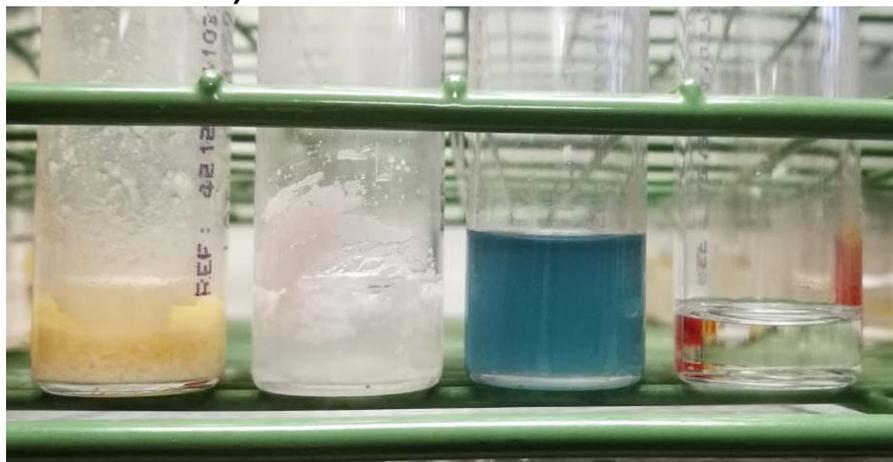
Tubo de izquierda a derecha, extracto (positivo), estándar de azadiractina (negativo), colesterol (positivo) y blanco (negativo). Fuente: Fotografía tomada por Fermín Labín en Laboratorio de Investigaciones Químicas y Ambientales, Departamento de Análisis Inorgánico, Escuela de Química, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

Figura n. ° 09: Resultados de prueba Salkowski para esteroides y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).



Tubo de izquierda a derecha, extracto (positivo), estándar de azadiractina (negativo), colesterol (positivo) y blanco (negativo). Fuente: Fotografía tomada por Fermín Labín en Laboratorio de Investigaciones Químicas y Ambientales, Departamento de Análisis Inorgánico, Escuela de Química, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

Figura n. ° 10: Resultados de prueba Carr-Price para esteroides y triterpenoides en extractos metanólicos de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.).



Tubo de izquierda a derecha, extracto (negativo), estándar de azadiractina (negativo), colesterol (positivo) y blanco (negativo). Fuente: Fotografía tomada por Fermín Labín en Laboratorio de Investigaciones Químicas y Ambientales, Departamento de Análisis Inorgánico, Escuela de Química, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.

D. Reportes de cromatogramas de Azadiractina en HPLC

Figura n.º 11: Reporte de curva de calibración de Azadiractina.

30/10/2019 17:40:30 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMIN LABIN

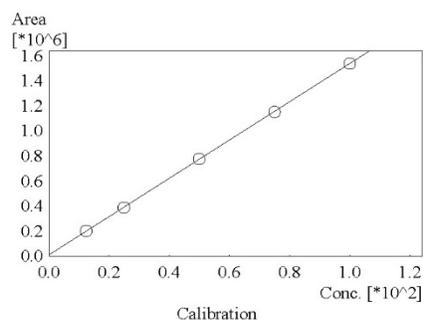
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD5.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : STD05
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : STD5.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 18/10/2019 15:57:19
Data Processed : 30/10/2019 17:33:03

Calibration Curve

ID# : 1
Name : Azadiractina
Quantitative Method : External Standard
Function : $f(x)=15306.8 \cdot x+5318.71$
Rr1=0.9999857 Rr2=0.9999713
MeanRF:15486.1 RfSD:199.193 RFRSD:1.28627
FitType : Linear
ZeroThrough : Not Through
Weighted Regression : None
Detector Name : Detector A



#	Conc. (Ratio)	MeanArea	Area
1	12.500	197847.8	197848
2	25.000	385274.4	385274
3	50.000	774298.3	774298
4	75.000	1150018.1	1150018
5	100.000	1537194.4	1537194

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD5.lcd

Figura n.º 12: Reporte estándar de Azadiractina de 12.5 mg/L.

30/10/2019 17:34:24 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD1.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : STD01
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : STD1.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 18/10/2019 13:41:25
Data Processed : 30/10/2019 17:20:05

Cromatograma

Estándar (1) 12.5 ppm
azadiractina

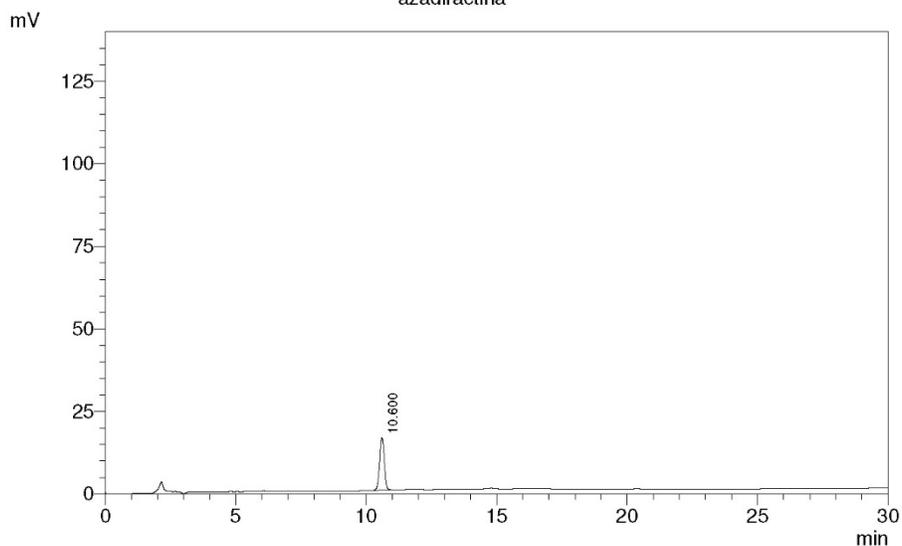


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD1.lcd

Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.600	197848	Azadiractina	12.578	mg/L
Total		197848			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD1.lcd

Figura n.º 13: Reporte estándar de Azadiractina de 25 mg/L.

30/10/2019 17:34:53 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD2.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : STD02
Tray# : 0
Vial # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : STD2.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 18/10/2019 14:12:39
Data Processed : 30/10/2019 17:20:43

Cromatograma Estándar (2) 25 ppm azadiractina

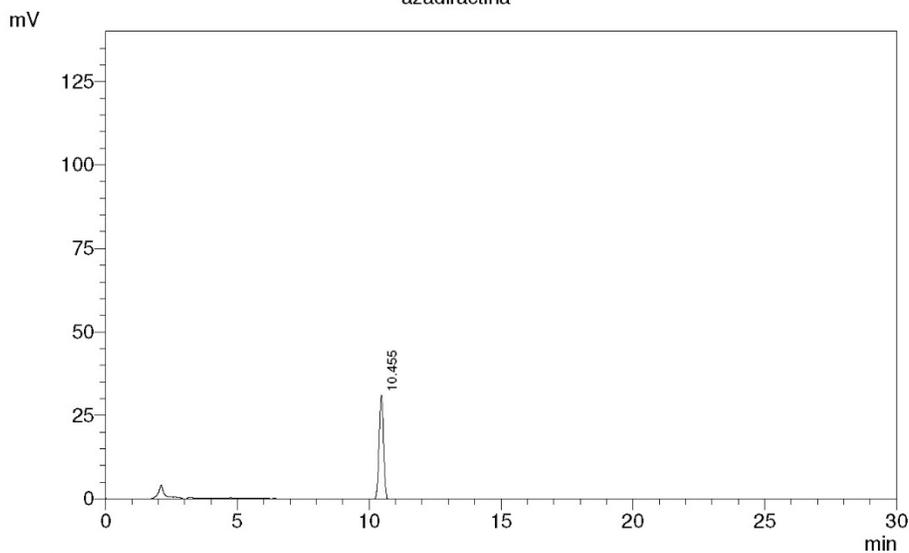


Tabla de Resultados C:\... \USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD2.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.455	385274	Azadiractina	24.823	mg/L
Total		385274			

Figura n.º 14: Reporte estándar de Azadiractina de 50 mg/L.

30/10/2019 17:35:14 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMIN LABÍN

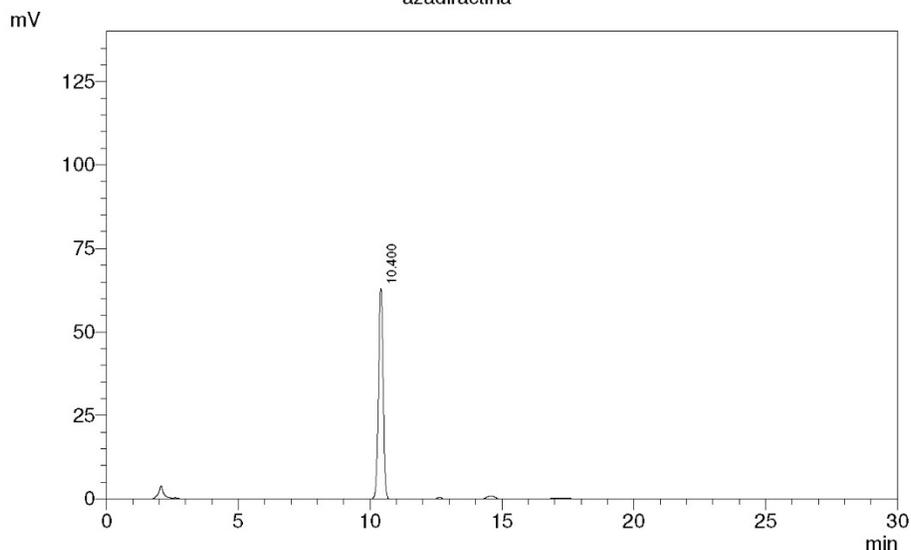
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD3.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : azadiractina
 Sample ID : STD03
 Tray# : 0
 Vail # : 0
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : STD3.lcd
 Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 18/10/2019 14:55:10
 Data Processed : 30/10/2019 17:21:17

Cromatograma

Estándar (3) 50 ppm

azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD3.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.400	774298	Azadiractina	50.238	mg/L
Total		774298			

Figura n.º 15: Reporte estándar de Azadiractina de 75 mg/L.

30/10/2019 17:35:58 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

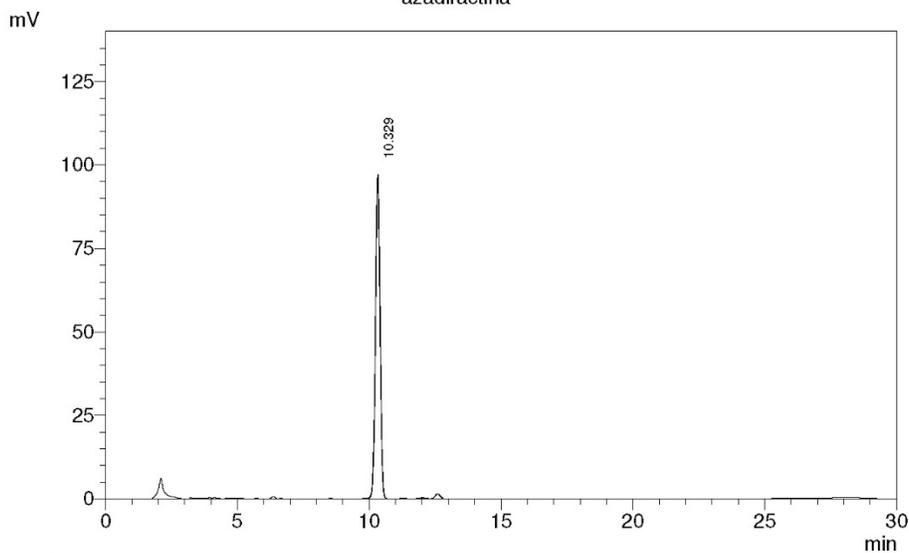
UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD4.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : STD04
Tray# : 0
Vial # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : STD4.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 18/10/2019 15:26:14
Data Processed : 30/10/2019 17:27:44

Cromatograma Estándar (4) 75 ppm azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\... \USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD4.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.329	1150018	Azadiractina	74.784	mg/L
Total		1150018			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD4.lcd

Figura n.º 16: Reporte estándar de Azadiractina de 100 mg/L.

30/10/2019 17:36:52 1 / 1

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

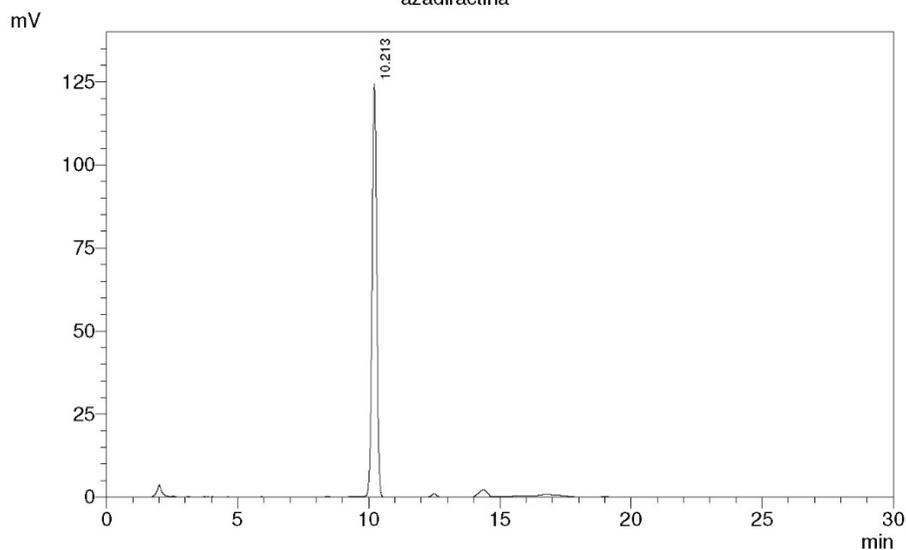
UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD5.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : STD05
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : STD5.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 18/10/2019 15:57:19
Data Processed : 30/10/2019 17:33:03

Cromatograma Estándar (5) 100 ppm azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD5.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.213	1529740	Azadiractina	99.591	mg/L
Total		1529740			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Curva\STD5.lcd

Figura n.º 17: Reporte de muestra 1 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:05:11 1 / 2

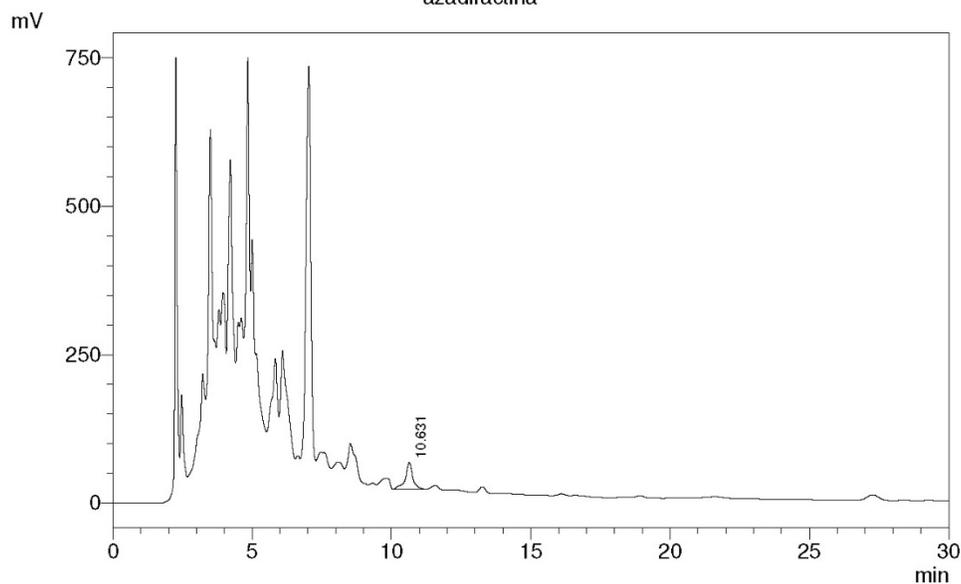
==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
 DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
 TESIS FERMÍN LABÍN
 EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\ScMx1.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : azadiractina
 Sample ID : ScMx1
 Tray# : 0
 Vial # : 0
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : ScMx1.lcd
 Method File Name : Azadiractina.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 24/10/2019 16:02:11
 Data Processed : 24/10/2019 16:32:15

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
 azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\ScMx1.lcd
 Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.631	861939	Azadiractina	55.963	mg/L
Total		861939			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\ScMx1.lcd

Figura n.º 18: Reporte de muestra 2 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:16:57 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx2.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx2
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx2.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 24/10/2019 16:33:41
Data Processed : 28/10/2019 17:12:51

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina

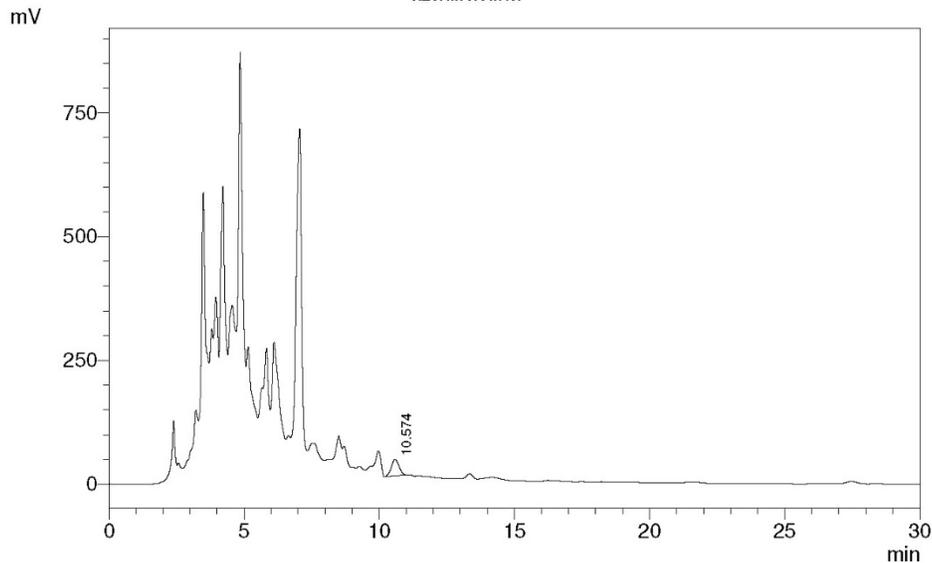


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx2.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.574	648548	Azadiractina	42.022	mg/L
Total		648548			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx2.lcd

Figura n.º 19: Reporte de muestra 3 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:18:32 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx3.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx3
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx3.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 24/10/2019 17:05:05
Data Processed : 28/10/2019 17:18:16

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina

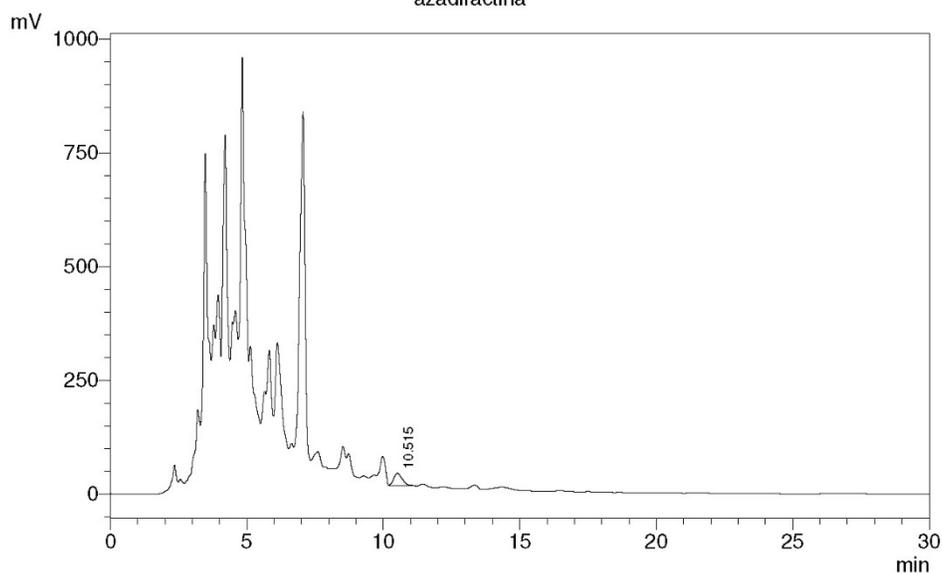


Tabla de Resultados C:\... \USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx3.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.515	613314	Azadiractina	39.721	mg/L
Total		613314			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx3.lcd

Figura n.º 20: Reporte de muestra 4 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:46:33 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMIN LABIN

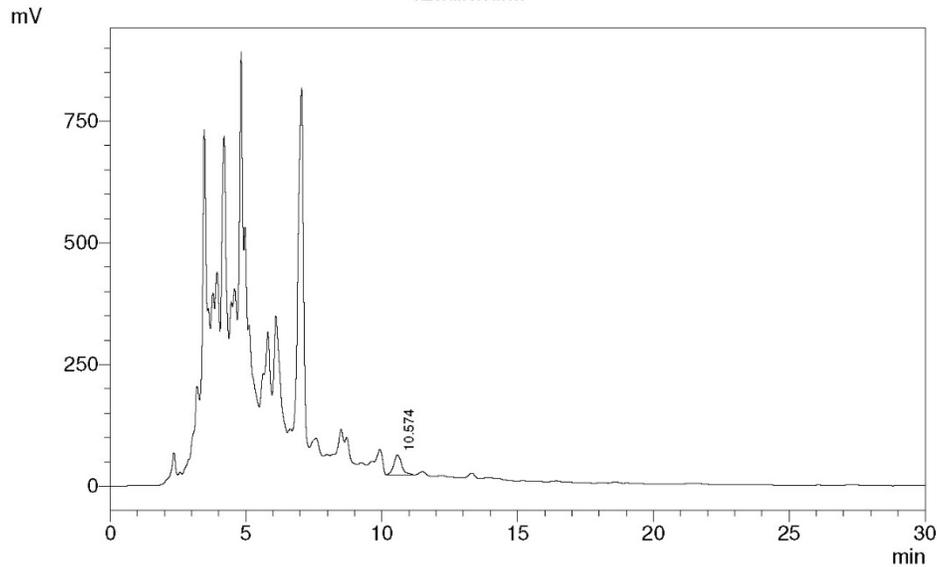
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx4.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx4
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx4.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 24/10/2019 17:36:43
Data Processed : 28/10/2019 17:24:55

Cromatograma

Extracción con Fluídos Supercríticos
azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx4.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.574	833036	Azadiractina	54.075	mg/L
Total		833036			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx4.lcd

Figura n.º 21: Reporte de muestra 5 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:46:51 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

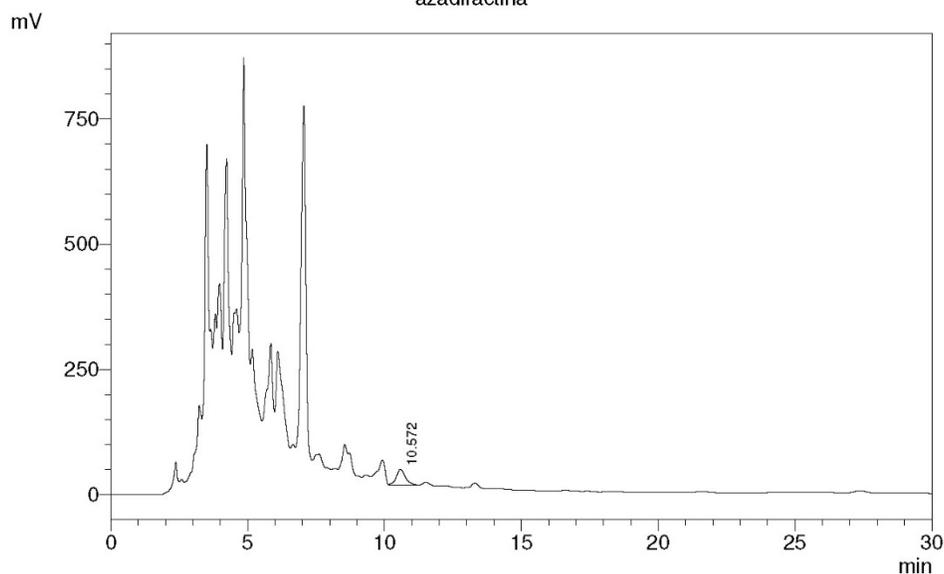
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx5.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx5
Tray# : 0
Vial # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx5.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 25/10/2019 8:44:58
Data Processed : 28/10/2019 17:26:21

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx5.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.572	726329	Azadiractina	47.104	mg/L
Total		726329			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx5.lcd

Figura n.º 22: Reporte de muestra 6 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:47:15 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

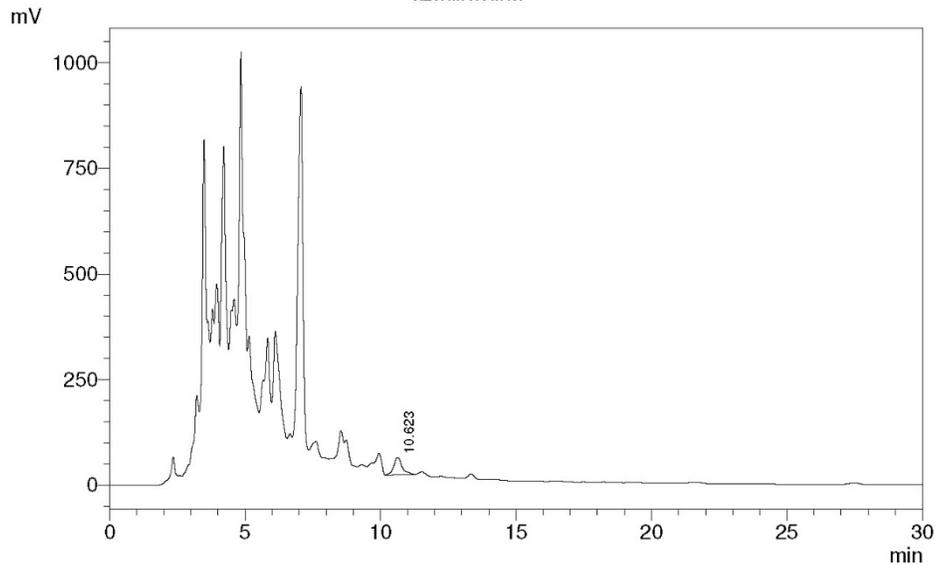
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx6.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx6
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx6.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 25/10/2019 9:19:39
Data Processed : 28/10/2019 17:27:33

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx6.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.623	910091	Azadiractina	59.109	mg/L
Total		910091			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx6.lcd

Figura n.º 23: Reporte de muestra 7 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:47:34 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMIN LABIN

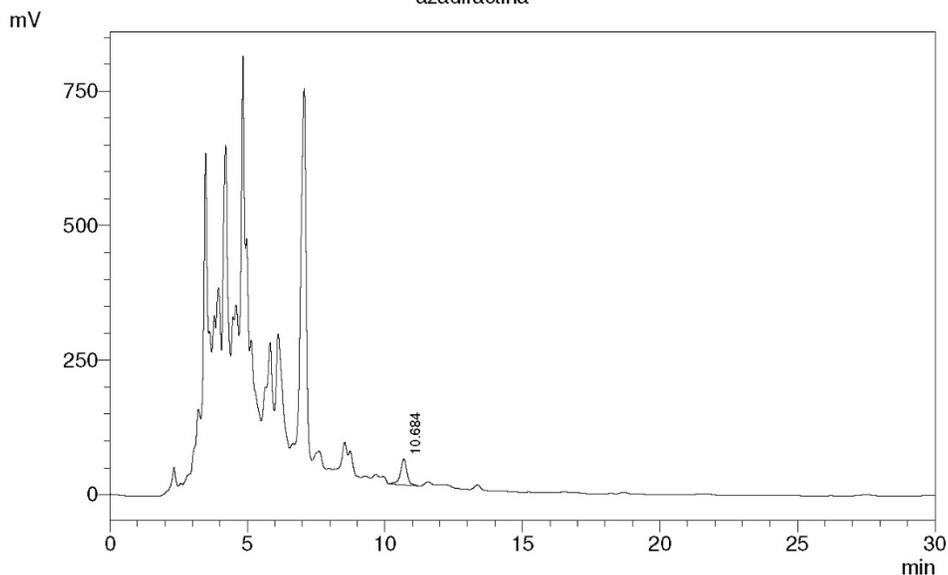
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx7.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx7
Tray# : 0
Vial # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx7.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 25/10/2019 9:53:28
Data Processed : 28/10/2019 17:28:26

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx7.lcd

Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.684	812229	Azadiractina	52.716	mg/L
Total		812229			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx7.lcd

Figura n.º 24: Reporte de muestra 8 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:47:54 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

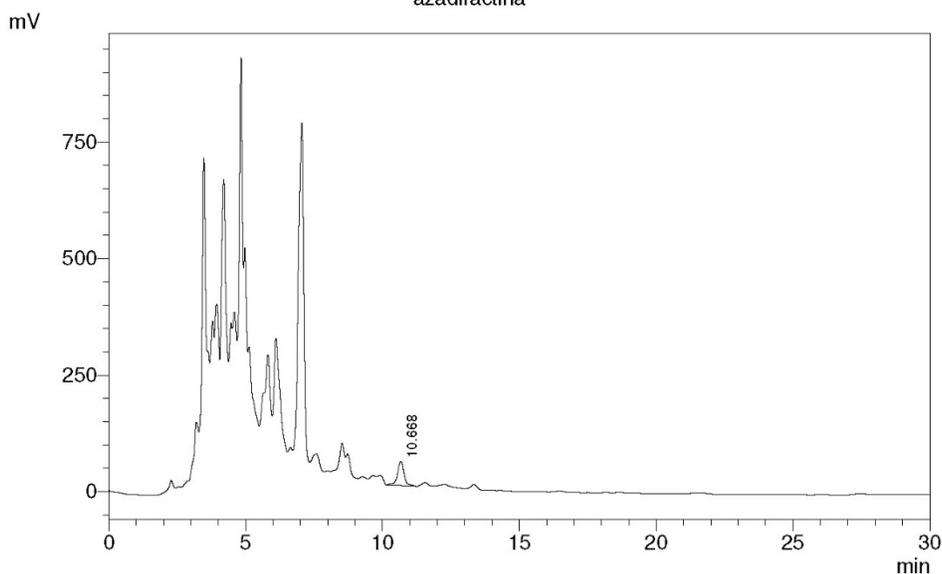
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx8.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx8
Tray# : 0
Vial # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx8.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 25/10/2019 10:27:00
Data Processed : 28/10/2019 17:29:08

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\... \USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx8.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.668	869422	Azadiractina	56.452	mg/L
Total		869422			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx8.lcd

Figura n.º 25: Reporte de muestra 9 del método por Fluidos Supercríticos

28/10/2019 17:48:16 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

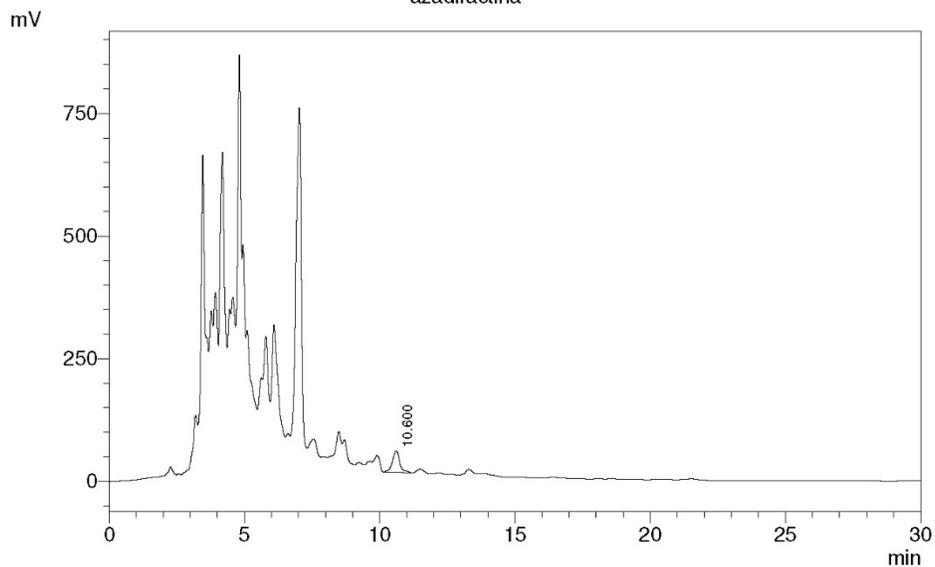
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx9.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx9
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx9.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 25/10/2019 10:58:52
Data Processed : 28/10/2019 17:29:53

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\... \USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx9.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.600	827738	Azadiractina	53.729	mg/L
Total		827738			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx9.lcd

Figura n.º 26: Reporte de muestra 10 del método por Fluidos Supercríticos

30/10/2019 16:57:40 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx10.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : ScMx8
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : ScMx10.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 25/10/2019 10:27:00
Data Processed : 30/10/2019 16:56:05

Cromatograma

Extracción con Fluídos Supercríticos
azadiractina

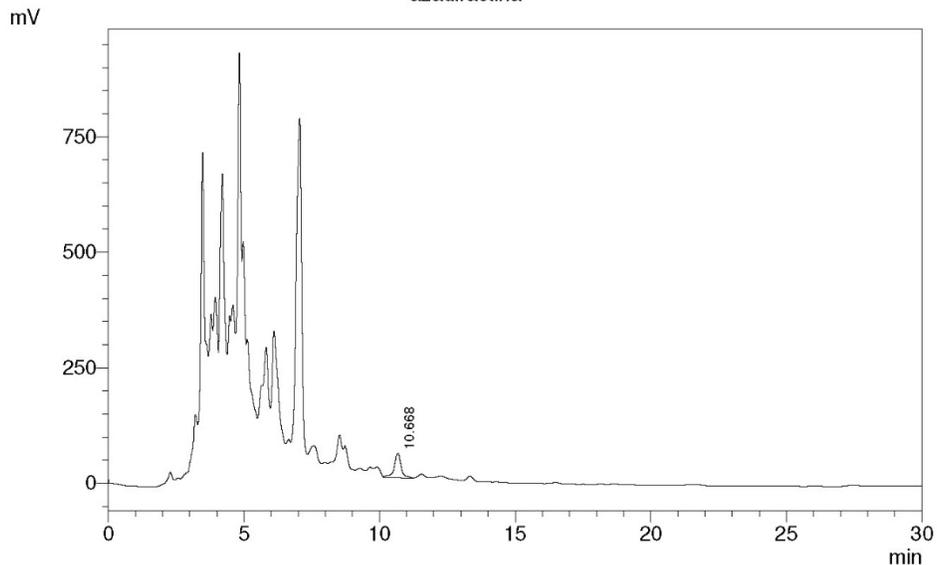


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx10.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.668	945134	Azadiractina	61.398	mg/L
Total		945134			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\ScMx10.lcd

Figura n.º 27: Reporte de muestra 1 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:27:20 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx1.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx1
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx1.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 8:27:12
Data Processed : 30/10/2019 16:13:04

Cromatograma

Extracción con Soxhlet
azadiractina

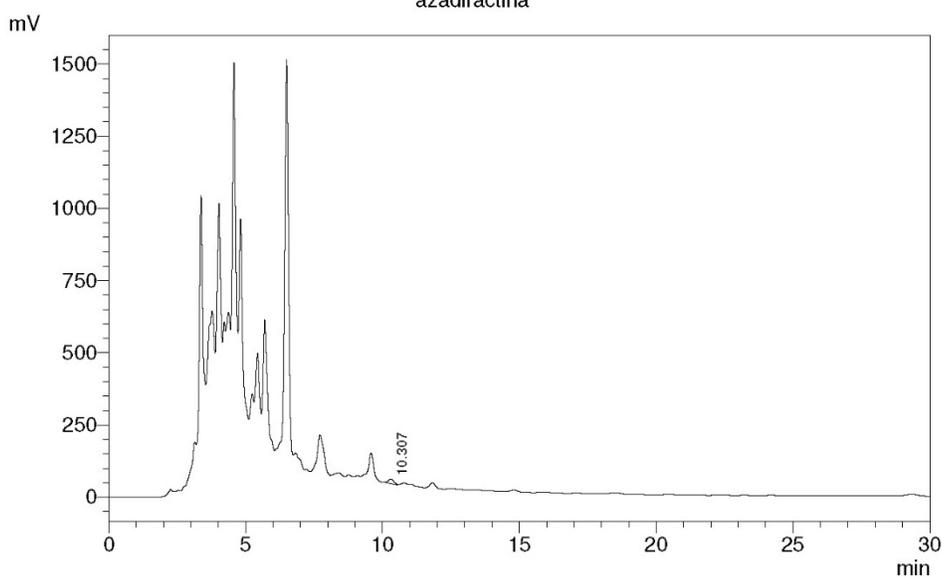


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx1.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.307	228829	Azadiractina	14.602	mg/L
Total		228829			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx1.lcd

Figura n.º 28: Reporte de muestra 2 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:28:37 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMIN LABIN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx2.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx2
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx2.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 10:04:15
Data Processed : 30/10/2019 16:15:08

Cromatograma

Extracción con Soxhlet
azadiractina

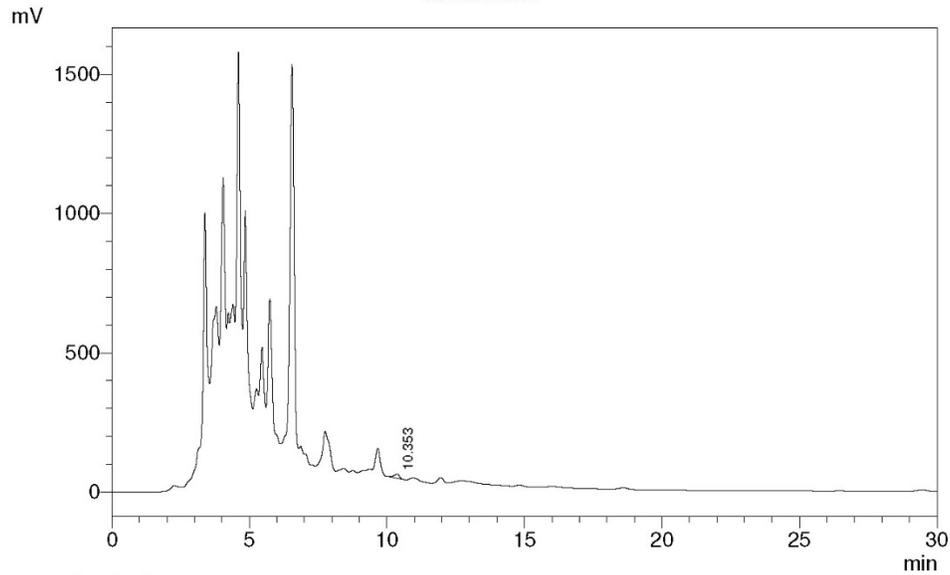


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx2.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.353	226246	Azadiractina	14.433	mg/L
Total		226246			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx2.lcd

Figura n.º 29: Reporte de muestra 3 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:35:29 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMIN LABIN

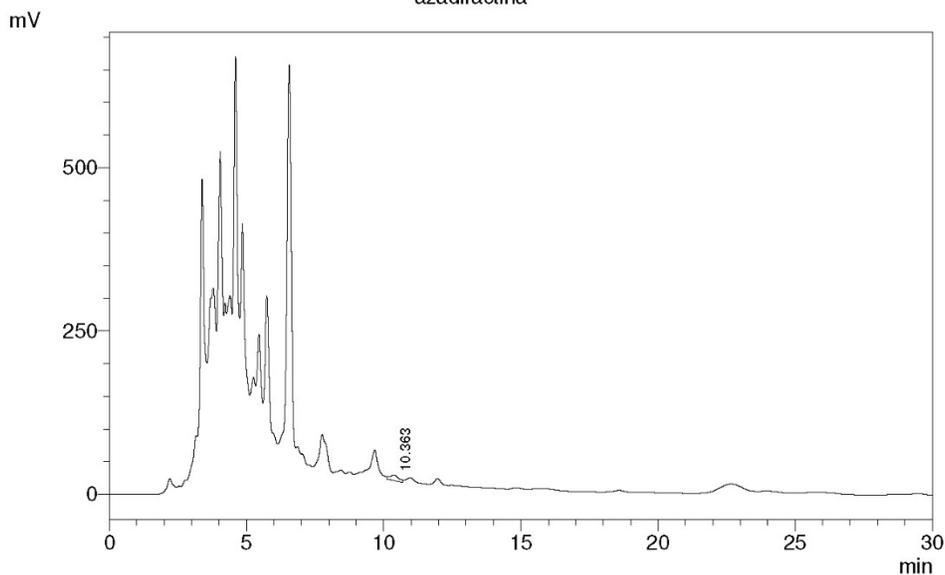
EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx3.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx3
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx3.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 10:37:47
Data Processed : 30/10/2019 16:35:03

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina



1 azadiractina /214nm

Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx3.lcd

Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.363	200956	Azadiractina	12.781	mg/L
Total		200956			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx3.lcd

Figura n.º 30: Reporte de muestra 4 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:07:50 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
 DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
 TESIS FERMÍN LABÍN
 EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx4.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : azadiractina
 Sample ID : SxMx4
 Tray# : 0
 Vial # : 0
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : SxMx4.lcd
 Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
 Batch File Name :
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 23/10/2019 11:09:20
 Data Processed : 30/10/2019 16:07:30

Cromatograma

Extracción con Soxhlet
 azadiractina

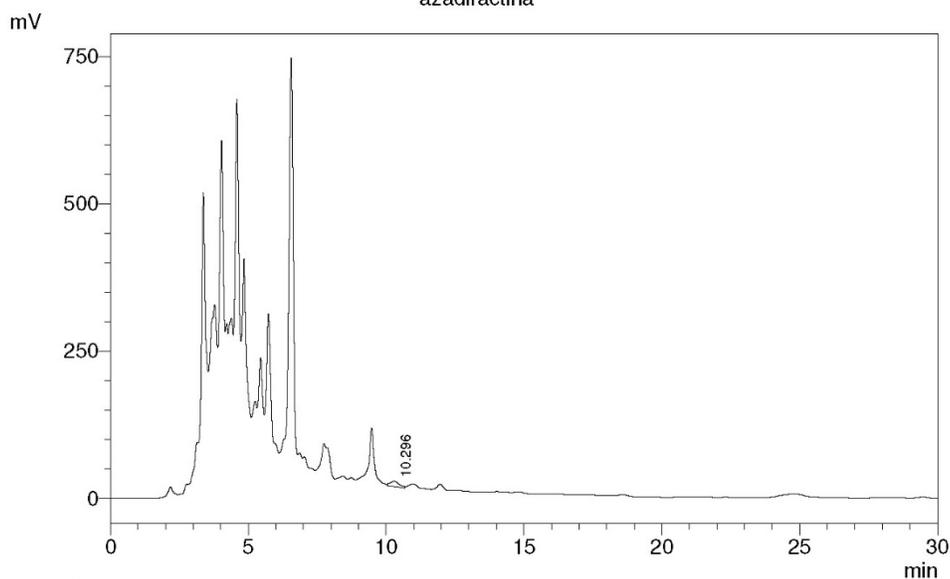


Tabla de Resultados C:\... \USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx4.lcd
 Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.296	218502	Azadiractina	13.927	mg/L
Total		218502			

Figura n.º 31: Reporte de muestra 5 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:38:44 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx5.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx5
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx5.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 11:41:00
Data Processed : 30/10/2019 16:12:10

Cromatograma

Extracción con Fluídos Supercríticos
azadiractina

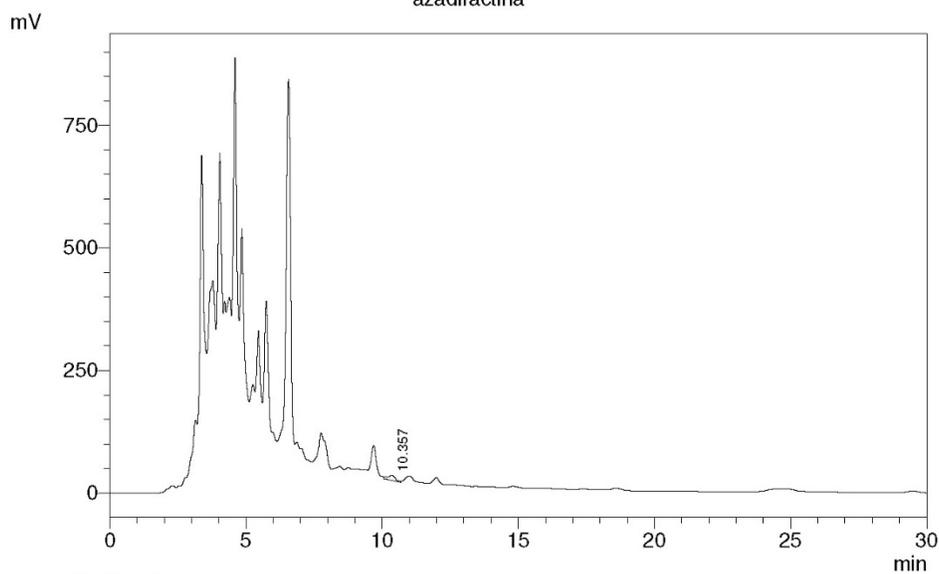


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx5.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.357	208525	Azadiractina	13.276	mg/L
Total		208525			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx5.lcd

Figura n.º 32: Reporte de muestra 6 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:43:48 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx6.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx6
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx6.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 12:12:55
Data Processed : 30/10/2019 16:43:01

Cromatograma

Extracción con Fluídos Supercríticos
azadiractina

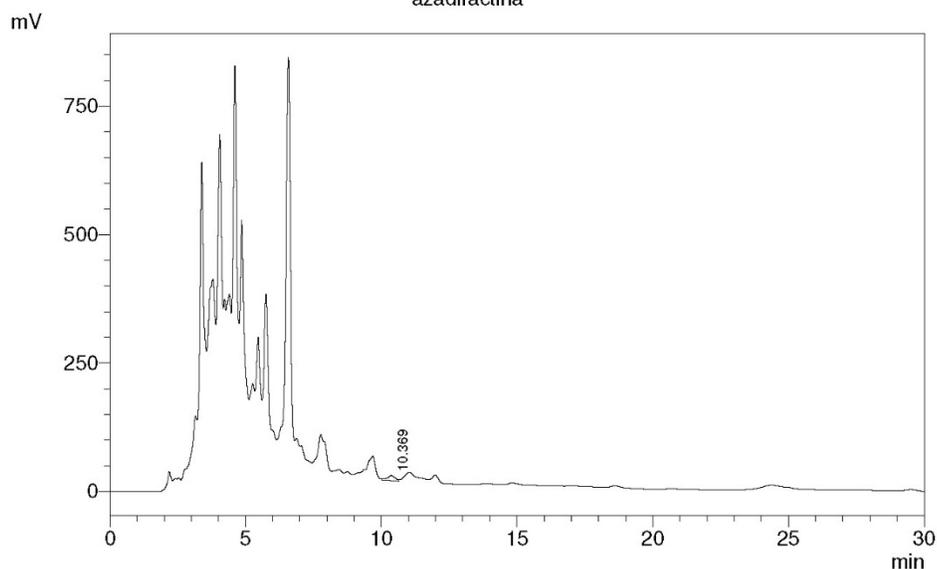


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx6.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.369	208156	Azadiractina	13.251	mg/L
Total		208156			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx6.lcd

Figura n.º 33: Reporte de muestra 7 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:48:45 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx7.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx7
Tray# : 0
Vial # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx7.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 12:44:54
Data Processed : 30/10/2019 16:47:02

Cromatograma

Extracción con Fluídos Supercríticos
azadiractina

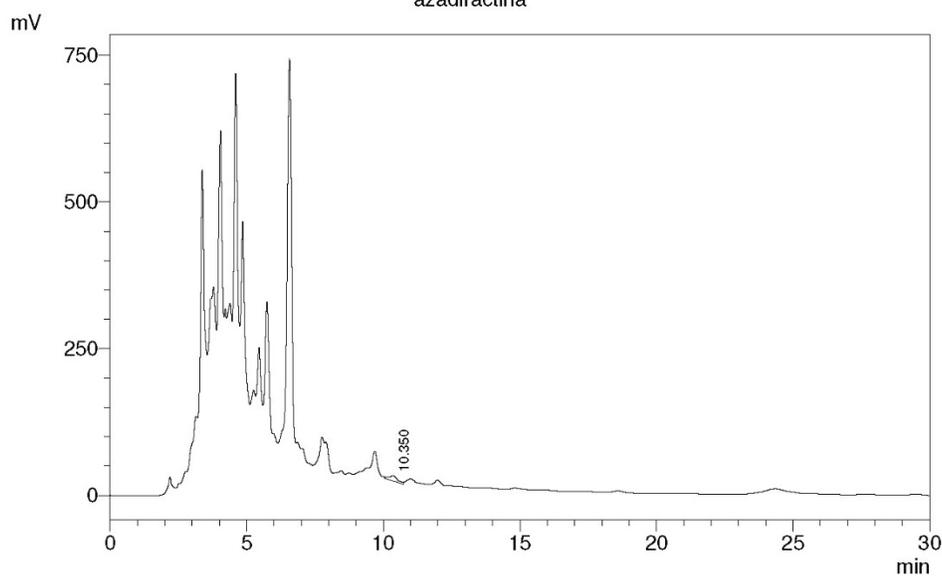


Tabla de Resultados C:\... \USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx7.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.350	195714	Azadiractina	12.439	mg/L
Total		195714			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx7.lcd

Figura n.º 34: Reporte de muestra 8 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:50:19 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMIN LABIN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx8.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx8
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx8.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 13:20:19
Data Processed : 30/10/2019 16:50:04

Cromatograma

Extracción con Fluidos Supercríticos
azadiractina

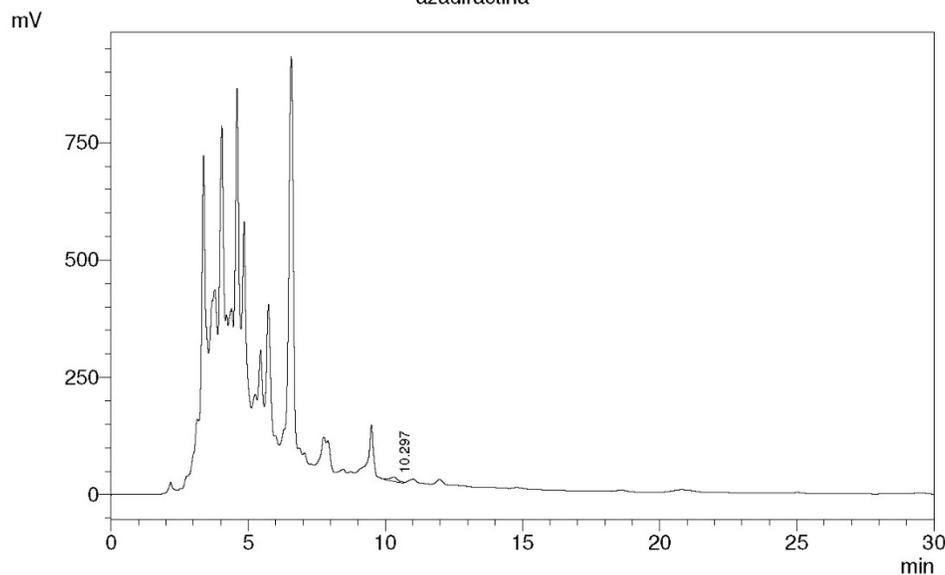


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx8.lcd

Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.297	210459	Azadiractina	13.402	mg/L
Total		210459			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx8.lcd

Figura n.º 35: Reporte de muestra 9 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:51:40 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx9.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx9
Tray# : 0
Vial # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx9.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 13:53:03
Data Processed : 30/10/2019 16:51:24

Cromatograma

Extracción con Fluídos Supercríticos
azadiractina

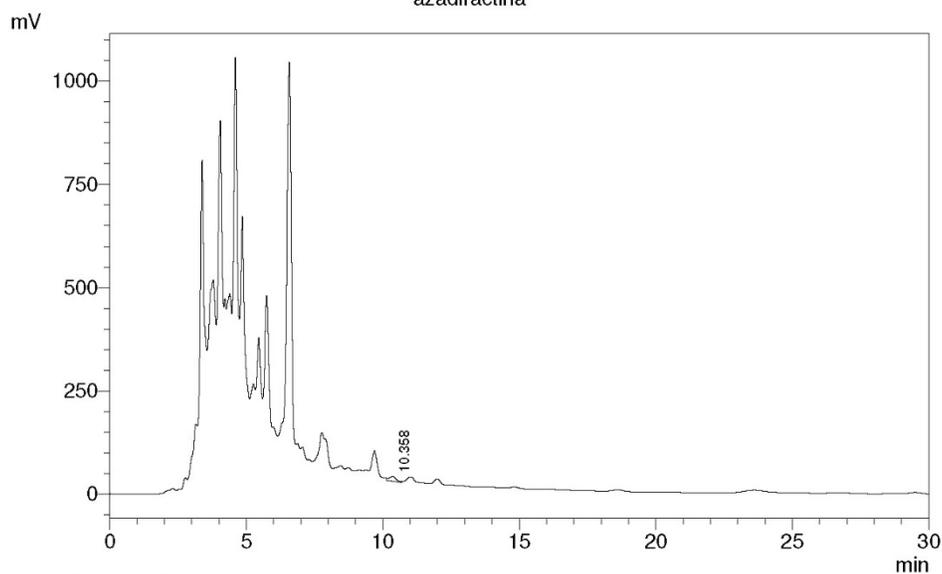


Tabla de Resultados C:\... \USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx9.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.358	211920	Azadiractina	13.497	mg/L
Total		211920			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx9.lcd

Figura n.º 36: Reporte de muestra 10 del método por Soxhlet

30/10/2019 16:54:34 1 / 2

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report =====

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS APLICADO
TESIS FERMÍN LABÍN

EVALUACIÓN DE DOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE AZADIRACTINA EN SEMILLAS DEL ÁRBOL DEL PARAÍSO

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx10.lcd

Acquired by : Admin
Sample Name : azadiractina
Sample ID : SxMx10
Tray# : 0
Vail # : 0
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : SxMx10.lcd
Method File Name : Curva Azadiractina.lcm
Batch File Name :
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 23/10/2019 14:25:37
Data Processed : 30/10/2019 16:54:12

Cromatograma

Extracción con Fluídos Supercríticos
azadiractina

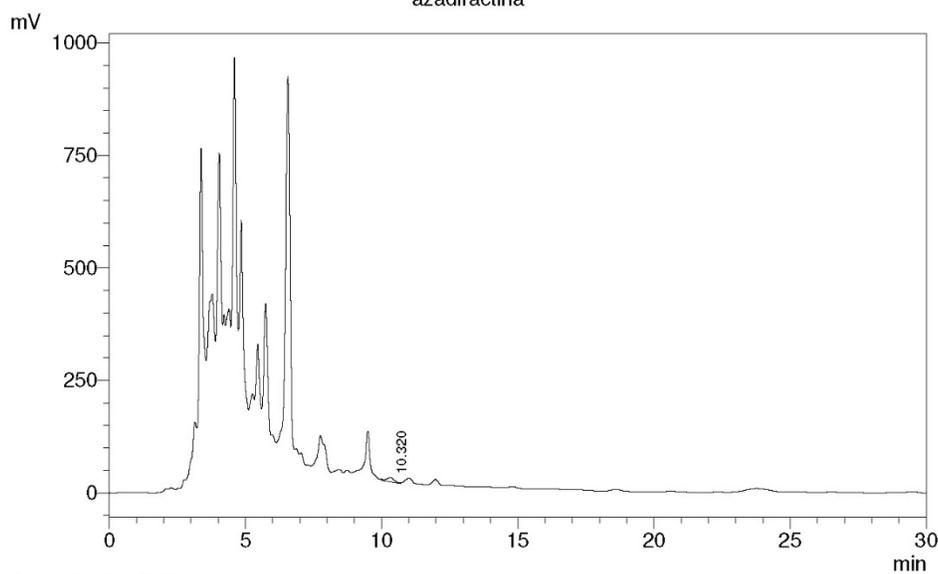


Tabla de Resultados C:\...USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx10.lcd
Detector A Ch1 214nm

Peak#	Ret. Time	Area	Name	Conc.	Units
1	10.320	207811	Azadiractina	13.229	mg/L
Total		207811			

C:\Documents and Settings\USAC\Mis documentos\TESIS\AZADIRACTINA\Limpios\SxMx10.lcd

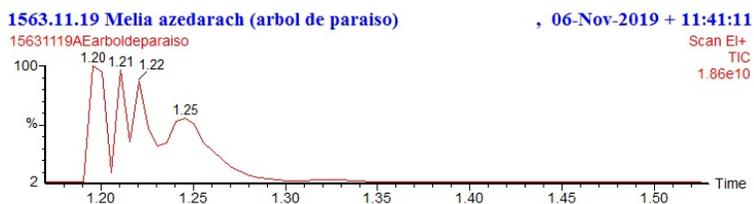
E. Espectros de fraccionamiento de aceite esencial en GC-MS /HS-GC-MS

Figura n.º 37: Espectro de fraccionamiento GC-MS de aceite esencial de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

Cromatograma



Cromatograma agrandado

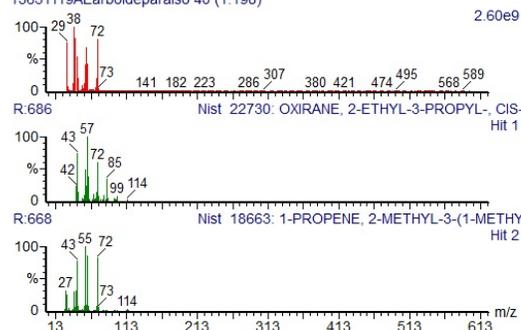


Cromatograma de la muestra líquida con split 20:1 las sustancias identificadas por esta técnica no deben ser extremadamente volátiles.

Espectro de iones y posibles sustancias presentes inyección directa del líquido en los tiempos de retención de 1.198 y 1.213 min.

1563.11.19 *Melia azedarach* (arbol de paraiso)

15631119AEarboldeparaiso 40 (1.198)

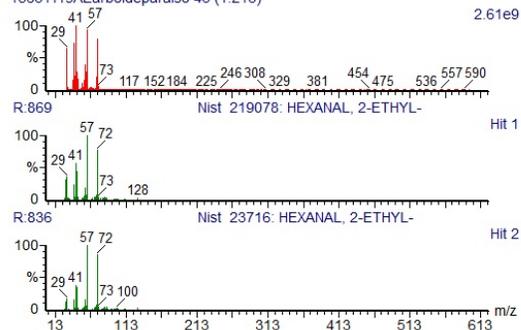


1563.11.19 *Melia azedarach* (arbol de paraiso)

Hit	REV	for	Compound Name
1	686	495	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, CIS-
2	668	585	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHOXY)-
3	652	560	1-PROPENE, 2-METHYL-3-PROPOXY-
4	649	444	HEXANAL, 2-ETHYL-
5	645	464	ORTHOFORMIC ACID, TRI-2-BUTENYL ESTER
6	636	562	4-CYCLOPENTENE-1,3-DIOL, TRANS-
7	632	552	2-BUTENE, 1-PROPOXY-
8	623	408	N-ISOPROPYLIDENE-HEXADECANO-HYDRAZIDE
9	623	421	4-BUTOXY-2-BUTANONE
10	621	444	OXIRANE, 2-METHYL-3-PROPYL-, CIS-
11	619	434	1,2,4-CYCLOPENTANETRIOL
12	613	540	6-OXA-BICYCLO[3.1.0]HEXAN-3-OL
13	610	316	Aceprometazine-Ni -H2O P962
14	607	521	BUTANE, 1-[(2-METHYL-2-PROPENYL)OXY]-
15	607	530	4-CYCLOPENTENE-1,3-DIOL, TRANS-
16	606	530	2-BUTENE, 1-PROPOXY-, (E)-
17	604	401	1-NONEN-3-OL
18	604	431	OXIRANE, 2,3-BIS(1-METHYLETHYL)-, TRANS-
19	595	499	1,3-PROPANEDIOL, 2-(HYDROXYMETHYL)-2-METHYL-
20	592	379	DIMEPHEPTANOL

1563.11.19 *Melia azedarach* (arbol de paraiso)

15631119AEarboldeparaiso 43 (1.213)

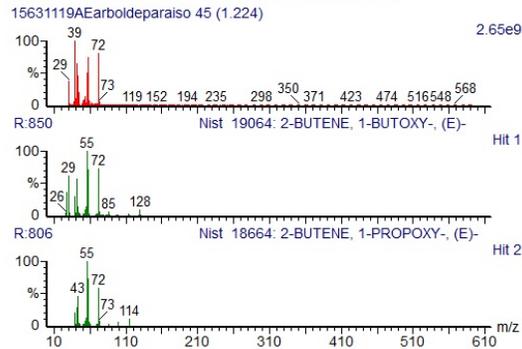


1563.11.19 *Melia azedarach* (arbol de paraiso)

Hit	REV	for	Compound Name
1	869	853	HEXANAL, 2-ETHYL-
2	836	816	HEXANAL, 2-ETHYL-
3	834	582	PROPANEDIOIC ACID, OXO-, BIS(2-METHYLPROPYL)
4	823	737	HEXANAL, 2-ETHYL-
5	822	766	1,3-PROPANEDIOL, 2-(HYDROXYMETHYL)-2-METHYL-
6	822	783	BUTANE, 1-[(2-METHYL-2-PROPENYL)OXY]-
7	821	632	DIAZENE, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)-
8	815	636	OXIRANE, (2,2-DIMETHYLPROPYL)-
9	815	798	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHOXY)-
10	812	775	1-PROPENE, 2-METHYL-3-PROPOXY-
11	807	770	HEXANAL, 2-ETHYL-
12	807	787	2-BUTENE, 1-PROPOXY-
13	807	793	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, TRANS-
14	793	741	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (Z)-
15	787	337	Isooctane P197
16	785	772	OXIRANE, 2-METHYL-3-PROPYL-, TRANS-
17	784	643	5-Methyl-1-hexene P191
18	784	732	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (E)-
19	776	759	HEPTANE, 1-(2-BUTENYLOXY)-, (E)-
20	774	598	HEPTANE, 1-(2-PROPENYLOXY)-

Figura n.º 38: Espectro de fraccionamiento GC-MS de aceite esencial de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

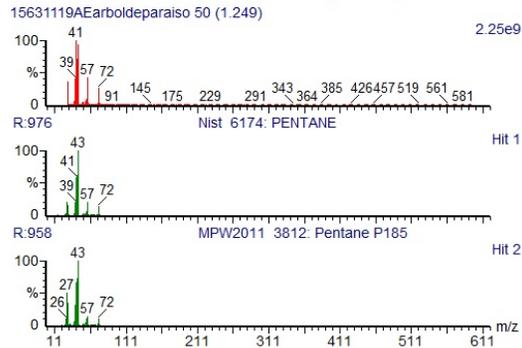
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso)



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso)

Hit	REV	for	Compound Name
1	869	853	HEXANAL, 2-ETHYL-
2	836	816	HEXANAL, 2-ETHYL-
3	834	582	PROPANEDIOIC ACID, OXO-, BIS(2-METHYLPROPYL)-
4	823	737	HEXANAL, 2-ETHYL-
5	822	766	1,3-PROPANEDIOL, 2-(HYDROXYMETHYL)-2-METHYL-
6	822	783	BUTANE, 1-[(2-METHYL-2-PROPENYL)OXY]-
7	821	632	DIAZENE, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)-
8	815	636	OXIRANE, (2,2-DIMETHYLPROPYL)-
9	815	798	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHOXY)-
10	812	775	1-PROPENE, 2-METHYL-3-PROPOXY-
11	807	770	HEXANAL, 2-ETHYL-
12	807	787	2-BUTENE, 1-PROPOXY-
13	807	793	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, TRANS-
14	793	741	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (Z)-
15	787	337	Isooctane P197
16	785	772	OXIRANE, 2-METHYL-3-PROPYL-, TRANS-
17	784	643	5-Methyl-1-hexene P191
18	784	732	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (E)-
19	776	759	HEPTANE, 1-(2-BUTENYLOXY)-, (E)-
20	774	598	HEPTANE, 1-(2-PROPENYLOXY)-

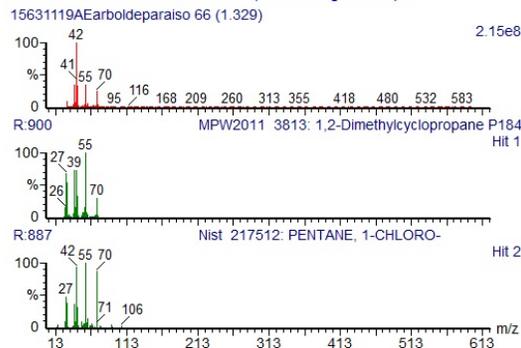
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso)



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso)

Hit	REV	for	Compound Name
1	876	875	PENTANE
2	958	952	Pentane P185
3	954	953	BUTANE, 2-METHYL-
4	947	946	BUTANE, 2-METHYL-
5	833	733	2-Methyl-1-propanol (isobutanol) P186
6	819	819	2-Methylpentane P189
7	796	734	2-Methylhexane P192
8	791	791	PENTANE
9	784	768	Hexane P189
10	767	710	Nonane P204
11	753	742	3-Methylpentane P189
12	753	749	HEXANAL, 2-ETHYL-
13	745	744	2-Methylbutane P185
14	729	722	3-Methylhexane P192
15	727	723	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, TRANS-
16	721	716	Tetrahydrofuran P185
17	720	716	OXIRANE, 2-METHYL-3-PROPYL-, TRANS-
18	718	655	Amylnitrite P198
19	717	659	MONOCHLOROMETHYL ISOPENTANOATE
20	691	691	BUTANE, 2,2-DIMETHYL-

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso)



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso)

Hit	REV	for	Compound Name
1	900	890	1,2-Dimethylcyclopropane P184
2	887	868	PENTANE, 1-CHLORO-
3	865	774	Pentane P185
4	800	797	2-Methylpentane P189
5	791	759	2H-PYRAN-2-ONE, TETRAHYDRO-4-METHYL-
6	762	759	PENTANE
7	744	730	2-Methyl-2-butene P184
8	737	615	2-Methyl-1-propanol (isobutanol) P186
9	736	716	Cyclohexanone P191
10	722	719	BUTANE, 2-METHYL-
11	713	664	METHANAMINE, N-BUTYLIDENE-
12	703	630	Tetrahydrofuran P185
13	693	521	GHB -H2O P189
14	680	648	3-METHYL-3-ISOPROPYLDIAZIRIDINE
15	668	561	Pyrrolidine @P184
16	664	642	HEXANE, 2,3-DIMETHYL-
17	661	650	3-Methylhexane P192
18	661	651	OXETANE, 2-(1,1-DIMETHYLETHYL)-3-METHYL-
19	659	655	HEXANE, 2,3-DIMETHYL-
20	656	572	Aminoethanol P184

Espectro de iones y posibles sustancias presentes en la muestra inyección directa del líquido split 20:1 en los tiempos de retención de 1.224, 1.249 y 1.329 min.

Figura n.º 39: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátiles de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

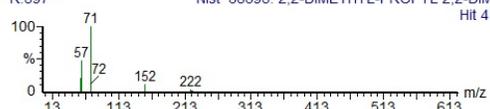
15631120AEarboldeparaísoHS 179 (0.994) 2.55e9



R:615 MPW2011 160: Butylhexadecanoate P821 Hit 3



R:597 Nist 35395: 2,2-DIMETHYL-PROPYL 2,2-DIM Hit 4



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

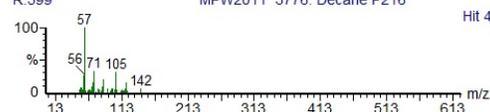
15631120AEarboldeparaísoHS 158 (0.889) 3.27e9



R:619 Nist 14276: 2-THIOPHENECARBOXYLIC ACID Hit 3



R:599 MPW2011 3776: Decane P216 Hit 4



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

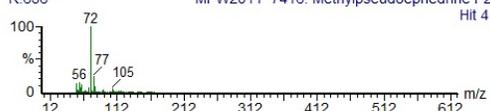
15631120AEarboldeparaísoHS 181 (1.004) 3.19e9



R:663 Nist 221693: METAMFEPRAMONE Hit 3



R:656 MPW2011 7416: Methylpseudoephedrine P2 Hit 4



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
1	681	401	Isooctane P197
2	628	372	Undecane P232
3	615	318	Butylhexadecanoate P821
4	597	309	2,2-DIMETHYL-PROPYL 2,2-DIMETHYL-PROPAN
5	595	455	2-THIOPHENECARBOXYLIC ACID, 5-(1,1-DIMET
6	585	347	SYDNONE, 3-NEOPENTYL-
7	564	453	ORTHOFORMIC ACID, TRI-2-BUTENYL ESTER
8	563	452	1,3-BUTANEDIAMINE
9	562	510	2-PROPENAMIDE, N-(HYDROXYMETHYL)-
10	561	328	Tetradecane P317
11	553	510	6-OXA-BICYCLO[3.1.0]HEXAN-3-OL
12	538	374	1,1-(DIETHYL-CARBAMOYL)SUCCINIMIDE
13	531	306	MANGANESE, TETRACARBONYL(N,N-DIMETHYL
14	527	466	1,3-HEXANEDIOL, 2-ETHYL-
15	521	470	2-BUTENE, 1-BUTOXY-, (E)-
16	520	384	1-BUTANOL, 4-BUTOXY-
17	517	308	Tridecane P285
18	516	339	Decane P216
19	514	451	BUTANE, 1-[(2-METHYL-2-PROPENYL)OXY]-
20	514	466	3-(PROP-2-ENOYLOXY)DODECANE

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

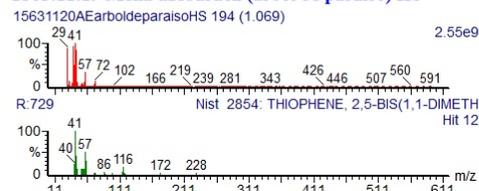
Hit	REV	for	Compound Name
1	818	365	Isooctane P197
2	725	343	Undecane P232
3	619	416	2-THIOPHENECARBOXYLIC ACID, 5-(1,1-DIMET
4	599	308	Decane P216
5	599	418	1,3-BUTANEDIAMINE
6	570	387	CYCLOPENTANOL, 2-METHYL-, CIS-
7	570	395	ORTHOFORMIC ACID, TRI-2-BUTENYL ESTER
8	565	343	GUANIDINE, N,N,N',N'-TETRAMETHYL-
9	561	390	CYCLOPENTANOL, 2-METHYL-, TRANS-
10	553	368	2-METHYLMALONODIAMIDE
11	548	538	6-OXA-BICYCLO[3.1.0]HEXAN-3-OL
12	538	364	1,2,4-CYCLOPENTANETRIOL
13	496	328	1-BUTANOL, 4-BUTOXY-
14	489	341	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, CIS-
15	476	457	CYCLOPENTANOL, 2-METHYL-
16	462	452	CYCLOPENTANOL, 3-METHYL-
17	452	448	4-CYCLOPENTENE-1,3-DIOL, TRANS-
18	448	435	CYCLOPENTANOL, 2-METHYL-, CIS-
19	447	435	CYCLOPENTANOL, 2-METHYL-
20	437	422	3-(PROP-2-ENOYLOXY)DODECANE

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
1	760	307	Bambuterol -C2H8 AC P935
2	688	307	MBDB P338
3	663	420	METAMFEPRAMONE
4	656	324	Methylpseudoephedrine P271
5	643	536	3-AMINO-2,4-DIMETHYLPENTANE
6	637	325	Metamfepramone P264
7	634	348	Mephentermine P239
8	629	423	2-METHYLMALONODIAMIDE
9	628	351	Methylphenidine @P271
10	624	442	CYCLOHEXANEMETHANAMINE, N-PROPYL-
11	623	325	Aceprometazine-M -H2O P962
12	621	321	Dimetamfetamine P239
13	615	360	Prenalterol P401
14	615	499	VALINE
15	611	395	METAMFEPRAMONE
16	610	304	Betaxolol -H2O P696
17	605	383	METAMFEPRAMONE
18	594	309	Atenolol P577
19	588	403	2-THIOPHENECARBOXYLIC ACID, 5-(1,1-DIMETI
20	584	362	(1-ETHYL-2-METHYLPROPYL)METHYLAMINE

Figura n.º 40: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátiles de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

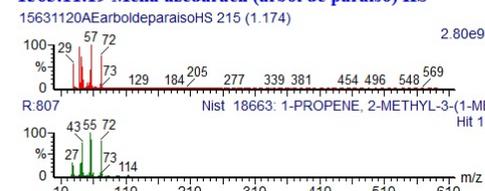
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
11	733	705	2-Methylhexane P192
12	729	687	THIOPHENE, 2,5-BIS(1,1-DIMETHYLETHOXY)
13	726	720	1,2-Dimethylcyclopropane P184
14	704	701	2-Methylbutane P185
15	704	546	MONOCHLOROMETHYL ISOPENTANOATE
16	702	695	3-Methylhexane P192
17	701	675	Nonane P204
18	694	651	N-HEXANESULPHONYLACETONITRILE
19	692	588	BUTANE, 1-BROMO-2-METHYL-, (S)-
20	692	637	BUTANOIC ACID, 4-HYDROXY-

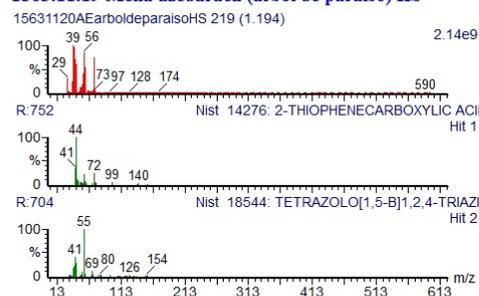
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
1	807	665	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHOXY)
2	779	617	1-PROPENE, 2-METHYL-3-PROPOXY-
3	763	348	Isooctane P197
4	756	560	HEXANAL, 2-ETHYL-
5	756	621	2-BUTENE, 1-PROPOXY-
6	735	603	2-BUTENE, 1-PROPOXY-, (E)-
7	730	607	6-OXA-BICYCLO[3.1.0]HEXAN-3-OL
8	721	595	HEXANAL, 2-ETHYL-
9	718	577	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, CIS-
10	714	544	1,3-PROPANEDIOL, 2-(HYDROXYMETHYL)-2-

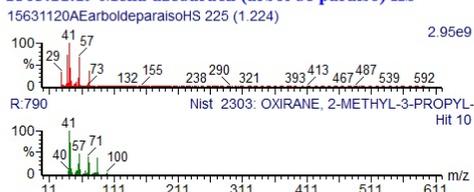
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
1	752	611	2-THIOPHENECARBOXYLIC ACID, 5-(1,1-DIMETHYLETHOXY)
2	704	565	TETRAZOLO[1,5-B]1,2,4-TRIAZINE, 5,6,7,8-TETRAHYDRO-
3	685	592	5-Methyl-1-hexene P191
4	676	517	1,3-Dimethylcyclopentane P191
5	648	541	Cyclohexane P188
6	648	531	OXIRANE, PROPYL-
7	634	453	Geranamine @P197
8	630	500	1-BUTANOL, 4-BUTOXY-
9	628	517	1,3-DIMETHYLDIAZIRIDINE
10	615	601	3-(PROP-2-ENOYL)OXYDODECANE
11	603	515	2-TRIFLUOROACETOXYDODECANE
12	600	509	3-Methylpentane P189
13	595	453	BUTANOIC ACID, 4-HYDROXY-
14	591	583	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, TRANS-
15	582	525	OXIRANE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHYL)-
16	582	574	OXIRANE, 2-METHYL-3-PROPYL-, TRANS-
17	581	550	1-PIPERAZINECARBOXYALDEHYDE

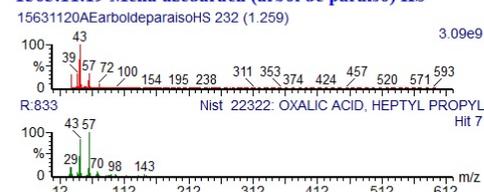
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
9	793	772	Hexane P189
10	790	721	OXIRANE, 2-METHYL-3-PROPYL-, TRANS-
11	788	689	Amylnitrile P198
12	785	684	OXIRANE, (2,2-DIMETHYLPROPYL)-
13	772	782	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHOXY)
14	768	682	2-Methylhexane P192
15	754	639	2H-PYRAN, 2-(1,1-DIMETHYLETHOXY)TETRAHYDRO-
16	753	753	BUTANE, 2,2-DIMETHYL-
17	753	741	2-BUTENE, 1-BUTOXY-, (E)-
18	753	631	1-PROPENE, 3-(1,1-DIMETHYLETHOXY)-

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

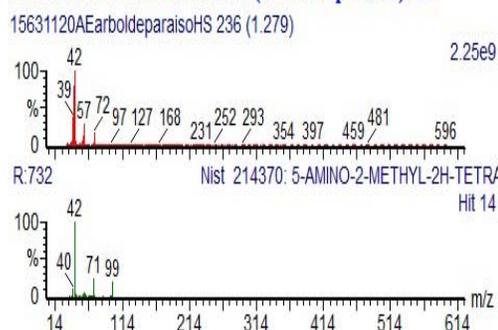


1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
1	947	946	PENTANE
2	940	939	BUTANE, 2-METHYL-
3	931	924	Pentane P185
4	927	926	BUTANE, 2-METHYL-
5	836	755	HEPTANE, 4-AZIDO-
6	833	820	Hexane P189
7	833	780	OXALIC ACID, HEPTYL PROPYL ESTER
8	828	793	PENTANE, 2,4-DIMETHYL-
9	828	805	PENTANE, 2,4-DIMETHYL-
10	821	746	2-Methyl-1-propanol (isobutanol) P186

Figura n.º 41: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátiles de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

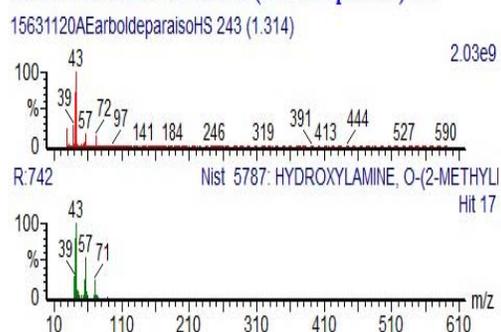
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
10	779	773	PROPANAL, 2-METHYL-
11	769	762	Tetrahydrofuran P185
12	758	737	Hexane P189
13	738	733	2-Methylbutane P185
14	732	545	5-AMINO-2-METHYL-2H-TETRAZOLE
15	731	727	1,2-Dimethylcyclopropane P184
16	731	691	Nonane P204
17	730	721	1,3-DIOXOLANE, 4-ETHYL-
18	726	720	BUTANAL, 2-ETHYL-
19	721	704	3-Methylpentane P189
20	720	715	1,3-Dioxolane, 4-ethyl-

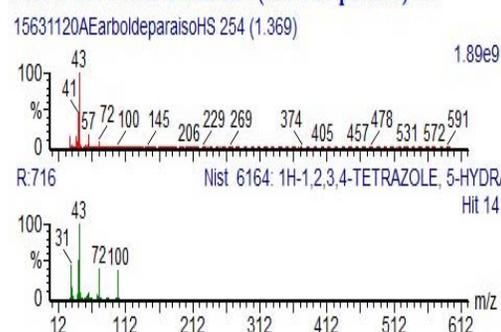
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
11	764	756	Hexane P189
12	761	724	PENTANE, 2,4-DIMETHYL-
13	760	755	BUTANAL, 2-ETHYL-
14	760	695	HEPTANE, 4-AZIDO-
15	754	741	PENTANE, 2,4-DIMETHYL-
16	751	713	HEXANE, 1-(ETHENYLOXY)-
17	742	736	HYDROXYLAMINE, O-(2-METHYLPROPYL)-
18	739	736	2-Methylbutane P185
19	730	695	Nonane P204
20	726	722	3-Methylhexane P192

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

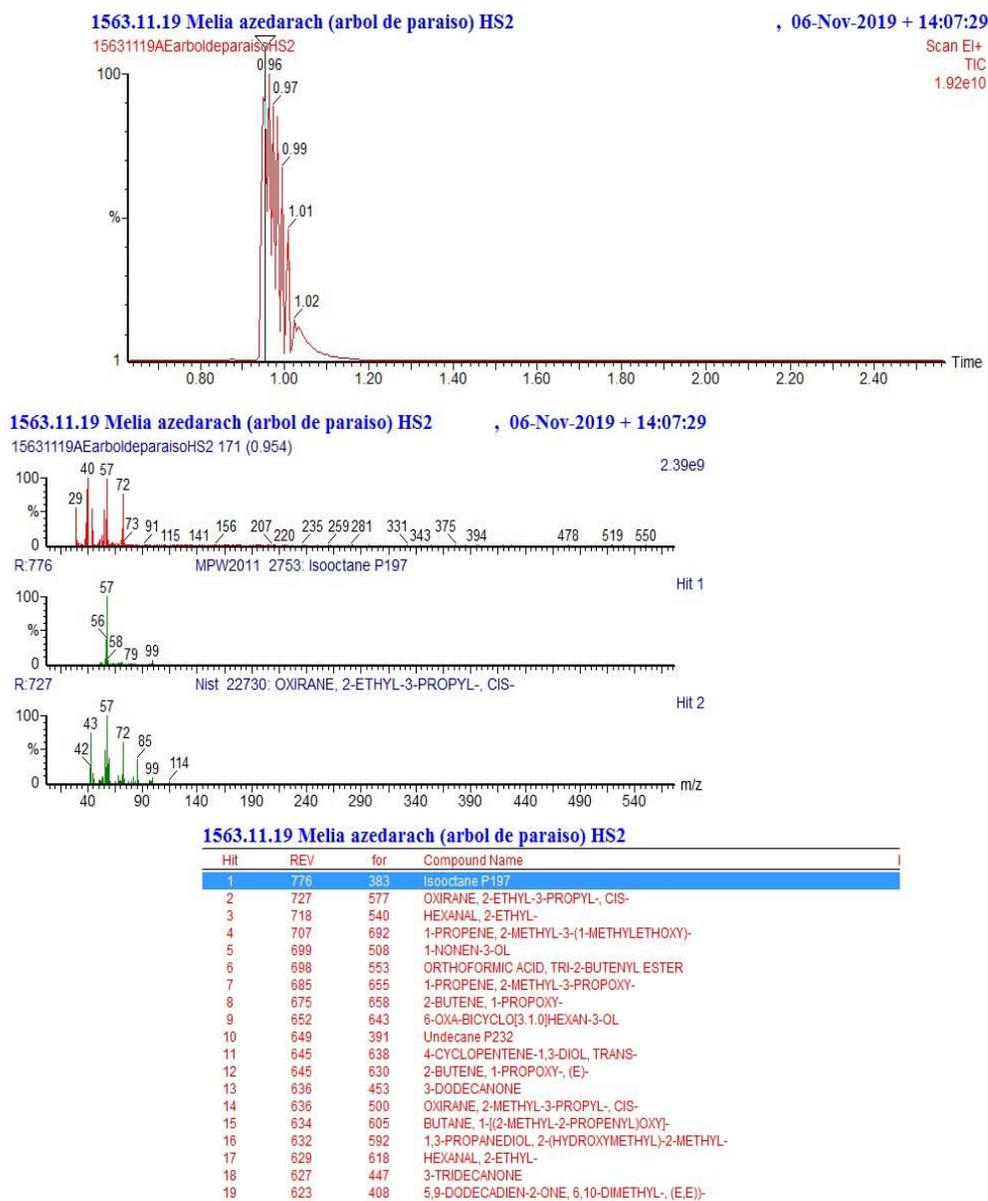


1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name
10	724	696	N-HEXANESULFONYLACETONITRILE
11	721	698	Nonane P204
12	720	718	2-Methylbutane P185
13	717	714	3-Methylhexane P192
14	716	713	1H-1,2,3,4-TETRAZOLE, 5-HYDRAZINO-
15	716	711	NITROXIDE, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)
16	708	682	2-Methylpropane P183
17	700	361	GHB -H2O P189
18	689	661	1H-1,2,3,4-TETRAZOL-5-AMINE, 1-METHYL-
19	685	657	Pyrrrolidine @P184
20	685	657	Pyrrrolidine @P184

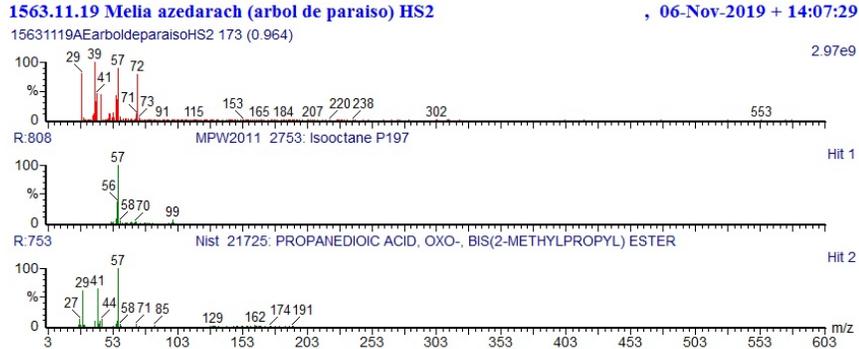
Figura n.º 42: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátiles de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

Cromatograma de la extracción de muestra por espacio de cabeza(SH) split 20:1 específico para analitos volátiles.



Espectro de iones y resultado de las posibles sustancias presentes en el tiempo de retención de 0.95 min. extracción espacio de cabeza. Comparación con la librería disponible en el equipo presentando porcentajes de parecido desde 62.3 hasta 77.6 siendo este último la probabilidad más alta.

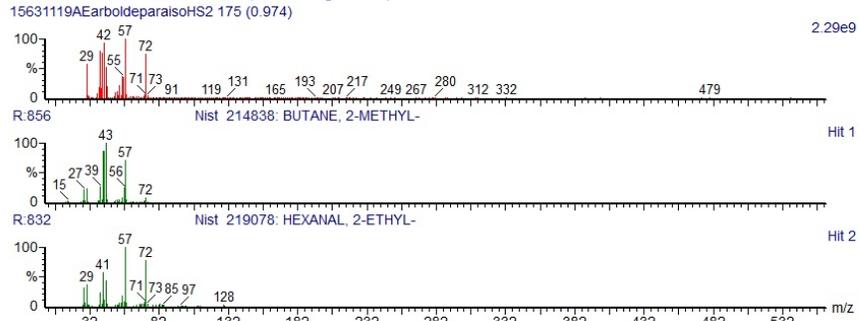
Figura n.º 43: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátiles de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2

Hit	REV	for	Compound Name	M.W.	Formula
1	808	404	Isooctane P197	114	C8H18
2	753	471	PROPANEDIOIC ACID, OXO-, BIS(2-METHYLPROPYL) ESTER	230	C11H18O5
3	743	700	BUTANE, 1-[2-METHYL-2-PROPENYL]OXY-	128	C8H16O
4	721	697	2-BUTENE, 1-BUTOXY-, (E)-	128	C8H16O
5	695	682	HEXANAL, 2-ETHYL-	128	C8H16O
6	694	591	HEXANAL, 2-ETHYL-	128	C8H16O
7	693	467	DIAZENE, BIS(1,1-DIMETHYLETHYL)-	142	C8H18N2
8	684	473	CYCLOHEXANEMETHANAMINE, N-PROPYL-	155	C10H21N
9	683	607	2-THIOPHENECARBOXYLIC ACID, 5-(1,1-DIMETHYLETHOXY)-	200	C9H12O3S
10	676	638	1-PROPENE, 2-METHYL-3-PROPOXY-	114	C7H14O
11	670	615	1,3-PROPANEDIOL, 2-(HYDROXYMETHYL)-2-METHYL-	120	C5H12O3
12	668	622	VALINE	117	C5H11O2N
13	666	649	2-BUTENE, 1-PROPOXY-	114	C7H14O
14	664	650	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHOXY)-	114	C7H14O
15	661	602	ORTHOFORMIC ACID, TRI-2-BUTENYL ESTER	226	C13H22O3
16	654	617	(E)-BUT-2-ENYL ISOBUTYL CARBONATE	172	C9H16O3
17	649	635	2-HEXEN-1-OL, (E)-	100	C6H12O
18	648	516	5-Methyl-1-hexene P191	98	C7H14
19	644	628	2-BUTENE, 1-PROPOXY-, (E)-	114	C7H14O

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2 , 06-Nov-2019 + 14:07:29



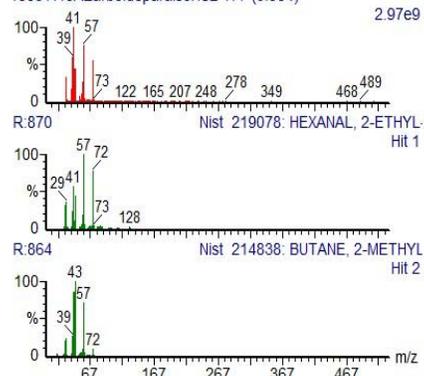
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2 1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS

Hit	REV	for	Compound Name	M.W.	Formula
1	856	854	BUTANE, 2-METHYL-	72	C5H12
2	832	820	HEXANAL, 2-ETHYL-	128	C8H16O
3	824	324	Isooctane P197	114	C8H18
4	823	822	BUTANE, 2-METHYL-	72	C5H12
5	802	800	PENTANE	72	C5H12
6	794	786	Pentane P185	72	C5H12
7	793	781	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHOXY)-	114	C7H14O
8	770	756	2-BUTENE, 1-BUTOXY-, (E)-	128	C8H16O
9	770	760	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, TRANS-	114	C7H14O
10	768	739	Hexane P189	86	C6H14
11	764	721	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (Z)-	170	C11H22O
12	763	655	Nonane P204	128	C9H20
13	762	741	3-Methylpentane P189	86	C6H14
14	754	712	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (E)-	170	C11H22O
15	751	640	5-Methyl-1-hexene P191	98	C7H14
16	751	739	HEPTANE, 1-(2-BUTENYLOXY)-, (E)-	170	C11H22O
17	750	635	4-PENTENAL	84	C5H8O
18	747	635	2-Methylhexane P192	100	C7H16
19	738	608	OXIRANE, (2,2-DIMETHYLPROPYL)-	114	C7H14O

Figura n.º 44: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátiles de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) H

15631119AEarboldeparaísoHS2 177 (0.984) 2.97e9

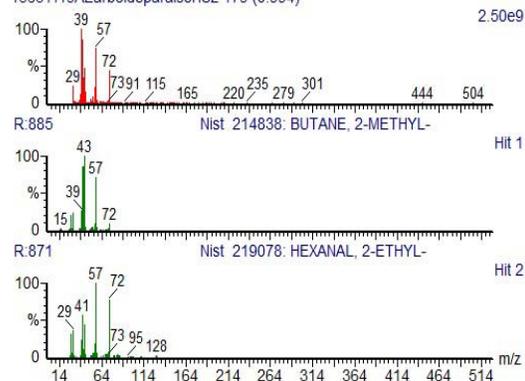


1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2

Hit	REV	for	Compound Name
1	870	859	HEXANAL, 2-ETHYL-
2	864	863	BUTANE, 2-METHYL-
3	827	826	BUTANE, 2-METHYL-
4	825	681	OXALIC ACID, HEPTYL PROPYL ES'
5	822	821	PENTANE
6	817	807	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, TR
7	814	624	PROPANEDIOIC ACID, OXO-, BIS(2-
8	807	800	Pentane P185
9	805	792	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METH
10	791	681	Nonane P204
11	782	772	OXIRANE, 2-METHYL-3-PROPYL-, T
12	780	742	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (Z)-
13	780	773	HYDROPEROXIDE, HEPTYL
14	778	747	(S)-(+)-3-BROMO-2-METHYL-1-PRO
15	777	637	OXALIC ACID, ALLYL HEPTYL ESTE
16	776	645	Amylnitrite P198
17	773	732	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-
18	772	759	OXETANE, 2-PROPYL-
19	770	751	3-Methylpentane P189
20	770	732	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (E)

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2

15631119AEarboldeparaísoHS2 179 (0.994) 2.50e9

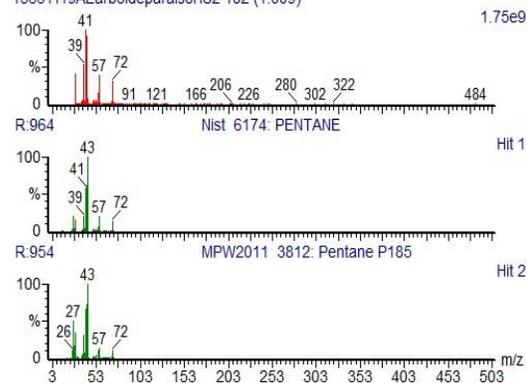


1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2

Hit	REV	for	Compound Name
1	885	883	BUTANE, 2-METHYL-
2	871	861	HEXANAL, 2-ETHYL-
3	849	849	BUTANE, 2-METHYL-
4	846	716	OXALIC ACID, HEPTYL PROPYL ESTER
5	837	836	PENTANE
6	822	655	PROPANEDIOIC ACID, OXO-, BIS(2-METHYLPROPYL)
7	817	812	Pentane P185
8	816	807	OXIRANE, 2-ETHYL-3-PROPYL-, TRANS-
9	809	798	1-PROPENE, 2-METHYL-3-(1-METHYLETHOXY)-
10	802	702	Nonane P204
11	794	771	Hexane P189
12	793	775	3-Methylpentane P189
13	788	779	OXIRANE, 2-METHYL-3-PROPYL-, TRANS-
14	784	658	OXALIC ACID, ALLYL HEPTYL ESTER
15	783	682	PENTANE, 2,4-DIMETHYL-
16	783	772	OXETANE, 2-PROPYL-
17	779	747	HEPTANE, 1-(1-BUTENYLOXY)-, (Z)-
18	779	772	HYDROPEROXIDE, HEPTYL
19	778	766	2-PENTANONE, 3-METHYL-
20	771	657	Amylnitrite P198

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2

15631119AEarboldeparaísoHS2 182 (1.009) 1.75e9



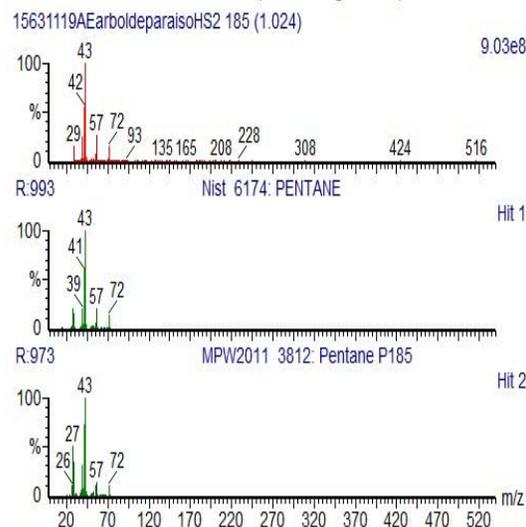
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2

Hit	REV	for	Compound Name
1	964	963	PENTANE
2	954	947	Pentane P185
3	943	942	BUTANE, 2-METHYL-
4	937	937	BUTANE, 2-METHYL-
5	861	845	(S)-(+)-3-BROMO-2-METHYL-1-PROPANOL
6	832	718	2-Methyl-1-propanol (isobutanol) P186
7	820	819	2-Methylpentane P189
8	787	719	2-Methylhexane P192
9	787	787	PENTANE
10	785	781	BUTANE, 2,3-DIMETHYL-
11	772	760	Hexane P189
12	762	754	BUTANAL, 2-ETHYL-
13	762	760	HYDROPEROXIDE, HEPTYL
14	755	749	Tetrahydrofuran P185
15	755	747	HYDROXYLAMINE, O-(2-METHYLPROPYL)-
16	754	692	Nonane P204
17	752	671	OXALIC ACID, HEPTYL PROPYL ESTER
18	749	686	PENTANE, 2,4-DIMETHYL-
19	746	741	HEXANAL, 2-ETHYL-
20	742	736	3-Methylpentane P189

Espectro de iones y posibles sustancias presentes en la muestra en los tiempos de retención específicos de: 0.984, 0.994 y 1.002 minutos, extracción SH Split 20:1

Figura n.º 45: Espectro de fraccionamiento GC-MS en headspace de aceite esencial volátiles de semillas del árbol de Paraíso (*Melia azedarach* Linn.)

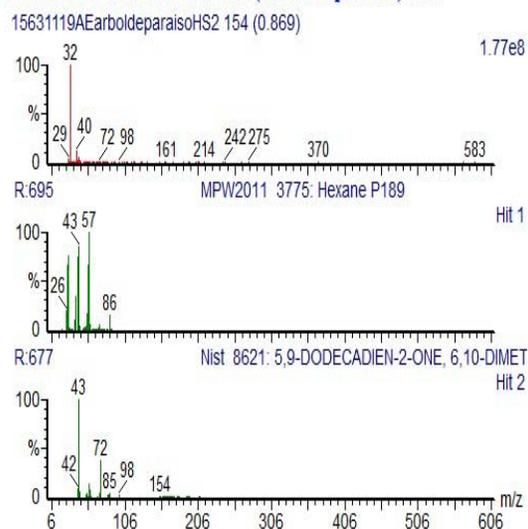
1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2

Hit	REV	for	Compound Name
1	993	993	PENTANE
2	973	964	Pentane P185
3	955	955	BUTANE, 2-METHYL-
4	946	945	BUTANE, 2-METHYL-
5	888	836	PENTANE, 2-METHYL-
6	880	794	2-Methyl-1-propanol (isobutanol) P186
7	856	856	2-Methylpentane P189
8	825	776	BUTANE, 1-CHLORO-3-METHYL-
9	812	812	PENTANE
10	804	723	HEPTANE, 4-AZIDO-
11	802	752	2-Methylhexane P192
12	800	752	BUTANE, 1-CHLORO-3-METHYL-
13	796	779	HEPTANE, 2-METHYL-
14	780	763	HEXANE, 2,5-DIMETHYL-
15	779	770	Hexane P189
16	779	722	OXALIC ACID, HEPTYL PROPYL ESTER
17	774	769	HEPTANE, 2-METHYL-
18	771	768	HEPTANE
19	769	761	HYDROXYLAMINE, O-(2-METHYLPROPYL)-
20	767	720	Nonane P204

1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2



1563.11.19 Melia azedarach (arbol de paraíso) HS2

Hit	REV	for	Compound Name
1	695	338	Hexane P189
2	677	323	5,9-DODECADIEN-2-ONE, 6,10-DIMETHYL-, (E,E)-
3	642	313	OXIRANE, 2-BUTYL-3-METHYL-, CIS-
4	627	306	3-Methylpentane P189
5	599	593	Pentane P185
6	563	558	PENTANE
7	554	548	3-BUTEN-1-OL
8	539	522	2-Methyl-1-propanol (isobutanol) P186
9	528	522	N-NITROSO-2-METHYL-OXAZOLIDINE
10	525	508	2-(4,5-DIHYDRO-3-METHYL-5-OXO-1-PHENYL-4-PYR-
11	523	508	[3,3'-BI-1H-1,2,4-TRIAZOLE]-5,5'-DIAMINE
12	522	518	2-Methylpentane P189
13	516	508	CARBAMOTHIOIC ACID, DIPROPYL-, S-PROPYL ESTE
14	516	511	BUTANE, 2-METHYL-
15	505	492	1,2,4-TRIAZOL-5-ACETIC ACID, 3-AMINO-
16	505	492	1,2,5-OXADIAZOLE-3-CARBOXAMIDE, 4-AMINO-N-(2-A
17	490	483	Aminoethanol P184
18	487	483	Tetrahydrofuran P185
19	484	479	PROPANAL, 2-METHYL-
20	484	472	2-TRIFLUOROACETOXYDODECANE

Espectro de iones y posibles sustancias presentes en los tiempos de retención de 1.024 y 0.869 min. Extracción SH.

F. Certificado de análisis de calidad del estándar de Azadiractina

Figura n.º 46: Certificado de Análisis de Calidad del estándar de Azadiractina

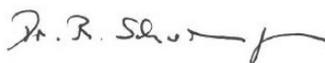
SIGMA-ALDRICH®

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
 Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: AZADIRACTIN
 ~ 95 %
Product Number: A7430
Batch Number: BCBZ5571
Brand: Sigma
CAS Number: 11141-17-6
Formula: $C_{35}H_{44}O_{16}$
Formula Weight: 720.71
Storage Temperature: -20 C
Quality Release Date: 25 OCT 2018

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO OFF WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR SOLID	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 93 %	98 %



Dr. Reinhold Schwenninger
 Quality Assurance
 Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

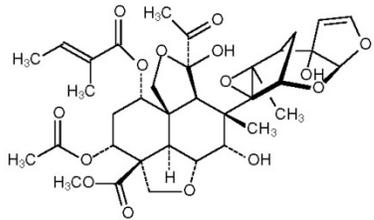
Figura n.º 47: Certificado de Análisis de Calidad del estándar de Azadiractina

SIGMA-ALDRICH®3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Date: 25.10.2018

Product name: **Azadirachtin**

Basic data Denotation: Azadirachtin Synonyms: Azadirachtin A Batch No.: BCBZ5571 CAS No.: [11141-17-6] Formula: C ₃₅ H ₄₄ O ₁₆ Molecular weight: 720.72 Storage temperature: 4 °C, light protected Source: Azadirachtea (kernels of the Neem tree) Stable until: October 2022 Last purity control: October 2018 Date of production: October 2018 Product No.: A7430 Remark: In solution the substance is not stable over a longer period		Molecular formula 
DETERMINATION	SPECIFICATION	RESULT
Properties Appearance Solubility Identity Melting point DAD UV-Spectrum Purity TLC HPLC	colourless microcrystalline powder soluble in methanol, acetonitrile, ethyl acetate 158 – 168 °C (from Ethyl acetate/n-Heptane) Maximum at 214 ± 2 nm 1 main band >97.0% at 214 nm	conforms conforms 165 – 168 °C; conforms λ _{max} = 214 nm; conforms 1 band; conforms 99.61%; conforms

Result: The product meets the requirements

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Figura n.º 48: Certificado de Análisis de Calidad del estándar de Azadiractina



3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
 Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Analytical Report to the Certificate of Analysis (CoA)

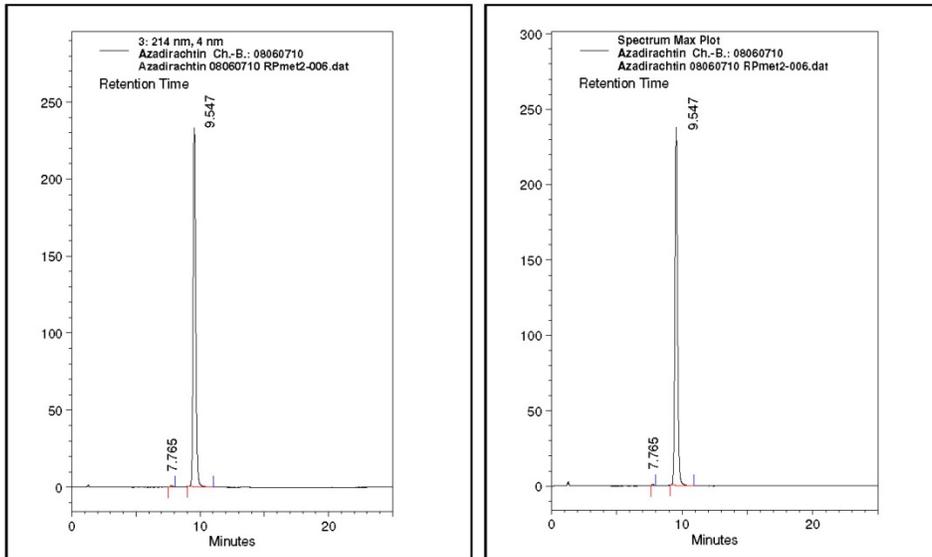
Date: 25.10.2018

Azadirachtin

Batch No.: BCBZ5571

HPLC-Analysis

Column type: Eurospher 100-5, C18, 250 x 4 mm with integrated precolumn 5 x 4 mm
 Mobile Phase: Acetonitrile/Water 40/60 (v/v)
 Flow rate: 1.00 mL/min
 Sample Solvent: Acetonitrile/Water 2:1
 Injection vol.: 10 µL
 Detection: DAD, 200–350 nm
 Temperature.: 20 °C



3: 214 nm, 4 nm					
Pk #	Retention Time	Area	Area Percent	Capacity factor	Lambda Max
1	7.765	12850	0.39	2.92	209
2	9.547	3283409	99.61	3.82	212
Totals			100.00		

Spectrum Max Plot ^{*)}					
Pk #	Retention Time	Area	Area Percent	Capacity factor	Lambda Max
1	7.765	10728	0.32	2.92	209
2	9.547	3333914	99.68	3.82	212
Totals			100.00		

^{*)} A Spectrum Max Plot is a chromatogram with each point plotted at its maximum absorbance within the detection range. This plot gives an indication of the appearance of the chromatogram when the wavelengths are optimized for each peak.

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

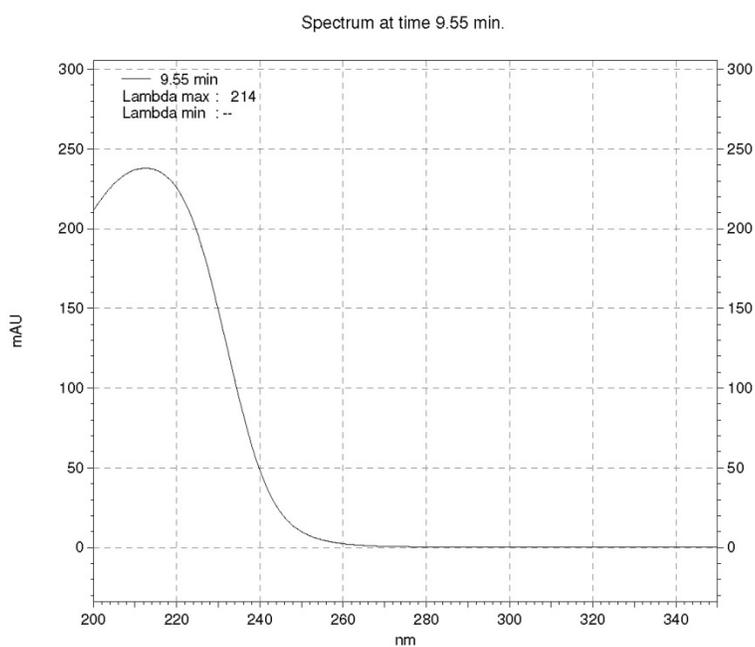
Figura n.º 49: Certificado de Análisis de Calidad del estándar de Azadiractina

SIGMA-ALDRICH3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com**Analytical Report to the Certificate of Analysis (CoA)**

Date: 25.10.2018

Azadirachtin

Batch No.: BCBZ5571

HPLC-Analysis**DAD UV-Spectrum**

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Figura n.º 50: Certificado de identificación de *Melia azedarach* Linn. por Herbario BIGU, Escuela de Biología, Fac. C.C.Q.Q. y Farmacia, USAC.



12 de febrero del 2020

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio se hace constar que el estudiante **Fermin Estuardo Labín Melgar**, carné 200515114, con CUI no.2602 18081 0608 de la Escuela de Química de esta casa de Estudios, solicitó la determinación botánica y depositó en este herbario, especímenes de "Paraíso" que fueron registrado así:

***Melia azedarach* L. (Meliaceae) Registro BIGU 81171**

A solicitud del interesado, se les extiende la presente constancia en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

Atentamente,

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

Ing. Agr. Mario Esteban Véliz Pérez
Coordinador-curador
Académico de Número





Fermín Estuardo Labán Melgar, Br.

Tesista



Oswaldo Efraín Martínez Rojas, Lcdo.

Asesor



Rosa Patricia Navas Najera, Lcda.

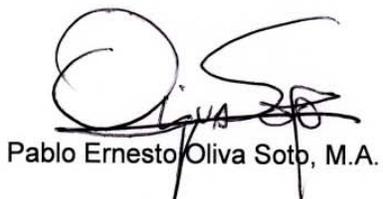
Co-Asesora



Bessie Evelin Oliva Hernández, M.Sc.

Directora

Escuela de Química



Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.

Decano

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia