

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**  
**Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas**

“ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE  
AZADIRACTINA Y SU ENFOQUE COMO COMPONENTE ACTIVO EN  
BIOPESTICIDAS AGRÍCOLAS”

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previo a la obtención del Título de:

**INGENIERO QUÍMICO**

PRESENTADO POR:

Génesis Andrea Baidal Veloz  
Ángel Daniel Baque Cambridge

TUTORA:

Lorena Quinchuela Carrera, MSc.

COTUTORA:

Patricia Manzano Santana, PhD.

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

# DEDICATORIA

En memoria de mi padre Felipe Baque Monar.

Aunque gritaré tu ausencia hasta el último día de mi vida, imitar tu resiliencia me ha permitido profesionalizarme. Desde lo más profundo de mi ser te agradezco tu apoyo incondicional, tu sacrificio, tu cariño, tus consejos y tu sabiduría. Fuiste un hombre ejemplar digno de imitar, formador de juventudes por 40 años y un fiel representante del pensamiento crítico e intelectual. Te dedico este trabajo, mi éxito y mis logros venideros, aunque no me alcanza para devolverte todo lo que me has dado. Prometo cuidar para siempre de mi familia.

A mi querida madre Bertha Cambridge Paredes también dedico este trabajo, mi éxito y mis logros venideros. Siempre creíste en mí y me animaste a conseguir mis metas. Tu sacrificio es una lección de vida que me sigues dando, y aunque mis profesores me han enseñado ciencias, de quién más he aprendido es de ti, de tu calidad de ser humano, de tu resiliencia, de tu pensamiento crítico y rebelde.

¡Queridos padres, muchas gracias por todo!

Ángel Baque Cambridge

# DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico principalmente:

A mis padres Jhonny Baidal Balón y Bella Veloz Peralta por demostrarme su amor cada día, porque gracias a su sacrificio y paciencia hoy puedo cumplir uno de mis objetivos más anhelados. Me apoyaron en cada decisión de mi vida, formaron mi carácter y me enseñaron que lo más importante en la vida es el respeto y la honestidad.

A mis hermanos quienes me motivaron, apoyaron e inculcaron el ejemplo de esfuerzo y dedicación para graduarme, luchar por mis sueños y nunca rendirme a pesar de las adversidades.

Finalmente quiero dedicar este proyecto a toda mi familia, por sus palabras de aliento y apoyarme durante todo este proceso.

Génesis Baidal Veloz

## AGRADECIMIENTOS

Mis sinceros agradecimientos a todas las personas que estuvieron presente en esta etapa universitaria.

A mis profesores y profesoras, a mis tutoras y a mi compañera de tesis Génesis Baidal les agradezco su dedicación y apoyo en los momentos más difíciles de este período.

A mis amigos de siempre agradezco sus consejos y motivaciones.

A mi querida institución ESPOL y a quienes la dirigen agradezco la pertinencia y humanización de mi educación.

A mis hermanas Diana y Aracely que nunca abandonaron merecen un fraterno agradecimiento.

A mi profesora, guía y amiga Dra. Cecilia Paredes mis sinceros agradecimientos por su solidaridad y apoyo incondicional.

¡A todos, muchas gracias!

Ángel Baque Cambridge

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar un enorme agradecimiento a Dios, por mantenerme con vida, salud y otorgarme el don del entendimiento para culminar esta etapa.

A mis padres agradezco su infinita paciencia y consejos, porque no es fácil comprender a un hijo.

A mi prima Emma Matamoros por ser mi confidente y amiga.

A mi institución ESPOL por abrirme las puertas del conocimiento, así como a cada maestro que aportó a mi formación profesional y humana, especialmente a mis tutoras de proyecto quienes con sus sabios conocimientos y recomendaciones nos orientaron para concluir este trabajo.

Finalmente agradezco a mis amigos y futuros colegas con quienes disfruto momentos inolvidables. A mi compañero Ángel Baque agradezco su esfuerzo y dedicación por este trabajo.

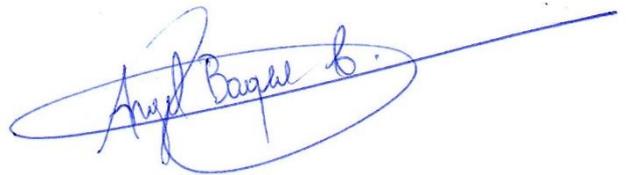
Génesis Baidal Veloz

## DECLARACIÓN EXPRESA

"Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponden conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Génesis Andrea Baidal Veloz* y *Ángel Daniel Baque Cambridge* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"



Génesis Baidal Veloz



Ángel Baque Cambridge

# EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:  
LORENA JACQUELINE  
QUINCHUELA CARRERA

.....  
Nadia Flores Manrique, MSc.

PROFESORA DE LA MATERIA

.....  
Lorena Quinchuela Carrera, MSc.

PROFESORA TUTORA

Patricia  
Manzano  
Santana

Firmado  
digitalmente por  
Patricia Manzano  
Santana  
Fecha: 2021.08.26  
21:19:00 -05'00'

.....  
Patricia Manzano Santana, PhD.

PROFESORA COTUTORA

## RESUMEN

El uso de agroquímicos en comunidades agrícolas afecta la sostenibilidad de sus modelos productivos y ambientales, por lo que es importante el desarrollo de procesos productivos amigables con el ambiente. Este proyecto promueve el aprovechamiento de las propiedades insecticidas de la azadiractina presente en extractos acuosos obtenidos desde el fruto de la especie *Azadirachta indica* A. Juss conocida como Neem. Los objetivos de este estudio son detectar la presencia de azadiractina en extractos polares mediante un análisis instrumental cualitativo por espectrofotometría UV-Vis e implementar diferentes estrategias de secado, para la determinación del grado de influencia en los procesos de extracción.

El diseño de la investigación contempló una metodología mixta (cuantitativa y cualitativa) con enfoque explicativo secuencial. Se definieron las siguientes etapas experimentales: 1) Tratamiento de la materia prima, 2) Extracción Sólido-Líquido, 3) Caracterización UV-Vis y 4) Tratamiento estadístico de los datos. El tratamiento de los frutos incluyó: recolección y limpieza, secado a temperatura ambiente (aire libre y en un secador solar) y tamizado. La extracción de azadiractina utilizando agua como solvente se realizó mediante sonicación y maceración, analizando diferentes tiempos de sonicación y relaciones masa/solvente respectivamente. Se realizaron barridos de longitudes de onda en un espectrofotómetro Marca Thermo Fisher Scientific, y sus resultados se analizaron en el software estadístico de IBM SPSS®.

Se pudo implementar un prototipo de secador solar para los frutos de Neem como la mejor opción para evitar degradación del componente activo. La extracción de azadiractina por maceración se favoreció a una relación masa/solvente de 30g/200mL. Finalmente, los mejores resultados para la detección de azadiractina, muestran como potencial método de extracción al proceso de sonicación durante un tiempo de 20min.

**Palabras Claves:** Neem, azadiractina, biopesticida, maceración, sonicación, secador solar

## **ABSTRACT**

*The use of agrochemicals in agricultural communities affects the sustainability of their production and environmental models, therefore, it is necessary to develop environmentally friendly production processes. This project promotes the use of the pesticide properties of azadirachtin present in aqueous extracts obtained from the fruit of the species *Azadirachta indica* A. Juss known as Neem. The objectives of this study are to detect the presence of azadirachtin in polar extracts through a qualitative instrumental analysis by UV-Vis spectrophotometry and implement different drying strategies, for the determination of the degree of influence on the extraction processes.*

*The research design considered a mixed methodology (quantitative and qualitative) with a sequential explanatory approach. The following experimental stages were defined: 1) Treatment of raw material, 2) Solid-Liquid Extraction, 3) UV-Vis characterization and 4) Statistical treatment of data. The treatment of the fruits included: collection and cleaning, drying at room temperature (outdoors and in a solar dryer) and sieving. The extraction of azadirachtin using water as a solvent was performed by sonication and maceration, analyzing different sonication times and mass/solvent ratios respectively. Wavelength sweeps were performed in a Thermo Fisher Scientific spectrophotometer, and their results were analyzed in the IBM SPSS® statistical software.*

*It was possible to implement a prototype solar dryer for neem fruits as the best option to avoid degradation of the active component. The extraction of azadirachtin by maceration favored a mass/solvent ratio of 30g:200mL. Finally, the best results for the detection of azadirachtin, show as a potential extraction method to the sonication process for a time of 20min.*

*Keywords: Neem, Azadirachtin, Biopesticide, Maceration, Sonication, solar dryer*

# ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES.....	7
RESUMEN .....	I
<i>ABSTRACT</i> .....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ABREVIATURAS.....	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	IX
ÍNDICE DE APÉNDICE B.....	X
ÍNDICE DE APÉNDICE C.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE DIAGRAMAS .....	XI
CAPÍTULO 1 .....	12
1.    Introducción .....	12
1.1    Descripción del problema .....	12
1.2    Justificación del problema .....	13
1.3    Objetivos .....	14
1.3.1    Objetivo General .....	14
1.3.2    Objetivos Específicos.....	14
1.4    Marco teórico.....	15
1.4.1    Estructura química de la azadiractina.....	16
1.4.2    Propiedades de la azadiractina .....	17
1.4.3    Uso de azadiractina en el manejo integral de plagas (MIP).....	18
1.4.4    Aislamiento de azadiractina .....	18
1.4.5    Caracterización de los componentes del Neem .....	22
1.4.6    Diseño Factorial 2 <sup>k</sup> .....	23

1.4.7	Modelo de Regresión Logística Binaria .....	24
CAPÍTULO 2 .....		27
2.	Metodología .....	27
2.1	Materiales y equipos .....	27
2.1.1	Materiales .....	27
2.1.2	Reactivos .....	27
2.1.3	Equipos .....	28
2.2	Diagrama de flujo de etapas experimentales .....	28
2.3	Diseño de la investigación .....	28
2.4	Diseño experimental de la investigación .....	29
2.5	Descripción de etapas experimentales .....	30
2.5.1	Tratamiento de los frutos de Neem. ....	30
2.5.2	Extracción de azadiractina de los frutos de Neem.....	35
2.5.3	Caracterización de la azadiractina .....	38
2.6	Tratamiento estadístico .....	39
2.6.1	Regresión Logística Binaria .....	40
CAPÍTULO 3 .....		42
3.	Resultados y análisis .....	42
3.1	Secado .....	42
3.1.1	Pruebas iniciales de humedad .....	42
3.1.2	Humedad de las muestras A y B.....	42
3.1.3	Curvas de humedad.....	43
3.2	Análisis granulométrico.....	46
3.2.1	Distribución del tamaño de partícula del fruto de Neem y curva granulométrica .....	46
3.3	Caracterización de azadiractina.....	48
3.3.1	Espectros UV – Vis muestras A y B purificadas. Ultrasonido .....	49

3.3.2	Comparación entre espectros UV – Vis de muestra A con diferentes relaciones masa/solvente y muestra purificada. Maceración .....	51
3.3.3	Comparación entre espectros UV – Vis de muestra B a diferentes relaciones masa/solvente y muestra purificada. Maceración .....	52
3.3.4	Comparación entre espectros UV – Vis de muestra A con diferentes tiempos de sonicación y muestra purificada. Ultrasonido .....	53
3.3.5	Comparación entre espectros UV – Vis de muestra B a diferentes tiempos de sonicación y muestra purificada. Ultrasonido.....	54
3.3.6	Comparación entre espectros UV – Vis de las mejores muestras obtenidas por maceración y ultrasonido vs muestra purificada. ....	55
3.3.7	Análisis de resultados espectrales .....	56
3.4	Tratamiento estadístico .....	59
3.4.1	Pruebas de supuestos .....	59
3.4.2	Regresión Logística Binaria .....	60
CAPÍTULO 4 .....		66
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	66
4.1	Conclusiones.....	66
4.2	Recomendaciones.....	67
BIBLIOGRAFÍA .....		68
APÉNDICE .....		74
APÉNDICE A.....		74
	Ecuaciones para granulometría.....	74
APÉNDICE B.....		75
	Procedimiento de extracción aislada (extractos alcohólicos) .....	75
	Procedimiento para el tratamiento estadísticos de datos en IBM SPSS®.....	76
APÉNDICE C .....		80
	Humedad de las muestras A y B .....	80

Ensayos granulométricos para muestras A y B. ....	81
Barrido de longitudes de onda (211 y 230 nm) para los 24 experimentos. ....	82
Tratamiento estadístico de datos por Regresión Logística Binaria .....	84

## ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FCNM	Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
INEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
LOPU	Laboratorios de Operaciones Unitarias
LAQUINS	Laboratorio de Análisis Químico Instrumental
MAGAP	Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca
MTOP	Ministerio de Transporte y Obras Públicas
MIP	Manejo Integral de Plagas
MIV	Manejo Integral de Vectores
MP	Materia Prima
AFC	Agricultura Familiar Campesina
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OMS	Organización Mundial de la Salud
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
ODS	Objetivos del Desarrollo Sostenible
USA	United States of America
ASTM	American Society for Testing and Materials
UTM	Universal Transverse Mercator
UV – Vis	Ultravioleta Visible
SPSS®	Statistical Package for Social Science
IBM	International Business Machines
MAE	Microwave – Assisted Extraction
UAE	Ultrasound – Assisted Extraction
SFE	Supercritical Fluid Extraction
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography

## SIMBOLOGÍA

m	Metro
cm	Centímetro
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
pH	Potencial de Hidrógeno
C	Carbono
H	Hidrógeno
O	Oxígeno
OH	Ión hidróxilo
CH <sub>3</sub>	Radical metilo
H <sub>2</sub> O	Agua
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
Kg	Kilogramo
mg	Miligramo
g	Gramo
min	Minutos
s	Segundos
L	Litro
mL	Mililitro
uL	Microlitro
°C	Grados Celsius
Hz	Hertz
exp	Exponente
DT <sub>50</sub>	Dosis tóxica media
D <sub>80</sub>	Diámetro característico con el tamaño de partícula pasante al 80%

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1.1	Árbol de Neem y sus componentes .....	16
Ilustración 1.2	Estructura química de la azadiractina .....	17
Ilustración 1.3	Curvas típicas de secado .....	20
Ilustración 1.4	Espectro UV - vis del estándar de nimbina .....	23
Ilustración 1.5	Espectros UV - vis de los estándares de azadiractina y salanina .....	23
Ilustración 2.1	Proceso de recolección de frutos de Neem .....	31
Ilustración 2.2	Pesado y corte transversal de los frutos de Neem .....	31
Ilustración 2.3	Secado al aire libre .....	32
Ilustración 2.4	Prototipo de secador solar. Vista frontal .....	33
Ilustración 2.5	Molienda y trituración del fruto seco de Neem .....	34
Ilustración 2.6	Rotulación de las muestras molidas A y B .....	34
Ilustración 2.7	Pesado de las muestras molidas y equipo tamizador .....	35
Ilustración 3.1	Curvas de secado para las muestras A y B .....	45
Ilustración 3.2	Curvas granulométricas de las muestras A y B .....	47
Ilustración 3.3	Espectro UV – Vis muestra A purificada por ultrasonido durante 20 minutos.....	49
Ilustración 3.4	Espectro UV – Vis muestra B purificada por ultrasonido durante 20 minutos.....	50
Ilustración 3.5	Espectro UV – Vis muestra A vs muestra purificada, maceración.....	51
Ilustración 3.6	Espectro UV – Vis muestra B vs muestra purificada, maceración.....	52
Ilustración 3.7	Espectro UV – Vis muestra A vs muestra purificada, ultrasonido.....	53
Ilustración 3.8	Espectro UV – Vis muestra B vs muestra purificada, ultrasonido.....	54
Ilustración 3.9	Espectros UV – Vis de las mejores muestras en maceración y ultrasonido vs muestra purificada .....	55

## ÍNDICE DE APÉNDICE B

Apéndice B.1 Pesaje de la matriz sólida y preparación de la solución con hexano...	75
Apéndice B.2 Primera extracción en equipo sonicador. Muestra A.....	75
Apéndice B.3 Filtración al vacío para obtención de la torta de Neem .....	75
Apéndice B.4 Preparación de la solución torta de Neem desgrasada y solvente etanol 99.99% .....	75
Apéndice B.5 Segunda extracción muestras A y B.....	76
Apéndice B.6 Filtración al vacío de muestras A y B para obtención de extracto alcohólico de azadiractina .....	76
Apéndice B.7 Ingreso de variables. Obtenido del software IBM SPSS®.....	76
Apéndice B.8 Ingreso de datos para cada variable. Obtenido del software IBM SPSS® .....	77
Apéndice B.9 Ejecución de un análisis de regresión logística en el software IBM SPSS®.....	77
Apéndice B.10 Ingreso de variables y selección del método. Obtenido en IBM SPSS® .....	78
Apéndice B.11 Recodificación de la variable “Métodos de extracción”. Obtenido en IBM SPSS®.....	78
Apéndice B.12 Configuración de las pestañas <i>opciones</i> y <i>guardar</i> . Obtenido en IBM SPSS®.....	79

## ÍNDICE DE APÉNDICE C

Apéndice C.1 Datos de humedad de las muestras 1 y 2 .....	80
Apéndice C.2 Ensayo granulométrico por tamizado para la muestra A.....	81
Apéndice C.3 Ensayo granulométrico por tamizado para la muestra B.....	81
Apéndice C.4 Valores de absorbancia entre 210 y 230 nm para las 24 unidades experimentales .....	82
Apéndice C.5 Espectros UV – Vis de todas las unidades experimentales .....	83
Apéndice C.6 Prueba de supuesto: Autocorrelación, tabla Savin y White.....	84
Apéndice C.7 Asignación de coeficientes y determinación de probabilidades con única variable independiente .....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Características de la especie <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	15
Tabla 2.1 Diseño Factorial $2^k$ con $k=2$ .....	29
Tabla 2.2 Matriz experimental.....	30
Tabla 2.3 Especificaciones del prototipo de secador solar.....	32
Tabla 2.4 Procedimientos de extracción de azadiractina .....	35
Tabla 2.5 Variables categóricas dicotómicas y poliatómicas.....	40
Tabla 3.1 Datos de humedad de las muestras 1 y 2 .....	42
Tabla 3.2 Datos de humedad para las muestras A y B.....	43
Tabla 3.3 Diámetros de abertura de las muestras .....	46
Tabla 3.4 Estadísticas de colinealidad.....	59
Tabla 3.5 Codificaciones de variables categóricas independientes .....	60
Tabla 3.6 Prueba de Hosmer y Lemeshow.....	61
Tabla 3.7 Resumen del modelo .....	61
Tabla 3.8 Tabla de clasificación <sup>a</sup> .....	62
Tabla 3.9 Variables en la ecuación.....	63
Tabla 3.10 Resultados de valores pronosticados .....	64

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 2.1 Etapas experimentales para obtención y caracterización de extractos acuosos.....	28
Diagrama 2.2 Procedimiento para purificación de azadiractina .....	37
Diagrama 2.3 Procedimiento para caracterización UV-Vis de extractos acuosos .....	38
Diagrama 2.4 Procedimiento para caracterización UV-Vis de extractos alcohólicos. ....	39
Diagrama 3.1 Esquema analítico para determinar el mejor proceso de extracción ...	48

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Descripción del problema

Ecuador es un país tropical con una diversidad de climas que permiten la proliferación excesiva de plagas. En una entrevista sobre el uso de plaguicidas realizada a 539 agricultores de varias provincias, se evidenció que los insecticidas son utilizados indiscriminadamente, ya que no siguen las recomendaciones especificadas por los fabricantes. Otro hallazgo de este estudio determinó que para una aspersión, los agricultores utilizan mezclas de dos o más pesticidas, excediendo así las dosificaciones recomendadas (Chirinos et al., 2020).

En el año 2013, el gobierno ecuatoriano impulsó un cambio en la matriz productiva del sector agrícola, como consecuencia, la demanda de plaguicidas superó los 1699 millones de dólares entre los años 2008 y 2018 (Esteban, 2020). El Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), en su estudio “Uso y Manejo de Agroquímicos en la Agricultura 2014”, determinó que más de dos millones y medio de hectáreas de cultivo utilizan agroquímicos. Además, identificó que solo el 20% de agroindustrias implementan sistemas de Manejo Integral de Plagas (MIP) y Manejo Integrado de Vectores (MIV) en sus cultivos (INEC, 2014).

En este contexto, un grupo de pequeños productores pertenecientes a la Agricultura Familiar Campesina (AFC) han optado por estas prácticas poco amigables con el ambiente para prevenir y mitigar plagas en sus cultivos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2015). Esto, sumado a la falta de conocimiento en Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), genera un problema que afecta al ecosistema, la salud ocupacional de operarios agrícolas y la seguridad alimentaria de los consumidores (Breilh, 2007).

La Organización Mundial de la salud (OMS) ha calculado que 20.000 personas mueren por año a causa de intoxicación y exposición a insecticidas (Guzmán-Plazola, Guevara-Gutiérrez, Olguín-López, & Mancilla-Villa, 2016). Informes del National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), indican que la

mayoría de los problemas de salud de trabajadores agrícolas inician por vías respiratorias y exposición dérmica. En Ecuador, el 4% de muertes corresponde a casos de exposición oral accidental por ingesta de pesticidas (OMS & FAO, 2014).

## **1.2 Justificación del problema**

La necesidad de prácticas agrícolas sostenibles y de productos biorracionales, implican la concienciación de los productores hacia la mejora de su modelo económico, de seguridad ocupacional y ambiental (Breilh, 2007). Por ello, con la finalidad de establecer bases y modelos de desarrollo incluyentes, es necesario que los agricultores se enmarquen en los siguientes Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) planteados en la agenda 2030 de la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2015):

- 11) Lograr que las ciudades y los asentamientos humanos sean inclusivos, seguros, resilientes y sostenibles.
- 12) Garantizar las pautas de consumo y de producción sostenibles.

Actualmente, las especies vegetales y sus componentes fitoquímicos son considerados de alta importancia por investigadores, instituciones gubernamentales y sector privado, ya que permiten la formulación de bioproductos (Azwanida, 2015). En este contexto, el árbol de Neem ha sido utilizado como medicina tradicional y protector de plagas por más de 5000 años, siendo la fuente de productos naturales más estudiada (V. S. Kumar & Navaratnam, 2013). A diferencia de otros árboles, sus hojas, frutos y semillas tienen variadas aplicaciones en la actualidad, una de las más importantes es la actividad larvívora (Manzano et al., 2020). La importancia de la planta es tal, que la ONU ha declarado a este árbol, como “El Árbol del siglo XXI” (V. S. Kumar & Navaratnam, 2013).

Los extractos de semillas de Neem contienen alta concentración de azadiractina, componente activo que posee propiedades germicidas, fungicidas e insecticidas (A. J. Mordue, Morgan, & Nisbet, 2005). Precisamente esta última propiedad es el motor que impulsa este proyecto, más aún, porque la azadiractina y otros productos ecológicos están ganando un lugar en el mercado como alternativas sostenibles para el control de plagas (Guerra Triviño, 2019).

Estudios de varios autores como, Oyelese (2020), Subramanian, Salleh, Bachmann, & Hossain (2019), Awasthi & Shikha (2019), se enfocan en la extracción de azadiractina desde las semillas del árbol de Neem, lo que confirma la existencia de numerosa literatura sobre este tema, sin embargo, si se desea estudiar la extracción desde el fruto, la información es escasa. El presente trabajo consiste en realizar un estudio cualitativo sobre los espectros de absorción de la azadiractina presente en extractos obtenidos desde el fruto. Se tomarán en cuenta las condiciones socioeconómicas, de operatividad en campo y de acceso a tecnologías de los productores de la región para el desarrollo de procesos productivos viables que permitan la obtención de azadiractina.

Además, se plantea un enfoque inicial de producción sostenible de azadiractina para su posterior uso en la elaboración de biopesticidas que minimicen el impacto ambiental causado por el uso excesivo de agroquímicos. No obstante, la investigación puede extenderse a otras disciplinas en la industria farmacéutica, cosmética o textil.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Detectar la presencia de azadiractina en el fruto de *Azadirachta indica* A. Juss mediante el análisis químico cualitativo de extractos polares, para su proyección como componente activo en bioplaguicidas.

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Implementar dos estrategias de secado natural (aire libre y prototipo secador solar), para la determinación del grado de influencia en los procesos de extracción de azadiractina.
  
- Examinar los espectros de absorción de los extractos obtenidos por procesos de maceración y sonicación a diferentes condiciones de operación, mediante un barrido por espectrofotometría UV-Vis.

- Evaluar la relación entre las diferentes técnicas de secado y extracción en la detección de azadiractina, mediante un modelo de regresión logística aplicando el software estadístico de IBM SPSS®.

#### 1.4 Marco teórico

*Azadirachta indica* A. Juss, conocido como árbol de Neem o Margosa, se cultiva en áreas tropicales y subtropicales del Asia y todo el subcontinente indio (V. S. Kumar & Navaratnam, 2013). Esta especie fue introducida en algunos países latinoamericanos como Perú, Chile, Argentina y Brasil. En Ecuador, forma parte del programa de incentivos forestales administrado por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). Su producción a gran escala permite aliviar problemas ambientales globales (deforestación, erosión del suelo, desertificación) a causa del calentamiento global (Zulueta, León, & Mendoza, 2016)

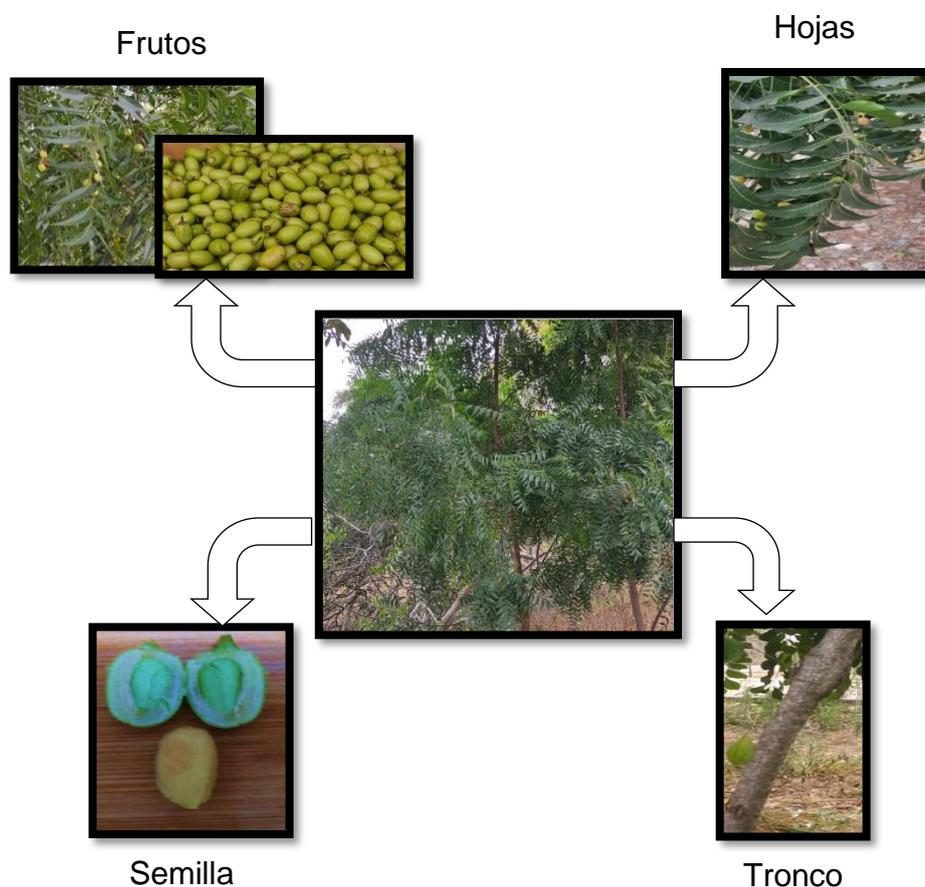
**Tabla 1.1 Características de la especie *Azadirachta indica* A. Juss**

Especificaciones	Característica
Familia	Caoba Meliácea
Altura	30 [m]
Hojas	Anchas, pH 8.2
Tronco	2.5 [m] de circunferencia
Corteza exterior	Gruesa, surcada
Fruto	Liso, elipsoidal, 2 [cm] largo
Flores	Pequeñas blancas y bisexuales
Tiempo de vida	200 años
Habitad	Suelos secos e infértiles

**Fuente:** National Research Council. (1992). *Neem: A Tree for Solving Global Problems*. National Academy Press, Washington, D.C

El árbol de Neem comienza a dar frutos entre 3 a 5 años, después de 10 años es completamente fructífero y dependiendo de las condiciones ambientales, es capaz de producir hasta 50 kg de frutos equivalentes a 6 kg de semillas por año (S. R. Fernandes et al., 2019). El fruto objeto de estudio es amarillo o marrón en su etapa de madurez, su mesocarpio (pulpa) es poco carnoso y contiene un endocarpio que encierra la semilla, misma que consta de una cáscara y un núcleo de aproximadamente la mitad de su peso. El núcleo de la semilla es la fuente con mayor concentración de azadiractina (2 - 4 mg), por esta razón, su uso es mayor en el control de plagas (H.S.Puri, 2006). Las hojas también contienen ingredientes

insecticidas, pero son menos efectivos que la semilla (A. Jenifer Mordue & Nisbet, 2000).



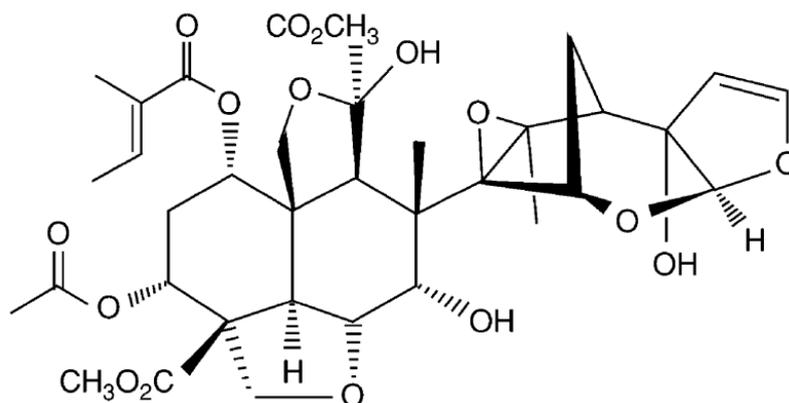
**Ilustración 1.1** Árbol de Neem y sus componentes

La especie *Azadirachta indica* A. Juss contiene una mezcla de 4 componentes activos con diferentes propiedades fitoquímicas. Estos compuestos (azadiractina, salanina, nimbina y meliantriol) pertenecen al grupo de los triterpenos, específicamente a la clase limonoides. La azadiractina fue uno de los primeros limonoides en ser aislado para combatir insectos (Council, 1992) y es el compuesto de interés en este estudio por poseer mayor actividad insecticida (A. J. Mordue et al., 2005).

#### **1.4.1 Estructura química de la azadiractina**

La molécula de azadiractina, de fórmula  $C_{35}H_{44}O_{16}$ , se conforma por un acetato, un éster de tiglato, dos ésteres metílicos, un alcohol secundario y terciario, un

epóxido y un éter vinílico, que forma parte de un acetal, y un hemiacetal (A. J. Mordue et al., 2005).



**Ilustración 1.2 Estructura química de la azadiractina**

**Fuente:** Mordue, A. J., Morgan, E. D., & Nisbet, A. J. (2005).

#### **1.4.2 Propiedades de la azadiractina**

La azadiractina es compuesto cristalino, incoloro, polar y no volátil; soluble en disolventes orgánicos polares (etanol, metanol, cloroformo, acetado de etilo, acetona) y con ligera solubilidad (1.29 g / L) en agua. A diferencia de su estabilidad en soluciones con solventes orgánicos, en extractos acuosos esta depende del pH de la solución, el cual debe oscilar entre 4 y 6. Con un pH mayor a 6, la molécula se vuelve inestable (Boursier, Bosco, Coulibaly, & Negre, 2011).

Los compuestos del Neem son fotosensibles. En el estudio realizado por Morque, Morgan & Nisbet (2005) se estableció que los extractos acuosos permanecen activos durante 8 días a un pH ligeramente ácido; mientras que en el suelo su DT<sub>50</sub> (Dosis tóxica media) es de 20 a 32 días aproximadamente.

En la salud humana, el uso medicinal de azadiractina provee actividad viral, antibacterial, antiinflamatoria, anticancerígena e inmunológica (V. S. Kumar & Navaratnam, 2013). En el control de plagas, posee efectos disuasorios en la alimentación de estas, provocando que dejen de alimentarse, desarrollarse y reproducirse (A. J. Mordue et al., 2005).

La azadiractina no es tóxica para los vertebrados, es segura para insectos polinizadores como abejas y mariposas (Morgan, 2009). Su eficacia se ha probado en más de 600 especies (lepidóptera, coleóptera, mosca blanca, saltahojas, dípteros etc.), las cuales se han catalogado como sensibles frente a este compuesto (S. R. Fernandes et al., 2019).

### **1.4.3 Uso de azadiractina en el manejo integral de plagas (MIP)**

Para la obtención de extractos acuosos de Neem no se requiere de equipos sofisticados, esto posibilita que la mayoría de los países en desarrollo mejoren los rendimientos en sus cultivos. La ventaja de este tipo de extractos para algunas especies de plantas como *Phaseolus vulgaris*, es que, al ser rociados sobre el suelo, los componentes activos son absorbidos por las raíces, luego a través del tallo y finalmente a la parte superior de la planta. De esta manera se logra que los cultivos estén protegidos desde el interior de la especie vegetal (Council, 1992).

Investigaciones realizadas desde 1985 aseguran que el uso de biopesticidas a base de Neem, debido a sus propiedades antialimentarias y efectos reguladores del crecimiento, son una herramienta útil para el control de poblaciones de plagas donde se ha desarrollado resistencia a los insecticidas, además es biodegradable, no deja ningún residuo; lo que ubica a la azadiractina como componente activo de biopesticidas seguros para el medio ambiente y que además permitan reducir el consumo progresivo de insecticidas en comunidades agrícolas (A. J. Mordue et al., 2005).

### **1.4.4 Aislamiento de azadiractina**

En el estudio de plantas medicinales, la preparación del material vegetal o materia prima (MP) es importante para conservar sus fitoquímicos. La recolección, limpieza, secado y molienda de este son etapas importantes previas al aislamiento del componente activo (Gupta, Naraniwal, & Kothari, 2012).

#### **1.4.4.1 Secado y molienda**

Las técnicas de secado natural usando secadores solares (estructuras cubiertas con nylon negro o polietileno transparente) o bandejas al aire libre expuestas al

sol, son las más comunes debido a su simplicidad, durabilidad y bajo costo (Banchemo, Carballo, & Telesca, 2007), pero estas requieren mayor tiempo de ejecución. Para minimizar este tiempo existen métodos de secado artificial, tales como: secado por microondas, horno o liofilización (Azwanida, 2015).

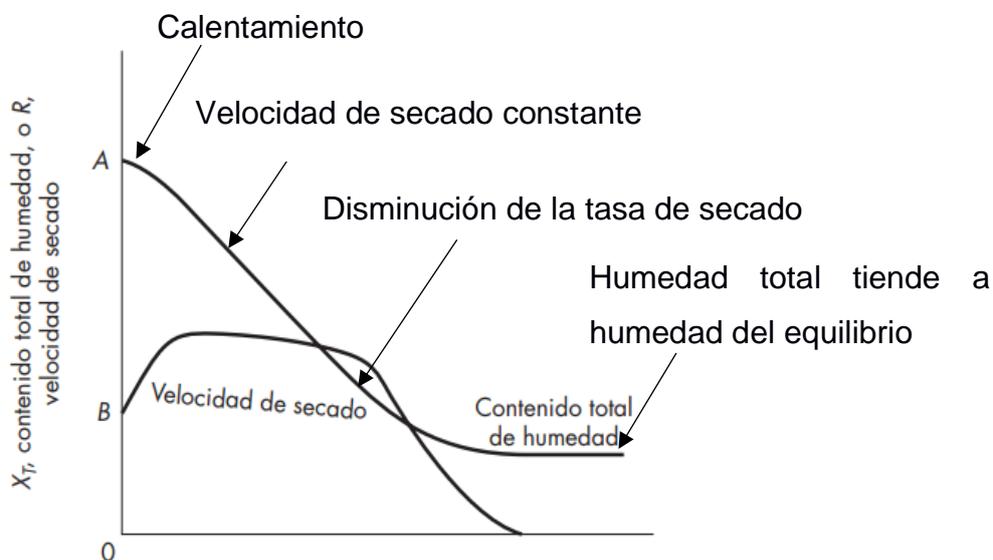
El secado permite que la MP no se degrade fácilmente, ya que disminuye su porcentaje de humedad el cual, según Hidalgo, Wilder, & Hilario, (2016) debe alcanzar valores entre el 8 - 12 % para frutos de Neem. El secado también mejora el proceso de molienda, ya que permite reducir el tamaño de partículas y aumentar el área de contacto entre la muestra y el solvente para una mejor transferencia del componente activo durante la extracción.

El diámetro de partícula recomendado se encuentra entre 0.425 y 0.710 mm para extracciones de especies vegetales, tal medida puede ser determinada mediante un análisis granulométrico por tamizado donde se separa las partículas del agregado según el tamaño de diferentes tamices con el fin de conocer su distribución (Gupta et al., 2012).

#### **1.4.4.2 Curvas de humedad**

Para extraer un componente activo desde cualquier especie vegetal se necesita secar el material. El contenido de agua en el aire debe ser menor que el contenido de agua en el material para que se lleve adelante la transferencia de calor y masa hasta llegar al punto de equilibrio. La humedad del material que no puede ser eliminada debido a la humedad relativa del aire recibe el nombre de humedad de equilibrio. Esta permite definir la humedad libre que puede ser removida fácilmente desde los sólidos. La diferencia entre las humedades total y de equilibrio recibe el nombre de humedad libre. En la Ilustración 1.3 se observa la curva A que representa la humedad total de un material sólido en función del tiempo. La primera etapa de este proceso representa la humedad eliminada por calentamiento del sólido debido a la temperatura de vaporización del gas. Luego la curva toma un comportamiento lineal debido a la velocidad de secado constante. Posteriormente, experimenta un cambio drástico en su dirección, tomando forma cóncava hacia arriba, lo que significa una disminución

en la tasa de secado. Finalmente, la curva toma una tendencia asintótica cuando la humedad del sólido se acerca a humedad del equilibrio. La curva B, representa la velocidad de secado, cuya definición matemática se representa tomando la derivada de la curva A (McCabe, Smith, & Harriott, 2007).



**Ilustración 1.3 Curvas típicas de secado**

**Fuente:** McCabe (2007). *Operaciones Unitarias de Ingeniería Química* (7.ª ed)

La Ilustración 1.3 permite identificar todas las etapas que se presentan en un proceso de secado. Se observa un período de velocidad de secado constante donde la humedad del sólido disminuye drásticamente. Esta velocidad empieza a disminuir ligeramente después de cierto tiempo hasta llegar a cero, es decir, hasta alcanzar la humedad del equilibrio que es una función de las condiciones termodinámicas del gas secador (McCabe et al., 2007).

La curva de humedad total se obtiene mediante la definición matemática:

$$W(\%) = \left(1 - \frac{m_1 - m_2}{m_1}\right) \times 100 \quad (1.1)$$

Donde:

$m_1$  es el peso en gramos de los frutos de Neem antes del secado.

$m_2$  es el peso en gramos de los frutos de Neem después del secado.

$W$  es el contenido de humedad total en porcentaje

#### **1.4.4.3 Extracción**

La extracción es el procedimiento crucial en la separación del principio activo del material vegetal y puede ser estudiada variando condiciones de temperatura, tiempo y tipo de solventes (Azwanida, 2015). Existen equipos de extracción modernos que permiten obtener altos rendimientos. Sin embargo, en países en desarrollo estos son de difícil adquisición por sus elevados costos, así pues, utilizan técnicas tradicionales con el mismo propósito.

Los métodos de extracción convencionales más utilizados para separar azadiractina en extractos acuosos o aceite de Neem, incluyen maceración, fermentación, hidrodestilación y extracción soxhlet. Las tres primeras técnicas son tradicionales y usan agua como solvente. Su tiempo de ejecución requiere de 6 a 24 horas, o 10 días en el caso de fermentación (Paragas, Fiegalan, & Cruz, 2018).

Para la extracción de aceite de Neem es recomendable utilizar un prensado mecánico de las semillas, o el método soxhlet que requiere solventes orgánicos de alta pureza (alcoholes, alcanos, éteres); en todo caso, la selección del solvente es una función de su estabilidad y selectividad con el soluto, su costo, su impacto ambiental y su recuperación (Azwanida, 2015). La torta de Neem que queda después de la extracción es rica en proteínas y puede reutilizarse en campos agrícolas como materia orgánica para dar fertilidad al suelo. Además, debido a su perfil proteico se utiliza como alternativa en la alimentación de animales del sector ganadero y avícola (Saxena et al., 2010)

Respecto a las técnicas modernas, entre las más utilizadas se encuentran: extracción asistida por microondas (MAE), extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción por fluidos supercríticos (SFE), ya que estas permiten aumentar el rendimiento, tiempo y calidad del proceso de extracción (S. R. Fernandes et al., 2019). EAU aplica ondas sonoras de alta intensidad y frecuencia para que el analito se difunda rápidamente de la fase sólida al solvente, aislando y purificando los principios activos de la muestra. Su costo es relativamente bajo, simple, efectivo y, a diferencia de los otros métodos se puede

realizar a temperaturas bajas lo que es conveniente para compuestos térmicamente inestables (Gupta et al., 2012).

#### **1.4.4.4 Purificación**

Los extractos de semillas de Neem pueden purificarse para aislar los componentes activos más eficaces del resto de la mezcla; esto permite la estandarización y formulaciones de alta calidad para uso comercial en el mercado de plaguicidas (Boursier et al., 2011). El proceso de purificación según Sidhu, Kumar, & Behl (2003) y A. J. Mordue (2005) consiste en extraer con un solvente no polar (hexano o éter de petróleo) el aceite de las semillas molidas de Neem para eliminar la fase oleosa. Posteriormente, para extraer y concentrar la azadiractina de la torta de Neem desgrasada, se utiliza un disolvente polar, estos pueden ser alcoholes como etanol o metanol de alta pureza.

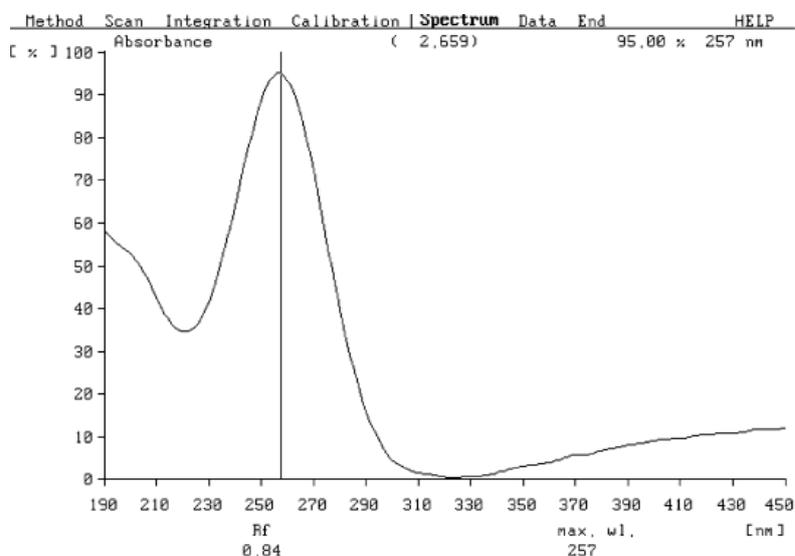
Actualmente, la purificación de limonoides de semillas de Neem se realiza por cromatografía de columna, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía líquida de presión media (MPLC), funcionando en fase reversa o normal (Farjaminezhad & Garoosi, 2020).

#### **1.4.5 Caracterización de los componentes del Neem**

La espectrofotometría UV-visible es una técnica instrumental de amplio uso en el análisis farmacéutico debido a su rapidez, sencillez y aplicabilidad a una gran cantidad de especies farmacológicamente activas y sus derivados que absorben en esa zona espectral (Sala, Maspotch, Iturriaga, Blanco, & Cerda, 1988).

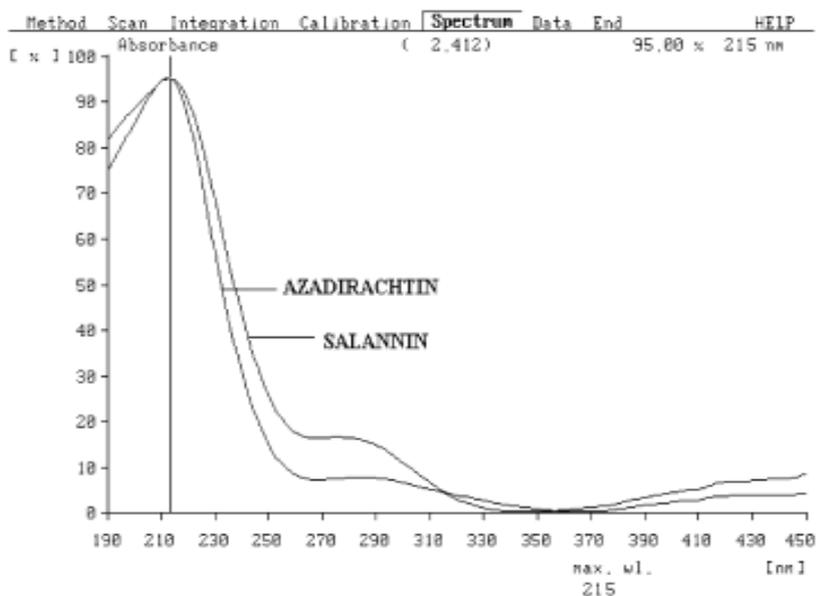
Entre los limonoides presentes en el árbol de Neem, la azadiractina presenta máxima absorción a valores bajos de longitud de onda ( $\leq 220$  nm) debido a su cromóforo de carbonilo  $\alpha$ - $\beta$  insaturado en el éster de tiglato y el éter de vinilo (Morgan, 2009). La Ilustración 1.4 e Ilustración 1.5 muestran los espectros de absorción de los estándares (diluidos en metanol) de nimbina, azadiractina y salanina respectivamente. En la Ilustración 1.5, a una longitud de onda de 215 nm se observa un máximo absoluto de absorbancia correspondiente a la molécula de azadiractina. También se observa un máximo local en 280 nm indicando la presencia del limonoide salanina. En la

Ilustración 1.4, a 257 nm el limonoide nimbina presenta un máximo absoluto de absorción (Agrawal, Kaul, Paradkar, & Mahadik, 2005).



**Ilustración 1.4 Espectro UV - vis del estándar de nimbina**

**Fuente:** Agrawal, H., Kaul, N., Paradkar, A. R., & Mahadik, K. R. (2005)



**Ilustración 1.5 Espectros UV - vis de los estándares de azadiractina y salanina**

**Fuente:** Agrawal, H., Kaul, N., Paradkar, A. R., & Mahadik, K. R. (2005)

#### 1.4.6 Diseño Factorial 2<sup>k</sup>

El diseño de una investigación científica o académica requiere la ejecución de experimentos que analicen los efectos que producen los cambios intencionados en

los valores (niveles) de las variables (factores) sobre la respuesta del sistema. En otras palabras, los efectos de “k” factores con “2” niveles cada uno pueden ser determinados con un número mínimo de  $2^k$  unidades experimentales (Collins, Dziak, & Li, 2009).

Los diseños factoriales  $2^k$  son los más eficientes y económicos para el tratamiento experimental de este tipo de investigaciones. Se debe definir claramente la variable de respuesta o dependiente (cuantitativa o cualitativa), las variables independientes y sus respectivos niveles. Estas deben ser controladas, mientras que los niveles pueden ser definidos mediante literatura previamente consultada o mediante valores intuitivos establecidos por el investigador que puedan alterar la variable dependiente (Montgomery & Wiley, 2013).

Entre los principios fundamentales del diseño experimental tenemos la aleatorización y la replicación de las unidades experimentales. Para asegurar la aleatoriedad del experimento, las corridas se realizan al azar evitando transgresiones a la independencia estocástica causada por elementos externos. Mientras que la replicación consiste en repeticiones independientes de cada combinación de factores para la estimación del error experimental. El número de réplicas dependen entre otras cosas de la capacidad económica disponible para la investigación (Pais, Peretta, Yamanaka, & Pinto, 2014).

#### **1.4.7 Modelo de Regresión Logística Binaria**

Los modelos de Regresión Logística Binaria ejecutan el tratamiento estadístico de variables categóricas dependientes dicotómicas dado un conjunto de variables independientes. Estos son un caso especial de los modelos lineales. El investigador/a debe aplicarlos cuando se desea predecir la presencia o ausencia de una característica, es decir, se tiene una variable de respuesta categórica binaria (Berlanga, 2014).

Una variable categórica dicotómica se utiliza para asignar una propiedad cualitativa a un objeto de estudio y toma dos categorías posibles: Si o No, Presente o Ausente, Se Detecta o No se Detecta, Positivo o Negativo, entre otras. Además, la ocurrencia del

evento se denota como una variable *dummy* y toma valores de 1 y 0 según sucede o no el efecto categórico (A. A. T. Fernandes, Filho, da Rocha, & da Silva Nascimento, 2020).

El objetivo de aplicar Regresión Logística Binaria es obtener un modelo con fines explicativos (evaluar cómo afectan las variables independientes sobre la variable dependiente) o un modelo con fines predictivos (estimar o predecir el valor de la variable dependiente usando un conjunto de variables independientes) (Berlanga, 2014). En todo caso, el modelo de regresión logística como función lineal de las variables independientes se presenta en la ecuación 1.2 y la estimación de los coeficientes se desarrolla mediante el método de máxima verosimilitud.

$$Y = \beta_0 + X_1\beta_1 + \dots + X_k \quad (1.2)$$

Donde:

$Y$ : Función lineal del modelo de regresión logística.

$\beta_0$  y  $\beta_k$ : Coeficientes estimados a partir de los datos

$X_k$ : Variables independientes

Los coeficientes estimados mediante regresión logística se utilizan para determinar la existencia de relación de las variables independientes sobre la dependiente (significación de  $\beta$ ), indicar la dirección de su relación (signo de  $\beta$ ) y su fuerza (Odd). El Odd es también referido como  $\text{Exp}(\beta)$  o razón y se establece que cuando este valor está alejado de 1 la relación es más fuerte (Moral, 2016).

Entre las limitantes del modelo se encuentra la multicolinealidad entre variables independientes, muestras pequeñas (estimaciones inconsistentes) y valores atípicos. Las variables independientes pueden ser cuantitativas o categóricas, en caso de ser categóricas estas deben ser *dummy* (A. A. T. Fernandes et al., 2020).

El modelo matemático de regresión logística basado en un conjunto de variables predictoras y escrito de manera que permita el cálculo de probabilidad para las distintas variables del modelo se presenta en la ecuación 1.3 (Moral, 2016).

$$p = \frac{1}{1+e^{-Y}} = \frac{1}{1+e^{-(\beta_0+X_1\beta_1+\dots+X_k\beta_k)}} \quad (1.3)$$

Donde:

$p$ : Probabilidad

$Y$ : Función lineal del modelo de regresión logística.

$e$ : Base de logaritmos neperianos

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Materiales y equipos

#### 2.1.1 Materiales

- Micropipeta Thermo Scientific (100-1000  $\mu\text{L}$ )
- Micropipeta Elicrom (100-200  $\mu\text{L}$ )
- Matraces Erlenmeyer
- Gradilla de plástico
- Kitasato
- Papel filtro
- Botellas color ámbar (para evitar degradación de azadiractina con los rayos solares)
- Vasos de precipitados
- Vidrio reloj
- Embudos de vidrio
- Embudos Büchner
- Tubos de ensayo
- Probetas (50 mL, 100 mL)
- Pissetas
- Celdas de cuarzo de 4cm
- Tamizador N° 60, abertura 250  $\mu\text{m}$ , Marca ATM Products
- Tamizador N°: 10, abertura 2000  $\mu\text{m}$ , Marca Fisher Scientific Company
- Tamizador N°: 18, abertura 1000  $\mu\text{m}$ , Marca Fisher Scientific Company
- Tamizador N°: 30, abertura 600  $\mu\text{m}$ , Marca Fisher Scientific Company

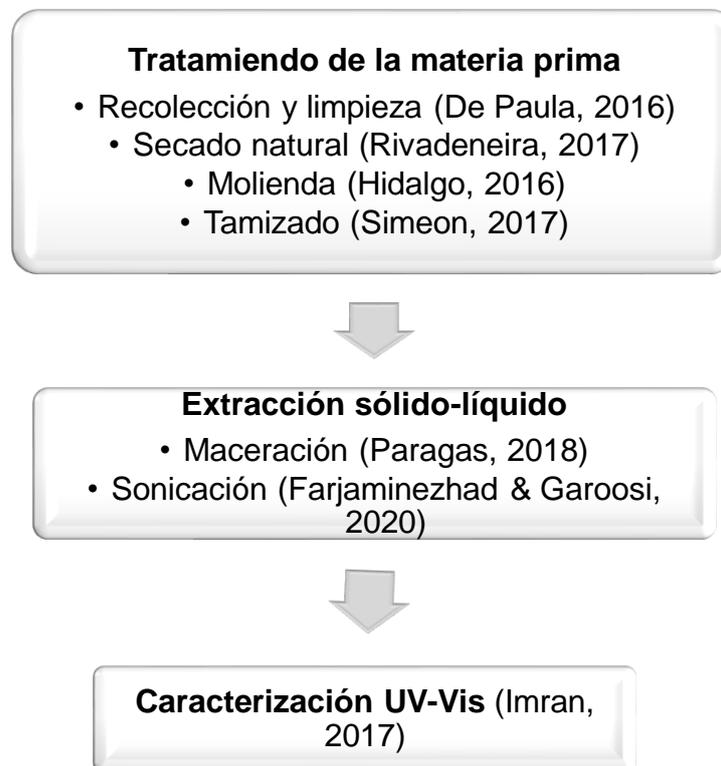
#### 2.1.2 Reactivos

- Hexano recuperado
- Etanol pureza 99.9%
- Agua destilada

### 2.1.3 Equipos

- Balanza analítica Sartorius con cuatro decimales de precisión.
- Balanza electrónica SF-400, capacidad 10 Kg
- Equipo Tamizador, Modelo RX-812, Marca Tyler, 60 Hz
- Baño ultrasónico, Modelo FS60, Marca Fisher Scientific
- Molino de grano tradicional manual, Marca Corona.
- Bomba de vacío
- Espectrofotómetro, Marca Thermo Fisher Scientific, Modelo Genesys10S UV-Vis
- Licuadora Marca Osterizer

## 2.2 Diagrama de flujo de etapas experimentales



**Diagrama 2.1 Etapas experimentales para obtención y caracterización de extractos acuosos**

### 2.3 Diseño de la investigación

Para el presente estudio se utilizó una metodología mixta (cuantitativa y cualitativa) con un enfoque explicativo secuencial (Rutberg & Bouikidis, 2018). Este método consta de

dos fases. La primera se encarga de recolectar datos cuantitativos de los procesos de secado y molienda, los cuales se utilizan como base para explicar con mayor profundidad los datos cualitativos obtenidos en la segunda fase mediante caracterización UV – Vis. Además, en esta fase (segunda) se plantea el tratamiento estadístico de los datos usando el software de IBM SPSS® para obtener información concluyente.

El método cuantitativo consiste en un diseño de investigación experimental longitudinal (periodo de tiempo establecido) para la obtención de la humedad final de cada muestra en los procesos de secado. La determinación del diámetro de partícula se incluye en esta primera etapa. Posteriormente, utilizando estos hallazgos se planteó el método cualitativo, en el cual se categoriza la variable de estudio “Detección de azadiractina”, se obtienen perfiles de absorbancias, y se aplica un modelo de Regresión Logística Binaria.

#### 2.4 Diseño experimental de la investigación.

Para detectar la presencia de azadiractina en los frutos de Neem se planteó un diseño factorial  $2^2$  (ver Tabla 2.1). Este diseño se realizó por triplicado fijando la variable independiente “Humedad” ( $W_A$  y  $W_B$ ) y obteniéndose un total de 24 unidades experimentales (ver Tabla 2.2).

**Tabla 2.1 Diseño Factorial  $2^k$  con  $k=2$**

Descripción		Observaciones
<b>Variables Independientes</b>	1) Relación masa/solvente (g/mL)	Se presenta en el método “maceración”
	2) Tiempo de sonicación	Se presenta en el método “sonicación”
<b>Niveles</b>	Variable Independiente 1	1) 20g/200mL 2) 30g/200mL
	Variable Independiente 2	1) 20 min 2) 30 min
		Se presenta en el método “maceración”
		Se presenta en el método “maceración”
<b>Variable dependiente</b>	Detección de azadiractina	Cualitativa. Observar espectros UV – vis picos de absorbancia entre 211 – 220 nm

**Tabla 2.2 Matriz experimental**

		Métodos de Extracción				
		N°	Maceración		Sonicación	
			E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	E <sub>4</sub>
Técnicas de secado	W <sub>A</sub>	1	A <sub>11</sub>	A <sub>12</sub>	A <sub>13</sub>	A <sub>14</sub>
		2	A <sub>21</sub>	A <sub>22</sub>	A <sub>23</sub>	A <sub>24</sub>
		3	A <sub>31</sub>	A <sub>32</sub>	A <sub>33</sub>	A <sub>34</sub>
	W <sub>B</sub>	1	B <sub>11</sub>	B <sub>12</sub>	B <sub>13</sub>	B <sub>14</sub>
		2	B <sub>21</sub>	B <sub>22</sub>	B <sub>23</sub>	B <sub>24</sub>
		3	B <sub>31</sub>	B <sub>32</sub>	B <sub>33</sub>	B <sub>34</sub>

Donde:

A: Muestra tratada por técnica de secado al aire libre.

B: Muestra tratada por técnica de secado prototipo de secador solar.

W: % Humedad de la muestra

E<sub>1</sub>: Extracción por maceración con R<sub>1</sub>: 20g/200mL

E<sub>2</sub>: Extracción por maceración con R<sub>2</sub>: 30g/200mL

E<sub>3</sub>: Extracción por sonicación con  $\theta_1$ : 20min

E<sub>4</sub>: Extracción por sonicación con  $\theta_2$ : 30min

N°: Número de repeticiones

Para purificar el componente activo, adicional a las 24 unidades experimentales se plantearon 6 ensayos para un proceso extracción aislada con hexano y etanol. Cada muestra (A y B) se analizó por triplicado. Los detalles se presentan en la sección 2.5.2.2

## 2.5 Descripción de etapas experimentales

### 2.5.1 Tratamiento de los frutos de Neem.

#### 2.5.1.1 *Recolección y limpieza*

Los frutos se recolectaron en el mes de junio en un sector de la provincia del Guayas, cantón Guayaquil, sector Data de Posorja, coordenadas UTM: - 2 713 762 ; - 80 298 022.

El material recolectado se colocó en bolsas plásticas (ver Ilustración 2.1) y posteriormente, se distribuyó sobre una superficie limpia y plana para eliminar material ajeno o en mal estado (hojas, tallos, raíces, etc.). Los frutos seleccionados se lavaron, pesaron y cortaron transversalmente de forma manual (ver Ilustración 2.2) siguiendo lo recomendado por De Paula (2016).



**Ilustración 2.1 Proceso de recolección de frutos de Neem**



**Ilustración 2.2 Pesado y corte transversal de los frutos de Neem**

### **2.5.1.2 Secado**

De acuerdo con el marco teórico, se plantearon dos estrategias para el secado natural del fruto de Neem: secado al aire libre y en secador solar. Las técnicas utilizadas siguieron las recomendaciones de Banchemo (2007, p. 25) y Rivadeneira (2017, p. 32). El proceso de secado se realizó desde el 8 al 26 de junio del año 2021, con las limitaciones ambientales climáticas propias de la Parroquia Posorja. Humedad relativa promedio anual mínima 73% y máxima 84%, temperatura promedio anual mínima 23.8 °C y máxima 30°C (MTOP, 2018).

#### 2.5.1.2.1 Secado al aire libre

Se seleccionaron dos lotes A y B de 1500 g de fruto cada uno, asignándoles el nombre de muestra A y B respectivamente. La muestra A se distribuyó equitativamente en dos bandejas de metal (Ver Ilustración 2.3). El secado transcurrió al aire libre por un periodo de 18 días (3 días al sol y 15 días bajo sombra).



**Ilustración 2.3 Secado al aire libre**

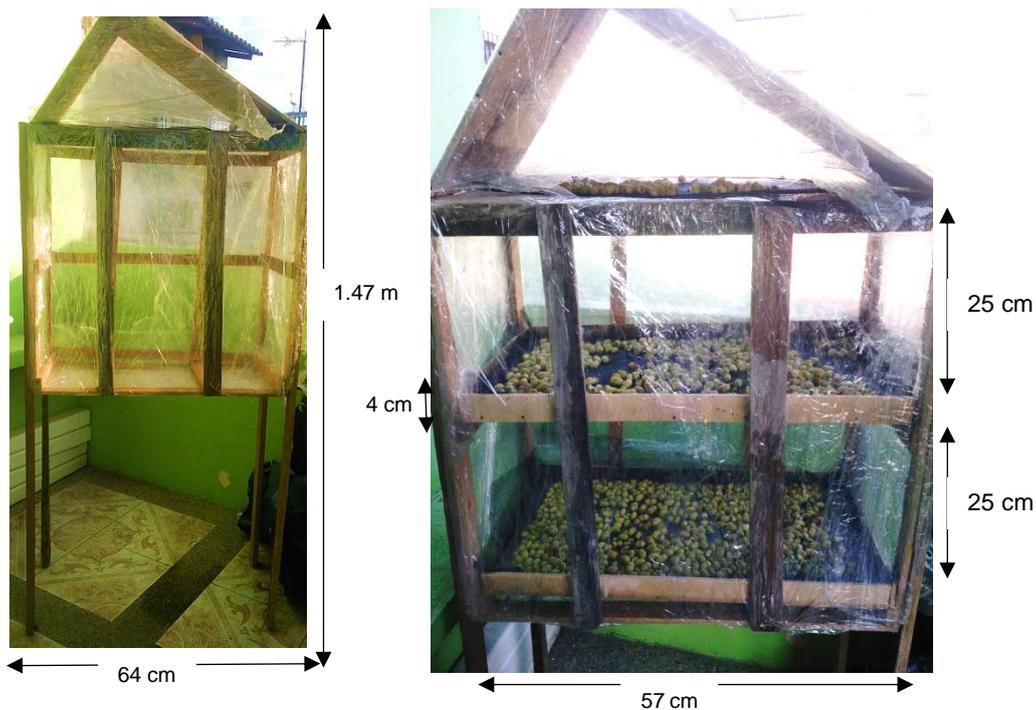
#### 2.5.1.2.2 Secado en prototipo

La Ilustración 2.4 presenta un prototipo de secador solar a baja escala con capacidad de 1500 g de fruto correspondientes a la muestra B. Las especificaciones se presentan en la Tabla 2.3.

La estructura se situó en un lugar abierto y los frutos se distribuyeron uniformemente a lo largo del lienzo de cada bandeja. Uno de los laterales se dejó descubierto para apilar las bandejas en forma de estante y permitir la entrada de aire al equipo. El secado transcurrió por un periodo de 18 días, verificándose que no exista crecimiento de hongos o bacterias en el fruto.

**Tabla 2.3 Especificaciones del prototipo de secador solar**

Especificaciones	Material	Dimensiones
Estructura	Madera	1.47 m x 64 cm
Cobertura	Polietileno transparente	84 cm x 64 cm
Bandejas	Madera, lienzo	57x31x4 cm - espacio entre bandejas 25cm



**Ilustración 2.4 Prototipo de secador solar. Vista frontal**

### 2.5.1.2.3 *Medición de humedad del fruto*

De cada lote (A y B) se seleccionaron muestras representativas de 103 g para determinar su humedad. Una vez al día durante el periodo de secado, se midieron sus masas con el fin de determinar el contenido de agua eliminada, y de esta forma obtener datos para la elaboración de las curvas de humedad (Subramanian et al., 2019).

Las masas seleccionadas de 103 g son representativas de una población de 1500g de frutos recolectados porque, previo al inicio de las etapas experimentales se estableció un protocolo de muestreo que permitió verificar la representatividad de las mismas. Para esto, se realizaron pruebas de humedad seleccionando muestras al azar de 653 g y 100 g, encontrándose que a los 13 días, las humedades de ambas muestras no varían en más del 1%.

### 2.5.1.3 **Molienda**

Para la molienda se siguió lo recomendado por (Hidalgo, Wilder, & Hilario, 2016, p. 204). En la Ilustración 2.5 se observa el proceso de trituración y homogenización

del tamaño de partícula para la muestra A. Esto se realizó utilizando un molino de granos y una licuadora. El mismo tratamiento se realizó para la muestra B.



**Ilustración 2.5 Molienda y trituración del fruto seco de Neem**

En la Ilustración 2.6 se observan las muestras A y B almacenadas en frascos de vidrio con su respectiva rotulación (A: Secado al aire libre y B: Secado en prototipo)



**Ilustración 2.6 Rotulación de las muestras molidas A y B**

#### 2.5.1.3.1 *Determinación del diámetro característico $D_{80}$*

Se realizó un análisis granulométrico de cada muestra por tamizado en el laboratorio LOPU-ESPOL, siguiendo las especificaciones de la norma U.S.A. estándar para tamices de prueba ASTM E-11 y la metodología recomendada por Simeon (2017).

Se utilizó el equipo tamizador durante 10 minutos para agitar 299.5 g de cada muestra y conocer la masa de las partículas retenidas en cada uno de los

tamices (N°10, N°18, N°30 y N°60) de diferentes aberturas (ver Ilustración 2.7). Posteriormente, para la determinación del diámetro característico de cada muestra con el tamaño de partícula pasante al 80% ( $D_{80}$ ), los datos obtenidos se representan en una curva granulométrica como porcentajes acumulados pasantes vs diámetro de las partículas.



**Ilustración 2.7** Pesado de las muestras molidas y equipo

## 2.5.2 Extracción de azadiractina de los frutos de Neem.

### 2.5.2.1 Extracción no aislada de azadiractina

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio LAQUINS-ESPOL. Las extracciones (ver Tabla 2.4) se realizaron colocando en contacto agua y material vegetal siguiendo la matriz experimental establecida en la Tabla 2.2

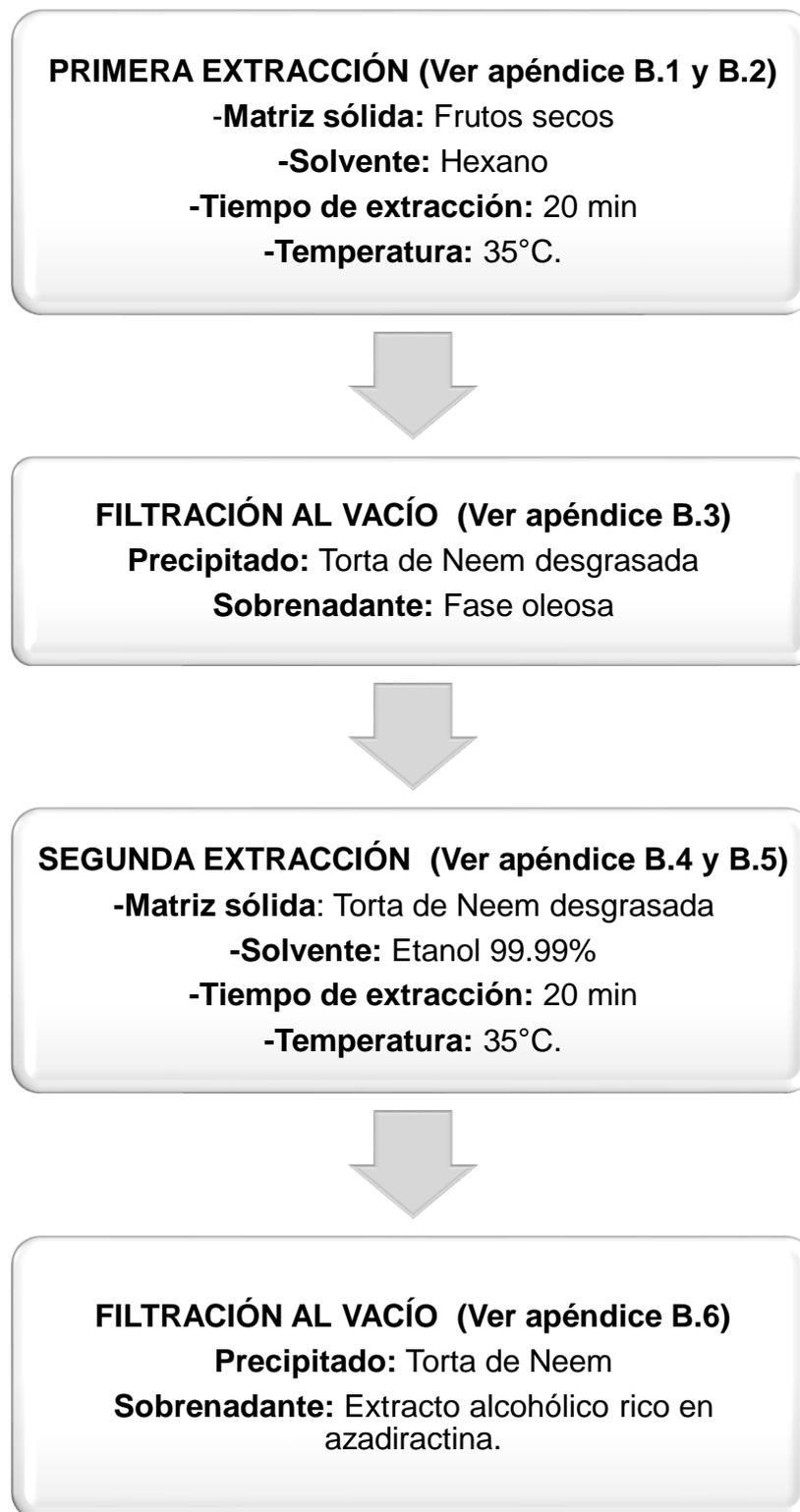
**Tabla 2.4** Procedimientos de extracción de azadiractina

N°	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO	DESCRIPCIÓN GRÁFICA
1	<p><b>Método convencional: Maceración (Paragas et al., 2018)</b>  Solvente de extracción: Agua  Matriz sólida: Frutos secos molidos</p> <p>- <b>Condiciones de operación</b>  Relación R (masa/solvente): variable  Temperatura: ambiente.  Tiempo de extracción: 24 horas</p> <p>- <b>Filtración</b>  Las muestras se filtraron a temperatura ambiente</p> <p>- <b>Almacenamiento</b>  Los extractos acuosos una vez filtrados se almacenaron en botellas de plástico oscuras y conservaron en refrigeración hasta su análisis.</p>	  

2	<p><b>Método moderno: Extracción Asistida por Ultrasonido (USE)</b>  <b>(Farjaminezhad &amp; Garoosi, 2020)</b>  Solvente de extracción: Agua  Matriz sólida: Frutos secos molidos</p> <p><b><u>Condiciones de operación</u></b>  Relación (masa/solvente): 2g/20mL  Temperatura del baño: 35 °C.  Tiempo de sonicación <math>\theta</math>: variable</p> <p><b><u>Filtración</u></b>  Las muestras se filtraron a temperatura ambiente</p> <p>- <b><u>Almacenamiento</u></b>  Los extractos acuosos una vez filtrados se almacenaron en botellas de plástico oscuras y conservaron en refrigeración hasta su análisis.</p>	
---	---	--

### **2.5.2.2 Extracción aislada de azadiractina.**

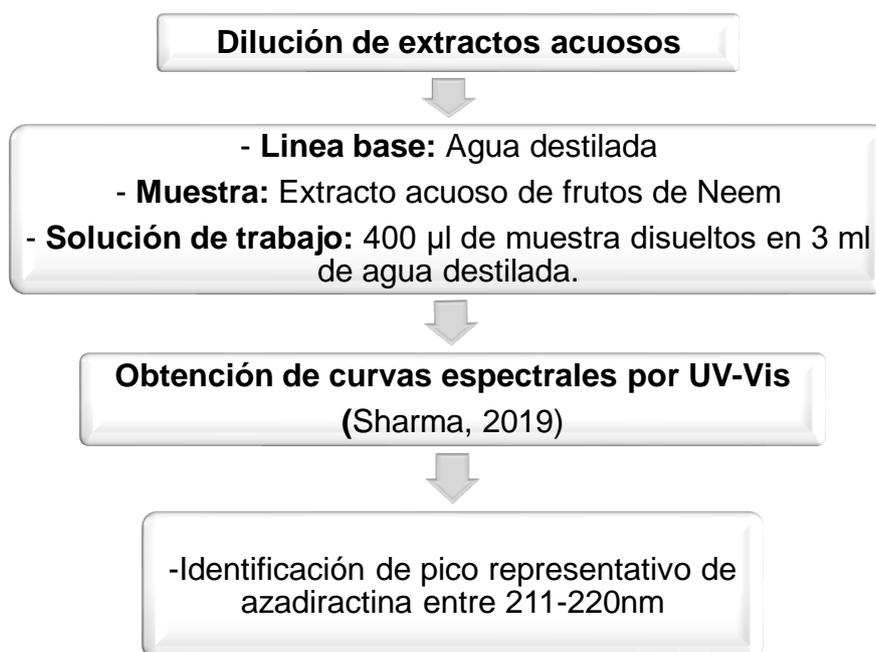
Este proceso se realizó siguiendo la metodología sugerida por Subramanian et al. (2019) y Farjaminezhad & Garoosi (2020), extrayendo con hexano el aceite (grasas, lípidos y proteínas) contenido en los frutos. Luego se realizó una segunda extracción (desde la torta de Neem) con etanol al 99.99% para separar la azadiractina. Los experimentos se realizaron mediante Extracción Asistida por Ultrasonido (ver Diagrama 2.2).



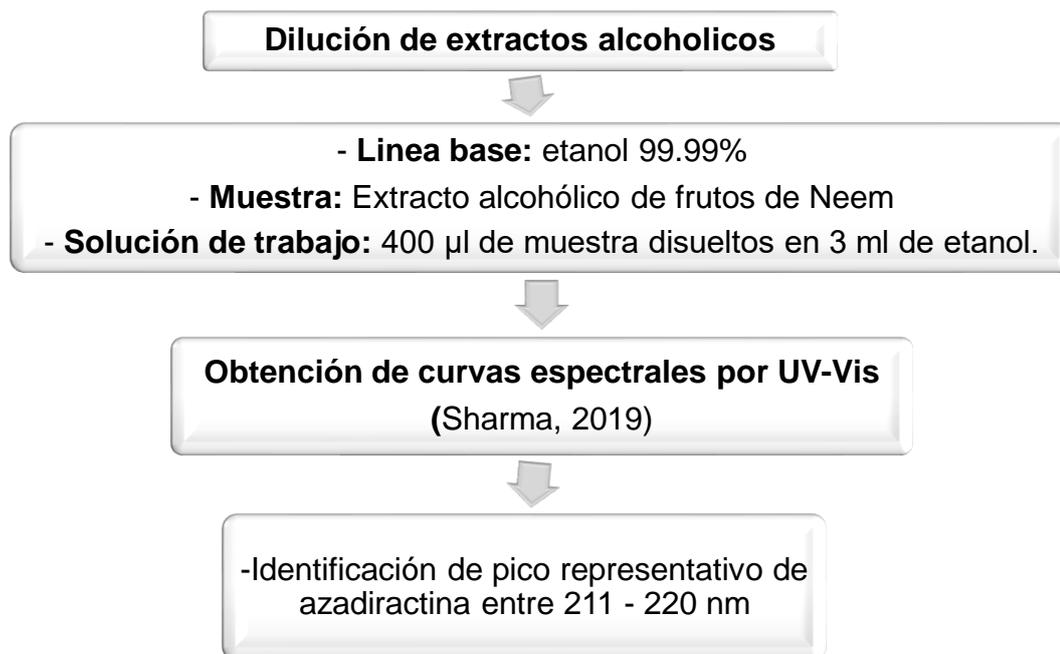
**Diagrama 2.2 Procedimiento para purificación de azadiractina**

### 2.5.3 Caracterización de la azadiractina

A partir de cada extracto se obtuvieron diluciones para su análisis por UV-Vis. Para extractos acuosos ver Diagrama 2.3 y para extractos alcohólicos ver Diagrama 2.4. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (25 °C) en un espectrofotómetro Modelo Genesys10S UV-Vis. El rango espectral de estudio fue de 190-600 nm. Las longitudes de onda elegidas para la identificación del pico representativo de azadiractina fueron seleccionadas conforme al desplazamiento batocrómico o hipsocrómico que pueden presentar los espectros de acuerdo con la naturaleza del disolvente (Sharma et al., 2019).



**Diagrama 2.3 Procedimiento para caracterización UV-Vis de extractos acuosos**



**Diagrama 2.4 Procedimiento para caracterización UV-Vis de extractos alcohólicos**

## 2.6 Tratamiento estadístico

Se aplicó un modelo de Regresión Logística Binaria utilizando un tratamiento estadístico de los datos mediante el software de IBM SPSS®. Este modelo nos permitirá mediante la significancia de los coeficientes, exponenciales y estadísticos del modelo evaluar la asociación entre variables.

Se estableció como hipótesis nula ( $H_0$ ) que la asociación entre la variable dependiente y la variable independiente no es estadísticamente significativa y como hipótesis alterna ( $H_1$ ) que la asociación entre la variable dependiente y la variable independiente es estadísticamente significativa; la aceptación o rechazo de la hipótesis nula permitirá concluir cuales son las variables independientes que explican el modelo.

Antes de realizar el análisis estadístico se debe comprobar que se cumplan los siguientes supuestos:

- No debe existir una correlación alta entre las variables independientes
- Independencia de errores
- El número de objetos observados debe ser significativo
- Analizar fuerza, dirección y significancia de los coeficientes del modelo

## 2.6.1 Regresión Logística Binaria

### 2.6.1.1 Ingreso de las variables en el software SPSS®

En la pestaña *vista de variables* se definió el identificador denominado “Experimentos” con codificación de las 24 muestras definidas en la matriz experimental de la Tabla 2.2. Posteriormente, basándose en la Tabla 2.5 se ingresaron las variables categóricas dicotómicas y poliatómicas según el número de categorías (ver Apéndice B.7). Conocer los valores asignados a cada variable es fundamental para la posterior explicación de los resultados.

**Tabla 2.5 Variables categóricas dicotómicas y poliatómicas**

Variable	ID	Medida	Valores
Dependiente dicotómica: “Presencia de azadiractina”	AZA	Nominal	0: “No se detecta presencia de azadiractina” 1: “Se detecta presencia de azadiractina”
Independiente dicotómica: “Humedad de la muestra”	W	Nominal	0: “% 30.10 por secado al Aire libre” 1: “%32.04 por secado en Prototipo”
Independiente poliatómica: “Métodos de extracción de aza a diferentes condiciones de operación”	E	Nominal	1: Maceración R1:20g/200mL 2: Maceración R2: 30g/200mL 3: Sonicación 20 min 4: Sonicación 30 min

Una vez creadas las variables, en la pestaña *vista de datos* se ingresó la información correspondiente a las variables humedad (W) y métodos de extracción (E). Adicional, para la variable dependiente (AZA) se ingresó la respuesta obtenida (detección de la presencia o no de azadiractina) luego de analizar los espectros UV-Vis, tal como se indica en Apéndice B.8. Para la ejecución del análisis de regresión logística, se seleccionó el menú *Analizar/Regresión/Logística binaria* (ver Apéndice B.9).

Como siguiente paso se introdujeron la variable dependiente categorizada “Presencia de azadiractina”, y las variables independientes (identificadas en

software como covariables) “Humedad de la muestra” y “métodos de extracción” (ver Apéndice B.10). La variable humedad (W) por ser dicotómica está categorizada, pero los métodos de extracción (E) al ser tratados como una variable poliatómica no están codificados como una variable *dummy*. En este caso, mediante la pestaña *categorica*, el sistema permitió recodificar automáticamente la variable E que tiene 4 categorías, creando 3 variables *dummy* adicionales a la categoría de referencia y asignando 0-1 a cada nueva variable (ver apéndice B.11). La categoría de referencia debe ser asignada con el valor de 0, se elige la opción “primera”, ya que se conoce mediante el análisis UV-Vis que la categoría de extracción (Maceración R1:20g / 200mL) provee resultados espectrales no favorables para la detección de azadiractina (ver Apéndice B.11).

#### **2.6.1.2 Selección del método y configuración del modelo**

Para la construcción del modelo de regresión se especificó el método *Intro*. El cual permite que todas las variables de un bloque se introduzcan en un solo paso (ver Apéndice B.10).

Las especificaciones para la presentación de resultados y posterior ejecución del análisis de regresión logística se seleccionaron mediante la pestaña *opciones*. En esta se eligen “gráficos de clasificación”, “bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow”, mientras que desde la pestaña *guardar* se seleccionaron las opciones “probabilidades” y “grupos de pertenencia” (ver Apéndice B.12). Posteriormente, se ejecutó el análisis mediante la pestaña *aceptar*.

# CAPÍTULO 3

## 3. Resultados y análisis

### 3.1 Secado

#### 3.1.1 Pruebas iniciales de humedad

Mediante muestreo simple se realizaron pruebas de humedad (ver Apéndice C.1) a una población de 1500 g de frutos de Neem recolectados en el mes de junio del año 2021, humedad relativa promedio anual mínima 73% y máxima 84%, temperatura promedio anual mínima 23.8 °C y máxima 30°C. Se seleccionaron dos muestras de 653 g y 100 g para secar al aire libre. La Tabla 3.1 indica la humedad final para cada muestra transcurrido un período de 13 días, encontrándose una diferencia porcentual entre las humedades de 1.037%, resultado que permitió establecer muestras representativas de 103 g para la población establecida.

**Tabla 3.1 Datos de humedad de las muestras 1 y 2**

Tiempo (días)	Muestra 1		Muestra 2	
	masa (g)	% Humedad	masa (g)	% Humedad
0	653		100	
13	205	31.39	32	31.07
Diferencia porcentual entre muestras 1 y 2			$\frac{31.07 - 31.39}{31.39} = 1.037\%$	

#### 3.1.2 Humedad de las muestras A y B

La Tabla 3.2 muestra los datos de humedad recopilados durante un periodo de 18 días (tiempo de secado) para dos muestras A y B de 103 g cada una. Estas fueron tratadas al aire libre y en un prototipo de secador solar. Al finalizar el secado, el porcentaje de humedad de la muestra A fue de 30.10%, mientras que el de la muestra B fue de 32.04%. Esto indica que el tratamiento aplicado a la muestra A permite eliminar mayor contenido de agua.

**Tabla 3.2 Datos de humedad para las muestras A y B**

Tiempo (días)	Secado al aire libre: Muestra A		Secado en prototipo: Muestra B	
	masa (g)	% Humedad	masa (g)	% Humedad
0	103		103	
1	68	66.02	75	72.82
2	50	48.54	63	61.17
3	41	39.81	52	50.49
4	38	36.89	44	42.72
5	36	34.95	40	38.83
6	35	33.98	38	36.89
7	34	33.01	36	34.95
8	33	32.04	35	33.98
9	33	32.04	35	33.98
10	33	32.04	34	33.01
11	32	31.07	34	33.01
12	32	31.07	34	33.01
13	32	31.07	34	33.01
14	32	31.07	34	33.01
15	32	31.07	34	33.01
16	31	30.1	33	32.04
17	31	30.1	33	32.04
18	31	30.1	33	32.04

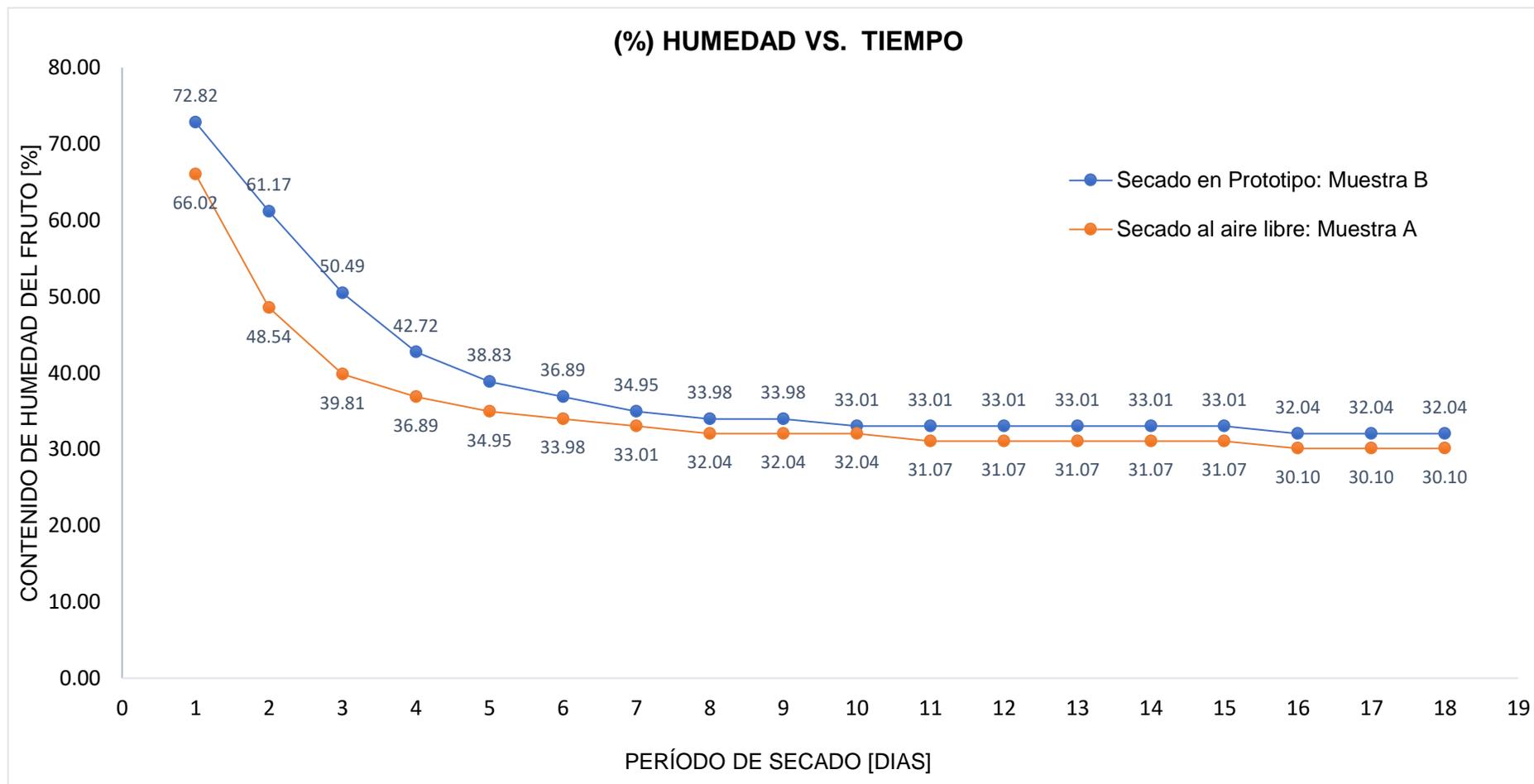
### 3.1.3 Curvas de humedad

En la Ilustración 3.1 se observan las curvas de secado que describen el comportamiento de la humedad en función del tiempo. La fase inicial donde ocurre el calentamiento del sólido no se observa fácilmente ya que, el tiempo de muestreo (cada 24 horas) no lo permitió. Se recomienda disminuirlo para que esta etapa sea observada en la gráfica. En la segunda etapa donde se produce el secado a velocidad constante, se elimina humedad libre y se moviliza humedad ligada o interna hacia la superficie de los frutos. Empieza desde el día 1 y termina en el día 3 para la muestra B y en el día 4 para la muestra A (Dávila Nava, 2004). Al final de esta etapa, la muestra B presenta una humedad del 42.72% (0.4272 Kg H<sub>2</sub>O / Kg de sólido seco), mientras que la muestra A presenta una humedad de 39.81 %. Se observa que esta se secó más rápido porque su velocidad de secado es

mayor (mayor pendiente en curva A para cualquier tiempo en la fase inicial). La diferencia entre humedades se explica debido a la incidencia directa de la radiación solar sobre la muestra A, en contraste con la muestra B que recibe radiación de forma indirecta.

La etapa de velocidad decreciente empieza desde el día 3 (muestra A) y 4 (muestra B), terminando en el día 15 para ambas muestras. Al final de esta, la muestra B presenta una humedad del 33.01% mientras que la muestra A presenta una humedad de 31.07%. De los días 15 al 18 se elimina la humedad ligada de la etapa anterior, y el porcentaje final para ambas muestras decrece ligeramente hasta un valor constante de 30.10% y 32.04% para las muestras A y B respectivamente. Estos valores distan de los reportados por Hidalgo, Wilder, & Hilario, (2016) los cuales se encuentran entre 8% - 12%, debido a la estrategia de secado empleada (secado natural) y a las limitantes climáticas de la zona (ver sección 3.1.1) que restringen alcanzar valores mínimos de humedad.

Además, se evidencia en la Tabla 3.2 que el secado al aire libre disminuye el tiempo en comparación con el secado en prototipo, ya que, en solo en 10 días la muestra A alcanzó una humedad del 32.04%, mientras que la muestra B tardó 18 días en llegar al mismo valor.



**Ilustración 3.1 Curvas de secado para las muestras A y B**

## 3.2 Análisis granulométrico

### 3.2.1 Distribución del tamaño de partícula del fruto de Neem y curva granulométrica

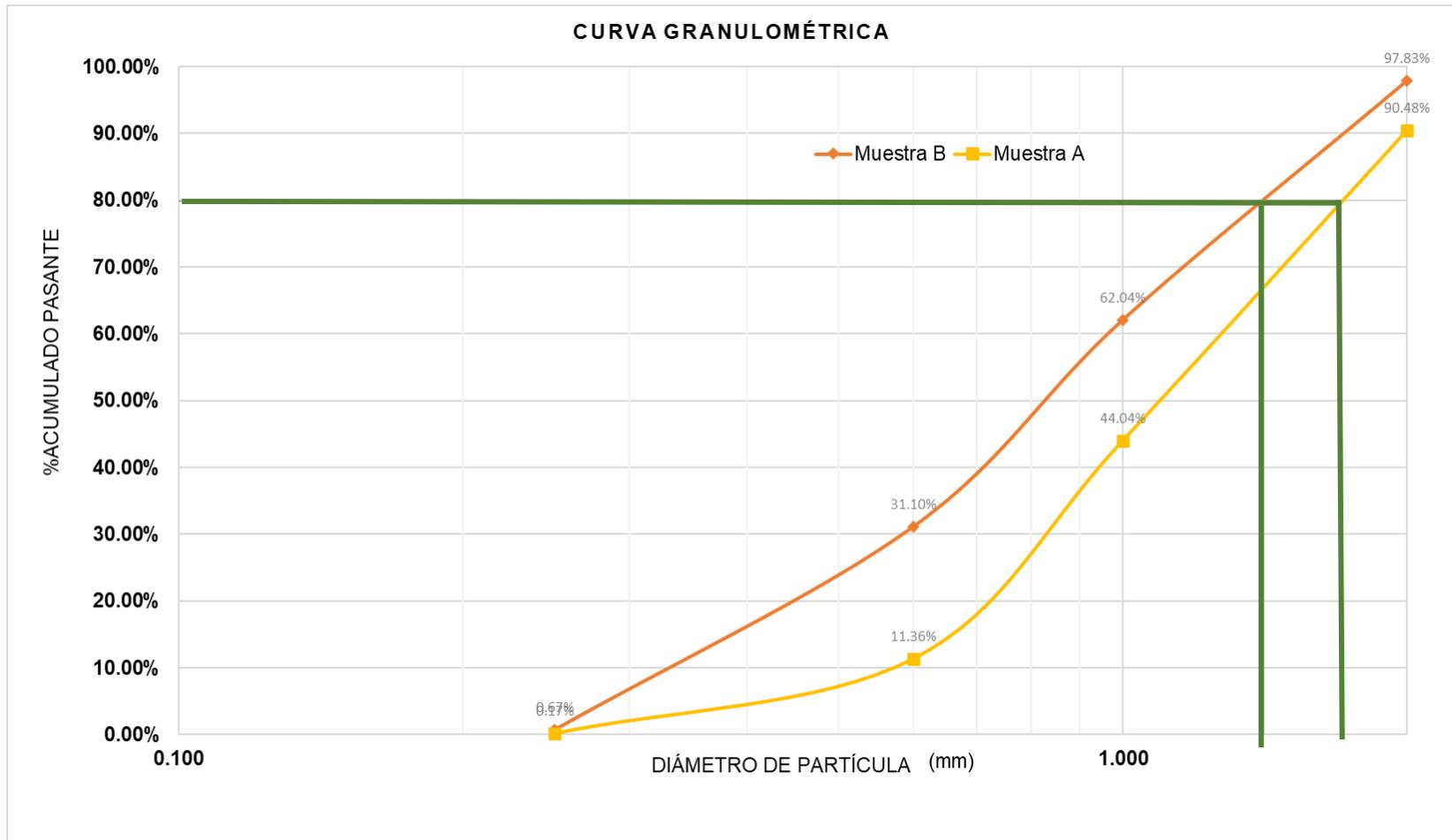
Mediante el software Excel se obtuvo información de los porcentajes retenidos parciales y acumulados en los tamices respecto al total de cada muestra (ver Apéndice C.2 y Apéndice C.3). En la Tabla 3.3 se presentan los resultados de los ensayos granulométricos para la determinación de los diámetros de abertura que permiten el paso del 80% de las muestras A y B. Se identificó que la muestra con menor diámetro de abertura es la B tratada en un secador solar.

**Tabla 3.3 Diámetros de abertura de las muestras**

Muestras	D <sub>80</sub> (mm)
A	1.774
B	1.502

La curva granulométrica presentada en la Ilustración 3.2 permitió corroborar que los diámetros característicos de abertura cuando pasa el 80% de muestra son mayores a 1 mm, pero menores al tamiz N°10 con abertura de 2 mm.

En base a la evidencia matemática se observa que los diámetros de partículas para ambas muestras no se encuentran dentro del rango (0.425 mm y 0.710 mm) reportado por la literatura (Awolu, 2013). Esto podría afectar los resultados obtenidos en las siguientes etapas del proceso. Una posible explicación de este fenómeno se encuentra en los equipos utilizados (molino de granos y licuadora casera) durante la molienda de los frutos, ya que, estos no permitieron obtener muestras pulverizadas y homogéneas. Los métodos de secado empleados antes de la molienda, también pudieron influir en la determinación del tamaño de partículas, ya que una muestra con mínimo contenido de humedad se pulveriza fácilmente.



**Ilustración 3.2** Curvas granulométricas de las muestras A y B

### 3.3 Caracterización de azadiractina

Para determinar la influencia de las variables independientes “Relación masa / solvente”, “Tiempo de sonicación”, y “Humedad” en la variable dependiente “Detección de azadiractina” se plantea el Diagrama 3.1

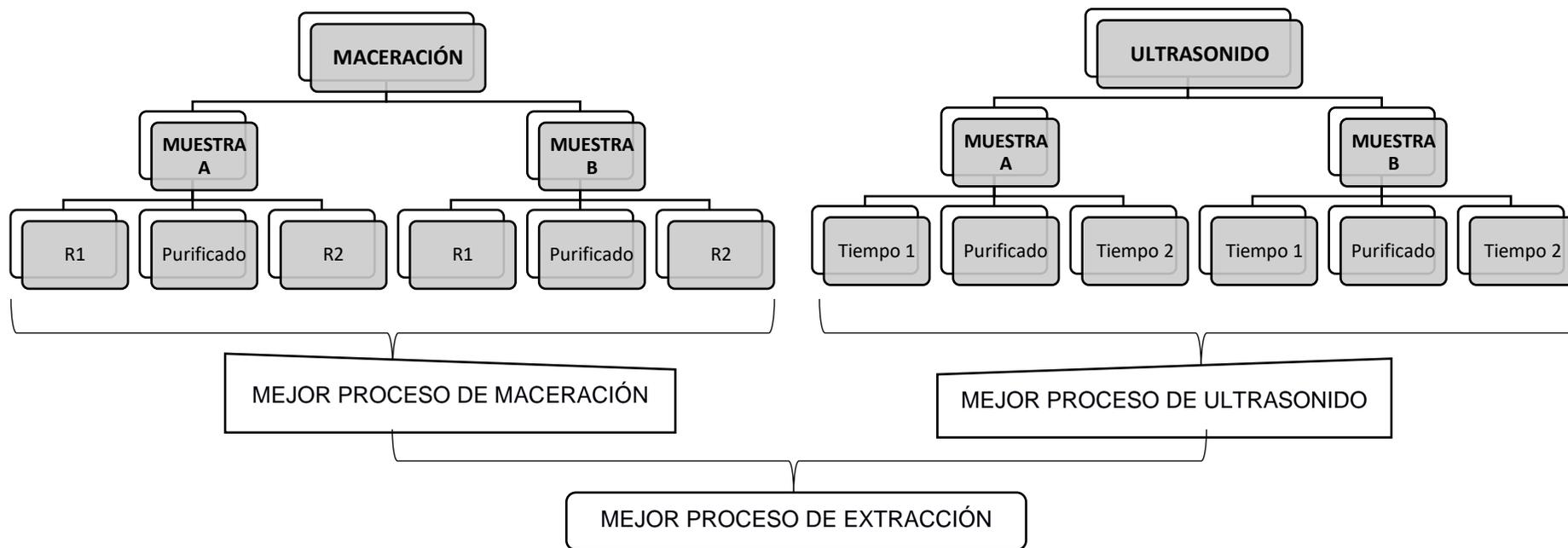


Diagrama 3.1 Esquema analítico para determinar el mejor proceso de extracción

Donde “Purificado” hace mención de los espectros de la muestra B purificada bajo extracción aislada y que representa de mejor forma el espectro del estándar de azadiractina (ver Ilustración 1.5). R1, R2 representan las relaciones masa / solvente de 20 g / mL y 30 g / mL respectivamente. Tiempo 1 y Tiempo 2 representan tiempos de sonicación de 20 min y 30 min respectivamente.

### 3.3.1 Espectros UV – Vis muestras A y B purificadas. Ultrasonido

#### 3.3.1.1 Muestra A

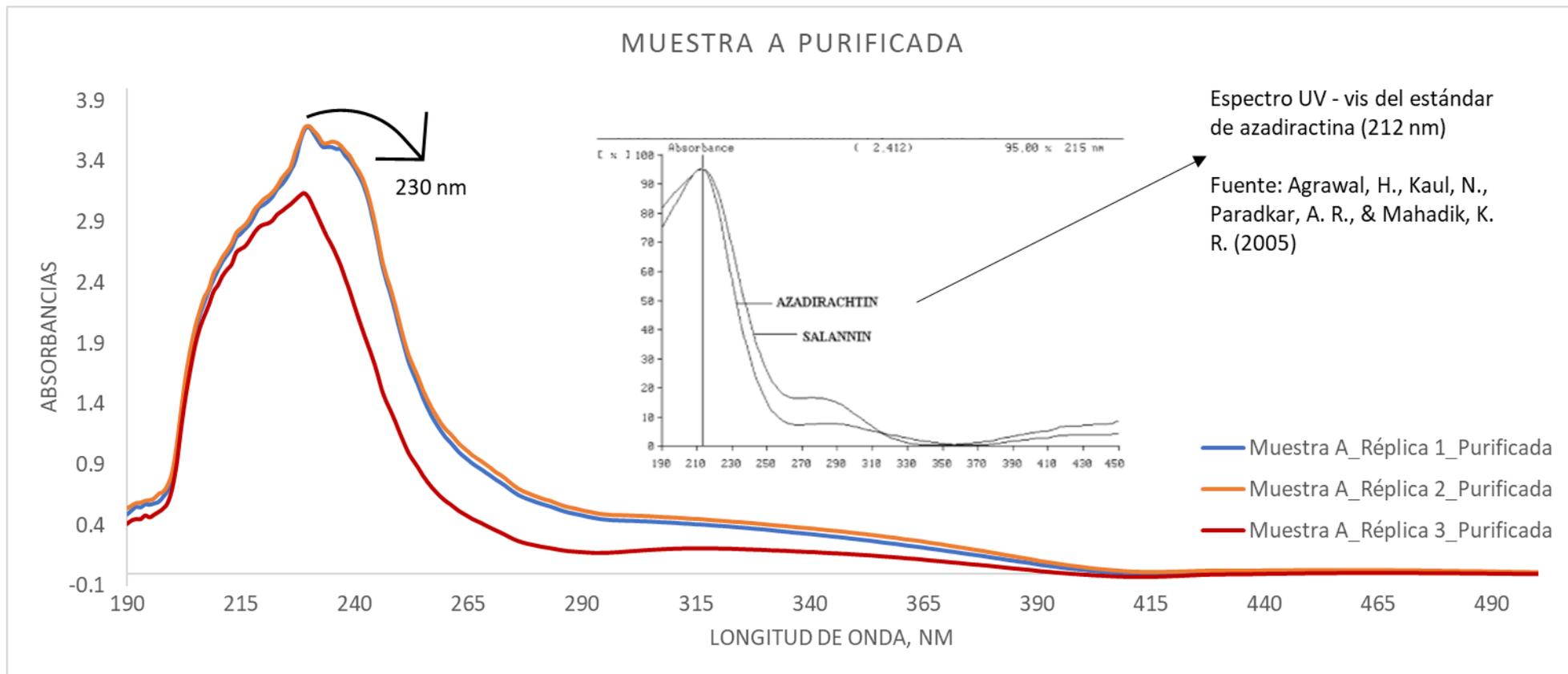


Ilustración 3.3 Espectro UV – Vis muestra A purificada por ultrasonido durante 20 minutos

### 3.3.1.2 Muestra B

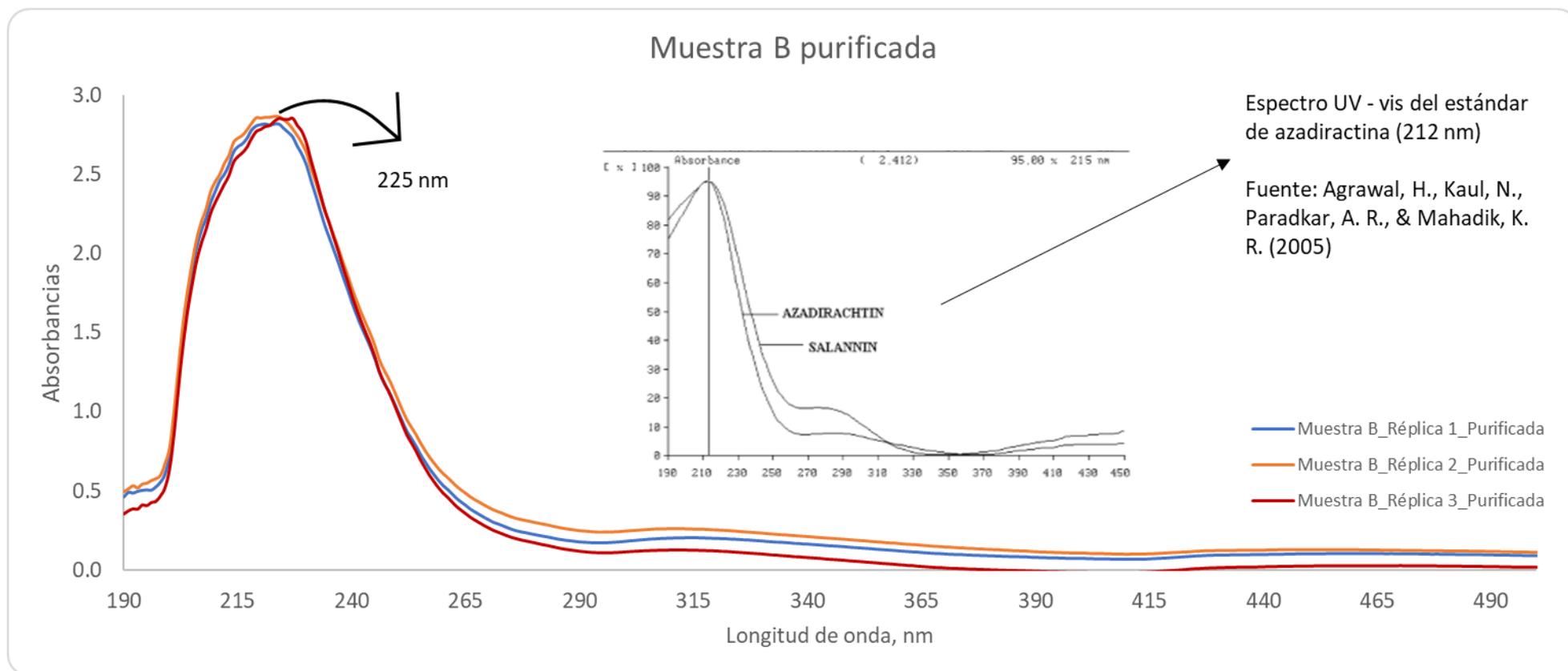
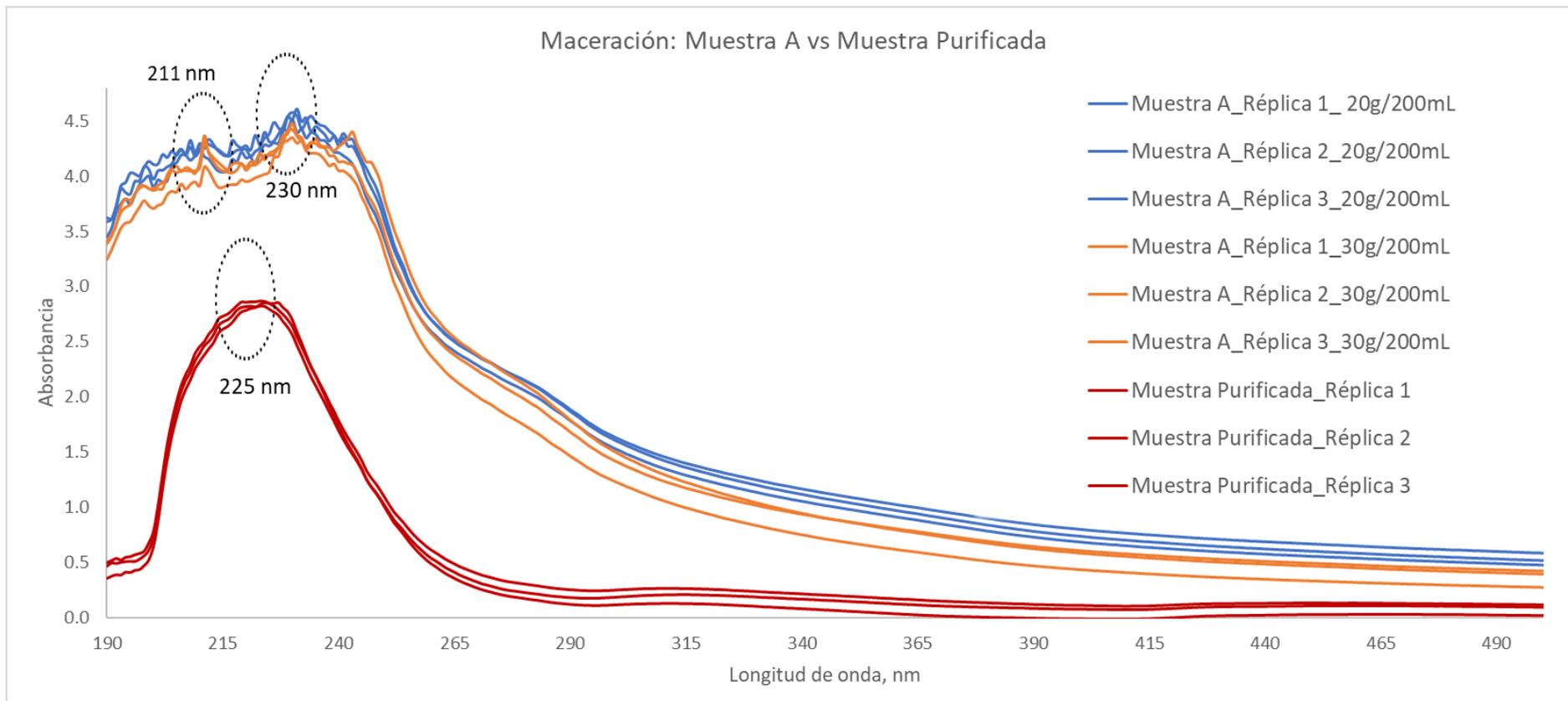


Ilustración 3.4 Espectro UV – Vis muestra B purificada por ultrasonido durante 20 minutos

### 3.3.2 Comparación entre espectros UV – Vis de muestra A con diferentes relaciones masa/solvente y muestra purificada. Maceración



**Ilustración 3.5 Espectro UV – Vis muestra A vs muestra purificada, maceración**

### 3.3.3 Comparación entre espectros UV – Vis de muestra B a diferentes relaciones masa/solvente y muestra purificada. Maceración

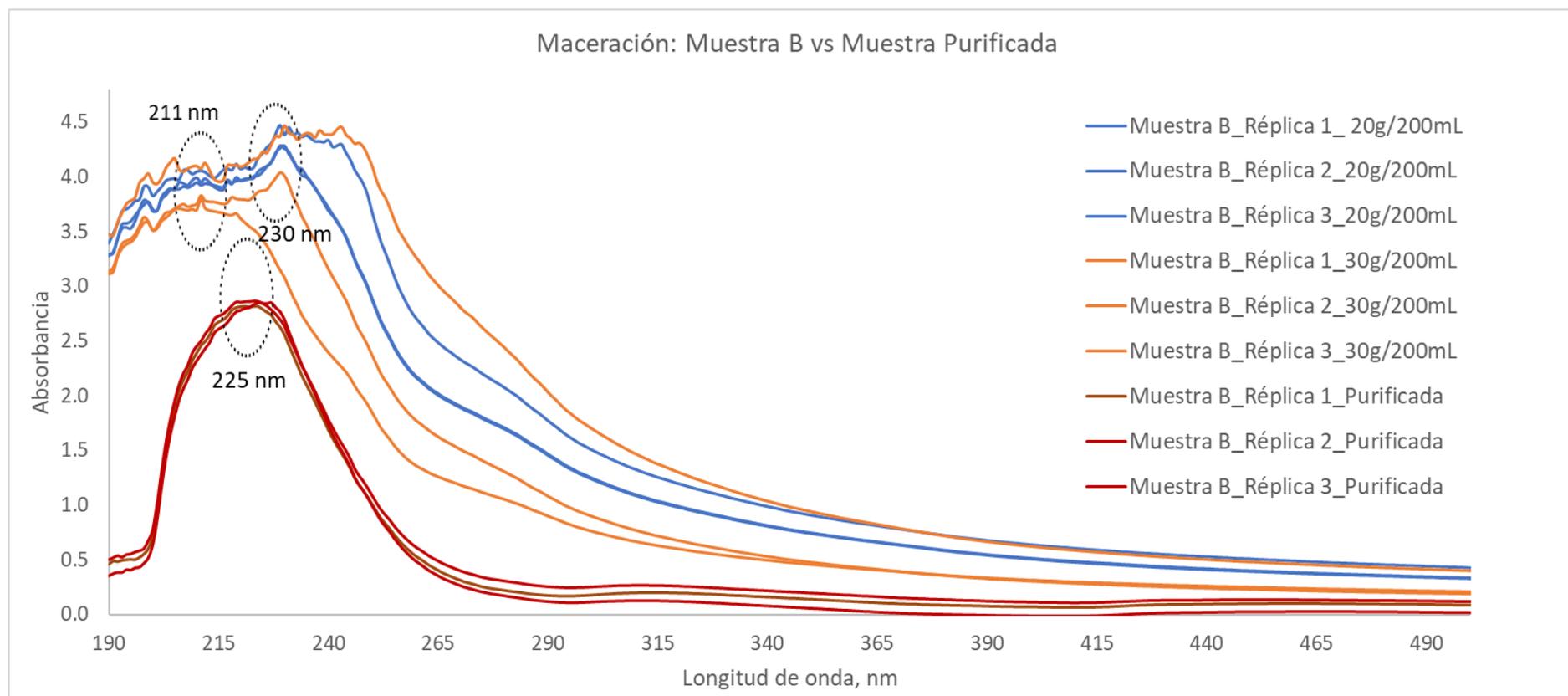


Ilustración 3.6 Espectro UV – Vis muestra B vs muestra purificada, maceración

### 3.3.4 Comparación entre espectros UV – Vis de muestra A con diferentes tiempos de sonicación y muestra purificada. Ultrasonido

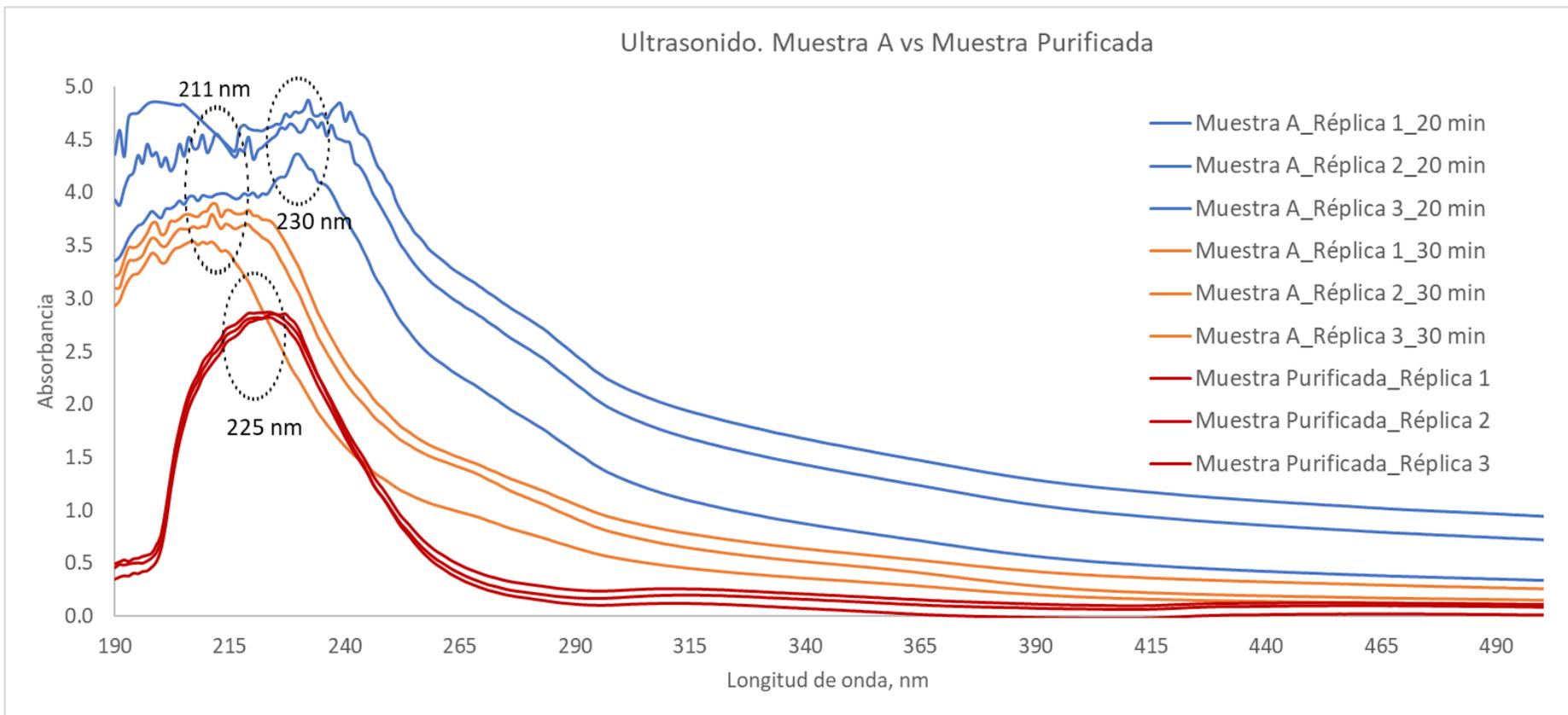


Ilustración 3.7 Espectro UV – Vis muestra A vs muestra purificada, ultrasonido

### 3.3.5 Comparación entre espectros UV – Vis de muestra B a diferentes tiempos de sonicación y muestra purificada. Ultrasonido

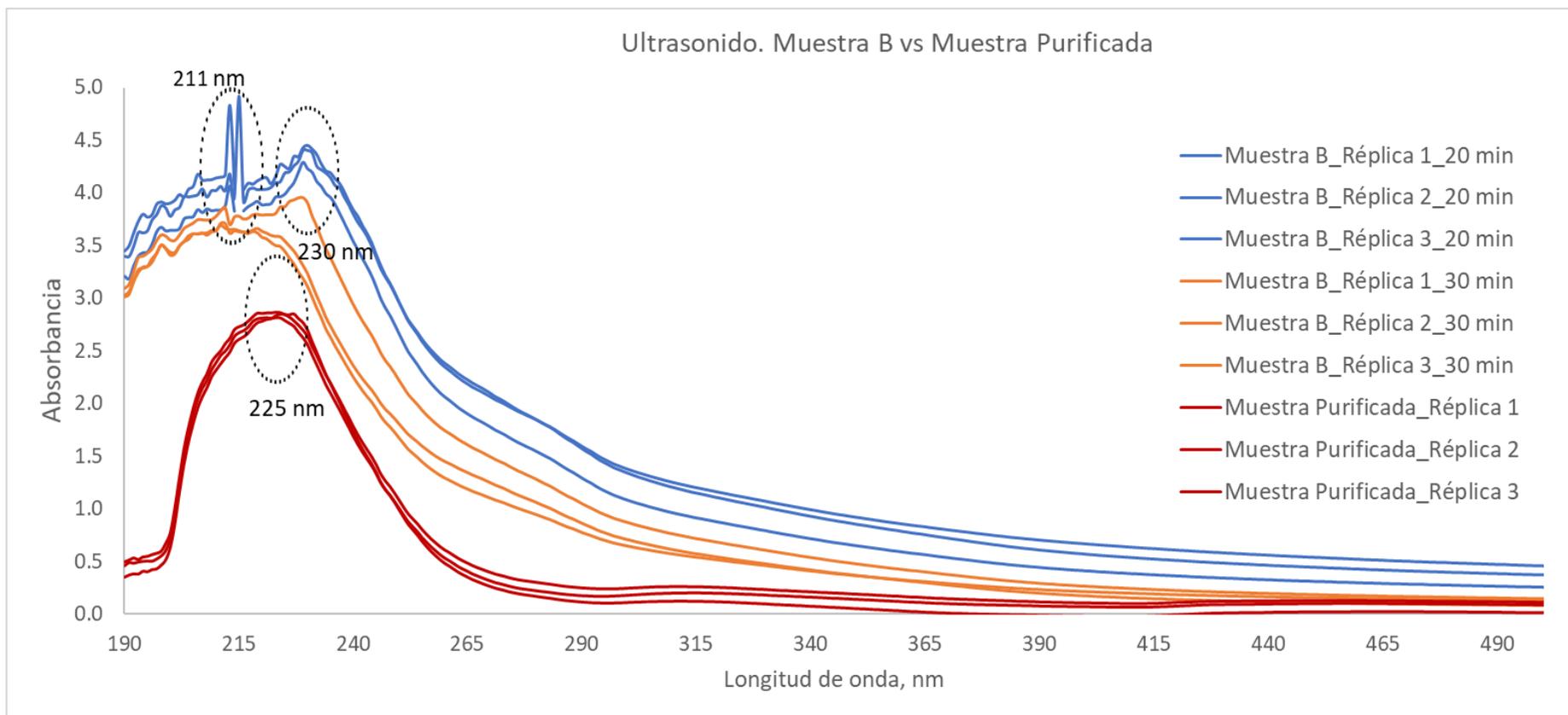


Ilustración 3.8 Espectro UV – Vis muestra B vs muestra purificada, ultrasonido

### 3.3.6 Comparación entre espectros UV – Vis de las mejores muestras obtenidas por maceración y ultrasonido vs muestra purificada.

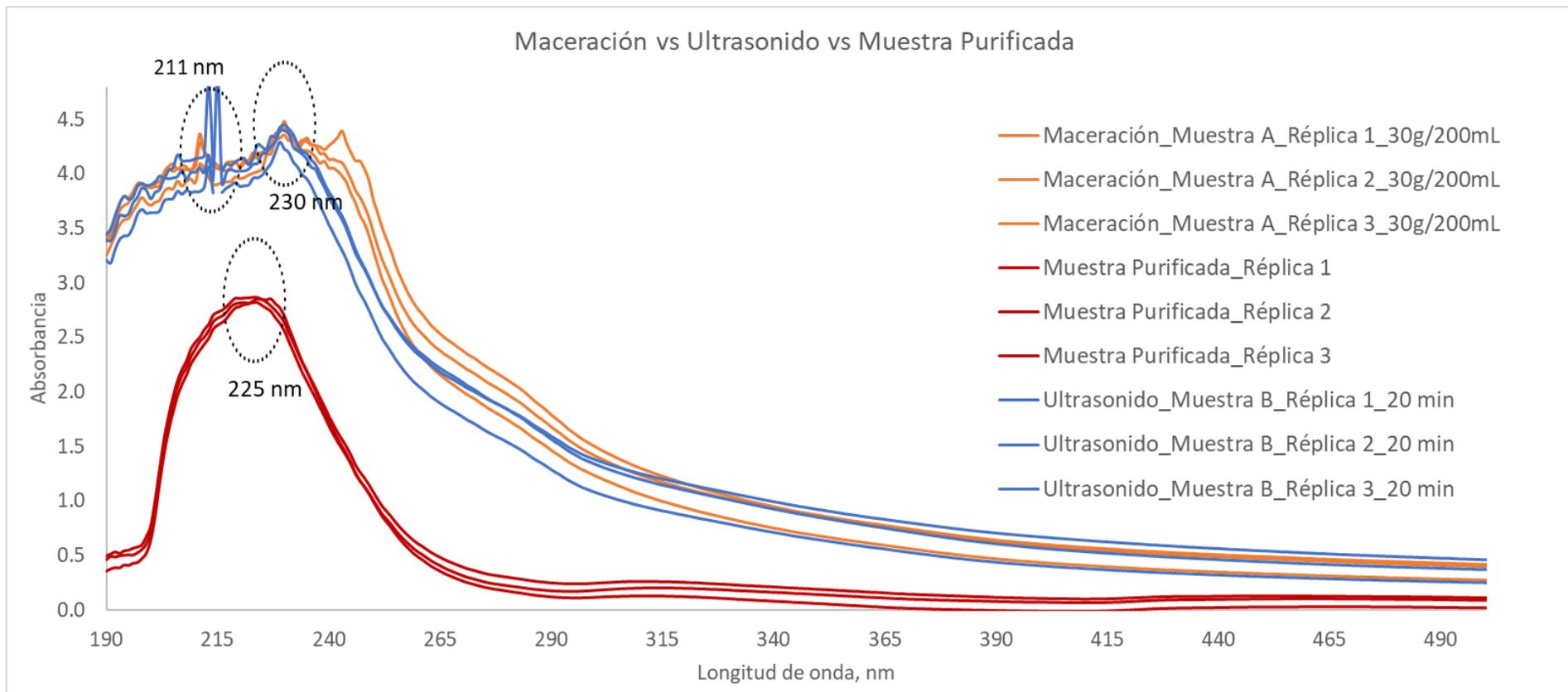


Ilustración 3.9 Espectros UV – Vis de las mejores muestras en maceración y ultrasonido vs muestra purificada

### 3.3.7 Análisis de resultados espectrales

Debido a la naturaleza mixta del proyecto compuesto por una fase cuantitativa y otra cualitativa, se ejecutaron en total 30 unidades experimentales (ver Apéndice C.5) para observar detenidamente el comportamiento de la variable dependiente (Detección de azadiractina) sobre las variables independientes definidas en la sección 2.4. Por esta razón, se planteó una estrategia de discriminación de espectros UV – Vis mediante el esquema analítico del Diagrama 3.1, que permitió la categorización de las muestras que cumplieran las características espectrales para el componente activo azadiractina, anulando los espectros que no reportaban características visuales tales como: absorbancias máximas absolutas en el intervalo de 211 a 220 nm, no registrar interferencias químicas causadas por otras sustancias activas (lípidos, grasas y proteínas) detectadas por el espectrofotómetro (ver características del equipo en sección 2.1.3), no registrar absorbancias máximas locales o absolutas fuera del intervalo de interés, mostrar curvas con robustez (suavidad) en el intervalo mencionado, entre otras. Finalmente, el algoritmo planteado utiliza como base comparativa los espectros (réplicas) UV - Vis de la muestra purificada que presentó mejores resultados (la muestra B) y los compara con todo el universo de experimentos. Esto permitió el confrontamiento entre muestras con diferentes humedades tanto en el proceso de maceración como en EAU, para luego comparar los mejores resultados de cada sección e identificar el mejor proceso de extracción.

En la Ilustración 3.3 e Ilustración 3.4 se observan los espectros UV - Vis de las muestras purificadas A y B respectivamente. La muestra A presenta un máximo absoluto de absorbancia a una longitud de onda de 230 nm (ver Ilustración 3.3), es decir, el máximo se encuentra desplazado entre 19 y 10 nm del rango (211 – 220 nm) reportado en la literatura. Adicional, se observa que la curva no es suave en esa región y registra ruidos mínimos (casi imperceptibles) a la izquierda de 230 nm. El desplazamiento del máximo de absorbancia hacia la derecha se presenta debido a la polaridad y concentración del solvente etanol al 99.99% utilizado para extraer azadiractina. Otra explicación para este resultado radica en las interferencias o ruidos debido a errores experimentales humanos como calibración del espectrofotómetro o contaminación externa de las muestras. La muestra B (ver Ilustración 3.4) presenta similares características, sin embargo, su máximo de

absorbancia se presenta en 225 nm, con un desplazamiento menor al encontrado en la muestra A, además, no se observan interferencias, por lo que se seleccionaron estos espectros UV – Vis como los mejores resultados y se utilizan para comparar con las demás unidades experimentales.

En la Ilustración 3.5 Espectro UV – Vis muestra A vs muestra purificada, maceración) se observa que los mejores espectros corresponden a la muestra con una relación masa/solvente de 30 g / 200 mL, ya que, la longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia es aproximadamente 211 nm, valor que se encuentra dentro del rango de interés. En contraste, la muestra sometida a una menor relación masa/solvente (20 g / 200 mL) presenta máximos de absorbancias difíciles de identificar ya que sus picos no presentan una amplitud considerable en el intervalo de 211 a 220 nm.

En la Ilustración 3.6 Espectro UV – Vis muestra B vs muestra purificada, maceración) se identifican máximos de absorbancia en 230 nm aproximadamente (fuera del rango de interés). La evidencia química del barrido espectral permite afirmar que la muestra B secada en prototipo y extraída bajo maceración no presenta buenos resultados en la detección de azadiractina. El ruido que se genera en este análisis se explica posiblemente en los errores experimentales, a la estrategia de secado y a interferencias químicas de otras sustancias.

En la Ilustración 3.7 se comparan los espectros UV – Vis de la muestra A (secada al aire libre) por EAU a diferentes tiempos de sonicación, encontrándose condiciones favorables para las muestras tratadas durante 30 min, ya que, se identifican picos a 211 nm en todas las réplicas. De las réplicas tratadas a un tiempo de 20 min, dos permiten identificar (difícilmente) picos a 211 nm a pesar de presentar ruido en el intervalo de interés.

La Ilustración 3.8 compara los espectros de la muestra B (tratada en prototipo de secador solar) por EAU a diferentes tiempos de sonicación. Las réplicas tratadas durante 20 minutos presentan picos máximos con mayor amplitud a una longitud de onda de 211 nm (dentro del intervalo de interés). A su vez, las réplicas tratadas

a 30 min exhiben picos ligeramente pronunciados a 211nm. Aunque todas las réplicas presenten ruido, este método de extracción permite identificar los mejores resultados para la detección del componente activo, en contraste con los espectros de las muestras extraídas por maceración. Finalmente, en la Ilustración 3.9 se contrastan las réplicas por maceración a una relación masa/solvente de 30 g / 200 mL y por sonicación a 20 minutos, identificándose mejor detección de azadiractina en los espectros correspondientes a la muestra B secada en prototipo y extraída por sonicación a 20 minutos.

En la sección 3.1.2, si bien es cierto se encontró evidencia matemática de que la estrategia de secado natural al aire libre permitía disminuir el tiempo, ésta no permite mejores resultados en la detección de azadiractina en comparación con un secado en prototipo. Esto se puede evidenciar en la Ilustración 3.9 Espectros UV – Vis de las mejores muestras en maceración y ultrasonido vs muestra purificada) en la cual la muestra B extraída por sonicación presenta características espectrales similares a las establecidas por Agrawal, (2005). La muestra B presenta un máximo de absorbancia absoluto en 211 nm (dentro del rango de interés) y menor ruido que permite identificar el pico típico de la azadiractina y cierta suavidad de las curvas en el rango de interés, características que no se presentan en muestra A secada al aire libre a una relación masa/solvente de 30 g / 200 mL. Debido a la evidencia química encontrada en los barridos espectrales se puede afirmar que la estrategia de secado que provee mejores resultados es el prototipo de secador solar. Esto se explica debido a que el recubrimiento de polietileno del prototipo evita la incidencia directa de los rayos solares sobre el fruto de Neem evitando la degradación de la molécula, además, permite que la energía térmica del sol se acumule dentro del prototipo, provocando el gradiente de energía necesario para que ocurra el secado (McCabe et al., 2007).

Respecto del análisis granulométrico de la sección 3.2, el tamaño de partícula recomendado por Awolu, (2013) para la extracción de componentes activos presentes en especies vegetales es de 0.425 mm a 0.710 mm. Debido al no cumplimiento de este requisito la muestra A con mayor diámetro de partícula (1.77 mm) presentó resultados desfavorables para la detección de azadiractina en los

espectros UV-Vis, en contraste con los espectros de la muestra B con un diámetro de partícula de 1.5 mm cercano al recomendado (ver Ilustración 3.9). Esto se puede explicar en los fenómenos de transferencia de materia para extracciones sólido-líquido, donde el área de contacto entre los dos materiales juega un rol preponderante en la extracción de analitos. Precisamente el área de contacto se incrementa cuando los sólidos se encuentran en un estado de pulverización y esto permite mayor transferencia de materia (Welty & Wicks, 2008).

### 3.4 Tratamiento estadístico

#### 3.4.1 Pruebas de supuestos

Para cumplir con el supuesto de independencia de errores se realizó una prueba de Durbin Watson, en la cual se comparó su estadístico frente a los límites inferior (DL) y superior (Du) de la tabla Savin y White (ver Apéndice C.6). El resultado obtenido por SPSS® indica que  $2.674 > 1.4107$  (Du), determinándose que no hay autocorrelación de errores, es decir, los errores en las observaciones adyacentes aleatorias sobre la “detección de azadiractina” no están correlacionados. La “detección de azadiractina” no depende de la observación de la muestra precedente.

Para cumplir con el supuesto de no colinealidad entre las variables independientes o predictoras se hallaron sus estadísticos de tolerancia y el factor de inflación de la varianza FIV. Los resultados de la Tabla 3.4 indican que no hay asociación entre las variables “humedad de la muestra” y “métodos de extracción”, ya que los FIV que miden el aumento de la varianza de los coeficientes de regresión toman el valor de 1 en ambas variables, afirmando que no hay incremento significativo de su varianza.

**Tabla 3.4 Estadísticas de colinealidad**

Modelo	Tolerancia	FIV
Métodos de extracción de aza	1.000	1.000
Humedad de la muestra	1.000	1.000

a. Variable dependiente: Presencia de azadiractina en la muestra

### 3.4.2 Regresión Logística Binaria

Para el modelo de regresión logística se recalca que la codificación asignada por el usuario para la categorización de la variable dependiente fue: 1 en la muestra *se detecta azadiractina* y 0 *no se detecta azadiractina*. Posteriormente, la Tabla 3.5 indica la recodificación establecida por el software para la variable independiente “métodos de extracción de aza” que tiene 4 categorías que se introducen en el modelo mediante las variables: Métodos de extracción de aza (1), Métodos de extracción de aza (2) y Métodos de extracción de aza (3), asignando como categoría de referencia a “maceración R1:20g / 200mL” (ver sección 2.6.1.1). Así, para la posterior interpretación de los resultados se considera lo siguiente teniendo presente la codificación del valor 1:

- “métodos de extracción de aza (1)” indica los resultados de comparar las categorías 2 (Sonicación 20 min), 3 (Sonicación 30 min) y referencia (maceración R1:20g / 200mL) versus la categoría 1 (Maceración R2: 30g / 200mL)
- “métodos de extracción de aza (2)” indica los resultados de comparar las categorías 2, 3 y referencia versus la categoría 2
- “métodos de extracción de aza (3)” indica los resultados de comparar las categorías 1, 2 y referencia versus la categoría 3.

**Tabla 3.5 Codificaciones de variables categóricas independientes**

Categorías	Frecuencia	Codificación de Variables: Métodos de extracción de aza		
		(1)	(2)	(3)
Referencia: Maceración R1:20g/200mL	6	0.000	0.000	0.000
1) Maceración R2: 30g/200mL	6	1.000	0.000	0.000
2) Sonicación 20 min	6	0.000	1.000	0.000
3) Sonicación 30 min	6	0.000	0.000	1.000

Para verificar que el modelo se ajuste a los datos, se determinó una medida de bondad de ajuste mediante una prueba de Hosmer-Lemeshow con la finalidad de conocer posibles desviaciones que no expliquen lo observado, para esta prueba se estableció un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  y como hipótesis nula ( $H_0$ ) que el

modelo de regresión logístico binario no se ajusta al conjunto de datos. Con la evidencia estadística presentada en la Tabla 3.6 se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, el modelo de regresión logístico se ajusta al conjunto de datos, dado que, el valor p calculado  $0.930 > 0.05$ . Por tanto, la variable dependiente “Detección de la presencia de azadiractina” está explicada por al menos una variable independiente del modelo. Se utilizó esta prueba ya que este este indicador es más fiable para conocer cómo se ajustan los datos al modelo, en casos de tener un número de ensayos insuficientes.

**Tabla 3.6 Prueba de Hosmer y Lemeshow**

Paso	Chi-cuadrado	gl	Valor p
1	,144	2	,930

La varianza de la variable de respuesta “Detección de la presencia de azadiractina” asociada a las variables independientes (“métodos de extracción” y “humedad de la muestra”) puede ser estimada de la Tabla 3.7 mediante los valores de  $R^2$ . La existencia de dos medidas de  $R^2$  (Cox-Snell y Nagelkerke) es debido a que se está trabajando con una variable dependiente categórica y no es posible calcular un único estadístico. Aunque ambos valores de  $R^2$  son válidos, el valor obtenido por Nagelkerke es la medida usualmente preferida por ser una versión ajustada del Cox y Snell lo que resulta en medidas superiores. Por tanto, seleccionando un valor de 0.286 el modelo propuesto explica el 28.6% de la desviación de la variable de respuesta, con un poder predictivo aceptable (Martinez, 2020).

**Tabla 3.7 Resumen del modelo**

Paso	Logaritmo de la verosimilitud -2	R cuadrado de Cox y Snell	R cuadrado de Nagelkerke
1	23,596 <sup>a</sup>	0.201	0.286

a. La estimación ha terminado en el número de iteración 4 porque las estimaciones de parámetro han cambiado en menos de ,001.

El resultado del porcentaje global de los casos que el modelo predijo de forma correcta se presenta en la Tabla 3.8, determinándose que para un total de 24 muestras analizadas por UV-Vis el modelo acierta el 79.2% de los casos (20 muestras). Esta predicción permite aceptar el modelo propuesto e inferir que las variables independientes estudiadas (“métodos de extracción” y “humedad de la muestra”) son buenas predictoras del modelo, ya que, más del 50% de los casos

ha sido clasificado correctamente (Camarero Rioja, Almazán Llorente, & Mañas Ramírez, 2018). Además, para una valoración predictiva del modelo se encontró una sensibilidad (capacidad del modelo para no equivocarse) del 88.2% por el recuento de los casos en los que se detectó presencia de azadiractina y una especificidad (capacidad para discriminar casos) del 57.1% de los casos en los que no se detectó presencia de azadiractina. Este hallazgo, también permite identificar que la estrategia planteada en la sección 3.3, Diagrama 3.1 para la discriminación de espectros y obtención de los datos ingresados en el software es correcta, ya que, en caso de que se hubiera obtenido un valor inferior al 50%, la clasificación de los casos hubiera sido deficiente lo que llevaría a nuevas experimentaciones incluyendo nuevas variables independientes que permitan explicar el modelo de mejor forma.

**Tabla 3.8 Tabla de clasificación<sup>a</sup>**

	Observado	Pronosticado		Porcentaje correcto
		Presencia de azadiractina en la muestra		
		No se detecta AZA	Detecta AZA	
Paso 1	Presencia de azadiractina en la muestra	4	3	57,1
	No se detecta AZA			
	Detecta AZA	2	15	88,2
	Porcentaje global			79,2

a. El valor de corte es ,500

Los resultados claves (coeficiente  $\beta_k$ ,  $\text{Exp}(\beta_k)$ , valor p) para un análisis explicativo del modelo matemático de regresión logística binaria de la sección 1.4.7 y ajuste del modelo de la ecuación 1.3 se muestran en la Tabla 3.9. Para la interpretación de estos resultados se estableció un nivel de significancia 0.10 y como  $H_0$  que la asociación entre la variable dependiente y la variable independiente no es estadísticamente significativa. Puesto que, para las tres categorías seleccionadas (maceración R<sub>2</sub>: 30g / 200mL, sonicación 20 min o sonicación 30 min) el valor p  $0.098 < 0.1$  se rechaza  $H_0$ , ya que, existe evidencia estadística que la relación entre la variable independiente “*métodos de extracción*” y la variable dependiente “*detección de la presencia de azadiractina*” es estadísticamente significativa. De la misma forma, se analiza la variable “*humedad de la muestra*” para el modelo

planteado, encontrándose que esta no es estadísticamente significativa, ya que, su valor p (0.612) es mayor a 0.1 infiriéndose que la humedad de la muestra no permite explicar el modelo de regresión logística obtenido.

**Tabla 3.9 Variables en la ecuación**

		$\beta_k$	Error estándar	Valor p	Exp ( $\beta_k$ )
Paso 1 <sup>a</sup>	Humedad de la muestra	0.528	1.039	0.612	1.695
	Métodos de extracción de aza (1)	2.337	1.411	0.098	10.354
	Métodos de extracción de aza (2)	2.337	1.411	0.098	10.354
	Métodos de extracción de aza (3)	2.337	1.411	0.098	10.354
	Constante	-0.969	1.040	0.352	0.380

a. Variables especificadas en el paso 1: Humedad de la muestra, Métodos de extracción de aza.

El uso de un intervalo de confianza del 90% y un valor de error de 0.1 se eligió basándose en que se prefiere el conocimiento de la relación de las variables bajo el riesgo de cometer un error tipo II, es decir, no rechazar la hipótesis nula a pesar de que esta es falsa. Además, uno de los supuestos de la regresión establece que el número de objetos observados debe ser significativo indicando que un tamaño de muestra más grande hace que el modelo sea más confiable (Navarro-Fierro, 1988). Cuando se utilizó un nivel de significancia estrecho como lo es 0.05, la precisión del modelo fue inexacta, ya que, el software al no tener datos de entrada suficientes para la creación de patrones no permitió inferir acerca de los resultados obtenidos. Sin embargo, al ampliar esta significancia a 0.1 fue posible la interpretación de los resultados.

Posteriormente, identificada la variable poliatómica “*métodos de extracción*” como variable explicativa del modelo; se analiza el valor de Exp ( $\beta_k$ ) que se encuentra asociado a cada categoría de la variable y cuantifica el riesgo de detectar o no azadiractina en la muestra de estudio. En las tres categorías: maceración R<sub>2</sub>: 30g/200mL, sonicación 20 min o sonicación 30 min de la variable “*métodos de extracción*” este valor es 10.354 y mayor a 1, inclinando la probabilidad de ocurrencia hacia el valor interno 1 (Si se detecta la presencia de azadiractina) de la variable dependiente, es decir, que la probabilidad de respuesta a detectar azadiractina en la muestra, es mucho mayor cuando se usa al menos uno de estos métodos de extracción en lugar del método de maceración R<sub>1</sub>: 20g / 200mL definido como categoría de referencia.

Para confirmar esta aseveración, mediante la Tabla 3.10 se muestran los resultados de la regresión logística para los valores pronosticados del modelo. Cuantitativamente se reveló que, de un total de 24 muestras solo aquellas que fueron extraídas por los métodos de maceración (relación 30g: 200mL) y sonicación a distintos tiempos (20 y 30 minutos) tienen una probabilidad pronosticada mayor al 50% de detectar azadiractina que las muestras extraídas por maceración a relación 20g/200mL. Así, de acuerdo con los valores pronosticados de probabilidad, 18 casos fueron asignados por el software SPSS dentro del grupo de las muestras que detectan la presencia de azadiractina (evento positivo de la variable dependiente).

**Tabla 3.10 Resultados de valores pronosticados**

Muestra	%w	Método de extracción	Probabilidad Pronosticada	Grupo Pronosticado
A11	30.10	Maceración R1:20g/200mL	0.2751	No se detecta AZA
A21	30.10	Maceración R1:20g/200mL	0.2751	No se detecta AZA
A31	30.10	Maceración R1:20g/200mL	0.2751	No se detecta AZA
B11	32.04	Maceración R1:20g/200mL	0.3915	No se detecta AZA
B21	32.04	Maceración R1:20g/200mL	0.3915	No se detecta AZA
B31	32.04	Maceración R1:20g/200mL	0.3915	No se detecta AZA
A12	30.10	Maceración R2: 30g/200mL	0.7972	Detecta AZA
A22	30.10	Maceración R2: 30g/200mL	0.7972	Detecta AZA
A32	30.10	Maceración R2: 30g/200mL	0.7972	Detecta AZA
B12	32.04	Maceración R2: 30g/200mL	0.8695	Detecta AZA
B22	32.04	Maceración R2: 30g/200mL	0.8695	Detecta AZA
B32	32.04	Maceración R2: 30g/200mL	0.8695	Detecta AZA
A13	30.10	Sonicación 20 min	0.7972	Detecta AZA
A23	30.10	Sonicación 20 min	0.7972	Detecta AZA
A33	30.10	Sonicación 20 min	0.7972	Detecta AZA
B13	32.04	Sonicación 20 min	0.8695	Detecta AZA
B23	32.04	Sonicación 20 min	0.8695	Detecta AZA
B33	32.04	Sonicación 20 min	0.8695	Detecta AZA
A14	30.10	Sonicación 30 min	0.7972	Detecta AZA
A24	30.10	Sonicación 30 min	0.7972	Detecta AZA
A34	30.10	Sonicación 30 min	0.7972	Detecta AZA
B14	32.04	Sonicación 30 min	0.8695	Detecta AZA
B24	32.04	Sonicación 30 min	0.8695	Detecta AZA
B34	32.04	Sonicación 30 min	0.8695	Detecta AZA

La variable independiente “*contenido de humedad*” resultó ser no significativa para explicar el modelo, sin embargo, las muestras secadas en un prototipo permiten pronosticar un 87% de probabilidad a detectar azadiractina en contraste con las muestras secadas al aire libre. Una explicación para tal suceso se debe a que se comete un error de tipo II obteniéndose un resultado falso positivo donde no se rechazó  $H_0$  para la variable humedad a pesar de que se observa una relación indirecta con los métodos de extracción que permiten explicar el modelo logístico.

Finalmente, la función logística definida mediante la ecuación 1.3, permite calcular directamente la probabilidad pronosticada de detección de azadiractina para muestras con porcentaje de humedad igual al 30.10%. Cabe recalcar que, debido al nivel de significancia empleado para el ajuste del modelo, la probabilidad se encuentra solo en función de los coeficientes de la variable independiente “*métodos de extracción*” (ver Apéndice C.7).

$$p = \frac{1}{1 + e^{-Y}} = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3)}} \quad (1.3)$$

**Donde:**

$X_1$ : Maceración  $R_2$ : 30g/200mL

$X_2$ : Sonicación durante un tiempo de 20 min

$X_3$ : Sonicación durante un tiempo de 30 min

$\beta_0$ : Constante del modelo de regresión logística igual a -0.969

$\beta_1$ : Coeficientes estimado para  $X_1$  igual a 2.337

$\beta_2$ : Coeficientes estimado para  $X_2$  igual a 2.337

$\beta_3$ : Coeficientes estimado para  $X_3$  igual a 2.337

# CAPÍTULO 4

## 4. Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

Con la finalidad de disminuir el impacto ambiental causado por el uso de agroquímicos en el sector agrícola, se ejecutaron distintos procesos de aislamiento de azadiractina (materia prima para biopesticidas) proveniente de la especie *Azadirachta indica* A. Juss. Luego del desarrollo de las etapas experimentales, resultados y análisis, se concluye que:

- Se implementaron dos estrategias de secado para los frutos de Neem: secado al aire libre y en prototipo de secador solar. Se propone utilizar la segunda estrategia (secador solar) para obtener muestras con menor diámetro de partícula (1.502 mm) y favorecer la extracción del componente activo. Con esta estrategia se detecta efectivamente la presencia del componente activo azadiractina en los espectros UV-Vis.
- Los extractos acuosos y alcohólicos analizados cualitativamente por espectrofotometría UV - Visible, permitieron detectar presencia de azadiractina en el fruto de Neem. Así, de un total de 24 muestras de extractos acuosos, 17 presentaron curvas espectrales que detectan el componente activo a una longitud de onda de 211nm. De estos 17, los mejores espectros pertenecen a los extractos obtenidos por sonicación a un tiempo de 20 minutos y por maceración a una relación masa/solvente de 30g / 200mL.
- La aplicación de un modelo de regresión logística binaria validó que la presencia de azadiractina en las muestras depende de los métodos de extracción utilizados. Además, este modelo predice la detección del componente activo azadiractina con una probabilidad del 87% para muestras secadas en un prototipo y extraídas mediante los procesos de maceración (30g/200mL) y sonicación (20 min y 30 min).

## 4.2 Recomendaciones

- Realizar estudios cuantitativos para determinar la cantidad de azadiractina que se puede obtener desde los frutos de Neem de la localidad en estudio, considerando las técnicas de secado (secador solar), tritución y extracción (sonicación durante 20 minutos) recomendadas en esta investigación.
- Realizar estudios sobre los efectos de los extractos acuosos de Neem en los microorganismos presentes en suelos y cultivos de la localidad para determinar las dosis adecuadas que deben aplicar los agricultores en sus cosechas (Sarawaneeyaruk, Krajangsang, & Pringsulaka, 2015).
- Realizar estudios de estabilidad a los extractos acuosos de azadiractina para determinar la forma eficiente de conservarlos. Además, investigar estrategias de encapsulamiento de la molécula azadiractina para evitar su degradación y consecuente pérdida de propiedades pesticidas (J. Kumar et al., 2010).
- Cada etapa de la investigación es susceptible de mejoras, por lo que, para el tratamiento de la materia prima (previo a la extracción) se recomienda seleccionar frutos de Neem maduros, ya que estos desarrollan mayor concentración de azadiractina (H.S.Puri, 2006). Además, para mejorar el proceso de extracción se sugiere incluir en el diseño de la investigación una etapa de purificación de los extractos acuosos, para eliminar interferencias químicas que afecten los resultados de la cuantificación, estabilidad y encapsulamiento de las moléculas de azadiractina.
- Los resultados de este proyecto sumado a las sugerencias previas permiten un amplio desarrollo investigativo sobre el aprovechamiento de la especie *Azadirachta indica* A. Juss y sus propiedades pesticidas, por lo que se recomienda avanzar hacia el desarrollo de un producto biopesticida que sea seguro para el medio ambiente.

# BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, H., Kaul, N., Paradkar, A. R., & Mahadik, K. R. (2005). Standardization of crude extract of neem seed kernels (*Azadirachta indica* A. Juss) and commercial neem based formulations using HPTLC and extended length packed-columns SFC method. *Chromatographia*, 62(3-4), 183-195. doi: 10.1365/s10337-005-0588-6
- Awasthi, R., & Shikha, D. (2019). Solvent Extraction of Neem Oil from Neem Seed for Development of Ecofriendly Pesticides. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, 3(3), 119-122. doi: 10.31142/ijtsrd21684
- Awolu, O. (2013). Optimization of Solvent Extraction of Oil from Neem (*Azadirachta indica*) and Its Characterizations. *Journal of Scientific Research and Reports*, 2(1), 304-314. doi: 10.9734/jsrr/2013/3705
- Azwanida. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03), 3-8. doi: 10.4172/2167-0412.1000196
- Banchero, L., Carballo, S., & Telesca, J. (2007). *Manual de secados solar de especies medicinales y aromáticas para predios familiares*. Montevideo - Uruguay: INIA.
- Berlanga, V. (2014). Cómo obtener un Modelo de Regresión Logística Binaria con SPSS. *REIRE. Revista d'Innovació i Recerca en Educació*, 7(8(2)), 105-118. doi: 10.1344/reire2014.7.2727
- Boursier, C. M., Bosco, D., Coulibaly, A., & Negre, M. (2011). Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A? *Crop Protection*, 30(3), 318-322. doi: 10.1016/j.cropro.2010.11.022
- Breilh, J. (2007). Nuevo modelo de acumulación y agroindustria: las implicaciones ecológicas y epidemiológicas de la floricultura en Ecuador \* New model of accumulation and agro-business: the ecological and epidemiological implications of the Ecuadorian cut flower product. *Ciência & Saúde Coletiva*, 12(1), 91-104.
- Camarero Rioja, L., Almazán Llorente, A., & Mañas Ramírez, B. (2018). Regresión Logística: Fundamentos y aplicación a la investigación sociológica Análisis Multivariante. *Uned*, 1-61. Recuperado de [http://www2.uned.es/socioestadistica/Multivariante/Odd\\_Ratio\\_LogitV2.pdf](http://www2.uned.es/socioestadistica/Multivariante/Odd_Ratio_LogitV2.pdf)
- Chirinos, D. T., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Bravo, S. P., Solis, L., & Geraud-Pouey, F. (2020). Insecticides and agricultural pest control: The magnitude of its use in crops

- in some provinces of Ecuador. *Ciencia Tecnología Agropecuaria*, 21(1). doi: 10.21930/RCTA.VOL21\_NUM1\_ART1276
- Collins, L. M., Dziak, J. J., & Li, R. (2009). Design of Experiments With Multiple Independent Variables: A Resource Management Perspective on Complete and Reduced Factorial Designs. *Psychological Methods*, 14(3), 202-224. doi: 10.1037/a0015826
- Council, N. R. (1992). *Neem: A Tree For Solving Global Problems*. Washington, D.C: National Academy Press.
- Dávila Nava, J. R. (2004). Capítulo 4: Procesos de secado. *Estudio experimental del efecto de la porosidad de partículas sobre el proceso de secado en un lecho fluidizado a vacío empleando aire*, 51-73. Recuperado de [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lim/davila\\_n\\_jr/capitulo4.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lim/davila_n_jr/capitulo4.pdf)
- De Paula, J. A. M., Brito, L. F., Caetano, K. L. F. N., De Moraes Rodrigues, M. C., Borges, L. L., & Da Conceição, E. C. (2016). Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method. *Talanta*, 149, 77-84. doi: 10.1016/j.talanta.2015.11.005
- Esteban, D. (2020). *Cambio climático , biodiversidad y sistemas agroalimentarios*. Quito. Recuperado de [https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18745/1/Cambio climático biodiversidad y sistemas agroalimentarios.pdf](https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18745/1/Cambio%20climatico%20biodiversidad%20y%20sistemas%20agroalimentarios.pdf)
- Farjaminezhad, R., & Garoosi, G. ali. (2020). Establishment of green analytical method for ultrasound-assisted extraction of azadirachtin, mevalonic acid and squalene from cell suspension culture of *Azadirachta indica* using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 144(November 2019), 111946. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.111946
- Fernandes, A. A. T., Filho, D. B. F., da Rocha, E. C., & da Silva Nascimento, W. (2020). Read this paper if you want to learn logistic regression. *Revista de Sociologia e Política*, 28(74), 1/1-19/19. doi: 10.1590/1678-987320287406EN
- Fernandes, S. R., Barreiros, L., Oliveira, R. F., Cruz, A., Prudêncio, C., Oliveira, A. I., ... Morgado, J. (2019). Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State-of-the-art. *Fitoterapia*, 134(January), 141-150. doi: 10.1016/j.fitote.2019.02.006
- Guerra Triviño, O. (2019). *Propuesta para la creación de una empresa desarrolladora y*

comercializadora de un insecticida ecológico a base de la hoja de Neem para uso doméstico en la ciudad de Guayaquil. Universidad Católica Santiago de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.

- Gupta, A., Naraniwal, M., & Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International journal of applied and natural sciences*, 1(1), 8-26.
- Guzmán-Plazola, P., Guevara-Gutiérrez, R. D., Olguín-López, J. L., & Mancilla-Villa, O. R. (2016). Perspectiva campesina, intoxicaciones por plaguicidas y uso de agroquímicos. *Idesia*, 34(3), 69-80. doi: 10.4067/S0718-34292016000300009
- H.S.Puri. (2006). *NEEM: The Divine Tree Azadirachta indica*. Singapore: Harwood academic publishers.
- Hidalgo, M. C., Wilder, D. R., & Hilario, D. (2016). Implementación de La Tecnología Semi-Industrial para la Obtención de Bioplaguicidas a partir del Árbol del Nim y su evaluación. *Universidad&Ciencia*, 5(2), 200-212.
- INEC. (2014). Uso y manejo de agroquimicos en la agricultura. Recuperado de <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Presentaciones/Plaguicidas.pdf>
- Kumar, J., Shakil, N. A., Singh, M. K., Singh, M. K., Pandey, A., & Pandey, R. P. (2010). Development of controlled release formulations of azadirachtin-A employing poly(ethylene glycol) based amphiphilic copolymers. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 45(4), 310-314. doi: 10.1080/03601231003704457
- Kumar, V. S., & Navaratnam, V. (2013). Neem (*Azadirachta indica*): Prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(7), 505-514. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60105-7
- Manzano, P., García, O. B., Malusín, J., Villamar, J., Quijano, M., Viteri, R., ... Orellana-Manzano, A. (2020). Larvicidal activity of ethanolic extract of *azadirachta indica* against *aedes aegypti* larvae. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 73(3), 9315-9320. doi: 10.15446/rfnam.v73n3.80501
- Martinez, S. (2020). Regresión Logística Binaria: Respuesta binaria. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., p. 6.
- McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriott, P. (2007). *Operaciones unitarias de ingeniería química* (7.<sup>a</sup> ed.). Mc Graw Hill.

- Montgomery, D. C., & Wiley, J. (2013). *Design and Analysis of Experiments Eighth Edition*. Recuperado de [www.wiley.com/go/permissions](http://www.wiley.com/go/permissions).
- Moral, I. (2016). Modelos de regresión lineal simple y regresión logística. En *Seden* (pp. 195-214). Recuperado de [https://www.revistaseden.org/files/14-cap 14.pdf](https://www.revistaseden.org/files/14-cap%2014.pdf)
- Mordue, A. J., Morgan, E. D., & Nisbet, A. J. (2005). Azadirachtin, a Natural Product in Insect Control. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 6-6, 117-135. doi: 10.1016/B0-44-451924-6/00077-6
- Mordue, A. Jenifer, & Nisbet, A. J. (2000). Azadiractina del árbol de neem *Azadirachta indica*: su acción contra los insectos. En *Departamento de Zoología de la Universidad de Aberdeen*. Recuperado de <http://www.agrogamacolombia.com.co/wp-content/uploads/2014/07/Azadiractina-del-árbol-de-Neem.pdf>
- Morgan, E. D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(12), 4096-4105. doi: 10.1016/j.bmc.2008.11.081
- MTOP. (2018). ESTUDIO DE IMPACTO AMBIENTAL (EIA) EXPOST Construcción de la carretera Playas-El Morro-Posorja incluyendo la construcción de puentes.
- Navarro-Fierro, R. (1988). *Introducción a la Bioestadística Análisis de Variables Binarias*. OMS, & FAO. (2014). *Código Internacional de Conducta para la Gestión de Plaguicidas*. doi: 13604S/1/12.14
- ONU. (2015). *Metas de los objetivos de desarrollo sostenible*. Recuperado de <http://www.onu.org.mx/publicaciones/metas-de-los-ods/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2015). *Ecuador en una mirada*. Recuperado de <http://www.fao.org/ecuador/fao-en-ecuador/ecuador-en-una-mirada/es/>
- Oyelese, O. J., Olawore, N. O., & Ololade, Z. S. (2020). Comparative Study of the Phytochemical and Bio-activities of the Essential Oils from Ripe and Unripe Seeds of *Azadirachta indica*. *The Journal of Medical Research*, 6(5), 219-224. doi: 10.31254/jmr.2020.6510
- Pais, M. S., Peretta, I. S., Yamanaka, K., & Pinto, E. R. (2014). Factorial design analysis applied to the performance of parallel evolutionary algorithms. *Journal of the Brazilian Computer Society*, 20(1), 1-17. doi: 10.1186/1678-4804-20-6
- Paragas, D. S., Fiegalan, E. R., & Cruz, K. D. (2018). Assessment of green solvents and extraction methods for biopesticide preparation from neem *Azadirachta indica* leaves

- against Oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Preprints*, 1(1), 1-12. doi: 10.20944/preprints201805.0179.v1
- Rivadeneira, C. R. E. (2017). *Impregnación de Aceite de Neem (Azadirachta Indica) en Soporte Textil para Combatir la Mosca de la Fruta Anastrepha Striata*. ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL, Quito, Ecuador.
- Rutberg, S., & Bouikidis, C. D. (2018). Focusing on the Fundamentals: A Simplistic Differentiation Between Qualitative and Quantitative Research. *Nephrology nursing journal : journal of the American Nephrology Nurses' Association*, 45(2), 209-212.
- Sala, G., Maspotch, S., Iturriaga, H., Blanco, M., & Cerda, V. (1988). Simultaneous multiwavelength spectrophotometric quantitation of active components in analgesic formulations. Comparative study of three calculation methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 6(6-8), 765-772. doi: 10.1016/0731-7085(88)80089-X
- Sarawaneeyaruk, S., Krajangsang, S., & Pringsulaka, O. (2015). The effects of neem extract and azadirachtin on soil microorganisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(4), 1071-1083. doi: 10.4067/S0718-95162015005000075
- Saxena, M., Ravikanth, K., Kumar, A., Gupta, A., Singh, B., & Sharma, A. (2010). Purification of azadirachta indica seed cake and its impact on nutritional and antinutritional factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4939-4944. doi: 10.1021/jf904336k
- Sharma, D., Kaur, P., Singh, G., Singh, D., Verma, S., & Singh, J. (2019). Development and Validation of Stability Indicating UV-Visible Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Neem (Azadirachtin) and Curcumin in Pharmaceutical Tablet Dosage Form. *Analytical Chemistry Letters*, 9(4), 564-581. doi: 10.1080/22297928.2019.1652113
- Sidhu, O. P., Kumar, V., & Behl, H. M. (2003). Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 910-915. doi: 10.1021/jf025994m
- Simeon, J. (2017). Análisis de tamaño de partículas por tamizado en agregado fino y grueso y Determinación de material más fino que el tamiz no. 200 (75 um) en agregado mineral por lavado. En *UNIVERSIDAD CENTROAMERICANA* (Vol. 1). San Salvador, El Salvador. Recuperado de file:///C:/Users/alum.fial8/Desktop/shi/GRANULOMETRIA.pdf

- Subramanian, S., Salleh, A. S., Bachmann, R. T., & Hossain, S. (2019). Simultaneous Extraction and Separation of Oil and Azadirachtin from Seeds and Leaves of *Azadirachta indica* using Binary Solvent Extraction. *Natural Product Sciences*, 25(2), 150-156. doi: 10.20307/nps.2019.25.2.150
- Welty, J., & Wicks, C. (2008). *Fundamentals of Momentum, Heat, and Mass Transfer* (5.<sup>a</sup> ed.).
- Zulueta, M. A. P., León, J. A. H., & Mendoza, G. P. (2016). *Desarrollo Local De Las Comunidades Agrícolas Rurales*. Samborondón - Ecuador. Recuperado de <https://www.ecotec.edu.ec/content/uploads/investigacion/libros/Desarrollo-comunidades-agricolas-rurales.pdf#page=24>

# APÉNDICE

## APÉNDICE A

### Ecuaciones para granulometría

$P_T$  = Peso inicial de la muestra para tamizado

$i$  = Numero de tamiz

$P_i$  = Peso de la muestra retenido en el tamiz  $i$

$\%R_i$  = Porcentaje total retenido en el tamiz  $i$

$\%Ra_i$  = Porcentaje retenido acumulado en el tamiz  $i$

$\%Pasante_i$  = Porcentaje pasante acumulado en el tamiz  $i$

$$P_i \text{ corregido} = \frac{P_T}{\sum P_i} \times P_i$$

$$\%R_i = \frac{P_i \text{ corregido}}{\sum P_i \text{ corregido}} \times 100$$

$$\%Ra_i = \%R_i + \%Ra_{i-1}$$

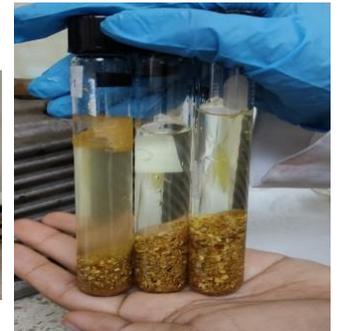
$$\%Pasante_i = 100 - \%Ra_i$$

## APÉNDICE B

### Procedimiento de extracción aislada (extractos alcohólicos)



**Apéndice B.1 Pesaje de la matriz sólida y preparación de la solución con hexano**



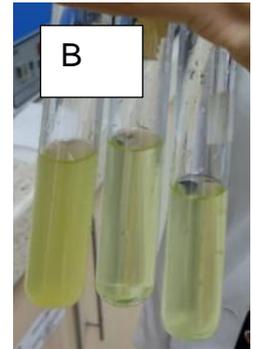
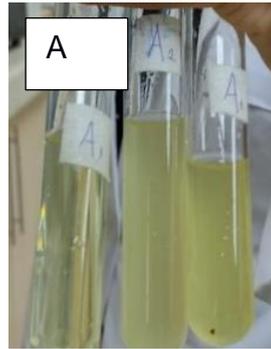
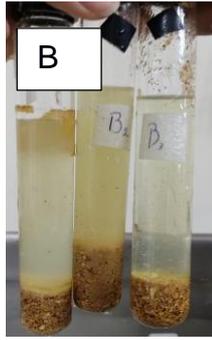
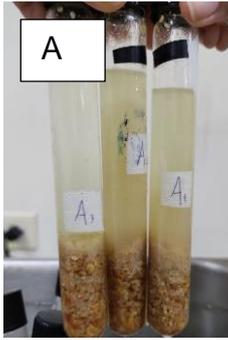
**Apéndice B.2 Primera extracción en equipo sonicador. Muestra A**



**Apéndice B.3 Filtración al vacío para obtención de la torta de Neem**



**Apéndice B.4 Preparación de la solución torta de Neem desgrasada y solvente etanol 99.99%**



**Apéndice B.5 Segunda extracción muestras A y B**

**Apéndice B.6 Filtración al vacío de muestras A y B para obtención de extracto alcohólico de azadiractina**

**Procedimiento para el tratamiento estadísticos de datos en IBM SPSS®**

	Nombre	Tipo	Anchura	Decimales	Etiqueta	Valores
1	Experimentos	Cadena	8	0	Identificador de las muestras	Ninguno
2	W	Numérico	8	0	Humedad de la muestra	{1, WA SOL...
3	AZA	Numérico	7	0	Presencia de azadiractina en la muestra	{0, No se de...
4	E	Numérico	8	0	Metodos de extracción de aza	{1, Macerac...
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						

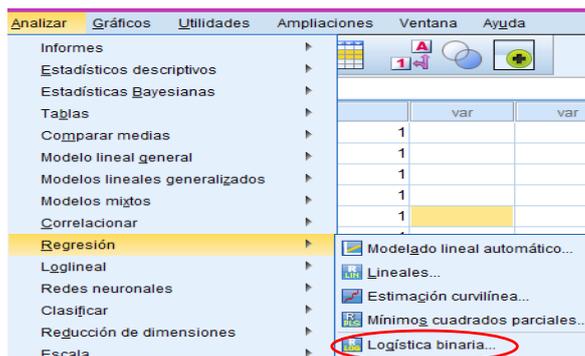
Vista de datos **Vista de variables**

**Apéndice B.7 Ingreso de variables. Obtenido del software IBM SPSS®**

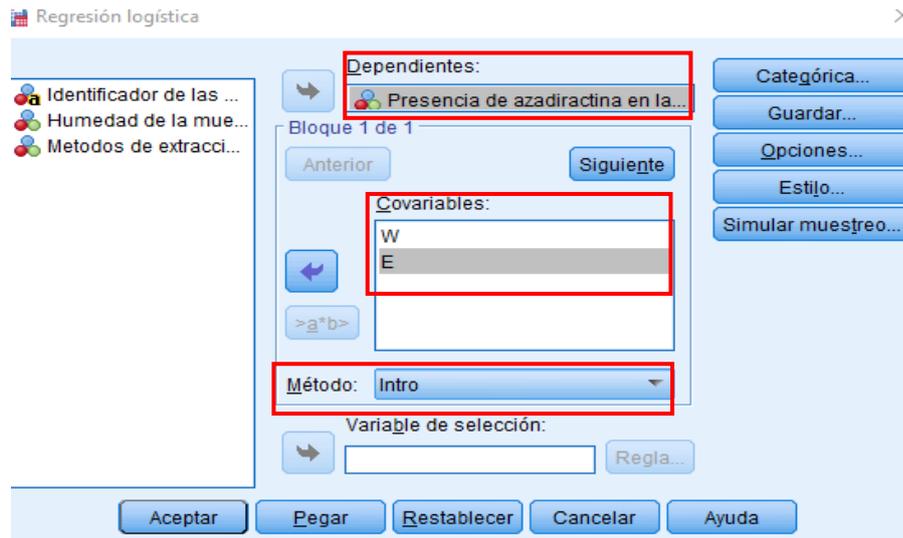
	Experimentos	W	AZA	E
1	A11	0	0	1
2	A21	0	1	1
3	A31	0	0	1
4	B11	1	0	1
5	B21	1	1	1
6	B31	1	0	1
7	A12	0	1	2
8	A22	0	1	2
9	A32	0	1	2
10	B12	1	0	2
11	B22	1	1	2
12	B32	1	1	2
13	A13	0	0	3
14	A23	0	1	3
15	A33	0	1	3
16	B13	1	1	3
17	B23	1	1	3
18	B33	1	1	3
19	A14	0	0	4
20	A24	0	1	4
21	A34	0	1	4
22	B14	1	1	4
23	B24	1	1	4
24	B34	1	1	4

Vista de datos Vista de variables

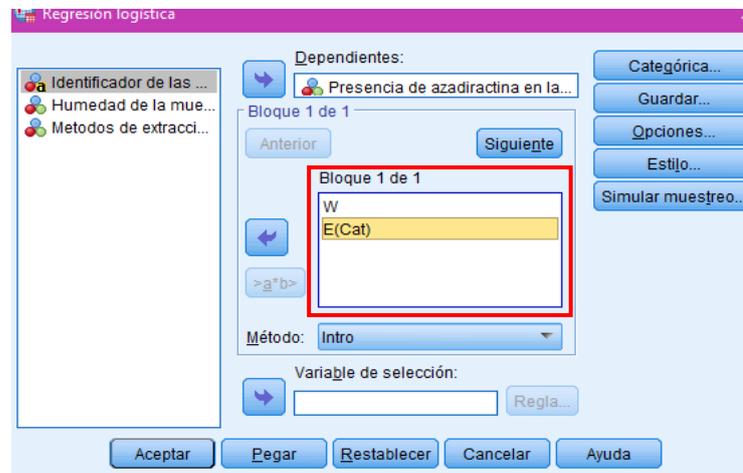
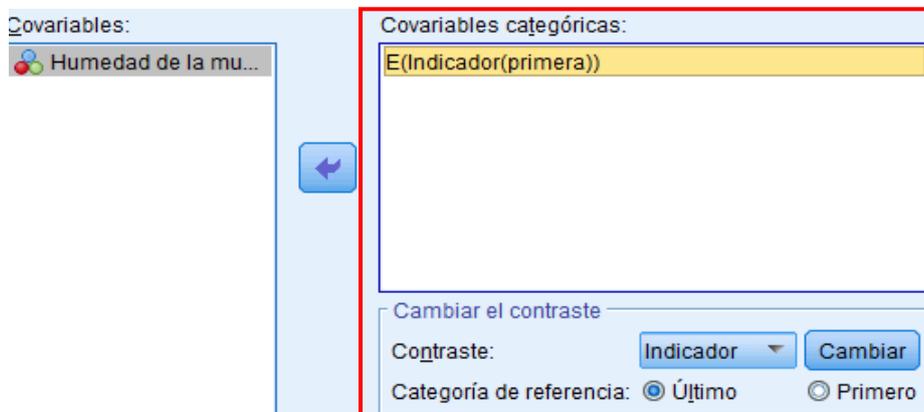
**Apéndice B.8 Ingreso de datos para cada variable. Obtenido del software IBM SPSS®**



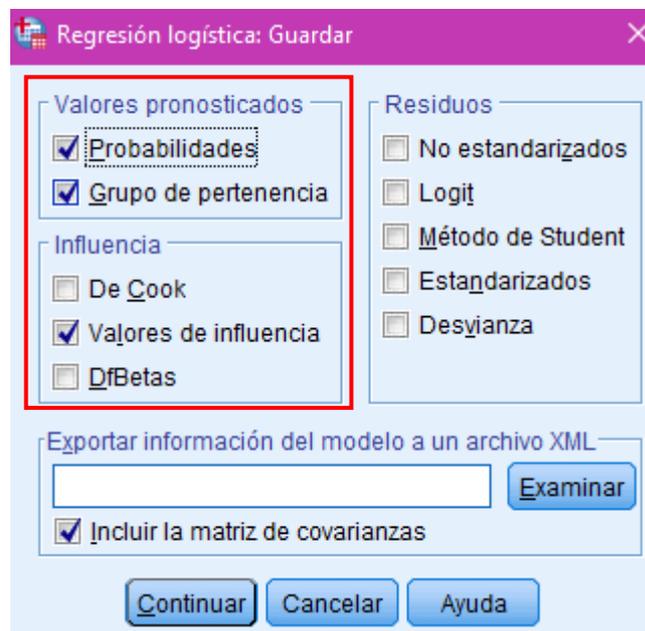
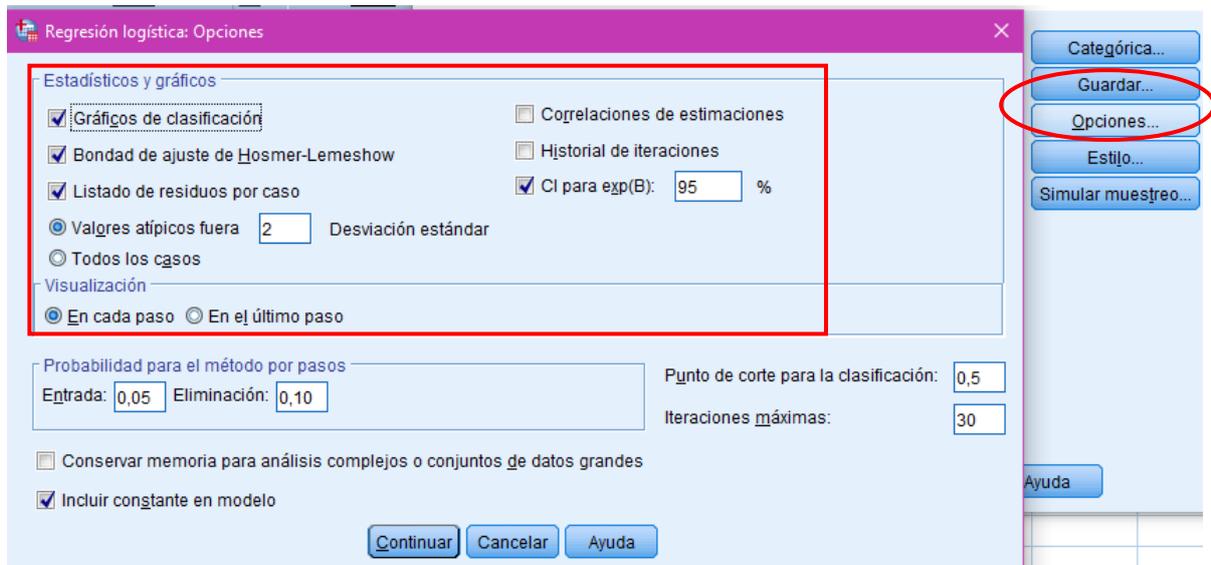
**Apéndice B.9 Ejecución de un análisis de regresión logística en el software IBM SPSS®**



**Apéndice B.10 Ingreso de variables y selección del método.  
Obtenido en IBM SPSS®**



**Apéndice B.11 Recodificación de la variable “Métodos de extracción”. Obtenido en IBM SPSS®**



**Apéndice B.12 Configuración de las pestañas *opciones* y *guardar*. Obtenido en IBM SPSS®**

## APÉNDICE C

### Humedad de las muestras A y B

Apéndice C.1 Datos de humedad de las muestras 1 y 2

Tiempo (días)	Secado al aire libre: Muestra A		Secado en prototipo: Muestra B	
	masa (g)	% Humedad	masa (g)	% Humedad
0	103		103	
1	68	66.02	75	72.82
2	50	48.54	63	61.17
3	41	39.81	52	50.49
4	38	36.89	44	42.72
5	36	34.95	40	38.83
6	35	33.98	38	36.89
7	34	33.01	36	34.95
8	33	32.04	35	33.98
9	33	32.04	35	33.98
10	33	32.04	34	33.01
11	32	31.07	34	33.01
12	32	31.07	34	33.01
13	32	31.07	34	33.01
14	32	31.07	34	33.01
15	32	31.07	34	33.01
16	31	30.1	33	32.04
17	31	30.1	33	32.04
18	31	30.1	33	32.04

## Ensayos granulométricos para muestras A y B.

### Apéndice C.2 Ensayo granulométrico por tamizado para la muestra A

ENSAYO DE LABORATORIO: GRANULOMETRÍA POR TAMIZADO U.S.A. STANDAR TEST SIEVE ASTM E-11						
<b>Fuente:</b>	Fruto de Neem			<b>Muestra:</b>	A	
<b>Fecha de ensayo:</b>	29/6/2021			<b>Localización:</b>	LOPU-ESPOL	
<b>Equipo Tamizador Modelo:</b>	RX-812			<b>Peso inicial (g):</b>	299.500	
Tamiz		Peso retenido Parcial (g)	Peso retenido corregido (g)	%Retenido		% Pasante
No.	Abertura (mm)			Parcial	Acumulado	
10	2.000	28.500	28.519	9.52%	9.52%	90.48%
18	1.000	139.000	139.093	46.44%	55.96%	44.04%
30	0.600	97.800	97.865	32.68%	88.64%	11.36%
60	0.250	33.500	33.522	11.19%	99.83%	0.17%
Fondo		0.500	0.500	0.17%	100.00%	0.00%
Peso total (g)		299.300	299.500	100.00%		
% Error		0.067				
<b>D<sub>80</sub> (mm)</b>		<b>1.774</b>				

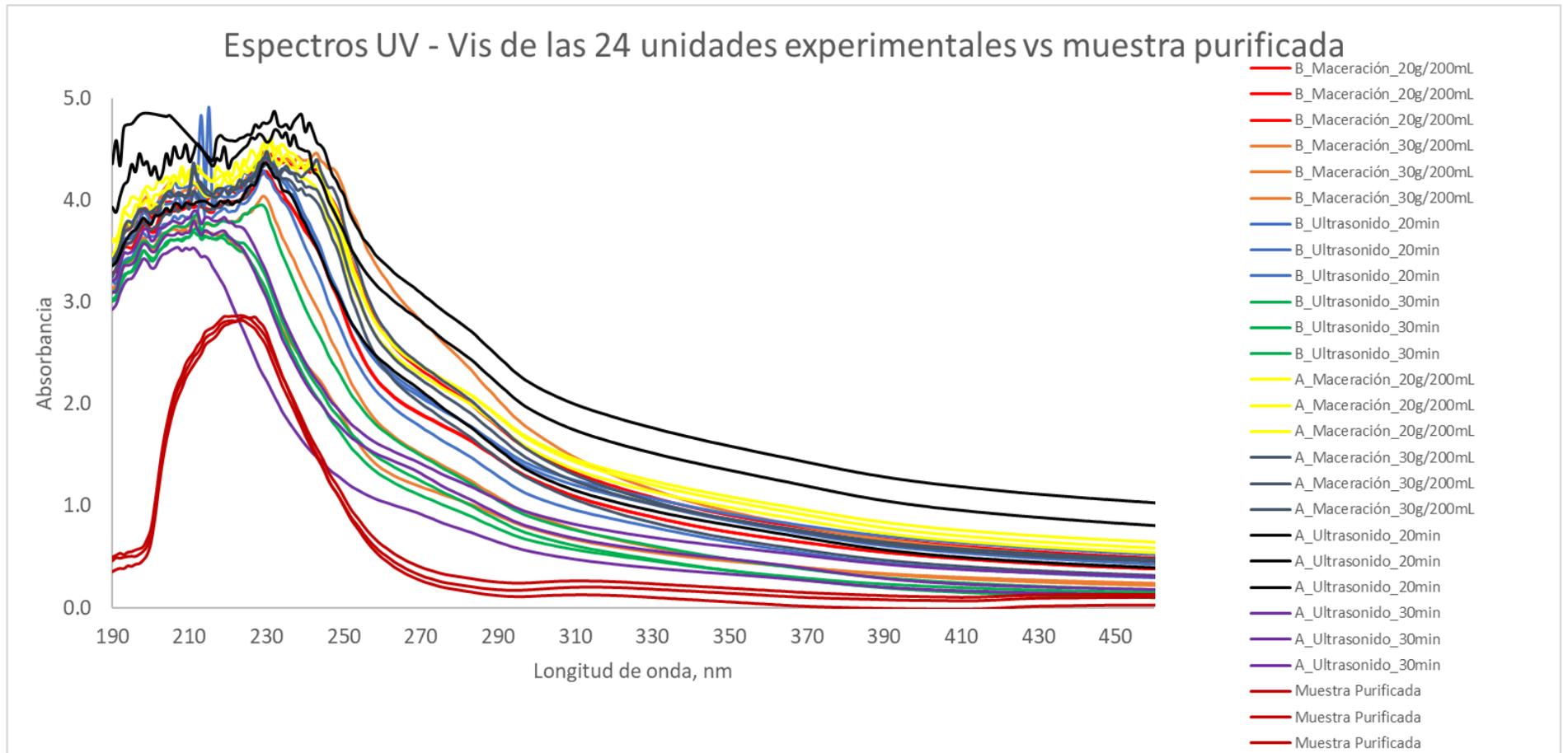
### Apéndice C.3 Ensayo granulométrico por tamizado para la muestra B

ENSAYO DE LABORATORIO: GRANULOMETRÍA POR TAMIZADO U.S.A. STANDAR TEST SIEVE ASTM E-11						
<b>Fuente:</b>	Fruto de Neem			<b>Muestra:</b>	B	
<b>Fecha de ensayo:</b>	29/6/2021			<b>Localización:</b>	LOPU-ESPOL	
<b>Equipo Tamizador Modelo:</b>	RX-812			<b>Peso inicial (g):</b>	299.500	
Tamiz		Peso retenido Parcial (g)	Peso retenido corregido (g)	%Retenido		% Pasante
No.	Abertura (mm)			Parcial	Acumulado	
10	2.000	6.500	6.511	2.17%	2.17%	97.83%
18	1.000	07.000	107.179	35.79%	37.96%	62.04%
30	0.600	92.500	92.655	30.94%	68.90%	31.10%
60	0.250	91.000	91.152	30.43%	99.33%	0.67%
Fondo		2.000	2.003	0.67%	100.00%	0.00%
Peso total (g)		299.000	299.500	100.00%		
% Error		0.167				
<b>D<sub>80</sub> (mm)</b>		<b>1.502</b>				

## Barrido de longitudes de onda (211 y 230 nm) para los 24 experimentos.

**Apéndice C.4 Valores de absorbancia entre 210 y 230 nm para las 24 unidades experimentales**

LONGITUD DE ONDA, nm	MUESTRA B PURIFICADA			MUESTRA A									MUESTRA B																
	ULTRASONIDO			MACERACIÓN						ULTRASONIDO			MACERACIÓN						ULTRASONIDO										
	TIEMPO SONICACIÓN: 20min			RELACIÓN 20g/200mL			RELACIÓN 30g/200mL			TIEMPO SONICACIÓN: 20min			TIEMPO SONICACIÓN: 30min			RELACIÓN 20g/200mL			RELACIÓN 30g/200mL			TIEMPO SONICACIÓN: 20min			TIEMPO SONICACIÓN: 30min				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
211	2.46	2.50	2.38	4.18	4.25	4.30	4.29	4.37	4.09		4.46	3.96	3.53	3.89	3.80	3.95	3.93	4.06	4.08	3.83	3.80	4.06	4.15	3.84	3.71	3.82	3.69		
212	2.50	2.57	2.44	4.15	4.34	4.29	4.21	4.20	4.05		4.56	3.98	3.50	3.89	3.73	3.98	3.94	4.04	4.13	3.78	3.71	4.02	4.17	3.88	3.71	3.85	3.66		
214	2.56	2.62	2.49	4.04	4.23	4.24	4.12	4.07	3.90	4.46	4.45	3.99	3.44	3.77	3.66	3.91	3.93	3.99	3.98	3.77	3.69	4.18	4.83	4.07	3.62	3.69	3.65		
216	2.64	2.70	2.57	4.05	4.19	4.18	4.06	4.04	3.92	4.39	4.33	3.94	3.45	3.83	3.70	3.88	3.91	4.06	3.97	3.75	3.67	3.96	4.07	3.83	3.64	3.77	3.65		
217	2.68	2.73	2.61	4.15	4.33	4.20	4.11	4.03	3.93	4.59	4.41	3.95	3.42	3.83	3.69	3.96	3.97	4.08	4.11	3.76	3.66	4.91			3.63	3.78	3.64		
218	2.69	2.75	2.64	4.13	4.28	4.24	4.12	4.06	3.93	4.64	4.39	3.99	3.34	3.80	3.66	3.93	3.95	4.06	4.11	3.82	3.65	3.92	4.03	3.83	3.62	3.75	3.63		
219	2.73	2.78	2.67	4.22	4.26	4.24	4.11	4.11	3.97	4.60	4.53	3.97	3.28	3.80	3.68	3.99	3.97	4.12	4.11	3.80	3.67	4.02	4.09	3.87	3.61	3.76	3.63		
220	2.78	2.83	2.73	4.16	4.28	4.24	4.08	4.05	3.95	4.59	4.31	4.00	3.22	3.80	3.69	3.96	3.97	4.07	4.10	3.79	3.62	4.04	4.08	3.89	3.63	3.79	3.64		
221	2.81	2.86	2.77	4.17	4.24	4.18	4.13	4.10	3.96	4.58	4.40	3.96	3.15	3.83	3.70	3.97	3.99	4.09	4.11	3.79	3.59	4.03	4.12	3.92	3.62	3.79	3.66		
222	2.81	2.86	2.78	4.10	4.37	4.23	4.13	4.10	3.99	4.58	4.43	3.99	3.07	3.78	3.65	3.98	3.99	4.07	4.14	3.79	3.55	4.03	4.14	3.89	3.58	3.79	3.63		
223	2.82	2.86	2.80	4.21	4.29	4.26	4.20	4.13	4.00	4.61	4.47	3.99	2.97	3.78	3.62	4.01	3.99	4.09	4.17	3.82	3.52	4.03	4.15	3.89	3.56	3.79	3.62		
224	2.81	2.86	2.81	4.28	4.35	4.40	4.15	4.19	4.02	4.62	4.51	4.05	2.89	3.74	3.58	4.01	4.05	4.17	4.17	3.86	3.48	4.05	4.09	3.90	3.53	3.79	3.59		
225	2.82	2.87	2.84	4.27	4.38	4.31	4.21	4.19	4.04	4.64	4.54	4.12	2.80	3.74	3.55	4.04	4.08	4.22	4.23	3.88	3.43	4.09	4.16	3.96	3.50	3.80	3.58		
226	2.82	2.87	2.85	4.30	4.49	4.32	4.22	4.20	4.17	4.65	4.61	4.15	2.72	3.72	3.51	4.10	4.10	4.27	4.22	3.89	3.37	4.10	4.27	3.96	3.49	3.86	3.58		
227	2.79	2.85	2.85	4.30	4.44	4.38	4.26	4.26	4.18	4.74	4.60	4.15	2.63	3.67	3.44	4.14	4.13	4.31	4.30	3.94	3.30	4.19	4.25	3.99	3.45	3.86	3.54		
228	2.77	2.82	2.85	4.41	4.41	4.45	4.31	4.37	4.30	4.71	4.65	4.25	2.54	3.60	3.36	4.22	4.21	4.40	4.38	3.99	3.22	4.20	4.23	4.04	3.38	3.91	3.49		
229	2.74	2.79	2.85	4.42	4.54	4.54	4.41	4.38	4.33	4.76	4.63	4.35	2.45	3.53	3.29	4.26	4.29	4.47	4.38	4.04	3.15	4.25	4.35	4.10	3.32	3.93	3.44		
230	2.68	2.75	2.81	4.51	4.58	4.51	4.42	4.48	4.35	4.75	4.57	4.36	2.36	3.45	3.19	4.28	4.26	4.39	4.47	4.01	3.08	4.30	4.34	4.20	3.25	3.95	3.38		



**Apéndice C.5 Espectros UV – Vis de todas las unidades experimentales**

## Tratamiento estadístico de datos por Regresión Logística Binaria

### Apéndice C.6 Prueba de supuesto: Autocorrelación, tabla Savin y White

Tamaño de la muestra	Número de términos	DL	DU
6	2	0,61018	1,4001
7	2	0,69955	1,35635
7	3	0,46723	1,89636
8	2	0,7629	1,33238
8	3	0,55907	1,77711
9	2	0,82428	1,31988
10	2	0,87913	1,31971
10	3	0,69715	1,64134
11	2	0,92733	1,32409
11	3	0,75798	1,60439
12	2	0,97076	1,33137
12	3	0,81221	1,57935
13	2	100,973	1,3404
13	3	0,86124	1,56212
14	2	104,495	1,35027
14	3	0,90544	1,55066
15	2	107,697	1,36054
15	3	0,94554	1,54318
16	2	110,617	1,37092
16	3	0,98204	1,5386
17	2	113,295	1,38122
17	3	101,543	1,53614
18	2	115,759	1,3,133
18	3	104,607	1,53525
19	2	118,037	1,40118
19	3	10,743	1,53553
<b>20</b>	<b>2</b>	<b>120,149</b>	<b>1,41073</b>
20	3	11,004	1,53668
20	4	0,99755	1,67634

Savin, N. E. y White, K. J. (1977). *The Durbin-Watson test for serial correlation with extreme sample sizes or many regressors*. *Econometría*, 45(8), p. 1989-1996.

**Apéndice C.7 Asignación de coeficientes y determinación de probabilidades con única variable independiente**

Variable independiente: Métodos de extracción de azadiractina	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$	<i>probabilidad pronosticada</i> $= \frac{1}{1 + e^{-Y}}$
Maceración R <sub>1</sub> :20g/200mL	0	0	0	$Y = -0.969 + 2.337(0) + 2.337(0) + 2.337(0) = -0.969$	0.2751
Maceración R <sub>2</sub> : 30g/200mL	1	0	0	$Y = -0.969 + 2.337(1) + 2.337(0) + 2.337(0) = 1.368$	0.7972
Sonicación 20 min	0	1	0	$Y = -0.969 + 2.337(0) + 2.337(1) + 2.337(0) = 1.368$	0.7972
Sonicación 30 min	0	0	1	$Y = -0.969 + 2.337(0) + 2.337(0) + 2.337(1) = 1.368$	0.7972