



Instituto Politécnico Nacional

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA

UNIDAD QUERÉTARO

POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

**“Evaluación toxicológica de extractos de hojas de
Neem (*Azadirachta indica*) en cochinilla silvestre
del nopal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell).”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA

IBT. Heliodoro González Huasano

Directores de Tesis:

Dra. Eva González Jasso Dr. Santiago Vergara Pineda



Querétaro, Qro. abril de 2020.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Querétaro siendo las 13 horas del día 26 del mes de junio del 2020 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: CICATA Unidad Querétaro para examinar la tesis titulada:

Evaluación toxicológica de extractos de hojas de Neem en cochinilla silvestre del nopal. del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	González	Apellido Materno:	Huasano	Nombre (s):	Heliodoro
-------------------	----------	-------------------	---------	-------------	-----------

Número de registro: A 1 8 0 5 8 8

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Tecnología Avanzada

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 19 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

El primer 1% de similitud corresponde al formato usado por el IPN para reportar trabajos de la institución.

El tercer 1% de similitud corresponde a los reportes de avances entregados al CONACYT como becario.

La similitud menor al 1% corresponde a conceptos adecuadamente referenciados a la fuente original.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

Los resultados y conclusiones obtenidos durante la investigación respaldan la investigación y objetivos del trabajo para presentarse en la defensa de grado de maestría en Tecnología Avanzada.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS


Director de Tesis
Dra. Eva González Jasso


Dra. Mónica Araceli Vidales Hurtado


Dra. Regina Hernández Gama


2° Director de Tesis
Dr. Santiago Vergara Pineda


Dr. Iván Domínguez López


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN EN
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE
PROFESORES DE TECNOLOGÍA AVANZADA
QUERÉTARO
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-13
REP 2017

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, 6 de julio del 2020

El Colegio de Profesores de Posgrado de CICATA-IPN - QUERETARO en su Sesión
(Unidad Académica)

ordinaria No. 200703 celebrada el día 3 del mes julio de 2020 conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	GONZÁLEZ	Apellido Materno:	HUASANO	Nombre (s):	HELIODORO
-------------------	----------	-------------------	---------	-------------	-----------

Número de registro: A 1 8 0 5 8 8

del Programa Académico de Posgrado: MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

Referente al registro de su tema de tesis, acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Evaluación toxicológica de extractos de hojas de Neem (*Azadirachta indica*) en cochinilla silvestre del nopal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell)"

Objetivo general del trabajo de tesis:

Evaluar los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de Neem por medio de aplicaciones directas al nopal hospedero, para determinar el efecto en la densidad poblacional de la cochinilla silvestre.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

1° Director: Dra. Eva González Jasso

2° Director: Dr. Santiago Vergara Pineda

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada CICATA-IPN-Querétaro

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis

Dra. Eva González Jasso

Aspirante

Heliodoro González Huasano

2° Director de Tesis (en su caso)

Dr. Santiago Vergara Pineda

Presidente del Colegio

Dr. Alejandro Alfredo Lozano Guzmán

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN EN
CIENCIA AVANZADA
Y TECNOLOGÍA AVANZADA
CIUDAD QUERÉTARO
DIRECCIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Querétaro, Qro. el día 17 del mes de Junio del año 2020, el que suscribe Heliodoro González Huasano alumno del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada, con número de registro A180588, adscrito al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Unidad Querétaro, manifiesta que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Dra. Eya González Jasso y el Dr. Santiago Vergara Pineda y cede los derechos del trabajo titulado Evaluación toxicológica de extractos de hojas de Neem (*Azadirachta indica*) en cochinilla silvestre del nopal (*Dactylopius opuntiae* Cockerell), al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones helio.glez.huasano@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



ABT, Heliodoro González Huasano

ÍNDICE	
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	2
1.1 <i>Árbol de Neem (Azadirachta indica)</i>	2
1.1.1 <i>Aplicaciones del Neem</i>	3
1.1.1.1 <i>Medicina</i>	4
1.1.1.2 <i>Cosmético</i>	5
1.1.1.3 <i>Insecticida</i>	5
1.1.2 <i>Compuestos activos del Neem</i>	6
1.1.2.1 <i>Azadiractina</i>	7
1.1.2.2 <i>Nimbolide</i>	8
1.1.2.3 <i>Salanina</i>	9
1.2 <i>Grana Cochinilla</i>	11
1.2.1 <i>Taxonomía</i>	11
1.2.2 <i>Cochinilla fina (D. coccus Costa)</i>	11
1.2.3 <i>Cochinilla silvestre (D. opuntiae Cockerell)</i>	11
1.2.4 <i>Ciclo Biológico</i>	13
1.2.5 <i>Daños causados por la cochinilla silvestre en el nopal</i>	13
1.2.6 <i>Estimación de la densidad poblacional</i>	14
1.2.7 <i>Métodos para el control de la Cochinilla</i>	14
1.2.7.1 <i>Tratamiento físico o mecánico</i>	14
1.2.7.2 <i>Tratamiento biológico</i>	14
1.2.7.3 <i>Tratamiento químico (Plaguicidas)</i>	15
1.2.7.4 <i>Tratamiento alternativo</i>	16
1.2.7.5 <i>Productos del Neem usados en México</i>	16
1.3 <i>Nopal (Opuntia spp.)</i>	17
1.3.1 <i>Plagas del Nopal</i>	17
1.3.2 <i>Usos del Nopal</i>	18
1.4 <i>Métodos de extracción de metabolitos secundarios en plantas</i>	18
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS	20
2.1 <i>HIPÓTESIS</i>	20
2.2 <i>Objetivo General</i>	20
2.3 <i>Objetivos Específicos</i>	20

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	21
3.1 Materiales y equipo.....	21
3.1.1 Materiales.....	21
3.1.2 Equipo	21
3.2 Diagrama experimental.....	22
3.2.1 Colecta de cladodios	22
3.2.2 Colecta de las hojas de <i>Neem</i>	23
3.2.3 Tamizado de las hojas pulverizadas del <i>Neem</i>	24
3.2.4 Preparación de los extractos por maceración	24
3.2.5 Elaboración de tratamientos	25
3.2.6 Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)	26
3.2.7 Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS).....	26
3.2.8 Primera etapa experimental: prueba de campo (<i>Invernadero</i>)	27
3.2.9 Segunda etapa experimental: prueba <i>in vitro</i> en ninfas I de cochinilla silvestre para determinar DL_{90}	27
3.2.10 Conteo de la densidad poblacional.....	28
3.2.11 Análisis estadístico.....	28
CAPÍTULO 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN	29
4.1 Preparación de los extractos por maceración	29
4.2 Análisis por GC-MS.....	29
4.3 Análisis por HPLC	33
4.5 Nivel de infestación de los cladodios colectados.....	34
4.6 Efecto de los tratamientos en la mortalidad de la cochinilla silvestre.	35
4.7 Primera etapa experimental: análisis del efecto de las concentraciones de los extractos en los cladodios infestados por cochinilla silvestre.	36
4.7.1 Análisis estadístico primera etapa.....	38
4.8 Segunda Etapa experimental: Determinación <i>in vitro</i> de la DL_{90} y su aplicación en cladodios	39
4.8.1 Análisis estadístico segunda etapa	42
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS.....	44
ANEXOS.....	51
<i>Anexo 1. Reporte extracto etanólico concentrado 5 días de maceración</i>	51
<i>Anexo 2. Reporte extracto etanólico concentrado 3 días de maceración</i>	59

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Árbol de Neem y sus partes a) árbol, b) flor, c) fruto y d) semilla (Azadirachta indica)(Rajkumar, Murari, & Nand, 2011).</i>	3
<i>Figura 2. Hojas de Neem (Azadirachta indica) (Kumar Pillai V., 2016).</i>	3
<i>Figura 3. Aplicaciones del Neem (Campos, de Oliveira, Pascoli, de Lima, & Fraceto, 2016).</i>	4
<i>Figura 4. Molécula de Azadiractina (Kumar et al., 2016).</i>	7
<i>Figura 5. Hormona Ecdisona (Ferro, Tacoronte, Montero, Cabrera Pedroso, & Zaldo, 2005).</i>	7
<i>Figura 6. Molécula del Nimbolide (Kumar et al., 2016).</i>	9
<i>Figura 7. Molécula de la Salanina (National Center for Biotechnology Information, 2020).</i>	9
<i>Figura 8. Morfología de Dactylopius opuntiae Cockerell (Vergara-Pineda S. 2019).</i>	12
<i>Figura 9 Ciclo biológico de la cochinilla silvestre A) huevo, B) ninfa I, C-D) ninfa II, E) adulto hembra y F)adulto macho (Rangel Estrada, Ramírez Rojas y Osuna Canizalez, 2013).</i>	13
<i>Figura 10. Depredadores naturales de la cochinilla silvestre A) Leucopis bellula (Hemberger R., 2009), B) Sympherobius barberi (Lord R., 2012), C) Laetilia coccidivora (Pelikan S., 2018), D) Hyperaspis trifurcata (Bryant P., 2006).</i>	15
<i>Figura 11. Diagrama de flujo de la experimentación.</i>	22
<i>Figura 12. Representación esquemática del acomodo de los cladodios CICATA (Elaboración propia).</i> ...	23
<i>Figura 13. Tamices empleados para la selección del tamaño de partícula (Elaboración propia).</i>	24
<i>Figura 14. Cromatograma por HPLC del estándar azadiractina a 250 ppm (13.98min) a 220nm.</i>	33
<i>Figura 15. Curva de calibración de la azadiractina a tres diferentes concentraciones (125,250 y 500 ppm).</i>	34
<i>Figura 16. Grado de infestación de los cladodios colectados: 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) y 6 (E).</i>	35
<i>Figura 17. Densidad poblacional de cochinilla silvestre en cladodios asperjados con los extractos acuosos (EA), n=3; (x ± Error Estándar).</i>	36
<i>Figura 18. Densidad poblacional de cochinilla silvestre en cladodios asperjados con los extractos etanólicos (EE), n=3; (x ± Error Estándar).</i>	37
<i>Figura 19. Mortalidad de las ninfas I tratadas con los extractos acuosos (EA) y extractos etanólicos (EE) en la prueba in vitro.</i>	39
<i>Figura 20. Densidad poblacional de cochinilla silvestre en cladodios asperjados con los extractos etanólico (EE), acuoso (EA), producto comercial (PC) y controles (Tiempo y Agua), n=5; (x ± Error Estándar).</i>	41

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Efecto del Neem en diferentes insectos plaga.</i>	6
<i>Tabla 2. Triterpenoides identificados en las partes de árbol del Neem (Rajkumar et al., 2011).</i>	10
<i>Tabla 3. Ejemplo del reporte de la biblioteca del NIST del equipo GC-MS Agilent Technologies 7090 A. .</i>	30
<i>Tabla 4. Compuestos identificados por el GC-MS en los extractos etanólicos de la primera y segunda etapa de experimentación.</i>	30
<i>Tabla 5. Compuestos de los extractos etanólicos y acuosos con efecto insecticida.</i>	31
<i>Tabla 6. Grados de infestación de los cladodios, colectados en la primera y segunda etapa experimental.</i>	35
<i>Tabla 7. Prueba de Tukey de los tratamientos, primera etapa experimental, con 95% de intervalo de confianza.</i>	38
<i>Tabla 8. Prueba de Tukey de los tratamientos, primera etapa experimental, con 75% de intervalo de confianza.</i>	39
<i>Tabla 9. Determinación de CL90 de acuerdo al análisis Probit.</i>	40
<i>Tabla 10. Prueba de Tukey de los tratamientos, segunda etapa experimental, intervalo de confianza 95%.</i>	42
<i>Tabla 11. Prueba de Tukey de los tratamientos, segunda etapa experimental, intervalo de confianza 75%.</i>	42

INDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Calculo de rendimiento de extractos de acuerdo a Happel y Jordan.</i>	29
---	-----------

DEDICATORIAS

A mis padres **Helia Huasano Moreno** y **Heliodoro González López** por darme su apoyo en estos años de mi formación académica y lo más importante la vida misma.

A mi hermano **Alejandro González Huasano**, que ha estado en todo momento haciéndome reír y molestando por todo.

A mi amiga, **Alejandra Jiménez Torres** que me ha dado su apoyo en la carrera que compartimos, apoyándome en mis sueños y claro en el gran camino de la maestría.

A mis abuelos “**Paula Huazano Nava** y **José Dolores Ortiz Villanueva**” que durante su vida me cuidaron, infundiéndome valores, consejos y cariño, dando impulso y buenos deseos.

Para **Alexa Ivanna González Orozco**, por ser luz en esos momentos tormentosos, te debo mi asenso en éste paso, “con recuerdos, vivencias y todo el resto”...GRACIAS ☺ <3

A mis amigos tanto de CICATA, que me impulsaron en este paso de mi formación, dando buenos momentos en cada parte de ella. (**Lupita, Diana, Michel, Melissa, Araceli López, Aura, Araceli, Karen, Ale, Pepe, Martín, Javier, Dario, Humberto, Miguel, Gerardo, Adrián, Valentín, Alexandra, Miriam, Karen Flores, Nico, Edgar, Lydia, Erika y Rubén**; a los chicos de prácticas “**Luis, Alondra, María José, Vicky**” etc.)

A mis asesores y maestros los Doctores: **Mónica, Regina, Santiago** e **Iván** por brindarme sus conocimientos, retos difíciles y probarme a mí mismo que tengo los conocimientos para todo lo que venga en adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al **CICATA-IPN-Querétaro** (Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada), que me permitió formar parte de este proyecto en un centro de investigación que me abrió más el panorama del trabajo de un investigador y de la devoción al conocimiento y la enseñanza.

En especial a mi asesora en todo este viaje la **Dra. Eva González Jasso**, que me mostró que las lucha siempre debe hacerse en las buenas y en las malas, que me apoyo en los momentos más críticos de mi formación en el CICATA y de la cual me llevo muy buenos momentos.

Al **Dr. Santiago Vergara Pineda**, mi asesor que me guío en el trabajo y me hizo entender el gran mundo de los insectos y de que no todo es plaga.

Al **Lic. Lira** por permitirme formar parte de un proyecto para un bien mayor, y darme armas para luchar por lo justo y correcto en la vida.

A **CONACYT**, por brindarme los recursos para poder llevar a cabo el trabajo de investigación que ha marcado mi camino.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ)**, en sus diferentes campus, por brindarme ayuda con sus profesores, alumnado e instalaciones, que sin ellas muchas de las actividades aquí presentes no podrían haberse concluido.

A la **Universidad Tecnológica de Corregidora (UTC)** y profesores, por ser mí casa de estudio que a pesar de sus carencias, siempre formará parte de mí, desde que ingrese a TSU y egrese de Ingeniería, gracias por ser mi “alma máter”, GRACIAS.

RESUMEN

El Neem (*Azadirachta indica*) ha mostrado su eficiencia contra diversas especies de insectos, alterando la eclosión del huevo en mosquitos, la regulación de la fertilidad en saltamontes, la actividad antialimentaria en coleópteros, lepidópteros; entre efectos, debido a sus compuestos tetranortriterpenoides que son los principales activos. Éstos son selectivos, biodegradables y de baja toxicidad, por lo cual son una alternativa en cultivos donde no está permitido el uso de agentes químicos, como es el caso del nopal, que es susceptible a más de 160 especies de insectos, entre los cuales destaca la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* Cockerell, que al alimentarse de la savia del nopal permite la entrada de patógenos llevando la planta hasta su muerte. El objetivo del presente proyecto fue evaluar el efecto de los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de Neem sobre la densidad poblacional de la cochinilla silvestre del nopal verdura, y caracterizar los extractos por cromatografía de líquidos (HPLC) y gases (CG-MS). Para ello, se realizaron colectas de hojas de Neem y de cladodios de nopal infestados con cochinilla silvestre, en dos etapas experimentales. Se determinó que el 50% y 57% de los cladodios de la primera y segunda colecta, respectivamente, presentaron un grado 4 de infestación. Los extractos acuosos y etanólicos se prepararon por maceración por 3 y 5 días, de las hojas pulverizadas, y fueron concentrados por rotaevaporación. En la primera etapa experimental, los extractos acuosos y etanólicos al 5, 10, 20, y 40% se aplicaron en los cladodios y se comparó su eficiencia contra un producto comercial a base de aceite de semilla de Neem. El efecto bioinsecticida se valoró por la reducción poblacional de la cochinilla silvestre al día 21 y se observó una disminución del 45, 35 y 35% con el uso del extracto acuoso (5%), etanólico (40%) y producto comercial (5%), respectivamente. En la segunda etapa experimental, se determinó la Dosis Letal 90 (DL90) de los extractos, en una prueba in vitro sobre la ninfa móvil I del ciclo biológico de la cochinilla silvestre. El extracto acuoso al 25% generó el 90% de letalidad de las ninfas (DL90:25%) y el extracto etanólico al 10% (DL90:10%) tuvo el mismo efecto. Los extractos a estas dos concentraciones se aplicaron a los cladodios en el invernadero, su efecto sobre la reducción de la densidad poblacional fue del 10, 84 y 75%, con el extracto acuoso (25%), etanólico (10%) y producto comercial (25%), respectivamente. En el análisis de CG-MS de los extractos concentrados que se maceraron por 3 y 5 días, se detectaron 130 y 78 compuestos, respectivamente; de los cuales solo una fracción menor del 10% se ha reportado con actividad insecticida. Sin embargo, por cromatografía HPLC no se identificaron los tetranortriterpenoides. Este estudio encontró que a menor tiempo de maceración se extrajeron mayor cantidad de compuestos volátiles y que los extractos etanólicos de las hojas del Neem podrían considerarse una opción para ser empleados como bioinsecticidas para el control de la cochinilla silvestre ante productos elaborados a base de semilla del mismo árbol.

Palabras clave: (Neem, triterpenoides, actividad insecticida, nopal, cochinilla silvestre).

ABSTRACT

Neem (*Azadirachta indica*) has shown its efficiency against many species of insects, altering the hatching of the mosquito's eggs, the regulation of fertility in grasshoppers, the antifeedant activity in coleoptera, lepidoptera; between effects, due to its tetranortriterpenoid compounds that are the main assets. These are selective, biodegradable and of low toxicity, for which they are an alternative in crops where the use of chemical agents is not allowed, as is the case of prickly pear, which is susceptible to more than 160 species of insects, among which stands out the wild cochineal *Dactylopius opuntiae* Cockerell, which, by feeding on the prickly pear sap, allows pathogens to enter, leading the plant to death. The purpose of the present project was to evaluate the effect of the aqueous and ethanolic extracts of the Neem leaves on the population of the wild cochineal of the prickly pear vegetable, and to characterize the extracts by liquid and gas chromatography (HPLC) and (CG-MS). For this, the first step was to collect the Neem leaves and prickly pear cladodes infested with wild cochineal were carried out in two experimental stages. It was determined that 50% and 57% of the cladodes of the first and second collect, respectively, presented a degree 4 of infestation. The aqueous and ethanolic extracts were prepared by maceration extraction for 3 and 5 days, from the pulverized leaves, and were concentrated by rotavaporation. In the first experimental stage, the aqueous and ethanolic extracts at 5, 10, 20, and 40% were applied to the cladodes and their efficiency was compared against a commercial product based on Neem seed oil. The bioinsecticide effect was assessed by the population reduction of the wild cochineal on day 21 and a decrease of 45, 35 and 35% was observed with the use of the aqueous extract (5%), ethanolic (40%) and commercial product (5%), respectively. In the second experimental stage, the Lethal Dose 90 (LD₉₀) of the extracts was determined in an in vitro test on mobile nymph I of the biological cycle of the wild cochineal. The 25% aqueous extract generated 90% of the nymphs' lethality (DL₉₀: 25%) and the 10% ethanolic extract (DL₉₀: 10%) had the same effect. The extracts at these two concentrations were applied to cladodes in the greenhouse, their effect on the reduction of population density was 10, 84 and 75%, with the aqueous extract (25%), ethanolic (10%) and commercial product (25%), respectively. In the CG-MS analysis of the concentrated extracts that were macerated for 3 and 5 days, 130 and 78 compounds were detected, respectively; of which only a fraction less than 10% has been reported with insecticidal activity. However, HPLC chromatography did not identify tetranortriterpenoids. This study found that the shorter the maceration time, the greater the amount of volatile compounds were extracted and that the ethanolic extracts of the Neem leaves could be considered an option to be used as bioinsecticides for the control of wild cochineal before products made from seed of the same tree.

Key words: (Neem, triterpenoids, insecticide activity, prickly pear, wild cochineal).

INTRODUCCIÓN

En México se produjeron 853 mil toneladas de nopal en 2018, con un valor monetario de 2100 millones de pesos, siendo Morelos, Cd. México, México, Jalisco y Puebla los cinco principales productores, exportando este producto a Estados Unidos principalmente aunque existen otros países que lo consumen, como Corea del Sur, Bélgica, Japón, República Checa, etc. (SIAP, 2019). El cultivo de nopal es susceptible a más de 160 especies de insectos, uno de los más importantes es la grana cochinilla, debido a su alta tasa de reproducción, con generación de colonias de 35 a 45 días (Pacheco Rueda, Lomelí Flores, Rodríguez- Leyva, & Ramírez- Delgado, 2010), la cochinilla se alimenta de la savia del nopal lo cual debilita a la planta y esto permite la entrada de patógenos que pueden ocasionar amarillamiento, debilidad, necrosis foliar y por tanto la muerte de la planta (Suassuna, Portillo, & Vigueras, 2008). Los métodos para el control de ésta plaga son tratamientos físicos, biológicos, químicos y mixtos; en el caso de los químicos, se aplican diversos productos como los organoclorados, organofosforados, piretrinas, etc., los cuales son de alta permanencia en el medio ambiente, afectan a insectos benéficos y causando afectaciones a la salud a los aplicadores y consumidores debido a residuos en los alimentos (Palacios Mendoza, Nieto Hernández, Llanderal Cázares, & González Hernández, 2004). Es debido a esto se han usado extractos o aceites esenciales provenientes de plantas, los cuales son de nulo riesgo y de baja permanencia en el medio ambiente; algunas plantas son conocidas por sus fitocomponentes los cuales poseen efecto insecticida como los que se encuentran en el Neem (Kumar, Rahal, & Malik, 2016). El Neem es conocido por tener efecto en gran diversidad de insectos, causándoles diferentes alteraciones, como por ejemplo Benelli *et al.*, (2017) reportó nula eclosión de huevos, afectaciones de etapa larvaria o desarrollo incompleto en mosquitos; Adnan *et al.*, (2014), observó en el insecto saltahojas del mango la regulación de crecimiento y actividad antialimentaria donde el insecto dejaba de alimentarse de las hojas de la planta; Córdova Albores *et al.*, (2013) describió las afectaciones en mudas de piel retenida o que los insectos no podían emerger de la nueva en su totalidad y el efecto antialimentario en insectos coleópteros, lepidópteros, hemipteros y dípteros. Por ello se planteó el objetivo de evaluar las concentraciones de los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de Neem por medio de aplicaciones directas al nopal hospedero, para determinar el efecto en la densidad poblacional de la cochinilla silvestre y analizar los extractos por dos técnicas de cromatografía

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 *Árbol de Neem (Azadirachta indica)*.

El Neem cuyo nombre científico es *Azadirachta indica* pertenece a la familia Meliaceae, se caracteriza por ser un árbol frondoso, de crecimiento rápido y de hoja perenne, que llega a crecer aproximadamente 30 m de altura y 2.5 m de ancho del tronco, se sabe que puede vivir más de 100 años (Pandey, Verma, & Singh, 2014) es proveniente de India o del Suroeste Asiático, donde se le conoce con diversos nombres como: lila de la India, margoza, planta milagrosa, botica de la naturaleza,

árbol divino, etc. Se encuentra distribuido alrededor del mundo en 79 países entre ellos México, en éste se ubica en 13 estados (Yucatán, Veracruz, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Guanajuato, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Durango, Colima, Baja California Sur y San Luis Potosí) (Cruz Fernández & Del Ángel Sánchez, 2004).

Es un árbol de corteza semirugosa que puede variar en color según la parte de la planta, edad y ubicación; posee tonos grises o negro grisáceo, la corteza es dura y gruesa con algunas fisuras en ella (Figura 1a). Las hojas, pueden ser de colores verdes claros a oscuros, en algunos casos las hojas tiernas son de colores rojizo a púrpura (Figura 2); se encuentran en posiciones alternas y compuestas, con terminaciones en forma de sierra, las cuales están agrupadas en el extremo de las ramas que pueden medir de 10 a 38cm. Los tallos suelen contar con 20 a 31 unidades, cada hoja puede llegar a medir de 3 a 8cm de largo. Las flores tienen un color blanco a crema (Figura 1b), se presentan de 150 a 250 inflorescencias cuyo aroma es similar a la miel; las flores se encuentran libres de azadiractina. Los frutos del Neem son similares a las aceitunas (Figura 1c), pueden medir hasta 3cm, color amarillo, sabor dulce; el árbol empieza a darlos entre una edad de 3 a 5 años y contienen en su interior una semilla. La semilla es de forma alargada, blanquecina cuando está seca, tiene una coraza que protege una almendra que pesa la mitad de la semilla; es la mayor fuente de azadiractina la cual se produce hasta los 10 años (Figura 1d) (National Research Council, 1992).

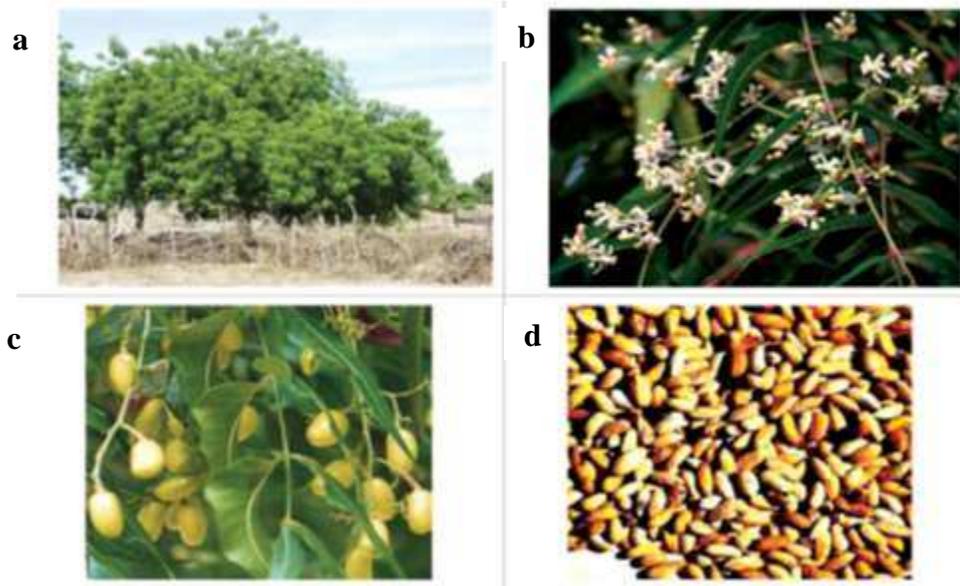


Figura 1. Árbol de Neem y sus partes a) árbol, b) flor, c) fruto y d) semilla (Azadirachta indica)(Rajkumar, Murari, & Nand, 2011).



Figura 2. Hojas de Neem (Azadirachta indica) (Kumar Pillai V., 2016).

1.1.1 Aplicaciones del Neem

Las diferentes actividades biológicas que se le atribuyen al Neem (Figura 3), se deben a la gran variedad de principios activos que el árbol posee, con ello mejorando y dando alivio a diversas afecciones, en seres humanos puede prevenir y controlar alteraciones por microorganismos u hongos, también ha sido usado en el combate de insectos plaga en los cultivos, etc. (Kumar et al., 2016).

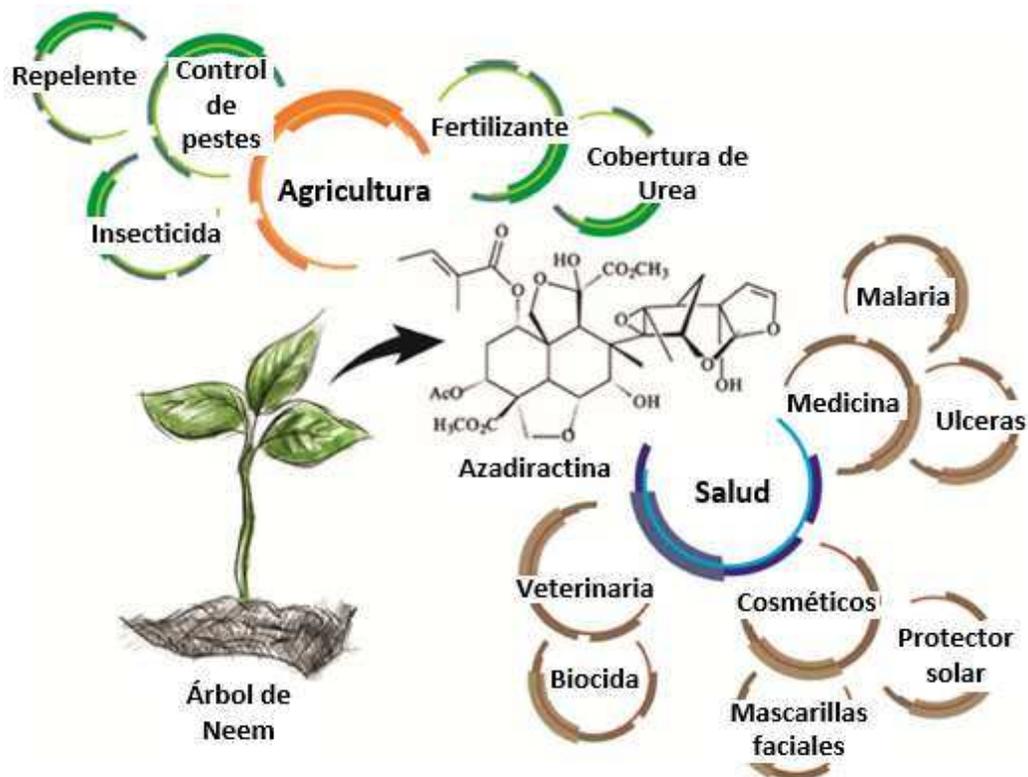


Figura 3. Aplicaciones del Neem (Campos, de Oliveira, Pascoli, de Lima, & Fraceto, 2016).

1.1.1.1 Medicina

En el ámbito de la medicina, el Neem es usado en infusiones, e incluso sus frutos u hojas son consumidas directamente; se ha reportado que tiene cualidades anticancerígenas (Rajkumar et al., 2011), las hojas, corteza y ramas presentan cualidades antimicrobianas, antiinflamatorias y otras que favorecen la cicatrización, (López Pantoja, Angulo Escalante, Martínez Rodríguez, Soto Beltrán, & Chaidez Quiroz, 2007). Se han usado extractos de corteza para tratar la fiebre, disentería, vómito, la malaria y la anorexia (Biswas K. , Chattopadhyay, Banerjee, & Bandyopadhyay, 2002). El nimbidol, presente en raíces y corteza del árbol, inhibe las glucosamidas intestinales ayudando a controlar la diabetes (experimentos en conejos y ratas) (Mukherjee & Sengupta, 2013). Los extractos acuosos de Neem, demostraron un efecto antihiper glucémico en animales diabéticos inducidos por estreptozotocina (Kumar et al., 2016).

1.1.1.2 Cosmético

Para el uso cosmético ha tenido aplicaciones desde el combate y prevención contra la dermatitis, acné, salpullido, soriasis, para ello se han utilizado productos en diferentes versiones, como: shampoo, jabones o soluciones (Cruz Fernández & Del Ángel Sánchez, 2004).

1.1.1.3 Insecticida

Los extractos de Neem abren un campo positivo en la regulación de agentes químicos, ya que se puede usar como manejo integrado y selectivo para la plaga que se desea erradicar; para ello pueden usarse las semillas u hojas. (Tiwari, Verma Kumar, Chakraborty, Dhama, & Singh Vir, 2014). El Neem es conocido por combatir más de 550 diferentes tipos de especies de insectos (Gahukar, 2014), de diversos órdenes (provocándoles diversas afectaciones), entre las que se encuentran: Orthoptera (saltamontes, langostas y grillos) causando un efecto antialimentario; Homoptera (áfidos, moscas blancas, salta hojas, psílidos y grana cochinilla) con efectos en su crecimiento y capacidad de alimentarse; Coleoptera (escarabajos, entre los más destacados se encuentran los comedores de hojas y los coccinélidos) puede provocar muerte por contacto o causa su crecimiento lento. En el caso de Lepidóptera (mariposas y polillas) son susceptibles principalmente en su etapa larvaria, sufren bloqueos para alimentarse o interrupciones en su desarrollo. Diptera (moscas de la fruta, moscas azules y mosquitos) efectos en su desarrollo. En el orden Hymenoptera (abejorros, hormigas, avispas y abejas) produce un efecto antialimentario. Por último en Heteroptera (chinchas) tiene efecto antialimentario (National Research Council, 1992).

A continuación, en la Tabla 1 se muestran trabajos previos del efecto del Neem en el control de diferentes insectos.

Tabla 1. Efecto del Neem en diferentes insectos plaga.

Referencia	Plaga	Presentación/Dosis	Efecto
Benelli et al., (2017)	Mosquito <i>Aedes aegypti</i> y <i>A. albopictus</i> , afectando (Larvas y huevos).	Presentación Pastel de Neem CL ₅₀ : 66ppm o DL ₅₀ : 50 ppm.	Interfiere en la eclosión del huevo y desarrollo larvario incompleto.
Adnan et al., (2014)	Saltahojas del mango <i>Idioscopus clypealis</i> .	Aceite de semillas de Neem al 3%, aplicación de 24 a 168h.	Regulación de crecimiento, fertilidad del adulto, deja de alimentarse.
Biswas G. C., (2013)	Afido de las mostaza <i>Lipaphis erysimi</i> Kalt.	Extractos etanólicos de las hojas y semillas de Neem y etanol- agua de semillas. Usando 25, 50 y 75 g de cada material vegetativo	Eliminación del 63 al 73% de la población de los áfidos p/planta.
Córdova Albores, Torres De los Santos, Rodolfo Adriano Anaya, Flores García, & Salvador Figueroa, (2013)	Insectos de los órdenes Coleoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Diptera.	Extractos fermentados de las hojas del Neem. Diluciones 1:2 y 1:4 de extracto	Afectación múltiple, efecto antialimentario, retraso de mudas, y eclosión de huevos.
Villamil Montero, Naranjo, & Van Strahlen, (2012)	Chinche de los pastos <i>Collaria scenica</i> Stal (Ninfas).	Extractos de semillas a 50-250 ppm cada 24 h/ 10 días.	Mortalidad del 85%.
Martínez Puc & Medina Medina, (2011)	Acaro <i>Varroa destructor</i> (Adultos).	Aceite, diluciones del 1 a 4%, 24 a 48h.	Repelencia, propiedad antialimentaria de pupas <i>Apis mellifera</i> (Abeja).
Zamora et al., (2008)	Gusano cogollero <i>Spodoptera frugiperda</i> (Larvas y huevos).	Aplicación de siete concentraciones de 1 a 100mg/5s/5 días (Huevos) y de 1 a 200mg (Larvas).	Eclosión del huevo, intervalos de 12 a 31%. Mortalidad del 13 a 22%.

1.1.2 Compuestos activos del Neem

El Neem posee más de 300 compuestos los cuales han sido extraídos de las diferentes partes de la planta, los cuales fueron clasificados como isoprenoides (Tiwari, Verma Kumar, Chakraborty, Dhama, & Singh Vir, 2014); de estos los llamados tetranortriterpenoides son el principal ingrediente activo, también son conocidos como limonoides, uno de los más estudiados es la Azadiractina debido a la abundancia y el mecanismo de acción. En el tronco existen otros compuestos tales como los taninos, diterpenos tricíclicos, ácido gálico, galocatequina, catequina, epicatequina, margalona e isomargalona (Kumar et al., 2016).

1.1.2.1 Azadiractina

La azaridactina (AZA), cuya fórmula química es $C_{35}H_{44}O_{16}$ pertenece a los triterpenoides también denominados como limonoides (Figura 4), tiene efecto en la morfología de los insectos, ya que ataca a la hormona ecdisona (Figura 5) que es la encargada del cambio fisiológico en los insectos (Benelli et al., 2017).

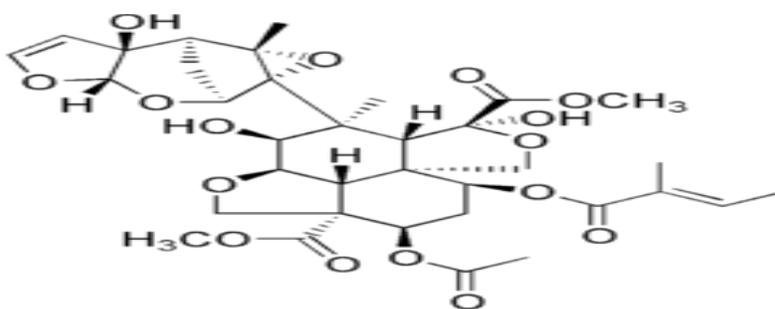


Figura 4. Molécula de Azadiractina (Kumar et al., 2016).

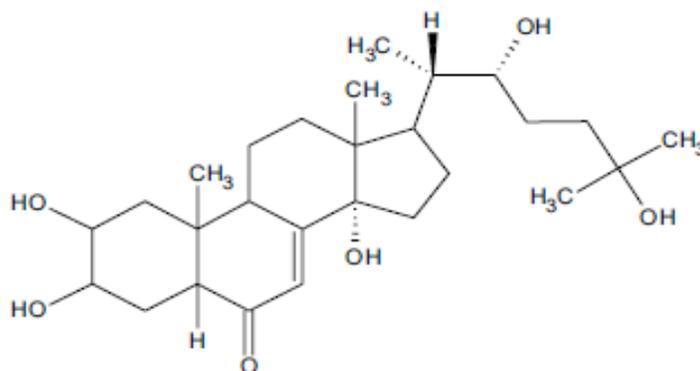


Figura 5. Hormona Ecdisona (Ferro, Tacoronte, Montero, Cabrera Pedroso, & Zaldo, 2005).

La máxima cantidad de azadiractina producida es de 4000 μ g/g del peso seco de los granos, en árboles de edad media, 20 a 40 años de edad (Priyanka, Rekha, Mithilesh, & Rakhi, 2010). También ha sido estudiado el tiempo de vida media del compuesto a diferentes condiciones; Pereira, Kumar, Agiwal, & Prasad, (2019) reportaron tiempos de vida del compuesto en soluciones metanólicas media bajo diferentes condiciones de radiación UV, pH y temperatura reportando una vida media máxima de 25 h en soluciones bajo radiación UV de 200 a 280 nm y a temperatura ambiente, mientras que al añadirse ácido benzoico duró 48 minutos y al

usarse lecitina 4 días respectivamente, también fueron usadas soluciones buffer para estabilizar el pH, en el se emplearon pH 10, 4 y 7 con el primer pH el tiempo de vida media fue 2 h, el segundo otorgó una vida de 19 días y el último pH confirió una vida media de 13 días, por último se usaron temperaturas de 50 y 90°C donde el tiempo fue de 7 días y 11 h respectivamente. En el estudio de Boursier, Bosco, Coulibaly, & Negre, (2011) el compuesto se mantuvo estable por 7 días a 14 y 25°C, sin embargo, a 30°C la concentración de azadiractina disminuye un 30% de la inicial. La investigación de Barrek, Paisse, & Grenier-Loustalot, (2004) su investigación se centró en saber los tiempos de vida media del compuesto en extractos de semilla a diferentes solventes usando valores de pH 2, 4, 6 y 8, temperaturas de 40, 50 y 70 °C y condiciones de fotosensibilidad (luz, oscuridad y radiación UV); el compuesto es estable a pH 2 en condiciones de luz y oscuridad donde su vida media es de 9 días, mientras que en UV es de 6 horas al mismo pH; a pH 6 en condiciones de luz, oscuridad y UV obtuvo 4.4 meses, 1.5 meses y 1 día respectivamente, mientras que a 40°C a pH 2 y 8 la vida media fue de 19 h y 27 días respectivamente. Por último Jarvis, Johnson, & Morgan, (1998) demostró que la azadiractina posee mayor estabilidad en metanol a diferentes pH; en soluciones buffer de pH 4 el compuesto adquirió una vida media de 49 días, a pH 5 de 50 días y a pH 6 el compuesto obtuvo una vida media de días, se observó que el compuesto puede soportar hasta una temperatura de 50°C en las diferentes soluciones buffer ya mencionadas lo cual le otorga una vida media de 7 días.

Estas características se deben a la estructura química de la azadiractina, la cual es un limonoide altamente oxidante, por su gran cantidad de oxígenos, grupos éter, acetal, hemiacetal y una variedad de ésteres carboxílicos; posee dieciséis centros estereogénicos de los cuales siete son cuaternarios. Lo cual la hace una molécula altamente inestable (Pereira et al., 2019).

1.1.2.2 Nimbolide

El Nimbolide (Figura 6) es un limonoide, cuya fórmula es $C_{27}H_{30}O_7$, posee dos compuestos activos; Nimbolide B y ácido Nímbico B los cuales son herbicidas, a su vez cuenta con actividad alelopática y fitotóxica; la actividad alelopática incrementa en función de la concentración del compuesto activo, pero la intensidad puede ser variada de acuerdo al tipo de planta a atacar (Chaudhary et al., 2017).

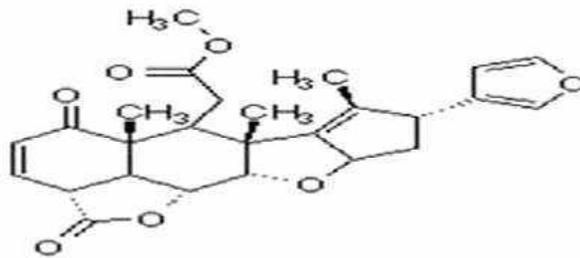


Figura 6. Molécula del Nimbolide (Kumar et al., 2016).

1.1.2.3 Salanina

La salanina (Figura 7) es un limonoide, cuya fórmula química es $C_{34}H_{44}O_9$, el compuesto interviene en el crecimiento de los insectos, disuade la alimentación, incrementa el tiempo del estado larvario, retrasa la muda y reduce el peso de la pupa (Chaudhary et al., 2017).

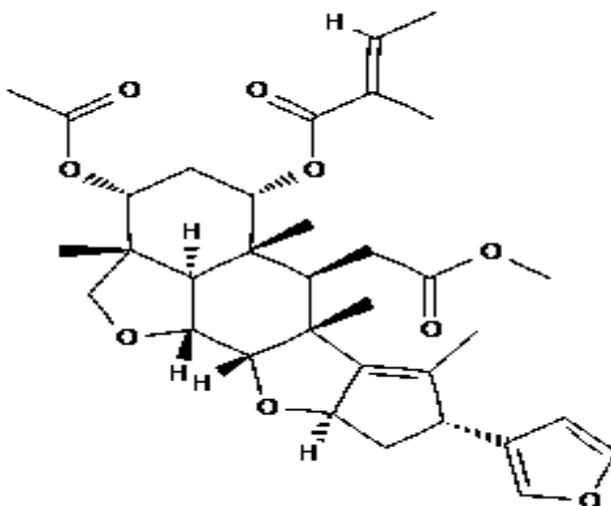


Figura 7. Molécula de la Salanina (National Center for Biotechnology Information, 2020).

Es la mezcla de salanina, nimbina y azadiractina la que provoca el efecto insecticida del Neem; , ya que cada uno posee una función específica al momento de actuar en el insecto (Chaudhary et al., 2017), creando un efecto sinérgico.

En la Tabla 2 se mencionan algunos de los compuestos que posee el Neem y la parte del árbol en la que se encuentran.

Tabla 2. Triterpenoides identificados en las partes de árbol del Neem (Rajkumar et al., 2011).

Compuesto	Fruta	Semilla	Flor	Hojas	Tronco	Corteza	Raíz	Aceite
Nimbina					X		X	X
Nimbinina					X		X	X
Ácido Salaninico								X
Salanina								X
Deacetil Nimbina		X				X		
Nimbolide				X				
Meliantriol								X
Azadirona								X
Epoxyazadiradiona								X
Azadiradiona								X
Gedunina								X
7-Deacetil Gedunina								X
Meldenina								X
Salanina-lactona								X
Nimbina-lactona								X
Azadiractina		X		X				
Vepinina								X
Nimbolina A					X			
Nimbolina B					X			
Nimbinina								X
Vilasinina					X			
Nomolina	X							
Nimolicina	X							
17-Hidroxi-azadiradiona	X							
17 β -Hidroxi-azadiradiona	X							
17-epi-azadiradiona	X							
1 α -Metoxi-1,2-dihidroepoxi-azadiradiona		X						
1 β , 2 β -Diepoxii-azadiradiona		X						
7-Acetilneotrichilenona		X						
7-Deacetil-7 α -benzoilazadiradione		X						
7-Deacetil-7 α -benzoilepoxi-azadiradione		X						
7-deacetil-7 α -benzoilgedunina		X						
Nimbinene				X		X		X
6-Deacetil nimbinene				X		X		X
Nimbandiol				X		X		X
6-o-Acetil-nimbandiol								X

1.2 Grana Cochinilla

1.2.1 Taxonomía

La cochinilla o grana pertenece a la familia Dactylopiidae y al género *Dactylopius* y se caracteriza por producir un pigmento rojo (ácido carmínico) y parasitar las cactáceas, especialmente 2 tipos la *Opuntia* Mill y *Nopalea* Salm-Dyck (Rodrigo, Catalá Oltra, & Granero, 2010).

Del género *Dactylopius* se conocen 6 especies: *Dactylopius. ceylonicus* Green, *D. tomentosus* Lamark, *D. austrinus* De Lotto, *D. confusus* Cockerell, *D. opuntiae* Cockerell y *D. coccus* Costa (Rodrigo et al., 2010).

1.2.2 Cochinilla fina (*D. coccus* Costa)

La cochinilla fina está cubierta con un polvo seroso, produce ácido carmínico (25% de su peso) (Hernández Hernández, García Gil de Muñoz, del Río Dueñas, & Lanz Mendoza, 2005). Es un insecto de gran importancia económica por la obtención del colorante, el cual se usa en la producción de alimentos, fármacos, textiles y cosméticos. Teniendo en cuenta que la relación cochinilla-nopal es complicada, se deben definir condiciones específicas para su crianza, temperaturas que van de 20 a 30°C ya que si son mayores de 35°C se acorta el ciclo biológico disminuyendo el tamaño final de la cochinilla y por lo tanto su contenido de ácido carmínico, si son debajo de los 10°C se alarga el ciclo biológico y se produce la enfermedad conocida como “chorreado”(Matadamas Ortiz & Zamorano Rojas, 2016).

1.2.3 Cochinilla silvestre (*D. opuntiae* Cockerell).

La cochinilla silvestre reúne a un gremio de especies del género *Dactylopius*, entre las más representativas de América están *D. confertus*, *D. confusus* y *D. opuntiae*; ésta última es la más distribuida en la República Mexicana, teniendo tasas de generación de colonias cada 35 a 45 días, (Pacheco Rueda et al., 2010). El ácido carmínico en *D. opuntiae* Cockerell constituye el 10% de su peso y un algodoncillo recubre su cuerpo (Hernández Hernández et al., 2005).

Cockerell en 1929, reclasificó la cochinilla silvestre, descrita y colectada por A. Duges en Guanajuato (México), propuso que a esta variedad se le llamara *Coccus cacti opuntiae*, nombre que fue rechazado, posteriormente se decidió llamarlas *Dactylopius opuntiae* Cockerell debido a la descripción más completa (De Lotto, 1974).

Estas son las características que describió Cockerell para la hembra de cochinilla silvestre: las hembras no se encuentran incrustadas en la secreción que producen y son claramente separables, aun así, se encuentran envueltas en ella. Las hembras poseen una forma oval o elíptica con longitudes de 2.3 mm y un ancho de 1.5 mm. Su cuerpo se encuentra segmentado en setas cortas modificadas en las partes lateral, dorsal y ventral; en la cabeza y abdomen son cilíndricas, moderadamente gruesas y numerosas. Poseen poros anchos y agrupados, los cuales se conectan a un conducto, estos pueden ser de dos a cuatro y se encuentran en las zonas dorsal media y submedia del tórax. Sus patas son gruesas, cortas, prácticamente atrofiadas y sus antenas se segmentan en siete partes. (De Lotto, 1974), estas características se representan en la Figura 8.

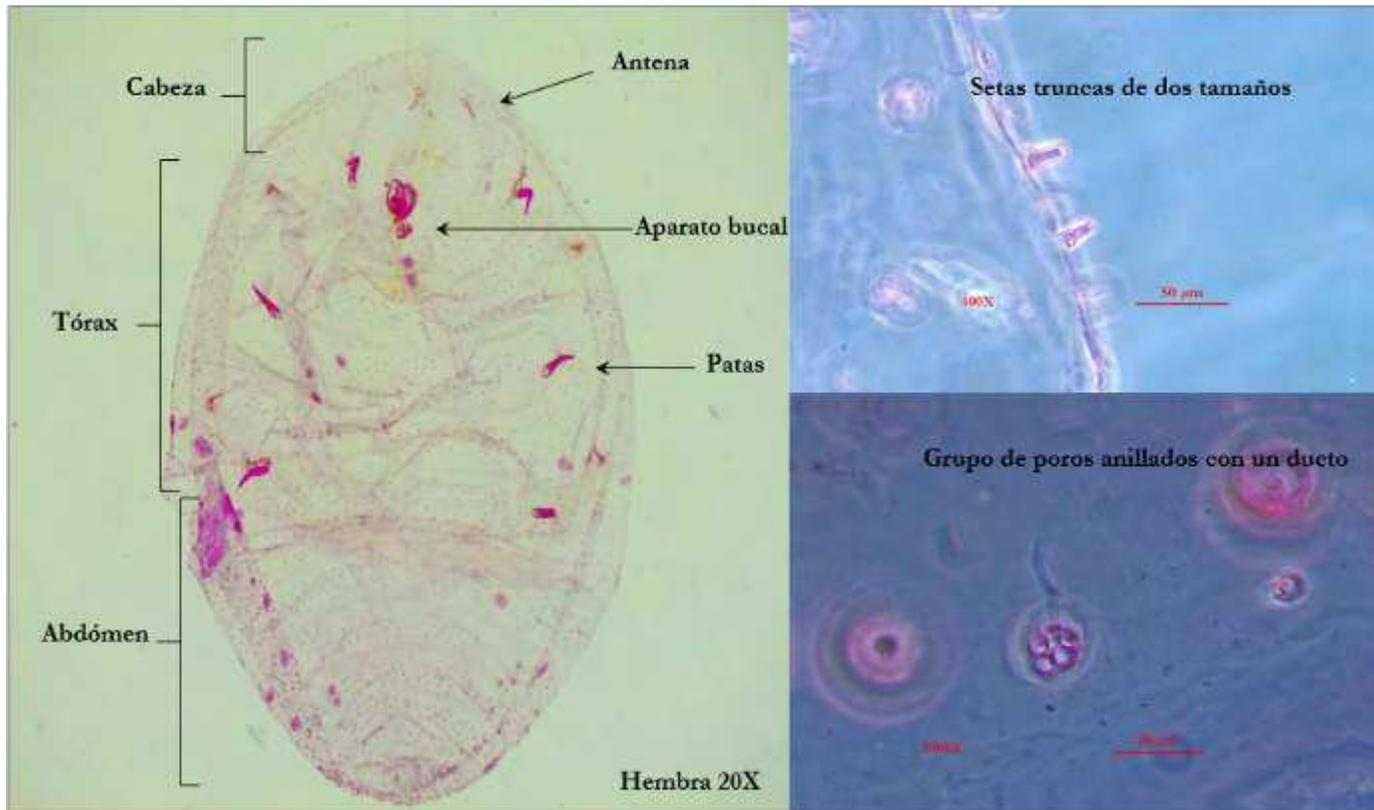


Figura 8. Morfología de *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Vergara-Pineda S. 2019).

1.2.4 Ciclo Biológico

D. coccus Costa y *D. opuntiae* Cockerell, comparten un mismo ciclo de vida en el nopal, mismo que puede verse la Figura 9; se sabe que los primeros estadios ninfales comprenden un máximo de 20 días; la duración de ninfa I a hembra es de 19 días y en machos hasta 22 días, donde la hembra posee un período de vida entre 35 y 42 días, mientras los machos sólo viven hasta 4 días. Las hembras pueden llegar a ovopositar hasta 130 huevecillos cuando se encuentran en vida silvestre (Flores-Hernández et al., 2006).



Figura 9 Ciclo biológico de la cochinilla silvestre A) huevo, B) ninfa I, C-D) ninfa II, E) adulto hembra y F) adulto macho (Rangel Estrada, Ramírez Rojas y Osuna Canizalez, 2013).

1.2.5 Daños causados por la cochinilla silvestre en el nopal

La SEDA (Secretaría de Estado en el Despacho de Ambiente) Paraíba de Brasil, reportó en 2006 una estimación de 150 mil hectáreas afectadas por cochinilla con un valor económico de 130 millones de dólares. Una infestación >75% de la superficie del cladodio significa la muerte para la planta; las ninfas y hembras se alimentan de savia, pero son éstas últimas las de importancia por la puesta de huevos que colocan las cual es de 130 huevecillos; al

alimentarse de la savia se ocasiona un por el consumo de debilitamiento la planta, lo que a su vez facilita la entrada de patógenos llevándola hasta su muerte (Suassuna et al., 2008).

La cochinilla es considerada una plaga de importancia mundial, ya que no se posee información suficiente de su biología (Palafox-Luna, Rodríguez-Leyva, Lomeli-Flores, Viguera-Guzmán, & Vanegas-Rico, 2018).

1.2.6 Estimación de la densidad poblacional

La determinación de la densidad poblacional de la cochinilla silvestre se realiza de la siguiente forma: se contabilizan las masas algodonosas de los cladodios, llamadas colonias; al conjunto de colonias se le denomina conglomerado (Cruz Rodríguez, González Machorro, & Villegas, 2010). Una colonia de cochinillas se conforma por un promedio de 38 ninfas I, 9 ninfas II, 7 hembras adultas y una proporción de 3 machos por hembra (aproximadamente 21) (Torres Gabriola & Cuevas Salgado, 2019).

Para seguir las señales de regulación poblacional, se deben realizar histogramas de la distribución de frecuencia del tamaño de los conglomerados, ajustando una regresión lineal del logaritmo natural de frecuencia y de tamaño de los conglomerados. Con ello se conocerá si los depredadores naturales de la cochinilla han aparecido en el cladodio, lo cual mantendrá la población controlada (Cruz Rodríguez et al., 2010).

1.2.7 Métodos para el control de la Cochinilla

1.2.7.1 Tratamiento físico o mecánico

Se utilizan escobas, escobillones y cepillos para “tumbar” o quitar a la cochinilla, desprendiéndola por la fricción realizada con las escobas contra la superficie del cladodio, en conjunto con agua tibia y jabón en polvo (Mena Covarrubias & Rosas Gallegos, 2004).

1.2.7.2 Tratamiento biológico

Diversas especies de insectos se usan para el control de cochinilla, de los cuales los más destacados son *Leucopis bellula* (Figura 10 A), *Symphorobius barberi* (Figura 10 B), *Laetilia coccidivora* (Figura 10 C), *Hyperaspis trifurcata* (Figura 10 D), ya que se emplean como

parte del manejo integrado para combatir a la cochinilla; estos insectos comen a *Dactylopius opuntiae* en ciertas fases del desarrollo, aunque algunos si la depredan en la mayor parte del ciclo (Cruz Rodríguez et al., 2010).



Figura 10. Depredadores naturales de la cochinilla silvestre A) *Leucopis bellula* (Hemberger R., 2009), B) *Sympherobius barberi* (Lord R., 2012), C) *Laetilia coccidivora* (Pelikan S., 2018), D) *Hyperaspis trifurcata* (Bryant P., 2006).

1.2.7.3 Tratamiento químico (Plaguicidas)

La cochinilla presenta un reto por ser un insecto difícil de erradicar con insecticidas convencionales, debido a su recubrimiento, por lo que se sugiere la aplicación de los productos en estadios específicos, como las ninfas las cuales son agentes de dispersión y ubicación de alimento y los machos cuya función se centra en la perpetuidad de la especie. (Miller & Kosztarab, 1979). Algunos de los productos usados para el combate del insecto son los monocrotofos, clorpirifos, carbaril, cipermetrina y los organofosforados los cuales tienen afectaciones en estadios específicos como adultos o huevos (Pretorius & Van Ark, 1992)- El empleo de estos productos ocasiona la contaminación del medioambiente, la afectación de insectos benéficos y repercusiones a la salud de los aplicadores y consumidores (Palacios Mendoza et al., 2004). En México, uno de los productos usados para el combate de la cochinilla es el Malathion 1000 E que es un organofosforado, un insecticida de contacto que se asperja de manera directa en los insectos, teniendo un 95% eficiencia (Aguilar

Zamora, 2000). Sin embargo, el compuesto causa daño genético tanto en seres humanos como animales afectando la colinesterasa, a pesar de esto su permanencia en el medio ambiente es de 2 a 4 semanas (Fuentes Matus, Vega y León, Díaz González, Noa Pérez, & Gutiérrez Tolentino, 2010).

1.2.7.4 Tratamiento alternativo

Para el combate de la cochinilla silvestre se han usado mezclas de extractos vegetales con jabones biodegradables, entre los cuales destacan la Cempasúchil, Tween 20, Santa María y Lauril Sulfato de Sodio; Santa María c/ Tween 20, la primera mezcla mencionada (M1) causó que el colorante (ácido carmínico), presente en insectos adultos, adquiriera una textura pastosa y formara grumos cristalizados provocando su muerte, mientras que la segunda mezcla (M2) redujo la población de ninfas en un 90% (Suassuna et al., 2008). Por otro lado, se estudió el efecto de siete concentraciones de jabones biodegradables (Roma y Peak Plus) sobre ninfas (I, II) y hembras de *D. opuntiae*, las ninfas I fueron susceptibles al detergente Roma (0.5%) reduciendo un 50% de la población, mientras que el Peak Plus al 1.5 y 3% afectó a las ninfas II y al resto de la población, el 50% restante respectivamente (Palacios Mendoza et al., 2004). En Cuernavaca, Morelos, México, estudiaron el efecto de seis tratamientos a base de aceites vegetales, en ninfas y hembras adultas de cochinilla silvestre, el resultado fue la reducción poblacional del 77% en el caso del aceite de maíz reciclado y hasta 89% para el aceite de oliva nuevo (Cuevas et al., 2015).

1.2.7.5 Productos del Neem usados en México

Se conocen dos productos el PROGRANIC[®] NeemAcar CE (extracto de Neem + extracto de canela) y el PROGRANIC[®] Nimicide 80 (aceite de las semillas de Neem al 80% + concentrado emulsionante), ambos productos poseen la certificación por parte del Instituto de Revisión de Materiales Orgánicos (OMRI) de acuerdo a los estándares de EUA y Canadá y de BIOAGRICERT, la cual se basa en la Ley de Productos Orgánicos para México.

El Nimicide 80 se emplea para combatir la cochinilla silvestre del nopal, se recomienda una dosis de 3L/Ha + coadyuvante (0.5mL/L de agua) en un volumen de 1700L de agua/Ha, realizando 3 aplicaciones al follaje, cada 7 días.

1.3 Nopal (Opuntia spp.)

El nopal *Opuntia* spp. pertenece a la familia botánica de las cactáceas, plantas de tallos carnosos nativas de América; esta familia cuenta con 125 géneros conocidos, hasta el momento, y 2000 especies descritas, muchas son endémicas, abundantes, diversificadas y ampliamente distribuidas en las zonas áridas y semiáridas de México (Cervantes Ramírez, 2002). En México se cultivan las especies *Opuntia ficus-indica*, *O. xocconxtle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha* (FAO & ICARDA, 2018).

En México, durante 2018 se produjeron 853 mil toneladas de nopal con un valor de 2100 millones de pesos, siendo los principales productores Morelos, Cd. de México, México, Jalisco y Puebla. Durante el 2018 el incremento de exportación de nopal verdura fue de 19.3% en el valor de venta y 4% en volumen, siendo el principal cliente Estados Unidos, el cual adquirió 51 mil 598 toneladas con un valor de 19,224,360 dólares, otros de los consumidores a los cuales se exportó fueron Corea del Sur, Bélgica, Japón, República Checa, etc. (SIAP, 2019).

El nopal ha desarrollado diversas adaptaciones tanto anatómicas, morfológicas y fisiológicas para subsistir, creciendo en ambientes áridos y con severo estrés hídrico (Beccaro et al., 2014). La planta cuenta con raíces xeromórficas, superficiales y carnosas. Poseen cladodios que han evolucionado para la retención de agua, se caracteriza por ser un tallo sin follaje, de forma espatulada-oblonga que puede medir hasta 40 cm de largo y 25 cm de ancho, estos cuentan con yemas cortas que tienen pelos o espinas. Han desarrollado yemas, las cuales son areolas que se transforma a un meristemo que da origen a un nuevo cladodio o una flor. En el caso de formar una flor estas crecen en cladodios de 1 año de edad, se pueden formar hasta 20 yemas florales por cladodio, que después de fertilizarse forman la cáscara de los frutos. Los frutos son bayas comestibles, carnosas y de semillas infértiles con gran cantidad de areolas que rara vez poseen espinas, son de forma ovoide, llegan a medir hasta 8cm de longitud y 5 de ancho y pueden ser de diversos colores dependiendo la variedad de nopal (FAO y ICARDA, 2018).

1.3.1 Plagas del Nopal

Existen más de 160 especies de insectos que causan daños al nopal, los cuales se han adaptado a las condiciones de sus hospederos, se conoce que el 75% de los insectos se

alimentan del nopal de manera interna, el resto ataca los tallos, raíces, cladodios o los frutos. Las plagas que atacan al nopal son: la grana cochinilla (ver sección 1.1.1); los insectos de la familia lepidóptera, donde se sitúan 50% especies de escarabajos de antenas largas del nopal (Cerambycidae) y 66% de picudos del nopal (Curculionidae) y chinches, los cuales se alimentan succionando la planta; las moscas que se alimentan de la superficie, semillas o de las frutas y por último se encuentran los trips, como *Neohydatothrips opuntiae*, que dañan la epidermis del cladodio y de los frutos (FAO & ICARDA, 2018):

1.3.2 Usos del Nopal

El nopal puede usarse para la producción de alimento para consumo humano en forma de nopalitos, al cual se le denomina nopal verdura, y para la producción de tuna, que es el fruto del nopal. También es utilizado como alimento para animales, cuando ya ha alcanzado una madurez de 1 año. (Cervantes Ramírez, 2002).

1.4 Métodos de extracción de metabolitos secundarios en plantas.

Los métodos de extracción de los metabolitos secundarios son muy diversos, y para elegir el más adecuado se debe entender las características de la muestra por ejemplo: el estado en el que se encuentra, si los metabolitos son volátiles, oleoresinosos, resinosos, termolábiles, termoestables, lipofílicos e hidrofílicos (Sierra, Barros, Gómez, Mejía, & Suarez, 2018).

A continuación se describen los principales métodos de extracción de acuerdo a Sierra, Barros, Gómez, Mejía, & Suarez (2018). Decocción, es el proceso donde la planta se pone en agua a cierta temperatura. Inicialmente se hierve el agua a flama baja y posteriormente se adiciona la planta molida, se deja reposar y se filtra.

Soxhlet, es un método de extracción continuo, en el cual la materia prima se coloca en una cámara central para que el solvente evapore por el uso asistido de temperatura hacia el interior de un recipiente, el vapor del solvente asciende al condensador para después gotear sobre el material. La materia vegetal y el solvente son colocados en un balón de destilación el cual se ha acoplado un refrigerante; el solvente se calienta, se evapora y se vuelve a mezclar con la materia vegetal hasta agotarse.

Hidrodestilación, es una técnica selectiva del componente volátil, para ello se inyecta vapor de agua directamente en la mezcla, donde el objetivo es lograr que el compuesto se condense

formando una fase inmiscible que cederá el calor a la mezcla a destilar para lograr la evaporación.

Maceración, técnica sólido-líquido de mayor uso a nivel laboratorio, se caracteriza por el reposo de la materia orgánica en soluciones con diferentes solventes por períodos de tiempo definidos, ya que la materia prima posee compuestos con afinidad al líquido de extracción. La maceración puede ser de dos tipos, dependiendo de la temperatura: fría o caliente. La primera consiste en sumergir la materia vegetal en un recipiente con la suficiente cantidad de solvente para cubrirla, esta se lleva a cabo por un largo lapso de tiempo y se deja a temperatura ambiente, es capaz de extraer la mayor cantidad de compuestos. La maceración por calor, consiste en cubrir la materia prima en el solvente, aplicándole temperatura la cual permite extraer los compuestos en menor tiempo, teniendo como desventaja que no logra extraer totalmente los compuestos ya que durante el proceso algunos o todos pueden degradarse. La maceración acuosa es una técnica simple, consiste en triturar la materia prima, para posteriormente ser colocada en agua. Algunos compuestos activos de la planta poseen menor solubilidad en agua, esto requiere tiempos de permeado largos.

En el caso de las maceraciones alcohólicas, los compuestos que pueden ser extraídos son los limonoides que poseen mayor solubilidad en este tipo de solvente, donde puede usarse el metanol o etanol; estas extracciones son endotérmicas, espontáneas e irreversibles (Chaudhary et al., 2017).

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS e HIPÓTESIS

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo y la producción del nopal verdura se ven afectados por las plagas. El uso de plaguicidas tiene consecuencias negativas a la salud de humanos y animales, algunos de los plaguicidas han caído en desuso o no se encuentran normados oficialmente; esto ha llevado a buscar medidas que sean más amigables con el medio ambiente y que puedan ser autorizadas oficialmente.

2.1 HIPÓTESIS

La reducción poblacional de la cochinilla silvestre será mayor en el extracto etanólico que en el acuoso del polvo de las hojas de Neem, sin tener efecto tóxico en el nopal.

2.2 *Objetivo General*

Evaluar las concentraciones de los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de Neem por medio de aplicaciones directas al nopal hospedero, para determinar el efecto en la densidad poblacional de la cochinilla silvestre.

2.3 *Objetivos Específicos*

- Elaborar extracto acuoso y etanólico de hojas del árbol de Neem por medio de maceración, y determinar su eficacia contra la cochinilla silvestre.
- Determinar los compuestos activos de los extractos y del producto comercial del Neem por medio de HPLC y GC-MS para comparar la cantidad de compuestos y concentración.
- Evaluar el efecto de los extractos acuoso y etanólico de las hojas de Neem en la ninfa I, mediante una prueba *in vitro* para determinar una Dosis Letal 90 DL₉₀.
- Evaluar la densidad poblacional de la cochinilla por medio de observaciones macroscópicas, después de asperjar de manera directa los cladodios con los extractos y con ello determinar su eficiencia como insecticida.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Materiales y equipo

3.1.1 Materiales

- Agua destilada
- Etanol absoluto (99.5% de pureza) J.T Baker[®]
- Estándar de Azadiractina Lote: BCBW9602 (SIGMA ALDRICH[®])
- Metanol y Agua grado HPLC J.T Baker[®]

3.1.2 Equipo

- GC-MS Agilent Technologies[®] 7090A
- HPLC-UV vis Agilent Technologies[®] 7090A
- Refrigerador
- Agitador Orbital Thermo Scientific[®] SHKE 2000
- Bomba de vacío 3KVA UP TRANSFORMER y Vacu Controler[®] V-850
- Rotaevaporador IKA RV 10 BASIC y Büchi Rotavapor[®] R-114
- Centrifuga refrigerada Eppendorf[®] 5702-R y 5804-R.
- Microscopio PRIMOTECH ZEISS[®]
- Molino NUTRIBULLET[®] 600 w

3.2 Diagrama experimental

El diagrama experimental Figura 11, nos muestra cómo se llevaron a cabo cada una de las etapas del trabajo, teniendo así cuatro actividades centrales y estas a su vez subdividiéndose en otras, las cuales serán explicadas a continuación:

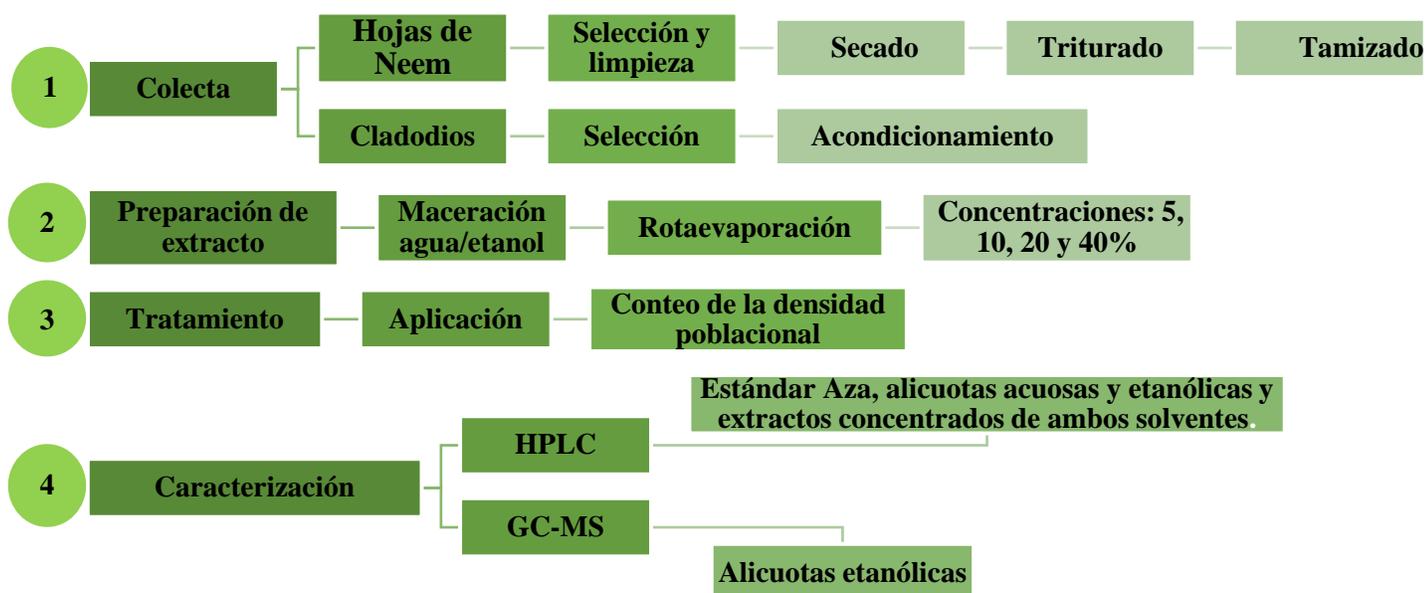


Figura 11. Diagrama de flujo de la experimentación.

3.2.1 Colecta de cladodios

La colecta de cladodios de nopal (*Opuntia ficus-indica*) variedad Milpa Alta-Verdulero, se realizó en el Campus Amazcala de la UAQ coordenadas 20°42'16.9"N 100°15'34.7"W ubicado en el municipio de El Marqués, Querétaro, México; en Abril y Agosto del 2019 donde las temperaturas reportadas para esos meses fueron 11°C mín a 28°C máx y 14°C mín a 27°C máx, respectivamente. La temperatura y humedad en el invernadero del Campus fue de 38°C y 55% humedad relativa, de 11 a 13 horas de la colecta. Se seleccionaron aquellos cladodios con una infestación del 50 a 75% de su superficie, un intervalo de tamaño 15 a 30 cm de largo y 9 a 15 cm de ancho, con una madurez no mayor a 3 meses, textura firme y de color verde claro; se guardaron en bolsas negras para su traslado al invernadero del CICATA. Para su acondicionamiento se colocaron en una estructura metálica con tendedores a una altura de 72 cm del suelo, por el método de raqueta cortada, formando grupos cuya sumatoria

fuese un promedio de 1000 colonias. En la Figura 12 se presenta su distribución, durante este proceso se registraron temperaturas de 9°C mín y 48°C máx y humedad relativa de 55 a 70%.

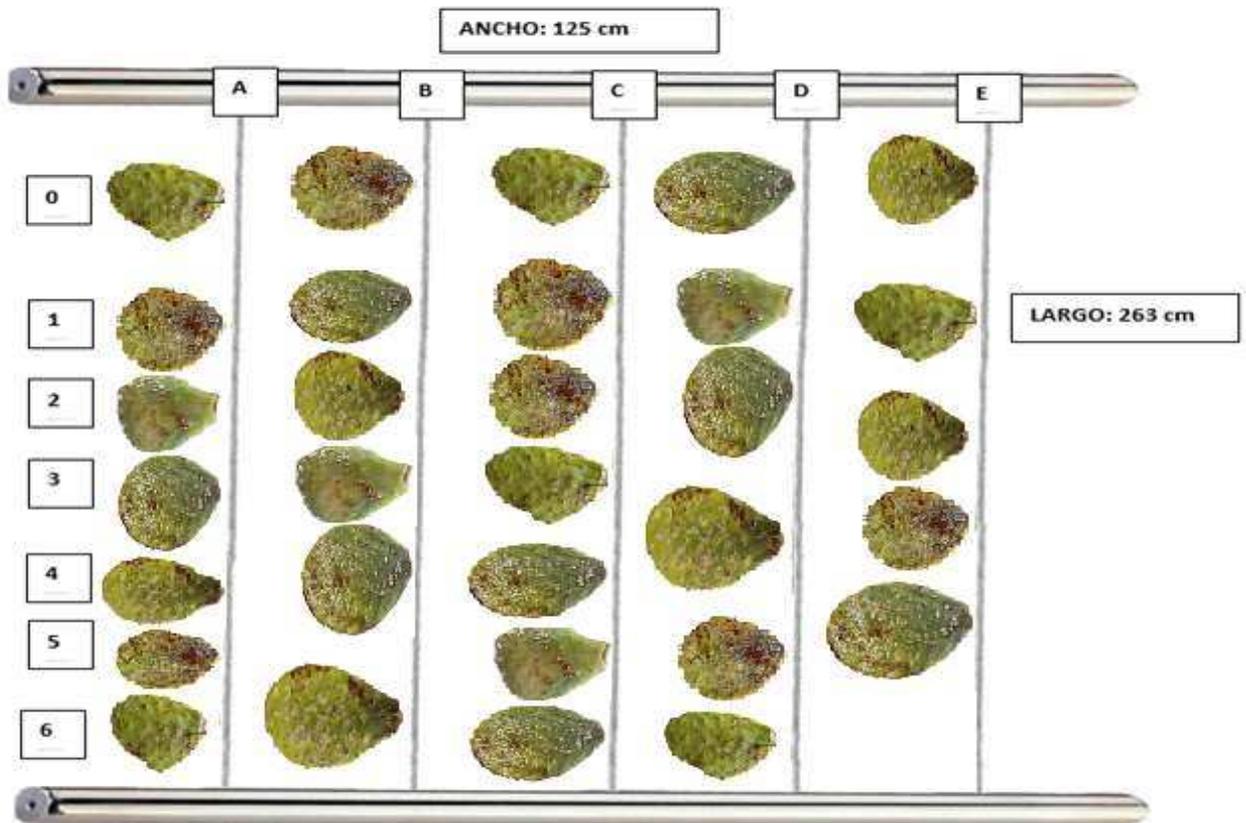


Figura 12. Representación esquemática del acomodo de los cladodios CICATA (Elaboración propia).

3.2.2 Colecta de las hojas de Neem

Las hojas de árboles adultos de Neem de 7 años de edad, fueron colectadas del Campus Jalpan de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) coordenadas 20°35'28"N 100°24'36"O ubicada en el municipio de Jalpan, Querétaro, México; a las 9:00 am en el mes de Marzo y Mayo, las temperaturas y humedades relativas de la región durante esos meses fueron 14°C mín a 32°C máx; 68% y 19°C mín a 35°C máx; 72% respectivamente, las hojas se mantuvieron en bolsas oscuras para su traslado y en refrigeración hasta su uso.

Las hojas fueron separadas del peciolo, seleccionándolas de acuerdo al color y la forma, eliminando aquellas con imperfecciones. Se lavaron con agua destilada para eliminar el polvo o tierra que pudiesen tener; se llevaron a un lugar seco, oscuro y se dejaron secar a temperatura ambiente de 20-25°C sobre papel estraza durante una semana.

Las hojas fueron reselectionadas para eliminar aquellas que no se adecuaron al proceso de secado, realizado esto se procedió a pulverizar las hojas en un molino, este proceso se llevó a cabo bajo condiciones de laboratorio

3.2.3 Tamizado de las hojas pulverizadas del Neem

Las hojas pulverizadas se pasaron por tamices de 74 a 250 μm ; con el propósito de conocer el tamaño de partícula para la elaboración de los extractos, los tamices usados se presentan en la Figura 13; todo el polvo sin importar su tamaño fue usado en la elaboración de los extractos.



Figura 13. Tamices empleados para la selección del tamaño de partícula (Elaboración propia).

3.2.4 Preparación de los extractos por maceración

Las hojas pulverizadas de Neem se colocaron en maceración para cada solvente (etanol absoluto y agua destilada) en matraces de 1000 mL, en proporción 1 g/ 6 ml (1:6), se mantuvieron a temperatura ambiente con agitación constante a 100 rpm en el agitador orbital, para la primera etapa experimental un lapso de 5 días y en la segunda etapa experimental por 3 días. Se tomaron alícuotas de 2 mL cada 24 h, las cuales se pusieron en la centrifuga por 5min a 4°C a 3500 rpm con el propósito de eliminar el precipitado que aún pudiesen tener y guardar el sobrenadante a 4°C hasta su análisis cromatográfico.

Una vez concluidos los tiempos de maceración los extractos se filtraron a vacío con ayuda de una bomba, papel Whatman® No.3, un matraz Kitasato de 1000 mL y un embudo Buchner,

de este proceso se obtuvieron 150 mL que posteriormente se concentraron a vacío por rotaevaporador a una temperatura de 40°C, una velocidad de 100 rpm y a una presión de 58 y 23 mbar para el etanol y agua respectivamente. Obteniendo una pasta de 2 g del concentrado acuoso y 3 g del etanólico en la primera etapa de experimentación (maceración de 5 días) y 2g para cada extracto en la segunda etapa de experimentación (maceración de 3 días); los cuales se utilizaron para preparar las soluciones que fueron asperjadas en los cladodios.

3.2.5 Elaboración de tratamientos

Se preparó una solución stock en agua destilada usando la pasta de los extractos acuosos y etanólicos; a partir de la cual se elaboraron soluciones de 5, 10, 20, 25 y 40%. Por otra parte, como control positivo se utilizó un producto comercial con el que se prepararon soluciones con concentraciones de 0.5, 5, 10 y 25%.

La investigación se dividió en dos etapas; en la primera se utilizaron los extractos acuoso y etanólico de 5 días de maceración, a las diferentes concentraciones, asperjándolas en 28 de 32 cladodios, los cuales fueron colectados al azar por el método de conglomerado. En dicho método no se consideró el tamaño del cladodio, ni el grado de infestación de la cochinilla en éste, los cladodios se colocaron por bloques al azar para cada una de las concentraciones y se aplicaron por triplicado. El diseño experimental consistió de dos tipos de extracto y cuatro dosis, los extractos fueron aplicados por un determinado tiempo; la disminución de la densidad poblacional de los cladodios fue nuestra respuesta.

En el caso de la segunda etapa, se aplicaron las Dosis Letales 90 (DL₉₀) del extracto acuoso y del etanólico obtenidas de la prueba *in vitro*; la colecta de cladodios se realizó de acuerdo a los siguientes criterios de selección: el tamaño de la colonia, color y madurez del cladodio, una vez colocados en el invernadero, se formaron grupos cuya sumatoria de colonias fuese ≥ 1000 , se realizó la prueba por quintuplicado; usándose el diseño experimental antes mencionado.

3.2.6 *Análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)*

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación de alta sensibilidad, el equipo cuenta con un sistema de suministro de disolvente, una válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un ordenador. (Harris, 2016). Ésta técnica se implementó para separar e identificar los compuestos triterpenoides los cuales constituyen la fracción no volátil debido a su peso molecular el cual es superior a 300 Da, por ello se utilizó la Azadiractina como estándar interno.

Las condiciones de HPLC que se utilizaron fueron las de Sharma et al. (2014) con modificaciones, columna C18, temperatura de 35°C, flujo de 1 mL/min, inyección de 20 µL de muestra por automuestreador, condiciones isocráticas, el tiempo de corrida fue de 15 min, con una fase móvil metanol/agua (50:50), y lectura a 220 nm.

Se analizaron las alícuotas etanólicas de los extractos de los días 0, 1, 2, 3, 4 y 5. Se utilizó como estándar Azadiractina (AZA) 0.5 mg/mL en metanol- agua HPLC (1:1) se prepararon las concentraciones de 25, 125 y 250 ppm.

3.2.7 *Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC-MS)*

La cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas es una técnica de separación de compuestos volátiles. Su fundamento base es la de separar los compuestos por su tasa de migración (Harris, 2016). Ésta técnica se empleó para la separación y detección de fenoles, diterpenos, ácidos carboxílicos, etc.

Las condiciones cromatográficas que se utilizaron fueron las de Oshiobugie et al. (2017) columna HP-5MS de 30 m de largo, diámetro interno de 0.320mm, grosor de 0.25 µm, temperatura inicial de 80°C por 2 minutos con incrementos de 10°C/min para una temperatura final de 240°C por 6 minutos; la temperatura del inyector 250°C y fase móvil gas helio, inyección 1 mL de muestra por automuestreador, realizando Splits (Divisiones) 5 y 20, el cual es un modo de como configurar el equipo, donde la muestra se divide antes de entrar a la columna, por lo que es ideal para muestras muy concentradas, se depositaron fracciones de µL en la columna capilar para que el resto de esta muestra se deseche. (Harris, 2001).

3.2.8 *Primera etapa experimental: prueba de campo (Invernadero)*

La prueba de campo consistió en asperjar directamente, con atomizadores manuales, los extractos a los cladodios de nopal en posición vertical. Se aplicó 1mL de cada concentración por ambas caras del cladodio, cada 24h, por 3 días realizando observaciones de la reducción poblacional de la cochinilla, mediante conteos de colonias a los 5, 7, 15 y 21 días postratamiento.

Para los extractos de la primera etapa experimental se usaron cuatro controles negativos los cuales fueron cladodios infestados de cochinilla, dos de ellos se asperjaron con agua, a los otros dos no se les aplicó nada, fueron utilizados como referencia de la densidad poblacional del insecto respecto al tiempo. Las soluciones de los extractos etanólicos, acuosos y del producto comercial se aplicaron por triplicado.

Mientras que aquellos de la segunda etapa experimental, el esquema de tratamiento fue el siguiente: en los controles negativos se usaron nueve cladodios; cuatro de ellos asperjados con agua, los otros cinco fueron los cladodios para conocer la densidad poblacional en función del tiempo, para el extracto etanólico, acuoso y el producto comercial cada uno se hizo por quintuplicado.

3.2.9 *Segunda etapa experimental: prueba in vitro en ninfas I de cochinilla silvestre para determinar DL₉₀.*

Se realizó una prueba *in vitro*, para conocer el efecto de los extractos sobre la ninfa móvil I que es la etapa más susceptible del ciclo biológico de la cochinilla silvestre porque no produce algodóncillo, y determinar las Dosis Letal 90 (DL₉₀) de los extractos acuoso y etanólico. Las ninfas I se colectaron de la superficie del cladodio usando un pincel y se colocaron en cajas Petri de 15 a 20 ninfas, se hizo por triplicado.

Se prepararon 2 mL de los extractos acuoso y etanólico en tubos Eppendorf a las concentraciones de 10, 20, 25, 30 y 40%, para determinar la DL₉₀. Se colocaron 4 µL de

extracto de manera directa a cada ninfa, se observó con microscopio el efecto insecticida a los 30, 60, 120, 240, 480 min y 24 h, para determinar la mortalidad el criterio fue la falta de movimiento en las extremidades de la ninfa y/o la deshidratación/deformación.

3.2.10 Conteo de la densidad poblacional

La estimación de la densidad poblacional de cochinilla se realizó de manera manual para cada cladodio, se contabilizaron las colonias representadas por cúmulos algodonosos que midiesen de 2 mm a 3 cm, se dividió al cladodio en cuadrantes, para posteriormente realizar la suma de ambas caras, esto durante los días 1, 2, 3 (tratamiento) y 5, 7, 15, 21 (postratamiento). Considerando como criterios de mortalidad la deshidratación de la colonia, cambios de coloración en el algodoncillo y la emanación de hemolinfa, basándose en lo descrito por Palacios-Mendoza (2004).

3.2.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la herramienta MiniTab, en la cual se realizaron pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba estadística de Tukey para la comparación de medias de los tratamientos con un intervalo de confianza del 95% y el uso de Excel donde se realizó la prueba Probit para determinar la DL_{90} .

CAPÍTULO 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1 Preparación de los extractos por maceración

Después de macerar en agua y etanol durante 3 y 5 días las hojas de Neem pulverizadas, los extractos se concentraron por rotaevaporación. En la maceración por 3 días se obtuvieron 2 g en forma de pasta para cada uno de los extractos lo cual correspondió al rendimiento del 5% mientras que en la maceración de 5 días, se obtuvo una pasta de 2g del concentrado acuoso y 3g del etanólico, con rendimientos del 5% y 7% respectivamente. El rendimiento de los extractos se calculó usando la ecuación de Happel y Jordan (Ecuación 1), la cual describe: el porcentaje en peso (EO), la cantidad de extracto obtenido (WE; g) y la cantidad de hoja procesada (WS; g) (Esparza Díaz et al., 2010).

$$EO (\%) = \frac{(WE * 100)}{WS}$$

Ecuación 1. Calculo de rendimiento de extractos de acuerdo a Happel y Jordan.

4.2 Análisis por GC-MS

El análisis de las alícuotas tomadas cada 24h durante la maceración de 3 y 5 días se realizó por cromatografía de gases, la información generada por el equipo se basa en la biblioteca del National Institute of Standards and Technology (NIST), la cual se conforma de los siguientes parámetros: número de pico (PK#), tiempo de retención en minutos (RT), área del pico (%), biblioteca/ID, número de referencia (Ref#), número CAS (CAS#) y calidad (Qual), como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplo del reporte de la biblioteca del NIST del equipo GC-MS Agilent Technologies 7090 A.

```

Search Libraries:  C:\Database\NIST08.L           Minimum Quality:  0
Unknown spectrum: Apex minus start of peak
Integration Events: Chemstation Integrator - events.e
  
```

PK#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	1.441	0.26	C:\Database\NIST08.L	80	000124-38-9	4
			Carbon dioxide	74	000075-21-8	3
			Ethylene oxide	81	000124-38-9	3
2	1.545	0.07	C:\Database\NIST08.L	837	000060-29-7	90
			Ethyl ether	838	000060-29-7	78
			Ethane, 1,2-dieethoxy-	8731	000629-14-1	56
3	2.128	0.03	C:\Database\NIST08.L	214	000067-64-1	64
			Acetone	215	000067-64-1	45
			2-Pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-	8094	000123-42-2	9
4	3.465	19.18	C:\Database\NIST08.L	94	000064-17-5	78
			Ethanol	95	000064-17-5	9
			Ethanol	93	000064-17-5	9
5	3.507	47.03	C:\Database\NIST08.L	2399	000461-64-3	5
			Ethyl fluoroformate	107	000067-62-8	4
			Hydroxylamine, O-methyl-	108	000067-62-8	3

En los Anexos 1 y 2 se encuentran los informes del análisis de cromatografía de gases de las muestras etanólicas concentradas de la primera y segunda etapa, 5 y 3 días respectivamente.

Una vez obtenidos los informes, los compuestos se seleccionaron de acuerdo a su área la cual debería ser mayor al 10%, nombre y número CAS que deberían estar presentes de 2 a 3 veces y cuya calidad sea ≥ 70 . En la Tabla 4 se indica por cada muestra de extracto etanólico el total de compuestos, los seleccionados en función de los criterios antes mencionados y su equivalente en porcentaje de estos últimos.

Tabla 4. Compuestos identificados por el GC-MS en los extractos etanólicos de la primera y segunda etapa de experimentación.

Muestra (h)	Primera Etapa			Segunda Etapa		
	Total	Seleccionados	%	Total	Seleccionados	%
1	31	8	18	46	6	13
24	28	8	25	62	12	19
48	19	5	26	44	9	20
72	10	7	70	75	19	25
96	29	6	20	NA		
120	20	4	20	NA		
Concentrada	78	20	25	130	36	28

En la Tabla 4, se puede resaltar que desde las 24 h los extractos etanólicos de la segunda etapa dieron 62 compuestos en total y 75 compuestos a las 72 h, sin embargo, de éstos sólo el 19 y 25% respectivamente se ajustaron a los parámetros. Mientras que aquellos de la primera etapa, la cantidad de compuestos extraídos a las 24, 72 y 120 h fueron de 31, 10 y 20 respectivamente, con porcentajes de aceptación de 25, 70 y 20. De los concentrados en ambas etapas experimentales se extrajeron un total de 130 compuestos de los 3 días de maceración y 78 compuestos de los 5 días de maceración respectivamente, de estos el 28 y el 25% se ajustaron a los parámetros de selección.

Se encontraron 14 compuestos en común en ambas etapas, de los cuales el fitol fue el compuesto mayoritario con 19%, el ácido n-decanoico 13%, la beta-D-glucopiranososa,1,6-anhidro 8%, ácido acético 8% y el 2-propanona, 1- hidroxy 8%.

Por otro lado, con respecto al análisis del extracto acuoso, solo se realizó el del concentrado de 5 días, el cual presentó 45 compuestos de los que fueron seleccionados 11 en base a los criterios antes mencionados, 5 de éstos coincidieron con los reportados para los concentrados etanólicos de 3 y 5 días, los cuales fueron el ácido acético, el ácido 2-hexenoico, fitol, ácido n-decanoico y la beta-D-glucopiranososa. En la Tabla 5 se agruparon aquellos compuestos que pudiesen tener un efecto insecticida.

Tabla 5. Compuestos de los extractos etanólicos y acuosos con efecto insecticida.

No. Compuesto	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Área (%)	Calidad	Efecto
1	ácido acético	28.18	0.31	91	Afectaciones cutáneas e insecticidas.
2	tolueno	6.31	0.06	91	Afectaciones reproductivas, musculoesqueléticas (mamíferos) e insecticidas.
3	2-propenal, 3-fenil	51.52	0.07	95	Insecticida
4	furfural	28.11	0.09	94	Tóxico por ingesta o absorción cutánea, insecticida.
5	ácido propanoico	31.57	0.01	86	Irritante (mamíferos) e insecticida (elaboración).
6	5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehido	80.69	0.52	86	Insecticida

La cantidad de compuestos obtenidos en la primera y segunda etapa de experimentación fue influenciada por el tiempo de maceración, a las 72 h (tres días) la cantidad de compuestos fue siete veces mayor que a los cinco días; mientras que en los concentrados fue aproximadamente el doble como se observó en la Tabla 5. Los compuestos más abundantes fueron los ácidos grasos (28%), ácidos carboxílicos (17%), éteres y furanos (11%); diterpenos, benzaldehídos, cumarinas, fenoles y piranonas (6%). La base etanólica tiende a atraer flavonoides (vanillina y 1,2-benzenediol,3-metoxi), terpenos (fitol) y fenoles (2-metoxi-fenol y 2,6-dimetoxi-fenol) mientras que la base acuosa, podemos encontrar principalmente diterpenos, ácidos grasos y carboxílicos; de forma similar a lo reportado por Perera, Karunaratne, & Chinthaka (2018). En el presente trabajo los compuestos de los extractos que fueron separados e identificados por GC-MS difieren en su mayoría a los obtenidos por Zeringue & Bhatnagar, (1994); Shivashankar, Roy, & Moorthy (2012) y Perera et al., (2018); ya que ellos analizaron directamente el polvo de las hojas de Neem por Headspace-GC-MS. Por otra parte, las variaciones en la cantidad y el tipo de compuestos obtenidos en ambas etapas experimentales pudo estar relacionado en los cuidados durante el acondicionamiento de las hojas, así como con la temporada en que fueron recolectadas durante marzo y mayo con temperaturas y humedades de 14°C mín a 32°C máx; 68% y 19°C mín a 35°C máx; 72% respectivamente; el trabajo de Guo et al., (2015) mencionó que las variaciones de compuestos químicos en diferentes partes de una planta y los efectos que estos causen dependen de las rutas metabólicas y de las condiciones ambientales como luz solar, agua y suelo.

Caracterización del producto comercial

El producto comercial a base de aceite de semilla de Neem, fue analizado por el método Headspace, en el cual fueron caracterizados 186 compuestos, de estos 74 se ajustaron a los criterios de selección antes mencionados, sólo el 12% de los compuestos coinciden con los extractos y concentrados preparados en el presente trabajo, a continuación se enlistan los compuestos: dióxido de carbono, acetona, tolueno, furfural, ácido propanoico, 2-furanmetanol, ácido hexánico y fenol.

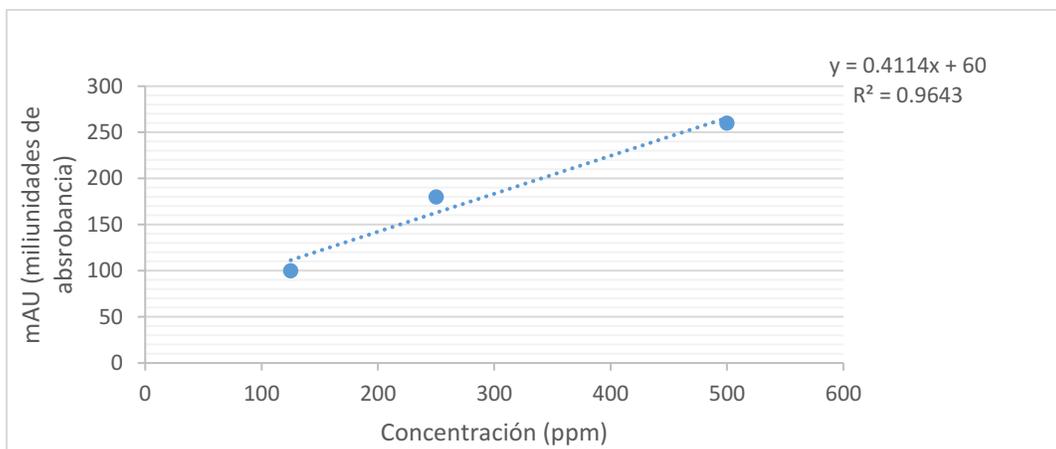


Figura 15. Curva de calibración de la azadiractina a tres diferentes concentraciones (125,250 y 500 ppm).

Las muestras de los extractos se inyectaron en el equipo, durante este proceso no se logró determinar el compuesto, por lo cual se dan posibles explicaciones del porque pudo pasar esto.

El trabajo de Morgan, (2009) reportó que el contenido de azadiractina en las hojas es de 0.009% mientras que en la semilla es de 0.03% por lo que es tres veces más en la semilla que en la hoja, la azadiractina comienza a producirse hasta los 10 años de edad en el árbol (National Research Council, 1992). Por otro lado, Priyanka et al. (2010) estimó que la cantidad máxima de azadiractina es de 4000µg/g de peso seco de los granos, en árboles de edad media, de entre 20 a 40 años; en el presente trabajo se emplearon las hojas, las cuales fueron colectadas de árboles de 7 años de edad. El contenido de azadiractina y de otros metabolitos secundarios depende de la condiciones abióticas donde se encuentre el árbol de acuerdo a Guo et al., (2015).

4.5 Nivel de infestación de los cladodios colectados

El grado de infestación de los cladodios se determinó en función del número de colonias de cochinilla silvestre, la superficie cubierta por las colonias y el área total del cladodio (Rangel Estrada et al., 2013), Figura 16; la figura nos muestra cada uno de los grados de infestación que pudieron observarse en el transcurso de las dos etapas experimentales, siendo la de mayor variedad, la primera etapa; mientras que la segunda etapa se observó solo dos grados de infestación, cada uno de los grados de infestación indica el porcentaje de la cochinilla en el cladodio, siendo así que un grado 4 corresponde del 25 al 50 % de la superficie del cladodio cubierta por cochinilla.



Figura 16. Grado de infestación de los cladodios colectados: 2 (A), 3 (B), 4 (C), 5 (D) y 6 (E).

En la colecta de la primera etapa (abril) el 50% de los cladodios obtuvieron un grado 4 de infestación, sin embargo en la segunda etapa (agosto) el 57% resultó con el mismo grado, en la Tabla 6, se muestran los grados de infestación de los 60 cladodios colectados.

Tabla 6. Grados de infestación de los cladodios, colectados en la primera y segunda etapa experimental.

Cladodios Colectados	Grados de infestación					Total
	2	3	4	5	6	
1ª Etapa	1	7	16	5	3	32
2ª Etapa	--	--	16	12	--	28

4.6 Efecto de los tratamientos en la mortalidad de la cochinilla silvestre.

A los cladodios, antes de ser tratados con los extractos, se les determinó su densidad poblacional la cual fue de 61 a 182 colonias y de 122 a 231 colonias para los grupos de la primera y segunda etapa experimental respectivamente.

En el momento que los extractos fueron asperjados, el acuoso causó la emanación de hemolinfa y cambio de coloración en el algodoncillo, mientras que el extracto etanólico, además de provocar la emanación de hemolinfa, causó la deshidratación de la colonia y con ello un cambio de coloración. Para ambos casos, desde la emanación de la hemolinfa, se definió la mortalidad de los individuos dentro de la colonia, de acuerdo a los criterios descritos por Palacios et al., (2004) y Torres et al., (2019) los cuales son: deshidratación de la colonia, cambio de coloración en el algodoncillo y la emanación de hemolinfa (ácido carmínico).

4.7 Primera etapa experimental: análisis del efecto de las concentraciones de los extractos en los cladodios infestados por cochinilla silvestre.

En la Figura 17, se presenta los histogramas de 7 tratamientos probados contra la cochinilla silvestre, donde se tomaron los días más relevantes de la experimentación, los cuales nos indican el efecto del extracto acuoso a las concentraciones 5, 10, 20 y 40% sobre el porcentaje de la densidad poblacional de la cochinilla silvestre durante el día 1 a 3 del tratamiento y las observaciones postratamiento hasta el día 21.

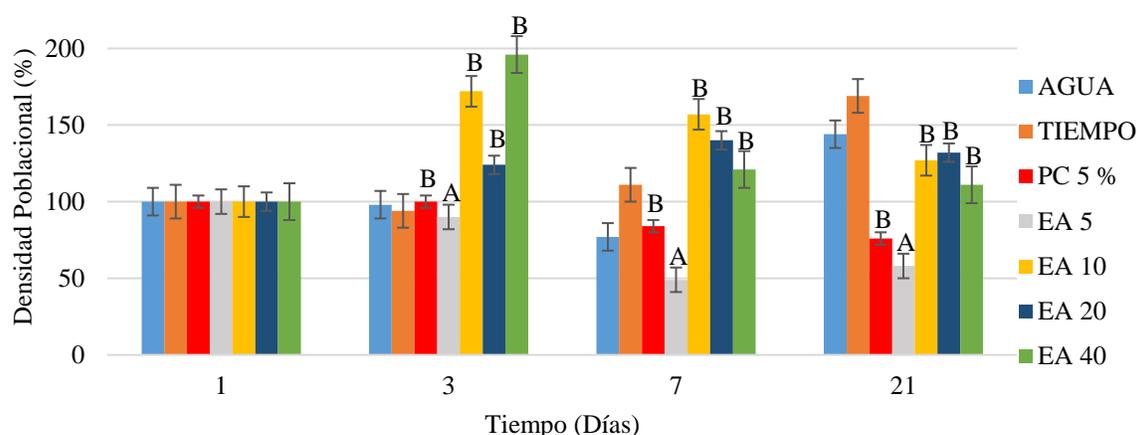


Figura 17. Densidad poblacional de cochinilla silvestre en cladodios asperjados con los extractos acuosos (EA), $n=3$; ($x \pm$ Error Estándar).

El efecto bioinsecticida se observó con la concentración al 5%, al día 7 redujo 51% la densidad poblacional de cochinilla silvestre y al día 21 obtuvo 45% de reducción, sin embargo el resto de las concentraciones, 10, 20 y 40%, incrementaron la densidad poblacional 60, 25 y 90% respectivamente al día 3.

Para el producto comercial (PC) se utilizaron las concentraciones de 0.5 y 5%, sólo esta última presentó efecto bioinsecticida, con una reducción poblacional de 35% al día 21; los controles negativos agua y tiempo estuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad. El aumento en la densidad poblacional probablemente se debió a que el volumen asperjado no fue el suficiente para impregnar a todas las colonias, por otra parte, no se conocía el porcentaje de cada uno de los instares o fases de desarrollo de la cochinilla en la colonia, además de los factores abióticos como temperatura y humedad relativa extremas (9°C mín a 48°C máx y 55-70%) no fueron impedimento para su proliferación en el invernadero, de acuerdo a los estudios de López Rodríguez, Méndez Gallegos, & Vanegas

Rico (2018) y Palafox *et al.*, (2018), Matadamas *et al.*, (2016) reportó que las variaciones de temperatura superiores de 35°C acortan el ciclo biológico del insecto. En cuanto a los controles de agua y tiempo, estos tuvieron un comportamiento de acuerdo a la conformación de una colonia típica de cochinilla silvestre, es decir, estaba conformada por ninfas, hembras y machos, basado en Torres *et al.*, (2019). Toda esta evidencia nos demostró como al no tener condiciones controladas de temperatura y humedad se puede acelerar el ciclo biológico del insecto, además de que también nos otorgó información de cómo se pueden estructurar las colonias en base a que estadios se encuentran dentro de los cúmulos y que al no conocer el número exacto de individuos por estadio que hay adentro de ellos, la tasa de generación de cochinilla se ve incrementada.

La Figura 18, se presenta los histogramas de los tratamientos probados contra la cochinilla silvestre, se muestran los días más relevantes de la experimentación y se explica el efecto del extracto etanólico a las concentraciones 5, 10, 20 y 40% sobre el porcentaje de la densidad poblacional de la cochinilla silvestre durante los días de tratamiento 1 a 3 y hasta el día 21.

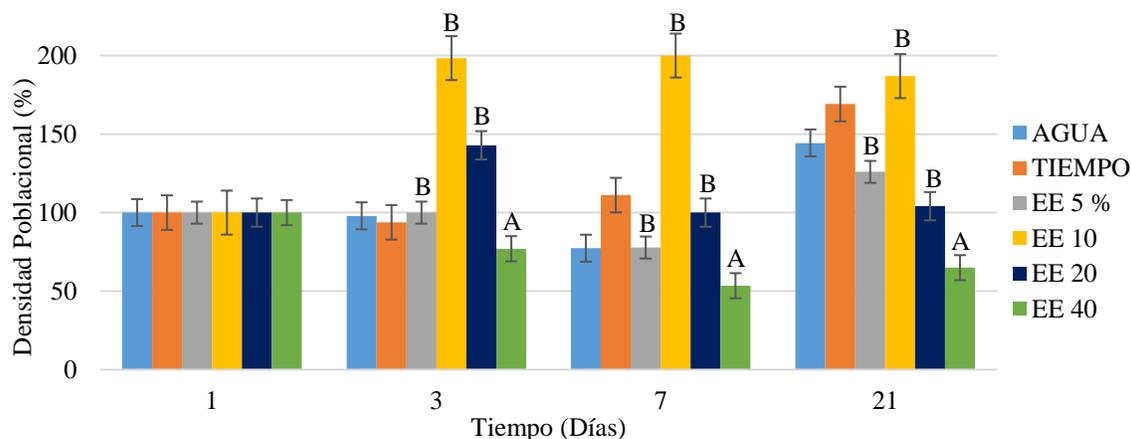


Figura 18. Densidad poblacional de cochinilla silvestre en cladodios asperjados con los extractos etanólicos (EE), $n=3$; ($\bar{x} \pm$ Error Estándar).

La concentración 40% presentó efecto bioinsecticida reduciendo 23% al día 3 y manteniéndose hasta el día 21 con 35%, sin embargo los grupos que recibieron los extractos al 10 y 20% incrementaron su densidad poblacional al doble y 43% respectivamente al día 3. Este incremento puede atribuirse a que el volumen administrado no fue el suficiente para impregnar a todas las colonias, la proporción de las diversas fases del desarrollo de la

cochinilla en los cúmulos algodonosos y los factores abióticos de temperatura y humedad. Los controles de agua y tiempo tuvieron un comportamiento de acuerdo a la constitución de una colonia típica de cochinilla silvestre.

4.7.1 Análisis estadístico primera etapa

Los datos estadísticos de la primera etapa experimental, presentados en la Tabla 7, nos muestran que no hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p= 0.123$), la prueba de Tukey nos mostró que hay igualdad en todos los tratamientos, sin embargo, en cuestión del porcentaje de mortalidad, el más relevante fue el extracto acuoso (EA) al 5%, con un 45% de eficiencia.

Tabla 7. Prueba de Tukey de los tratamientos, primera etapa experimental, con 95% de intervalo de confianza.

Tratamiento (%)	Promedio (\bar{x})	Desviación Estándar	Mortalidad (%)	Agrupación
EA 5	38	16	45	A
EE 40	37	11	32	A
PC 5	14	13	25	A

**Extracto Acuoso (EA), Extracto Etanólico (EE) y Producto Comercial (PC).
Los tratamientos que no comparten una letra son significativamente diferentes.
95% de intervalo de confianza**

La Tabla 8 nos muestra la comparación de Tukey de los tratamientos de la primera etapa experimental con un intervalo de confianza del 75%, donde podemos observar que no existe diferencia significativa entre ninguno de ellos.

Tabla 8. Prueba de Tukey de los tratamientos, primera etapa experimental, con 75% de intervalo de confianza.

Tratamiento (%)	Promedio (\bar{x})	Desviación Estándar	Mortalidad (%)	Agrupación
EA 5	38	16	45	A
EE 40	37	11	32	A
PC 5	14	13	25	A

Extracto Acuoso (EA), Extracto Etanólico (EE) y Producto Comercial (PC).
 Los tratamientos que no comparten una letra son significativamente diferentes.
 75% de intervalo de confianza

4.8 Segunda Etapa experimental: Determinación *in vitro* de la DL_{90} y su aplicación en cladodios

La prueba *in vitro* se realizó para determinar la DL_{90} en las ninfas I de cochinilla silvestre, los extractos etanólicos al 40, 30 y 20 % tuvieron una eficiencia bioinsecticida del 100% y del 90% a la concentración 10%. En el caso del extracto acuoso, las concentraciones del 40, 30 y 20% tuvieron porcentajes de eficiencia del 100, 98 y 88 % respectivamente, siendo 25% la concentración que obtuvo 90% de eficiencia.

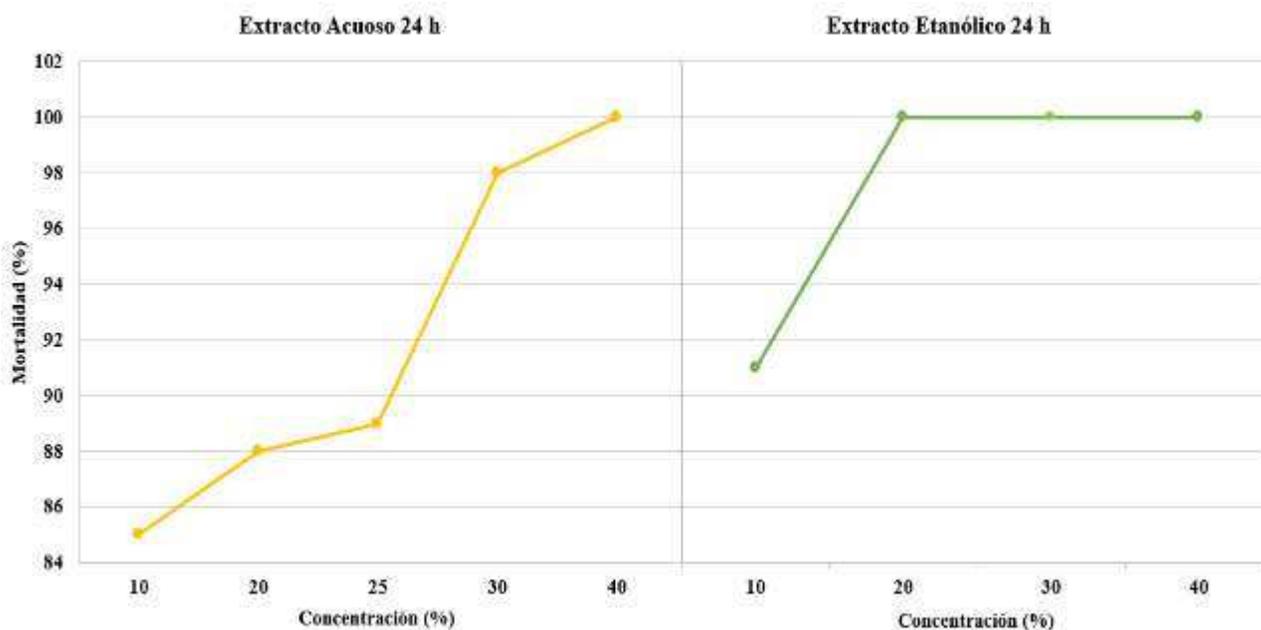


Figura 19. Mortalidad de las ninfas I tratadas con los extractos acuosos (EA) y extractos etanólicos (EE) en la prueba *in vitro*.

La Figura 19, describe el comportamiento de las concentraciones acuosas, las cuales fueron aplicadas en las ninfas I de cochinilla silvestre, la concentración al 25% causó 90% de mortalidad de ninfas I a las 24h. En el caso de las concentraciones etanólicas desde los 30 min, presentaron 100% de mortalidad, con excepción de la concentración 10% la cual obtuvo 91% de mortalidad.

Para corroborar dicho porcentaje de mortalidad en las pruebas *in vitro*, se realizó el análisis Probit Tabla 9, la cual permite calcular la Concentración Letal, Efectiva e Inhibitoria (CL, CE, CI) en cualquier porcentaje de la población en estudio, esto se obtuvo transformando las concentraciones a logaritmos y los porcentajes de mortalidad a unidades Probit conformando el criterio dosis-respuesta, para obtener la pendiente e intercepto, y generar la CL₉₀.

El análisis Probit precisó la CL₉₀: 23% del extracto acuoso y CL₉₀: 16% extracto etanólico, mientras que las obtenidas en el laboratorio fueron de 25% y 10% para los extractos acuoso y etanólico, respectivamente. Siendo estas últimas las que se asperjaron a los cladodios.

Tabla 9. Determinación de CL90 de acuerdo al análisis Probit.

Concentración	Mortalidad (%)	Unidad Probit
EE 10	91	6.34
20	100	7.33
30	100	7.33
40	100	7.33
EA 10	85	6.04
20	88	6.18
25	89	6.23
30	98	7.05
40	100	7.33
Extracto Etanólico (EE) y Extracto Acuoso (EA)		

En la Figura 20, se presenta el efecto del extracto acuoso 25%, extracto etanólico al 10%, el producto comercial al 10 y 25%, y los controles negativos agua y tiempo sobre el porcentaje de la densidad poblacional de la cochinilla silvestre durante los días de tratamiento 1 a 3 y hasta el 21 día de observación.

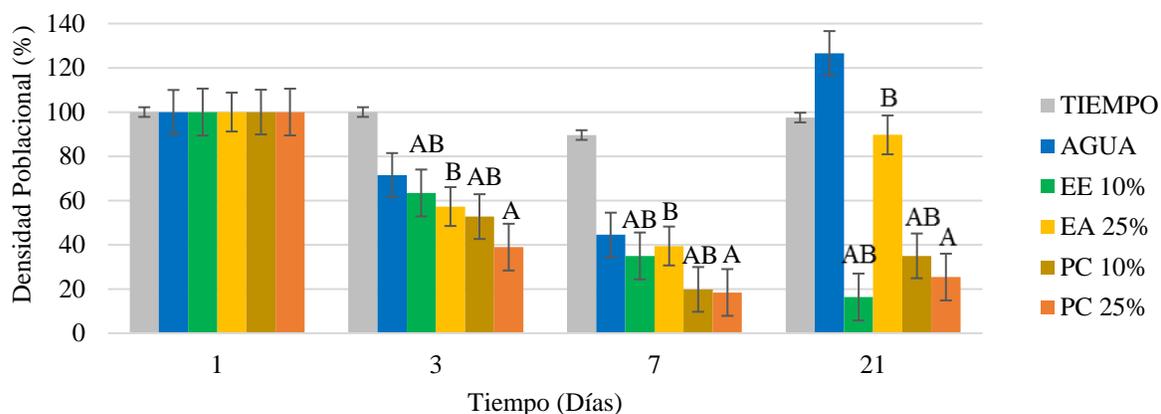


Figura 20. Densidad poblacional de cochinilla silvestre en cladodios asperjados con los extractos etanólico (EE), acuoso (EA), producto comercial (PC) y controles (Tiempo y Agua), $n=5$; ($x \pm$ Error Estándar).

En el día 7 el efecto bioinsecticida se observó de manera similar en ambos extractos, reduciendo la densidad 65% y 60% en el etanólico y acuoso respectivamente; aunque el mayor descenso poblacional del 84% se presentó al día 21 con el extracto etanólico. Con respecto al producto comercial el efecto bioinsecticida fue de 80% al día 7; no obstante al día 21 bajó de forma no significativa su efectividad al 65 y 75% en su concentraciones de 10 y 25% respectivamente. En cuanto al control de agua causó reducción de 45% al día 7, repuntando su población 27% al día 21, con base a lo visto en la primera etapa experimental, el incremento en la densidad poblacional de la cochinilla silvestre se liga con las condiciones abióticas de acuerdo a Torres *et al.*, (2019), a su vez que éstas podrían tener relación con la puesta de huevos en las hembras o que se mejoró el intercambio de gases en los huevos, a su vez que esto causa una competencia entre ellas para poder encontrar un lugar adecuado en cladodio para poder alojarse, también que la etapa ninfal I no duró más de una semana antes de realizar el siguiente cambio y involucrarse en la cubierta algodonosa.

4.8.1 Análisis estadístico segunda etapa

Los datos estadísticos de la Tabla 10, maceración de 3 días mostraron que no hay diferencia significativa entre los tratamientos ($p= 0.250$), la prueba de Tukey comprobó que hay igualdad en todos los tratamientos, sin embargo en cuestión del porcentaje de mortalidad los tratamientos más relevantes fueron el EE 10% con 84% de mortalidad, y en el PC 25% con 75%.

Tabla 10. Prueba de Tukey de los tratamientos, segunda etapa experimental, intervalo de confianza 95%.

Tratamiento (%)	Promedio (\bar{x})	Desviación Estándar	Mortalidad (%)	Agrupación
EA 25	38	26	10	A
EE 10	62	23	84	A
PC 10	64	16	65	A
PC 25	73	11	75	A

**Extracto Acuoso (EA), Extracto Etanólico (EE) y Producto Comercial (PC).
Los tratamientos que no comparten una letra son significativamente diferentes.
95% de intervalo de confianza**

La prueba de Tukey de la Tabla 11, con el intervalo de confianza al 75%, se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos, específicamente entre el extracto acuoso y su contraparte del producto comercial, donde el extracto no posee el mejor efecto contra la cochinilla silvestre, mientras el producto comercial lo tiene, por otra parte el efecto entre extracto etanólico y del producto comercial al 10% poseen el mismo efecto.

Tabla 11. Prueba de Tukey de los tratamientos, segunda etapa experimental, intervalo de confianza 75%.

Tratamiento (%)	Promedio (\bar{x})	Desviación Estándar	Mortalidad (%)	Agrupación
EA 25	38	26	10	B
EE 10	62	23	84	AB
PC 10	64	16	65	AB
PC 25	73	11	75	A

**Extracto acuoso (EA), extracto etanólico (EE) y producto comercial (PC).
Los tratamientos que no comparten una letra son significativamente diferentes.
75% de intervalo de confianza**

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

1. El análisis por cromatografía de gases, confirmó que en los extractos obtenidos por el proceso de maceración hay diversidad de compuestos, de éstos, siete poseen actividad insecticida, los cuales son el ácido acético, etanol, tolueno, 2-propenal, 3-fenil, furfural, ácido propanoico y el 5-(hidroximetil)-2-furancarboxaldehído.
2. Se determinó que a menor tiempo de maceración se extrajeron mayor cantidad de compuestos, 130 y 78 a los 3 y 5 días de maceración respectivamente.
3. La prueba *in vitro* confirmó la susceptibilidad de las ninfas I de cochinilla silvestre con ambos extractos, encontrando las DL_{90} : 25% acuoso y DL_{90} : 10% etanólico.
4. El efecto de las CL_{90} en los cladodios infestados con cochinilla silvestre, causó 84% de mortalidad al día 21 con el extracto etanólico a diferencia del extracto acuoso su máximo efecto de mortalidad fue 61% al día 7.
5. El producto comercial mostró 80% de mortalidad al día 7 de observación en ambas concentraciones de 10 y 25%, mostrando una actividad residual de 65 y 75% al día 21.
6. Se comparó la eficiencia de los extractos contra un producto comercial, demostrando que las hojas del Neem son buena opción incluso ante productos elaborados a base de semilla del mismo árbol, incluso llegando a tener efecto de permanencia por el mismo tiempo de tratamiento.

REFERENCIAS

1. Adnan, S. M., Uddin, M. M., Alam, M. J., Islam, M. S., Kashem, M. A., Rafii, M. Y., & Latif, M. A. (2014). Management of mango hopper, *Idioscopus clypealis*, using chemical insecticides and Neem oil. *Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/709614>
2. Aguilar Zamora, A. A. (2000). Control de la grana cochinilla del nopal verdura en el Distrito Federal. Chapingo, México: Grupo Produce A.C. Distrito Federal. Retrieved from <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/1522>
3. Barrek, S., Paise, O., & Grenier-Loustalot, M. F. (2004). Analysis of neem oils by LC-MS and degradation kinetics of azadirachtin-A in a controlled environment : Characterization of degradation products by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 753–763. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2377-0>
4. Beccaro, G. L., Bonvegna, L., Donno, D., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., Nieddu, G., ... Bounous, G. (2014). *Opuntia* spp. biodiversity conservation and utilization on the Cape Verde Islands. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 62(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0133-2>
5. Benelli, G., Canale, A., Toniolo, C., Higuchi, A., Murugan, K., Pavela, R., & Nicoletti, M. (2017). Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? *Natural Product Research*, 31(4), 369–386. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1214834>
6. Biswas, G. C. (2013). Comparative Effectiveness of Neem extracts and Synthetic Organic Insecticide Against Mustard Aphid. *Bangladesh J. Agril. Res.*, 38(2), 181–187. Retrieved from <https://www.banglajol.info/index.php/BJAR/article/view/15881/11258>
7. Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R. K., & Bandyopadhyay, U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*, 82(11), 1336–1345. <https://doi.org/http://www.iisc.ernet.in/currsci/jun102002/1336.pdf>
8. Boursier, C. ., Bosco, D., Coulibaly, A., & Negre, M. (2011). Are traditional neem extract preparations as efficient as the azadirachtin A commercial formulation? *AperTO - Archivio Istituzionale Open Access Dell'Università Di Torino*, (April). <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.11.022>
9. Bryant P. (2006). Associated with cochineal on prickly pear - *Hyperaspis trifurcata*. 10 06 2020, de Iowa State University Department of Entomology Sitio web: <https://bugguide.net/node/view/80641>
10. Campos, E. V. R., de Oliveira, J. L., Pascoli, M., de Lima, R., & Fraceto, L. F. (2016). Neem Oil and Crop Protection: From Now to the Future. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01494>
11. Cervantes Ramírez, M. C. (2002). *Plantas de Importancia Económica en las zonas*

- áridas y semiáridas de México* (Primera). México. Retrieved from <http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/127/120/416-1>
12. Chaudhary, S., Kanwar, R. K., Sehgal, A., Cahill, D. M., Barrow, C. J., Sehgal, R., & Kanwar, J. R. (2017). Progress on Azadirachta indica Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *Frontiers in Plant Science*, 8(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00610>
 13. Córdova Albores, L. C., Torres De los Santos, Rodolfo Adriano Anaya, M. de L., Flores García, R., & Salvador Figueroa, M. (2013). Extractos fermentados de hojas de Azadirachta indica A. Juss para el combate de insectos plaga. *Quehacer Científico En Chiapas*, 8(2), 69–79.
 14. Cruz Fernández, M., & Del Ángel Sánchez, R. (2004). El Árbol De Nim, Establecimiento y Aprovechamiento en la Huasteca Potosina. San Luis Potosí, México. Retrieved from <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/Docs-descargar/FOLL.TEC.003.pdf>
 15. Cruz Rodríguez, J. A., González Machorro, E., & Villegas, A. (2010). A1-397 Control autónomo de la cochinilla silvestre (*Dactylopius opuntiae* Cockerell) en una plantación de nopal tunero con manejo ecológico. Retrieved from <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Eu1WQL3MzKsJ:sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/53267+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx>
 16. Cuevas Salgado, M. I., Castañeda Templos, F. A., & Romero Nápoles, C. (2015). Aceites vegetales comestibles como alternativa de control para cochinilla silvestre del nopal *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Homoptera: Dactylopiidae), bajo condiciones de campo. *Boletín de La Sociedad Mexicana de Entomología*, 1, 64–70. Retrieved from [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:o4AszHkDLcJ:www.socmexent.org/boletin/revista/2015Julio/064%2520\(64-70\).pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:o4AszHkDLcJ:www.socmexent.org/boletin/revista/2015Julio/064%2520(64-70).pdf+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx)
 17. De Lotto, G. (1974). On the status and identity of the cochineal insects (Homoptera: Coccoidea: Dactylopiidae). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa*, 37(1), 167–193.
 18. Esparza Díaz, G., López Collado, J., Villanueva Jiménez, J. A., Osorio Acosta, F., Otero Colina, G., & Camacho Díaz, E. (2010). Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de Azadirachta indica A. Juss. *Agrociencia*, 44(7), 821–833. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v44n7/v44n7a8.pdf>
 19. FAO, & ICARDA. (2018). *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*. (P. Inglese, C. Mondragon Jacobo, A. Nefzaoui, & C. Sáenz, Eds.), *Producido por La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y el Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/i7628es/I7628ES.pdf>
 20. Ferro, N., Tacoronte, J. E., Montero, L. A., Cabrera Pedroso, M. T., & Zaldo, A.

- (2005). Ecdiesteroides II . Propiedades geométricas y electrónicas : una aproximación QSAR para determinar el potencial de actividad biológica. *CENIC Ciencias Químicas*, 36(2). Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/1816/181620581007.pdf>
21. Flores-Hernández, A., Murillo-Amador, B., Rueda-Puente, E. O., Salazar-Torres, J. C., García-Hernández, J. L., & Troyo-Diéguez, E. (2006). Reproducción de cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Homóptera: Dactylopiidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 77(1), 97–102. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2006.001.321>
 22. Fuentes Matus, C., Vega y León, S., Díaz González, G., Noa Pérez, M., & Gutiérrez Tolentino, R. (2010). Determinación de residuos de malatión y malaoxón en mango de las variedades ataulfo y tommy atkins producidos en chahuities, Oaxaca. *Agrociencia*, 215–223. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v44n2/v44n2a10.pdf>
 23. Gahukar, R. T. (2014). Factors affecting content and bioefficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) phytochemicals used in agricultural pest control: A review. *Crop Protection*, 62, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.014>
 24. Guo, S. S., You, C. X., Liang, J. Y., Zhang, W. J., Geng, Z. F., Wang, C. F., ... Lei, N. (2015). Chemical composition and bioactivities of the essential oil from *Etlingera yunnanensis* against two stored product insects. *Molecules*, 20(9), 15735–15747. <https://doi.org/10.3390/molecules200915735>
 25. Harris, D. C. (2016). *Análisis químico cuantitativo*. (REVERTÉ, Ed.) (Tercera). China Lake, California. Retrieved from https://www.academia.edu/40610014/Análisis_químico_cuantitativo_3a_ed_nodrm?auto=download
 26. Harris C.D.. (2001). *Quantitative Chemical Analysis*. Fifth Edition. Barcelona: Reverté S.A
 27. Hernández Hernández, F. D. L. C., García Gil de Muñoz, F., del Río Dueñas, I., & Lanz Mendoza, H. (2005). La cochinilla fina del nopal, colorante mexicano para el mundo. Pdf. *Ciencia*, 78–86.
 28. Hemberger R. (2009). Fly associated with cochineal - *Leucopis bellula*. 10 06 2020, de Iowa State University Department of Entomology Sitio web: <https://bugguide.net/node/view/361647/bgpape>
 29. Jarvis, A. P., Johnson, S., & Morgan, E. D. (1998). Stability of the natural insecticide azadirachtin in aqueous and organic solvents. *Pesticide Science*, 53(3), 217–222. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199807\)53:3<217::AID-PS766>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199807)53:3<217::AID-PS766>3.0.CO;2-9)
 30. Kumar, D., Rahal, A., & Malik, J. K. (2016). Neem Extract. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 585–597. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00043-7>
 31. Kumar Pillai, V. (2016). Hojas de Neem. Recuperado 22 de abril de 2020.

- https://es.123rf.com/profile_vinodpillai?page=1&word=neem&srch_lang=es&reverse_search_mobile=&mediapopup=63077571.
32. López Pantoja, Y., Angulo Escalante, M., Martínez Rodríguez, C., Soto Beltrán, J., & Chaidez Quiroz, C. (2007). Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. (Spanish). *Bioquímica*, 32(4), 117–125. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=28692274&lang=es&site=ehost-live>
 33. López Rodríguez, P., Méndez Gallegos, S. de J., & Vanegas Rico, J. M. (2018). Demographic statistics of *Dactylopius opuntiae* Cockerrell (Hemiptera: Dactylopiidae) under greenhouse conditions. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 17(December), 31–42. <https://doi.org/10.5154/r.rchsza.2018.05.012>
 34. Lord Zimlich R. (2012). Barber's Brown Lacewing - *Symphorobius barberi*. 10 06 2020, de Iowa State University Department of Entomology Sitio web: <https://bugguide.net/node/view/621133/bgpage>
 35. Martínez Puc, J. F., & Medina Medina, L. A. (2011). Evaluación de la resistencia del ácaro *Varroa destructor* al fluvalinato en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 2(1), 93–99.
 36. Matadamas Ortíz, E. J., & Zamorano Rojas, M. de la P. (2016). Manual para la producción de grana cochinilla. México. Retrieved from [icamex.edomex.gob.mx/sites/icamex.edomex.gob.mx/files/files/publicaciones/2016/GRANA COCHINILLA 2016.pdf](http://icamex.edomex.gob.mx/sites/icamex.edomex.gob.mx/files/files/publicaciones/2016/GRANA%20COCHINILLA%202016.pdf)
 37. Mena Covarrubias, J., & Rosas Gallegos, S. (2004). Guía para el manejo integrado de las plagas del nopal tunero. México. Retrieved from <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/2069>
 38. Miller, D. R., & Kosztarab, M. (1979). Study of Scale Insects ! *Annual Reviews Entomology*, 24, 1–27. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/234149927_Recent_Advances_in_the_Study_of_Scale_Insects
 39. Morgan, E. D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(12), 4096–4105. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.11.081>
 40. Mukherjee, A., & Sengupta, S. (2013). Characterization of nimbidol as a potent intestinal disaccharidase and glucoamylase inhibitor present in *Azadirachta indica* (neem) useful for the treatment of diabetes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(5), 900–910. <https://doi.org/10.3109/14756366.2012.694877>
 41. National Research Council. (1992). *Neem: A Tree for Solving Global Problems*. <https://doi.org/https://doi.org/10.17226/1924>
 42. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Salannin, CID=6437066, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Salannin> (accessed on

- Apr. 22, 2020).
43. Oshiobugie, M. J., Olaniyi, A. M., & Aderele, O. R. (2017). AAS and GC-MS Analysis of Phytochemicals in the Leaf, Stem and Root of *Azadirachta indica* A. Juss (Dongoyaro). *British Journal of Pharmaceutical Research*, 15(4), 1–12. <https://doi.org/10.9734/bjpr/2017/30611>
 44. Pacheco Rueda, I., Lomelí Flores, J. R., Rodríguez- Leyva, E., & Ramírez-Delgado, M. (2010). Ciclo de vida y parámetros poblacionales de *Symphorobius barberi* Banks (Neuroptera: Hemerobiidae) criado con *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Hemiptera: Dactylopiidae). *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 27(2), 325–340. <https://doi.org/10.21829/azm.2011.272756>
 45. Palacios Mendoza, C., Nieto Hernández, R., Llanderal Cázares, C., & González Hernández, H. (2004). Efectividad biológica de productos biodegradables para el control de la cochinilla silvestre *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Homoptera: Dactylopiidae). *Acta Zoologica Mexicana*, 20(3), 99–106. <https://doi.org/10.21829/azm.2004.2012000>
 46. Palafox-Luna, J. A., Rodríguez-Leyva, E., Lomeli-Flores, J. R., Viguera-Guzmán, A. L., & Vanegas-Rico, J. M. (2018). Ciclo De Vida Y Fecundidad De *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) EN *Opuntia ficus-indica* (Caryophyllales: Cactaceae). *Agrociencia*, 52(1), 103–114.
 47. Pandey, G., Verma, K. K., & Singh, M. (2014). Evaluation Of Phytochemical , Antibacterial And Free Radical Scavenging Properties Of *Azadirachta Indica* (Neem) Leaves. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 10–13. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/286690118>
 48. Pereira, V. V., Kumar, D., Agiwal, M., & Prasad, T. G. (2019). Stability of azadirachtin : A tetranortriterpenoid from Neem tree, 7(6), 412–419. Retrieved from <http://www.chemjournal.com/archives/?year=2019&vol=7&issue=6&ArticleId=7605&si=false>
 49. Perera, A. G. W. U., Karunaratne, M. M. S. C., & Chinthaka, S. D. M. (2018). Bioactivity and Volatile Profiling of *Azadirachta indica* Leaves for the Management of Maize Weevil, *Sitophilus zeamais* (Motsch.) Infestations. *Journal of Tropical Forestry and Environment*, 8(1), 10–24. <https://doi.org/10.31357/jtfe.v8i1.3479>
 50. Pretorius, M. W., & Van Ark, H. (1992). Further insecticide trials for the control of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) as well as *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) on spineless cactus. *Phytophylactina*, 24(November 1991), 229–233. Retrieved from https://journals.co.za/content/phyto/14/3/AJA03701263_1471
 51. Pelikan S. (2018). *Laetilia coccidivora*. 10 06 2020, de Iowa State University Department of Entomology Sitio web: <https://bugguide.net/node/view/1569441/bgimage>
 52. Priyanka, S., Rekha, H. R., Mithilesh, S., & Rakhi, C. (2010). Assessment of age and morphometric parameters of seeds on azadirachtin production in neem seed

- kernels collected from various ecotypes. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 14(1), 24–28. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/230785452%0A>
53. Rajkumar, P., Murari, P., & Nand, K. S. (2011). Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): A mini review. *Cancer Biology and Therapy*, 12(6), 467–476. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.6.16850>
 54. Rangel Estrada, S. ., Ramírez Rojas, S., & Osuna Canizalez, F. . (2013). Manejo de Picudo de Nopal, Cochinilla y Mancha Negra en Morelos. México. Retrieved from <https://www.google.com/url?client=internal-element-cse&cx=013537588134044823115:m6u9zxtp6yu&q=http://siafemor.inifap.gob.mx/anec/pdf/descargables/46/46.pdf&sa=U&ved=2ahUKEwivzYbepd7nAhXQqZ4KHU11DaYQFjAAegQIBBAB&usg=AOvVaw2fh2PqTa9a-2NR4fvrqLLM>
 55. Rodrigo, E., Catalá Oltra, M., & Granero, M. (2010). Estudio comparativo de la morfología y biología de *Dactylopius coccus* Costa y *D. opuntiae* (Cockerell) (Hemiptera : Dactylopiidae), dos especies presentes en la Comunidad Valenciana. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 36, 23–35. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3321570>
 56. Sharma, V., Walia, S., Kumar, J., Nair, M. G., & Parmar, B. S. (2014). An Efficient Method for the Purification and Characterization of Nematicidal Azadirachtins A , B , and H , Using MPLC ... *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(August 2003), 3966–3972. <https://doi.org/10.1021/jf0342167>
 57. Shivashankar, S., Roy, T. K., & Moorthy, P. N. K. (2012). Headspace Solid Phase Micro Extraction and GC / MS Analysis of the Volatile Components in Seed and Cake of *Azadirachta indica* A . juss . *Chemical Bulletin of “Politehnica” University of Timisoara, Romania*, 57(71), 1–6.
 58. SIAP. (2019). Panorama Agroalimentario 2019. Retrieved February 12, 2020, from https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/
 59. Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suarez, D. (2018). *Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. Uniagraria*. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/329197168_PRODUCTOS_NATURALES_S_METABOLITOS_SECUNDARIOS_Y_ACEITES_ESENCIALES](https://www.researchgate.net/publication/329197168_PRODUCTOS_NATURALES_METABOLITOS_SECUNDARIOS_Y_ACEITES_ESENCIALES)
 60. Suassuna, P., Portillo, L., & Viguera, A. (2008). Pruebas de control de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) con extractos vegetales en el Nordeste de Brasil. *Grana Chochinilla y Colorante Natural*, (July 2018), 78–80. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/326410105%0APRUEBAS>
 61. Tiwari, R., Verma Kumar, A., Chakraborty, S., Dhama, K., & Singh Vir, S. (2014a). Neem(*azadirachta indica*)and its Potential for Safeguarding Health of Animals and Humans: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(2), 110–123. <https://doi.org/10.3923/jbs.2014.110.123>
 62. Tiwari, R., Verma Kumar, A., Chakraborty, S., Dhama, K., & Singh Vir, S.

- (2014b). Neem (*Azadirachta indica*) and its potential for safeguarding health of animals and humans: A Review. *Journal of Biological Sciences*, 14(2), 110–123. <https://doi.org/10.3923/jbs.2014.110.123>
63. Torres Gabriola, K., & Cuevas Salgado, M. I. (2019). Control de *Dactylopius opuntiae* Cockerell, 1929 (Hemiptera: Dactylopiidae) con aceites vegetales reciclados bajo condiciones de laboratorio. *Entomología Mexicana*, 6, 134–139. Retrieved from http://www.entomologia.socmexent.org/revista/2019/EA/EA_134-139.pdf
64. Vergara Pineda, S. (2019). Morfología de *Dactylopius opuntiae* Cockerell (Reporte interno). Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Juriquilla, Facultad de Ciencias Naturales.
65. Villamil Montero, D. A., Naranjo, N., & Van Strahlen, M. A. (2012). Efecto insecticida del extracto de semillas de Neem (*Azadirachta indica*) sobre *Collaria scenica*, Stal (Hemiptera: Miridae). *EntomoBrasilis*, 5(2), 125–129. <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v5i2.224>
66. Zamora, M. C., Martínez, A. M., Nieto, M. S., Schneider, M. I., Figueroa, J. I., & Pineda, S. (2008). Sistema de Información Científica Cogollero Activity of Several Biorational Insecticides Against the Fall Armyworm. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 351–357.
67. Zeringue, H. J., & Bhatnagar, D. (1994). Effects of neem leaf volatiles on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3543–3547. <https://doi.org/10.1128/aem.60.10.3543-3547.1994>

ANEXOS

Anexo 1. Reporte extracto etanólico concentrado 5 días de maceración

Library Search Report

Acq On : 05 Apr 2019 14:08

ALS Vial : 3 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST08.L Minimum Quality:0

Unknown Spectrum: Apex minus start of peak

Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	1.437	0.82	C:\Database\NIST08.L			
			Carbon dioxide	80	000124-38-9	4
			Ethylene oxide	74	000075-21-8	3
			Carbon dioxide	81	000124-38-9	3
2	1.711	0.03	C:\Database\NIST08.L			
			4-Iodo-3-methoxyamphetamine	129441	1000124-02-9	28
			Benzeneethanamine, 4-fluoro-.beta.	48498	103439-06-1	28
			,3-dihydroxy-N-methyl-			
			Pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione, 5-ami	28049	1000270-67-7	9
			no-6-nitroso-			
3	2.168	0.01	C:\Database\NIST08.L			
			Acetone	215	000067-64-1	9
			Methyl Isobutyl Ketone	3839	000108-10-1	9
			Acetone	214	000067-64-1	7
4	3.587	35.65	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol	94	000064-17-5	83
			Ethanol	93	000064-17-5	9
			Ethanol	95	000064-17-5	9
5	4.008	5.11	C:\Database\NIST08.L			
			Dimethyl ether	97	000115-10-6	5
			Propylene Glycol	931	000057-55-6	5
			Dimethyl ether	96	000115-10-6	5
6	4.111	3.23	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol	95	000064-17-5	9
			Dimethyl ether	97	000115-10-6	5
			Ethanol	93	000064-17-5	4
7	4.172	3.90	C:\Database\NIST08.L			
			Dimethyl ether	96	000115-10-6	5
			Dimethyl ether	97	000115-10-6	5
			Ethanol	95	000064-17-5	4
8	4.251	3.00	C:\Database\NIST08.L			
			Hydrazine, methyl-	104	000060-34-4	5
			Thietane, 3-methyl-	2064	022438-40-0	4
			1-Propanol, 3-mercapto-	2405	019721-22-3	4
9	4.311	2.09	C:\Database\NIST08.L			
			Octane, 1-methoxy-	20820	000929-56-6	9
			Formic acid, 1-methylethyl ester	2055	000625-55-8	7
			Methoxyacetyl chloride	5172	038870-89-2	7
10	4.355	1.72	C:\Database\NIST08.L			

			Octane, 1-methoxy-	20820	000929-56-6	5
			Pentane, 1-methoxy-	4404	000628-80-8	4
			Ethanol, 2-[4-(1-pyridin-3-ylmethy lpiperidin-4-yl)piperazin-1-yl]-	139688	1000302-83-4	4
11	4.391	3.06	C:\Database\NIST08.L			
			Formic acid, 1-methylethyl ester	2055	000625-55-8	9
			Formic acid, 1-methylethyl ester	2057	000625-55-8	9
			Formic acid, 1-methylethyl ester	2058	000625-55-8	7
12	4.453	1.71	C:\Database\NIST08.L			
			Butane, 1-methoxy-2-methyl-	4444	062016-48-2	9
			Methane, nitroso-	91	000865-40-7	4
			Ethanol, 2-methoxy-	934	000109-86-4	4
13	4.487	0.83	C:\Database\NIST08.L			
			1-Methoxymethylthiopropane	9165	1000197-01-3	9
			Methane, nitroso-	91	000865-40-7	4
			Dimethyl-cyano-phosphine	1848	031641-57-3	4
14	4.509	1.76	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol	95	000064-17-5	7
			Ethanol	94	000064-17-5	7
			Hydrazine, methyl-	101	000060-34-4	5
15	4.545	3.67	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol	93	000064-17-5	7
			Ethanol	95	000064-17-5	7
			Ethanol	94	000064-17-5	4
16	4.620	0.80	C:\Database\NIST08.L			
			1,2-Propanediol, 3-methoxy-	4942	000623-39-2	9
			Tripropylene glycol monomethyl eth er	4946	036887-04-4	9
			Formic acid, 1-methylethyl ester	2055	000625-55-8	5
17	6.310	0.06	C:\Database\NIST08.L			
			Toluene	2434	000108-88-3	91
			Toluene	2432	000108-88-3	91
			1,3,5-Cycloheptatriene	2449	000544-25-2	91
18	11.359	0.04	C:\Database\NIST08.L			
			1H-Pyrrole, 1-methyl-	1115	000096-54-8	91
			1H-Pyrrole, 1-methyl-	1118	000096-54-8	90
			Bi-2-cyclohexen-1-yl	31610	001541-20-4	72
19	20.448	0.09	C:\Database\NIST08.L			
			2-Propanone, 1-hydroxy-	813	000116-09-6	59
			2-Propanone, 1-hydroxy-	811	000116-09-6	45
			2-Propanone, 1-hydroxy-	812	000116-09-6	7
20	28.209	0.22	C:\Database\NIST08.L			
			Acetic acid	263	000064-19-7	91
			Acetic acid	261	000064-19-7	90
			Acetic acid	260	000064-19-7	90
21	28.718	0.04	C:\Database\NIST08.L			
			Propanoic acid, 2-oxo-, methyl est er	4201	000600-22-6	45
			Propanoic acid, 2-oxo-, methyl est er	4203	000600-22-6	9
			Cycloserine	4148	000068-41-7	7

22	36.720	0.06	C:\Database\NIST08.L 2-Furanmethanol 2-Furanmethanol 2-Furanmethanol	3053 3058 3055	000098-00-0 000098-00-0 000098-00-0	95 95 95
23	40.534	0.04	C:\Database\NIST08.L 1,3-Cyclopentanedione 1,2-Cyclopentanedione 2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-	3070 3069 3088	003859-41-4 003008-40-0 010493-98-8	80 80 72
24	41.795	0.09	C:\Database\NIST08.L 2-Butenoic acid, 3-methyl- 2-Butenoic acid, 3-methyl- 2-Butenoic acid, 3-methyl-	3661 3664 3665	000541-47-9 000541-47-9 000541-47-9	46 46 41
25	43.088	0.06	C:\Database\NIST08.L 1-Oxa-3,4-diazacyclopentadiene Cyclohexanol, 2-amino-1-methyl-4-(1-methylethyl)- Isomenthylamine	494 27360 27336	000288-99-3 006756-99-6 004894-99-9	37 25 17
26	43.289	0.41	C:\Database\NIST08.L 1,3-Pentadiene, 5-(2,2-dimethylcyclopropyl)-2,4-dimethyl-, (Z or E)- Cyclopropanecarboxylic acid, 2-bromo-2-methyl-, methyl ester 1,3-Bis-(2-cyclopropyl,2-methylcyclopropyl)-but-2-en-1-one	33114 53341 104376	1000150-39-6 1000267-45-9 1000222-08-6	25 12 12
27	43.634	0.12	C:\Database\NIST08.L Heptanoic acid Hexanoic acid Hexanoic acid	13275 7995 7996	000111-14-8 000142-62-1 000142-62-1	46 43 43
28	48.914	0.25	C:\Database\NIST08.L 2-Hexenoic acid 2-Hexenoic acid, (E)- 2-Hexenoic acid, (E)-	7112 7126 7131	001191-04-4 013419-69-7 013419-69-7	93 91 62
29	49.981	1.30	C:\Database\NIST08.L Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.) Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl- Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-	16802 16757 16765	006876-13-7 000473-55-2 000473-55-2	60 49 43
30	50.015	0.09	C:\Database\NIST08.L Bicyclo[4.1.0]heptan-2-one, 6-methyl- Spiro[3.4]octan-5-one Dicyclobutylidene oxide	10448 10374 10382	014845-41-1 010468-36-7 037677-06-8	50 47 32
31	50.054	0.15	C:\Database\NIST08.L 7-Methyl-1,6-octadiene 6,6-Dimethyl-cyclooct-4-enone Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-	10534 24717 24810	042152-47-6 1000194-10-0 007764-50-3	55 49 45
32	50.077	0.08	C:\Database\NIST08.L Dichloroacetic acid, dodecyl ester 1-Dodecene 1-Dodecanol	133196 35937 49034	083005-01-0 000112-41-4 000112-53-8	35 35 25

33	50.109	0.30	C:\Database\NIST08.L 1-Azabicyclo[3.2.1]octane, 6-methyl-, endo-Hydroxylamine, O-(3-methylbutyl)-	10805	1000197-30-9	27
			1-Azabicyclo[2.2.2]octane, 3-methyl-	4581	019411-65-5	27
				10794	000695-88-5	27
34	50.201	1.06	C:\Database\NIST08.L 1H-Imidazole-1-propanoic acid, alpha-hydroxy-, (S)-	28146	051103-59-4	38
			Furan, 2-methyl-	1165	000534-22-5	38
			Cyclodecene, 3-bromo-	71208	056325-56-5	38
35	51.991	0.13	C:\Database\NIST08.L Oxirane, dodecyl-	68891	003234-28-4	35
			Cyclohexanol, 1-ethynyl-	10389	000078-27-3	22
			Cyclohexane, 1-methyl-4-(1-methylphenyl)-, trans-	16797	001124-25-0	22
36	53.621	0.17	C:\Database\NIST08.L Cyclohexanol, 1-ethynyl-	10389	000078-27-3	47
			3-Fluorobenzoic acid, undec-10-enyl ester	130677	1000279-01-2	35
			4-Fluorobenzoic acid, undec-10-enyl ester	130678	1000279-02-8	35
37	53.830	0.02	C:\Database\NIST08.L 1-Ethynyl-1-cyclooctanol	24689	055373-76-7	38
			9,12-Tetradecadien-1-ol, (Z,E)-	67169	051937-00-9	37
			Bicyclo[2.2.1]heptane, 1,3,3-trimethyl-	16759	006248-88-0	35
38	55.184	0.15	C:\Database\NIST08.L 2-Propanone, 1,3-dihydroxy-	2251	000096-26-4	40
			1-Propanol, 2-methyl-	851	000078-83-1	10
			Formaldehyde, dimethylhydrazone	639	002035-89-4	9
39	70.708	0.18	C:\Database\NIST08.L 4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	20368	028564-83-2	91
			2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one	20360	010230-62-3	42
			l-Alanine, N-butoxycarbonyl-, pentyl ester	104721	1000313-35-5	38
40	73.503	0.40	C:\Database\NIST08.L Glycerin	2403	000056-81-5	47
			Glycerin	2404	000056-81-5	47
			Glycerin	2402	000056-81-5	38
41	77.449	0.04	C:\Database\NIST08.L Benzofuran, 2,3-dihydro-	9283	000496-16-2	56
			1H-Imidazo(4,5-d)pyridazine	9173	000273-00-7	50
			Benzofuran, 2,3-dihydro-	9282	000496-16-2	50
42	81.232	0.04	C:\Database\NIST08.L 2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxyethyl)-	11004	000067-47-0	94
			2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxyethyl)-	11003	000067-47-0	91
			Furan, 2,3-dihydro-4-(1-methylpropyl)-, (S)-	11368	034379-54-9	72

43	81.741	0.39	C:\Database\NIST08.L				
			n-Decanoic acid	38605	000334-48-5	59	
			Nonanoic acid	29618	000112-05-0	45	
			Nonanoic acid	29620	000112-05-0	43	
44	82.171	0.05	C:\Database\NIST08.L				
			Silane, trimethyl-1-propenyl-, (Z)	7341	004964-02-7	35	
			Propane, 1,2-dimethoxy-	4734	007778-85-0	22	
			Butanedioic acid, 2,3-dimethyl-, dimethyl ester	40555	028306-68-5	16	
45	83.767	0.04	C:\Database\NIST08.L				
			2-Cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, cis-	24923	001197-06-4	62	
			Cyclohexene, 3,3,5-trimethyl-	10572	000503-45-7	58	
			2,6-Dimethylfluorobenzene	10484	000443-88-9	49	
46	83.908	0.07	C:\Database\NIST08.L				
			2,3,5,6-Tetrafluoroanisole	44904	002324-98-3	64	
			Theobromine	44939	000083-67-0	47	
			(E)-Stilbene	44655	000103-30-0	40	
47	85.816	0.60	C:\Database\NIST08.L				
			9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	130796	000301-00-8	91	
			11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester	151903	055682-88-7	83	
			3-Dodecen-1-yne, (E)-	33044	025091-25-2	58	
48	86.485	6.02	C:\Database\NIST08.L				
			Phytol	133804	000150-86-7	90	
			Phytol	133806	000150-86-7	90	
			Phytol	133803	000150-86-7	74	
49	87.021	0.08	C:\Database\NIST08.L				
			2,4,6-Trimethoxybenzonitrile	53652	002571-54-2	46	
			Benzo[f]quinoline, 2-methyl-	53970	039258-30-5	43	
			Pyrazole, 5-methyl-3-(5-nitro-2-furyl)-	54057	016239-90-0	43	
50	88.292	0.65	C:\Database\NIST08.L				
			Undecanoic acid	48788	000112-37-8	55	
			n-Decanoic acid	38606	000334-48-5	53	
			n-Decanoic acid	38605	000334-48-5	53	
51	92.011	0.07	C:\Database\NIST08.L				
			2-Propenoic acid, 3-phenyl-	22900	000621-82-9	95	
			trans-Cinnamic acid	22888	000140-10-3	93	
			2-Propenoic acid, 3-phenyl-	22905	000621-82-9	91	
52	93.328	0.32	C:\Database\NIST08.L				
			5-Hydroxypipicolic acid	21023	1000133-09-0	53	
			N,N'-Trimethyleneurea	3584	001852-17-1	47	
			Imidazole, 5-fluoro-2-methyl-	3577	071516-19-3	47	
53	94.097	0.24	C:\Database\NIST08.L				
			2-Hexanol, 3,4-dimethyl-	13557	019550-05-1	40	
			Octane, 1-methoxy-	20810	000929-56-6	33	
			1,3-Cyclopentanediol, cis-	4255	016326-97-9	32	
54	94.736	3.26	C:\Database\NIST08.L				
			n-Decanoic acid	38606	000334-48-5	53	

			Undecanoic acid	48789	000112-37-8	50
			n-Decanoic acid	38605	000334-48-5	47
55	95.399	0.03	C:\Database\NIST08.L			
			1,4-Benzenediol, 2-methoxy-	18110	000824-46-4	30
			1,2-Benzenediol, 3-methoxy-	18105	000934-00-9	27
			1,2-Benzenediol, 3-methoxy-	18109	000934-00-9	18
56	95.813	0.07	C:\Database\NIST08.L			
			8-Hexadecenal, 14-methyl-, (Z)-	99536	060609-53-2	46
			cis-11-Hexadecenal	88713	053939-28-9	43
			13-Octadecenal, (Z)-	110398	058594-45-9	43
57	96.409	0.02	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol, 2-[2-(2-butoxyethoxy)ethoxy]-	63460	000143-22-6	43
			Ethyl 2,3-epoxybutyrate	13091	019780-35-9	43
			15-Crown-5	74086	033100-27-5	43
58	96.711	0.01	C:\Database\NIST08.L			
			1H-Phosphole, 2,5-dihydro-1,3-dimethyl-	7273	015450-84-7	22
			Spiro[1,3-dioxolane-2,2'-[6,7]diazabicyclo[3.2.2]non-6-ene]	46653	1000142-34-9	22
			Ethyl 2-hexenoate	19380	027829-72-7	22
59	96.870	0.02	C:\Database\NIST08.L			
			2-Mercaptobenzothiazole	35281	000149-30-4	47
			1-Naphthaleneacetonitrile	35195	000132-75-2	38
			2-Mercaptobenzothiazole	35282	000149-30-4	38
60	97.368	0.15	C:\Database\NIST08.L			
			2-Furanone, 3,4-dihydroxytetrahydr	8585	1000198-03-7	40
			Hexane, 1-fluoro-	4818	000373-14-8	27
			n-Pentanol, 3-methyl-5-[1-cycloaza	20088	1000251-59-9	22
			propyl]-			
61	97.636	0.14	C:\Database\NIST08.L			
			n-Decanoic acid	38605	000334-48-5	43
			Decanoic acid, silver(1+) salt	119103	013126-67-5	43
			n-Decanoic acid	38609	000334-48-5	38
62	97.785	0.04	C:\Database\NIST08.L			
			Methyl 2-[(1H-2-oxo-4-pyrimidinyl)amino]-propanoate	57265	128765-61-7	43
			2,5-Dimethylhydroquinone	17099	001321-28-4	38
			Benzene, 1-methyl-2-(methylthio)-	17233	014092-00-3	38
63	98.006	0.08	C:\Database\NIST08.L			
			2-[2-[2-[2-(2-Butoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol	131747	1000352-05-1	27
			Heptaethylene glycol monododecyl ether	212777	003055-97-8	22
			2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(Trimethylsilyloxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol	215219	1000352-06-6	22
64	98.150	0.09	C:\Database\NIST08.L			
			2,6-Dimethylbicyclo[3.2.1]octane	16727	1000215-28-2	38
			Cyclohexene,1-heptyl-	44612	015232-86-7	25
			1,3-Pentadiene, 2,3-dimethyl-	2894	001113-56-0	25

65	98.437	0.14	C:\Database\NIST08.L			
			3-Dibutylamino-1-propyne	35169	006336-58-9	53
			3-Butylindolizidine	45306	1000111-48-2	50
			Pyrrolo[1,2-c]oxazol-1(3H)-one, tetrahydro 7a-acetyl-3-(1,1-dimethylethyl)-	78692	086046-29-9	50
66	99.014	0.43	C:\Database\NIST08.L			
			Octaethylene glycol	182492	1000289-34-2	49
			2-[2-[2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol	133106	1000352-04-0	47
			Hexagol	122202	002615-15-8	47
67	99.360	1.10	C:\Database\NIST08.L			
			n-Decanoic acid	38609	000334-48-5	49
			Ethanone, 1-(4,5-dihydro-2-thiazolyl)-	12700	029926-41-8	38
			Octanoic Acid	20563	000124-07-2	30
68	99.594	0.30	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol, 2-bromo-	10128	000540-51-2	22
			Methyl nonyl ether	29070	007289-51-2	22
			Z-1,6-Tridecadiene	44610	1000130-98-3	20
69	99.761	1.27	C:\Database\NIST08.L			
			2-Butenedioic acid (Z)-, monododecyl ester	124289	002424-61-5	72
			1-Dodecanol	49040	000112-53-8	64
			n-Pentadecanol	81357	000629-76-5	62
70	99.952	0.39	C:\Database\NIST08.L			
			9,10-Diazatricyclo[4.4.0.0(2,8)]dec-9-ene	16063	1000142-35-1	47
			1H-Inden-1-one, 2,3,4,5,6,7-hexahydro-	16317	022118-00-9	47
			1,Z-5,E-7-Dodecatriene	33050	083085-83-0	43
71	100.140	0.54	C:\Database\NIST08.L			
			5-Ethylcyclopent-1-ene-1-carboxylic acid	18272	036258-07-8	30
			5,5,8a-Trimethyldecalin-1-one	54766	1000195-96-1	27
			1-Methyl-3-n-propyl-2-pyrazolin-5-one	18054	031272-04-5	27
72	100.583	1.24	C:\Database\NIST08.L			
			6-Tetradecyne	54852	003730-08-3	81
			11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	153173	002463-02-7	81
			7-Hexadecyne	76620	074685-28-2	80
73	100.974	0.36	C:\Database\NIST08.L			
			Propanal, 2,2-dimethyl-	1770	000630-19-3	27
			6,8-Dioxo-3-thiabicyclo(3,2,1)octane 3,3-dioxide	33172	069697-60-5	25
			Oxirane, [(dodecyloxy)methyl]-	91853	002461-18-9	22
74	101.096	0.44	C:\Database\NIST08.L			
			4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	44172	1000297-95-5	91
			2,5-Dihydroxy-4-isopropyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one	44201	054755-56-5	47
			(4-Methylphenylthio)acetone	44225	001200-13-1	46

75	101.614	0.12	C:\Database\NIST08.L				
			3-Tetradecen-5-yne, (Z)-	53210	074663-68-6	59	
			1,3-Cyclooctadiene	5362	001700-10-3	50	
			2-Methylenebicyclo[2.2.1]-heptane	5439	000497-35-8	50	
76	101.796	6.58	C:\Database\NIST08.L				
			9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	130796	000301-00-8	90	
			11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester	151903	055682-88-7	87	
			cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatriene	85640	056797-43-4	86	
77	102.375	1.08	C:\Database\NIST08.L				
			D-Allose	44771	002595-97-3	90	
			.beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	31825	000498-07-7	83	
			.beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	31824	000498-07-7	80	
78	102.706	0.56	C:\Database\NIST08.L				
			2-Propenoic acid, 3-[(phenylmethyl)thio]-, (E)-	54148	013831-01-1	32	
			Benzenemethanamine, N-hydroxy-N-(phenylmethyl)-	69542	000621-07-8	25	
			Alanine, N-methyl-N-benzyloxycarbonyl-, benzyl ester	156525	1000329-49-7	22	

LIQUIDOS AU...COLWAX60 M.M Mon Apr 08 10:24:12 2019

Anexo 2. Reporte extracto etanólico concentrado 3 días de maceración

Library Search Report

Acq On : 30 Sep 2019 17:53

ALS Vial : 6 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST08.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex minus start of peak

Integration Events: ChemStation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	1.450	0.71	C:\Database\NIST08.L			
			Carbon dioxide	80	000124-38-9	4
			Ethylene oxide	74	000075-21-8	3
			Carbon dioxide	81	000124-38-9	3
2	1.714	0.18	C:\Database\NIST08.L			
			1,2,5-Oxadiazol-3-carboxamide, 4,4	124788	1000294-17-4	9
			'-azobis-, 2,2'-dioxide			
			2-Pentanethiol	4757	002084-19-7	7
			Propane, 1-chloro-2-methyl-	2419	000513-36-0	7
3	2.123	0.05	C:\Database\NIST08.L			
			Acetone	215	000067-64-1	64
			Acetone	213	000067-64-1	64
			Acetone	214	000067-64-1	64
4	2.203	0.02	C:\Database\NIST08.L			
			5,9-Dodecadien-2-one, 6,10-dimethyl-	65616	1000132-10-9	37
			1-, (E,E)-			
			3-Oxetanol, 2,2,3-trimethyl-	8065	025910-96-7	36
			N-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-.beta.-d	204201	1000286-43-3	10
			-glucopyranosyl)-glycine, ethyl ester			
5	3.439	45.74	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol	94	000064-17-5	83
			Ethanol	93	000064-17-5	9
			Ethanol	95	000064-17-5	9
6	4.188	4.06	C:\Database\NIST08.L			
			2-Propanone, 1-(1,3-dioxolan-2-yl)	13124	000767-04-4	5
			4(5H)-Thiazolone, 2-imino-	7856	000556-90-1	4
			2-Pentanol, nitrate	14439	021981-48-6	4
7	4.411	0.27	C:\Database\NIST08.L			
			Methoxyacetyl chloride	5172	038870-89-2	4
			Ethanol	95	000064-17-5	4
			Ethanol	93	000064-17-5	4
8	4.436	1.01	C:\Database\NIST08.L			

			1-Propanol, 2-ethoxy-	4718	019089-47-5	40
			Isopropyl Alcohol	294	000067-63-0	7
			Isopropyl Alcohol	296	000067-63-0	7
9	4.558	0.32	C:\Database\NIST08.L			
			1-Propanesulfonic acid, methyl ester	16852	002697-50-9	9
			1,2-Propanediol diformate	14080	053818-14-7	7
			Dimethyl ether	97	000115-10-6	5
10	4.616	0.13	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol, 2-methoxy-, carbonate (2:1)	43276	000626-84-6	9
			Hexane, 1,6-dimethoxy-	21776	013179-98-1	4
			Ethanol	94	000064-17-5	4
11	4.964	0.62	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol	93	000064-17-5	9
			Ethanol	94	000064-17-5	9
			Ethanol	95	000064-17-5	7
12	5.037	2.01	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanol	95	000064-17-5	9
			Ethanol	93	000064-17-5	7
			Ethanol	94	000064-17-5	7
13	5.167	1.45	C:\Database\NIST08.L			
			Ethylamine	85	000075-04-7	4
			1,3-Dithiolan-2-one	9061	002080-58-2	4
			Ethanol	93	000064-17-5	3
14	5.520	0.55	C:\Database\NIST08.L			
			Acetic acid, hydroxy-, ethyl ester	4661	000623-50-7	4
			Hydroxylamine	37	007803-49-8	3
			Hydroxylamine	38	007803-49-8	3
15	7.148	0.10	C:\Database\NIST08.L			
			1-Propanol	291	000071-23-8	90
			1-Propanol	288	000071-23-8	64
			2-Fluoropropene	286	001184-60-7	49
16	11.370	0.07	C:\Database\NIST08.L			
			1H-Pyrrole, 1-methyl-	1115	000096-54-8	83
			1-Penten-3-yne, 2-methyl-	1088	000926-55-6	64
			2-Hexen-4-yne, (Z)-	1079	030626-48-3	59
17	20.169	0.28	C:\Database\NIST08.L			
			2-Propanone, 1-hydroxy-	813	000116-09-6	28
			2-Propanone, 1-hydroxy-	812	000116-09-6	9
			2-Propanone, 1-hydroxy-	811	000116-09-6	9
18	24.859	0.17	C:\Database\NIST08.L			

			3-Phenyl-3-trimethylsilyloxypropan	143919	1000079-40-7	50
			oic acid, trimethylsilyl ester			
			2-Methyl-1,4-bis(trimethylsiloxy)b	95831	105747-05-5	40
			utane			
			2-Phenyl-1,2-bis(trimethylsilyloxy	133278	294847-15-7	40
)propane			
19	25.273	0.10	C:\Database\NIST08.L			
			Azetidine	194	000503-29-7	4
			Butanal, 2-methyl-	1730	000096-17-3	4
			2-Propenoic acid, 2-hydroxyethyl	7980	000818-61-1	4
			ester			
20	27.824	0.52	C:\Database\NIST08.L			
			Acetic acid	263	000064-19-7	91
			Acetic acid	262	000064-19-7	90
			Acetic acid	260	000064-19-7	90
21	28.346	0.39	C:\Database\NIST08.L			
			Propanoic acid, 2-oxo-, methyl ester	4201	000600-22-6	9
			Propanoic acid, 2-oxo-, methyl ester	4203	000600-22-6	9
			Di-n-propyl ether	4392	000111-43-3	5
22	32.188	0.30	C:\Database\NIST08.L			
			1,2-Bis(trimethylsiloxy)ethane	64308	007381-30-8	64
			Silane, [(1-methyl-1,3-propanediyl	85063	056771-47-2	50
)bis(oxy)]bis[trimethyl-			
			3,8-Dioxa-2,9-disiladecane, 2,2,9,	85057	018001-91-7	50
			9-tetramethyl-			
23	36.320	0.05	C:\Database\NIST08.L			
			2-Furanmethanol	3053	000098-00-0	97
			2-Furanmethanol	3059	000098-00-0	96
			2-Furanmethanol	3058	000098-00-0	91
24	38.728	0.23	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanedioic acid, bis(trimethylsil	85821	018294-04-7	56
			yl) ester			
			3,8-Dioxa-2,9-disiladec-5-ene, 2,2	83680	053326-59-3	40
			,9,9-tetramethyl-, (E)-			
			1-Propene-1-thiol	824	000925-89-3	7
25	40.130	0.07	C:\Database\NIST08.L			
			1,2-Cyclopentanedione	3069	003008-40-0	80
			2-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-	3088	010493-98-8	78
			3H-Pyrazol-3-one, 1,2-dihydro-5-me	3021	004344-87-0	64
			thyl-			
26	41.445	0.07	C:\Database\NIST08.L			
			2-Butenoic acid, 3-methyl-	3664	000541-47-9	91
			Butanoic acid, 3-bromo-3-methyl-	44742	005798-88-9	72
			2-Butenoic acid, 3-methyl-	3661	000541-47-9	50
27	42.841	0.84	C:\Database\NIST08.L			

			1,4-Methanocycloocta[d]pyridazine,	62180	1000221-85-9	38
			1,4,4a,5,6,9,10,10a-octahydro-11,			
			11-dimethyl-, (1.alpha.,4.alpha.,4			
			a.alpha.,10a.alpha.)-			
			Pyridine, 4-propyl-	9455	001122-81-2	27
			2,6-Dimethyl-1,3,6-heptatriene	9928	000928-67-6	14
28	43.302	0.12	C:\Database\NIST08.L			
			Hexanoic acid	7995	000142-62-1	83
			Hexanoic acid	7996	000142-62-1	78
			Hexanoic acid	7997	000142-62-1	78
29	44.273	0.09	C:\Database\NIST08.L			
			Butanoic acid, butyl ester	20615	000109-21-7	87
			Propanoic acid, 2-methyl-, 2-ethyl	71515	074367-31-0	78
			-3-hydroxyhexyl ester			
			Propanoic acid, 2-methyl-, 3-hydro	71519	074367-34-3	78
			xy-2,4,4-trimethylpentyl ester			
30	44.634	0.16	C:\Database\NIST08.L			
			Ethanedioic acid, bis(trimethylsil	85821	018294-04-7	40
			yl) ester			
			2-Methyl-3,5-heptadiene, 7-trimeth	176039	1000196-08-4	36
			ylsilyl-2,3-bis(trimethylsilyloxy)			
			1,2-Butanediol, bis(trimethylsilyl	85053	1000099-91-9	9
)-			
31	48.632	1.25	C:\Database\NIST08.L			
			Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trime	16802	006876-13-7	60
			thyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)			
			Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trime	16757	000473-55-2	55
			thyl-			
			Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trime	16805	004795-86-2	46
			thyl-, [1R-(1.alpha.,2.beta.,5.alp			
			ha.)]-			
32	49.228	0.26	C:\Database\NIST08.L			
			Cyclooctane, 1,2-dimethyl-	17786	013151-94-5	89
			Cyclododecane	35940	000294-62-2	89
			Cyclooctane, methyl-	11411	001502-38-1	89
33	51.522	0.07	C:\Database\NIST08.L			
			Cinnamaldehyde, (E)-	14357	014371-10-9	95
			2-Propenal, 3-phenyl-	14359	000104-55-2	95
			2-Propenal, 3-phenyl-	14365	000104-55-2	93
34	54.153	0.87	C:\Database\NIST08.L			
			2-Propanone, 1,3-dihydroxy-	2251	000096-26-4	42
			1,3-Dihydroxyacetone dimer	44799	062147-49-3	38
			1-Propanol, 2-methyl-	851	000078-83-1	12
35	54.792	0.11	C:\Database\NIST08.L			

			Silane, trimethyl[4-(trimethylsilyl)butoxy]-	72651	007140-91-2	40
			Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	85821	018294-04-7	38
			1-Propene-1-thiol	824	000925-89-3	4
36	61.362	0.25	C:\Database\NIST08.L			
			2-Hydroxy-gamma-butyrolactone	4198	019444-84-9	25
			Cyclopentanol	1717	000096-41-3	9
			Propanoic acid, 2,2-dimethyl-	4282	000075-98-9	9
37	69.793	0.23	C:\Database\NIST08.L			
			4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	20368	028564-83-2	90
			4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	20367	028564-83-2	87
			4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	20366	028564-83-2	87
38	71.103	0.12	C:\Database\NIST08.L			
			Disiloxane, 1,3-bis(1,1-dimethyl-1,1,3,3-tetramethyl-	94436	067875-55-2	50
			3,8-Dioxa-2,9-disiladec-5-ene, 2,2,9,9-tetramethyl-, (Z)-	83681	053326-58-2	45
			Butylsemithiocarbazide	22003	006610-31-7	43
39	72.781	0.21	C:\Database\NIST08.L			
			Glycerin	2404	000056-81-5	59
			1,2,3,4-Butanetetrol, [S-(R*,R*)]-	9586	002319-57-5	59
			Glycerin	2402	000056-81-5	59
40	76.839	0.17	C:\Database\NIST08.L			
			Benzofuran, 2,3-dihydro-	9282	000496-16-2	64
			Benzene, (ethenyloxy)-	9270	000766-94-9	50
			5-Acetyl-2-methylpyridine	15334	042972-46-3	50
41	78.031	0.17	C:\Database\NIST08.L			
			3,8-Dioxa-2,9-disiladecane, 2,2,9,9-tetramethyl-	85058	018001-91-7	37
			Silane, [(1-methyl-1,3-propanediyl)bis(oxy)]bis[trimethyl-	85063	056771-47-2	37
			(Benzo(b)thien-6-yl)acetic acid	52696	006177-87-3	35
42	80.659	0.22	C:\Database\NIST08.L			
			2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxyethyl)-	11004	000067-47-0	94
			2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxyethyl)-	11003	000067-47-0	94
			1H-Pyrrole-2,5-dione	2916	000541-59-3	43

43	81.421	0.23	C:\Database\NIST08.L			
			n-Decanoic acid	38605	000334-48-5	53
			Octanoic Acid	20564	000124-07-2	47
			Nonanoic acid	29619	000112-05-0	47
44	82.977	0.08	C:\Database\NIST08.L			
			1,2-Bis(trimethylsiloxy)ethane	64308	007381-30-8	56
			1-Pentamethyldisilyloxy-3-phenylprop-2-ene	108533	1000216-94-9	56
			Silane, trimethyl[4-(trimethylsilyl)butoxy]-	72651	007140-91-2	56
45	85.270	0.11	C:\Database\NIST08.L			
			9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	130796	000301-00-8	91
			cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienoic acid, methyl ester	85640	056797-43-4	80
			11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester	151903	055682-88-7	72
46	86.053	7.31	C:\Database\NIST08.L			
			Phytol	133804	000150-86-7	90
			Phytol	133803	000150-86-7	87
			Phytol	133805	000150-86-7	58
47	86.619	0.09	C:\Database\NIST08.L			
			2-Anthracenamine	53941	000613-13-8	49
			2-Anthracenamine	53944	000613-13-8	49
			2-Anthracenamine	53947	000613-13-8	49
48	87.232	0.03	C:\Database\NIST08.L			
			Silane, [(1-methyl-1,3-propanediyl)bis(oxy)]bis(trimethyl-)	85063	056771-47-2	72
			3,8-Dioxo-2,9-disiladec-5-ene, 2,2,9,9-tetramethyl-, (E)-	83680	053326-59-3	64
			Ethanedioic acid, bis(trimethylsilyl) ester	85821	018294-04-7	42
49	88.088	0.24	C:\Database\NIST08.L			
			o-Chloroaniline	11613	000095-51-2	35
			p-Chloroaniline	11620	000106-47-8	35
			Isobutyramide, N-(4-chlorophenyl)-	56986	1000339-96-3	35
50	90.195	0.69	C:\Database\NIST08.L			
			Tetratriacontane	211201	014167-59-0	91
			Heneicosane	133836	000629-94-7	91
			Heneicosane, 11-(1-ethylpropyl)-	180776	055282-11-6	91

59	97.733	0.05	C:\Database\NIST08.L				
				2-Thiophenemethanamine	6836	027757-85-3	38
				Thiazole, 4,5-dimethyl-	6837	003581-91-7	35
				Thiazole, 4,5-dimethyl-	6843	003581-91-7	35
60	98.111	0.14	C:\Database\NIST08.L				
				1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane	108277	017455-13-9	64
				2-[2-[2-[2-[2-[2-(Trimethylsilyloxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol	194756	1000352-06-3	64
				15-Crown-5	74084	033100-27-5	59
61	98.861	1.22	C:\Database\NIST08.L				
				Squalene	198700	007683-64-9	50
				2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	198715	000111-02-4	50
				2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	198717	000111-02-4	50
62	99.150	1.10	C:\Database\NIST08.L				
				n-Decanoic acid	38605	000334-48-5	76
				Octane, 1-(ethenylthio)-	38778	042779-08-8	30
				Oxalic acid, allyl octadecyl ester	188446	1000309-24-5	20
63	99.380	0.40	C:\Database\NIST08.L				
				2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol	210431	1000352-11-2	50
				Ethanol, 1-[2-[2-(1-methylethoxy)ethoxy]ethoxy]-	53551	029681-21-8	38
				2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy)ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethanol	189078	1000352-04-2	38
64	99.534	1.56	C:\Database\NIST08.L				
				Cyclododecane	35940	000294-62-2	72
				Dichloroacetic acid, tridecyl ester	143926	1000280-48-3	64
				Trichloroacetic acid, dodecyl ester	158264	074339-50-7	58
65	99.720	0.25	C:\Database\NIST08.L				
				(3-Chloro-propyl)-urea	15789	1000300-24-6	10
				Acetamide	240	000060-35-5	10
				Propanoic acid, 3-hydroxy-, hydrazide	4612	024535-11-3	9
66	99.827	0.54	C:\Database\NIST08.L				

		5-Ethylcyclopent-1-ene-1-carboxylic acid	18272	036258-07-8	27
		1-Methyl-3-n-propyl-2-pyrazolin-5-one	18054	031272-04-5	27
		Thiophene, 2-methyl-5-propyl-	18325	033933-73-2	27
67	100.070	1.41 C:\Database\NIST08.L			
		Heptadecane	90418	000629-78-7	72
		Octadecane	101147	000593-45-3	64
		Heneicosane	133835	000629-94-7	64
68	100.331	1.67 C:\Database\NIST08.L			
		3,4-Octadiene, 7-methyl-	10546	037050-05-8	81
		11,14-Eicosadienoic acid, methyl ester	153173	002463-02-7	76
		Bicyclo[2.2.2]octane, 2-methyl-	10583	000766-53-0	74
69	100.599	1.52 C:\Database\NIST08.L			
		D-Erythro-Pentose, 2-deoxy-	14851	000533-67-5	32
		N-Ethylformamide	731	000627-45-2	16
		1,6-Anhydro-2,4-dideoxy-.beta.-D-ribo-hexopyranose	13161	014059-74-6	16
70	100.738	1.25 C:\Database\NIST08.L			
		4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	44172	1000297-95-5	38
		1,2,4-Cyclopentanetrione, 3-(2-pentenyl)-	44148	054644-27-8	27
		6-Methylnicotinic acid	16443	003222-47-7	15
71	101.508	5.75 C:\Database\NIST08.L			
		9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	130796	000301-00-8	91
		11,14,17-Eicosatrienoic acid, methyl ester	151903	055682-88-7	90
		cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatriene	85640	056797-43-4	86
72	101.914	2.42 C:\Database\NIST08.L			
		D-Allose	44771	002595-97-3	90
		.beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	31824	000498-07-7	86
		.beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	31825	000498-07-7	83
73	102.608	0.46 C:\Database\NIST08.L			
		Benzene, 1-isocyanato-4-(methylthio)-	33856	1000319-49-0	50
		3,6-Dimethyl-5-oxo-1,2,3,5-tetrahydroimidazo[1,2-a]pyrimidine	33793	058910-42-2	45
		1H-Purin-2-amine, 6-methoxy-	33731	020535-83-5	45
74	102.740	0.83 C:\Database\NIST08.L			

1H-Purin-2-amine, 6-methoxy-	33731	020535-83-5	72
Furo[3,4-c]pyridine-3,4(1H,5H)-dio	33834	007472-18-6	64
ne, 6-methyl-			
1H-Purin-2-amine, 6-methoxy-	33729	020535-83-5	56

75 103.886 0.04 C:\Database\NIST08.L

Tricyclo[6.6.0.0(3,6)]tetradeca-1(49140	1000151-40-9	25
8),4,11-triene			
1-Methyl-4-amino-5-chloro-6-oxo-(1	29953	017254-80-7	11
H)-pyridazine			
Oxime-, methoxy-phenyl-	24423	1000222-86-6	11

LIQUIDOS AU... NUEVO LTM.M Mon Oct 21 12:49:35 2019