



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MEDELLÍN

DETERMINACIÓN DE LA FOTODEGRADACIÓN DE EXTRACTO METANÓLICO DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM)

JHON DIEGO RIOS SALAZAR

QUÍMICO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Química
Medellín, Colombia

2014

DETERMINACIÓN DE LA FOTODEGRADACIÓN DE EXTRACTO METANÓLICO DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM)

JHON DIEGO RIOS SALAZAR
Químico

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de
Magister en Ciencias Química

Director

Ph.D Fernando Orozco Sánchez

Asesor

Ph.D Benjamín Rojano

Línea de Investigación

Suspensiones celulares para la producción de metabolitos secundarios

Grupo de Investigación

Biotecnología Vegetal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Química
Medellín, Colombia

2014

***A mis padres Blanca y Jhon,
Hermanas Liliana y Beatriz,
Mis ángeles, Camila e Isabel y
a mi novia Katheryn Gómez***

***“Sera la razón mi guía; la voluntad, mi
fuerza; el deber de proceder así, mi
perseverancia y el apoyo más grande... mi
fe.”***

Adolf Hitler

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por permitir acrecentar mis conocimientos y brindar las instalaciones, recursos y personal para el buen terminar de este proyecto investigativo.

Agradezco a los profesores PhD. Fernando Orozco Sánchez y PhD. Benjamín Rojano, por ser el director y asesor de esta tesis respectivamente, por haberme incluido en su proyecto de investigación, por la confianza ofrecida y por sus aportes y colaboración brindada a lo largo de mi trabajo de investigación.

Una mención importante a todos los docentes que colaboraron en mi formación en la maestría, PhD Daniel Barragán, PhD Angelina Hormaza, PhD Cristina Valencia, PhD Mauricio Sánchez, MSc Álvaro Lema; por todos sus aportes y enseñanzas para mi vida profesional.

Un agradecimiento especial a los PhD Rodrigo Hoyos y PhD Jairo Quijano que no solo por sus enseñanzas como docentes, me brindaron su amistad y apoyo incondicional.

Es de mencionar todas esas personas que hicieron de mi formación académica y estadía en la Universidad Nacional de Colombia, un buen lugar, como lo son todos los amigos: Fredy Amaringo, Pablo Ruiz, Claudia Escobar, Danny Velásquez, Wilson Parra, Fernando García, Jaime Alzate, Daniel Ospina, Fanny Ramírez, Martha Piedrahita, Mario Rodríguez, Ramiro García y Esteban Atehortua, que con sus consejos, colaboraciones y amistad convirtieron de este tiempo algo más ameno y agradable.

Al PhD Jairo Sáez, por toda su colaboración, asesoría y enseñanzas, no sólo en mi formación profesional, sino también para la vida en general, gracias.

A mi papá, que desde el cielo me ayudó a terminar de escribir este documento y sé que me está apoyando igual o hasta más que cuando nos estaba acompañando, así como mi mamá, hermanas, sobrinas y pareja. Gracias por su paciencia y ayuda.

RESUMEN

Los extractos de cultivos celulares de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) poseen importantes efectos insecticidas. Resulta especialmente interesante estudiar su degradación, debido a que en forma general los extractos de productos naturales pueden degradarse en las condiciones medioambientales en las que comúnmente se encuentran. En la presente investigación, se sometió el extracto metanólico de cultivos de células en suspensión de *A. indica*, a diferentes condiciones de radiación (oscuridad, 254 y 368 nm) y temperatura (35 y 45 °C). Se evidenció la degradación de varios de los componentes del extracto a través de su seguimiento por HPLC con arreglo de diodos, encontrando tiempos de vida media para sus componentes principales, que oscilan entre 69.50 ± 0.68 minutos (compuesto 7 a 254 nm y 45 °C) y 564.92 ± 35.51 minutos (compuesto 6 a 368 nm y 35 °C), dependiendo de las condiciones usadas para el tratamiento. Se concluye que con una longitud de onda de 254 nm, así como una temperatura de 35 °C, se facilita la degradación de los compuestos analizados del extracto metanólico de los cultivos celulares de *Azadirachta indica*.

Palabras clave: Fotodegradación, termodegradación, cultivo de células en suspensión, *Azadirachta indica* A. Juss, tiempo de vida media.

Abstract

Extracts of cell cultures of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) have significant insecticidal effects. It is particularly interesting to study its degradation because, generally the natural products extracts may present degradation in environmental conditions. In the present study, the methanol extract of *A. Indica* cell culture was subjected to different radiation conditions (dark, 254 and 368 nm) and temperature (35 and 45 ° C). Degradation of various components of the extract analysed by HPLC with diode array, showed half-lives for its major components ranging from 69.50 ± 0.68 minutes (compound 7 to 254 nm and 45 °C) and 564.92 ± 35.51 minutes (compound 6 to 368 nm and 45 °C), depending on the conditions used for the treatment. It is concluded that degradation of *A. indica* cell extract is higher with a wavelength of 254 nm and 35 ° C.

Keywords: Photodegradation, thermodegradation, plant cell culture, *Azadirachta indica* A. Juss, half-life

CONTENIDO

Contenido

RESUMEN	IX
INTRODUCCIÓN	1
1 NEEM	5
1.1 Generalidades de la <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	5
1.2 Estudio químico de la familia <i>Meliáceae</i>	10
1.3 Estudio químico de la especie <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	10
1.3.1 Terpenoides y esteroides	10
1.3.2 Otros constituyentes diferentes a los terpenoides y esteroides	11
1.4 Estudios de fotodegradación de la azadiractina	12
1.5 Biogénesis de los nortriterpenoides	13
2 MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.1 Material biológico	19
2.1.1 Subcultivo de las suspensiones celulares de A. Indica.	19
2.1.2 Almacenamiento de las células.	19
2.2 Obtención de extractos	20
2.3 Experimentación de foto y termodegradación	20
2.3.1 Equipo	20
2.3.2 Condiciones de experimentación	21
2.4 Análisis químico	22
2.4.1 Equipo	22
2.4.2 Condiciones cromatográficas	22
2.4.3 Preparación del estándar de azadiractina-A	23
2.4.4 Análisis estadístico de los resultados	23
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1 Análisis de azadiractina y otros terpenoides en el extracto metanólico de células en suspensión de A. indica	25

3.2	Resultados de los experimentos de la foto y termodegradación del extracto metanólico de células de <i>A. indica</i> .	30
3.3	Determinación de constantes de velocidad y de la vida media de los compuestos en los experimentos de foto y termodegradación.	38
3.3.1	Evaluación de las cinéticas de primer orden, método Pearson y Moore	38
3.3.2	Método matemático del seguimiento de degradación de los compuestos, la ley de disoluciones de Ostwald	43
3.3.3	Análisis de los tiempos de vida media (τ)	47
3.4	Análisis estadístico de la degradación de cada uno de los compuestos	48
3.4.1	Análisis estadístico realizado a la composición porcentual de los compuestos	50
3.4.2	Análisis de Varianza factorial	50
3.4.3	Análisis de los resultados	51
3.4.4	Análisis de efectos simples	52
4	CONCLUSIONES	55
5	RECOMENDACIONES	59
6	ANEXO A: Análisis estadístico	61
6.1	Análisis estadístico para λ (0 nm, 254 nm y 368 nm) y T (35 °C y 45 °C) considerando oscuridad	62
6.1.1	Análisis para el compuesto 12.357 (1)	63
6.1.2	Análisis para el compuesto 12.834 (2)	65
6.1.3	Análisis para el compuesto 14.773 (3)	67
6.1.4	Análisis para el compuesto 16.543 (4)	69
6.1.5	Análisis para el compuesto 19.709 (5)	71
6.1.6	Análisis para el compuesto 27.287 (7)	73
6.2	Análisis estadístico para λ (254 nm y 368 nm) y T (35 °C y 45 °C), sin considerar la oscuridad	75
6.2.1	Análisis para el compuesto 12.357 (1)	75
6.2.2	Análisis para el compuesto 12.834 (2)	77
6.2.3	Análisis para el compuesto 14.773 (3)	80
6.2.4	Análisis para el compuesto 16.543 (4)	83
6.2.5	Análisis para el compuesto 19.709 (5)	86
6.2.6	Análisis para el compuesto 23.972 (6)	89
6.2.7	Análisis para el compuesto 27.287 (7)	92
7	BIBLIOGRAFÍA	95

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	6
Figura 1-2 Estructura molecular de Azadiractina-A	11
Figura 1-3 Biosíntesis del Isopentil-pirofosfato (IPP) y del Dimetil-alil-pirofosfato (DMAPP)	13
Figura 1-4 Biosíntesis de monoterpeneo, geranil pirofosfato (GPP) y del sesquiterpeneo, farnesil pirofosfato (FPP)	14
Figura 1-5 Biosíntesis de triterpeneo, escualeno (SQ)	14
Figura 1-6 Síntesis del oxiesqualeno OS y el dioxiesqualeno DOS a partir del SQ	15
Figura 1-7 Biosíntesis damarendiol	15
Figura 1-8 Biosíntesis del eufano (20R) ótirucalano (20S)	16
Figura 1-9 Biosíntesis del azadiractol	16
Figura 1-10 Biosíntesis de Tetranortriterpenoides	17
Figura 3-1 Cromatograma extracto metanólico de suspensiones celulares de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss, gradiente	27
Figura 3-2 Cromatograma extracto metanólico de suspensiones celulares de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss, gradiente 2	27
Figura 3-3 Señales analizadas en cromatograma de extracto metanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss, gradiente 2	28
Figura 3-4 Curva de calibración de Azadiractina-A construida con el gradiente 2	29
Figura 3-5 Cromatograma del estándar de azadiractina-A usando el gradiente 2	30
Figura 3-6 Variación en la composición del compuesto 1 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de A. indica.	31
Figura 3-7 Variación en la composición del compuesto 2 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de A. indica.	32
Figura 3-8 Variación en la composición del compuesto 3 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de A. indica.	33
Figura 3-9 Variación en la composición del compuesto 4 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de A. indica.	34
Figura 3-10 Variación en la composición del compuesto 5 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de A. indica.	35
Figura 3-11 Variación en la composición del compuesto 6 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de A. indica.	36
Figura 3-12 Variación en la composición del compuesto 7 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de A. indica.	37
Figura 3-13 Cinética de degradación del compuesto 1 sometido a una radiación de 254 nm y 35 °C	41

Figura 3-14 Curva ajustada del compuesto 1 sometido a 254 nm de longitud de onda y 35 °C de temperatura	44
Figura 3-15 Comportamiento del compuesto aislado a los 12.3568 min en los seis tratamientos a los cuales fue sometido experimentalmente	49
Figura 3-16 Gráfico del comportamiento del compuesto 1 en los diferentes tratamientos de longitud de onda y temperatura, en un extracto metanólico de células de <i>A. indica</i>	52
Figura 6-1 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 1	63
Figura 6-2 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 1	64
Figura 6-3 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 2	65
Figura 6-4 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 2	66
Figura 6-5 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 3	67
Figura 6-6 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 3	68
Figura 6-7 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 4	69
Figura 6-8 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 4	70
Figura 6-9 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 5	71
Figura 6-10 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 5	72
Figura 6-11 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 7	73
Figura 6-12 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 7	74
Figura 6-13 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 1	75
Figura 6-14 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 1	76
Figura 6-15 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 2	77
Figura 6-16 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 2	78
Figura 6-17 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 3	80
Figura 6-18 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 3	81
Figura 6-19 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 4	83
Figura 6-20 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 4	84
Figura 6-21 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto	86
Figura 6-22 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 5	87
Figura 6-23 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 6	89
Figura 6-24 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 6	90
Figura 6-25 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 7	92
Figura 6-26 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 7	93

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS

Tabla 1-1 Descripción taxonómica de la <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	5
Tabla 3-1 Caracterización química y biológica de las líneas celulares de <i>A. indica</i> existentes en el Lab. de Crecimiento y Desarrollo Vegetal.	25
Tabla 3-2 Composición relativa de los compuestos seleccionados para los estudios de degradación usando el gradiente 2	29
Tabla 3-3 Constantes cinéticas de reacción de primer orden de algunos compuestos en extracto metanólico de <i>A. indica</i> , sometido a termo y fotodegradación	42
Tabla 3-4 Tiempos de vida media (τ) de algunos compuestos en el extracto metanólico de <i>A. indica</i> sometido a foto y termodegradación (λ de 254 nm y 356 nm, 35 y 45 °C)	42
Tabla 3-5 Ecuaciones encontradas para la degradación de algunos compuestos en el extracto metanólico de <i>A. indica</i> sometidos a foto y termodegradación (Parte A)	44
Tabla 3-6 Ecuaciones encontradas para la degradación de algunos compuestos en el extracto metanólico de <i>A. indica</i> sometidos a foto y termodegradación (Parte B)	44
Tabla 3-7 Coeficientes de regresión, R^2 , de las ecuaciones encontradas para la degradación de algunos compuestos en el extracto metanólico de <i>A. indica</i> sometidos a foto y termodegradación	45
Tabla 3-8 Tiempos de vida media (τ) de algunos compuestos en el extracto metanólico de <i>A. indica</i> sometidos a foto y termodegradación determinados por el método gráfico	45
Tabla 3-9 Diferencias porcentuales entre los dos métodos usados para el análisis de la degradación de los compuestos del extracto de células de <i>A. indica</i> a dos longitudes de onda y dos temperaturas diferentes	46
Tabla 3-10 Cambio porcentual de los compuestos con respecto al Aza-A	48
Tabla 3-11 Anova característico del efecto de cada uno de los factores sobre los 7 compuestos estudiados en el extracto metanólico de células de <i>A. indica</i>	51
Tabla 6-1 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 1	63
Tabla 6-2 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 1	64
Tabla 6-3 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 2	65
Tabla 6-4 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 2	66
Tabla 6-5 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 3	67
Tabla 6-6 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 3	68
Tabla 6-7 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 4	69

Tabla 6-8 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 4	70
Tabla 6-9 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 5	71
Tabla 6-10 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 5.....	72
Tabla 6-11 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 7	73
Tabla 6-12 Comparación de efectos múltiples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 7.....	74
Tabla 6-13 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 1	76
Tabla 6-14 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 1	76
Tabla 6-15 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto.....	76
Tabla 6-16 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 2	78
Tabla 6-17 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 2	78
Tabla 6-18 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 2.....	78
Tabla 6-19 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 3	81
Tabla 6-20 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 3	81
Tabla 6-21 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 3.....	82
Tabla 6-22 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 4	84
Tabla 6-23 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 4	84
Tabla 6-24 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 4.....	85
Tabla 6-25 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 5	87
Tabla 6-26 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 5	87
Tabla 6-27 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 5.....	88
Tabla 6-28 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 6	90
Tabla 6-29 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 6	90
Tabla 6-30 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 6.....	91
Tabla 6-31 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 7	93
Tabla 6-32 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 7	93
Tabla 6-33 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 7.....	94

CONTENIDO

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
a, z	Concentraciones iniciales de las sustancias (a, z)	mol/L	Ec. 3-8, 3-9
A, B, Z	Componentes de la reacción	-----	Ec. 3-6
C	Concentración	mol/L	Ec. 3-23
C_A	Concentración de la sustancia A	mol/L	Ec. 3-8
C_Z	Concentración de la sustancia Z	mol/L	Ec. 3-8
C_0	Concentración inicial	mol/L	Ec. 3-23
k	Constante de velocidad, cinética de 1 orden	min ⁻¹	Ec. 3-23
K	Constante de proporcionalidad	-----	Ec. 3-12
t	Tiempo	min	Ec. 3-23
T	Temperatura	°C	Ec. 1.34
V	Volumen	L	Ec. 3-5
x	Grado de reacción en términos de concentración	mol/L	Ec. 3-5

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$n_{B,0}$	Cantidad de B al inicio de la reacción	mol	Ec. 3-1
n_B	Cantidad de sustancia B	mol	Ec. 3-1
ν_B	Velocidad de reacción independiente de V	mol/(L·s)	Ec. 3-3
θ_∞	Valor de la propiedad física al final de la reacción	-----	Ec. 3-15
ν_B	Coefficiente estequiométrico de B	-----	Ec. 3-1
ξ	Tasa temporal de incremento del grado de la reacción	mol/s	Ec. 3-3
θ, θ_t	Valor de la propiedad física en cualquier momento de la reacción	-----	Ec. 3-11
θ_M	Contribución del medio de reacción a la propiedad medida	-----	Ec. 3-11
ξ	Grado de una reacción	mol	Ec. 3-1

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
λ	Longitud de onda	nm	
τ	Tiempo de vida media	min	Ec. 3-26

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ADP</i>	<i>Adenosín difosfato</i>
<i>AMV</i>	<i>Ácido Mevalónico</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosín trifosfato</i>
<i>A. indica</i>	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss
<i>Aza-A</i>	<i>Azadiractina-A</i>
<i>DMAPP</i>	<i>Dimetil-alil-pirofosfato</i>
<i>DOS</i>	<i>Dioxiescualeno</i>
<i>D.P</i>	<i>Diferencia porcentual</i>
<i>FPP</i>	<i>Farnesil pirofosfato</i>
<i>GPP</i>	<i>Geranil pirofosfato</i>
<i>HGMS</i>	<i>(S)-3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa</i>
<i>HPLC</i>	<i>Cromatografía de alta eficiencia</i>
<i>HSCoA</i>	<i>Coenzima A</i>
<i>IPP</i>	<i>Isopentil-pirofosfato</i>
<i>L.O.</i>	<i>valor de τ logrado con el método matemático usando la ley de diluciones de Ostwald</i>
<i>Ms</i>	<i>Espectroscopia de masas</i>
<i>OS</i>	<i>Oxiescualeno</i>
<i>pH</i>	<i>Función H</i>
<i>P.M.</i>	<i>Valor de τ obtenido en la evaluación cinética usando el método Pearson and Moore</i>
<i>SQ</i>	<i>Escualeno</i>
<i>Uv</i>	<i>Ultravioleta</i>

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los insectos, microorganismos y hongos tienen gran importancia por el papel que desempeñan en la naturaleza (fertilización de plantas, descomposición de material inservible, control biológico de otras especies, entre otros). No obstante, en ocasiones se consideran un verdadero problema para el hombre, ya que compiten muchas veces por la misma base alimenticia (plantas) y en ocasiones son un vector de enfermedades tanto para el hombre como para los animales domésticos (Espinoza, 2003; FAO, 1994; OMAF, 1991; Tagliati, 2011). *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz) es la plaga de mayor importancia económica en Colombia y en otros países del continente, debido a los graves daños que ocasiona en los cultivos. Afecta ampliamente los cultivos agrícolas, especialmente los de *Zea Mays* (maíz), algodón, sorgo, entre otros (Gutierrez-Garcia, 2010). Estos daños contrarrestan la necesidad del país, de aumentar la producción de alimentos, mejorar la calidad de los productos y hacerlos competitivos en el exterior. Los productos de exportación y de consumo interno, deben estar en excelente estado sanitario. En otras palabras, libres de cualquier afectación patógena y al mismo tiempo, no exceder los niveles residuales máximos de los insecticidas, permitidos internacionalmente. Difícilmente será posible cumplir con estos requisitos, ya que la resistencia de los insectos a los pesticidas sintéticos ha aumentado, así como el costo progresivo que exige la aplicación de dosis en mayor cantidad y aspersiones más constantes en los cultivos.

En el momento se busca la obtención de alimentos por medio de cultivos limpios (sin uso de insecticidas sintéticos), debido a los problemas causados en la salud del hombre, animales domésticos y el medio ambiente, ante el uso indiscriminado de pesticidas y herbicidas sintéticos poco o nada biodegradables (Espinoza, 2003; FAO, 1994; OMAF, 1991; Tagliati, 2011). Para tal efecto, el hombre ha centrado su búsqueda en nuevos métodos de control de plagas, tratando de hacer más biodegradables las tecnologías

existentes, como también el hallazgo de metabolitos secundarios viables que se pueden encontrar en algunas especies vegetales. Estos metabolitos deben presentar características muy interesantes de selectividad y biodegradabilidad (Tagliati, 2011). Para el control de algunos insectos, como *S. frugiperda*, se tienen varios reportes de bioinsecticidas con un alto rendimiento, entre los que se destacan los preparados a partir del árbol de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) (Negreta & Morales, 2003). También, se han evaluado los extractos de suspensiones celulares de *A. Indica*, pero aún sin una aplicación comercial (Capataz, 2005; Koul & Wahab, 2004; Trujillo, 2008). Sin embargo, se tienen reportes de la pérdida de efectividad de estos bioinsecticidas con el tiempo, debido posiblemente al efecto de la luz, temperatura, pH, entre otros factores (Barrek, Paise, & Grenier-Loustalot, 2004), lo cual impide su uso en las plantaciones agrícolas. Entre los metabolitos secundarios producidos por *A. Indica*, el único compuesto al que se le ha determinado su fotodegradación es a la azadiractina-A (Aza-A), reportándose un tiempo de vida media de 48 min. para este compuesto (Dureja & Johnson, 2000; Johnson, Dureja, & Dhingra, 2003; Johnson & Dureja, 2002).

El uso de suspensiones celulares de neem tiene un potencial en regiones donde la producción agrícola de esta especie es dificultosa, la tierra está proyectada para otra producción agropecuaria o se presentan limitaciones medioambientales, haciendo prometedor el cultivo de tejidos celulares en biorreactores. Lo anterior hace necesario para el desarrollo y éxito de los insecticidas de neem, de un análisis completo del comportamiento de dichas sustancias. Así, debe conocerse cómo se degradan los extractos de neem en presencia de luz, específicamente en las zonas del espectro UV-visible donde se presenta absorción por dichos extractos. Esta degradación puede simularse exponiendo los compuestos que componen dichos extractos a diferentes longitudes de onda, presentes en la luz solar y específicamente exponiendo el extracto a cierto tipo de lámparas, como las utilizadas en los equipos de clonación y subcultivo de células.

El metabolito secundario más estudiado y al que se le atribuye una gran actividad insecticida en la planta de neem es la Aza-A. Aunque se conocen algunos fotoproductos de este compuesto, no se conocen reportes de la degradación de este metabolito o de otros terpenoides dentro de la matriz del extracto vegetal. Tampoco se conoce el comportamiento de dicho extracto, en función de su degradación por factores externos del medio, durante su almacenamiento. Hasta el momento tampoco se ha estudiado la,

posible degradación de los extractos provenientes de cultivos de células en suspensión de neem. Con la importancia que tiene la formulación de un producto final con actividad insecticida, es necesario determinar las condiciones adecuadas de almacenamiento y manejo del mismo entre las que se destaca, la capacidad de degradación con la luz de los extractos metanólicos de suspensiones celulares de neem.

En esta investigación se propuso como objetivo general determinar la degradación del extracto metanólico de suspensiones celulares de *A. indica*, por la presencia de luz, en diferentes regiones del UV-Visible. Específicamente se propuso.

- Realizar estudios preliminares, para la determinación de la concentración de azadiractina y triterpenoides en la matriz de extracto metanólico, utilizando métodos de HPLC
- Determinar la vida media de fotodegradación en diferentes regiones del espectro UV-Visible del extracto metanólico de suspensión celular de *A. indica*, evaluándolo por un método cromatográfico.
- Implementar este método de análisis para la determinación de la vida media del extracto metanólico obtenido de una suspensión celular de *A. indica*, sometido a una degradación térmica.

Para lograrlo, se evaluó la degradación del extracto metanólico de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* (neem), causada por la interacción de luz UV, a 254 y 368 ± 2 nm y oscuridad a temperaturas de 35 y 45 °C. Adicionalmente se modelaron las cinéticas de reacción con una ecuación de primer orden (J. W. Moore, 1980), determinando la constante cinética, realizando con esta información un análisis de varianza de todos sus factores.

El material biológico fue producido por suspensiones celulares de *A. Indica*, en Erlenmeyerss con medio líquido MS y otros constituyentes menores. El subcultivo se realizó cada 10 días. El extracto metanólico se obtuvo luego de filtrar y liofilizar las células, sometiéndolas a percolación sucesiva en metanol y aplicando sonicación por un tiempo de 1 hora. Los Erlenmeyerss fueron colocados en una incubadora a temperatura constante a 25 °C durante 3 días, momento en el cual es filtrado el material y se reemplazó el metanol. El filtrado se llevó a un proceso de evaporación a presión reducida, eliminando todo el metanol, el extracto obtenido se almacenó en oscuridad. Este extracto, se somete

a una extracción sólido-líquido con diclorometano, recobrando con esto, el extracto madre.

La metodología utilizada para determinar cómo se fotodegrada el extracto metanólico de biomasa de neem, consistió en el seguimiento de la variación porcentual en la concentración de los compuestos, en un lapso de tiempo, expuestas a las longitudes de onda λ_1 (oscuridad), λ_2 (254 ± 2 nm) y λ_3 (368 ± 2 nm), realizando el análisis con la ayuda de un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector de Uv-visible. Con todo este proceder se determinó la degradación de los compuestos del extracto metanólico de suspensiones celulares de *A. indica*, por la presencia de luz, en tres diferentes regiones del UV-Visible y dos temperaturas, asemejando las condiciones de exposición final en el laboratorio y los cultivos y a dos temperaturas diferentes.

1 NEEM

Las biomoléculas con insaturaciones y presencia de átomos de oxígeno, pueden presentar una degradación debido a diversos factores. Estos factores incluyen la exposición a la luz, la temperatura, así como a la permanencia en atmósferas ricas en oxígeno. Los metabolitos secundarios usados para la producción de bioinsecticidas a partir de extractos *Azadirachta Indica* A. Juss (o árbol del neem) son ricos en dichos componentes y se ha reportado que la azadiractina (principal metabolito de éste árbol) presenta degradación en presencia de luz (Dureja & Johnson, 2000; Falasca & Bernabe, 2009; Johnson et al., 2003; Johnson & Dureja, 2002). Por esta razón se hace necesario determinar la degradación de los extractos alcohólicos de la biomasa de las suspensiones celulares de *A. Indica*, tecnología alternativa para la producción de estos bioinsecticidas y que viene desarrollándose desde hace más de 10 años en la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Las investigaciones realizadas a la azadiractina, se han basado en el compuesto aislado y purificado, del material vegetal (Dureja & Johnson, 2000; Johnson et al., 2003; Johnson & Dureja, 2002). Sin embargo no se conocen reportes del comportamiento de la matriz formada por el extracto metanólico, expuesto a factores que pudiesen alterar su comportamiento, desconociendo las posibles sinergias o adiciones en el comportamiento existentes entre los compuestos que se encuentran en determinada mezcla.

1.1 Generalidades de la *Azadirachta indica* A. Juss

El nombre científico del árbol del Neem es *Azadirachta indica* A. Juss. Pertenece a la familia *Meliáceae* (Tabla 1-1).

Tabla 1-1 Descripción taxonómica de la *Azadirachta indica* A. Juss

Reino	Vegetal
División	Embriofitas
Subdivisión	Angiospermas

Clase	Dicotiledóneas
Orden	Geraniales
Familia	Meliáceae
Género	<i>Azadirachta</i>
Especie	<i>indica</i>
Sinonimia	<i>Melia indica</i> Juss, <i>Melia azadirachta</i>

Se encuentra distribuida en el continente africano, sudeste de Asia, sur del Sahara, Centroamérica, Suramérica, Oceanía y ahora se trabaja experimentalmente en parcelas meridionales de Arizona, California, y Florida. Actualmente en 78 países existen reportes de árboles del Neem. En 9 países se utilizan materias activas provenientes de ese árbol. Se calcula que en todo el mundo existen aproximadamente 91 millones de ejemplares (Falasca & Bernabe, 2009). El Neem se adapta a las regiones tropicales, tropicales húmedas, subtropicales, áridas, y a elevaciones que van desde el nivel del mar hasta los mil metros (1000 m) sobre el nivel del mar. Soporta una temperatura máxima de 46 °C, y una mínima de 26 °C, una precipitación anual de 400 a 1200 mm. Además puede crecer en suelos pobres en materia orgánica de textura pesada, media y ligera, pH de 5.5 a 7.0, buen drenaje y una profundidad mayor a 150 centímetros y un fotoperiodo menor a 12 horas/luz. Puede prosperar en suelos rocosos y poco profundos (20-50 cm), soportar hasta 50 °C y un pH de 5 a 7.5, pero no soporta heladas o largos períodos de bajas temperaturas, ni suelos arenosos, secos y profundos, anegados y salinos (FAO, 1998; Liogier & Martorell, 1999).

Azadirachta indica A. Juss.

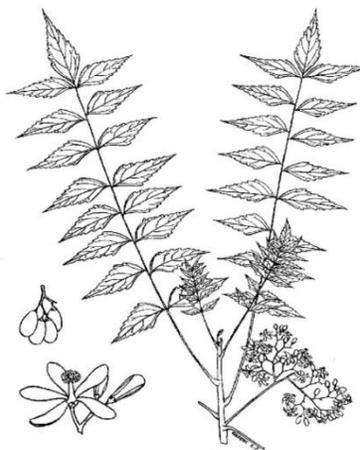


Figura 1-1 *Azadirachta indica* A. Juss. Tomado del catálogo producido por el Royal Museum for Central Africa bajo el boucher VB17

La *A. indica* es una especie de crecimiento rápido y puede alcanzar alturas de hasta 30 m con un diámetro medio de la copa de 5 a 10 m en condiciones óptimas. Su sistema radicular tiene una raíz pivotante muy desarrollada, los frutos son drupáceos, oval-oblongos, amarillos purpúreos, de 1 cm de diámetro y normalmente contienen una sola semilla. El fruto tiene una longitud de 2 cm y cuando madura, el pericarpio aparece amarillo y de textura rugosa (Osuna, 2000). Se propaga naturalmente por semillas; los frutos cuando están maduros caen al suelo pudiendo germinar si las condiciones son adecuadas, siendo su capacidad de germinación muy alta durante las primeras 4 semanas y descendiendo luego rápidamente. Los frutos empiezan a aparecer cuando el árbol alcanza una edad de 3 a 5 años; hasta los 10 años, la producción de frutos no es rentable (Osuna, 2000).

Esta especie ha hecho aportes significativos a la humanidad en el campo de la agricultura, a nivel medicinal y farmacológico. Por sus características, la madera es excelente para la construcción y elaboración de muebles, ya que no son atacados por las termitas (National Academy of Sciences (NAS), 1980). El aceite de la semilla es usado como combustible, lubricante para maquinaria, fertilizante para plantas, para la elaboración de jabones, desinfectantes, productos farmacéuticos y en cosmetología (Beckstrom-Stetemberg & Duke, 1996; Evans, 1992; National Academy of Sciences (NAS), 1980; Norten, 1999). Así mismo, estudios sobre la relación que existe entre la actividad biológica y la composición química de los extractos de esta planta, demostraron su propiedad molusquicida para *Lymnaea acuminata*, responsables de producir la fascioliasis en el ganado vacuno (Raguraman & Singh, 1999). Es utilizado en países subdesarrollados a nivel de control biológico para controlar insectos plaga que atacan los cultivos, inhibiendo o retardando la actividad de alimentación de los insectos, reduciendo de esta manera el daño directamente. Un producto agrícola, atacado por insectos no es atractivo por su baja palatabilidad lo cual reduce los períodos de alimentación y las cantidades ingeridas por animales, incrementándose el parasitismo y la depredación por permanecer expuestos y débiles.

Las propiedades del Neem vienen basadas en el parecido que presentan sus componentes con algunas hormonas naturales, de tal forma que los insectos absorben los componentes del Neem como si fueran hormonas reales y estas bloquean su sistema endocrino. Estas sustancias son biodegradables, no venenosas, y no afectan directamente a los enemigos naturales (Cole & Cox, 1981). Tiene mucho éxito contra

hongos que causan ciertas enfermedades de las plantas. Tanto en laboratorio como en pruebas de campo, el Neem, ha controlado enfermedades como el moho. En pruebas de invernadero, tiene una eficacia próxima al 100 % contra el moho de las judías. Recientemente, se ha demostrado una conexión verdaderamente notable entre el Neem y los hongos (Joycharat, 2010; Mohanty, Raghavendra, & Dash, 2008). Un beneficio indirecto para la salud humana es que las hojas de Neem contienen compuestos bioactivos que interfieren con la capacidad del hongo *Aspergillus flavus* para producir aflatoxinas en granos mal almacenados. En pruebas realizadas con extractos de Neem contra *Aspergillus* sp, se frenó por completo la producción de aflatoxina (Shultz et al., 1992). En un estudio realizado en Venezuela se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos, etanólicos y cetónicos de las hojas del árbol del Neem sobre varios microorganismos como *Escherichia coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotóxica, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Candida krusei* ATCC 6258 y *C. albicans* ATCC 90028. Los resultados obtenidos en esta evaluación microbiológica muestran que dichos extractos, a la dosis de 0.02 g/mL, presentaron una acción antibacteriana y antifúngica sobre los diferentes microorganismos de una manera selectiva. Los extractos etanólicos y cetónicos mostraron actividad contra *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* enterotóxica, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *C. krusei* ATCC 6258. Los extractos acuosos no presentaron actividad contra ninguno de los microorganismos ensayados en la dosis empleada y ninguno de los extractos evaluados fue activo contra la levadura *C. albicans* ATCC 90028 (Gualtieri, 2004; Khosla, 2000).

En India muchas personas tienen dentaduras y encías sanas por el empleo diario de ramas de Neem que son masticadas y usadas a modo de cepillo de dientes. Modernamente, tanto en India como en Alemania existen dentífricos con compuestos de Neem. Lo más reciente en el aprovechamiento de este árbol es que el aceite extraído de las semillas tiene fuertes efectos espermicidas intravaginales en ratas; además se realizaron ensayos con primates y otros machos de mamíferos donde se encontró que no se redujo la producción de semen, pero sí su capacidad reproductiva (Khosla, 2000; Shultz et al., 1992).

En el Centro de Investigación de Agroquímicos de la India, se ha reportado que extractos de diferentes partes vegetativas del árbol del Neem, tales como el tallo, las hojas, las flores, las semillas, la corteza y la pulpa del fruto, se han ensayado para el control de patógenos causantes de enfermedades y han sido benéficos para la salud humana y

veterinaria debido a sus propiedades antisépticas, antifúngicas y antivirales. Tal es el caso de la nimbina, que actúa como antiinflamatorio, antihistamínico, antiartrítico, antiviral y ha demostrado actividad sobre el Virus X de la Patata, *Vaccinia virus*, y sobre el virus de las enfermedades venéreas de las aves. La gedunina se emplea como vaso dilatador, antimalárico, antifúngico y estimulador de la inmunidad; la quercetina se usa como antibacterial y antifúngico y la salanina repele moscos (Cohen, Quistad, & Casida, 1996).

Los extractos de Neem son de los más poderosos que se pueden encontrar en la farmacopea de la India para combatir algunas enfermedades. En particular la investigación ha demostrado que algunos componentes de Neem, genudin y nimbidol (presente en hojas), controlan una variedad de hongos que atacan al humano, incluyendo los causantes del pie de atleta, tiñas, infecciones vaginales causadas por *Cándida*, etc. El aceite de Neem es preferido como tratamiento debido a su mayor contenido de ingredientes activos, hasta bajas concentraciones de extracto de hojas han conseguido sanar problemas de dermatitis. Dos investigadores que basaron sus estudios en las tradiciones antiguas de la utilización de esta planta, encontraron que el humo de Neem presentó una suspensión total en el crecimiento y germinación de los hongos en pacientes enfermos (Biswas & Chattopadhyay, 2002).

En la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, un grupo de profesores y estudiantes han entendido los beneficios de la producción de metabolitos secundarios en cultivo de células vegetales en suspensión y desde hace algunos años se vienen realizando investigaciones en tal sentido. Se han culminado siete investigaciones con *A. indica*, el proyecto “Efecto comparativo de dos fuentes de extracto de Neem (planta de campo e in vitro) sobre *Spodoptera sp*”, dos trabajos de grado de ingeniería química “Comportamiento de las células vegetales en suspensión de *A. Indica* en un biorreactor agitado” (W. Muñoz & O. Vanegas, 2004) “Cinética de Crecimiento de *A. indica* en un biorreactor de Tanque Agitado” (Guzmán & Quintero, 2005) y la tesis de Maestría en Biotecnología “Efecto de elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *A. indica* y su efecto sobre *Spodoptera sp*.” (Capataz, 2005), “Efecto de la relación agitación-aireación sobre el crecimiento celular y la producción de azadiractina en cultivos celulares de Neem en un biorreactor agitado” (Bedoya, 2008), con los cuales se definieron protocolos para el establecimiento de suspensiones celulares de dicha especie, identificación y cuantificación de azadiractina en suspensiones celulares de *A. indica*.

1.2 Estudio químico de la familia *Meliáceae*

Esta familia está constituida por 51 géneros con aproximadamente 575 especies, distribuidas en gran variedad de hábitats que van desde bosques lluviosos hasta zonas desérticas. Dentro de los análisis realizados a especímenes de esta familia, se pueden destacar el aislamiento de benzofuranos (Mulholland, Parel, & Coombes, 2000; Proksch, 2001), triterpenoides del tipo limonoide (Connolly & Waterman, 2000; R. Kumar, 2011; Laphookhieo, 2008; Li, 2008; Mulholland et al., 2000; Omar, 2003; Regnault-Roger, Philogene, & Vincent, 2003), protolimonoides, mono-, sesqui-, di y triterpenoides (Joycharat, 2010; Musa, 2007; Negi, 2011; Rafiq & Dahot, 2010; Siddiqui, Ali, Ali, & Ahmed, 2009), esteroides (Mulholland et al., 2000; Qi, Wu, Ma, & Luo, 2003), flavonoides, cromonas, cumarinas, alcaloides, escualenos, fenoles, taninos, quinonas, saponinas, glicosidos (Laphookhieo, 2008; Mulholland et al., 2000; Musa, 2007).

1.3 Estudio químico de la especie *Azadirachta indica* A. Juss

Investigadores farmacéuticos fueron los primeros en aislar algunos principios químicos con actividades importantes, tales como azadiractina, tetranotriterpenoides, diterpenoides, titerpenoides, pentanotriterpenoides, hexanotriterpenoides y algunos compuestos no terpenoides de varias partes del árbol (Henderson, McCrindle, & K.H., 1968; Lavie, Jain, & Kirson, 1967; Pradhan, Jotwani, & Rai, 1962). Entre los de especial interés se encuentran los terpenoides por su actividad y su concentración en el árbol. Del árbol de *A. indica* se pueden destacar dos grandes grupos donde se clasificarían los compuestos contenidos en ésta, siendo estos grupos los Terpenoides y esteroides, y otros constituyentes diferentes a los terpenoides y esteroides.

1.3.1 Terpenoides y esteroides

Este grupo se subdivide en diterpenoides (con 32 compuestos), triterpenoides los cuales podríamos clasificarlos en azadiractinas (con 17 compuestos), protolimonoides (con 7 compuestos), apoprotolimonoides (con 3 compuestos), limonoides con anillo hemiacetal (con 3 compuestos), limonoides con anillo γ -hidroxibutenol (con 9 compuestos), zadironas (con 21 compuestos), homoazadironas (con 2 compuestos), geduninas (con 7 compuestos), Vilasininas (con 24 compuestos), nimbinas (con 11 compuestos),

nimboldidas (con 3 compuestos), nimbininas (con 5 compuestos), nimbolininas (con 6 compuestos), salaminas (con 12 compuestos), azadiractolas (con 7 compuestos), meliacarpinas (con 6 compuestos), meliacarpininas o azadiractinas'n (con 3 compuestos), y otros triterpenoides (serían 9 compuestos); de los esteroides presentes tenemos 8 compuestos (Ghiasuddin, 1993; M. Rasheed, 2002).

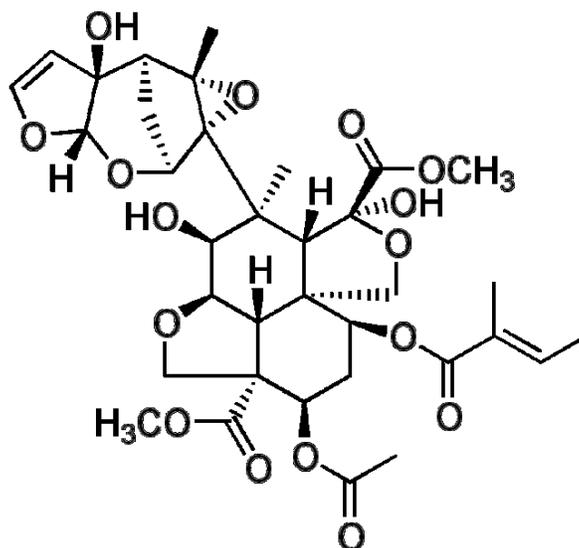


Figura 1-2 Estructura molecular de Azadiractina-A

1.3.2 Otros constituyentes diferentes a los terpenoides y esteroides

En este gran grupo encontramos una variedad de metabolitos como los hidrocarburos (con 14 compuestos), ácidos y sus derivados (con 7 compuestos), ácidos grasos y sus derivados (con 12 compuestos), cumarinas (con 7 compuestos), flavonoides (con 18 compuestos), poliacetatos (con 2 compuestos) y otros que corresponderían a 4 compuestos adicionales (Ghiasuddin, 1993; M. Rasheed, 2002)). De toda esta gama de compuestos contenidos en el A. indica, se han realizado diferentes bioensayos, encontrando actividades tales como antifúngica, antibacterial, antimalaria, antifertilidad de insectos, antipiréticos, antiinflamatorio, analgésicos antiulcerogénicos, antihipertensivos, antihiperlipémicos, neurofarmacológicos, antidermatofitos, hepatoprotectivo, inmunoestimulante, antioxidante, antígenotóxico, anticáncer y antialimentario en insectos (Biswas & Chattopadhyay, 2002; Cohen et al., 1996; Falasca & Bernabe, 2009; Gualtieri,

2004; Raguraman & Singh, 1999; Shultz et al., 1992; Subapriya & Nagini, 2005). Para destacar se puede mencionar como la azadiractina-A y el nimbolide presenta una buena actividad antioxidante y quimiopreventiva contra el cáncer con una buena actividad antitumoral (Biswas & Chattopadhyay, 2002; Priyadarsini, 2009). Por su capacidad insecticida, la azadiractina-A se ha utilizado en el control del vector *Anophelesgambiae* s.l., transmisor de la malaria como también con el microorganismo *Plasmodiumfalciparum* causante de ésta (Dua, 2009; Habluetzel, 2009; Omar, 2003; R.L, 2008; Sibley & Ringwald, 2006; Udeinya, 2006).

También se analizó su actividad como desparasitante del *Triatoma infestans*, vector de la leishmaniasis (chagas), haciendo que éste no transmita la enfermedad y no se pueda reproducir (Falasca & Bernabe, 2009; Habluetzel, 2009), así como el control de otros insectos que son vectores de varias afecciones de la salud de los humanos, como de animales domésticos (Guanasekaran, 2009). En otros estudios se han encontrado actividad antifúngica (Mohanty et al., 2008)

1.4 Estudios de fotodegradación de la azadiractina

Todos los análisis realizados han sido enfocados a la degradación de la azadiractina pura, con longitudes de onda específicas y en exposición continua, determinando su fotoproducto (Dureja & Johnson, 2000). Por otra parte, también se han reportado los tiempos de degradación total (Falasca & Bernabe, 2009) y el tiempo de vida media para esté metabolito tanto en exposición continua a una longitud de onda específica (254 nm), como a una exposición en todo el espectro de la luz solar (Johnson et al., 2003; Johnson & Dureja, 2002). En ningún tipo de publicación se ha hecho evidente el análisis de la degradación de los diferentes tipos de extractos de muestras que contengan a la azadiractina, como tampoco se han realizado análisis de ésta, dentro de estas matrices.

Los estudios que hacen mención de la fotodegradación de la azadiractina-A, están enfocados a los elementos que pudieran minimizar ésta, con la utilización de diferentes surfactantes (Johnson & Dureja, 2002; Srivastava & Srivastava, 2011), fotoestabilizantes (Johnson et al., 2003), y contenedores sólidos para su protección (J. Kumar & Parmar, 1999). Esta información ha sido ampliamente utilizada en la formulación de productos constituidos por azadiractina.

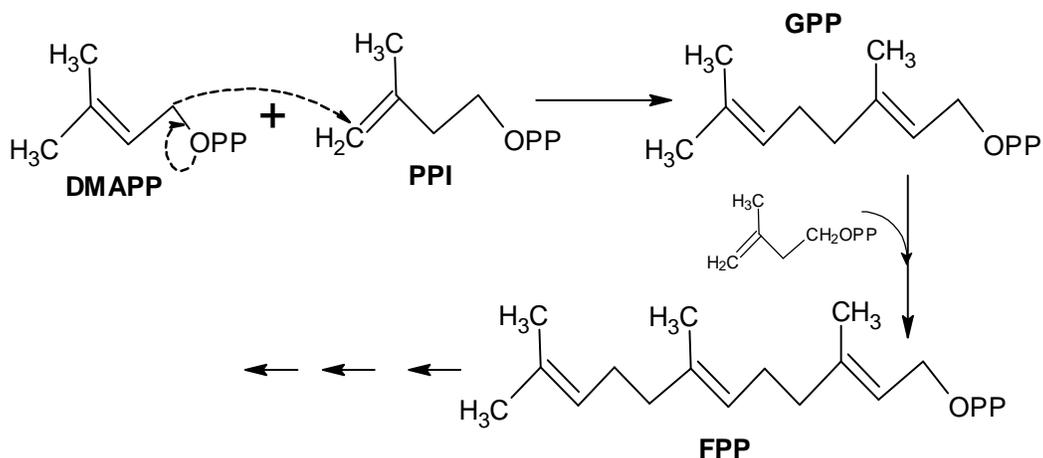


Figura 1-4 Biosíntesis de monoterpeno, geranil pirofosfato (GPP) y del sesquiterpeno, farnesil pirofosfato (FPP)

Basado en rutas propuestas en Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Ghiasuddin, 1993; Munawwer Rasheed, 2002

Ahora, a partir de la combinación de dos farnesil pirofosfatos (FPP) se forma el escualeno (SQ), con la ayuda de la escualenosintasa. El escualeno es el triterpenoide base para la formación de los limonoides. Dos moléculas de farnesil-pirofosfato, por acción de la sintetasa del escualeno, pierden los grupos pirofosfato, y uniéndose por los extremos donde existen los pirofosfatos, se forma el escualeno. Este consiste en una cadena de 24 carbonos con seis grupos metilo y 6 enlaces dobles.

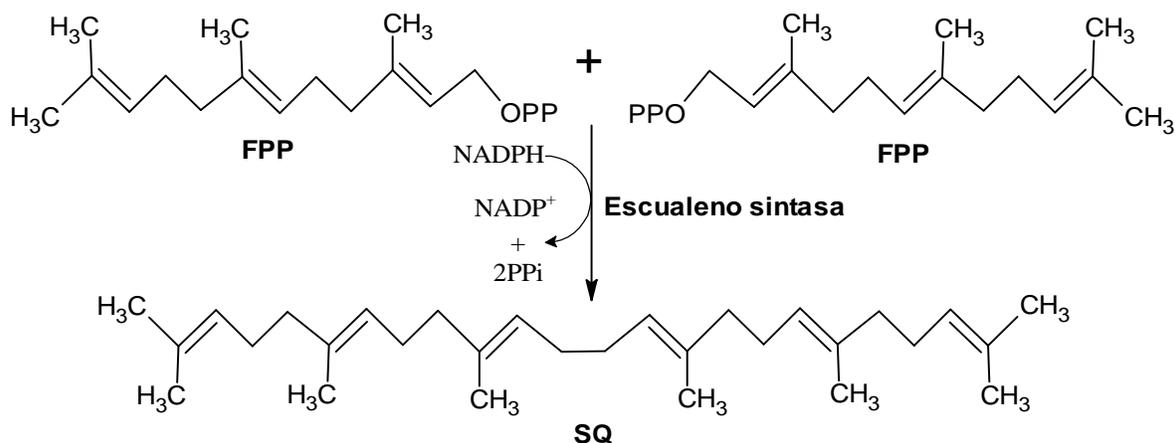


Figura 1-5 Biosíntesis de triterpeno, escualeno (SQ)

Basado en rutas propuestas en Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Ghiasuddin, 1993; Munawwer Rasheed, 2002

En el reacondicionamiento de la molécula, comienzan a surgir un gran número de reacciones. Para el caso específico ocurre la oxidación del SQ, formando el oxiescualeno (OS) y el dioxiescualeno (DOS).

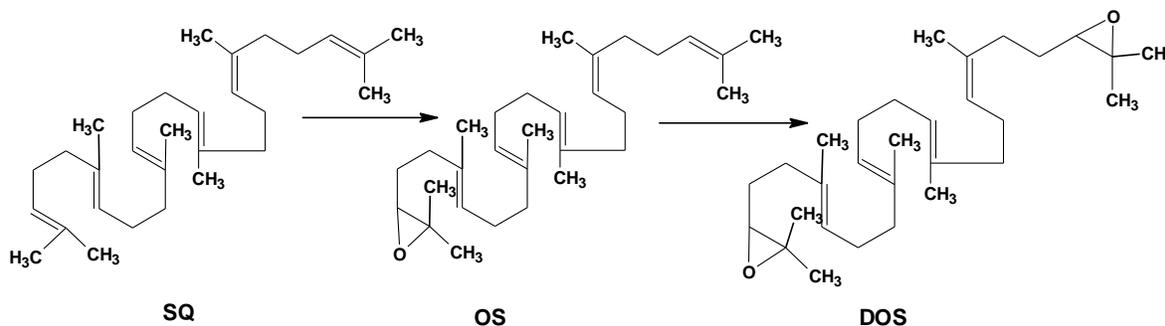


Figura 1-6 Síntesis del oxiesqualeno OS y el dioxiesqualeno DOS a partir del SQ

Basado en rutas propuestas en Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Ghiasuddin, 1993; Munawwer Rasheed, 2002

En este punto se encuentran diferentes posibles rutas metabólicas en la que se destaca la producción del damarandiol, apoyándose la biosíntesis en la ciclación Markovnikov y anti-Markovnikov para los ciclos de cinco y seis miembros respectivamente (Munawwer Rasheed, 2002).

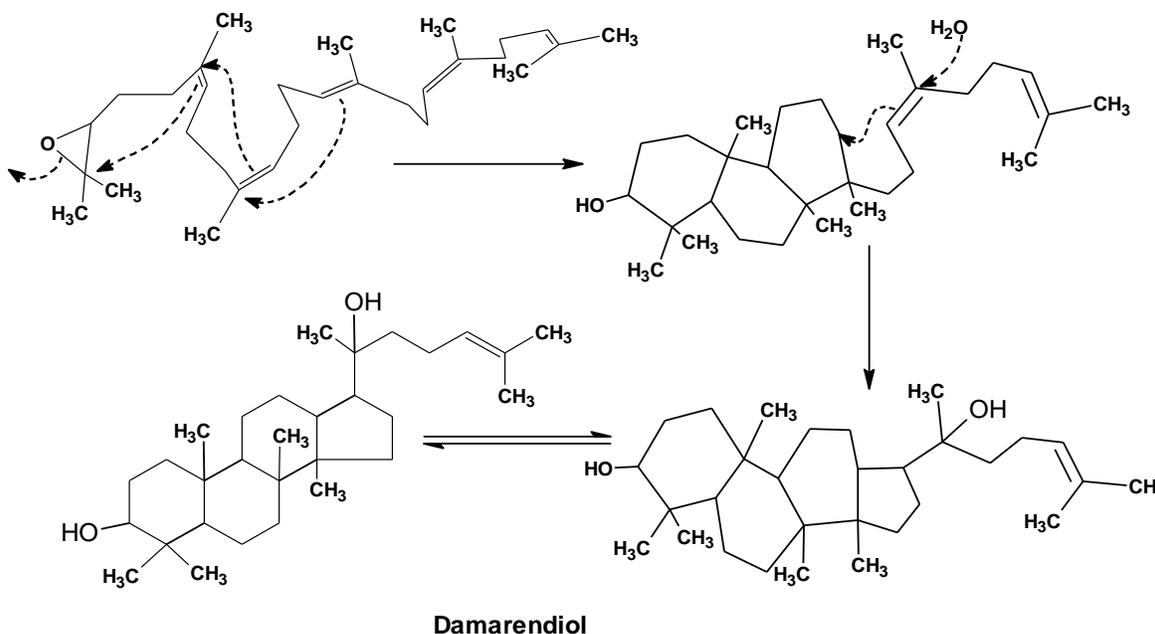


Figura 1-7 Biosíntesis damarendiol

Basado en rutas propuestas en Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Ghiasuddin, 1993; Munawwer Rasheed, 2002

Otra división de la anterior biosíntesis ocurre en la reacción previa, donde antes se produce el damarendiol. Esta nueva ruta conduce a la producción de eufano o de tirucanalo, siendo estos compuestos dos isómeros conformacionales, en el carbono 20.

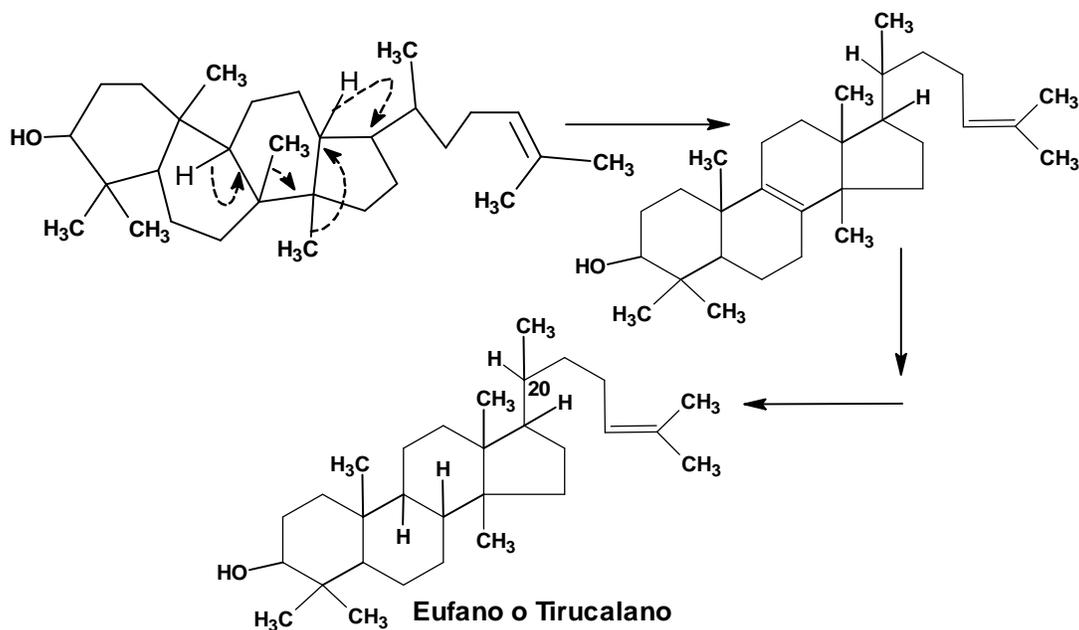


Figura 1-8 Biosíntesis del eufano (20R) ótirucalano (20S)

Basado en rutas propuestas en Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Ghiasuddin, 1993; Munawwer Rasheed, 2002

En este momento, biogenéticamente, estos metabolitos secundarios pueden tomar el camino para la producción del azadiractol, metabolito primigenio de los nortriterpenoides, donde se incluye la Aza-A.

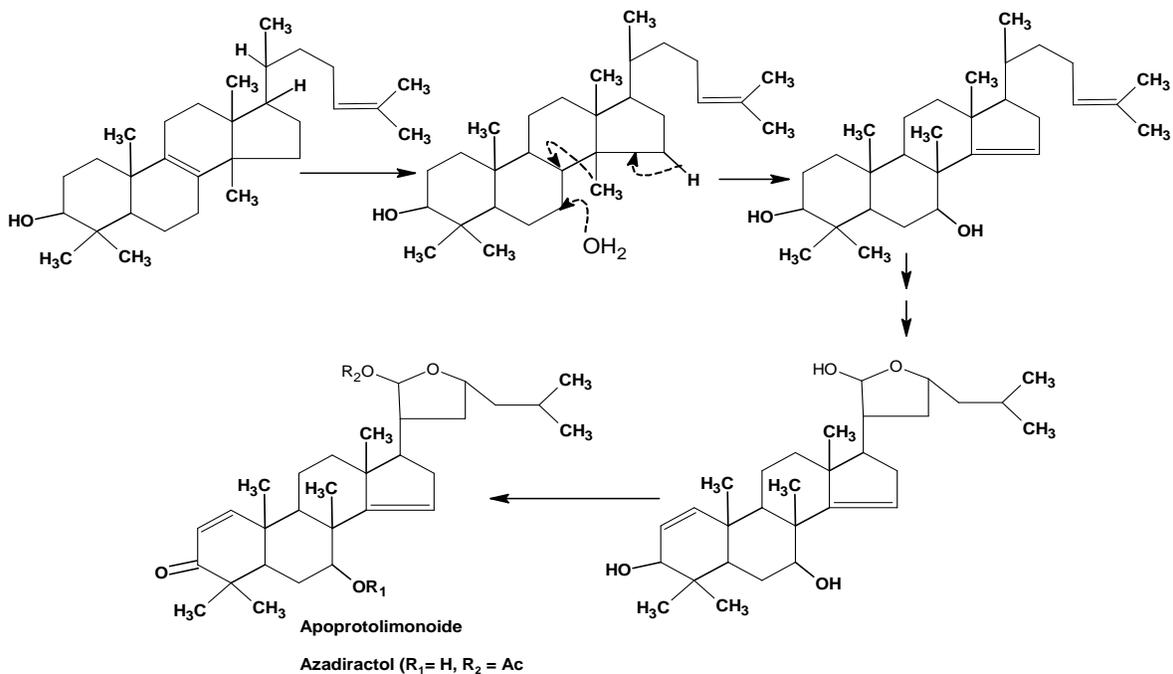


Figura 1-9 Biosíntesis del azadiractol

Basado en rutas propuestas en Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Ghiasuddin, 1993; Munawwer Rasheed, 2002

A partir del azadiractol, se comienza la síntesis de una serie de tetranortriterpenoides, algunos de los cuales se representan en la Figura 1-10.

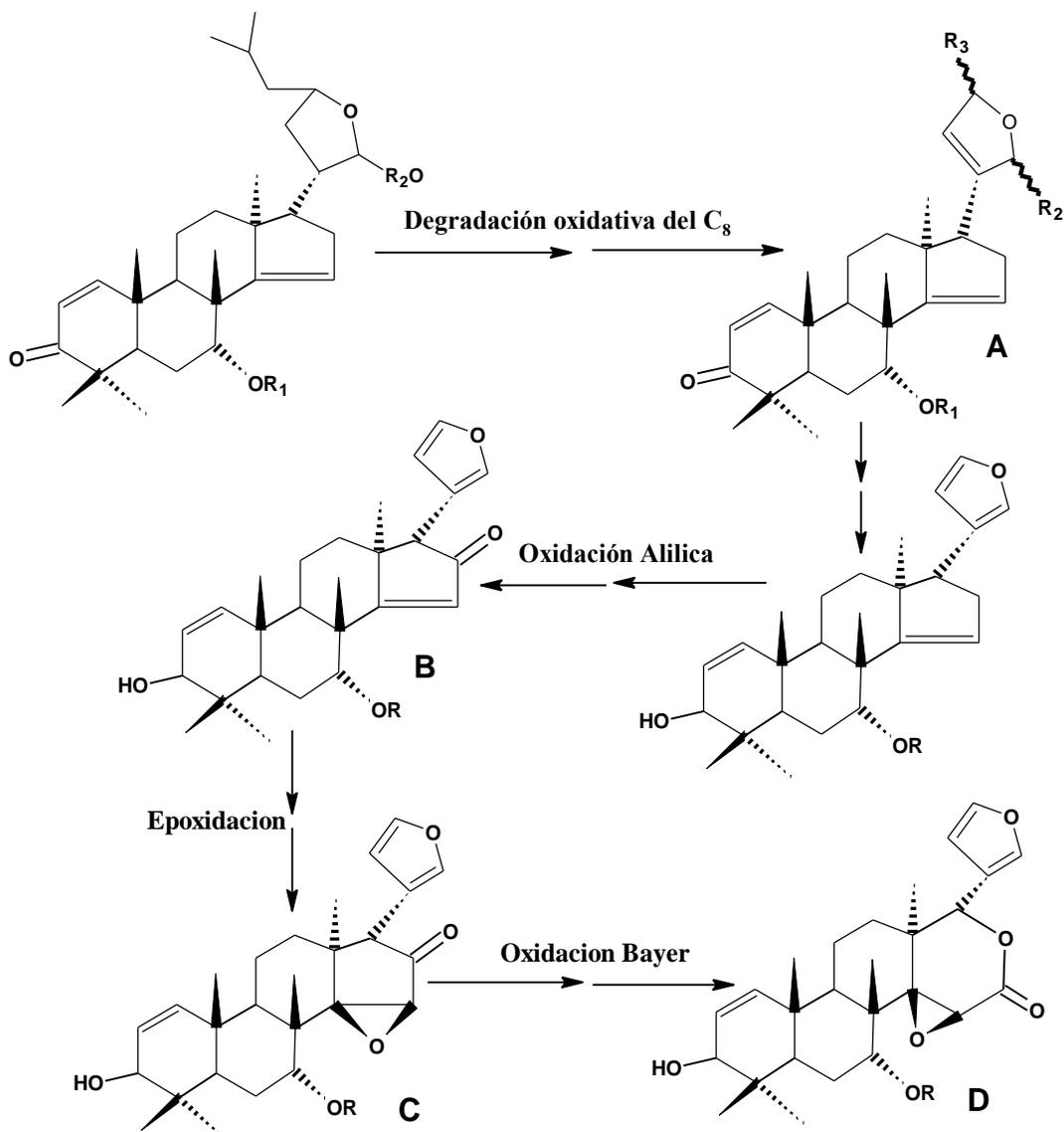


Figura 1-10 Biosíntesis de Tetranortriterpenoides

(A) Grupo Hemiacetal de tetranorapolimonoides (Limocin A, R₁=H, R₂=OMe, R₃=Ac) y (Limocin B, R₁=OMe, R₂=H, R₃=Ac); (B) Azadiradiona o Nimolicina (R=Ac); (C) Nimbinin, Nimolin o Epoxiazadiradiona (R=Ac); (D) Grupo Gedunino (R=Ac)

Basado en rutas propuestas en Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Ghiasuddin, 1993; Munawwer Rasheed, 2002

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

2.1.1 Subcultivo de las suspensiones celulares de *A. Indica*.

Las suspensiones celulares de *A. Indica* se iniciaron por transferencia en forma aséptica de 500 mg de callos friables de ocho (8) semanas de edad a matraces Erlenmeyers de 250 mL con una capacidad de 50 mL de medio líquido MS, sacarosa 3 % (p/v), glicina 2 mg/L, ácido nicotínico 0,5 mg/L, piridoxina-HCl 0,5 mg/L y tiamina-HCl 0,1 mg/L, ajustado a un pH de 5,8 y suplementado con los reguladores hormonales definidos (Capataz, 2005). Las suspensiones fueron incubadas en condiciones de oscuridad, 25 °C y 120 rpm en un agitador orbital (Centricol Ltda., Colombia). El subcultivo fue logrado mediante un tratamiento de sedimentación para retirar todo el medio de cultivo viejo y las células remanentes (sedimentadas) fueron suspendidas en medio fresco de igual volumen al retirado (sobrenadante). Suspensiones homogéneas se obtuvieron mediante la transferencia de 10 mL de suspensión celular a matraces Erlenmeyers de 250 mL pre-esterilizados en autoclave con 40 mL de medio fresco cada 10 días.

2.1.2 Almacenamiento de las células.

El material recuperado fue almacenado en matraces de 1.0 L, cubiertos para garantizar oscuridad absoluta y refrigerado a 5 °C; cuando se tenía el suficiente material biológico, éste se sometió a filtración, se liofilizó y posteriormente reunidos herméticamente para así ser congelados.

2.2 Obtención de extractos

El material liofilizado fue distribuido en matraces Erlenmeyers de 250 mL, a los cuales se les adicionó metanol suficiente para rebasar dicho material. Luego de esto el material se introdujo en un baño ultrasonido por un tiempo de 1 hora, garantizando la destrucción de las paredes celulares de la mayoría del material. Transcurrido este procedimiento, los matraces fueron colocados en una incubadora de agitador orbital manteniendo la temperatura constante a 25 °C durante 3 días: En este momento se retiró el líquido por filtración, se adicionó metanol nuevo, el material se introdujo en un baño ultrasonido nuevamente durante 30 minutos, repitiendo la misma serie de percolación hasta agotamiento del material celular. El filtrado, se llevó a vaporización a presión reducida, sometido a una temperatura de 30 °C, eliminando por completo el metanol. El extracto bruto se recogió y se almacenó en oscuridad a 5 °C hasta completar la cantidad suficiente para los experimentos de degradación. Finalmente el extracto se sometió a una extracción sólido-líquido con diclorometano, para luego ser filtrado, e inmediatamente vaporizado el exceso de diclorometano a presión reducida y 25 °C, recobrando con esto el extracto soluble en el diclorometano, el cual denominamos extracto madre.

De 138.247 ± 0.001 g de biomasa liofilizada de células de *Azadirachta indica* A. Juss se extrajeron 27.398 ± 0.001 g de extracto madre.

2.3 Experimentación de foto y termodegradación

2.3.1 Equipo

Se utilizó un fotorreactor diseñado por el investigador y fabricado por Centricol Ltda., Colombia, con la especificación de distancia entre la fuente lumínica y los extractos de 10.0 cm. Las fuentes utilizadas fueron, una lámpara de λ 254 nm, Germicidal lamp HNS 8W 65 G8T5/0F, con un máximo de emisión real de 253.2 nm marca OSRAM Puritec® y una intensidad de $56.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ y otra lámpara de λ 368 nm, Blacklight 368 F8w/T5/BL368, su máximo de emisión real de 368.9 nm marca SYLVANIA® con una intensidad de $78.5 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. Los espectros de emisión fueron tomados con un espectrómetro de fibra óptica lineal de diodos Chem 2000 de Ocean Optics®, para la detección de la intensidad de las lámparas se usó un radiómetro UVP®, modelo UVX, serie E29048 con detector UVX-25.

2.3.2 Condiciones de experimentación

Con el fin de determinar las mejores condiciones para el estudio se realizaron las siguientes consideraciones, con la realización de experimentos preliminares:

- Espectro de UV-Visible, con el fin de determinar los máximos de absorción del extracto metanólico de suspensiones celulares de *A. indica*, para con esto tratar de conseguir las fuentes luminosas lo más cercano posible a dichos máximos.
- Cromatogramas preliminares, para determinar los mejores intervalos de tiempo con los cuales sería más propicio hacer el análisis de degradación.
- La distancia de exposición entre las muestras y la fuente de irradiación fue determinada reproduciendo esta de los trabajos realizados Johnson y Dureja (Johnson et al., 2003; Johnson & Dureja, 2002).

A 1.8749 ± 0.0001 g de extracto madre se le adicionaron 300.00 ± 0.05 mL de metanol con una densidad de 0.765 g/mL, quedando la muestra madre de 8163.629 ± 0.005 ppm de extracto. De estos se tomaron 1.500 ± 0.001 mL, con 9.3745 mg del extracto madre disuelto y se adicionaron en cajas de Petri. Las cajas fueron llevadas al fotorreactor y se dejaron oscuridad absoluta hasta total evaporación del metanol a una temperatura de 30 °C. Paso siguiente las cajas se expusieron a las combinaciones de luz (0.0 nm, 254.0 ± 2.0 nm y 368.0 ± 2.0 nm) y temperatura (35 °C y 45 °C) determinada, durante el tiempo planeado para su exposición. Transcurrido el tiempo de exposición, el extracto de cada caja de Petri se diluyó con 2.000 ± 0.001 mL de metanol grado HPLC, obtenido de Merck® (Darmstadt, Germany), se transfirió un vial ámbar rotulado que se guardó a -4 °C para luego ser analizado.

La totalidad de los experimentos para la determinación de la foto y la termodegradación se realizaron con la utilización del gradiente 2 (sección 2.4.2). Para la obtención del extracto utilizado en estos experimentos se usó una mezcla de líneas celulares de suspensiones de *A. indica* existentes y cultivadas en el laboratorio de Crecimiento y Desarrollo Vegetal de nuestra universidad, garantizando así la independencia de los datos obtenidos.

2.4 Análisis químico

2.4.1 Equipo

Los análisis de cuantificación de la degradación, se realizaron en un equipo Shimadzu®, línea prominente UV-HPLC, equipado con un detector UV-PDA e índice de refracción y un inyector Shimadzu modular. Los datos se analizaron con el software **Unichrom™ V¹.versión libre**

2.4.2 Condiciones cromatográficas

Inicialmente se trabajó con un Gradiente 1 (Orozco, 2009) consistente en una fase móvil inicial acetonitrilo-agua (35:65) durante 10 min, momento en el cual la proporción cambió a acetonitrilo-agua (45:55) hasta el minuto 11. Luego, acetonitrilo-agua (70:30) en el minuto 14 y finalmente acetonitrilo-agua (35:65). La detección se realizó en UV a 213 nm, el volumen de inyección fue de 50.0 µL, con un flujo de 1.0 mL/min durante 15 minutos, a temperatura ambiente del laboratorio. Se utilizó una columna LichroCART 125-4 LiChrosper 100 RP-18 (125 mm x 4.6 mm D.I, diámetro de poro 5 µm) (Merck®, Alemania).

Se realizó la adecuación de un Gradiente 2, que garantizara la separación y una mejor definición de las señales: Para lograr esto se usó una fase móvil inicial de agua-acetonitrilo (30:70) (Giraldo et al, 2002), la detección se hizo en una longitud de onda de 214 nm, se usó un volumen de inyección de 50.0 µL con un flujo de 1.0 mL/min. La temperatura se estabilizó y mantuvo a 35 °C, la fase móvil final utilizada agua-acetonitrilo (90:10)(Giraldo et al., 2002) y el tiempo que tarda el gradiente es 30 min. Se utilizó una columna LichroCART 125-4 LiChrosper 100 RP-18 (125 mm x 4.6 mm D.I, diámetro de poro 5 µm) (Merck®, Alemania).

¹Unichrom™ system hardware, software and documentation belongs to New Analytical Ltd and is protected by Republic of Belarus and Russian Federation.
URL [http:// www.unichrom.com](http://www.unichrom.com)

2.4.3 Preparación del estándar de azadiractina-A

Se prepararon soluciones estándar de azadiractina-A (Sigma A 7430) a 381.318, 213.255, 72.723, 44.141, 21.333, 8.056 ppm utilizando como solvente Metanol HPLC de Merck® (Darmstadt, Germany). Estas soluciones fueron utilizados para construir las curva de calibración mostrada en la Figura 3-4, tanto con el gradiente 1 como con el gradiente 2.

2.4.4 Análisis estadístico de los resultados

Los experimentos y análisis se realizaron por triplicado. El diseño factorial se analizó mediante un ANOVA. Para las diferentes ecuaciones se calculó el coeficiente de regresión (R^2), el nivel de significancia del modelo (valor-p) y las diferentes significativas entre los tratamientos se analizaron mediante el test de Tukey. Para los análisis estadísticos se usó el software **R-project² versión 3.0 de libre distribución**

²R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios realizados a la Aza-A, referentes a su comportamiento cuando es sometida a irradiaciones lumínicas de 254 nm, muestran que la vida media reportada para esta es de 48 min (Dureja & Johnson, 2000; Johnson et al., 2003; Johnson & Dureja, 2002). En el presente capítulo se enseña el análisis de Aza-A y otros terpenoides realizado al extracto obtenido de las células en suspensión de *A. indica*, la evaluación de la foto y termodegradación del extracto y un análisis completo sustentado estadísticamente.

3.1 Análisis de azadiractina y otros terpenoides en el extracto metanólico de células en suspensión de *A. indica*

La tabla 3-1, presenta el contenido de azadiractina en diferentes líneas de callos y células en suspensión de *A. indica* existentes en nuestro laboratorio, determinados mediante el gradiente 1 (Gloria Orozco-Sánchez; Yohanneth Reyes, 2013).

Tabla 3-1 Caracterización química y biológica de las líneas celulares de *A. indica* existentes en el Lab. de Crecimiento y Desarrollo Vegetal.

Líneas	Aza (mg/g)	I.A. (%)
S24C	0.277±0.095	92±8
S24A	0.025±0.009	83±11
S26	0.060±0.006	62±18
S27	0.105±0.022	82±9
S29	0.272±0.055	83±16
SNV3	0.191 ±0.018	100±0
SNV2	1.013 ±0.167	100±0
SNV1	0.290±0.074	80±18
CNV3	0.017±0.002	63 ±16
CNV2	0.000±0.029	33±27
CNV1	0.115±0.008	67±16

Aza = Azadiractina-A; I.A. = Índice antialimentario; S = Suspensiones celulares; C = Callos de células.

Análisis realizados a las diferentes líneas celulares con las que está trabajando nuestro grupo de investigación. Tomado del trabajo experimental de Yoanneth Paola Reyes y Gloria Orozco Sánchez.

Las evaluaciones biológicas del extracto alcohólico de las hojas y de los extractos intracelulares de callos y suspensiones celulares, se hicieron siguiendo la metodología empleada en nuestro laboratorio por Capataz (2005) con larvas de *Spodoptera frugiperda* en estado L2 (Capataz, 2005; Orozco S, 2013):

$$I. A. = \frac{Adcc - Adct}{Adcc + Adct} \times 100 \quad \text{Ec. 3-1}$$

Siendo:

I.A.: efecto o índice antialimentario.

Adcc: el área del disco control, consumida.

Adct: área del disco con tratamiento, consumida.

Una mezcla de la biomasa de estas líneas celulares, fue la que se utilizó para obtener el extracto metanólico, con el que se realizó la presente tesis para garantizar la aleatoriedad en el muestreo. Debe anotarse que aunque algunas líneas celulares presentaron un contenido muy bajo o nulo de azadiractina, conservaron una importante actividad biológica sobre el gusano cogollero del maíz. Lo anterior sugiere la presencia de otros terpenoides diferentes a la azadiractina con efecto antialimentario sobre este gusano (Orozco S, 2013).

Para la determinación del comportamiento del extracto metanólico de las suspensiones celulares en referencia frente a la exposición lumínica y térmica, fue necesario adoptar un nuevo gradiente de elución en la fase móvil en el cromatógrafo, para lograr observar una mayor cantidad de señales definidas. En las Figura 3-1 y Figura 3-2, se pueden comparar los cromatogramas utilizando ambos gradientes. Con el gradiente 2 Figura 3-2, se pueden diferenciar un mayor número de señales, las cuales, como se verá en la siguiente sección, muestran un comportamiento característico cuando son sometidas a luz y calor.

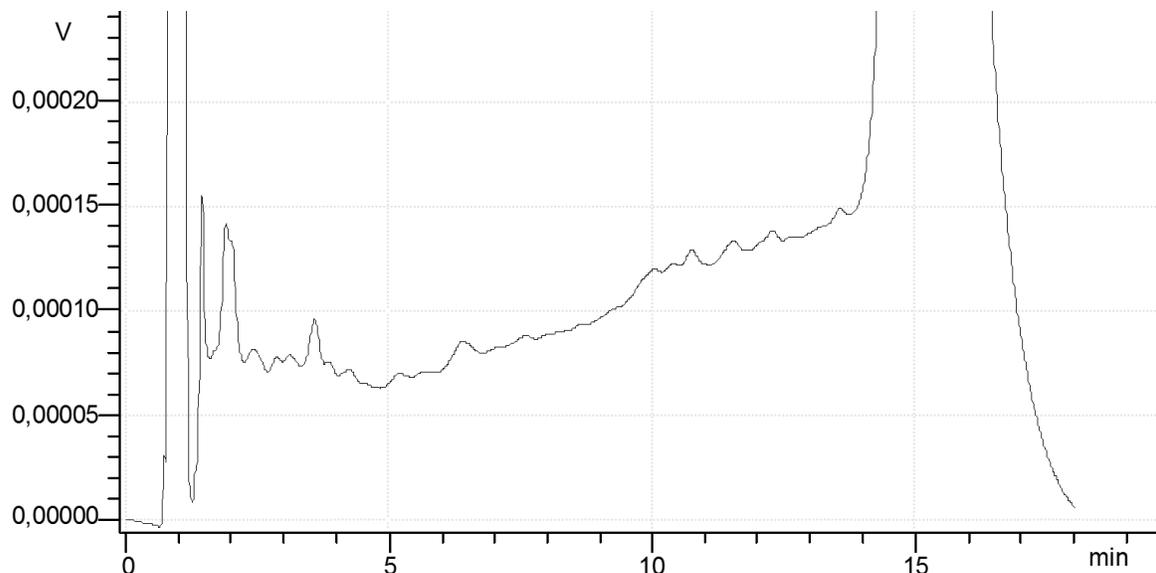


Figura 3-1 Cromatograma extracto metanólico de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* A. Juss, gradiente 1

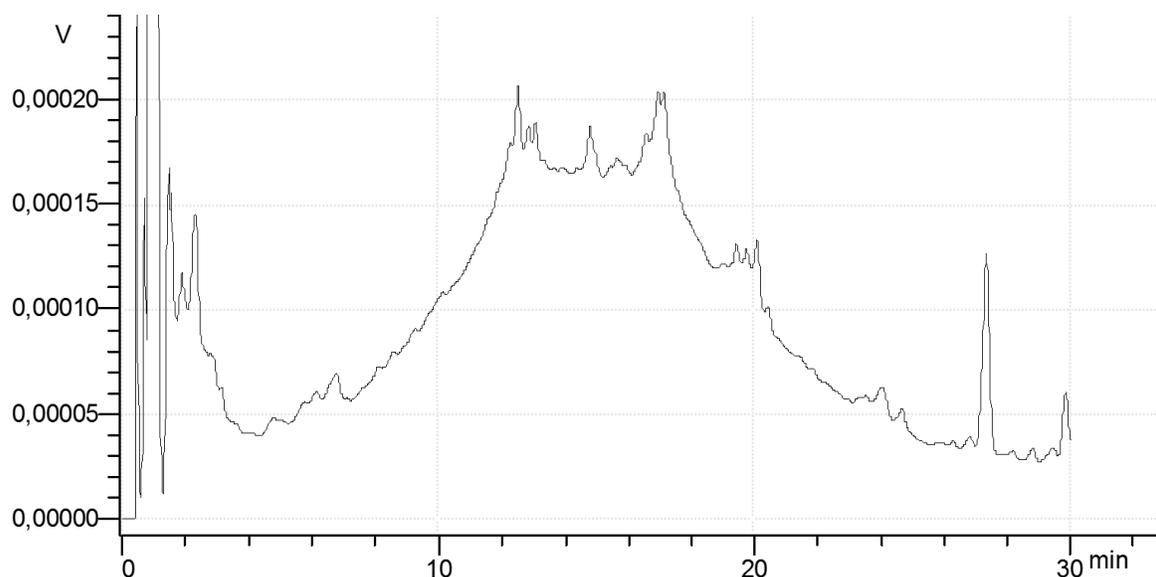


Figura 3-2 Cromatograma extracto metanólico de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* A. Juss, gradiente 2

Con el gradiente 1 es el utilizado para identificar la azadiractina en un tiempo de retención de 5.8 min. El cromatograma presentó 19 señales no muy definidas, correspondientes a un mínimo de 19 compuestos, los cuales en su mayoría fueron identificados como terpenoides (Orozco, 2009). Mediante el gradiente 2 se logró mayor separación, observándose un mayor número de señales (57 picos), correspondientes a mínimo 57 compuestos puros, lo cual facilita la determinación de la degradación de los terpenoides presentes en el extracto.

Como se mostrará posteriormente, 13 de las señales anteriores fueron las más definidas, y se le hizo un seguimiento en los estudios de degradación. Seis de estas señales se repitieron en la totalidad de los experimentos (señales 1, 2, 3, 4, 5 y 7). Presentando un comportamiento de degradación y una señal adicional (señal 6), presento comportamiento de producción de este Figura 3-3.

En las siguientes secciones del presente trabajo se designará a cada una de estas señales como “compuesto”, aunque se sabe que esto no necesariamente es cierto ya que puede ser una mezcla de varios de ellos.

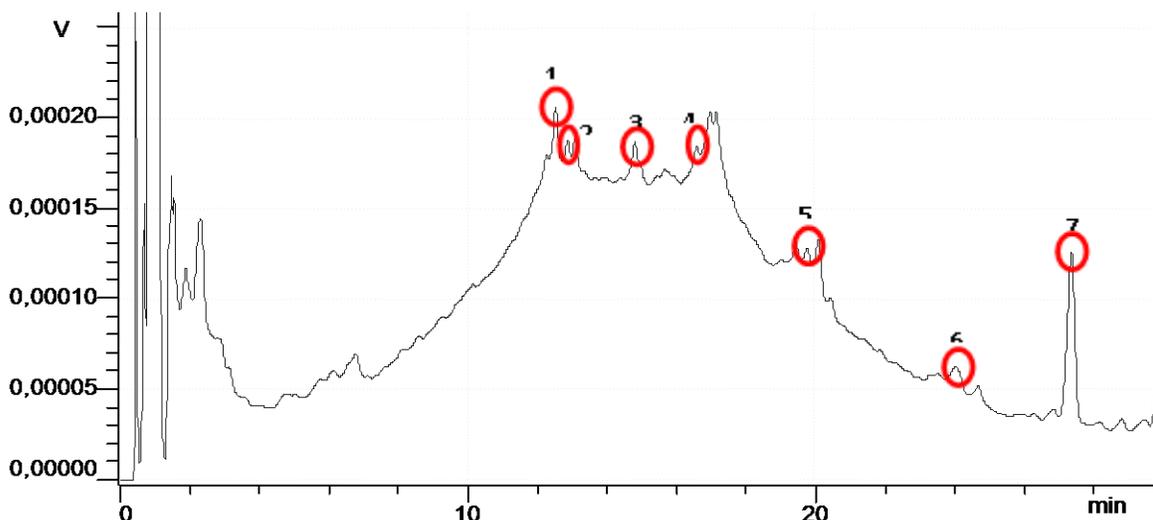


Figura 3-3 Señales analizadas en cromatograma de extracto metanólico de *Azadirachta indica* A. Juss, gradiente 2

Todos los análisis realizados, están basados en los datos obtenidos por medio del equipo HPLC-UV, un ejemplo de los cromatogramas está representado en la Figura 3-3, En éste se especifica las señales a las cuales se les determinó su comportamiento en los diferentes tratamientos de degradación.

En la Tabla 3-2 se muestra una relación porcentual de estos picos con respecto a la totalidad de las señales y la cantidad estimada de cada compuesto esta expresada en miligramos equivalentes de Aza-A (mg eqA), relacionando las alturas con la obtenida en la curva de calibración para la Aza-A, que se enseña en la Figura 3-4, donde se utiliza la $Y = 2.5024 \times 10^{-5}X - 2.0976 \times 10^{-4}$ Ec. 3-2, siendo Y la altura y X la concentración en ppm.

$$Y = 2.5024 \times 10^{-5}X - 2.0976 \times 10^{-4} \quad \text{Ec. 3-2}$$

Tabla 3-2 Composición relativa de los compuestos seleccionados para los estudios de degradación usando el gradiente 2

(Composición expresada en porcentaje y en miligramos equivalentes de azadiractina-A, mg eqA)

Número de señal o compuesto	Tiempo de retención (min)	Altura (mV)	Composición (%)	Composición (mg eqA/kg extracto)
Azadiractina	7.9	N.D.	N.D.	N.D.
1	12.4	0.20	1.6	1273.0
2	12.8	0.18	1.5	1148.9
3	14.8	0.17	1.5	1134.0
4	16.5	0.17	1.4	1101.9
5	19.7	0.11	0.9	719.8
6	24.0	0.04	0.3	264.8
7	27.3	0.10	0.8	659.7
50 señales restantes		11.0	91.9	71588.8

N.D. No Detectado.

La composición de los anteriores “compuestos” (mg eqA/kg_{Extracto}) fue estimada con la curva de calibración de la azadiractina, que se representa en la Figura 3-4.

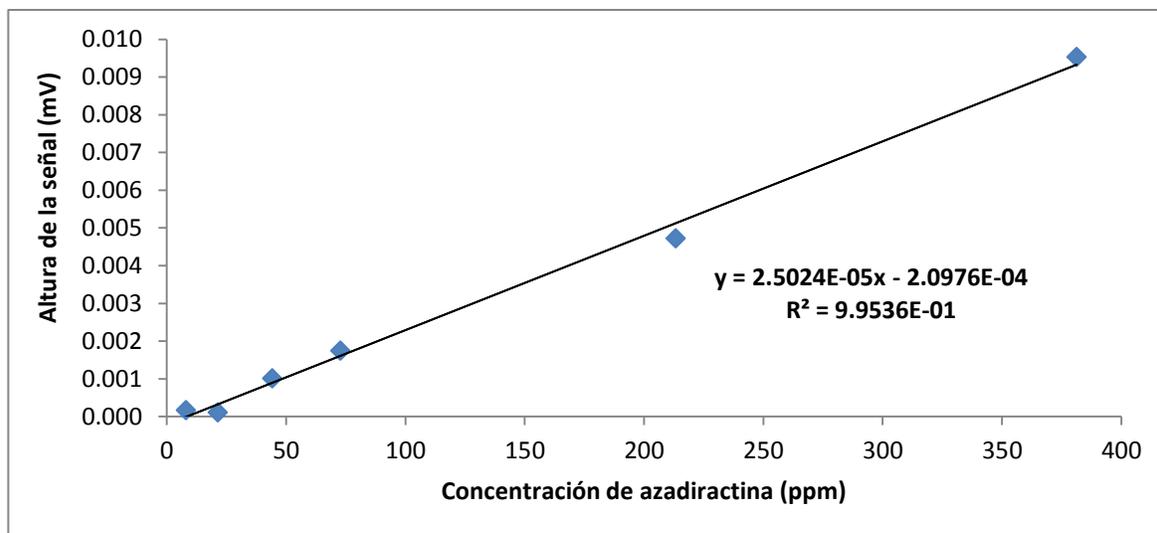


Figura 3-4 Curva de calibración de Azadiractina-A construida con el gradiente 2

La curva de calibración presentada en la Figura 3-4 fue construida con el análisis cromatográfico realizado al estándar de azadiractina-A, cuyo cromatograma tiene la forma mostrada en la Figura 3-5.

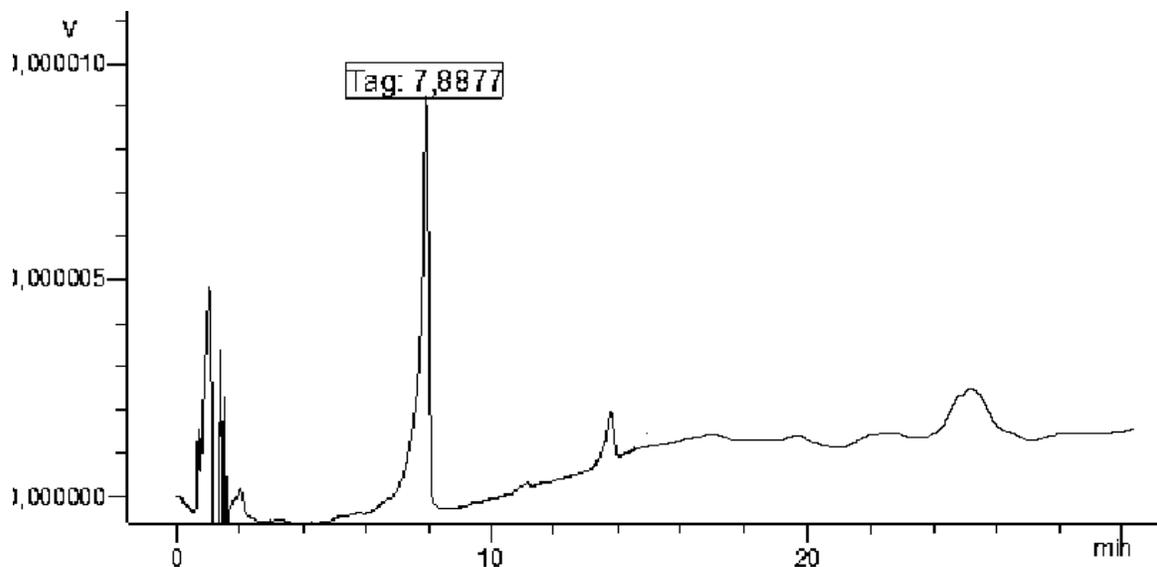


Figura 3-5 Cromatograma del estándar de azadiractina-A usando el gradiente 2

De esta manera, se muestra la existencia de Aza-A en el extracto, por medio del gradiente 1, así como la cuantificación de algunos de los demás compuestos con respecto a la cantidad de Aza-A, con ambos gradientes 1 y 2, observándose mejor resolución de los compuestos con el último gradiente.

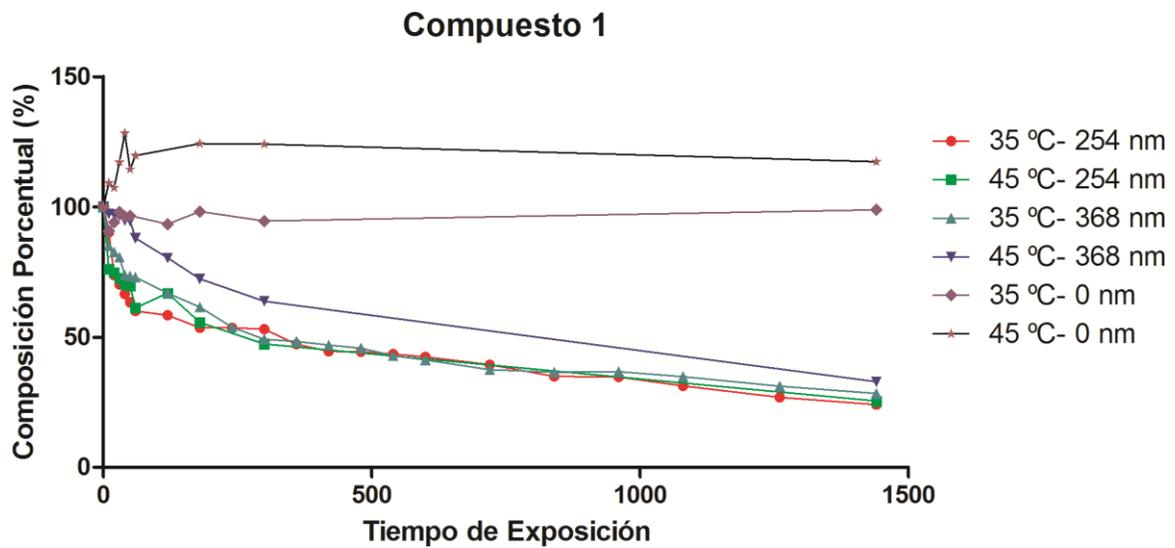
3.2 Resultados de los experimentos de la foto y termodegradación del extracto metanólico de células de *A. indica*.

Diferentes muestras del extracto metanólico de células de *A. indica* fueron sometidas a tratamientos térmicos y lumínicos durante 1440 min (24 horas). La variación en la composición del extracto fue analizada mediante el gradiente 2. Las figuras 3-6 a 3-12 presentan el comportamiento de la composición porcentual de los siete compuestos seleccionados anteriormente. En las Figura 3-6 A se muestra el comportamiento de la muestra 1 en cada uno de los seis tratamientos a los que fue sometido. Se ve un proceder particular de las muestras cuando se encuentran sometidas únicamente a la interacción de la temperatura, exponiendo la nulidad de cualquier comportamiento. Siendo su variabilidad debido exclusivamente a la aleatoriedad de las muestras usadas en el proceso para estos tratamientos. Con respecto a los otros cuatro experimentos se ve una degradación considerable, siendo el ejercicio de exposición a 45 °C y 368 nm, el proceso más lento en comparación de las otras tres operaciones, en la que se desarrolla intensivamente este proceso de degradación, antes de las dos primeras horas. Éste comportamiento se atenuó

durante las dos siguientes horas, momento en el cual se comienza a disminuir significativamente la pendiente con la cual se venía moviendo su comportamiento,

En la Figura 3-6 B se muestra un gráfico de barras comportamiento promedio para el compuesto 1 en todos sus tratamientos, ratificando como se expuso anteriormente el comportamiento particular de las muestras cuando se encontraban en ausencia de luz y sometidos a 35 °C y 45 °C, respectivamente, así como el conducta de las muestras en los demás tratamientos.

A



B

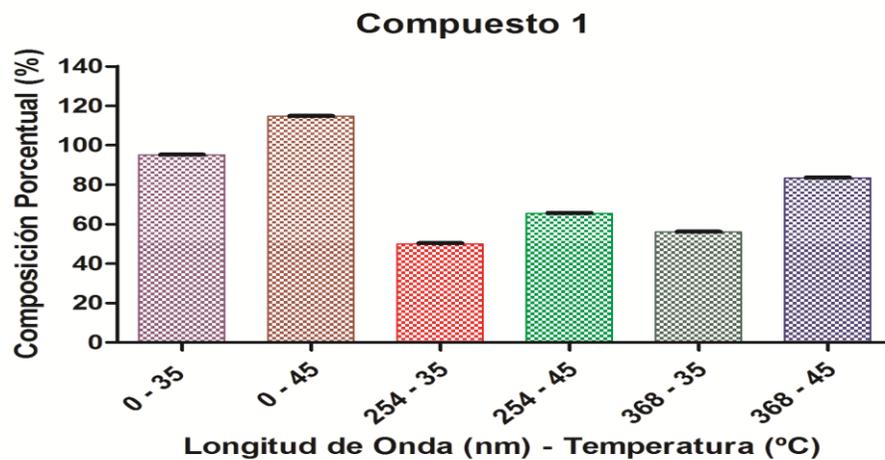
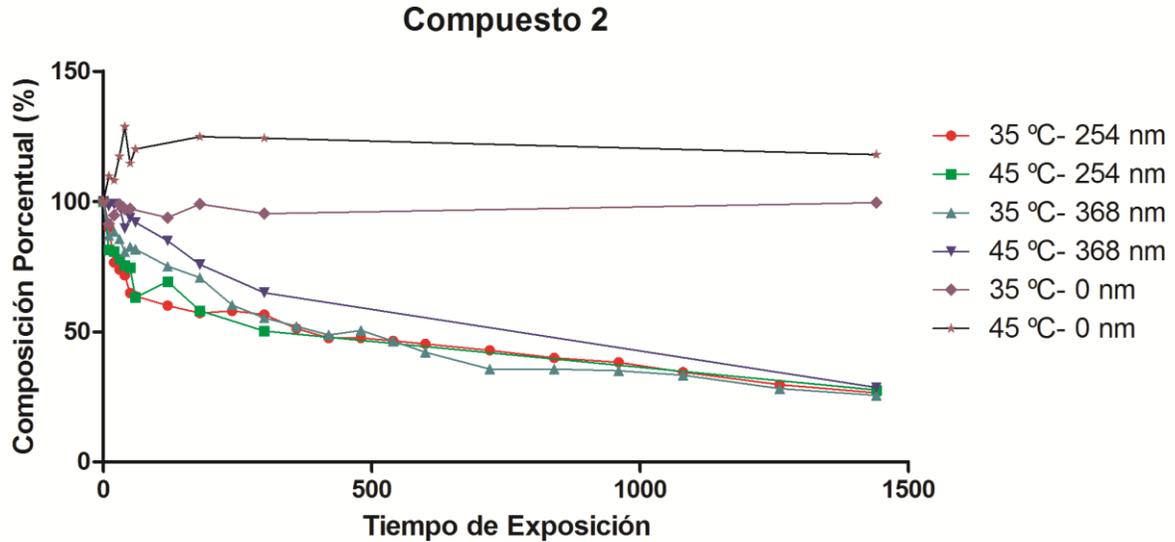


Figura 3-6 Variación en la composición del compuesto 1 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de *A. indica*.

(A) Perfiles de composición porcentual en cada uno de los seis tratamientos. (B) Gráfico de barras del promedio porcentual en los seis tratamientos.

Las figuras 3-7 a la 3-10 presentan el comportamiento mostrado por los compuestos 2 al 5, el cual fue similar al hallado para el compuesto 1.

A



B

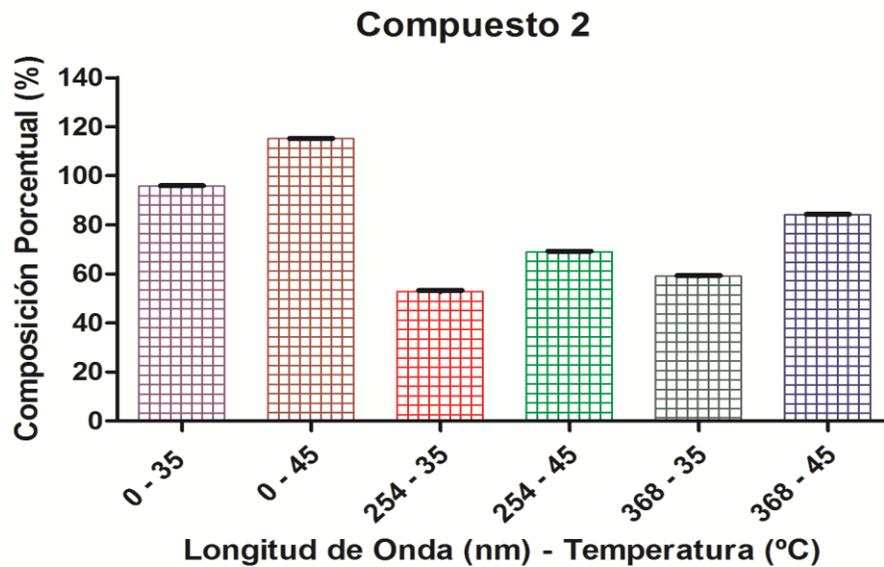
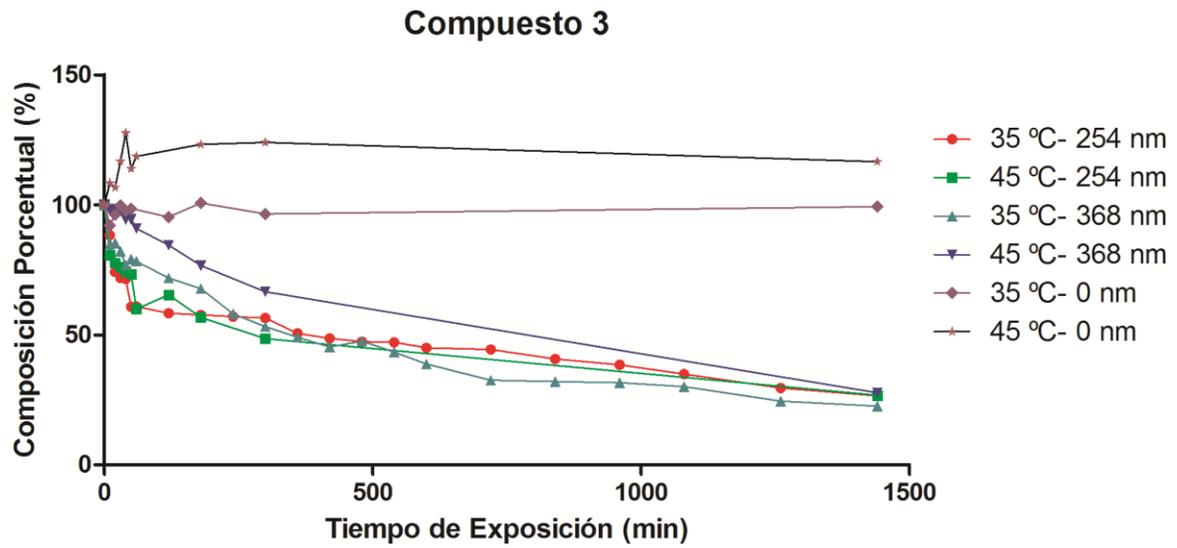


Figura 3-7 Variación en la composición del compuesto 2 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de *A. indica*.

(A) Perfiles de composición porcentual en cada uno de los seis tratamientos. (B) Gráfico de barras del promedio porcentual en los seis tratamientos.

A



B

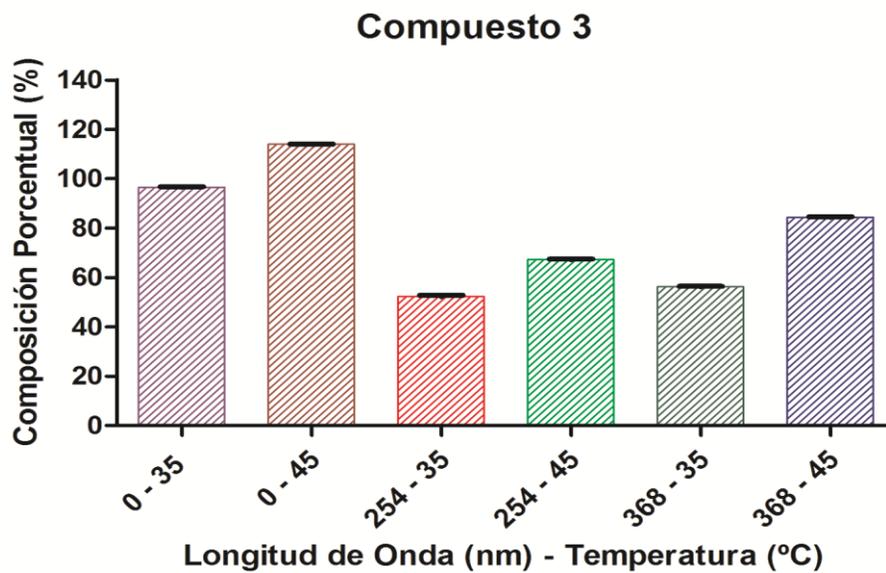
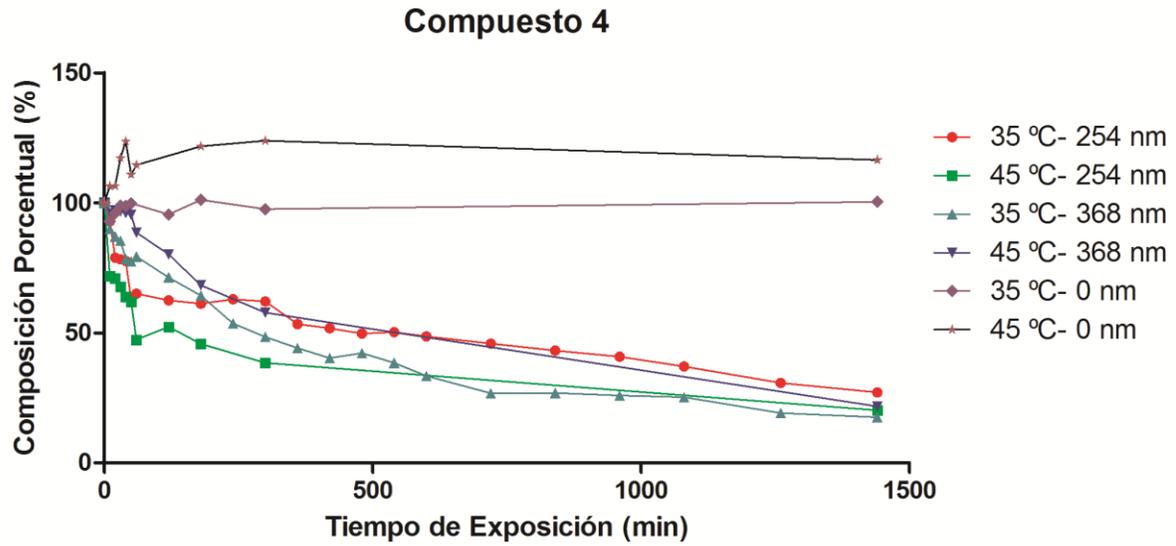


Figura 3-8 Variación en la composición del compuesto 3 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de *A. indica*.

(A) Perfiles de composición porcentual en cada uno de los seis tratamientos. (B) Gráfico de barras del promedio porcentual en los seis tratamientos.

A



B

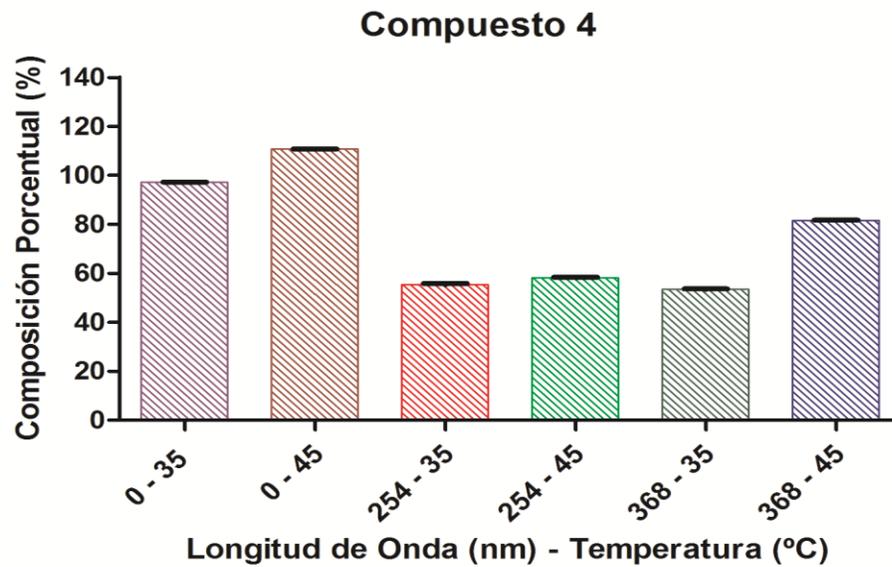
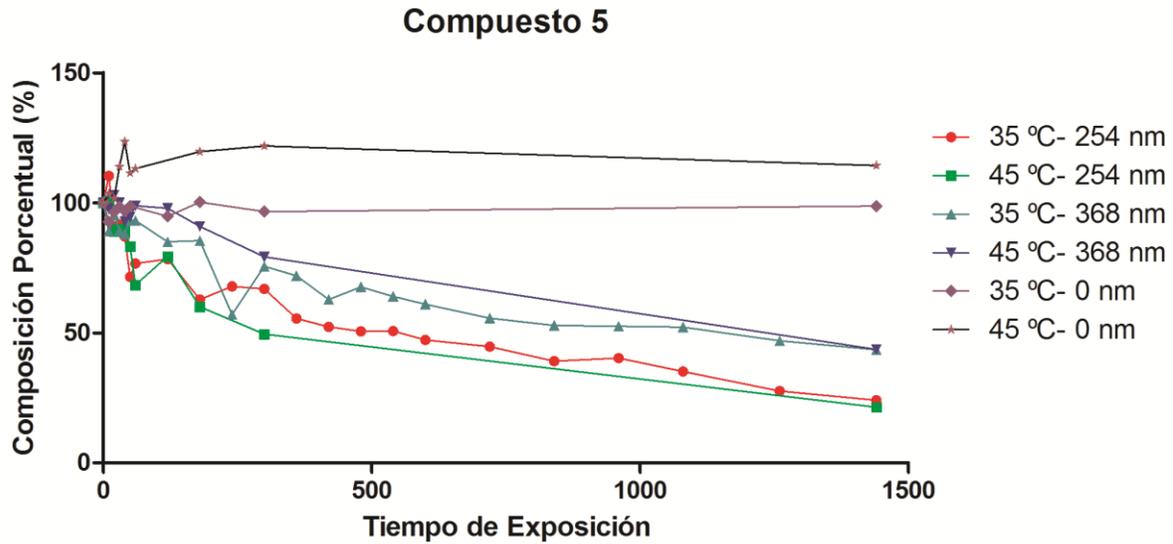


Figura 3-9 Variación en la composición del compuesto 4 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de *A. indica*.

(A) Perfiles de composición porcentual en cada uno de los seis tratamientos. (B) Gráfico de barras del promedio porcentual en los seis tratamientos.

A



B

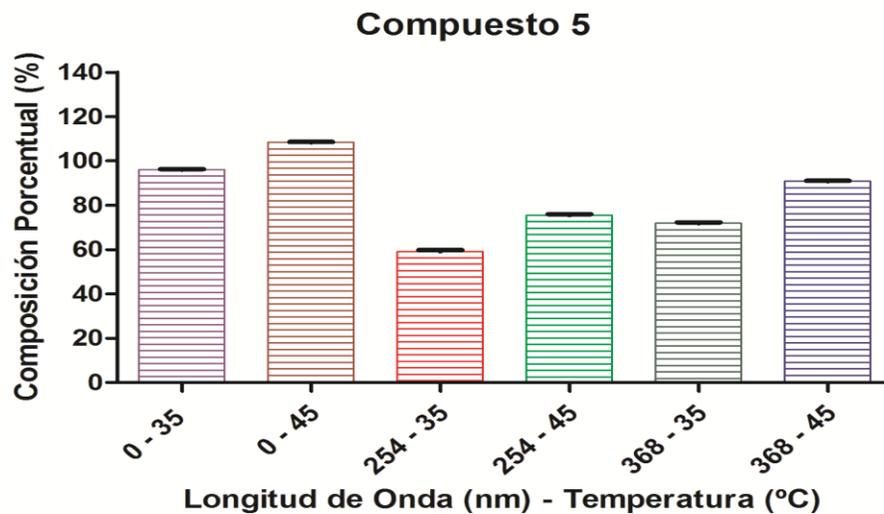
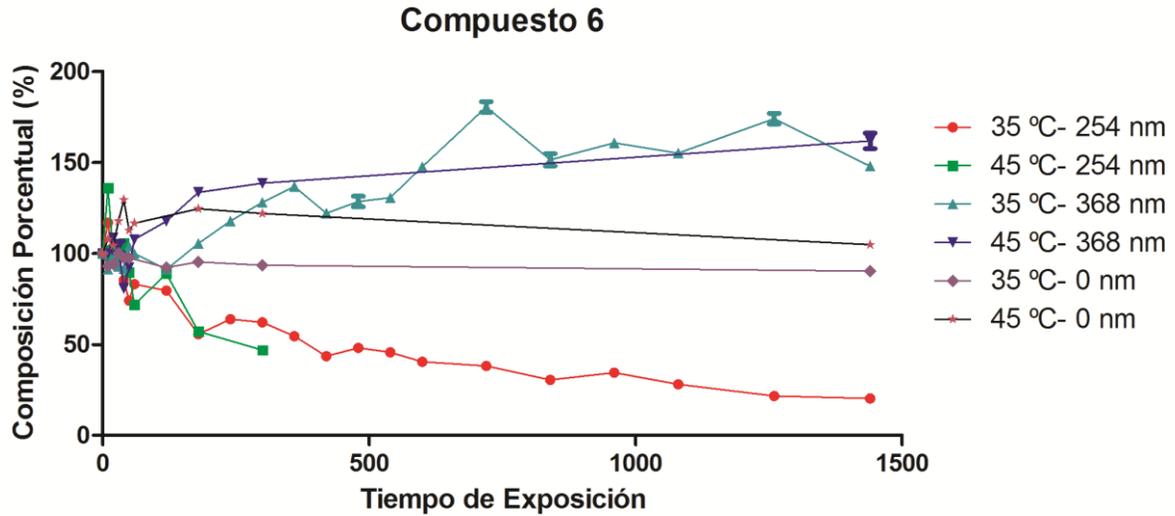


Figura 3-10 Variación en la composición del compuesto 5 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de *A. indica*.

(A) Perfiles de composición porcentual en cada uno de los seis tratamientos. (B) Gráfico de barras del promedio porcentual en los seis tratamientos.

La Figura 3-11, revela algo completamente nuevo a lo presentado anteriormente, ya que en las condiciones de irradiación de 368 nm, se produce el compuesto seis, tanto para una temperatura de 35 °C como la de 45 °C. El comportamiento de este compuesto en ausencia de luz, es similar al presentado con los anteriores compuestos, viéndose su fluctuación debido a la aleatoriedad. Ahora, para la muestra que fue sometida a 254 nm de incidencia lumínica, así como 45 °C, se deja de detectar su señal a partir de la quinta hora.

A



B

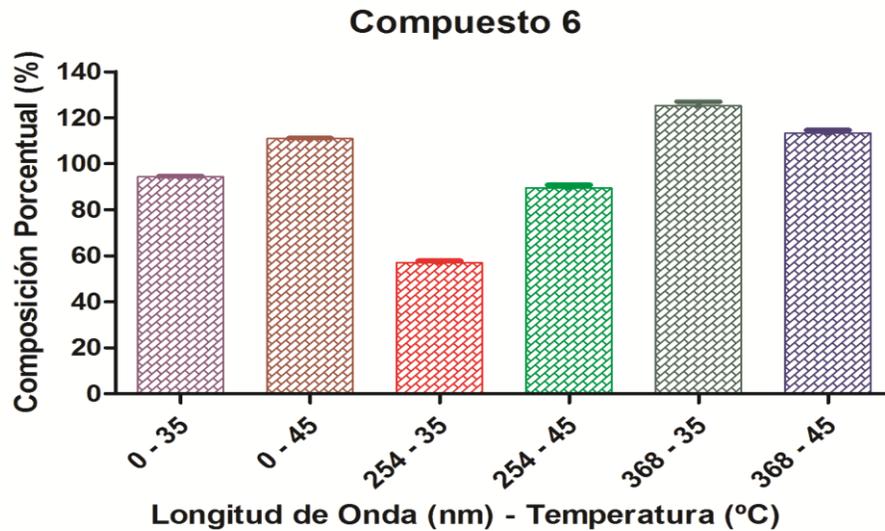


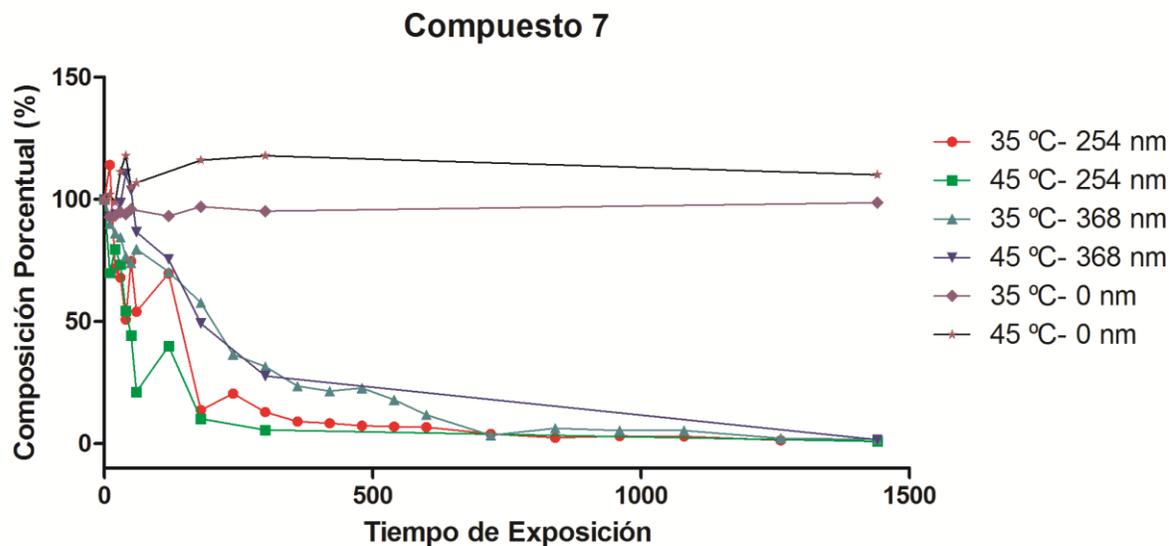
Figura 3-11 Variación en la composición del compuesto 6 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de *A. indica*.

(A) Perfiles de composición porcentual en cada uno de los seis tratamientos. (B) Gráfico de barras del promedio porcentual en los seis tratamientos.

Para el compuesto siete mostrado en la Figura 3-12, se observa que a 35 °C y 254 nm, se degradó dramáticamente hasta la quinta hora, momento en el cual se asintótiza, disminuyendo su pendiente con la cual venía. Algo similar ocurre con este compuesto a la misma longitud de onda, pero con la temperatura de 45 °C, la diferencia mostrada es que la caída vertiginosa del porcentaje ocurre antes de transcurrir las tres horas de exposición, a partir de este instante toma el mismo proceder que adoptó la muestra a 35 °C y 254 nm. Los experimentos en los cuales la exposición fue 368 nm a 35 °C y 45 °C, el

comportamiento del compuesto es similar entre las dos exposiciones, en el cual se ve que la rata de degradación es menor con respecto a las mostradas, cuando se mencionó las irradiaciones anteriores. Cuando la muestra es sometida a oscuridad en las dos temperaturas, el compuesto siete presenta el mismo comportamiento mostrado por los demás compuestos en estas condiciones.

A



B

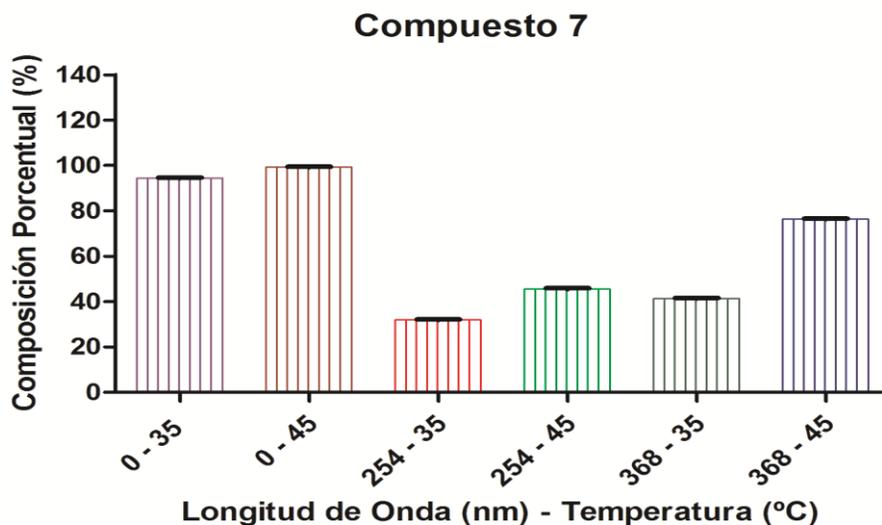


Figura 3-12 Variación en la composición del compuesto 7 en los experimentos de degradación del extracto metanólico de células de *A. indica*.

(A) Perfiles de composición porcentual en cada uno de los seis tratamientos. (B) Gráfico de barras del promedio porcentual en los seis tratamientos.

3.3 Determinación de constantes de velocidad y de la vida media de los compuestos en los experimentos de foto y termodegradación.

Para la determinación del tiempo de vida media (τ) del extracto metanólico de *A. indica* se tomaron dos vías a partir de los resultados obtenidos experimentalmente. Primero, modelando la degradación con una cinética de primer orden, basándose el análisis en el método Pearson and Moore (J. W. Moore, 1980) y segundo, modelando la concentración del compuesto con el tiempo, ajustando una ecuación para cada experimento, la cual permitió determinar el tiempo en el que se tuvo el 50 % de la concentración, basándose este último análisis en la ley de las diluciones de Ostwald (Ostwald, 1888, 1889).

3.3.1 Evaluación de las cinéticas de primer orden, método Pearson y Moore

Este primer método, la obtención del tiempo de vida media de los compuestos se obtuvo hallando la correlación existente entre una propiedad física (absorbancia de los compuestos expresada en mV) con la concentración real de cada compuesto (J. W. Moore, 1980; Ruiz, 2014). Para el uso de este método es indispensable precisar que cualquier medida física utilizada como criterio del grado de avance de una reacción, cambie significativamente durante la reacción. Otra exigencia es que la propiedad cambie de alguna manera simple con la concentración de reactantes y productos. Así, se debe relacionar la cantidad física medida con la variable de reacción, como lo expresan Pearson y Moore en el capítulo dos del libro *Kinetic and Mechanism* (J. W. Moore, 1980). Inicialmente es necesario definir el grado de una reacción ξ (mol) como:

$$\xi = \left(\frac{n_B - n_{B,0}}{\nu_B} \right) \text{Ec. 3-3}$$

Aquí B representa la sustancia que participa en la reacción y se toma como referencia

ν_B : Es el coeficiente estequiométrico (positivo para productos y negativo para reactivos)

n_B (mol): Cantidad de sustancia B.

$n_{B,0}$ (mol): Cantidad de B al inicio de la reacción cuando $\xi = 0$

La velocidad de reacción $\dot{\xi}$ (mol/s), es definida como la tasa temporal de incremento del grado de la reacción, según:

$$\dot{\xi} = \frac{d\xi}{dt} = \nu_B^{-1} \frac{dn_B}{dt} \quad \text{Ec. 3-4}$$

Es conveniente trabajar a la velocidad como una propiedad intensiva (independiente del volumen del sistema) Por tanto la velocidad (ν) de reacción por unidad de volumen se define así:

$$\nu_B = \frac{dC_B}{dt} = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{Ec. 3-5}$$

ν (mol/(L•s)), mide el cambio de la concentración por unidad de tiempo de reacción. Además se define x como el grado de la reacción en términos de la concentración (mol/L).

$$x = -\xi/V \quad \text{Ec. 36}$$

Siendo V el volumen (L). Cualquier reacción puede ser escrita como:

$$0 = \sum_B \nu_B B \quad \text{Ec. 3-7}$$

Sabiendo que B representa a los compuestos que intervienen en la reacción, sean reactivos o productos. Si tenemos el reactante A, para formar Z y podemos escribir:

$$-\nu_A A = \nu_Z Z \quad \text{Ec. 3-8}$$

Expresando las concentraciones en términos de x , tenemos:

$$C_A = a + \nu_A x \quad \text{Ec. 3-9}$$

$$C_Z = \nu_Z x \quad \text{Ec. 3-10}$$

Siendo C_A y C_Z la concentración de A y Z respectivamente y teniendo en cuenta que (a) representan la concentración inicial del reactante, y se asume que inicialmente no hay producto (z); cuando A, ha reaccionado en su totalidad tendremos, que las unidades para todos estos factores son mol/L:

$$C_A = 0 = a + \nu_A x \quad \text{Ec. 3-11}$$

Despejando

$$x = \frac{-a}{\nu_A} \quad \text{Ec. 3-12}$$

Ahora, identificamos a θ como el valor de la propiedad física medible en cualquier momento t de la reacción.

$$\theta = \theta_M + \theta_A + \theta_Z \quad \text{Ec. 3-13}$$

θ_M es la contribución del medio de reacción a la propiedad medida. Como la propiedad física debe variar con la concentración hacemos:

$$\theta_A = K_A C_A \quad \text{Ec. 3-14}$$

Donde K_A es una constante de proporcionalidad y C_A es la concentración de A en cualquier momento de la reacción; extendiendo igualmente para Z nos queda:

$$\theta = \theta_M + K_A(a + v_A x) + K_Z v_Z x \quad \text{Ec. 3-15}$$

Evaluando en los valores extremos de la reacción al comienzo en que no hay producto, $x=0$, se puede escribir:

$$\theta_0 = \theta_M + K_A a \quad \text{Ec. 3-16}$$

θ_0 es la propiedad inicial de la muestra antes que comience la reacción de degradación. Y al final de la Ec. 3-12, se obtiene por tanto, mediante sustracción:

$$\theta_\infty - \theta_0 = -K_A a - \frac{K_Z v_Z a}{v_A} \quad \text{Ec. 3-17}$$

Siendo θ_∞ la propiedad a tiempo infinito, cuando se garantiza que la reacción ha terminado o está en equilibrio. Para esta propiedad se tomó la señal a 1440 min y teniendo en cuenta que:

$$\theta - \theta_0 = K_A v_A x + K_Z v_Z x \quad \text{Ec. 3-18}$$

Ahora,

$$\theta_\infty - \theta = -K_A(a + v_A x) - K_Z v_Z \left(\frac{a}{v_A} + x\right) \quad \text{Ec. 3-19}$$

Por simplificación decimos que:

$$\Delta k = K_A v_A + K_Z v_Z \quad \text{Ec. 3-20}$$

Por tanto:

$$\theta - \theta_0 = x \Delta k \quad \text{Ec. 3-21} \quad \text{y} \quad \theta_\infty - \theta_0 = -\left(\frac{a}{v_A}\right) \Delta k \quad \text{Ec. 3-22}$$

Y tenemos que:

$$\theta_\infty - \theta = -\left(\frac{a}{v_A} + x\right) \Delta k \quad \text{Ec. 3-23}$$

Por consiguiente:

$$\frac{a}{a+v_Ax} = \frac{\theta_\infty - \theta_0}{\theta_\infty - \theta} \quad \text{Ec. 3-24}$$

Esta es una reacción útil cinéticamente que nos permite evaluar el avance de la reacción como función de la concentración del reactivo. De aquí igualando con:

$$\ln \frac{c_0}{c} = kt \quad \text{Ec. 3-25}$$

Tenemos:

$$\ln \left(\frac{\theta_\infty - \theta_0}{\theta_\infty - \theta} \right) = kt \quad \text{Ec. 3-26} \quad \text{o} \quad \ln \left(\frac{\theta_\infty - \theta}{\theta_\infty - \theta_0} \right) = -kt \quad \text{Ec. 3-27}$$

Por tanto para una reacción de primer orden, si graficamos $\ln \left(\frac{\theta_\infty - \theta}{\theta_\infty - \theta_0} \right)$ en función del tiempo (t) sería una línea recta, como se muestra en la siguiente Figura 3-13, La pendiente de esta línea es igual a $-k$, encontrando con esto las constantes cinéticas de la reacción, presentadas en la tabla 3-3.

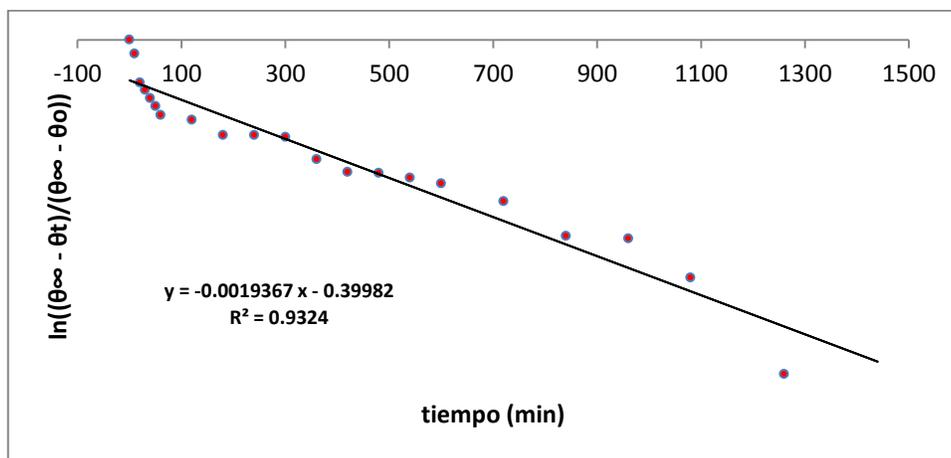


Figura 3-13 Cinética de degradación del compuesto 1 sometido a una radiación de 254 nm y 35 °C

Debido a que el coeficiente de regresión R^2 de las rectas obtenidas para las reacciones de degradación es superior al 0.90 y los datos suministrados para esta linealización son significativos (valor $p < 0.05$), se concluye de esta forma que este tipo de reacciones pueden considerarse de orden "uno".

Tabla 3-3 Constantes cinéticas de reacción de primer orden de algunos compuestos en extracto metanólico de *A. indica*, sometido a termo y fotodegradación

	Longitud de Onda (nm)				
	254 nm		368 nm		
	Temperatura		Temperatura		
	T.R.(Nº Cpto)	35 °C	45 °C	35 °C	45 °C
k (min ⁻¹) x 1000	12.357 (1)	1.94 ± 0.01	3.14 ± 0.02	2.20 ± 0.04	2.71 ± 0.02
	12.834 (2)	1.83 ± 0.01	3.22 ± 0.02	2.27 ± 0.04	2.26 ± 0.18
	14.773 (3)	1.77 ± 0.01	3.31 ± 0.02	2.38 ± 0.05	2.12 ± 0.02
	15.726	1.54 ± 0.01	7.78 ± 0.10	2.23 ± 0.05	N.D.
	16.543 (4)	1.76 ± 0.01	3.27 ± 0.01	2.17 ± 0.04	1.92 ± 0.02
	16.747	N.D.	3.98 ± 0.01	0.80 ± 0.01	2.70 ± 0.02
	19.709 (5)	1.89 ± 0.02	3.33 ± 0.02	1.91 ± 0.04	1.38 ± 0.02
	22.988	N.D.	N.D.	3.53 ± 0.47	3.83 ± 0.18
	23.824	2.54 ± 0.13	9.12 ± 0.33	N.D.	N.D.
	23.972 (6)	1.37 ± 0.27	2.83 ± 0.05	1.24 ± 0.07	N.D.
	27.287 (7)	3.98 ± 0.24	9.98 ± 0.10	3.69 ± 0.21	4.55 ± 0.01
	28.537	0.75 ± 0.02	N.D.	1.63 ± 0.32	N.D.
	29.617	3.24 ± 0.11	N.D.	N.D.	N.D.

T.R. Tiempo de retención; Nº Cpto Número del compuesto; N.D No detectado.

De acuerdo con esta información, se encuentra el tiempo de vida media (τ) de los compuestos objeto de estudio, tabla 3-4, usando la siguiente ecuación:

$$\tau = \frac{\ln(2)}{k} \quad \text{Ec. 3-28}$$

Tabla 3-4 Tiempos de vida media (τ) de algunos compuestos en el extracto metanólico de *A. indica* sometido a foto y termodegradación (λ de 254 nm y 368 nm, 35 y 45 °C) usando el método Pearson y Moore.

	Longitud de Onda (nm)				
	254 nm		368 nm		
	Temperatura		Temperatura		
	T.R.(Nº Cpto)	35 °C	45 °C	35 °C	45 °C
τ (min)	12.357 (1)	357.81 ± 2.28	220.91 ± 1.03	315.23 ± 5.44	255.43 ± 2.15
	12.834 (2)	378.06 ± 2.49	215.59 ± 1.04	305.40 ± 5.69	306.46 ± 2.41
	14.773 (3)	391.85 ± 2.75	209.31 ± 0.98	291.76 ± 6.21	326.51 ± 2.53
	15.726	449.51 ± 2.70	89.15 ± 1.10	311.73 ± 6.53	N.D.
	16.543 (4)	393.97 ± 2.58	211.84 ± 0.87	320.38 ± 5.77	360.99 ± 2.84
	16.747	N.D.	174.09 ± 0.63	270.78 ± 5.42	256.72 ± 1.59
	19.709 (5)	366.85 ± 3.10	207.89 ± 1.07	362.96 ± 8.66	504.58 ± 7.08
	22.988	N.D.	N.D.	207.21 ± 27.23	182.38 ± 8.62

T.R.(Nº Cpto)	Longitud de Onda (nm)			
	254 nm		368 nm	
	Temperatura		Temperatura	
	35 °C	45 °C	35 °C	45 °C
23.824	275.62 ± 14.20	76.30 ± 2.73	N.D.	N.D.
23.972 (6)	556.46 ± 88.52	245.49 ± 4.53	564.92 ± 35.51	N.D.
27.287 (7)	176.22 ± 10.26	69.50 ± 0.68	189.61 ± 10.42	152.24 ± 0.30
28.537	923.60 ± 28.97	N.D.	484.84 ± 101.16	N.D.
29.617	214.76 ± 6.98	N.D.	N.D.	N.D.

T.R. Tiempo de retención; Nº Cpto Número del compuesto; N.D. No Detectado.

La anterior información suministra una medida concreta de los tiempos de vida media, con el uso de fórmulas que han sido utilizadas y validadas a través del tiempo en diferentes estudios cinéticos (J. W. Moore, 1980). Estos datos se consideran relevantes y confiables, aunque podría considerarse otro tipo de análisis realizados con los datos crudos obtenidos en la experimentación, como se muestra en la siguiente sección.

3.3.2 Método matemático del seguimiento de degradación de los compuestos, la ley de disoluciones de Ostwald

Un método utilizado, fue definido en 1888 por el novel Wilhelm Ostwald (Cruz, Peral, Troitiño, & Plaza, 2013), el cual ha sido reportado y validado desde su momento de creación. Consiste en el ajuste de la curva obtenida con los datos experimentales y su interpolación gráfica, para con esto modelar su comportamiento en una ecuación, con una buena correlación (Ostwald, 1888, 1889; Skoog, West, Holler, & Cruch, 2005), un ejemplo del ajuste realizado se muestra en la Figura 3-14.

De esta forma se determinó el tiempo en el cual la degradación de los compuestos llega a un 50%, este consiste en modelar la concentración de los compuestos objeto de estudio con el tiempo, generando unas ecuaciones con un buen ajuste con respecto a los datos experimentales. Esta información se presenta en las Tabla 3-5 y *Tabla 3-6*. La mayoría de los coeficientes de regresión fueron superiores a 0.90.

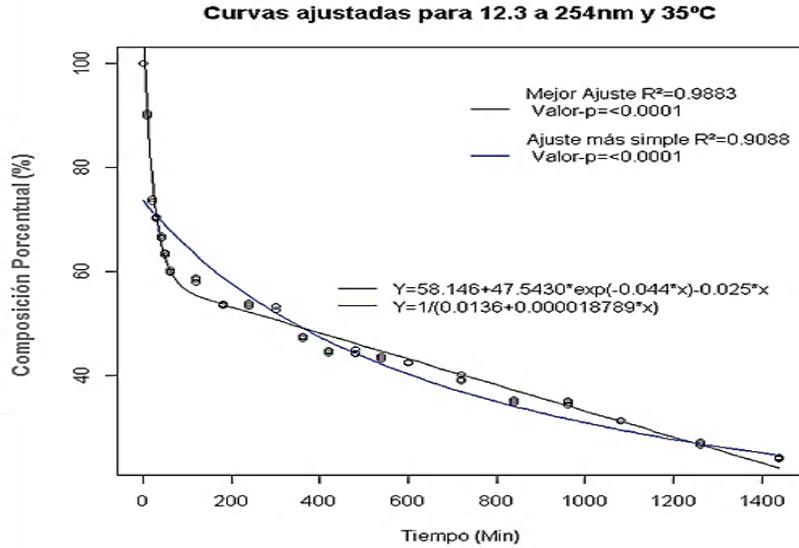


Figura 3-14 Curva ajustada del compuesto 1 sometido a 254 nm de longitud de onda y 35 °C de temperatura

Tabla 3-5 Ecuaciones encontradas para la degradación de algunos compuestos en el extracto metanólico de *A. indica* sometidos a foto y termodegradación (Parte A)

		Longitud de Onda (nm)	
		254 nm	
		Temperatura	
T.R.(Nº Cpto)		35 °C	45 °C
τ (min)	12.357 (1)	$Y=58.146+47.543*EXP(-0.044*X)-0.025*X$	$Y=63.7755+32.9522*EXP(-0.0505*X)-0.0276*X$
	12.834 (2)	$Y=61.2925+39.0636*EXP(-0.0369*X)-0.025*X$	$Y=63.4020+32.4285*EXP(-0.0268*X)-0.0253*X$
	14.773 (3)	$Y=60.5608+39.6612*EXP(-0.0430*X)-0.0242*X$	$Y=61.2629+34.5326*EXP(-0.0289*X)-0.0245*X$
	16.543 (4)	$Y=65.5374+36.2492*EXP(-0.0361*X)-0.0279*X$	$Y=62.1784+34.6626*EXP(-0.0210*X)-0.0261*X$
	19.709 (5)	$Y=70.3050+35.6176*EXP(-0.0198*X)-0.0337*X$	$Y=54.5736+45.2691*EXP(-0.0081*X)-0.0231*X$
	23.972 (6)	$Y=62.8045+44.5666*EXP(-0.0113*X)-0.032*X$	$Y=81.9546+33.3997*EXP(-0.013*X)-0.1211*X$
	27.287 (7)	$Y=3.8948+93.1752*EXP(-0.0077*X)$	$Y=11.7171+84.7147*EXP(-0.0174*X)-0.0078*X$

T.R. Tiempo de retención; Nº Cpto Número del compuesto; Y= Composición porcentual; X= Tiempo de exposición

Tabla 3-6 Ecuaciones encontradas para la degradación de algunos compuestos en el extracto metanólico de *A. indica* sometidos a foto y termodegradación (Parte B)

		Longitud de Onda (nm)	
		368 nm	
		Temperatura	
T.R.(Nº Cpto)		35 °C	45 °C
τ (min)	12.357 (1)	$Y=53.9086+38.2172*EXP(-0.0103*X)-0.0185*X$	$Y=50.47+50.5547*EXP(-0.0103*X)-0.0123$
	12.834 (2)	$Y=48.1350+44.3309*EXP(-0.0040*X)-0.0157*X$	$Y=24.8941+75.5329*EXP(-0.0021*X)$
	14.773 (3)	$Y=46.2099+43.7896*EXP(-0.0042*X)-0.0168*X$	$Y=23.1942+77.3435*EXP(-0.0020*X)$
	16.543 (4)	$Y=53.8696+38.6398*EXP(-0.0039*X)-0.0175*X$	$Y=26.5189+74.3920*EXP(-0.0017*X)$
	19.709 (5)	$Y=69.0722+27.3083*EXP(-0.004*X)-0.0176*X$	$Y=19.2825+81.3867*EXP(-0.0008*X)$

Longitud de Onda (nm)		
368 nm		
Temperatura		
T.R.(Nº Cpto)	35 °C	45 °C
23.972 (6)	C.F.	C.F.
27.287 (7)	Y=-3.3649+97.644*EXP(-0.0033*X)+0.0036*X	Y=-1.6613+109.7341*EXP(-0.0036*X)

T.R. Tiempo de retención; Nº Cpto Número del compuesto; Y= Composición porcentual; X= Tiempo de exposición

Todas las ecuaciones encontradas poseen un valor-p menor a 0.0001 y los R2 se presentan en la siguiente Tabla 3-7

Tabla 3-7 Coeficientes de regresión, R², de las ecuaciones encontradas para la degradación de algunos compuestos en el extracto metanólico de *A. indica* sometidos a foto y termodegradación

		Longitud de Onda (nm)			
		254 nm		368 nm	
		Temperatura		Temperatura	
T.R.(Nº Cpto)		35 °C	45 °C	35 °C	45 °C
R ²	12.357 (1)	0.99	0.94	0.98	0.98
	12.834 (2)	0.99	0.95	0.99	0.99
	14.773 (3)	0.99	0.95	0.98	1.00
	16.543 (4)	0.98	0.96	0.99	1.00
	19.709 (5)	0.96	0.94	0.92	0.96
	23.972 (6)	0.95	0.72	C.F.	C.F.
	27.287 (7)	0.91	0.89	0.99	0.93

T.R. Tiempo de retención; Nº Cpto Número del compuesto; C.F. Compuesto formado

Teniendo en cuenta toda la información expuesta anteriormente, se pueden calcular los tiempos de vida media (τ) usando la ecuación de regresión, de las ecuaciones obtenidas para los diferentes tratamientos.

Tabla 3-8 Tiempos de vida media (τ) de algunos compuestos en el extracto metanólico de *A. indica* sometidos a foto y termodegradación determinados por el método gráfico, utilizando la ley de disoluciones de Ostwald

		Longitud de Onda (nm)			
		254 nm		368 nm	
		Temperatura		Temperatura	
T.R.(Nº Cpto)		35 °C	45 °C	35 °C	45 °C
τ (min)	12.357 (1)	325.84	499.11	302.70	276.49
	12.834 (2)	451.70	529.72	415.98	524.51
	14.773 (3)	436.40	459.71	356.81	529.82
	16.543 (4)	556.90	466.68	516.12	678.33
	19.709 (5)	602.53	331.58	1102.51	1217.97
	23.972 (6)	413.20	271.91	C.F.	C.F.
	27.287 (7)	91.37	45.12	186.93	209.26

T.R. Tiempo de retención; Nº Cpto Número del compuesto; C.F. Compuesto formado

Todos estos valores dan una información importante de cómo se comportan realmente los compuestos a través del tiempo en condiciones experimentales, sin idealizar nada en el sistema, para cada uno de los tratamientos a los cuales fueron sometidas las muestras. Siendo la idealización, tener en cuenta el volumen de dilución del compuesto, el solvente y otras variables que a nivel molecular pueden afectar el desempeño del experimento.

Una vez realizado los dos tipos de análisis y de antemano definido el análisis cinético de primer orden como "más confiable" por su valía científica, se hace necesario generar una tabla de diferencias porcentuales (D.P.) para los dos métodos. Para esto se usó la siguiente ecuación.

$$D.P. = \frac{L.O.-P.M.}{P.M.} \times 100 \% \quad \text{Ec. 3-29}$$

Donde P.M. representa el valor de τ obtenido en la evaluación cinética usando el método Pearson and Moore Tabla 3-8 y L.O. el valor de τ logrado con el método matemático usando la ley de diluciones de Ostwald Tabla 3-4. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 3-9 Diferencias porcentuales en el tiempo de vida media (τ) entre los dos métodos usados para el análisis de la degradación de los compuestos, del extracto de células de *A. indica* a dos longitudes de onda y dos temperaturas diferentes

		254 nm		368 nm	
		35 °C	45 °C	35 °C	45 °C
D.P. (%)	T.R.(Nº Cpto)				
	12.357 (1)	-8.93	125.93	-3.98	8.24
	12.834 (2)	19.48	145.71	36.21	71.15
	14.773 (3)	11.37	119.64	22.29	62.27
	16.543 (4)	41.35	120.30	61.10	87.91
	19.709 (5)	64.25	59.50	203.75	141.38
	23.972 (6)	49.92	256.38	C.F.	C.F.
27.287 (7)	-48.15	-35.08	-1.41	37.46	

D.P. Diferencia porcentual en el tiempo de vida media; T.R. Tiempo de retención; Nº Cpto Número del compuesto; C.F. Compuesto formado

El signo negativo de los valores anteriores, indica que el τ obtenido por medio de la ecuación de degradación es menor al determinado usando método Pearson and Moore. Caso contrario sucede cuando los valores porcentuales son positivos. La información anterior muestra qué tan alejados porcentualmente se encuentran los datos obtenidos en los dos métodos utilizados para la determinación del τ . Con este análisis se observa que en general, el estudio realizado mediante cada uno de los dos métodos, proporcionan una

información diferente. Se considera que es más confiable el método de evaluación cinética de primer orden, obtenida por método Pearson and Moore, puesto que este proceso tiene en cuenta las influencia e idealiza otras variables que inciden en la reacción, tales como, el solvente de dilución, volumen que lo contiene, entre otras, las cuales modifica el valor obtenido en la respuesta por estas asunciones (J. W. Moore, 1980; Ruiz, 2014; Sergiv et al., 1975). Por el contrario el método obtenido con la ley de Ostwald, atribuye el valor de respuesta directamente al cambio de concentración de los compuestos en el extracto. En el segundo método no se considera la idealización de las variables antes mencionadas, que también influyen en el valor medido de la respuesta, trabajando con los valores crudos obtenidos experimentalmente. Haciendo mucho más dispendiosa la labor para la determinación de las vidas medias, ya que no es posible crear un modelo general para todas las muestras. Por este motivo se realiza un tratamiento individual y particular por evento experimental para dicha determinación del τ . Al tratarse de un número reducido de procedimientos en esta tesis, se considera que es el dato más real que se puede generar con la información experimental obtenida, ya que se tiene en cuenta toda la información *in situ* del proceso. Evitando la idealización de los datos para este método, se impiden asunciones que pueden ser de gran valor para el análisis efectuado en esta tesis de todo el proceso.

3.3.3 Análisis de los tiempos de vida media (τ)

El análisis de degradación realizado a los seis compuestos, se hace con respecto a la fotodegradación encontrada para la Aza-A por Dureja y Johnson (Dureja & Johnson, 2000), donde se muestra como este compuesto, expuesto a 254 nm, se degrada en 48 min. En la literatura no aparece información de fotodegradación, de otros nortriterpenoides constituyentes de la *A. indica* y tampoco hay referencias de este comportamiento para extractos de esta especie vegetal. Asumiendo que los compuestos 1, 2, 3, 4, 5 y 7, estructuralmente tienen una forma similar a la Aza-A, se realizó un análisis comparativo porcentual entre los compuestos del extracto y la Aza-A.

En Tabla 3-10 se enseña como aumentan porcentualmente estos seis compuestos con respecto a lo reportado para la Aza-A expuesto a 254 nm (Dureja & Johnson, 2000), utilizando la información obtenida en el método Pearson and Moore, presentada en la Tabla 3-4

Tabla 3-10. Cambio porcentual de los compuestos con respecto al reportado para Aza-A

		Longitud de Onda (nm)			
		254 nm		368 nm	
T.R.(Nº Cpto)		Temperatura		Temperatura	
		35 °C	45 °C	35 °C	45 °C
C.P. (%)	12.357 (1)	645.43	360.24	556.74	432.15
	12.834 (2)	687.63	349.15	536.24	538.45
	14.773 (3)	716.36	336.05	507.84	580.22
	16.543 (4)	720.78	341.33	567.45	652.05
	19.709 (5)	664.26	333.10	656.18	951.21
	27.287 (7)	267.12	44.80	295.01	217.17

C.P. Cambio porcentual (((Tiempo tratamiento-48.0 min)/48 min) x 100%); T.R. Tiempo de retención; Nº Cpto Número del compuesto; C.F. Compuesto formado

La tabla anterior muestra que los seis compuestos en todos los tratamientos, presentan una diferencia en el τ con respecto al reportado para la Aza-A, que va desde 0.44 veces (C.P. 44 %) hasta 9.51 veces mayor (C.P. 951 %), lo que muestra la posibilidad de interacciones de apantallamiento dentro del extracto.

Aunque la biodegradabilidad, actualmente es un **plus** para cualquier producto que comercialmente tenga influencia en el consumo humano, cuando esta degradación es demasiado rápida puede constituir un problema en la funcionalidad del producto. Para el caso particular que avoca la presente tesis, el producto final con el cual se pretende obtener un bioinsecticida a base de extracto metanólico de suspensiones celulares de *A. indica*, al degradarse demasiado pronto no cumpliría la función con la cual fue propuesto y diseñado. La determinación de la vida media de los compuestos que componen el extracto metanólico de suspensiones celulares de *A. indica* es de gran importancia, para con ello poder determinar la mejor formulación que se debería usar para el producto final.

3.4 Análisis estadístico de la degradación de cada uno de los compuestos

El análisis estadístico realizado al comportamiento de degradación, muestra la significancia de cada uno de los factores, así como la interacción entre ellos. Se realizó el ANOVA para los 7 compuestos seleccionados durante los estudios de degradación. Para el ANOVA se analizó el efecto de la temperatura, longitud de onda, tiempo de exposición y las interacciones temperatura – longitud de onda, temperatura – tiempo de exposición, longitud de onda – tiempo de exposición y temperatura – longitud de onda – tiempo de exposición.

Se realizaron dos tipos de análisis diferentes para el diseño factorial de degradación, sin tener en cuenta y considerando los experimentos en oscuridad ($\lambda = 0 \text{ nm}$).

En la Figura 3-15 se muestra gráficamente el comportamiento del compuesto uno, aislado a los 12.3568 min, usando el gradiente 2 y para los seis diferentes tratamientos a los cuales fue sometido experimentalmente. Con esta información, se realizaron los análisis factoriales del compuesto, teniendo en cuenta factores como la temperatura, la longitud de onda y el tiempo de exposición. No se tomaron en cuenta los periodos en donde no hubo registros de algún tratamiento.

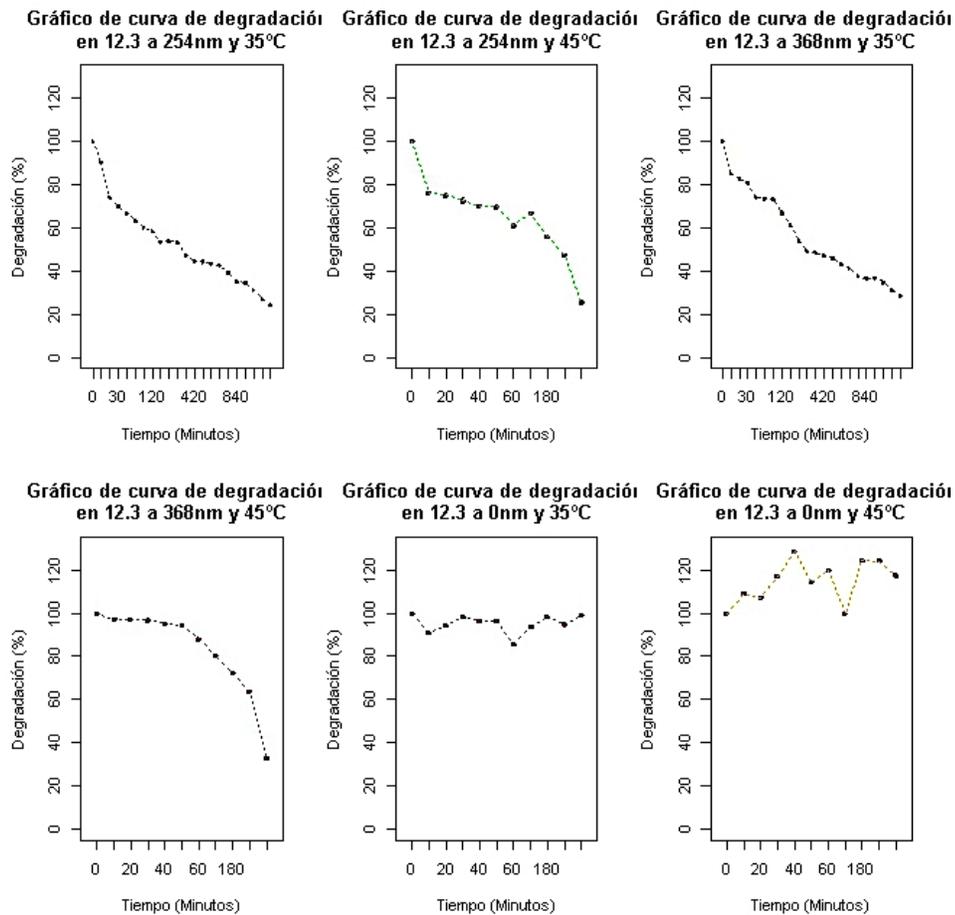


Figura 3-15 Comportamiento del compuesto 1, aislado a los 12.3568 min en los seis tratamientos a los cuales fue sometido experimentalmente

3.4.1 Análisis estadístico realizado a la composición porcentual de los compuestos

En los perfiles de degradación del compuesto en cada nivel de longitud de onda se muestran algunas diferencias en sus comportamientos, ya que a 254 nm se logra una degradación más rápida que a 368 nm. En los perfiles de degradación de cada nivel de temperatura también se notan ciertas diferencias, ya que a 35 °C se logra una degradación más rápida que a 45 °C. En los dos perfiles hay una característica común y es que a las 5 horas de exposición no difiere considerablemente un nivel de otro, ni para las longitudes de onda ni para las temperaturas.

Una posible explicación del comportamiento de la degradación ocurrida a la misma temperatura y diferente longitud de onda, donde ésta es mayor a 254 nm que a 368 nm, puede deberse a que en 254 nm los grupos funcionales contenidos en estos compuestos absorban en esa energía, convirtiéndola en energía química, favoreciendo la reacción química debido a que las reacciones fotoquímicas son favorecidas gracias a los cambios en las fases de los orbitales moleculares (Griesbeck & Mattay, 2005). Mientras que a 368 nm esta energía no es suficiente para formar estados excitados que provoquen la reactividad de los compuestos.

Ahora, analizando el comportamiento de los compuestos cuando se encuentran a una longitud de onda igual, pero con una temperatura diferente, se ve favorecida la degradación a 35 °C. Siendo una causa posible de este comportamiento, que a esta temperatura se haga más viable cierto tipo de reacción, las cuales a 45 °C no son activadas, ya que por la vía térmica los orbitales que intervienen en la reacción están más favorecidos a 35 °C. Mientras que a 45 °C pueden estar cambiando de fase, haciendo menos probable esta reacción y por consiguiente disminuyendo la velocidad de degradación (Carey & Sundberg, 2007)

3.4.2 Análisis de Varianza factorial

El análisis factorial es una técnica de reducción de datos que sirve para encontrar grupos homogéneos de variables a partir de un conjunto numeroso de variables. Estos grupos se forman con variables que correlacionan mucho entre si y procurando inicialmente, que unos grupos sean independientes de otros (Fernandez, 2011).

Efectos (variables) fijos: Temperatura, longitud de onda, tiempo y sus interacciones.

Variable respuesta: Composición porcentual del compuesto de interés.

Y se quieren probar las siguientes hipótesis:

Juego de Hipótesis

Para cada uno de los factores se plantea el siguiente juego de hipótesis:

- Ho: Las medias poblacionales de cada nivel del factor son iguales (no hay diferencias significativas entre los niveles del factor).
- Ha: Las medias poblacionales de cada nivel de temperatura son diferentes (hay diferencias significativas entre niveles del factor).

Para las interacciones se plantea el siguiente juego de hipótesis:

- Ho: No hay interacción significativa entre los factores
- Ha: Hay interacción significativa entre los factores

3.4.3 Análisis de los resultados

La siguiente tabla presenta el ANOVA característico obtenido para el efecto de los factores estudiados sobre la composición porcentual de los siete compuestos seleccionados, mediante los dos tipos de análisis. Tanto los tratamientos donde se cuenta $\lambda = 0, 254$ y 368 nm, así como en el que se excluye los tratamientos de $\lambda = 0$ nm.

Tabla 3-11 Anova característico del efecto de cada uno de los factores sobre los 7 compuestos estudiados en el extracto metanólico de células de *A. indica*.

Fuente	G.L.	Valor p
Temperatura	1	< 0.001
Longitud de Onda	1	< 0.001
Tiempo	9	< 0.001
Temperatura: Longitud de Onda	1	< 0.001
Temperatura: Tiempo	9	< 0.001
Longitud de Onda: Tiempo	9	< 0.001
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	< 0.001

G.L. Grados de libertad

En los dos análisis realizados, el modelo satisface los supuestos para todos los compuestos y por lo tanto es adecuado para hacer inferencias válidas. Con un nivel de significancia asumido de 0.05 dado por que el valor-p es menor que este nivel como se muestra en la Tabla 3-11, se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto se concluye con una confianza del 95%, que el efecto de los factores y las interacciones son significativos, sobre los 7 compuestos en los dos diferentes tipos de análisis. Una de estas interacciones, efecto de la temperatura – longitud de onda, sobre la composición del compuesto 1 a las 24 h, para el caso en el cual se tiene en cuenta la $\lambda = 0$ nm, es mostrada en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** Donde se puede observar claramente que tanto a 254 nm, como a 368 nm, su comportamiento es independiente de la temperatura después de los 1440 min. Y como con un $\lambda = 0$ nm, se analiza que en los 45 °C hay una producción de este, cosa que no ocurre en su otra temperatura.

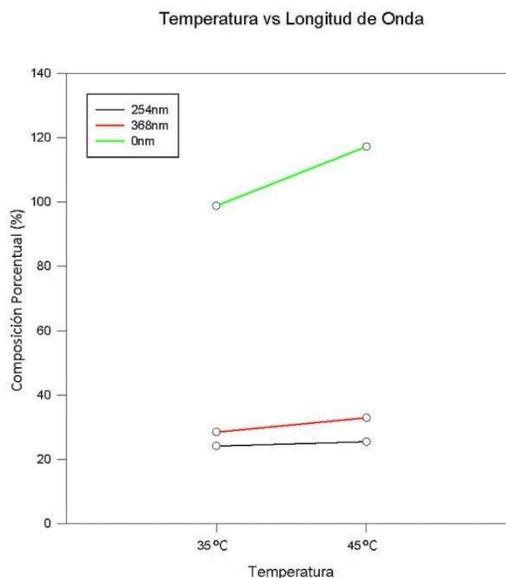


Figura 3-16 Gráfico del comportamiento del compuesto 1 en los diferentes tratamientos de longitud de onda y temperatura, en un extracto metanólico de células de *A. indica*

3.4.4 Análisis de efectos simples

La estrategia más utilizada para interpretar una interacción significativa consiste en el análisis de efecto simple, el cual consiste en como los efectos atribuidos a un componente del modelo lineal, después de haber fijado los niveles de otro componente de dicho modelo. Teniendo en cuenta lo anterior, se efectuaron comparaciones múltiples según el método de Tukey, con un nivel de significancia del 0.05. Y mirando el comportamiento en general de los

siete compuestos, en los seis diferentes tratamientos y dados los dos análisis estadísticos realizados. Se obtuvo que el valor-p en cada estudio fue menor al nivel de significancia de 0.05, se puede aseverar que los resultados, indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de temperatura o de longitud de onda según sea el caso; son significativos.

Los estudios estadísticos completos con las gráficas y ANOVAS particulares para cada uno de los experimentos los encontramos en el **Anexo A**

4 CONCLUSIONES

El contenido de azadiractina en diferentes líneas de callos y células en suspensión de *A. indica* existentes en nuestro laboratorio, determinados mediante el gradiente 1 mostraron la presencia de Aza-A en un intervalo de concentraciones de 0.000 ± 0.029 a $1.013 \pm 0.167 \text{ mg}_{\text{Aza-A}}/\text{g}_{\text{Extracto}}$. Adicionalmente el índice antialimentario de los extractos alcohólicos fue de 33 ± 27 a $100 \pm 0 \%$. Exponiendo que aunque algunas líneas celulares presentaron un contenido nulo de Aza-A, conservaron una importante actividad biológica sobre el gusano cogollero.

Se determinó Aza-A en el extracto por medio del gradiente 1. Así como algunos otros terpenoides relacionados con la azadiractina, mediante ambos gradientes 1 y 2, observándose mejor resolución de los compuestos, por la separación de las señales, utilizando el último gradiente, presentado en la sección 3.1.

El uso del gradiente 2 muestra mayor cantidad de señales, 57 picos, en comparación con las mostradas en el gradiente 1, que fueron 19 señales (Figura 3-1 y Figura 3-2), dando con ello un mayor campo de análisis. De estos 57 picos, 7 señales fueron las más definidas (Figura 3-3) y a ellas se les analizó su comportamiento en los 6 tratamientos de degradación.

De acuerdo con los análisis realizados, usando la teoría cinética de las reacciones (método Pearson and Moore), así como el método matemático de ajuste gráfico de los datos (ley de Ostwald), se concluye qué tan distantes están los resultados entre sí, como se mostró en la Tabla 3-9. El estudio realizado mediante cada uno de los dos métodos, proporcionan una información diferente. Posiblemente el efecto del volumen de trabajo y el solvente de dilución del extracto generan una información adicional, alterando de esta forma los resultados.

El comportamiento observado en los siete compuestos analizados en la sección 3.4, expone cómo las muestras no tienen ningún comportamiento en ausencia de luz, así se sometan al efecto de la temperatura, siendo la variabilidad mostrada en los datos obtenidos, debida exclusivamente a la aleatoriedad de las muestras usadas en el proceso.

Con respecto a los cuatro experimentos, donde se tiene irradiación lumínica y térmica, se ve un comportamiento de degradación de las muestras, siendo el tratamiento de exposición a 45 °C y 368 nm, el proceso de una degradación más lenta.

El compuesto seis, revela algo completamente diferente a lo presentado por los otros compuestos. En las condiciones de irradiación de 368 nm, en las dos temperaturas utilizadas, dicho compuesto se produce (aumenta su concentración) en estas condiciones, en vez de degradarse. Ahora, cuando esta muestra fue sometida a 254 nm y 35 °C, se degrada el compuesto seis y se deja de detectar a partir de la quinta hora.

El compuesto siete, sometido a 35 °C y 254 nm se degradó totalmente a partir de la hora 14. En los demás tratamientos fue muy baja su composición final, exceptuando los que no estuvieron sometidos a estímulo lumínico.

La degradación de los seis compuestos, los cuales se observaron en todos los tratamientos realizados, presentan una diferencia en el τ con respecto a la Aza-A, desde 0.44 hasta 9.51 veces mayor, mostrando que dentro del extracto hay interacciones a nivel molecular, posiblemente de apantallamiento. Así, se encontraron tiempos de vida media desde 69.50 min (compuesto 7 a 254 nm y 45 °C) hasta 504.58 min (compuesto 5 a 368 nm y 45 °C) Tabla 3-4.

Se demuestra que seis compuestos (1 a 5 y 7) en todos los tratamientos, presentan una diferencia en el τ con respecto al reportado en la literatura para la Aza-A, que va desde 0.44 veces hasta 9.51 veces mayor, lo que muestra interacciones dentro del extracto.

Con un análisis estadístico completo se concluye que en los perfiles de degradación de los compuestos en cada nivel de longitud de onda y temperatura, se muestran algunas diferencias, ya que a 254 nm se logra una degradación más rápida, así como a 35 °C, en comparación con sus similares (368 nm y 45 °C). En los dos perfiles hay una característica común y es que a las 5 horas de exposición no difiere considerablemente un nivel de otro, ni para las longitudes de onda ni para las temperaturas.

La degradación de los extractos como se demostró, ocurre principalmente por la presencia lumínica, ya que en ausencia total de la misma, la influencia de la temperatura no es incidente en su disminución de concentración para los compuestos analizados.

5 RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta todos los análisis realizados y viendo las diferencias existentes entre los dos métodos de análisis para el tiempo de vida media, es recomendable establecer por medio de un mayor muestreo y utilizando la ecuación de Arrhenius encontrar la energía de activación E_a y otras propiedades para caracterizar con esto, dichas reacciones. También se sugiere extender el número de datos por tratamiento, con sus respectivas repeticiones, y poder obtener una información mucho más completa.

Realizar la separación, purificación y análisis individual de cada uno de los componentes analizados en esta tesis, para determinar su comportamiento con las mismas condiciones, para cada uno de los siete compuestos, así como a varias combinaciones de ellos. Determinado el anterior análisis, se prestaría para decir a ciencia cierta cómo es la sinergia ocurrida en dicha matriz por estos compuestos, en cuanto a la actividad biológica.

Es recomendable, después de realizar las anteriores sugerencias, hacer análisis de estos y otros de los compuestos presentes en el extracto, usando foto y termoprotectores, que permitan aumentar la vida útil del bioinsecticida que se pretende producir.

Gracias a los estudios y análisis realizados es recomendable para el almacenamiento de los extractos metanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* A. Juss, la eliminación total de la incidencia de la luz y no sobrepasar los 45 °C, garantizando con esto la concentración con la cual fue formulada inicialmente.

6 ANEXO A: Análisis estadístico

Para esta sección de la tesis se tienen las siguientes características generales para todos los tratamientos, en cada una de las muestras.

- Se realizaron análisis factoriales a cada compuesto, teniendo en cuenta factores como la temperatura, la longitud de onda y el tiempo de exposición, para cada uno de los dos tipos de estudio (incluyendo el tratamiento $\lambda = 0$ nm y sin incluirlo).
- No se tomaron en cuenta los periodos de tiempo en donde no hubieron registros de algún tratamiento.

En todos los tratamientos se manejaron los mismos criterios para realizar el estudio, así como para su análisis de resultados, estos fueron:

Análisis de Varianza factorial

- Efectos fijos: Temperatura, Longitud de Onda, Tiempo y sus interacciones.
- Variable de Interés: Degradación.

Juego de Hipótesis

Para cada uno de los factores se plantea el siguiente juego de hipótesis:

- H_0 : Las medias poblacionales de cada nivel del factor son iguales (No hay diferencias significativas entre los niveles del factor).
- H_a : Las medias poblacionales de cada nivel de Temperatura son diferentes. (Hay diferencias significativas entre niveles del factor).

Para las interacciones se plantea el siguiente juego de hipótesis:

- H_0 : No hay interacción significativa entre los factores

- Ha: Hay interacción significativa entre los factores

El gráfico de perfiles muestra el comportamiento medio de cada nivel del factor en la variable Degradación a través del tiempo. En los perfiles de degradación de cada nivel de longitud de onda se muestran algunas diferencias en los comportamientos, ya que a 254 nm se logra una degradación más rápida que a 368 nm. En los perfiles de degradación de cada nivel de temperatura también se notan ciertas diferencias en los comportamientos, ya que a 35 °C se logra una degradación más rápida que a 45 °C. En las gráficas de perfiles hay una característica común y es que a las 5 horas la Degradación no difiere considerablemente de un nivel a otro ya que se alcanza una degradación aproximada al 50%.

Análisis de los resultados:

Los modelos satisfacen los supuestos y por lo tanto es adecuado para hacer inferencias válidas.

Con un nivel de significancia asumido de 0.05 se hacen las siguientes conclusiones para todos los tratamientos:

Como el Valor-p es menor que el nivel de significancia de 0.05, se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto se concluye con una confianza del 95% que hay interacción significativa entre los factores. Por lo tanto se hacen conclusiones respecto a los efectos simples.

Análisis de Efectos simples

Se efectuaron comparaciones múltiples según el método de Tukey, con un nivel de significancia del 95%.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

6.1 Análisis estadístico para λ (0 nm, 254 nm y 368 nm) y T (35 °C y 45 °C) considerando oscuridad

Se realizaron análisis factoriales a cada compuesto, teniendo en cuenta factores como la temperatura y la longitud de onda (Incluyendo a 0 nm) a los 1440 minutos.

En el compuesto 7 no se realizó el análisis factorial debido a que no se tomó muestra del tratamiento de 254 nm a 35 °C.

Para el compuesto 6 no se realizó el análisis ya que no tenía representación muestral a 0 nm.

6.1.1 Análisis para el compuesto 12.357 (1)

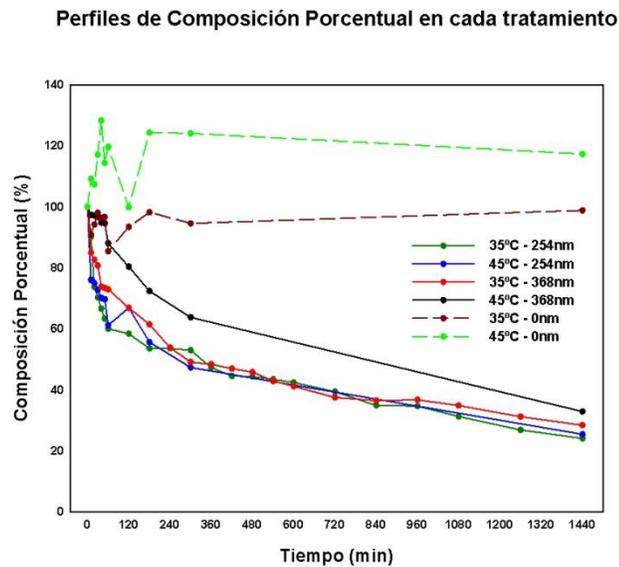


Figura 6-1 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 1

Tabla 6-1 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 1

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor
Temperatura	1	294,699	294,699	920,766	<0,001
Longitud de Onda	2	25935,095	12967,547	40516,236	<0,001
Temperatura: Longitud de Onda	2	249,890	124,945	390,382	<0,001

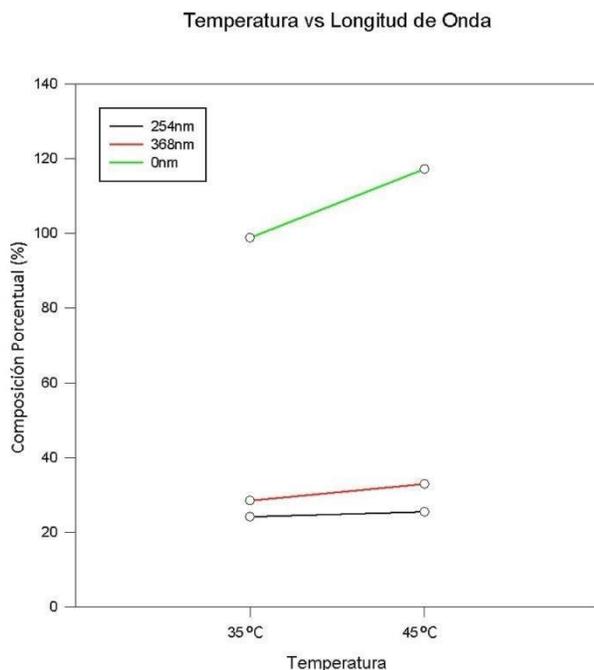


Figura 6-2 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 1

Tabla 6-2 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 1

Efectos simples de la Longitud de Onda a 35 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
0nm vs. 368 nm	74737.00	3.00	228815.00	<0,001
0nm vs. 254 nm	70412.00	3.00	215573.00	<0,001
254 nm vs. 368 nm	4325.00	3.00	13242.00	<0,001
Efectos simples de la Longitud de Onda a 45 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
0nm vs. 368 nm	91,887	3	281,319	<0,001
0nm vs. 254 nm	84,401	3	258,401	<0,001
254 nm vs. 368 nm	7,486	3	22,918	<0,001
Efectos simples de la Temperatura a 254 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45° vs. 35°	1,322	2	4,049	0,014
Efectos simples de la Temperatura a 368 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45° vs. 35°	4,483	2	13,725	<0,001
Efectos simples de la Temperatura a 0nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45° vs. 35°	18,472	2	56,553	<0,001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de temperatura o de longitud de onda según sea el caso, son significativos.

6.1.2 Análisis para el compuesto 12.834 (2)

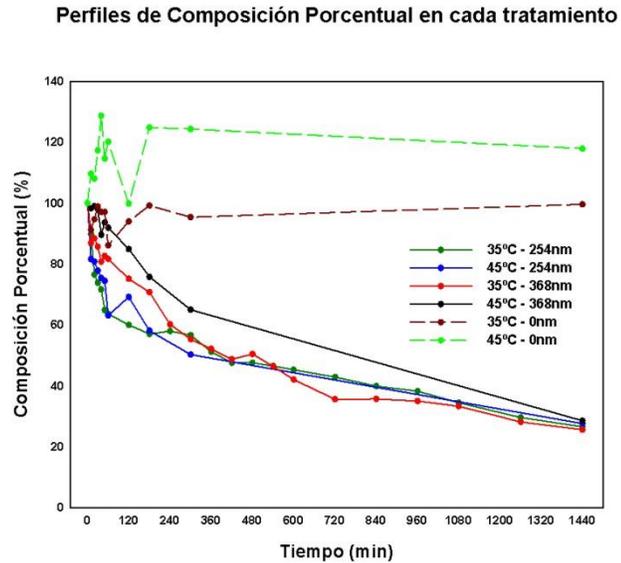


Figura 6-3 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 2

Tabla 6-3 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 2

Fuente	G.L.	Sum	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	249,244	249,244	669,240	<0,001
Longitud de Onda	2	26679,071	13339,536	35817,714	<0,001
Temperatura: Longitud de Onda	2	268,879	134,439	360,980	<0,001

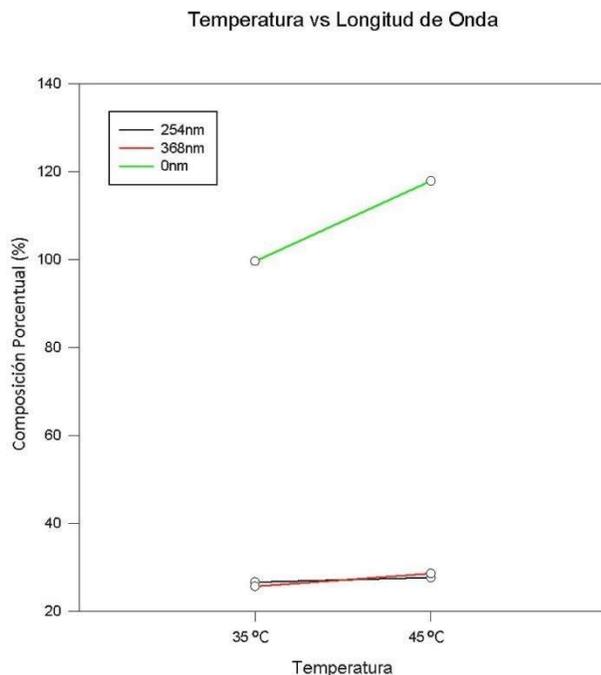


Figura 6-4 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 2

Tabla 6-4 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 2

Efectos simples de la Longitud de Onda a 35 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
0nm vs. 368 nm	73,998	3	210,020	<0,001
0nm vs. 254 nm	73,023	3	207,252	<0,001
254 nm vs. 368 nm	0,975	3	2,768	0,165
Efectos simples de la Longitud de Onda a 45 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
0nm vs. 368 nm	90,282	3	256,236	<0,001
0nm vs. 254 nm	89,371	3	253,652	<0,001
254 nm vs. 368 nm	0,910	3	2,584	0,203
Efectos simples de la Temperatura a 254 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45° vs. 35°	1,061	2	3,010	0,055
Efectos simples de la Temperatura a 368 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45° vs. 35°	2,947	2	8,363	<0,001
Efectos simples de la Temperatura a 0nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45° vs. 35°	18,320	2	51,994	<0,001

A 35 °C y a 45 °C no hay diferencias significativas entre los niveles de Longitud de Onda a 254 nm y a 368 nm. A 254 nm no hay diferencias significativas entre los niveles de temperatura de 35 °C y 45 °C. Las demás comparaciones fueron significativas en especial a 0nm.

6.1.3 Análisis para el compuesto 14.773 (3)

Perfiles de Composición Porcentual en cada tratamiento

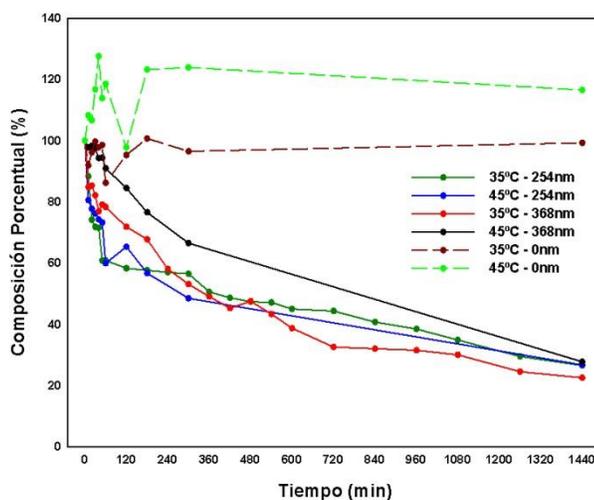


Figura 6-5 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 3

Tabla 6-5 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 3

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor
Temperatura	1	255,825	255,825	683,154	<0,001
Longitud de Onda	2	26899,583	13449,792	35916,196	<0,001
Temperatura: Longitud de	2	231,713	115,856	309,381	<0,001

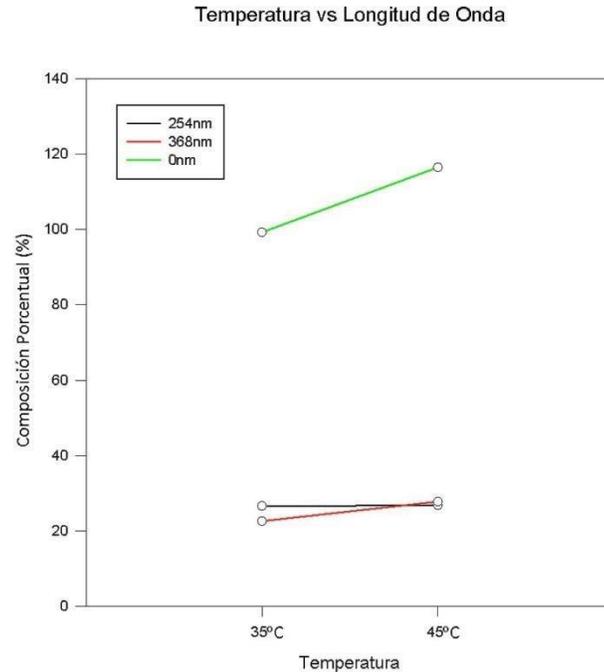


Figura 6-6 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 3

Tabla 6-6 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 3

Efectos simples de la Longitud de Onda a 35 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
0 nm vs. 368 nm	76,712	3	217,126	<0,001
0 nm vs. 254 nm	72,697	3	205,761	<0,001
254 nm vs. 368 nm	4,015	3	11,365	<0,001
Efectos simples de la Longitud de Onda a 45 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
0 nm vs. 254 nm	89,801	3	254,172	<0,001
0 nm vs. 368 nm	88,772	3	251,259	<0,001
368 nm vs. 254 nm	1,029	3	2,913	0,141
Efectos simples de la Temperatura a 254 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45 °C vs. 35 °C	0,157	2	0,445	0,759
Efectos simples de la Temperatura a 368 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45 °C vs. 35 °C	5,201	2	14,722	<0,001
Efectos simples de la Temperatura a 0 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45 °C vs. 35 °C	17,261	2	48,856	<0,001

A 45 °C de Temperatura se presentaron diferencias significativas a 0 nm. A 254 nm de Longitud de Onda no se presentaron diferencias significativas entre los niveles de Temperatura. De resto, las demás comparaciones obtuvieron diferencias significativas.

6.1.4 Análisis para el compuesto 16.543 (4)

Perfiles de Composición Porcentual en cada tratamiento

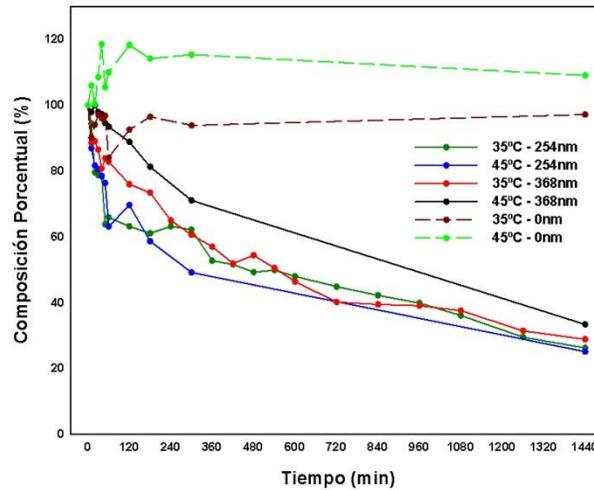


Figura 6-7 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 4

Tabla 6-7 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 4

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	116,785	116,785	356,846	<0,001
Longitud de Onda	2	22400,566	11200,283	34223,482	<0,001
Temperatura: Longitud de	2	127,207	63,604	194,346	<0,001

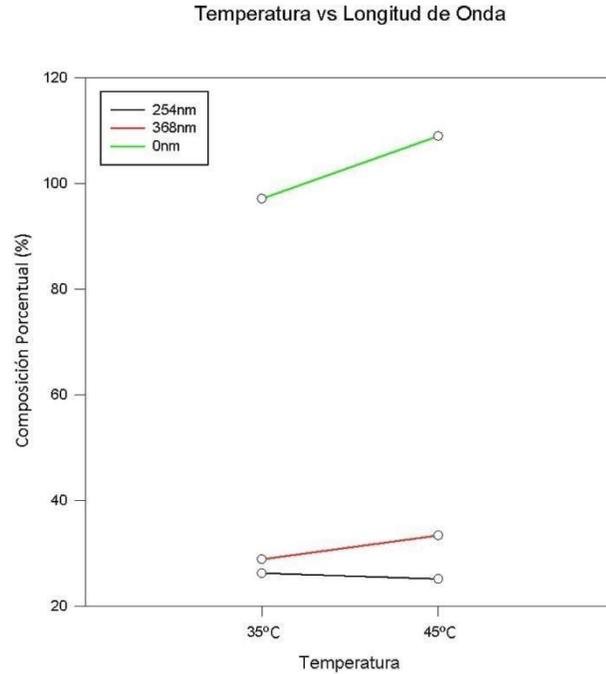


Figura 6-8 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 4

Tabla 6-8 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 4

Efectos simples de la Longitud de Onda a 35 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-
0 nm vs. 254 nm	70,910	3	214,691	<0,001
0 nm vs. 368 nm	68,287	3	206,751	<0,001
368 nm vs. 254 nm	2,623	3	7,940	<0,001
Efectos simples de la Longitud de Onda a 45 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-
0 nm vs. 254 nm	83,894	3	254,003	<0,001
0 nm vs. 368 nm	75,653	3	229,054	<0,001
368 nm vs. 254 nm	8,241	3	24,950	<0,001
Efectos simples de la Temperatura a 254 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-
35 °C vs. 45 °C	1,106	2	3,350	0,036
Efectos simples de la Temperatura a 368 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-
45 °C vs. 35 °C	4,512	2	13,659	<0,001
Efectos simples de la Temperatura a 0 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-
45 °C vs. 35 °C	11,878	2	35,962	<0,001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de Temperatura o de Longitud de Onda según sea el caso; son significativos.

6.1.5 Análisis para el compuesto 19.709 (5)

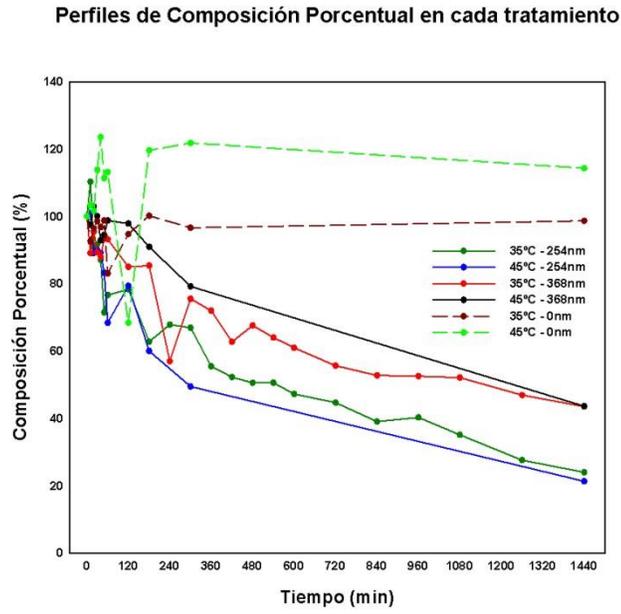


Figura 6-9 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 5

Tabla 6-9 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 5

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor
Temperatura	1	85,637	85,637	121,071	<0,001
Longitud de Onda	2	22852,568	11426,284	16154,106	<0,001
Temperatura: Longitud de Onda	2	292,03	146,015	206,431	<0,001

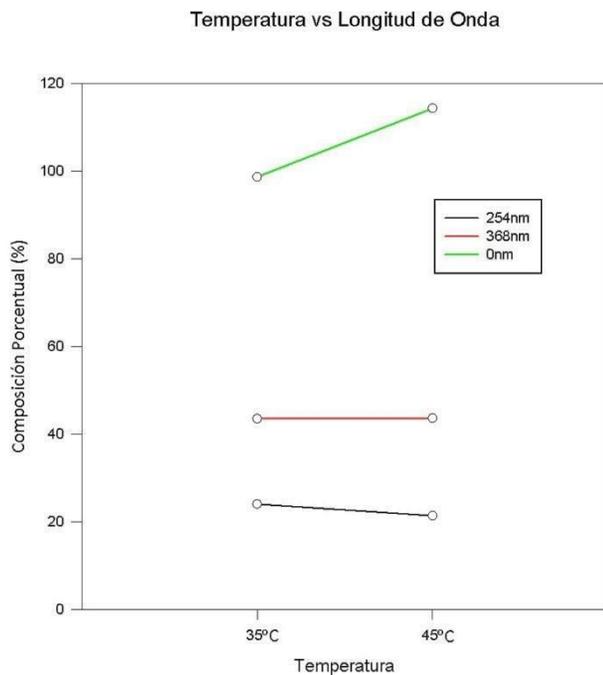


Figura 6-10 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 5

Tabla 6-10 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 5

Efectos simples de la Longitud de Onda a 35 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
0 nm vs. 254 nm	74,678	3	153,796	<0,001
0 nm vs. 368 nm	55,178	3	113,636	<0,001
368 nm vs. 254 nm	19,501	3	40,160	<0,001
Efectos simples de la Longitud de Onda a 45 °C				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
0 nm vs. 254 nm	92,994	3	191,515	<0,001
0 nm vs. 368 nm	70,695	3	145,592	<0,001
368 nm vs. 254 nm	22,299	3	45,923	<0,001
Efectos simples de la Temperatura a 254 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
35 °C vs. 45 °C	2,676	2	5,510	0,002
Efectos simples de la Temperatura a 368 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45 °C vs. 35 °C	0,123	2	0,253	0,861
Efectos simples de la Temperatura a 0 nm				
Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45 °C vs. 35 °C	15,640	2	32,209	<0,001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de temperatura o de longitud de onda según sea el caso; son significativos, excepto el efecto simple de la temperatura a 368 nm en donde no se encontraron diferencias significativas entre los dos niveles de temperatura.

6.1.6 Análisis para el compuesto 27.287 (7)

Perfiles de Composición Porcentual en cada tratamiento

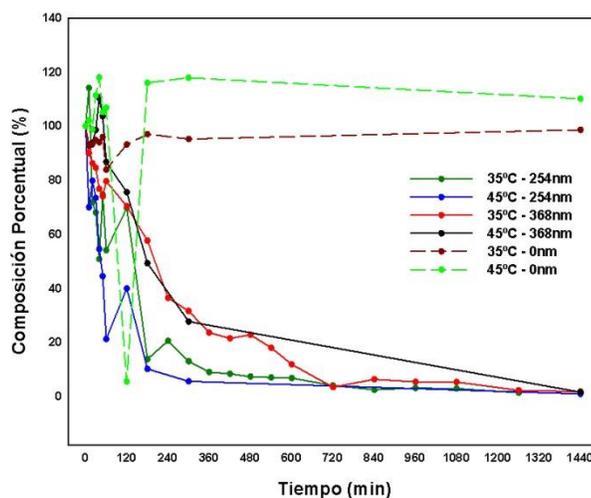


Figura 6-11 Perfiles de composición porcentual en cada nivel de λ y T para el compuesto 7

Tabla 6-11 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 7

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Tratamientos	4	38337,654	9584,413	34411,524	<0,001
Residual	10	2,785	0,279		
Total	14	38340,439			

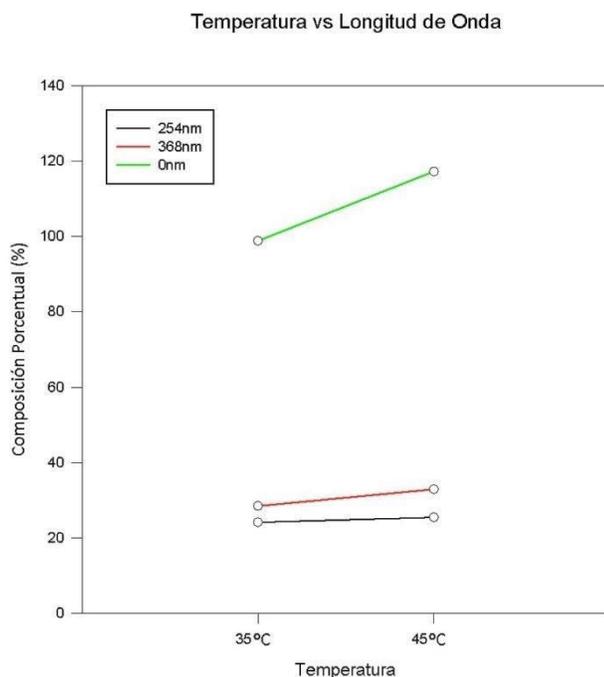


Figura 6-12 Gráfico comparativo del comportamiento de las tres longitudes de onda en sus dos temperaturas para el compuesto 7

Análisis de Comparaciones múltiples

Se efectuaron comparaciones múltiples según el método de Tukey, con un nivel de significancia del 95%. Estos fueron los resultados:

Tabla 6-12 Comparación de efectos múltiples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 7

Comparación	Diferencia	p	q	Valor-p
45-0 vs. 45-254	109,166	5	358,275	<0,001
45-0 vs. 45-368	108,505	5	356,105	<0,001
45-0 vs. 35-368	108,299	5	355,429	<0,001
45-0 vs. 35-0	11,455	5	37,595	<0,001
35-0 vs. 45-254	97,711	5	320,680	<0,001
35-0 vs. 45-368	97,049	5	318,510	<0,001
35-0 vs. 35-368	96,844	5	317,834	<0,001
35-368 vs. 45-254	0,867	5	2,846	0,326
35-368 vs. 45-368	0,206	5	0,676	0,988
45-368 vs. 45-254	0,661	5	2,170	0,565

Al relacionar el nivel de longitud de onda a 0 nm, se obtienen diferencias significativas entre las diferentes combinaciones involucradas. No sucede lo mismo en las

combinaciones que no toman en cuenta este nivel de longitud de onda ya que dichas combinaciones no obtuvieron diferencias significativas entre sí.

6.2 Análisis estadístico para λ (254 nm y 368 nm) y T (35 °C y 45 °C), sin considerar la oscuridad

Se realizaron análisis factoriales a cada compuesto, teniendo en cuenta factores como la Temperatura, la Longitud de Onda y el Tiempo.

No se tomaron en cuenta los periodos de tiempo en donde no hubo registros de algún tratamiento.

6.2.1 Análisis para el compuesto 12.357 (1)

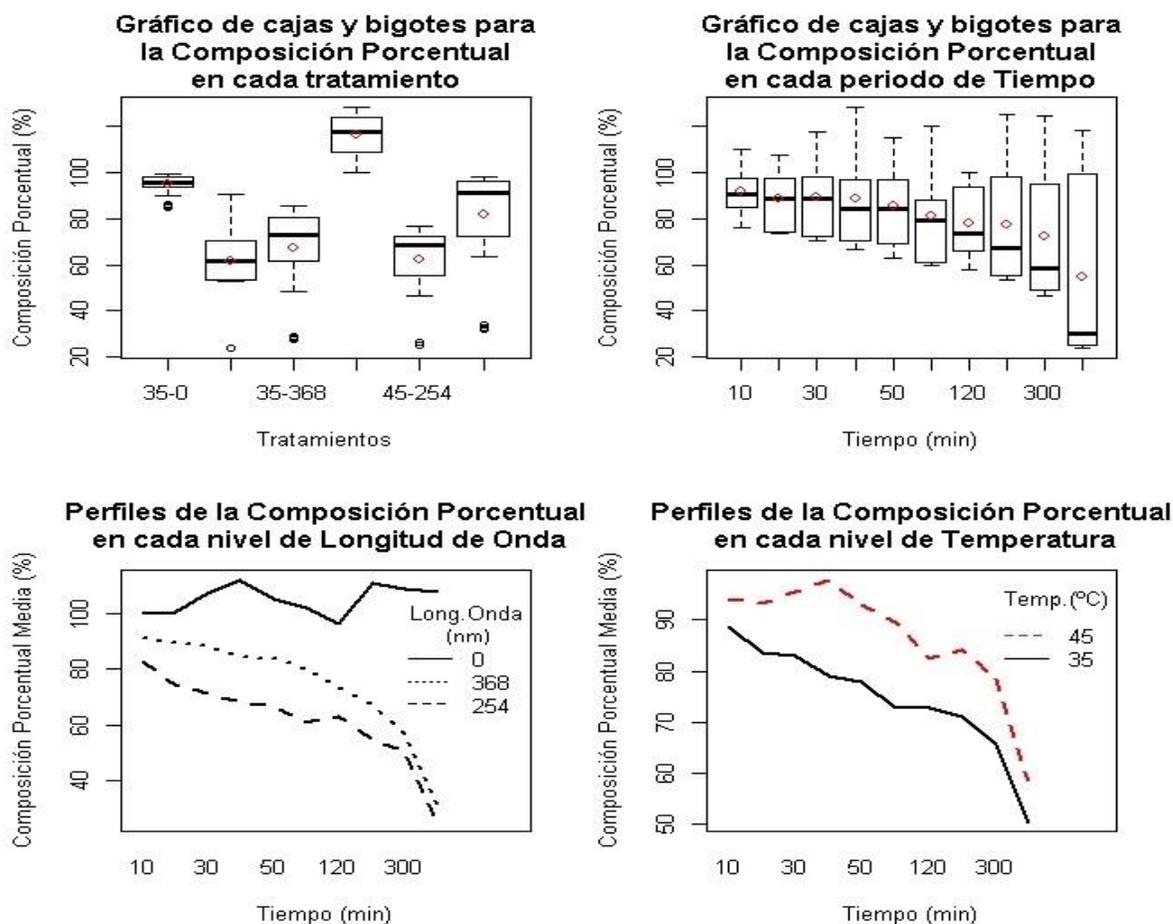


Figura 6-13 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 1

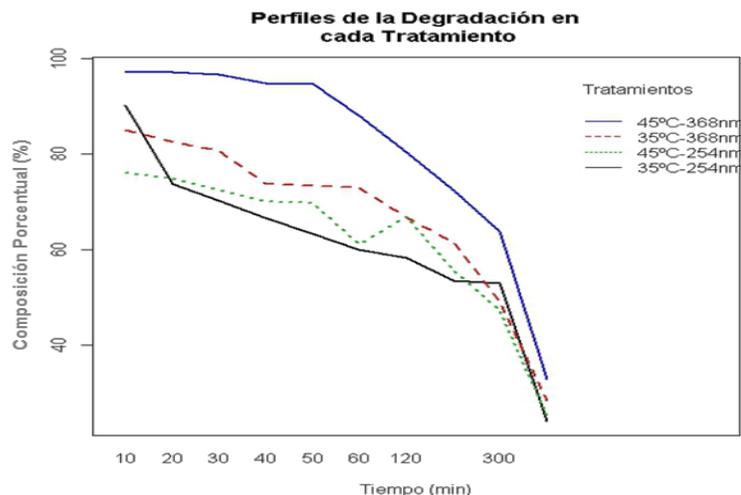


Figura 6-14 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 1

Tabla 6-13 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 1

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	1701.47956	1701.47956	6303.0379	7.49E-78
Longitud de Onda	1	5049.30552	5049.30552	18704.8759	1.32E-96
Tiempo	9	32773.4029	3641.48921	13489.6975	2.32E-123
Temperatura: Longitud de Onda	1	1403.18775	1403.18775	5198.03222	1.50E-74
Temperatura: Tiempo	9	535.559381	59.5065979	220.438935	1.26E-52
Longitud de Onda: Tiempo	9	678.043275	75.3381416	279.086022	1.44E-56
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	324.715642	36.0795158	133.654592	2.11E-44

Tabla 6-14 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 1

Temperatura: Longitud de Onda	1	1403.18775	1403.18775	5198.03222	1.50E-74
Temperatura: Tiempo	9	535.559381	59.5065979	220.438935	1.26E-52
Longitud de Onda: Tiempo	9	678.043275	75.3381416	279.086022	1.44E-56
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	324.715642	36.0795158	133.654592	2.11E-44

Tabla 6-15 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
45 °C:254 nm-35 °C:254 nm	0.69192821	0.33993521	1.04392121	< 0.001
35 °C:368 nm-35 °C:254 nm	6.13436809	5.78237509	6.48636109	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:254 nm	20.5044431	20.1524501	20.8564361	< 0.001
35 °C:368 nm-45 °C:254 nm	5.44243988	5.09044688	5.79443288	< 0.001

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
45 °C:368 nm-45 °C:254 nm	19.8125149	19.4605219	20.1645079	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:368 nm	14.370075	14.018082	14.722068	< 0.001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de Temperatura o de Longitud de Onda según sea el caso; son significativos.

6.2.2 Análisis para el compuesto 12.834 (2)

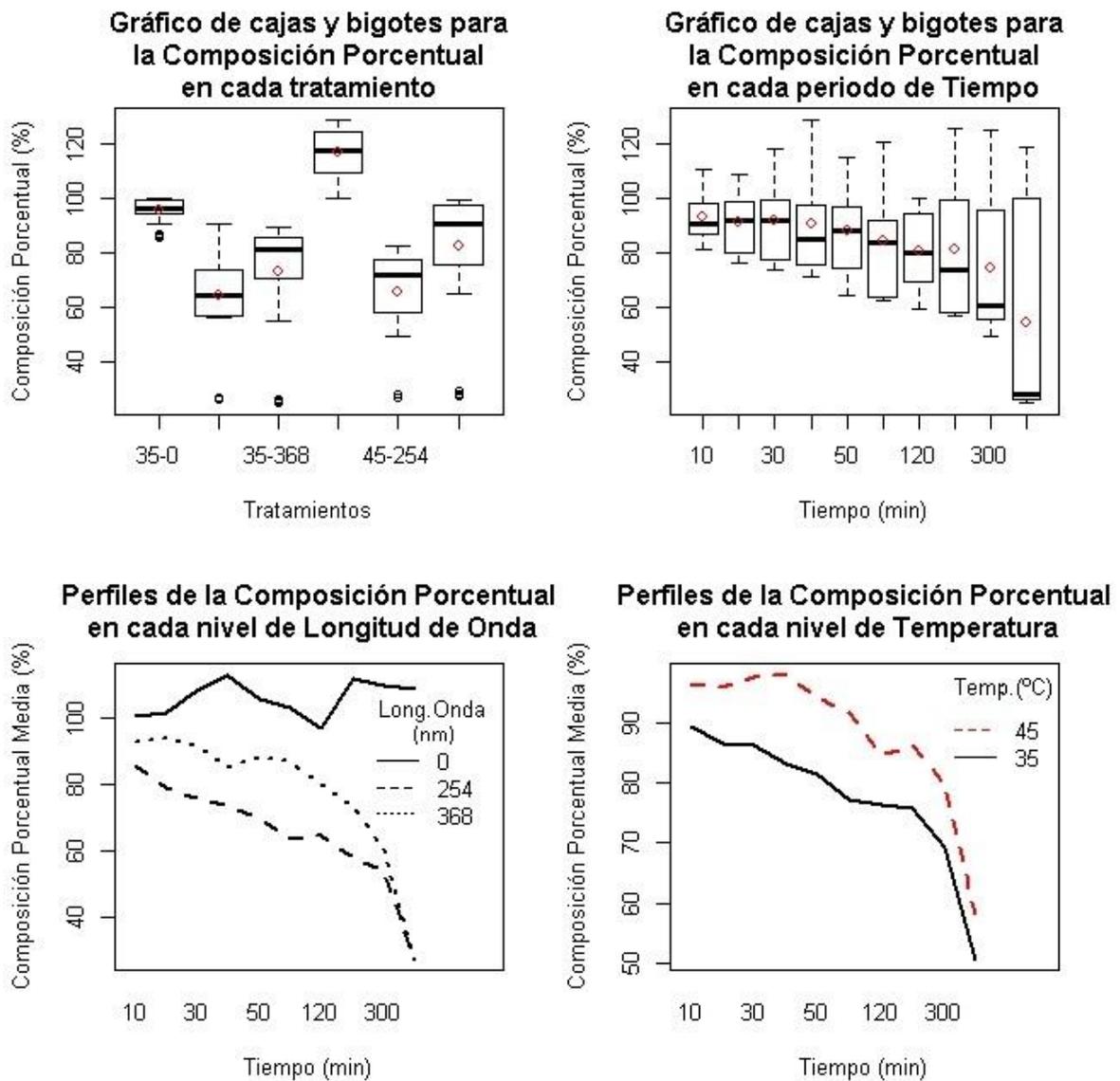


Figura 6-15 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 2

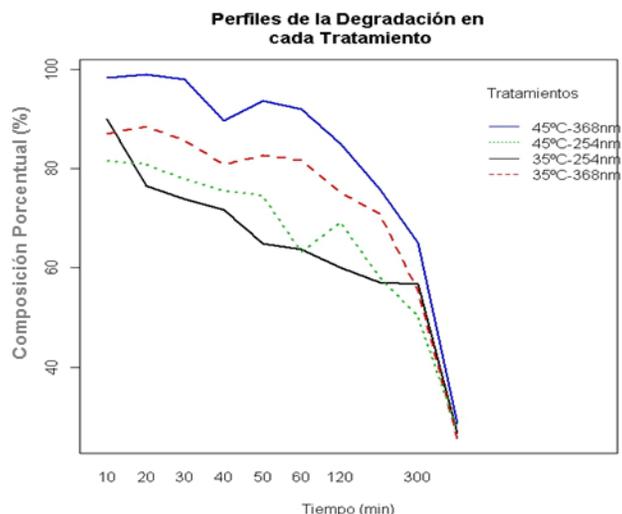


Figura 6-16 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 2

Tabla 6-16 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 2

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	899.598487	899.5984875	2772.933162	7.36E-64
Longitud de Onda	1	5007.83708	5007.837079	15436.21705	2.77E-93
Tiempo	9	36428.3801	4047.597786	12476.36394	5.26E-122
Temperatura: Longitud de Onda	1	409.262387	409.2623866	1261.515287	9.59E-51
Temperatura: Tiempo	9	299.043998	33.22711093	102.419645	3.92E-40
Longitud de Onda: Tiempo	9	1239.93712	137.7707916	424.6663397	1.16E-63
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	278.21638	30.91293114	95.28638953	5.44E-39

Tabla 6-17 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 2

Temperatura: Longitud de Onda	1	409.262387	409.2623866	1261.515287	9.59E-51
Temperatura: Tiempo	9	299.043998	33.22711093	102.419645	3.92E-40
Longitud de Onda: Tiempo	9	1239.93712	137.7707916	424.6663397	1.16E-63
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	278.21638	30.91293114	95.28638953	5.44E-39

Tabla 6-18 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 2

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
45 °C:254 nm-35 °C:254 nm	1.78248509	1.39660686	2.16836332	< 0.001
35 °C:368 nm-35 °C:254 nm	9.22653956	8.84066133	9.61241779	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:254 nm	18.3960618	18.0101836	18.7819401	< 0.001

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
35 °C:368 nm-45 °C:254 nm	7.44405448	7.05817625	7.82993271	< 0.001
45 °C:368 nm-45 °C:254 nm	16.6135767	16.2276985	16.999455	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:368 nm	9.16952226	8.78364403	9.55540049	< 0.001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de Temperatura o de Longitud de Onda según sea el caso; son significativos.

6.2.3 Análisis para el compuesto 14.773 (3)

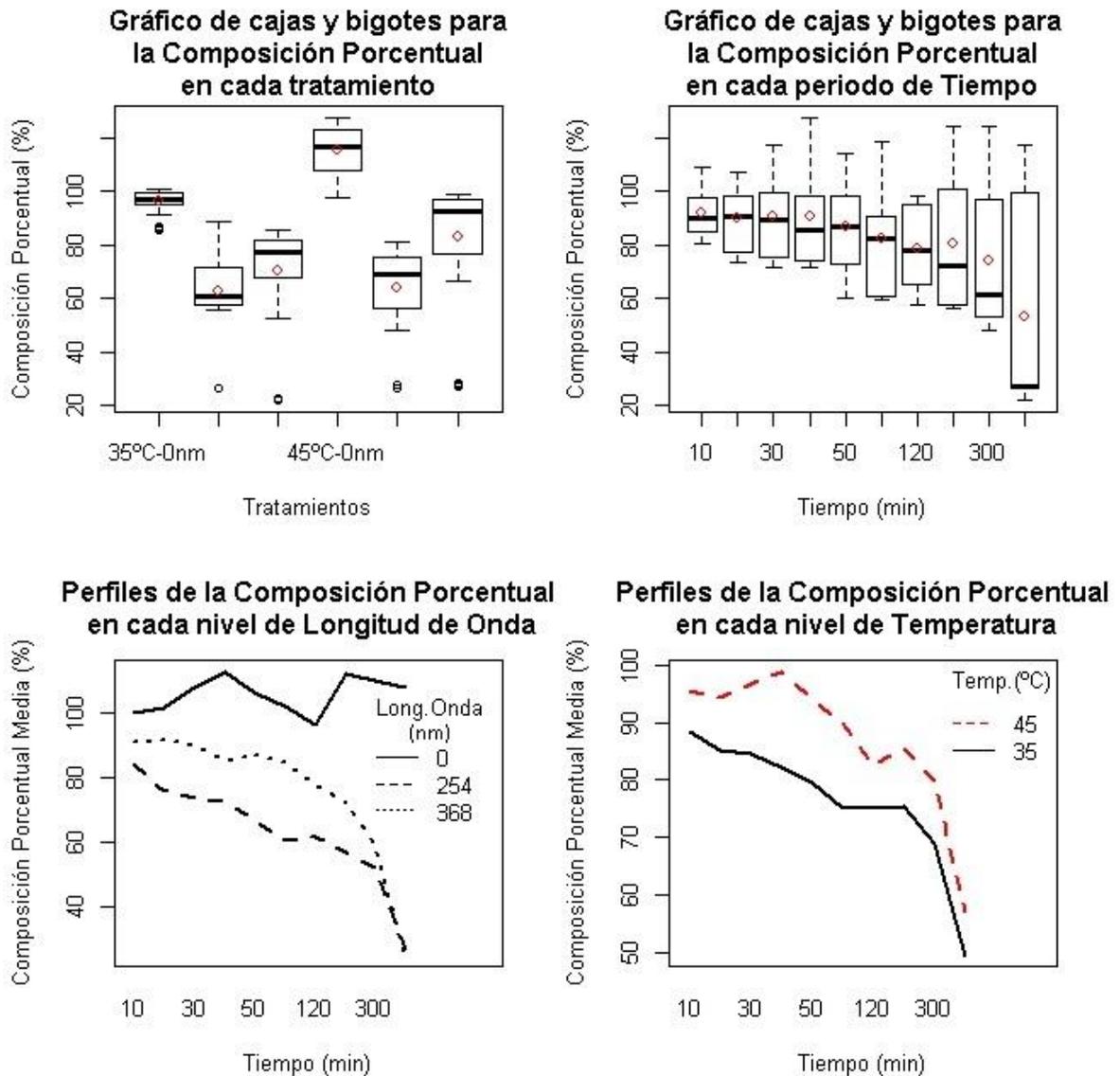


Figura 6-17 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 3

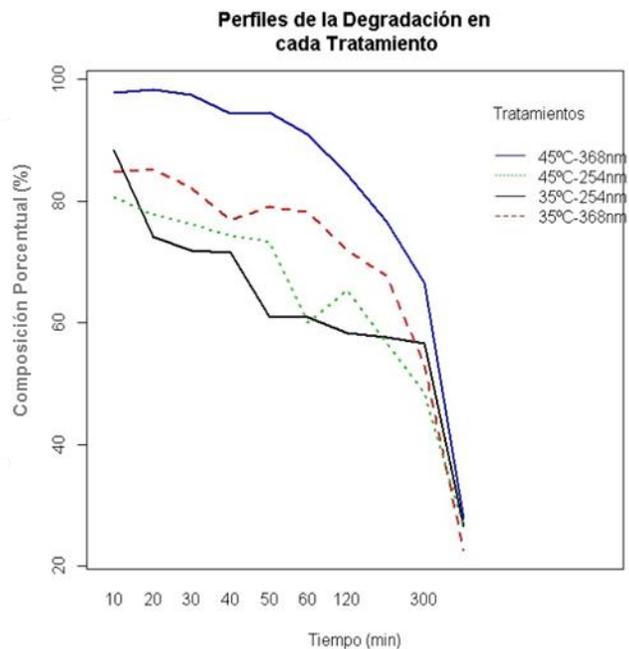


Figura 6-18 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 3

Tabla 6-19 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 3

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	1462.92996	1462.92996	4753.34188	5.08E-73
Longitud de Onda	1	5258.47328	5258.47328	17085.7949	4.86E-95
Tiempo	9	35500.4198	3944.49109	12816.4131	1.80E-122
Temperatura: Longitud de Onda	1	980.757331	980.757331	3186.66992	3.26E-66
Temperatura: Tiempo	9	424.585689	47.1761877	153.284542	1.25E-46
Longitud de Onda: Tiempo	9	1445.07079	160.563421	521.701554	3.65E-67
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	268.703465	29.8559406	97.0077152	2.84E-39

Tabla 6-20 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 3

Temperatura: Longitud de Onda	1	980.757331	980.757331	3186.66992	3.26E-66
Temperatura: Tiempo	9	424.585689	47.1761877	153.284542	1.25E-46
Longitud de Onda: Tiempo	9	1445.07079	160.563421	521.701554	3.65E-67
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	268.703465	29.8559406	97.0077152	2.84E-39

Tabla 6-21 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 3

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
45 °C:254 nm-35 °C:254 nm	1.26546222	0.88961801	1.64130643	< 0.001
35 °C:368 nm-35 °C:254 nm	7.52174351	7.1458993	7.89758772	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:254 nm	20.2225739	19.8467296	20.5984181	< 0.001
35 °C:368 nm-45 °C:254 nm	6.2562813	5.88043709	6.6321255	< 0.001
45 °C:368 nm-45 °C:254 nm	18.9571116	18.5812674	19.3329558	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:368 nm	12.7008303	12.3249861	13.0766746	< 0.001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de Temperatura o de Longitud de Onda según sea el caso; son significativos.

6.2.4 Análisis para el compuesto 16.543 (4)

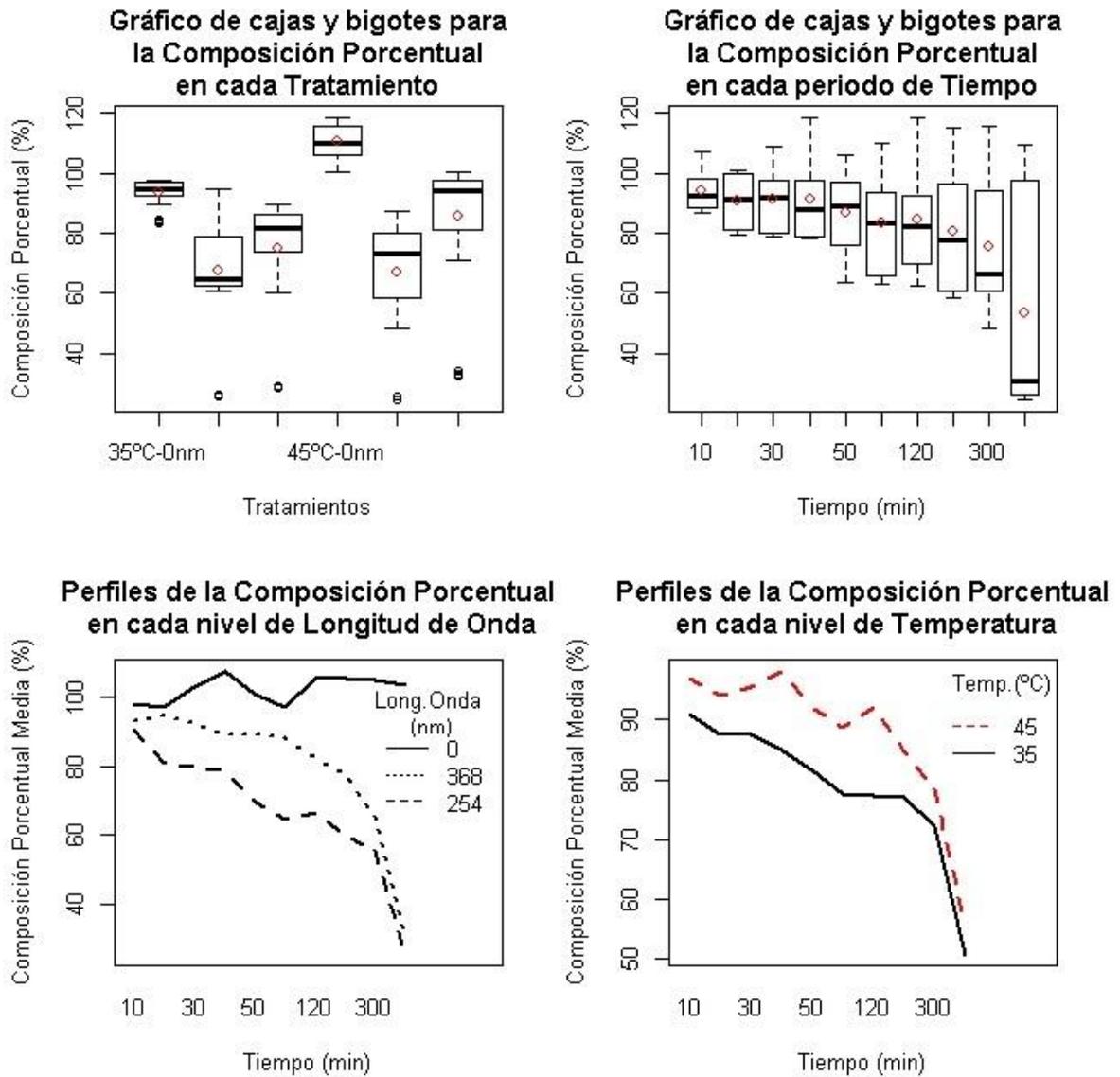


Figura 6-19 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 4

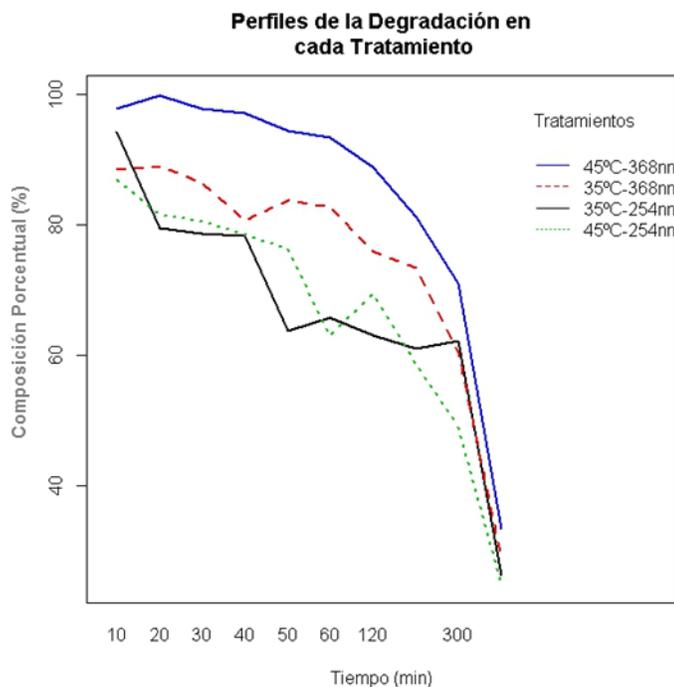


Figura 6-20 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 4

Tabla 6-22 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 4

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	771.19622	771.19622	2601.48575	8.79E-63
Longitud de Onda	1	5181.96483	5181.96483	17480.3861	1.96E-95
Tiempo	9	36749.5802	4083.28669	13774.2015	1.01E-123
Temperatura: Longitud de Onda	1	886.416691	886.416691	2990.16039	3.91E-65
Temperatura: Tiempo	9	461.886735	51.3207484	173.120915	1.26E-48
Longitud de Onda: Tiempo	9	1080.59379	120.065977	405.020045	7.41E-63
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	335.494313	37.2771459	125.747458	2.04E-43

Tabla 6-23 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 4

Temperatura: Longitud de Onda	1	886.416691	886.416691	2990.16039	3.91E-65
Temperatura: Tiempo	9	461.886735	51.3207484	173.120915	1.26E-48
Longitud de Onda: Tiempo	9	1080.59379	120.065977	405.020045	7.41E-63
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	335.494313	37.2771459	125.747458	2.04E-43

Tabla 6-24 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 4

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
45 °C:254 nm-35 °C:254 nm	-0.365573938	-0.734438847	0.00329097	0.053
35 °C:368 nm-35 °C:254 nm	7.70702504	7.338160131	8.07588995	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:254 nm	18.21292258	17.84405767	18.5817875	< 0.001
35 °C:368 nm-45 °C:254 nm	8.072598978	7.703734069	8.44146389	< 0.001
45 °C:368 nm-45 °C:254 nm	18.57849652	18.20963161	18.9473614	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:368 nm	10.50589754	10.13703263	10.8747624	< 0.001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de Temperatura o de Longitud de Onda según sea el caso; son significativos, excepto en el efecto simple de la Temperatura a 254 nm, en donde no se encontraron diferencias significativas entre estos dos niveles de Temperaturas.

6.2.5 Análisis para el compuesto 19.709 (5)

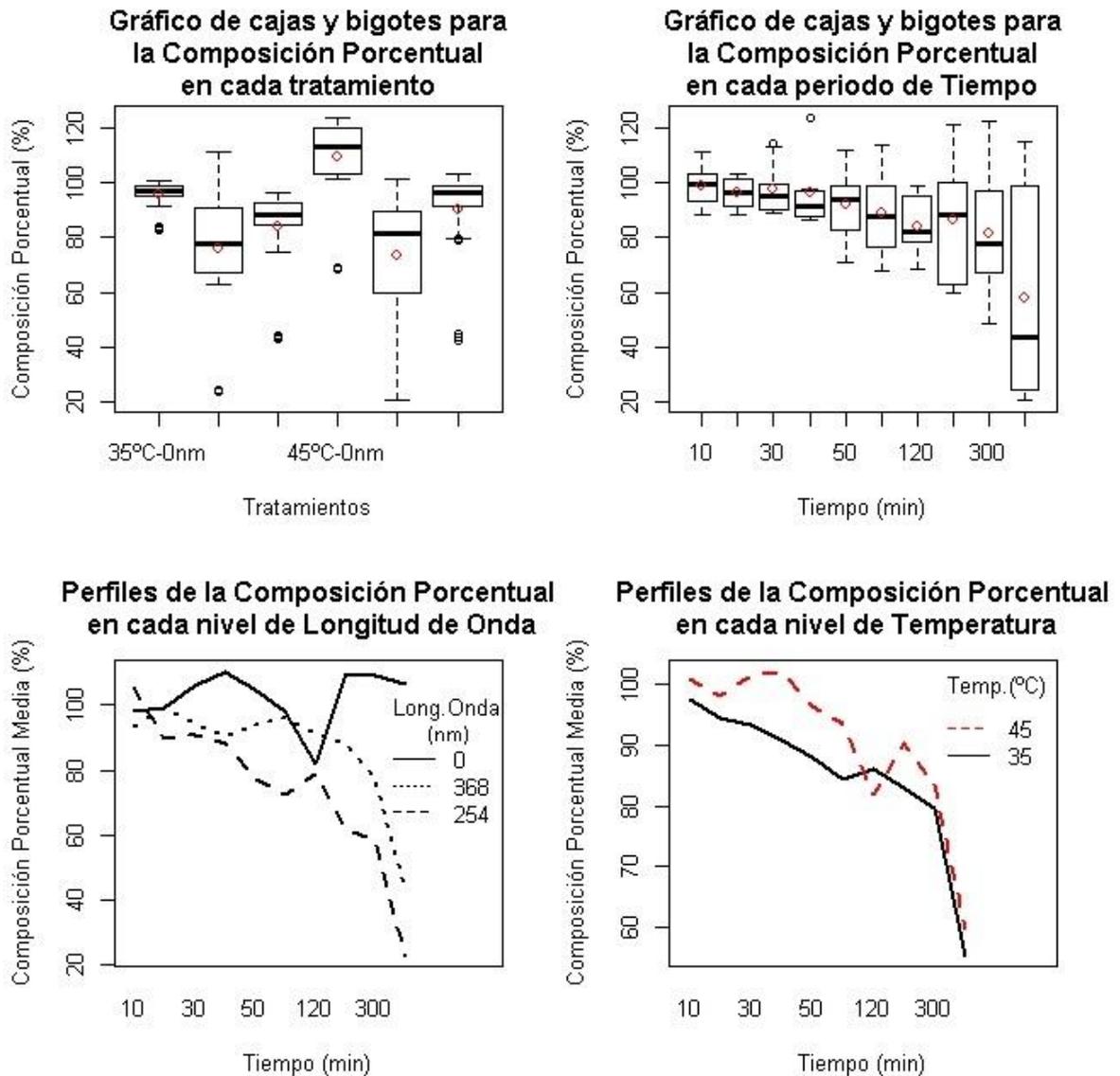


Figura 6-21 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto

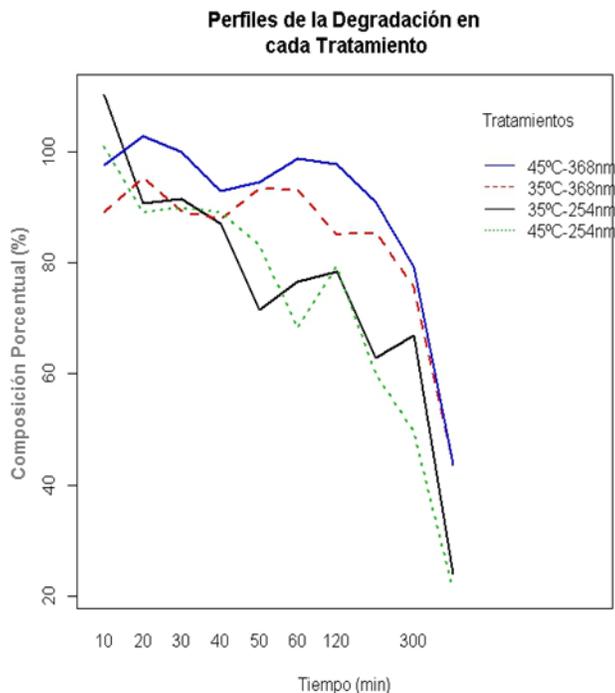


Figura 6-22 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 5

Tabla 6-25 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 5

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	75.283521	75.283521	115.06146	3.77E-17
Longitud de Onda	1	4509.3751	4509.3751	6892.01672	2.19E-79
Tiempo	9	39421.3807	4380.15342	6694.51751	3.35E-111
Temperatura: Longitud de Onda	1	601.307518	601.307518	919.02345	1.28E-45
Temperatura: Tiempo	9	480.154754	53.3505282	81.5396201	1.49E-36
Longitud de Onda: Tiempo	9	3775.45009	419.494454	641.144887	1.10E-70
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	547.11635	60.7907056	92.911002	1.36E-38

Tabla 6-26 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 5

Temperatura: Longitud de Onda	1	601.307518	601.307518	919.02345	1.28E-45
Temperatura: Tiempo	9	480.154754	53.3505282	81.5396201	1.49E-36
Longitud de Onda: Tiempo	9	3775.45009	419.494454	641.144887	1.10E-70
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	9	547.11635	60.7907056	92.911002	1.36E-38

Tabla 6-27 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 5

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
45 °C:254 nm-35 °C:254 nm	-2.89288155	-3.440881654	-2.344881445	< 0.001
35 °C:368 nm-35 °C:254 nm	7.783193842	7.235193738	8.331193946	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:254 nm	13.84432456	13.29632446	14.39232466	< 0.001
35 °C:368 nm-45 °C:254 nm	10.67607539	10.12807529	11.2240755	< 0.001
45 °C:368 nm-45 °C:254 nm	16.73720611	16.18920601	17.28520621	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:368 nm	6.061130719	5.513130614	6.609130823	< 0.001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de Temperatura o de Longitud de Onda según sea el caso; son significativos.

6.2.6 Análisis para el compuesto 23.972 (6)

El gráfico de perfiles muestra el comportamiento medio de cada nivel del factor en la variable Degradación a través del tiempo. En los perfiles de Degradación de cada nivel de Longitud de Onda se muestran diferencias marcadas en los comportamientos, ya que a 368 nm no se logra una degradación del compuesto. En los perfiles de Degradación de cada nivel de Temperatura no se notan comportamientos bien marcados de Degradación.

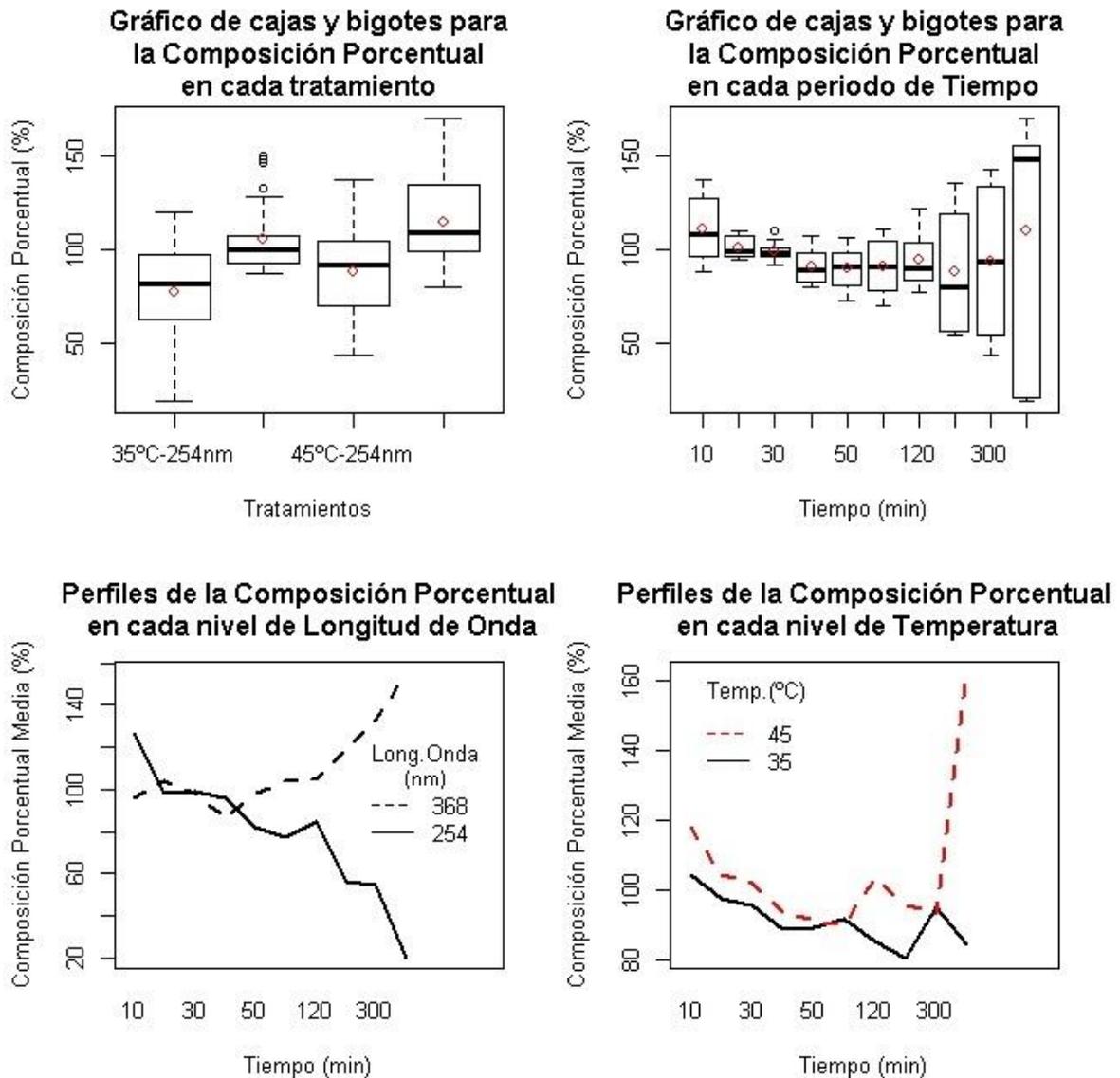


Figura 6-23 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 6

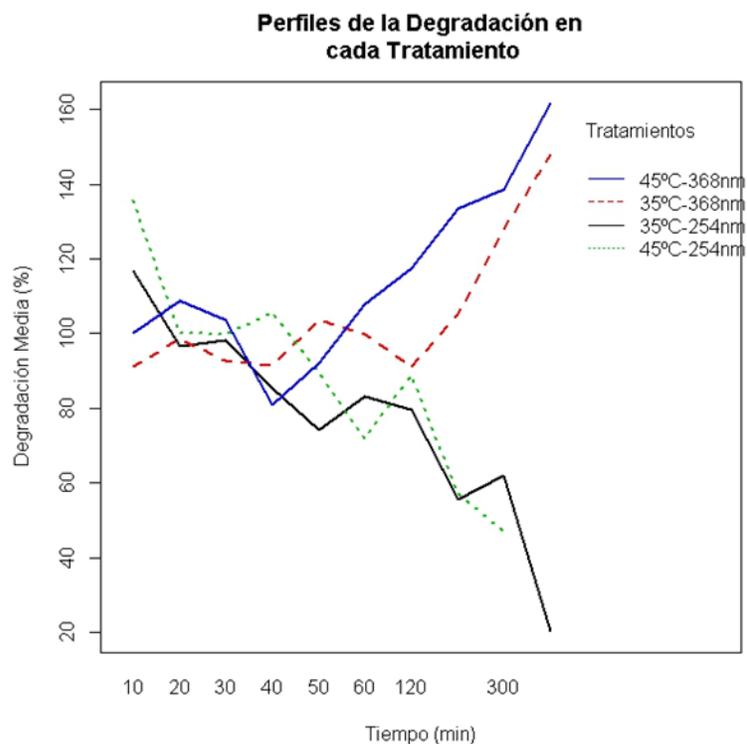


Figura 6-24 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 6

Tabla 6-28 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 6

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	3557.5142	3557.5142	397.55134	2.36E-32
Longitud de Onda	1	21304.2722	21304.2722	2380.7472	3.27E-60
Tiempo	9	6199.67769	688.853077	76.9791625	4.27E-35
Temperatura: Longitud de Onda	1	67.7018239	67.7018239	7.56566223	7.39E-03
Temperatura: Tiempo	9	7819.66902	868.852114	97.0940108	1.23E-38
Longitud de Onda: Tiempo	9	44952.9744	4994.77494	558.164875	5.71E-67
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	8	2853.82772	356.728465	39.8643185	1.68E-24

Tabla 6-29 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 6

Temperatura: Longitud de Onda	1	67.7018239	67.7018239	7.56566223	7.39E-03
Temperatura: Tiempo	9	7819.66902	868.852114	97.0940108	1.23E-38
Longitud de Onda: Tiempo	9	44952.9744	4994.77494	558.164875	5.71E-67
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	8	2853.82772	356.728465	39.8643185	1.68E-24

Tabla 6-30 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 6

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
45 °C:254 nm-35 °C:254 nm	11.8784086	9.79512097	13.9616962	< 0.001
35 °C:368 nm-35 °C:254 nm	28.4813824	26.4536592	30.5091057	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:254 nm	37.3274947	35.2997714	39.355218	< 0.001
35 °C:368 nm-45 °C:254 nm	16.6029738	14.5196862	18.6862615	< 0.001
45 °C:368 nm-45 °C:254 nm	25.4490861	23.3657985	27.5323737	< 0.001
45 °C:368 nm-35 °C:368 nm	8.84611225	6.81838898	10.8738355	< 0.001

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de Temperatura o de Longitud de Onda según sea el caso; son significativos.

6.2.7 Análisis para el compuesto 27.287 (7)

El gráfico de perfiles muestra el comportamiento medio de cada nivel del factor en la variable Degradación a través del tiempo. En los perfiles de Degradación de cada nivel de Longitud de Onda se muestran algunas diferencias en los comportamientos, ya que a 254 nm se logra una degradación más rápida que a 368 nm. En los perfiles de Degradación de cada nivel de Temperatura no se notan ciertas diferencias bien marcadas en los comportamientos. En las dos gráficas de perfiles hay una característica común y es que a las 5 horas la Degradación no difiere considerablemente de un nivel a otro ya que se alcanzan degradaciones menores al 20%.

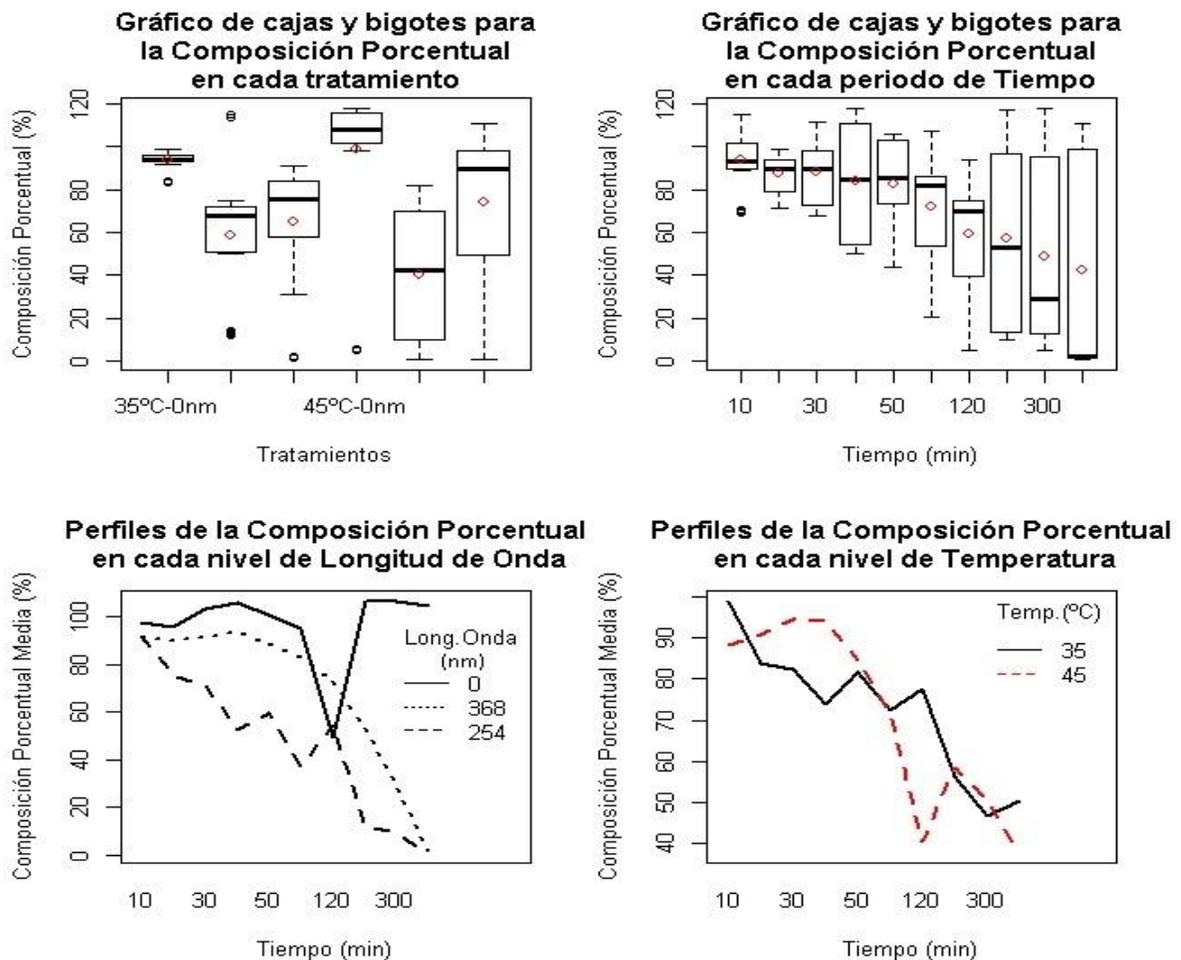


Figura 6-25 Gráficos de cajas y bigotes para la degradación en cada tratamiento y sus perfiles de degradación en cada nivel de λ y T para el compuesto 7

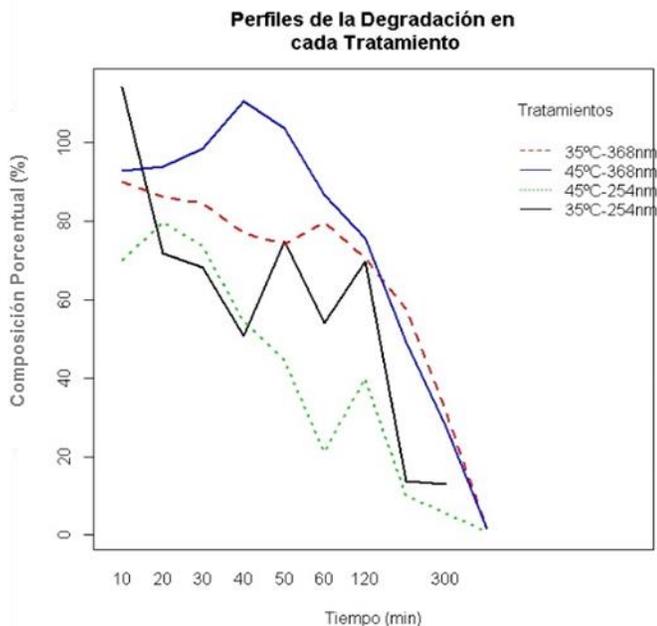


Figura 6-26 Gráfico de degradación para cada tratamiento del compuesto 7

Tabla 6-31 Resumen de Anova para cada uno de los factores en el compuesto 7

Fuente	G.L.	Sum Cuad	CM	Valor F	Valor p
Temperatura	1	802.167298	802.167298	1103.62583	8.59E-48
Longitud de Onda	1	12365.4023	12365.4023	17012.3831	4.68E-93
Tiempo	9	91384.5795	10153.8422	13969.7075	3.09E-121
Temperatura: Longitud de Onda	1	3240.37663	3240.37663	4458.1266	1.38E-70
Temperatura: Tiempo	9	3926.92892	436.325435	600.298746	3.50E-68
Longitud de Onda: Tiempo	9	7326.24404	814.027116	1119.94263	1.27E-78
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	8	3226.61288	403.326611	554.898795	1.95E-65

Tabla 6-32 Resumen de Anova para las interacciones en el compuesto 7

Temperatura: Longitud de Onda	1	3240.37663	3240.37663	4458.1266	1.38E-70
Temperatura: Tiempo	9	3926.92892	436.325435	600.298746	3.50E-68
Longitud de Onda: Tiempo	9	7326.24404	814.027116	1119.94263	1.27E-78
Temperatura: Longitud de Onda: Tiempo	8	3226.61288	403.326611	554.898795	1.95E-65

Tabla 6-33 Comparación de efectos simples entre los niveles de los factores Temperatura y Longitud de Onda en el compuesto 7

Comparación	Diferencia	L Inf	L Sup	Valor p
45 °C:254 nm-35 °C:254 nm	-15.46973814	-16.06347508	-14.8760012	< 0.000
35 °C:368 nm-35 °C:254 nm	9.802130141	9.208393199	10.39586708	< 0.000
45 °C:368 nm-35 °C:254 nm	15.31063945	14.71690251	15.90437639	< 0.000
35 °C:368 nm-45 °C:254 nm	25.27186828	24.69396718	25.84976938	< 0.000
45 °C:368 nm-45 °C:254 nm	30.78037759	30.20247648	31.35827869	< 0.000
45 °C:368 nm-35 °C:368 nm	5.508509307	4.930608204	6.08641041	< 0.000

Los resultados indican que los efectos simples de un factor con respecto a un nivel de Temperatura o de Longitud de Onda según sea el caso; son significativos.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Ävalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismos secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119–145.
- Barrek, S., Paisse, O., & Grenier-Loustalot, M.-F. (2004). Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment. Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 753–63. doi:10.1007/s00216-003-2377-0
- Beckstrom-Stetemberg, S. M., & Duke, J. (1996). Phytochemeco Database. Retrieved from <http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html>
- Bedoya. (2008). *Efecto de la relación agitación-aireación sobre el crecimiento celular y la producción de azadiractina en cultivos celulares de Neem en un biorreactor agitado*. Universidad Nacional de Colombia.
- Biswas, K., & Chattopadhyay, I. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current ...*, 82(11), 1336–1345. Retrieved from <http://repository.ias.ac.in/5193/>
- Capataz, J. (2005). *EFECTO DE ELICITORES ABIÓTICOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN SUSPENSIONES CELULARES DE Azadirachta indica Y SU EFECTO SOBRE Spodoptera sp.* Universidad Nacional de Colombia.
- Carey, F. A., & Sundberg, richard J. (2007). Photochemistry. In Springer (Ed.), *Advanse Organic Chemistry Part A* (p. 1097).
- Cohen, E., Quistad, G. B., & Casida, J. E. (1996). Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradioe and other limonoids from neem insecticide. *Life Science*, 58(13), 1075–1081.
- Cole, R. J., & Cox, R. H. (1981). *Handbook of Toxic Fungal Metabolites* (pp. 87–165). New York: Academic Press.
- Connolly, D. L., & Waterman, P. G. (2000). *Chemistry of limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae. Chemistry and chemical taxonomy of the rutale. London.*

- Cruz, M., Peral, F., Troitino, M., & Plaza, M. (2013). *Evolucion historica de los principios de la quimica* (pp. 393–445). Madrid: Universidad Nacional de Educacion a Distancia. Retrieved from <http://www.uned.es/publicaciones>
- Dua, V. . (2009). Larvicidal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria Journal*, 8, 124.
- Dureja, P., & Johnson, S. (2000). Photodegradation of azadirachtin-A: A neem-based pesticide. *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*-, 79(12), 1998–2001. Retrieved from http://www.currentscience.ac.in/Downloads/article_33722.pdf
- Espinoza, A. (2003). *Efectos de los plaguicidas en la salud y el ambiente en Costa Rica*. Ministerio de Salud. (O. regional de la O. M. de la S. Organización Panamericana de la Salud, Ed.) (1st ed., pp. 6–24). San Jose de Costa Rica: Organización Panamericana de la Salud. Retrieved from <http://www.bvs.sa.cr/php/situacion/plaguicidas.pdf>
- Evans, J. (1992). *Plantation Forestry in the tropics*. Oxford : Clarendon Press, 164.
- Falasca, S., & Bernabe, M. A. (2009). El árbol del Neem (*Azadirachta indica*) para controlar enfermedades endémicas en Argentina. *Revista Geográfica*, 146, 111–124.
- FAO. (1994). *Agricultural and Environmental Legislation - Lithuania*. Roma.
- FAO. (1998). The crop environmental requirements database. In FAO (Ed.), *Land and water digital media series 4*. Roma: FAO.
- Fernandez, S. de la F. (2011). *ANÁLISIS FACTORIAL*. (U. A. de Madrid, Ed.) (pp. 14–21). Retrieved from <http://www.fuenterrebollo.com/Economicas/ECONOMETRIA/MULTIVARIANTE/FACTORIAL/analisis-factorial.pdf>
- Ghiasuddin. (1993). *Chemical studies on the constituents of Azadirachta indica A. Juss*. University of Karachi.
- Giraldo, F., Castaño, C., Morales, G., Lopez, C., & Galeano, E. (2002). Determinación de azadirachtina por cromatografía líquida de alta eficiencia. (HPLC) en semillas de árbol de NEEM (*A. Indica*) cultivadas en Colombia. *Vitae*, 9(1), 59–63.
- Griesbeck, A. G., & Mattay, J. (2005). Synthetic Organic Photochemistry. In M. Dekker (Ed.), *Synthetic Organic Photochemistry* (pp. 1–11). New york. Retrieved from <http://www.dekker.com>
- Gualtieri, M. (2004). Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la *Azadirachta Indica* A. Juss (Neem). *Folleto Tecnico. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 35(1), 12–16.

- Guanasekaran, A. (2009). Larvicidal & emergence inhibitory activities of NeemAzal T/S 1.2 per cent EC against vectors of malaria, filariasis & dengue. *Indian Journal of Medical*, *130*, 138–145.
- Gutierrez-Garcia, S. (2010). Efecto del nim en el daño ocasionado por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en tres variables agronómicas de maíz resistente y susceptible. *Acta Zoológica Mexicana*, *26*, 1–16.
- Guzmán, & Quintero. (2005). *Cinética de Crecimiento de A. indica A. Juss en un Biorreactor de Tanque Agitado*. Universidad Nacional de Colombia.
- Habluetzel, A. (2009). *Azadirachta indica* as a public health tool for the control of malaria & other vector-borne diseases. *Indian Journal of Medical Research*, *130*, 112–114.
- Henderson, R., McCrindle, A., & K.H., M. (1968). Overton, Tetrarortriterpenoids. IX. The constitution and stereochemistry of salanin. *Tetrahedron*, *24*, 1525–1528.
- J. W. Moore, R. G. P. (1980). *Kinetic and Mechanism*. (Wiley., Ed.) (3a ed., pp. 13–16).
- Johnson, S., & Dureja, P. (2002). Effect of surfactants on persistence of azadirachtin-A (neem based pesticide). ... of *Environmental Science and Health, Part ...*, *37*(1), 75–80. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/PFC-120002899>
- Johnson, S., Dureja, P., & Dhingra, S. (2003). Photostabilizers for azadirachtin-A (a neem-based pesticide). *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *38*(4), 451–62. doi:10.1081/PFC-120021665
- Joycharat, N. (2010). Terpenoid constituents and antifungal activity of *Aglaia forbesii* seed against phytopathogens,.. *Canadian Journal of Chemistry*, *88*, 937–944.
- Khosla, P. (2000). Antinociceptive activity of *Azadirachta indica* (Neem) in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, *32*, 372–374.
- Koul, O., & Wahab, S. (2004). *Neem: today and in the new millennium*. (Kluwer, Ed.) (pp. 1–256). Academic publishers. USA. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=U1dFQOq4uX0C&oi=fnd&pg=PR7&dq=Neem+today+and+in+the+new+millennium&ots=WP_1mH5Lvt&sig=9pFnYcEjU3gm_Cu02bDXX3Q98I
- Kumar, J., & Parmar, B. (1999). Stabilization of azadirachtin A in neem formulations: effect of some solid carriers, neem oil, and stabilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 1735–1739. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf980667t>
- Kumar, R. (2011). Isolates, Head space GC/MS analysis of volatile constituents of *Trichilea connaroides* wight and arn. Extracts and their invitro anti-plasmodium activity against *Plasmodium falciparum*. *Research Journal of Phytochemistry*, *5*, 41–47.

- Laphookhieo, S. (2008). A novel limonoid from the seeds of *Chisocheton siamensis*. *Canadian Journal of Chemistry*, 28, 205–208.
- Lavie, D., Jain, K., & Kirson, I. (1967). Terpenoids - V. Melianone from *Melia azadarach* L. *Tetrahedron Letters* 8(5): p.p. 490. *Tetrahedron Letters*, 8(5), 490.
- Li, M. (2008). The absolute stereochemistry of protoxylogranatin A—a new protolimonoid from the seeds of Chinese mangrove, *Xylocarpus granatum*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(6), 503–508.
- Liogier, A. H., & Martorell, L. F. (1999). *Flora of Puerto Rico and adjacent islands: systematic synopsis*. University of Puerto Rico. Segunda edición. San Juan. (U. of P. Rico, Ed.) (Segunda ed., p. 94). San Juan: University of Puerto Rico.
- Mohanty, S. S., Raghavendra, K., & Dash, A. P. (2008). Influence of growth medium on antifungal activity of neem oil (*Azadirachta indica*). *Biomedical and Life Science*, 49(5), 318–320.
- Mulholland, D., Parel, B., & Coombes, P. H. (2000). The chemistry of the Meliaceae and Ptaeroxylaceae of southern and eastern Africa and Madagascar. *Current Organic Chemistry*, 4, 1011–1054.
- Musa, Y. M. (2007). Analgesic and anti-inflammatory effects of the leaf extracts of *Pseudocedrella kotschyii* Harms (Meliaceae). *Journal of Pharmaceutical. And Toxic*, 2(6), 542–550.
- Nacional Academy of Sciences (NAS). (1980). *Fire Wood Crops, Shrub and tree species for energy production. Report of an Ad Hoc Panel of the Advisory Committee on Technology Innovation*. (p. 114). Washington.
- Negi, J. (2011). (Meliaceae), Chemical and pharmacological aspects of *Toona*. *Research Journal of Phytochemistry*, 5(1), 14–21.
- Negreta, F., & Morales, J. (2003). *El gusano cogollero del maiz (Spodoptera frugiperda. Smith)*. *Cartilla Ilustrada No. 3* (pp. 16–21.). Cerete.
- Norten, E. (1999). *Neem. India's Miraculous Healing Plant.: Edited by*. (J. Putz, K. Werner, & D. Straw, Eds.) (p. 92). Rochester: Healing Arts Press.
- OMAF. (1991). *Grower Pesticide Safety Course*. Toronto-Ontario.
- Omar, S. (2003). Traditionally used antimalarials from the Meliaceae. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(2), 133–139.

- Orozco, F. (2009). *Efecto de la oferta de oxígeno sobre crecimiento y la producción de terpenoides con células de Azadirachta indica en un bioreactor*. Colegio de Posgraduados de Yauatepec, Morelos México.
- Orozco S, G. P. (2013). *Variación en la producción de terpenoides durante el establecimiento de líneas de células en suspensión de Azadirachta indica*. Universidad Nacional de Colombia.
- Ostwald, W. (1888). Ostwald's dilution law. *Z. Physik. Chem*, 2, 36–37.
- Ostwald, W. (1889). Ostwald's dilution law. *Z. Physik. Chem*, 3, 170, 241.
- Osuna, E. (2000). *Producción de plantas y establecimiento y manejo de plantaciones de neem (Azadirachta indica A, Juss). dentro de Investigación Regional del Noreste Campo Experimental Todos Santos*. La Paz (México). Campo Experimental Todos Santos.
- Pradhan, S., Jotwani, M. G., & Rai, B. K. (1962). The neem seed deterrent to locusts. *Indian Farming*, 12, 7–11.
- Priyadarsini, R. V. (2009). The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. *Free Radical Research*, 1–13.
- Proksch, P. (2001). Chemistry and biological activity of rocaglamide and related compounds in Aglaia species (Meliaceae). *Current Organic Chemistry*, 5, 923–938.
- Qi, S., Wu, D., Ma, Y., & Luo, X. (2003). The chemical constituents of *Munronia henryi*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 5, 215–221.
- R.L, G. (2008). Efficacy of local neem extracts for sustainable malaria vector control in an African village. *Malaria Journal*, 7(138), 1–11.
- Rafiq, M., & Dahot, M. (2010). Callus and azadirachtin related limonoids production through in vitro culture of neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *African Journal of Biotechnology*, 9(4), 449–453. Retrieved from <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/77947>
- Raguraman, S., & Singh, R. P. (1999). Biological Effects of Neem (*Azadirachta indica*) Seed Oil on an Egg Parasitoid, *Trichogramma chilonis*, 92(6): p.p. . *Journal of Economic Entomology*, 92(6), 1274–1280.
- Rasheed, M. (2002). *Chemical constituents of A. indica*. University of Karachi, Karachi.
- Rasheed, M. (2002). *Studies on the chemical constituents of Azadirachta indica A.Juss (Neem)*. Tesis Doctoral. International center for chemical sciences,.

- Regnault-Roger, C., Philogene, B., & Vincent, C. (2003). Biopesticides d'origine végétale. *Tec&Doc-Lavoisier*, 1, 42–46.
- Ruiz, P. (2014). *Estudio Experimental y Computacional de la Termólisis de Isoprenol en Solución de m-xileno*. Universidad Nacional de Colombia.
- Sergiy, G., Kazanskaia, N., Uzhinov, B., Papisova, V., Gurman, V., Meluzova, G., ... Romanov, V. (1975). *Metodos Experimentales de la Cinetica Quimica*. (Mir Moscu, Ed.).
- Shultz, E. B., Bhatnaga, D., Jacobson, M., Metcalf, L. R., Saxena, C. R., & Unanader, D. (1992). *Neem a tree for solving global problems*. (National Academy Press., Ed.) (p. 152). Washington, D.C.
- Sibley, C. H., & Ringwald, P. (2006). Review: A database of antimalarial drug resistance. *Malaria Journal*, 5, 48. Retrieved from <http://www.malariajournal.com/content/5/1/48>
- Siddiqui, B. S., Ali, S. K., Ali, S. T., & Ahmed, F. (2009). Pregnane steroids from the heartwood of *Azadirachta indica*. *Turkish Journal of Chemistry*, 33, 501–506.
- Skoog, D., West, D., Holler, J., & Cruch, S. (2005). *Fundamentos de química analítica*. (T. Learning, Ed.) (8ava ed., pp. 910–912).
- Srivastava, S., & Srivastava, A. K. (2011). Stability enhancement of Azadirachtin (a biopesticide) produced in vitro against atmospheric degradation. In F. Pio & S. K. Varma (Eds.), *Annual International Conference on Advances in Biotechnology (BIOTECH 2011)* (pp. BT1–BT7). doi:10.5176/978-981-08-8119-1
- Subapriya, R., & Nagini, S. (2005). Medicinal Properties of Neem Leaves: A Review. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, 5, 149–156.
- Tagliati, E. (2011). ¿Qué hace la FAO? ¡Alimentos para siempre! Plaguicidas. Retrieved from <http://www.fao.org/kids/es/pesticides.html>.
- Trujillo, P. (2008). Determinación de la DL50 y TL50 de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín*, 61(2), 4564–4575.
- Udeinya, I. J. (2006). Fractions of an antimalarial neem-leaf extract have activities superior to chloroquine, and are gametocytocidal. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 100(1), 17–22.
- W. Muñoz, & O. Vanegas. (2004). *Comportamiento de las células vegetales en suspensión de A. Indica en un biorreactor agitado*. Universidad Nacional de Colombia.

“La escuela, es el arma más poderosa, puede cambiar el mundo”

Nelson Mandela

