



Laboratorio de
Ecología Química



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
U R U G U A Y

Obtención, cuantificación y estandarización de extractos del paraíso (*Melia azedarach*) para su potencial empleo como bioplaguicida.

Alumno: Bach. Qca. Manuel Minteguiaga Carbajal.

Tutor: Prof. Dra. (*PhD*) Carmen Rossini.

Supervisor INIA: Qco. Facundo Ibañez.

Informe de Practicantado de Químico, orientación Agrícola y Medio Ambiente.

Marzo 2011.

Dedicado a las personas que son pilares de mi vida, que durante tantos años han confiado en mí y me dan aliento cuando parece faltarme.

A mi familia y a la memoria de mi padre.

Y porque lo mejor está por venir...

“En la vida somos todos novatos: ésta es tan corta que no da tiempo para otra cosa.”

Charlie Chaplin (1889-1977).

Índice:

Dedicatoria: 2

Índice: 3

1- Justificación

Plan de Trabajo: 5

2- Objetivos-----6

3- Resumen-----6

4- Introducción

4.1- La problemática de la Agricultura Convencional: empleo masivo de agroquímicos sintéticos: 7

4.2- La Agricultura Orgánica: 8

4.3- Los Bioplaguicidas: 9

4.4- Meliaceae, una familia promisoría: 11

4.5- Melia azedarach, el árbol del paraíso: 11

4.6- Los Limonoides, compuestos polifuncionales: 13

4.7- Estudios en Uruguay: 15

5- Materiales y métodos

5.1- Obtención de extractos de Melia azedarach y Quillaja brasiliense: 17

5.1.1- Material vegetal: 17

5.1.2- Proceso de extracción: 17

5.2- Cuantificación de los principios fitosanitarios de Melia azedarach: 19

5.2.1- Tratamiento de los extractos: 19

5.2.2- Ensayos de Almacenamiento 19

5.2.3- Determinación de Limonoides totales 19

5.2.4- Análisis por Cromatografía en Capa Fina (TLC) 21

5.2.5- <i>Análisis de Materia Seca (MS)</i>	22
5.3- <i>Obtención de principios activos Limonoides a escala preparativa</i>	22
5.3.1- <i>Aislamiento y purificación por fraccionamiento</i>	22
5.3.1.1- <i>A partir de los frutos de Melia azedarach</i>	23
5.3.1.2- <i>A partir del extracto realizado en Timatic® de Melia azedarach</i>	27
5.3.1.2.1- <i>Primer Procedimiento</i>	27
5.3.1.2.2- <i>Segundo Procedimiento</i>	31
5.3.1.2.3- <i>Eliminación del componente desconocido</i>	35
5.3.2- <i>Pruebas de precipitación</i>	35
5.3.3- <i>Extracción fase sólida (SPE) de varios órganos de Melia azedarach</i>	36
5.3.4- <i>Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)</i>	36
5.3.5- <i>Comparativa con patrones</i>	36
5.3.6- <i>Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</i>	36
5.3.7- <i>Ensayos de corrimiento de bandas en UV</i>	36
5.4- <i>Ensayos de efectividad del bioplaguicida</i>	37
5.4.1- <i>Formulación</i>	37
5.4.2- <i>Pruebas a laboratorio</i>	37
5.4.3- <i>Relevamiento de las condiciones fitosanitarias del cultivo de tomate a campo</i>	38
5.4.4- <i>Pruebas a campo</i>	39

6- Resultados y Discusión

6.1- <i>Extracción</i>	41
6.1.1- <i>Análisis del proceso de extracción</i>	41
6.2- <i>Cuantificación de Limonoides</i>	42
6.2.1- <i>Análisis de Almacenamiento de los extractos</i>	42
6.2.1.1- <i>Condiciones de oscuridad</i>	42

6.2.1.2- Comparativa con condiciones de almacenamiento bajo luz:	44
6.3- <u>Aislamiento de Limonoides</u> :	46
6.3.1- A partir de frutos de <i>Melia azedarach</i> :	46
6.3.2- A partir del extracto realizado en Timatic de frutos de <i>Melia azedarach</i> :	47
6.3.2.1- Primer Procedimiento:	47
6.3.2.2- Segundo Procedimiento:	47
6.3.3 Separación por SPE de extractos de diferentes órganos de <i>Melia azedarach</i> :	49
6.3.4. Análisis por RMN:	52
6.4- <u>Efectividad del Bioplaguicida</u> :	51
6.4.1- A laboratorio:	51
6.4.2- A campo:	53
7- Conclusiones -----	56
8- Agradecimientos -----	57
9- Bibliografía -----	60

1. Justificación:

Este Informe se presenta como parte de los requisitos para la obtención del título de grado **Químico**, orientación **Agrícola y Medio Ambiente**, plan de estudios 2000 de la Facultad de Química, Udelar.

El plan de trabajo fue realizado en base a un proyecto ya en marcha en el Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Las Brujas, denominado "Producción local participativa de bioplaguicidas (ANII_AIS 662), financiado como Proyecto de Alto Impacto Social por parte de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación. El mismo involucra la investigación, obtención de conocimientos y transferencia de tecnología a los productores dedicados a la Agricultura Orgánica, como parte de los Programas Nacionales de Producción Frutícola y Producción Familiar de INIA.

Plan de Trabajo:

El Plan de trabajo propuesto para Practicantado de Químico, vinculó los siguientes puntos:

*Cuantificación de principios activos fitosanitarios en *Melia azedarach* (TLC, espectrofotometría, HPLC).

*Obtención de principios activos limonoides a escala preparativa (TLC, LC, HPLC).

*Participación en realización de pruebas de formulación y efectividad de bioplaguicidas en laboratorio y campo.

*Obtención de extractos estandarizados de *Melia azedarach* y otros coadyuvantes de origen botánico.

2. Objetivos

*Realizar un estudio de la capacidad bioplaguicida de extractos de frutos de *Melia azedarach* junto a coadyuvantes naturales, evaluando su estabilidad en condiciones de almacenamiento y efectividad frente a insectos plaga en condiciones de laboratorio y campo.

*Determinar la naturaleza química de los principios bioactivos.

3. Resumen:

En éste trabajo se realizaron avances en el estudio del proceso de extracción, almacenamiento y aislamiento de principios bioplaguicidas en extractos del árbol del paraíso (*Melia azedarach*), realizando formulaciones de los mismos junto a coadyuvantes naturales, y evaluándolas en bioensayos en laboratorio y pruebas de campo.

La extracción de los principios activos plaguicidas (limonoides) fue a partir de los frutos de paraíso molidos, empleando una mini-planta extractora y etanol como solvente. Dicho proceso extractivo fue evaluado a través de los parámetros materia seca y contenido de limonoides totales, los que siguieron una tendencia logarítmica con el tiempo.

A los extractos se le realizaron pruebas de degradación en almacenamiento bajo condiciones de oscuridad, determinando contenido de limonoides totales y pH. Los resultados indicaron una buena estabilidad hasta la quinta semana de ensayo, y marcada diferencia respecto de estudios previos en condiciones de luminosidad, reflejando el carácter fotolábil de los limonoides.

Para la obtención de estándares y para determinar la identidad química de los principios activos, se realizaron varios procedimientos de aislamiento y purificación de limonoides. Los mismos permitieron la obtención de fracciones enriquecidas en un compuesto (presente en frutos y semillas) que fue sometido a análisis estructural por RMN y UV con reactivos de corrimiento.

Para evaluar la efectividad de éstos extractos se prepararon varias formulaciones, una de las cuales incluyó una porción de extracto etanólico de *Quillaja brasiliense*. Los resultados obtenidos en laboratorio frente a *Diabrotica speciosa* (Coleoptera:Crysomelidae) y en campo frente a *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera:Aleyrodidae) fueron promisorios, lo cual indicaría la factibilidad del empleo de éste tipo de preparaciones en predios orgánicos.

4. Introducción.

4.1- La problemática de la Agricultura Convencional: empleo masivo de agroquímicos sintéticos.

Anualmente, una tercera parte de la producción mundial de alimentos es perdida por la acción de enfermedades y plagas, tanto a campo como en almacenamiento (Carpinella, 2003). Dentro de tales agentes perjudiciales a la producción, los insectos son los mayores responsables, debido al gran número de especies e individuos existentes y a la gran capacidad de adaptación que han desarrollado a lo largo de su historia evolutiva (Bentancourt & Scatoni; 1999).

La solución tecnológica que ofrece la agricultura convencional a partir de la llamada "Revolución Verde", es la aplicación masiva de pesticidas sintéticos. Los mismos han demostrado una diversidad de efectos ambientales y ecológicos no deseados, desequilibrando el balance natural en los ecosistemas (Bhatl, 2004). Dentro de ellos se incluyen: la generación de resistencia por parte de los insectos plagas, el exterminio de los enemigos naturales de los mismos, la resurgencia de plagas secundarias, bioacumulación y biomagnificación de residuos a lo largo de la cadena trófica, y extensión de los mismos a matrices ambientales como suelo, aire y agua (Habib, 2010; Brunherotto, 2001, Isman, 2002). Según Habib, en promedio sólo el 0.1% de la cantidad de principio activo aplicado llega a su organismo blanco. Ello puede ser aún más crítico, ya que hay ejemplos de pesticidas que al degradarse en el ambiente, pueden derivar en productos más tóxicos que el principio activo original, como el conocido caso del Parathion y su derivado Paraoxon (Joiners *et. al.*, 1971).

Los pesticidas sintéticos también han demostrado tener una gran nocividad a la salud humana, siendo responsables de intoxicaciones agudas, y en el caso de exposiciones crónicas pueden derivar en enfermedades letales como el cáncer entre otros (Prakash, 1997). El problema es agravado debido a la transmisión de los contaminantes por el aire, agua, y alimentos, lo que lo hace un tema de primer orden en Salud Pública.

Lo mismos efectos nocivos son aplicables a otros agrotóxicos empleados en Agricultura Convencional, por ejemplo herbicidas, fungicidas y nematicidas. En el mismo sentido, la gran aplicación de fertilizantes inorgánicos trae aparejado la contaminación de las napas freáticas e incluso eutrofización, hecho que redundo en la pérdida de la biodiversidad acuática. (DINAMA, 2009).

El Uruguay ha sufrido un gran incremento en la utilización de agrotóxicos, lo cual se refleja en la Figura 1, como volumen de importación de los mismos. El aumento sostenido en la importación de dichas *commodities* se debe a la expansión de los cultivos de secano en el país, principalmente del cultivo de soja. La importación de fungicidas, herbicidas e insecticidas aumentó un 160% en el período 2004-2008 respecto de 1999-2003, y casi un 400% respecto del quinquenio 1994-1998. El mayor responsable de ese aumento fue el herbicida glifosato (DINAMA, 2009).

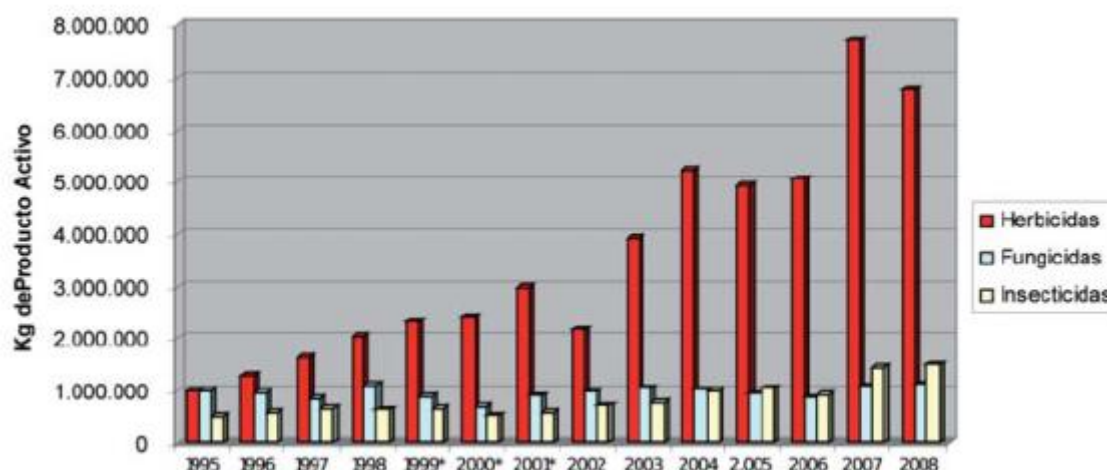


Figura 1: Importación nacional de agrotóxicos en años recientes.

Fuente: DINAMA.

El gran impacto ambiental y social que surge de la aplicación de éste tándem de compuestos sumamente nocivos a los agroecosistemas, puede devenir en una pérdida anunciada de la calidad de vida humana y poner en serio riesgo la sustentabilidad de dichos sistemas (González de Molina & Guzmán Casado; 2006). Es por ello que desde unos años a ésta parte, se ha comenzado a plantear la posibilidad de hacer una gestión más razonable y ambientalmente amigable de los sistemas de producción agrícola a través de la llamada Agricultura Orgánica.

4.2- La Agricultura Orgánica.

La Agricultura Orgánica es aquella en la que la producción de alimentos se realiza a través de metodologías amigables al medio ambiente, generando productos seguros, de calidad y seguridad para el consumo humano (FAO, 2003). Esta práctica tiene uno de sus pilares en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), en donde se respeta el principio de biodiversidad, no procurando eliminar las plagas sino mantener su población dentro de límites económicamente tolerables (FAO, 2003). Las tecnologías aplicadas incluyen la utilización de semioquímicos (compuestos involucrados en procesos de comunicación química en la naturaleza), técnicas de

manejo cultural, empleo de organismos benéficos, aplicación racional de pesticidas de síntesis, entre otras (FAO, 2003; Bentley, 1990; Isman, 2002).

Los productos alimenticios orgánicos son altamente estimados por sus características inocuas para la salud, ya que para su cultivo no se emplean productos químicos agresivos ni materiales transgénicos. Los consumidores valoran asimismo el respeto por la naturaleza, la vinculación familiar generalmente imperante y el rol de la mujer en dicha producción (INIA, 2009). Todo ello se ha favorecido por una creciente preocupación por el medio ambiente y la preservación de los recursos naturales, lo que se ha reflejado en los medios masivos de comunicación.

Actualmente, en el Uruguay se cuenta apenas con 1900 hectáreas dedicadas a la producción orgánica, en emprendimientos generalmente de escasa extensión superficial, donde el rubro con mayor participación es el horti-frutícola (DINAMA, 2009; INIA, 2009).

4.3- Los Bioplaguicidas.

Una técnica bastante empleada en Agricultura Orgánica refiere al uso de bioplaguicidas: organismos vivos (caso de microorganismos), parte de los mismos o compuestos derivados de ellos que se emplean para el control de plagas en los agroecosistemas (FAO, 2003).

Dentro de los bioplaguicidas, los extractos de plantas conteniendo compuestos químicos derivados de las mismas (conocidos como botanicals en inglés), si bien son una técnica de aplicación milenaria, han ejercido en las últimas décadas una gran atracción para la producción orgánica (Bhatl, 2004; Isman, 2002; Puri, 1999). Ello se debe a su especificidad de acción, la degradación de los compuestos a campo sin dejar residuos tóxicos, la no afectación de organismos superiores, incluyendo al ser humano, entre otras (Isman, 1997, 2002; Roy, 2006; Costa, 2004). Estudios con extractos de meliáceas, han demostrado que la especificidad de acción puede verse comprometida en función de la dosis aplicada: dosis superiores a las recomendadas aumentan la mortalidad de enemigos naturales de las plagas (Pevelig, 2006). Sin embargo, la aplicación en dosis adecuadas puede redundar en una mayor emergencia de parasitoides de las mismas (Charleston, 2006), con su consiguiente beneficio ambiental y económico. Por ello no hay que perder de vista que la aplicación en campo debe ser responsable en cuanto a cantidad y periodicidad, y basada en el monitoreo de la población existente de los insectos dañinos.

La acción biológica en el control de plagas se debe a compuestos del metabolismo secundario, los cuales cumplen generalmente la función de defensa química del organismo vegetal ante el ataque de herbívoros, producto de la coevolución (Bentley, 1990; Arnason 2004; Hammad, 2008). A pesar de que dichos compuestos de defensa sean tóxicos a las plagas, la función observada no suele ser la muerte del herbívoro, sino la deterrencia alimentar y de oviposición, la regulación en el crecimiento y desarrollo de los insectos, y la disminución de la fertilidad (Isman, 2002).

La degradabilidad y la no toxicidad resultante de los bioplaguicidas se basa en la alta relación carbono/nitrógeno comparado a los pesticidas sintéticos, y en la ausencia de funcionalidades químicas persistentes como grupos fosforados, compuestos halogenados y con metales pesados en su estructura (Prakash, 1997).

Otro aspecto interesante de los pesticidas botánicos es que su acción no se debe a un principio activo en general, sino que en los extractos suele haber decenas de componentes muy relacionados estructuralmente, los que ejercen efecto sinérgico (Philogene, 2005). Adicionalmente, los metabolitos de plantas pueden tener sitios de acción múltiples y en muchos casos novedosos (Prakash, 1997).

La Química de pesticidas ha tomado como ejemplo los compuestos aislados de las plantas y ha sintetizado derivados para su aplicación a campo con el objetivo de independizarse de la fuente vegetal. Esto es particularmente importante en el caso de las especies nativas con baja velocidad de proliferación, permitiendo así también la preservación de los recursos naturales (Costa, 2004). Un ejemplo en éste sentido ha sido el descubrimiento de extractos con capacidad pesticida en el Piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*, Asteraceae), la que se debe a compuestos terpénicos no convencionales (ausencia del patrón propio de biosíntesis de los mismos) denominados piretrinas, los que son miméticos de la hormona juvenil de los insectos (Bentley, 1990; Viegas Júnior, 2003; Isman, 2002). Los compuestos sintéticos surgidos a partir de tal estudio se conocen como piretroides, siendo su mecanismo de acción similar al de los pesticidas organofosforados (OP), con una mayor capacidad de degradación en el ambiente (Viegas Júnior, 2003).

Los pesticidas botánicos, a pesar de presentar mínimos efectos nocivos al medioambiente, han tenido varios impedimentos para su desarrollo. Los principales refieren a la estandarización y control de calidad de las formulaciones, escasez de la fuente original, y el registro en las normativas nacionales (Isman, 1997; Costa, 2004). La estabilización es dificultosa debido principalmente a la variabilidad propia de los metabolitos secundarios en función de las condiciones ambientales imperantes (Arnason, 2004; Carpinella, 1999). Aspectos tales como optimización de las condiciones de extracción y almacenamiento (con la posible generación de artefactos), son aún materia pendiente en muchos casos (Bhatl, 2004).

Metabolitos activos aislados de plantas pueden causar resistencia al ser aplicados solos, por ejemplo: en el caso de la toosendanina, la polilla del tabaco (*Spodoptera litura*) se habitúa a la misma en 5 horas (por la activación de posibles vías de detoxificación) y lo mismo ocurre con la azadirachtina (Isman, 2002). Sin embargo no se observa resistencia al aceite de neem ni a extractos de *Melia azedarach*. Lo anterior marca la necesidad de emplear extractos y aceites en las aplicaciones y no los componentes puros, dado que las mezclas generarían el efecto sinérgico antes mencionado.

Por todo lo antedicho, los pesticidas botánicos han sido objeto de muchos planes de bioprospección a lo largo del mundo, en la búsqueda de posibles principios activos y

formulaciones ambientalmente seguras. Ello se basa en que plantas relacionadas filogenéticamente suelen poseer metabolitos secundarios similares, por lo que miembros de familias de plantas con probada capacidad pesticida, suelen ser blanco de los estudios (Arnason, 2004). En dichos planes de prospección, no puede faltar la adquisición y valoración de los conocimientos no científicos propios de diferentes grupos humanos (etnoprospcción), lo cual puede ahorrar muchos esfuerzos de investigación (Bhatl, 2004).

4.4- Meliaceae, una familia promisoría.

Las meliáceas son conocidas desde antiguo como plantas con acción biológica en medicina natural, principalmente en la India y China (Hammad, 2008). La estrella dentro de ellas es el Neem (*Azadirachta indica*), al cual la cultura popular y la religión han dado carácter de divino (Puri, 1999). Dicho autor menciona una gran diversidad de usos homeopáticos de la corteza, hojas y flores, reportados e incluidos en la Farmacopea India. Los mismos incluyen tratamientos de piel, antipirético, anti-ulcérico, antimalárico, antiparasitario, antiinflamatorio, etc. A pesar de lo antedicho, como todo producto bioactivo, tiene su dosis recomendada, ya que por sobre el umbral puede actuar como narcótico (Puri, 1999).

Sin embargo, las propiedades insecticidas que presentan las meliáceas, son las que han contribuido a un gran énfasis en su investigación (Bonhenstegel, 1999; Nakatani, 1994, Suresh 2002; Champagne, 1992). Por ejemplo el árbol del Neem posee reportada actividad anti-alimentaria y regulatoria del crecimiento y desarrollo de distintos tipos de insectos y ácaros (Viegas Júnior; 2003; Isman 1997; Puri, 1999). Otras meliáceas tales como *Trichilla spp.*, *Cedrela spp.*, *Swietenia spp.*, *Guarea spp.*, *Khaya spp.* y *Chukrasia spp.* han demostrado también contener principios altamente tóxicos para los insectos (Arnason, 2004; Regnault-Roger 2005; Abdelgaleil, 2005).

El árbol del paraíso y el de Neem son muy relacionados filogenéticamente, lo que se puede apreciar en uno de los sinónimos del Neem: *Melia azadirachta*, lo cual ha provocado confusión en algunas regiones (Puri, 1999). *Melia toosendan*, *Melia volkensii*, *Azadirachta excelsa* y *Azadirachta siamensis* son otras especies que han recibido atención en cuanto a su estudio (Arnason, 2004; Peveling, 2006; Puri, 1999), por estar muy emparentadas al Neem, lo que hasta la fecha constituye un debate entre los taxónomos.

4.5- *Melia azedarach*, el árbol del paraíso.

El árbol del paraíso (figura 2), *Melia azedarach*, es una especie caducifolia de la familia de las Meliáceas, originario de Persia, China e India (Hammad, 2008). Las propiedades farmacológicas de dicha especie son enormes y por tal aparece (al igual que el Neem) en la Farmacopea china y en la medicina india para el tratamiento de malaria y dolores estomacales e intestinales provocados por parásitos (Ong, 2007; Srivastava 1986; Nakatani, 1994; Oelrichs, 1983).

El paraíso fue introducido en Uruguay y muchos países del mundo debido a las características ornamentales de su porte y a la producción de madera, lo cual lo hace un árbol de preferencia para los paisajistas, urbanistas e ingenieros forestales. Una muy buena cualidad que presenta en ese sentido es la gran resistencia al frío y climas áridos (Hammad, 2008), lo cual ha repercutido en una excelente adaptación a nuestras condiciones climáticas. Debido a ello se ha naturalizado (crece sin necesidad de ser plantado) no sólo en nuestro país sino en el resto de América, África y Australia (Oelrichs, 1983; Nakatani, 1994; Zhou, 2004; Hammad, 2008).

El paraíso ha sido tempranamente reportado como tóxico para el hombre y mamíferos principalmente por la ingestión de sus frutos, habiéndose constatado muerte de niños por éste motivo (Oelrichs, 1983). Existen también una gran variedad de reportes en que se ha visto la toxicidad para el ganado vacuno y lanar, cerdos, aves y cabras (Oelrichs, 1983; Carpinella, 1999). Empero, la variabilidad en la toxicidad en locaciones geográficas tan distantes es considerable, debido a la diferente composición fitoquímica de las poblaciones (Carpinella, 1999; Hammad, 2008).

Sin embargo, la acción contra insectos es la más profusamente probada: los extractos de diferentes órganos provocan alto nivel de deterrencia (alimentar y de oviposición), y mayor duración de los estadios larvales y pupales en insectos plaga (Carpinella, 2006; Peveling, 2006; Charleston, 2006; Nathan, 2006; Coria, 2007). El efecto anti-alimentar llega a ser tan importante que provoca la muerte de insectos por inanición en bioensayos de consumo de no elección (Defagó, 2006). Los insectos afectados pertenecen a varios órdenes: Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Homoptera e incluso ácaros (Carpinella, 2006). Dicha actividad se debe a compuestos de naturaleza nortriterpenoide (triterpenos modificados), conocidos genéricamente como limonoides (Ahn, 1994; Carpinella, 2006).

La efectividad de los extractos acuosos y alcohólicos de paraíso está probada no sólo para plagas agrícolas, sino también contra una diversidad de parásitos y organismos nocivos para la ganadería (Maciel, 2006; Carpinella 2006), por lo cual también pueden ser una herramienta de interés para la producción orgánica de carne, la que en el país es apenas un 4% (DINAMA, 2009).

De hojas, raíces, corteza y frutos de *Melia azedarach* se han aislado compuestos limonoides conocidos como meliacarpinas, azedarachtinas, nimboldinas y otros, que poseen propiedades anti-alimentares y tóxicas debido a interferencia con las funciones fisiológica y bioquímicas básicas (Srivastava, 1986; Carpinella, 2002, 2003; Nakatani, 1994; Huang, 1995; Bohnenstegel, 1999). Las meliacarpinas (como la toosendanina y la meliartenina) han demostrado actividad antialimentaria del mismo orden que la azadirachtina A del Neem, la cual parece no estar presente en *Melia azedarach*. (Carpinella 2003, 2006). En base a tales compuestos, fue patentado en Argentina un extracto alcohólico para repeler insectos (*Xanthogalleruca luteola* y *Epilachna paenulata*) (Carpinella, 2006).



Figura 2: Melia azedarach L., el paraíso. Vista de los frutos, y su utilización como árbol de ornato público.

Fuentes: http://flowersinisrael.com/Flowgallery/Melia_azedarach_flower2.jpg

http://online-media.uni-marburg.de/biologie/botex/mallorca05/bildgross/melia_azedarach2.jpg

4.6-Los limonoides, compuestos polifuncionales.

Los limonoides son principios amargos presentes en el orden Rutales, principalmente en la familia de los cítricos (Rutaceae) y Meliaceae. La estructura química de algunos limonoides de meliáceas es mostrada en la figura 3, caso de la azadirachtina A, el limonoide con mayor actividad anti-insecto y principio activo de varias preparaciones comerciales patentadas (Suresh, 2002; Isman, 1997), y la toosendanina aislada de corteza y frutos de *M. azedarach* (Isman, 2002; Meng, 2009). En el paraíso, en la FQ-UdelaR se caracterizó estructuralmente un limonoide relacionado (Díaz, 2009), cuya estructura se muestra también en la figura 3.

La diversidad y complejidad estructural de los limonoides es enorme (más de 300 reportados), en los cuales cambios en el patrón de sustitución, estado de oxidación, hidrofobicidad, conectividad molecular, potencial electrostático y distancia geométrica pueden influenciar su actividad biológica (Suresh, 2002; Champagne, 1992; Roy, 2006).

Generalmente los limonoides son hallados en todo el vegetal, pero dentro de un mismo organismo, los diferentes órganos producen diferentes tipos de compuestos (Champagne, 1992), lo cual implica diferente nivel de actividad biológica de los extractos (Brunherotto, 2001; De Souza, 2001; Coria, 2007; Valladares, 2003). Champagne y Roy refieren que el patrón biosintético independiente del órgano es el mismo: incrementar el estado de oxidación y el rearreglo del esqueleto original hidrocarbonado de los esteroides eufano y tirucalano (conocidos como protolimonoides o protomeliacinas) originados en la ciclación del escualeno (Champagne, 1992; Roy, 2006). Las modificaciones posteriores dan la gran variabilidad, la que es mucho mayor en Meliaceae que en Rutaceae (Roy, 2006).

Sin embargo nada se sabe del lugar físico y la enzimología involucrada en la síntesis dentro de la célula, a excepción de los frutos de *Citrus* (Rutaceae), donde la síntesis se da en la

membrana celular luego del daño del tejido, liberando un sabor amargo al jugo (Champagne, 1992).

Los limonoides por mucho tiempo fueron considerados carentes de actividad fisiológica (Suresh, 2002) hasta que se demostró su capacidad como sustancia reguladora del crecimiento (IGR, por sus siglas en inglés) de insectos, y posteriormente su potencial anti-alimentario (Champagne, 1992).

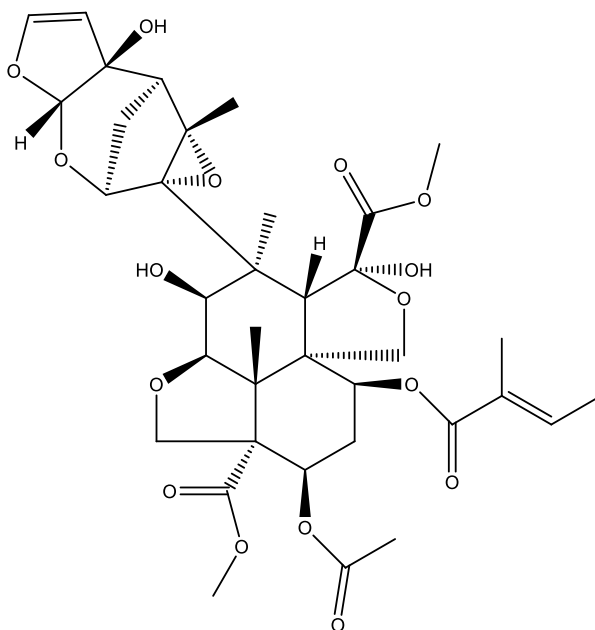
En cuanto a relación estructura-actividad, se ha demostrado que la porción hidroxi-furanacetil y el grupo funcional epóxido son responsables por la actividad deterrente, y la porción de la decalina (anillo C-seco: modificado de la biosíntesis original) es fundamental para la actividad IGR (Viegas Junior, 2002). Sin embargo, la actividad puede ser modificada por la sustitución en posiciones de los anillos de decalina (Roy, 2006). A pesar de ello, no son conocidas con firmeza las bases moleculares del mecanismo de acción deterrente y regulador del crecimiento.

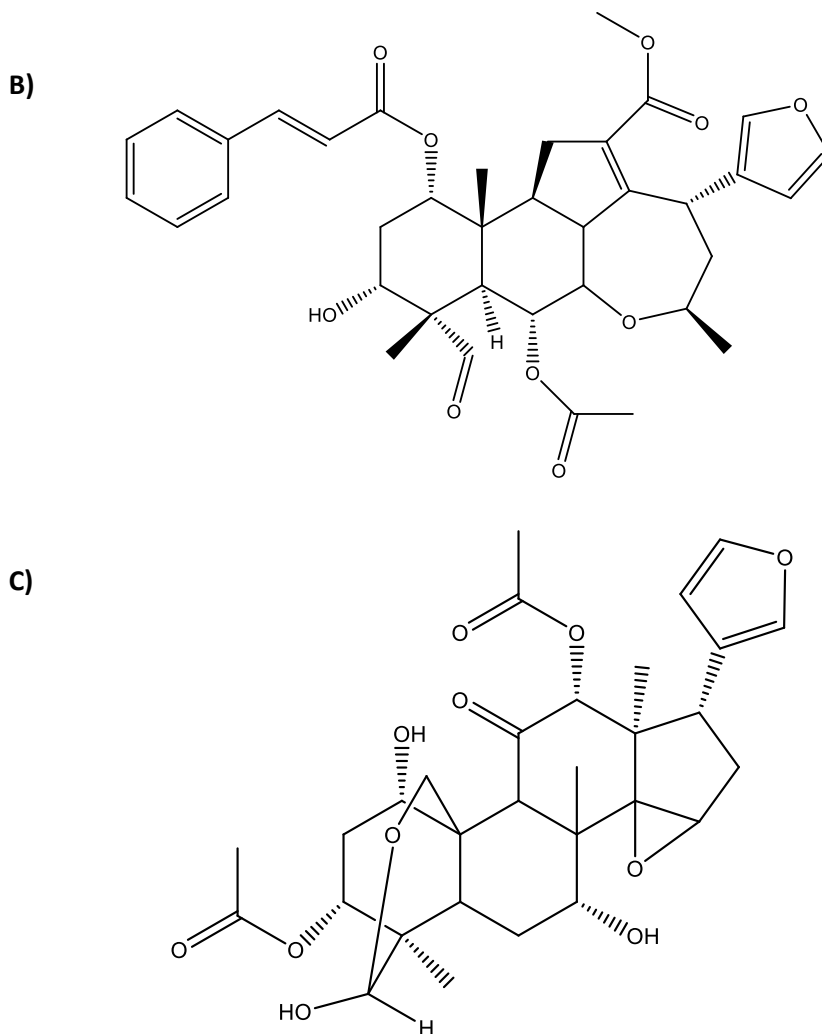
También se ha constatado que la actividad antialimentaria se reduce mucho por acción de la luz, lo cual produce una foto-degradación por acción directa sobre el anillo furánico (Suresh, 2002).

Si bien la actividad anti-insecto es la mayormente reportada, en la literatura existen casos de limonoides con actividad anti-ácaros, bactericida, antifúngica (fungiestática y fungicida), nematocida, helmintocida y protozoaricida (Srivastava, 1986; Sharma, 2003; Maciel, 2006; Roy 2006).

Pero la bioactividad de éstos metabolitos no termina allí, ya que se han aislado también de la corteza y frutos del paraíso, limonoides con actividad citotóxica (Ahn, 1994; Tayeka, 1996; Zhou, 2004).

A)





*Figura 3: Limonoides de Meliaceae: A) Azadirachtina A, el principal compuesto limonoide del árbol del Neem (*Azadirachta indica*). Limonoides de *Melia azedarach*: B) caracterizado en FQ-UdelaR (Díaz y Rossini, 2009) y C) *Toosendanina*.*

4.7- Estudios en Uruguay.

En Uruguay, el plan de bioprospección se ha llevado a cabo por varias instituciones, las que incluyen a la Universidad de la República (UdelaR), Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), en vías de valorizar la biodiversidad nativa y contribuir al desarrollo sustentable de la nación.

Dentro de tales planes de prospección, el árbol del paraíso ha sido objeto de investigación en un esfuerzo conjunto entre INIA y la Facultad de Química (FQ-UdelaR) a través del proyecto PDT 77/20 (Responsables: Ing. Agr. *PhD.* Roberto Zóppolo y el Quím. Facundo Ibáñez). Su posterior seguimiento en INIA fue a través del comienzo de ejecución (setiembre de 2009) del proyecto "Producción local participativa de bioplaguicidas (ANII_AIS 662) bajo los mismos responsables; y en FQ-UdelaR fue en estudios de posgrado (Quím. Martina Díaz; tutoría Prof. Dra. *PhD.* Carmen Rossini).

Al igual que en el caso de los pesticidas sintéticos, los bioplaguicidas deben ser aplicados junto a coadyuvantes para aumentar su potencial de acción. En INIA se ha trabajado en la realización de formulaciones insecticidas a base de *Melia azedarach* con el agregado de extractos de *Quillaja brasiliense* (Quillaja) y *Achyroclines satureoides* (Marcela). La Quillaja aporta saponinas (glucósidos de esteroides o de triterpenoides), que debido a sus propiedades surfactantes, posibilitan la penetración a través de la cutícula cerosa de plantas e insectos plagas, incorporándose a su medio interno (Chapagain & Wiesman 2006). La Marcela aporta flavonoides (tales como la quercetina), que al ser compuestos polifenoles actúan como antioxidantes y filtros UV para la protección de los limonoides contra los efectos degradativos de la luz. Es pertinente también aclarar que tanto las saponinas como los flavonoides pueden tener efecto pesticida, lo cual posibilitaría una sumatoria de efectos, no descartándose la sinergia entre los diferentes metabolitos (Philogene, 2005).

Los resultados que se han obtenido hasta el presente en los estudios de las formulaciones a base de paraíso en INIA Las Brujas, han demostrado una reducción del consumo de tejidos foliares (deterrencia alimentaria) para la especie *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae), efecto insecticida moderado para *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera:Aleyrodidae) y disminución de la oviposición para *Tuta absoluta* (Lepidoptera:Gelechiidae) y *Bonagota cranaodes* (Lepidoptera:Tortricidae); todos insectos de alta incidencia de daño en sistemas hortifrutícolas (Ibañez, Zoppolo; 2008). Dichos extractos testeados contra insectos benéficos, como la abeja melífera (*Apis mellifera*) y la avispa parasitoide *Ageniaspis citricola*, demostraron ausencia de efectos negativos para la supervivencia de los mismos. De la misma forma se hicieron ensayos de toxicidad con mamíferos, ejemplificando los mismos con la administración de extractos crudos concentrados a ratas hembras Wistar. Los extractos no indujeron a la muerte de los animales en ningún caso con la dosis límite de 2000 mg/kg de peso vivo, ni se hallaron alteraciones al efectuar la necropsia de los individuos (Ibañez, Zoppolo; 2008).

En ensayos de campo, se evaluó la toxicidad de las formulaciones de *Melia azedarach* contra *Thrips tabaci* (plaga del cultivo de cebolla), mostrando un control similar al del piretroide λ -cialotrina (Borges, 2010).

En cuanto a la determinación de limonoides, se ha observado una mayor concentración de los mismos en los frutos maduros comparados a los frutos verdes y las hojas verdes y senescentes (Ibañez, Zoppolo; 2008).

Por su parte en FQ-UdelaR, Díaz ha observado deterrencia alimentar en ensayos con *Spodoptera littoralis* y *Epilachna paenulata* (Coleoptera:Coccinellidae), e inhibición de asentamiento para los pulgones *Myzus persicae* y *Ropalosiphum padi* (Homoptera:Aphididae). Sin embargo no se determinó toxicidad de contacto contra *Nezara viridula* (Hemiptera:Pentatomidae) ni en ensayos de canulación oral contra larvas de *S. littoralis* (Díaz, 2010).

Aparte del limonoide representado en la figura 3, Díaz ha aislado también de poblaciones uruguayas de paraíso, el triterpenoide ohchinolal y derivados, los cuales no han demostrado hasta el momento actividad biológica por separado, lo cual indicaría un fuerte efecto sinérgico de sus constituyentes (Díaz, 2010).

5. Materiales y métodos.

5.1- Obtención de extractos de *Melia azedarach* y *Quillaja brasiliense*

5.1.1 Material vegetal

Los frutos de paraíso fueron colectados a partir de especímenes existentes en la Estación Experimental INIA-Las Brujas en el período junio-octubre de 2010. Los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento. El mismo se realizó mediante un molino de martillos que homogenizó el material vegetal. Se aseguró que los frutos procesados tuvieran características similares y no se encontraran en grave estado de deterioro ante visibles ataques fúngicos.

Las hojas de *Quillaja brasiliense* fueron colectadas de un espécimen existente también en INIA Las Brujas. Una vez cortadas, fueron secadas en estufa a 60 °C durante 24 horas, para posteriormente realizar la extracción.

5.1.2 Proceso de extracción

Una vez obtenido el material homogéneo, se realizó la extracción de los principios activos limonoides de *M. azedarach* a través de una máquina transportable específica a tal fin (Extractor rápido Timatic, figura 4), la cual realizó ciclos alternativos de extracción dinámicos y estáticos con etanol absoluto (S.A.T., Las Piedras) como solvente de extracción.

Los extractores rápidos sólido-líquido de la serie Timatic® (Perugia, Italia) se utilizan para la extracción de diferentes principios activos de vegetales a temperatura ambiente o bajo calentamiento. El ciclo de extracción alterna una fase dinámica obtenida a presión programada (que fuerza el solvente de extracción hacia el tejido vegetal) con una fase estática en la que los principios activos se transfieren hacia el solvente. Durante la fase dinámica se posibilita una percolación forzada con recirculación de aquél (INIA, 2009).

Los extractos obtenidos a través de ésta metodología son limpios, de acuerdo a un sistema de filtros que posee el extractor.



Figura 4: Máquina de extracción Timatic®.

- 1) Panel de control, 2) Botón de Emergencia, 3) cámara de extracción, 4) Contenedor de solvente.

Fuente: INIA Las Brujas

Los parámetros de extracción fueron los siguientes:

Masa vegetal extraída: 4 kilos.

Volumen de solvente de extracción: 15 litros de etanol.

Temperatura de funcionamiento: Temperatura ambiente.

Ciclo: *tiempo de compresión: 5.0 minutos

*tiempo de descompresión: 6.0 minutos

Número de ciclos: 90.

Número de percolaciones: 10.

El extracto obtenido de paraíso por éste medio tiene un fuerte color amarillo y olor característico.

El mismo procedimiento y parámetros fueron empleados para la extracción de las saponinas de Quillaja, obteniéndose un extracto verdoso.

Los extractos de ambas especies fueron almacenados a temperatura ambiente al abrigo de la luz hasta posterior tratamiento y disposición de los mismos.

Para el análisis del proceso de extracción se tomaron muestras a diferentes tiempos del proceso de extracción de frutos de *Melia azedarach* y se determinaron los parámetros limonoides totales y materia seca.

5.2- Cuantificación de principios activos fitosanitarios de *Melia azedarach*

5.2.1 Tratamiento de los extractos

Los extractos, una vez obtenidos fueron modificados en su pH para estudiar la degradación de los principios activos limonoides a diferentes condiciones de acidez.

Para ello se ajustó la acidez a pH= 7 (con NaOH) y pH= 4 (con ácido acético) en porciones por duplicado, dejándose asimismo de comparación, un duplicado de pH inicial del extracto (tal cual se obtiene con el Extractor Timatic).

5.2.2 Ensayos de Almacenamiento.

Porciones de 500 ml de extractos fueron almacenadas a temperatura ambiente, en condiciones de abrigo de la luz.

Las porciones fueron muestreadas semanalmente hasta la quinta semana del ensayo, y cada dos semanas luego de la quinta, por la obtención de 100 ml de cada extracto.

En todos los casos, los tratamientos fueron almacenados en heladera a -5° C hasta su correspondiente análisis.

5.2.3 Determinación de limonoides totales.

Este método permite realizar la determinación de limonoides totales en relación al patrón de toosendanina a través de un desarrollo de color y posterior medición espectrofotométrica.

Para ello se procedió tomando como base la técnicas descripta en Dai (1999), Breksa, (2007) y Abassi (2005).

Preparación de la muestra

Los solventes empleados fueron todos de calidad HPLC.

Se tomaron las muestras de extractos de los diferentes tratamientos y primeramente se les midió el pH correspondiente.

Una alícuota de 4.00 ml fue tomada de cada extracto etanólico y se le agregaron 2.00 ml de agua destilada y 200 µl de una solución de NaCl al 5% en agua (tuvo por objetivo romper la posible emulsión formada al mezclar la solución orgánica con agua). El desgrasado de la muestra se realizó por medio de seis extracciones con 2.00 ml de n-hexano (J. T. Baker). Luego de cada adición se agitó vigorosamente y se sometió la muestra a centrifugado (3500 rpm, 3 minutos; centrífuga *VWR Clinical 100*) para lograr una nítida separación de las capas

orgánica (superior) y acuosa (inferior). La capa orgánica se destinó a recuperación del solvente y se siguió trabajando con la acuosa. Posteriormente se adicionaron de forma secuencial tres porciones de 2.00 ml de diclorometano (Dorwil) y nuevamente se centrifugó (3500 rpm, 5 minutos), luego de agitación vigorosa. En ésta etapa se quedó con la capa enriquecida en limonoides (capa inferior orgánica) y se desecharon las capas acuosas con las sustancias más polares. Todas las capas orgánicas de cada muestra fueron reunidas y se le adicionó una punta de espátula de $MgSO_4$ (s) para secar las mismas. Posteriormente se realizó una filtración mediante papel de las fracciones orgánicas y se evaporó el exceso de solvente mediante rotavapor (*Technolab RE 52AA*). El residuo de éste proceso se retomó en 6.00 ml de acetonitrilo (Merck). El esquema separativo se presenta en la figura 5.

Desarrollo de color y medida espectrofotométrica

Se tomaron porciones de 525 μ l del extracto resultante del proceso anterior (para cada uno de los tratamientos) y se le adicionaron 825 μ l de una solución stock de ácidos perclórico-acético ($HClO_4/HAc$; 36:24) (Merck y Dorwil respectivamente) y 825 μ l de una solución 37 mg/ml de DMAB (1,4-dimetilaminobenzaldehído; Sigma Aldrich) en la solución stock, agitando luego vigorosamente. El DMAB es un indicador específico que reacciona con anillos furánicos, tiofuránicos e indólicos (Brekša, 2007). El proceso de desarrollo de color se hizo por duplicado para cada uno de los tratamientos, junto a estándares de toosendanina a 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.5 mg/ml con el objetivo de desarrollar una curva de calibración.

La medición espectrofotométrica fue realizada a los 30 minutos del agregado de reactivos a los extractos o patrones, en un espectrofotómetro *Shimadzu UV-Vis 160 A* de doble haz. Según bibliografía y de acuerdo a la determinación experimental, el máximo de absorción se presenta a 505 nm.

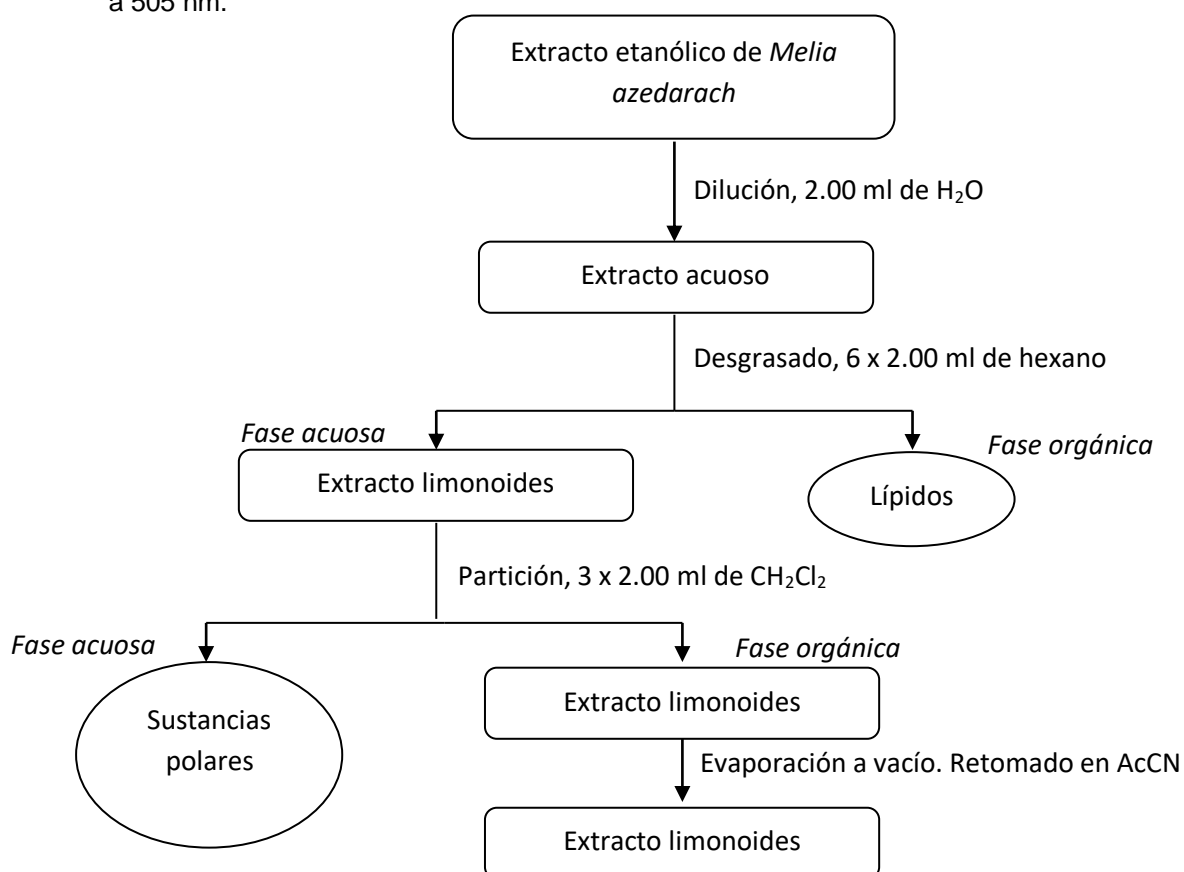


Figura 5: Esquema separativo empleado para la cuantificación de limonoides totales a través de espectrofotometría UV en los extractos alcohólicos de Melia azedarach.

5.2.4 Análisis por cromatografía en capa fina (TLC)

A los extractos etanólicos de almacenamiento (y posteriormente a cada fase del proceso de aislamiento, ver más adelante) se los sometió a corridas de cromatografía en capa fina con placas de sílica gel como fase estacionaria (Silica gel 60 F₂₅₄; Merck KGaA) y una mezcla de acetato de etilo (AcOEt) y n-hexano (3:1) como fase móvil. En todos los casos se sembraron 5 µl de cada uno de los extractos. Las corridas fueron realizadas en una cámara cromatográfica, y el revelado de las placas fue mediante dos reactivos reveladores: Vainillina sulfúrica y reactivo de Ehrlich, cuyas preparaciones se detallan a continuación.

Vainillina: Vainillina al 3% (p/v) en etanol absoluto con 1% (v/v) de H₂SO₄. Revelador de compuestos esteroidales. La coloración que desarrolla éste revelador con los limonoides es marrón-violeta.

Reactivo de Ehrlich: DMAB al 2% en la solución stock ácida mencionada en el apartado anterior. Revelador de furanos, tiofuranos y derivados indólicos. La coloración que da a los limonoides éste revelador es rosado-rojiza.

Las semanas de almacenamiento en oscuridad ensayadas fueron: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 7 a pH 7. A la par se sembraron estándares de Toosendanina de 0.3, 0.5 y 1.0 mg/ml, para realizar una estimación de las cantidades relativas a lo largo de las semanas con un programa especial a tal fin (TLSee).

Luego de realizar las corridas se tomaron fotografías de las placas y se escanearon ya que la coloración de las manchas no permanece en el tiempo.

Por problemas en la obtención de las imágenes (escáner con poca definición y fotografías con luces y sombras), no se pudo realizar la cuantificación.

Para ulteriores análisis rápidos se utilizo solamente el reactivo de Ehrlich como revelador ya que las placas reveladas por Vainillina presentan muchas interferencias con altos R_f (compuestos más apolares) como se puede ver en la figura comparativa 6.

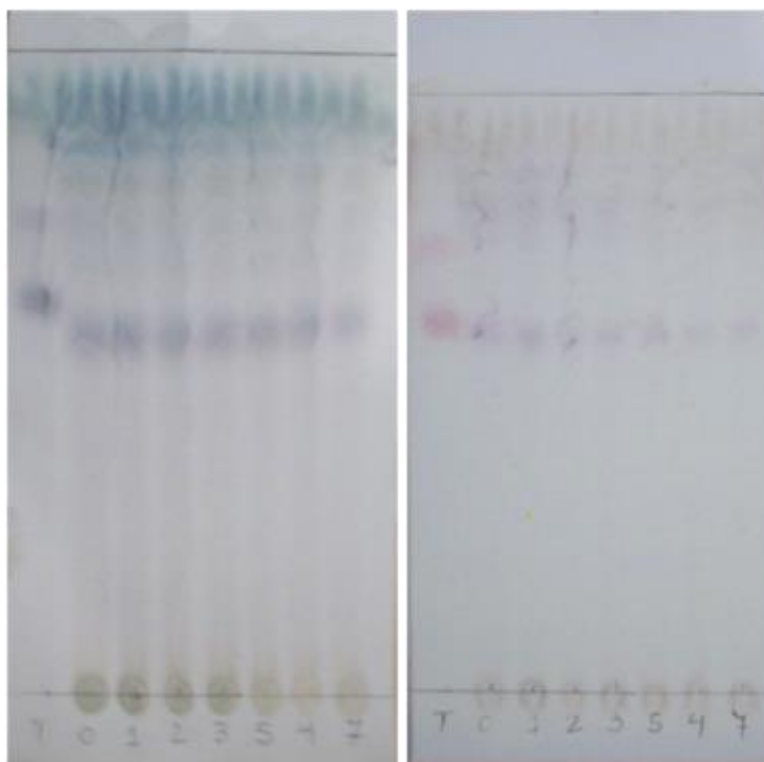


Figura 6: Comparación de las corridas de TLC para limonoides en las diferentes semanas de almacenamiento. La primera corresponde al revelador de Vanilina sulfúrica y la segunda al de reactivo de Ehrlich.

5.2.5- Análisis de materia seca (MS).

Los mismos fueron realizados para estudiar la variación de dicho parámetro con el tiempo de extracción durante el proceso. La materia seca es lo que resta de un material vegetal luego de realizar un calentamiento hasta peso constante, evaporándose el agua y componentes volátiles, y permaneciendo los componentes fijos como azúcares, proteínas, metabolitos de alto peso molecular (incluido limonoides), etc.

Para ello se colocaron 20 ml del extracto alcohólico en cápsulas de porcelana y las mismas fueron depositadas en estufa (24 horas, 105 °C) hasta completa sequedad. Se pesaron las cápsulas antes y después de la evaporación del solvente, y la materia seca se calculó como la diferencia entre ambas masas.

5.3 Obtención de principios activos limonoides a escala preparativa

5.3.1 Aislamiento y purificación por fraccionamiento.

En los procedimientos que se describen a continuación se trató de aislar limonoides de frutos y extractos de frutos de *Melia azedarach* por técnicas usuales empleadas en el aislamiento de productos naturales. Sin embargo, en la literatura se cita la labilidad de éstos compuestos al calor y a condiciones ligeramente ácidas (incluso por la realización de cromatografía en

columna con sílica normal), lo cual abre la posibilidad de aislar artefactos más que compuestos nativos de la planta. (Nakatani, 1994; Huang, 1995; Jarvis 1998).

5.3.1.1 A partir de los frutos de *Melia azedarach*

Se realizó éste procedimiento tomando como modelo la técnica descrita para la azadirachtina en Schroeder & Nakanishi, 1987. El esquema de los pasos seguidos se puede visualizar en la figura 8.

Los solventes de éste proceso fueron todos reusados, salvo en la etapa de retomado que fueron de calidad HPLC.

Es importante establecer que éste procedimiento y el siguiente descrito, fueron seguidos con el objetivo de obtener un sólido cristalino para poder realizar estudios estructurales. En ningún caso se obtuvo un sólido, sino más bien líquidos pastosos que debieron ser retomados en solventes para realizar estudios cromatográficos en HPLC. Ello sin duda, se debe a que (a pesar de que se purificaron los extractos), las impurezas no se pudieron eliminar, lo cual impidió la cristalización. El procedimiento de evaporación de solvente (mencionado en la figura 8 y siguientes) seguido fue simplemente dejar las fracciones bajo campana de extracción, en una placa de Petri limpia, hasta remoción total de aquél.

Desgrasado y extracción

Para ello se partió de 1.00 kg de frutos de paraíso finamente molidos y se le realizó un desgrasado en condiciones estáticas con n-hexano (tres veces con dos litros de solvente, durante dos días y medio cada vez). Posteriormente, a los frutos desgrasados se les realizó la extracción propiamente dicha con dos litros de etanol (también con tres etapas de dos días y medio cada una) por agitación mecánica (Agitador Arrow 2000, velocidad 2; ver figura 7).



*Figura 7: Dispositivo empleado para la extracción de material vegetal en el procedimiento de obtención de los limonoides a escala preparativa a partir de los frutos de *M. azedarach*.*

Luego del anterior proceso se realizaron particiones con MeOH/hexano (3 x 75 ml) para un desgrasado más fino, y H₂O/EtOAc (3 x 200 ml) para descartar los compuestos muy polares. El extracto en acetato de etilo fue a su vez filtrado sobre Sílica gel 60 (0,063-0,100 mm; Merck) para eliminar la humedad remanente en el mismo.

Al extracto resultante se lo sometió a cromatografía a vacío en embudo de Buchner, con sílica gel 60 (5 cm l. x 7 cm d.i.) como fase estacionaria y la fase móvil fue variando según las fracciones colectadas (cada una de las mismas fue de 30 ml) como se detalla a seguir:

*Fracción 1: n-hexano

*Fracciones 2 a 6: AcOEt-hexano (3:1)

*Fracción 7: AcOEt-MeOH (3:1)

*Fracción 8: AcOEt-MeOH (1:3)

*Fracción 9: MeOH

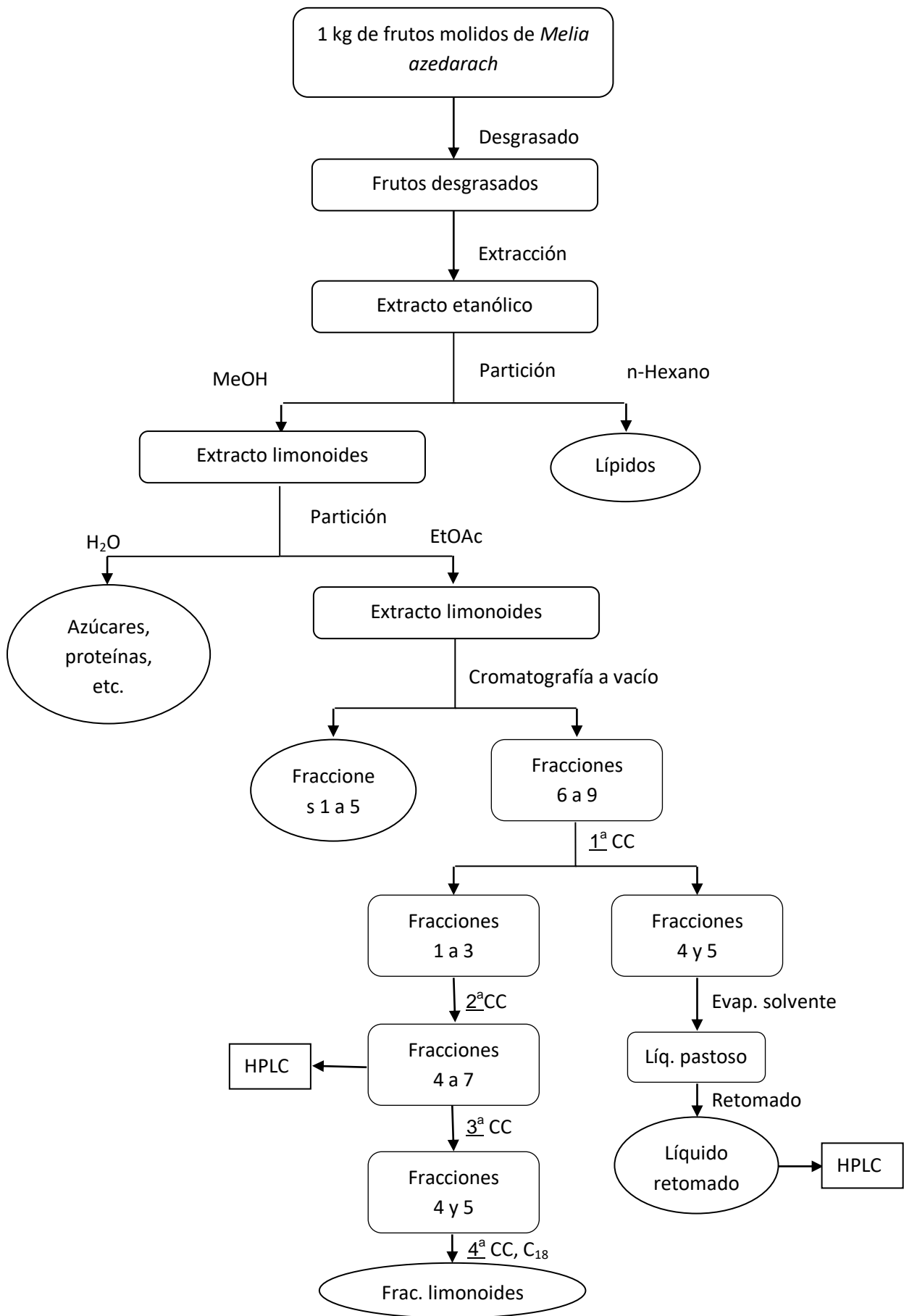


Figura 8: Esquema del procedimiento seguido para el aislamiento de limonoides a partir de los frutos de M. azedarach.

Las distintas fracciones fueron analizadas por TLC según el procedimiento descrito anteriormente, con siembra de 5 µl de muestra y reveladores de DMAB (Erllich) y Vainillina. De tal análisis se decidió reunir las fracciones 6-9.

Separación por cromatografía en columna

1^a Las fracciones anteriores fueron objeto de una nueva cromatografía para aumentar la eficiencia de separación (ésta vez sin vacío) con sílica gel 60 (18 cm l. x 0.5 cm d.i.) como fase estacionaria. La fase móvil fue AcOEt-hexano (3:1) y las porciones colectadas fueron de 5 ml.

De ésta separación resultó (evidenciado por TLC) una fracción (f_4) que aparentemente tenía una única mancha. Dicha fracción fue luego inyectada en HPLC en donde se apreció un pico que saturó el detector a un tiempo de retención menor que la toosendanina (ver figura 20 en Resultados y Discusión).

2^a A las fracciones de la primera columna no separadas se les volvió a hacer cromatografía en columna, continuando con el aumento de la eficiencia por el aumento del largo de columna (26 cm. L. x 0.5 cm d.i.) de fase estacionaria sílica gel 60, con la misma fase móvil y el mismo volumen de colecta de fracciones.

Del análisis simultáneo por TLC se apreció que las fracciones 4 a 7 revelaban manchas similares en coloración a la toosendanina y fueron reunidas para una nueva separación en columna. También dicha porción fue inyectada en HPLC.

3^a Esta vez el cambio introducido fue la fase móvil ya que se empleó AcCN y se colectaron porciones de 2 ml.

Dos fracciones más (f_4 y f_5) se guardaron para una nueva separación.

4^a Esta separación en columna fue realizada cambiando la fase estacionaria ya que se realizó con Li Chroprep RP 18 (25-40 µm) (fase reversa). La separación fue realizada en una columna de dimensiones (2 cm l. x 0.5 cm d.i.). Las fracciones colectadas fueron de 1 ml, según el siguiente esquema de fases móviles.

*Fracciones 1 y 2: H₂O-MeOH (9:1)

*Fracciones 3 a 5 H₂O-MeOH (7:3)

*Fracciones 6 a 8: H₂O-MeOH (5:5)

*Fracciones 9 a 12: MeOH

Del análisis por TLC surgió que en las fracciones f_1 , f_2 , f_4 , f_6 y f_7 se evidenciaron pocas manchas (figura 9), las cuales revelaron por ambos reveladores (DMAB y Vainillina) en la misma coloración que la toosendanina, indicando una correspondencia presumible a limonoides. Por un error experimental dichas fracciones no pudieron ser sometidas a HPLC (contaminación de

la muestra al intentar cristalizar). Aún así y a pesar de la poca separación que se evidencia en la figura 9, se puede inferir que éste procedimiento puede llevar a la obtención de estándares limonoides, siempre y cuando se parta de una cantidad inicial superior a la del procedimiento descrito anteriormente (escalado).



Figura 9: TLC revelada por DMAB mostrando las fracciones resultantes del proceso descrito en el texto comparado al patrón de toosendanina (T). Se puede evidenciar que todas las fracciones revelan aparentes compuestos limonoides.

Todo el proceso anterior fue tomado como *know-how* para la obtención de limonoides a escala preparativa del propio extracto obtenido del extractor rápido Timatic®, ya que la disponibilidad de frutos fue escasa en ésta etapa del estudio.

5.3.1.2- A partir del extracto realizado en Timatic® de *Melia azedarach*

5.3.1.2.1- Primer Procedimiento

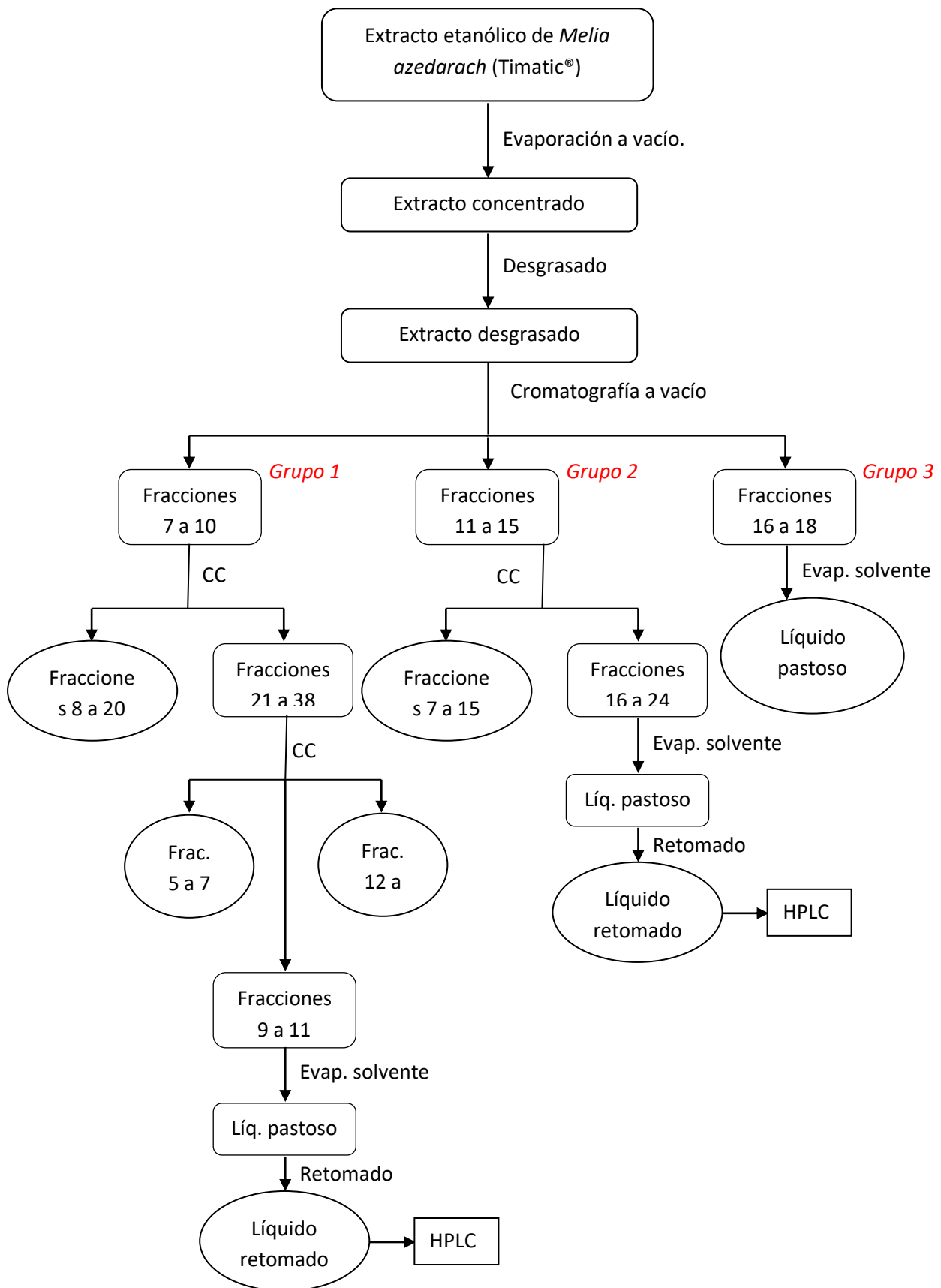


Figura 10: Esquema del primer procedimiento seguido para el aislamiento de limonoides a partir del extracto de frutos obtenido del extractor Timatic®.

En esta oportunidad se partió de 5 litros del extracto, y se le concentró en rotavapor hasta 500 ml, tratando de evitar la exposición excesiva al calor que pudiese degradar los principios

activos. Posteriormente se efectuó el desgrasado con n-hexano en bola decantación por agitación con 6 porciones de 150 ml.

Al extracto anterior se lo separó mediante una cromatografía a vacío en embudo de Buchner, con sílica gel 60 (5 cm l. x 7 cm d.i.) como fase estacionaria y la fase móvil fue modificándose según la siguiente descripción:

*Fracciones 1 a 5: n-hexano (100ml). El objetivo de ésta colecta fue hacer un desgrasado más fino.

A partir de aquí se comenzaron a tomar fracciones de 50 ml.

*Fracción 6: AcOEt-hexano (1:1)

*Fracciones 7 a 9: AcOEt-hexano (3:1)

*Fracciones 10 a 12: CH₂Cl₂-AcOEt-hexano (4:3:1)

*Fracciones 13 a 15: CH₂Cl₂-MeOH (3:1)

*Fracciones 16 a 18: CH₂Cl₂-MeOH (1:1)

*Fracciones 19 a 21: MeOH

Las distintas fracciones fueron analizadas por TLC según el procedimiento descrito anteriormente, con siembra de 5 µl de muestra y revelador de DMAB (Erllich) y Vainillina sulfúrica. De ello surgió que había tres grupos de fracciones diferenciados en cuanto a los compuestos revelados: grupo 1 (f₇ a f₁₀, más apolares), grupo 2 (f₁₁ a f₁₅) y grupo 3 (f₁₆ a f₁₈; más polares). En base a ello se decidió realizar una cromatografía líquida en columna que permitiese una mejor separación.

Separación por cromatografía en columna

Dado que en éste procedimiento a partir del extracto fue obtenida mayor cantidad de muestra, se decidió utilizar una columna cromatográfica mayor (para no saturar la sílica), conectada a una bomba peristáltica (Tris Pump, Teledyne ISCO; figura 11), cuyo objetivo es pulsar la fase móvil a través de aquella con movimientos peristálticos. Ello repercute en una mayor velocidad de flujo y con ello una mayor eficiencia cromatográfica.



Figura 11: Sistema cromatográfico con bomba peristáltica empleado para la separación de los extractos de Melia azedarach.

Grupo 1: La separación en la columna (fase estacionaria: sílica gel 60; 19 cm. L. x 2.0 cm d.i.) fue realizada isocráticamente (fase móvil: AcOEt-hexano (3:1)) colectando fracciones de 5 ml. A ésta separación se sometieron los grupos 1 y 2, mientras que el grupo 3 fue empleado para intentar obtener un sólido (veáse figura 10).

Es digno de mencionar que a partir de éste procedimiento, se **enfocó** en las fracciones que de acuerdo a la evaluación realizada por TLC, presentaban mayor intensidad de mancha de los reveladores específicos, con lo cual presumiblemente, también mayor contenido de limonoides.

Luego de la cromatografía en columna con bomba peristáltica, mediante evaluación por TLC se evidenció posible presencia de limonoides en las fracciones 21 al 38, por lo que se decidió hacer un paso más de cromatografía en búsqueda de aislar algún compuesto.

Con las fracciones anteriores reunidas se les volvió a someter a cromatografía en columna (fase estacionaria: sílica gel 60, 25 cm L x 0.5 cm d.i.), con la fase móvil variando (debido a que la isocrática anterior insumió mucho tiempo) según:

*Fracciones 1 a 7: AcOEt-hexano (3:1)

*Fracciones 8 a 13: MeOH-AcOEt-hexano (4:3:1)

*Fracciones 14 a 20: MeOH

Se obtuvieron tres fracciones (9 a 11) presumiblemente enriquecidas en limonoides (según los reveladores de TLC) que fueron sometidas a análisis por HPLC, luego de intentar la cristalización.

Grupo 2: En éste caso también se realizó cromatografía en columna con la misma columna (recuperada) que el grupo anterior (con bomba peristáltica) y recogiendo el mismo volumen de fracciones (5 ml), pero variándose la fase móvil:

*fracciones 1 al 10 (AcOEt-Hexano) (3:1)

*fracciones 10 al 20 (MeOH-AcOEt-Hexano) (4:3:1)

*fracciones 20 al 30 MeOH

De acuerdo a la evaluación por TLC, se decidió juntar las fracciones 16 a 24, tras lo cual se la dejó evaporar el solvente e intentar obtener un sólido. Lo anterior tampoco se pudo lograr, pero se obtuvo un líquido pastoso que fue retomado en MeOH y destinado a análisis por HPLC.

Grupo 3: Por la misma metodología citada se permitió evaporar el solvente a temperatura ambiente bajo campana (con el objetivo inicial de poder obtener cristales) resultó en un líquido de consistencia aceitosa, que al someterse a TLC reveló varias manchas, una de las cuales fue al mismo R_f que la toosendanina.

Como se describe en Resultados, el análisis por HPLC de las diferentes fracciones, arrojó ausencia de toosendanina o posibles limonoides con tiempo de retención similar (al menos en cantidades apreciables), volviéndose a encontrar el mismo gran pico de un compuesto con bajo índice de retención (más polar que los limonoides) del primer procedimiento.

Dado que en el paraíso están reportados compuestos flavonoides como la quercetina (Carpinella, 2006) y que las fracciones obtenidas presentaban color amarillo (típico de éste tipo de compuestos), se decidió realizar un nuevo proceso procurando eliminar los posibles limonoides en un paso de clean-up y también variar las fases estacionarias empleadas.

5.3.1.2.2- Segundo Procedimiento

En ésta oportunidad (ver figura 12) también se partió del extracto concentrado (50 ml), al cual se lo sometió a desgrasado (3x150 ml de n-hexano) y nuevamente cromatografía a vacío (sembrando 25 ml del extracto desgrasado), con variación solamente en el grado de polaridad del gradiente de fase móvil, ya que el largo de columna se mantuvo constante (110 g de sílica: 7 cm en embudo Buchner), colectando 50 ml de fracciones.

El gradiente de fase móvil fue:

*Fracción 1: n-hexano

*Fracción 2 a 4: AcOEt-hexano (1:1)

*Fracciones 5 a 7: AcOEt-hexano (3:1)

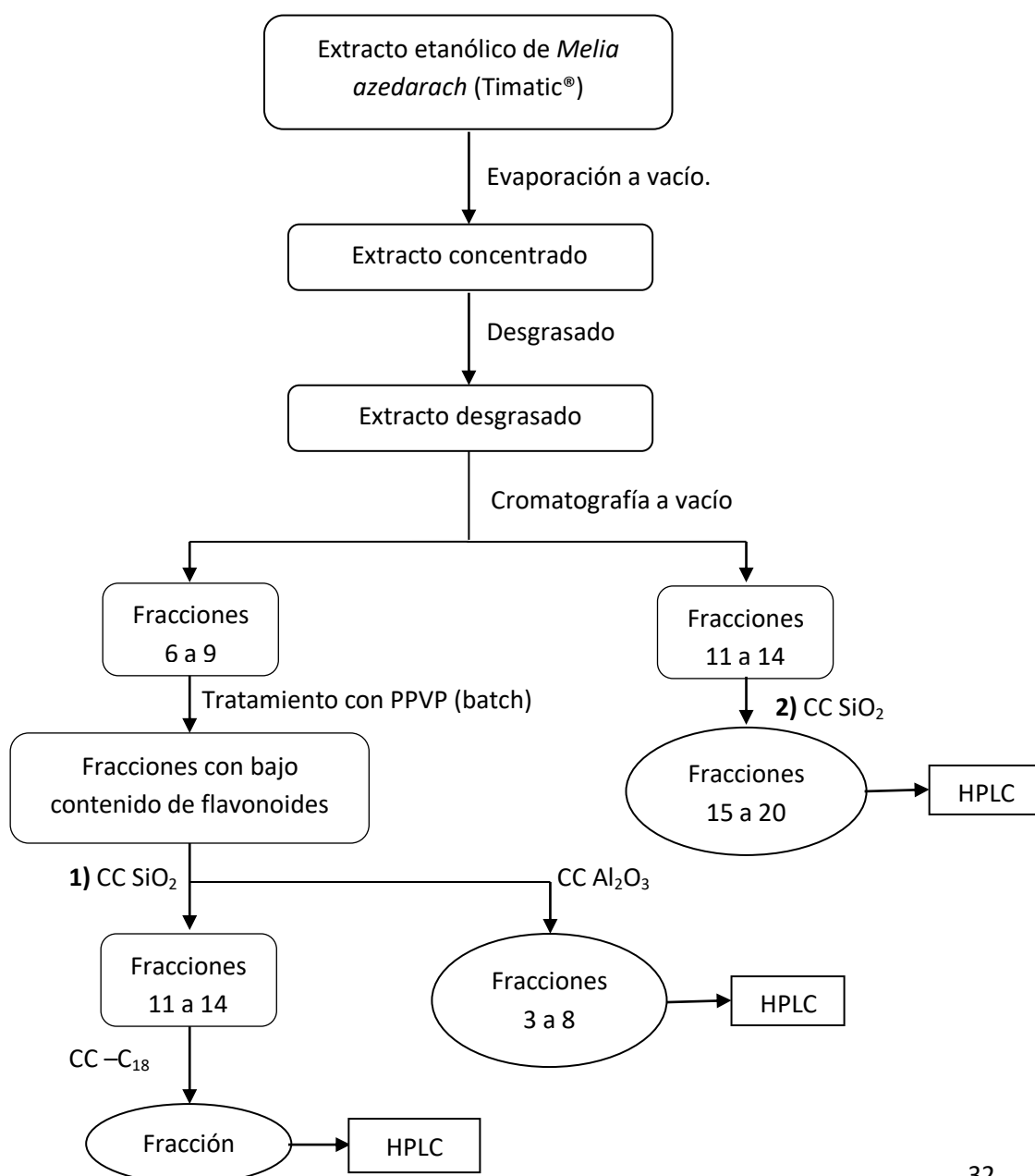
*Fracciones 8 a 10: AcOEt-MeOH (3:1)

*Fracciones 11 a 13: AcOEt-MeOH (1:1)

*Fracciones 14 y 15: AcOEt-MeOH (1:3)

*Fracciones 16 a 18: MeOH

Del análisis posterior por TLC con reactivo de Ehrlich y Vainillina sulfúrica, se decidió coleccionar las fracciones 6 a 9, con presumible mayor cantidad de limonoides, aunque las fracciones 11 a 14 también evidenciaron posible presencia (aunque con revelado de mayor grado de sustancias no deseadas).



*Figura 12: Esquema del segundo procedimiento seguido para el aislamiento de limonoides a partir del extracto de frutos de *M. azedarach* obtenido del extractor Timatic®.*

Como se puede apreciar en el esquema, se siguió trabajando con ambas porciones. En éste caso se aplicó a las fracciones sin solvente en batch una porción de 1 g de PPVP (poli-pirrolidona, P-6755; Sigma Aldrich; figura 13), cuya función es eliminar los polifenoles del extracto (incluyendo los flavonoides) (Glenn, 1972). La pasta sólida resultante del tratamiento se retomó en 5 ml de AcOEt-Hexano (3:1) y se lo sometió a dos diferentes tipos de cromatografía en columna.

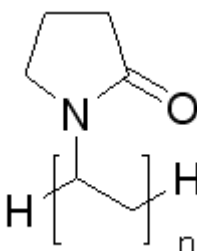


Figura 13: Estructura química de la polivinilpirrolidona (PVP). La PPVP (polímero con entrecruzamiento de cadenas de PVP) es empleada para la eliminación de compuestos polifenólicos de muestras biológicas.

Fuente: Sigma Aldrich

Cromatografía en Sílica:

1) La columna tuvo las dimensiones de 25 cm L x 0.5 cm d.i., las fracciones colectadas fueron de 1ml y el gradiente de fase móvil fue el siguiente:

*Fracciones 1 a 3: Tolueno

*Fracciones 4 a 6: (Tolueno: AcCN) (3:1)

*Fracciones 7 a 9: (Tolueno: AcCN) (1:3)

*Fracciones 10 a 12: AcCN

*Fracciones 13 a 15: MeOH

Del análisis por TLC (Vainillina sulfúrica y reactivo de Ehrlich) surgió que los limonoides se encontraban en las fracciones 11 a 14, pero igualmente había otro tipo de compuestos con R_f mayores, por lo cual se decidió seguir purificando a través de una fase reversa.

2) Se empleó nuevamente la columna conectada a la bomba peristáltica; fase estacionaria: sílica gel 60; 19 cm. L. x 2.0 cm d.i.. Las fracciones colectadas fueron de 2 ml, de acuerdo al gradiente:

*Fracciones 1 a 4: n- Hexano

*Fracciones 5 a 8: (AcOEt-Hexano) (1:1)

*Fracciones 9 a 13: (AcOEt-Hexano) (3:1)

*Fracciones 14 y 15: AcOEt

*Fracciones 16 a 25: MeOH

De acuerdo a las corridas por TLC realizadas, las fracciones 15 a 20 resultaron enriquecidas en posibles limonoides, por lo cual fueron evaporadas a vacío e inyectadas a HPLC, como lo indica el diagrama.

Cromatografía en Fase Reversa (C₁₈):

La fase empleada fue la Li Chroprep RP 18 (25-40 μm) utilizada anteriormente. Las dimensiones de la columna fueron 2 cm l. x 0.5 cm d.i. Se colectaron fracciones de 1 ml, variando el gradiente de fase móvil como se indica (igual que en la anterior cromatografía reversa):

*Fracciones 1 y 2: H₂O-MeOH (9:1)

*Fracciones 3, 4, 5 H₂O-MeOH (7:3)

*Fracciones 6, 7 y 8: H₂O-MeOH (5:5)

*Fracciones 9, 10, 11 y 12: MeOH

La limpieza de la columna se llevó a cabo con tetrahidrofurano (THF).

Se obtuvo una fracción (8) cuyo revelado por los dos reactivos resultó en coloración propia de limonoides. A continuación se diluyó en 1/10 en MeOH y se inyectó en HPLC.

Cromatografía en Alúmina

Las dimensiones de la columna fueron 10 cm l. x 0.5 cm d.i. y se colectaron fracciones de 2 ml. La fase móvil varió de acuerdo a:

*Fracciones 1 a 5: (AcOEt-Hexano) (3:1)

*Fracciones 6 a 10: (AcOEt-MeOH-Hexano) (8:7:1)

*Fracciones 11 a 15: (AcOEt: MeOH) (1:1)

*Fracciones 16 a 20: MeOH

Del análisis por TLC surgió que las fracciones enriquecidas en limonoides fueron las correspondientes 3 a 8, pero sin poder lograr una separación definida.

5.3.1.2.3- Eliminación del componente desconocido.

A lo largo de los tres procedimientos descritos, se obtuvieron fracciones enriquecidas en un compuesto con tiempo de retención en HPLC (fase reversa) de 6, 15 minutos que saturó el detector (ver Resultados). Por su pronta elución se consideró pudiese tratarse de un compuesto muy polar, y dado que las fracciones presentaban notorio color amarillo, se pensó en la posibilidad que fuese un flavonoide.

Es por ello que se ideó otro procedimiento intentando evitar la presencia de flavonoides y procurando obtener un sólido para realizar análisis estructurales.

Para ello se tomaron 90 ml del extracto y se le hizo tres veces partición con 100 ml entre H₂O y CH₂Cl₂. Las fases orgánicas fueron reunidas y secadas con MgSO₄, para posteriormente eliminar el solvente por evaporación en rotavapor. Siguiendo la técnica propuesta en Houghton (1998), al residuo anterior se lo disolvió en una mezcla MeOH-H₂O (1:1) junto a 7.5 g de PPVP sólido, para posteriormente filtrar y centrifugar (5800 rpm x 10 min). La eliminación del MeOH se realizó por evaporador rotatorio, mientras que la eliminación del H₂O (previo congelado a -80°C se realizó en un liofilizador (LabConco Freeze Dry System. Freezones 4.5). De lo anterior se obtuvo un sólido marrón y un aceite pastoso, adherido a las paredes de los tubos. El mismo fue posteriormente retomado en MeOH e inyectado en HPLC, donde se constató la eficacia del procedimiento en la eliminación del componente problema.

5.3.2 Pruebas de precipitación.

Debido a que los procedimientos de fraccionamiento no parecieron funcionar muy bien en la obtención de limonoides, se intentó realizar una precipitación de los mismos en base a dos argumentos: 1) que existe bibliografía que considera dicho aspecto (Melwita, 2010) que describe la precipitación selectiva de azadirachtina del aceite de Neem y 2) observaciones experimentales realizada en el procedimiento de cuantificación de limonoides totales descrito en el apartado 5.2.3 y aislamiento de limonoides por fraccionamiento en el apartado 5.3.1.1.

Las observaciones fueron que 1) al retomar el residuo remanente de la evaporación de diclorometano con acetonitrilo, y llevarlo al freezer (-5 °C), luego de un par de horas aparecía un precipitado blanco y 2) el extracto de AcOEt (figura 8) almacenado en heladera también presentaba abundancia de un precipitado blanquecino fino, que a la postre resultó hielo.

Para evaluar la primera observación se empleó el mismo procedimiento descrito en la figura 5, salvo que a fines comparativos se retomó el residuo en metanol y acetonitrilo y se lo llevó a freezer. Al cabo de 24 horas se observó el mismo precipitado en la fracción de AcCN y no así

en la correspondiente al MeOH. Se hizo TLC del mismo (disuelto en MeOH), pero no se pudo observar ninguna mancha con los reveladores de limonoides empleados (DMAB y Vainillina). Es por ello que se supone que el precipitado no sea de limonoides, quedando pendiente la realización de test fitoquímicos para discriminar por grupo de metabolitos primarios y secundarios.

5.3.3- Extracción en fase sólida (SPE) de varios órganos de *Melia azedarach*.

Para evaluar la posible presencia de toosendanina en diferentes órganos, se tomaron muestras de: corteza, hojas, ramas nuevas, frutos verdes, semillas (disponibles con anterioridad) de árboles de paraíso existentes en INIA Las Brujas. Los diferentes órganos fueron molidos mediante licuadora y mortero de porcelana, tomándose 1.0 g para realizar la extracción con 10.00 ml de (EtOH-H₂O) (60:40) a través de ultrasonido por 45 minutos. Luego de ese tiempo, las porciones fueron centrifugadas (10 min x 4000 rpm), y del sobrenadante se tomó 1.00 ml para la extracción en SPE en cartuchos de C18 (Supelclean ENVI-18; Supelco). La elución de los compuestos retenidos fue con alícuotas de 1.00 ml de: 1) H₂O, 2) AcCN-H₂O (1:1), 3) AcCN y 4) THF. La fracción de acetonitrilo y agua de cada uno de los órganos fue inyectada en HPLC. En todos los casos, el agua empleada fue ultrapura.

5.3.4- Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Para éstos análisis se empleó un equipo compuesto por un controlador Waters 600, equipado con Autosampler 717 plus y controlador de temperatura Waters TCM. Los detectores empleados fueron UV Waters 486, y de fluorescencia Shimadzu RF-10 AXL.

Se inyectaron en HPLC tanto el estándar de toosendanina en AcCN o MeOH (1 mg/ml) como las fracciones obtenidas en el proceso de aislamiento y purificación (siempre en solvente compatible a la fase móvil). Las condiciones de corrida fueron las siguientes. Inyección: 10 µl, temperatura: 40 °C, columna Rigel HPLC C18 (250 mm l. x 4.6 mm d.i.; 5 µm de tamaño de partícula). Fase móvil isocrática de AcCN-H₂O (35:65) a un flujo de 1 ml/min. Las muestras previo a inyectar se filtraron por medio de un filtro de 0.45 µm (Millipore).

Inicialmente se empleó detección por fluorescencia con λ_{exc} : 230 nm y λ_{em} : 320 nm, según la técnica publicada por Meng (2009), lo que no demostró respuesta significativa a los analitos. Por ello a posteriori se detectó por UV a 215 nm (Ong, 2007).

5.3.5- Comparativa con patrones

Con el objetivo de saber si el compuesto problema pudiese ser alguno de los patrones disponibles en el laboratorio (flavonoides previamente descritos en *Melia azedarach* y el limonoide azadirachtina), se procuró comparar su elución junto a la de éstos últimos.

Es así que se inyectó en HPLC bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, un estándar de flavonoides: Rutina (1,42 mg/ml; Fluka) y Quercetina deshidratada (1,66 mg/ml;

Sigma Aldrich) en MeOH (Carlo Erba Reagents) y un estándar de Azadirachtina aprox. 1 mg/ml preparada de una solución madre de aprox. 5 mg/ml (Sigma Aldrich). En éste último caso no se evidenció pico en HPLC debido presumiblemente a la degradación que hubiese ocurrido (la solución tenía 1 año y medio de antigüedad).

La Quercetina es un flavanol, que al combinarse y formar enlace glicosídico con el disacárido Rutinosa (Ramnosa (β -1,6) Glucosa) forma la Rutina, la cual tiene amplia distribución en el reino vegetal, incluyendo las hojas de *Melia azedarach* (Carpinella, 2006).

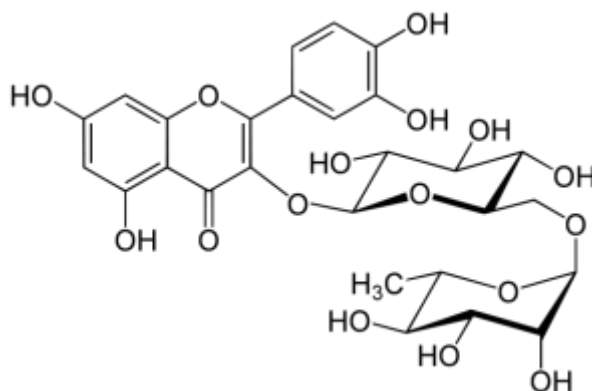


Figura 14: Estructura del glicósido Rutina: Quercetina (aglicona) + Rutinosa (disacárido), empleados para comparar la elución del compuesto problema.

5.3.6- Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

A la fracción 4 del procedimiento de aislamiento a partir de frutos de *Melia azedarach* se la sometió a análisis por RMN, evaporando a sequedad la misma, obteniéndose un sólido amarillo amorfo, que fue retomado en CHCl_3 deuterado (Minipul). Se realizaron experimentos de ^1H y de COSY a 400 MHz en FQ-UdelaR.

5.3.7- Ensayos de corrimiento de bandas en UV:

5.4 –Ensayos de efectividad del bioplaguicida

5.4.1- Formulación

Las formulaciones empleadas tuvieron en cuenta antecedentes previos (Ibañez, 2008: a, b, c; Díaz, 2010) y el hecho de que los extractos etanólicos se deben aplicar diluidos en agua al material vegetal porque de lo contrario marchita las hojas (J. P. Burla, comunicación personal).

Dicho lo anterior, las formulaciones empleadas para los ensayos de laboratorio fueron al 0.1%, 1% y 10% del extracto diluido en agua; y 10% con 1% de extracto de hojas de Quillaja (para que las saponinas actuaran como humectantes).

Un extracto al 1% con extracto etanólico de Quillaja al 1%, fue empleado para el ensayo de campo.

5.4.2-Pruebas a laboratorio

El organismo con el cual se realizó el ensayo fue *Diabrotica speciosa* (Coleoptera:Chrysomelidae), colectado sobre zapallos en el Módulo de Producción Orgánica de INIA Las Brujas. La plaga se conoce vulgarmente como “San Antonio Verde” o “vaquilla de las cucurbitáceas, plaga polífaga cuya distribución se restringe a las Américas (Bentancourt & Scatoni, 1999). Este insecto (figura 15) ha sido reportado en más de 60 especies, sin embargo aparece íntimamente relacionada a las cucurbitáceas (familia del zapallo), tolerando por tal los principios amargos cucurbitacinas (EPPO, 2005). Es particularmente tolerante al frío, pasando el invierno como adulto oculto en plantas perennes. En cuanto a su biología, tiene tres estadios larvales y su tiempo de desarrollo es de 25 días, y de 6 días para el caso de la pupa; reproduciendo tres generaciones anuales. Con su aparato masticador causa un gran daño en los cultivos, desde el primer estadio larval en el que afecta al sistema radicular. Sin embargo los adultos comen sobre hojas, frutos y especialmente el polen de las flores, lo cual compromete la descendencia del cultivo y lo hacen una plaga de consideración (EPPO, 2005, Bentancourt & Scatoni, 1999).



Figura 15: Adultos de *Diabrotica speciosa*, “San Antonio Verde”, plaga de cucurbitáceas.

Fuentes:

<http://www.viarural.com.ar/viarural.com.ar/agricultura/aa-insectos/diabrotica-speciosa-01.jpg>

http://farm3.static.flickr.com/2034/2534888883_b93034a1d0.jpg

Metodología:

A cada adulto se lo sometió a un bioensayo de consumo con elección de alimento. Para ello se colocaron en placas de Petri de plástico dos trozos foliares de papa (*Solanum tuberosum*; reportada como consumida *in vivo* por la plaga) a manera de círculos de 2 cm de diámetro. Uno de los mismos fue sumergido 5 segundos en agua (control) y el restante fue sumergido de la

misma manera en cada uno de los tratamientos descritos anteriormente: 0.1%, 1%, 10% y 10% con Quillaja. Los insectos fueron dejados en condiciones con luz y a temperatura controlada de 25 °C durante 24 horas, tiempo tras el cual se los sacó de las placas y se recogieron las muestras foliares. Con las mismas se hizo una estimación de la cantidad consumida (según la porción entera de hoja fuese 100%).

5.4.3-Relevamiento de las condiciones fitosanitarias del cultivo de tomate a campo.

En una recorrida efectuada por el equipo técnico del proyecto, visitando predios de productores orgánicos de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la localidad de Santa Rosa, se evaluó el estado fitosanitario de los cultivares. En la misma se constató que la “mosca blanca” (*Trialeurodes vaporariorum*, ver sección siguiente) no es un problema generalizado en todos los predios, sino que depende mucho de la gestión que lleva a cabo el productor en su explotación, así como de la antigüedad que la misma posea. Así predios en los cuales la explotación no lleva más de dos años, no poseen problemas de mosca blanca (habiéndose constatado visualmente altos niveles de parasitoides y depredadores), presumiblemente por no haber encontrado todavía las condiciones biológicas para establecerse, lo cual es típico de K estrategistas (Stubbs, 1977).

Una plaga que va en aumento a percepción de los productores y los técnicos es la llamada “vaquilla” o “bicho moro” (*Epicauta adspersa*, Coleoptera:Meloidae), del cual fue constatado gravísimos daños en cultivo de acelga durante la recorrida. Uno de los productores (Derly Tejera) dijo haber aplicado extracto de paraíso al 1% (suministrado por INIA) sin efecto aparente.

Otra observación muy interesante fue realizada en la casa del productor Daniel Bentancor, quien aplica una formulación comercial a base de Neem en invernáculos, teniendo algunos bajo el tratamiento con el hongo entomopatógeno *Lecanicillium lecanii* (ensayo montado por INIA Las Brujas). En éstos últimos se observó un gran nivel poblacional de moscas blancas, mientras que en los tratamientos con Neem era casi inexistente la plaga. Vinculado a ello, en los alrededores de los invernáculos tratados con Neem se pudo evidenciar malezas con altas presencias de moscas blancas. Ello es una verificación más de que el Neem tiene actividad repelente contra dichos insectos, lo cual está profusamente comprobado (Puri, 1999).

En la gira también se pudo apreciar predios con problemas de la polilla *Tuta absoluta* y de “San Antonio Verde”.

5.4.4-Pruebas a campo.

El ensayo fue realizado en la localidad de Santa Rosa (departamento de Canelones) en el predio de productores orgánicos (Manuel y Julio Moura), en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) en invernáculo. Este ensayo fue realizado previo a la recorrida anteriormente expuesta.

La plaga que más afectaba a la explotación era la “mosca blanca” (*Trialeurodes vaporariorum*), un homóptero, llamado así por el polvillo blanco y sedoso que producen sus alas (Bentancourt & Scatoni, 1999). Son insectos hemimetábolos o de metamorfosis incompleta, que pasan por cuatro estadios ninfales, los que posteriormente dan paso al adulto. El primer estadio ninfal es el único con capacidad de movimiento, mientras que los restantes estadios son de forma aplanada y permanecen inmóviles en el envés de las hojas (Bentancourt & Scatoni, 1999). Las ninfas secretan una sustancia azucarada, favoreciendo la aparición de fumagina: un hongo oscuro que cubre el follaje entorpeciendo la fotosíntesis (Bentancourt, 2004).



Figura 16: Adulto y ninfas de mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), plaga de tomate.

Fuentes:

[http://hightunnels.cfans.umn.edu/images/GHWF%20\(W.%20Billen,%20Pflanzenbeschaustelle,%20Weil%20am%20Rhein,%20Bugwood.org\).jpg](http://hightunnels.cfans.umn.edu/images/GHWF%20(W.%20Billen,%20Pflanzenbeschaustelle,%20Weil%20am%20Rhein,%20Bugwood.org).jpg)

http://www.inia.cl/ururi/images/plagas/pimiento/plagas_pimiento_8.jpg

Como todos los homópteros tanto ninfas como adultos tienen un aparato bucal pico succionador (estilete) que usan para alimentarse de la savia vegetal. Al hacerlo, no sólo causa daños a las estructuras vegetativas por la introducción de aquél (daños directos), sino también por la introducción de virus y bacterias fitopatógenas, desencadenando enfermedades en el cultivo (daños indirectos). Otro daño indirecto es por la aparición de fumagina (Bentancourt & Scatoni, 1999; Bentancourt, 2004).

Metodología:

Para la realización del ensayo, el invernáculo fue dividido en 4 cuadrantes y el tratamiento aplicado por rociado en dos de ellos (cuadrantes 1 y 4), dejándose dos controles (2 y 3). Como se dijo anteriormente, el bioplaguicida aplicado fue el extracto etanólico de *Melia azedarach* al 1% con Quillaja como coadyuvante.

Para evaluar la población de moscas blancas se tomaron al azar diez plantas de tomate y se contó el número de insectos adultos en el envés de las tres hojas de mayor desarrollo de la

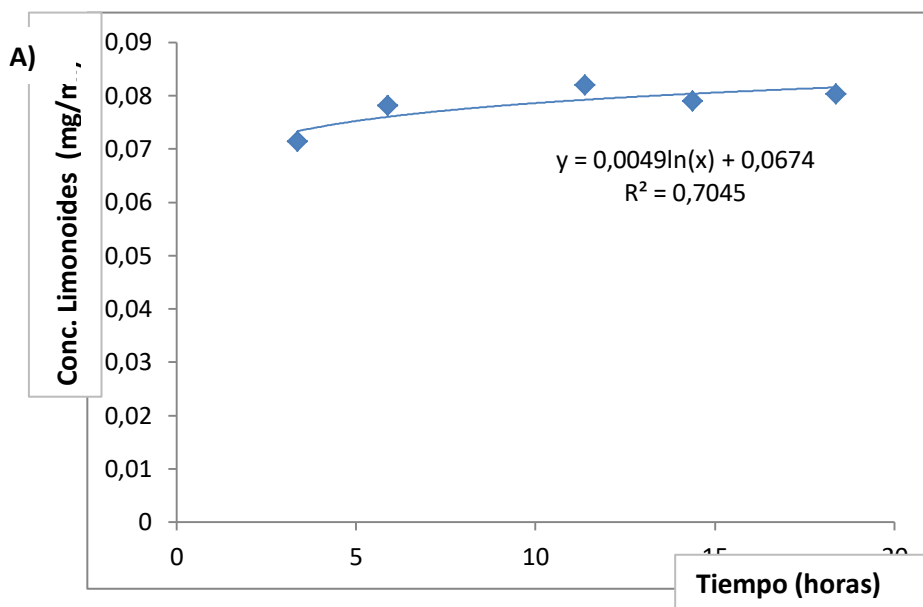
plantación (superiores). El seguimiento del tratamiento fue realizado por el equipo técnico del proyecto, contando cada una semana el número de insectos durante 3 semanas.

6- Resultados y Discusión

6.1-Análisis del Proceso de Extracción

Los resultados del análisis del proceso de extracción en la máquina Timatic, en cuanto al contenido de limonoides y materia seca a través del tiempo de extracción son dados en la figura 17.

A pesar de que el muestreo en períodos cortos de extracción no fue realizado, se aprecia claramente la tendencia logarítmica en cuanto a ambos parámetros en función del tiempo. Ello indicaría que la máquina es muy eficiente a tiempos iniciales y luego la capacidad va disminuyendo (la pendiente tiende a ser cero a tiempos largos de extracción) de acuerdo a que el solvente de extracción se va saturando en los compuestos a ser extraídos. Dicho comportamiento ya había sido observado en INIA Las Brujas para el parámetro materia seca, pero aún no para la concentración total de limonoides (Borges, 2010).



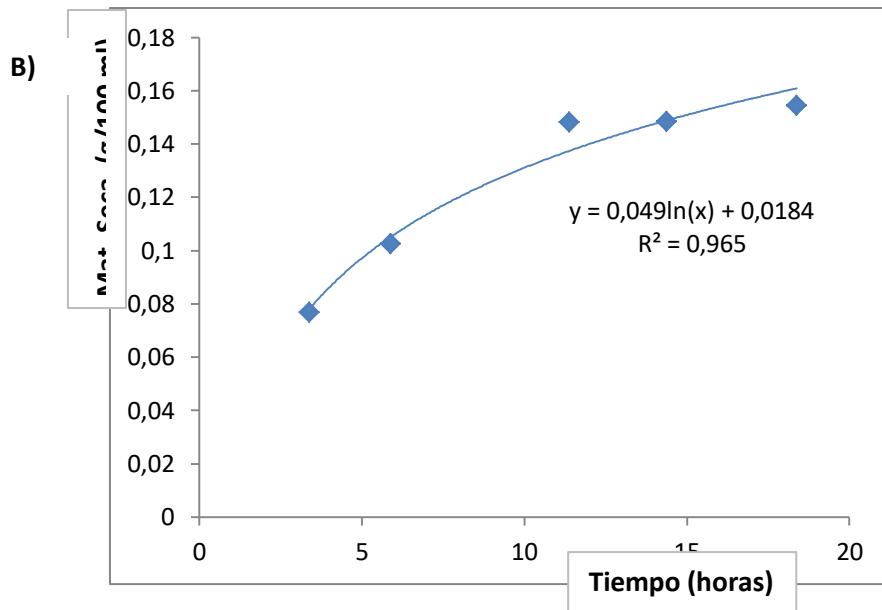


Figura 17: Análisis del proceso de extracción. A) Contenido total de limonoides (mg/ml); y B) materia seca (g/100 ml) en función del tiempo de extracción.

De acuerdo a los resultados mostrados (figura 17), se deduce que la extracción a tiempos largos posiblemente sólo incremente el nivel de impurezas (materia seca no relacionada a limonoides). Lo antedicho se visualiza en que la casi totalidad de los limonoides ya son extraídos a los 400 minutos (alrededor de 0,075 mg/ml), donde el contenido de materia seca es de 0,1 g/100 ml; mientras que en 1100 minutos el contenido en limonoides es prácticamente el mismo y la materia seca es más del doble que a los 400 minutos (aproximadamente 1,5 g/100 ml; figura 17). Igualmente debería evaluarse a través de bioensayos si la presencia de esos componentes fijos puedan tener un sinergismo en cuanto a la actividad biológica; caso contrario la extracción a largo períodos de tiempo carece de sentido, incrementando los costos del procedimiento.

6.2-Análisis de almacenamiento de los extractos.

6.2.1-Condición de oscuridad

A continuación se representan la variación de los parámetros estudiados: pH y contenido total de limonoides, en función de los diferentes tiempos de almacenamiento (Tablas 1 y 2, Figura 18).

Muestra	Día 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 7	Semana 9
ph inicial 1	0,80736821	0,59243006	0,99505855	0,83011057	0,71463587	0,84427256	0,660166676	0,66670298
ph inicial 1 Rep	0,8063884	0,65185592	0,93955189	0,82030612	0,74078109	0,94122774	0,720082793	0,66125606
ph inicial 2	*	0,84658987	0,99912002	0,93795958	0,91944006	0,9303339	0,769105071	0,71681464
ph inicial 2 Rep	*	0,84750411	1,04650376	0,91835067	0,95430034	0,94013835	0,784356446	0,6993845
ph 4 1	0,819126	0,83379046	0,80958505	0,81268043	0,94776404	0,94231712	0,810501661	0,66670298
ph 4 1 Rep	0,81618656	0,87036021	0,84207676	0,81050166	0,97281987	*	0,727708481	*
ph 4 2	0,85243974	0,75516548	0,80687741	0,82357427	0,5839098	0,90854622	0,680864971	0,71136772
ph 4 2 Rep	0,87105624	0,78076431	0,84613823	0,84318318	0,71681464	0,77782014	0,709188954	*
ph 7 1	0,9367039	0,84658987	0,81500034	0,90200991	0,93795958	0,98698186	0,776730759	0,66125606
ph 7 1 Rep	0,91318832	0,84384714	0,81635416	0,90854622	0,94885342	0,95974726	0,740781088	0,66997113
ph 7 2	0,92004703	*	0,89893725	0,89547361	0,90636745	0,94885342	0,681954355	0,64709407
ph 7 2 Rep	0,89751127	*	0,9151831	0,83664688	0,88893731	0,92924451	0,696116346	0,69066943

Tabla 1: Concentración total de limonoides (mg/ml) determinadas por el método de DMAB-UV respecto de los diferentes tiempos de almacenamiento en oscuridad.

Nota: Las casillas en las que se ha representado un asterisco () indican datos no disponibles.*

Muestra	Día 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 7	Semana 9
ph inicial 1	5,17	4,61	4,94	4,84	4,67	4,86	4,39	4,63
ph inicial 2	5,12	4,66	4,97	4,76	4,38	4,9	4,33	4,55
ph 4 1	3,7	3,01	3,67	3,34	2,9	3,84	2,64	2,78
ph 4 2	3,58	2,62	3,47	3,12	2,68	3,53	2,2	2,46
ph 7 1	6,89	7,04	5,95	5,98	6,04	6,93	6,11	6,05
ph 7 2	7,26	6,97	6,06	6,99	6,52	7,21	6,62	6,82

Tabla 2: Variación de pH con el tiempo de almacenamiento en oscuridad.

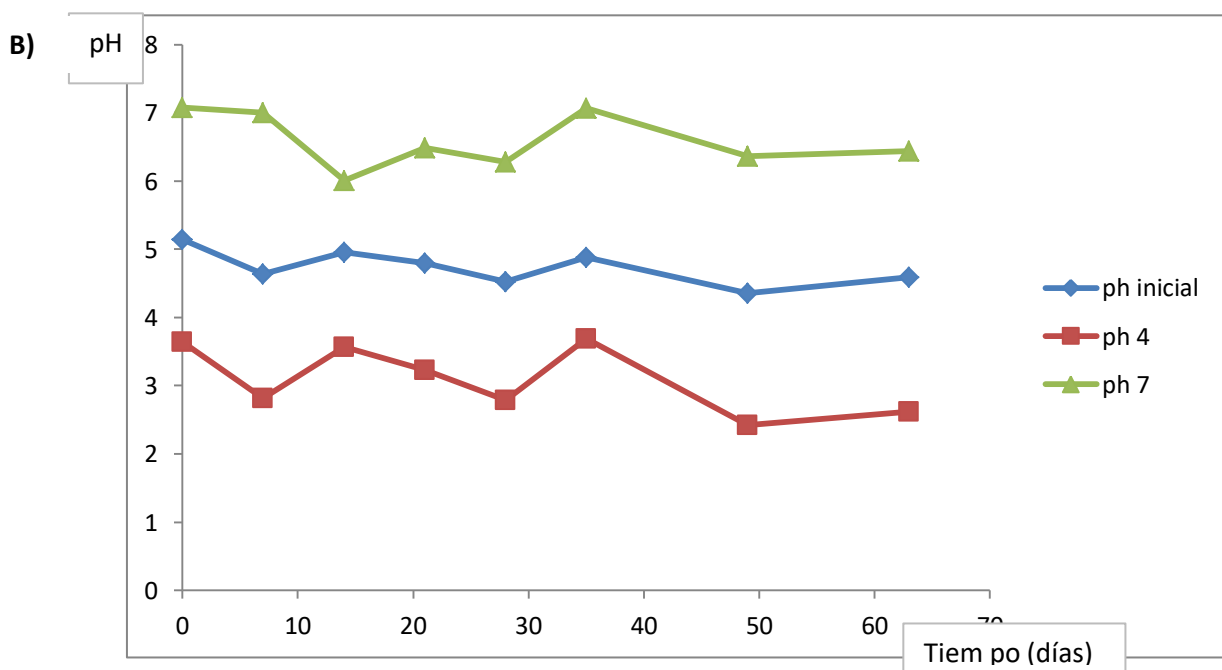
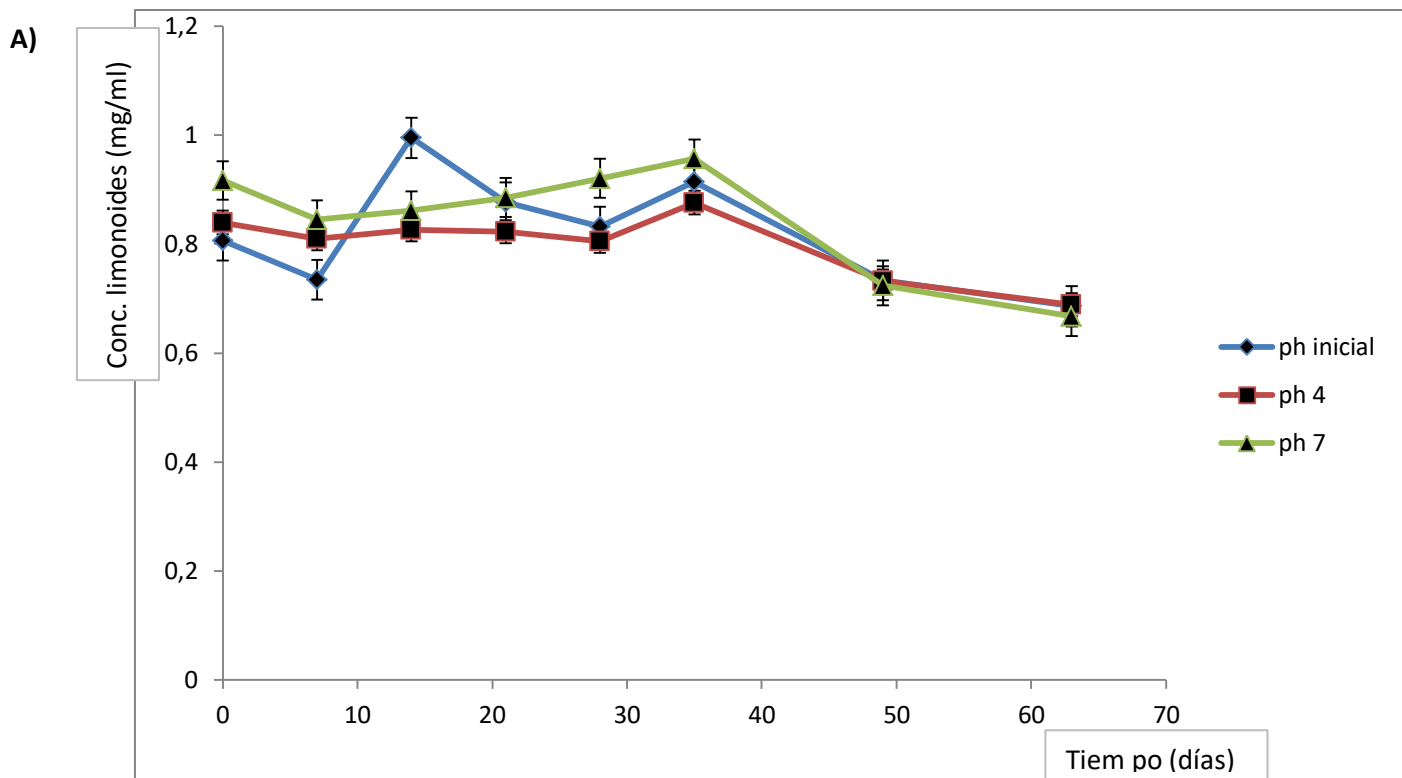


Figura 18: Representación gráfica de la variación en el contenido de limonoides (A) y en el pH (B) de los extractos almacenados a oscuridad en función del tiempo de almacenamiento.

Según se desprende de los datos precedentes, el contenido de limonoides se mantiene aproximadamente constante hasta los 30-35 días (a pesar de la variabilidad mostrada en la tabla 1, lo cual puede deberse a errores de método), tras lo cual comienza a descender

paulatinamente. La degradación verificada en condiciones de oscuridad es inferior al 15% en todos los casos después de 65 días. Esto es muy importante considerando la posibilidad de fabricar formulaciones comerciales, ya que ello podría asegurar la adecuación y actividad del producto (mantenido en recipiente cerrado y al abrigo de la oscuridad) con el transcurso del tiempo.

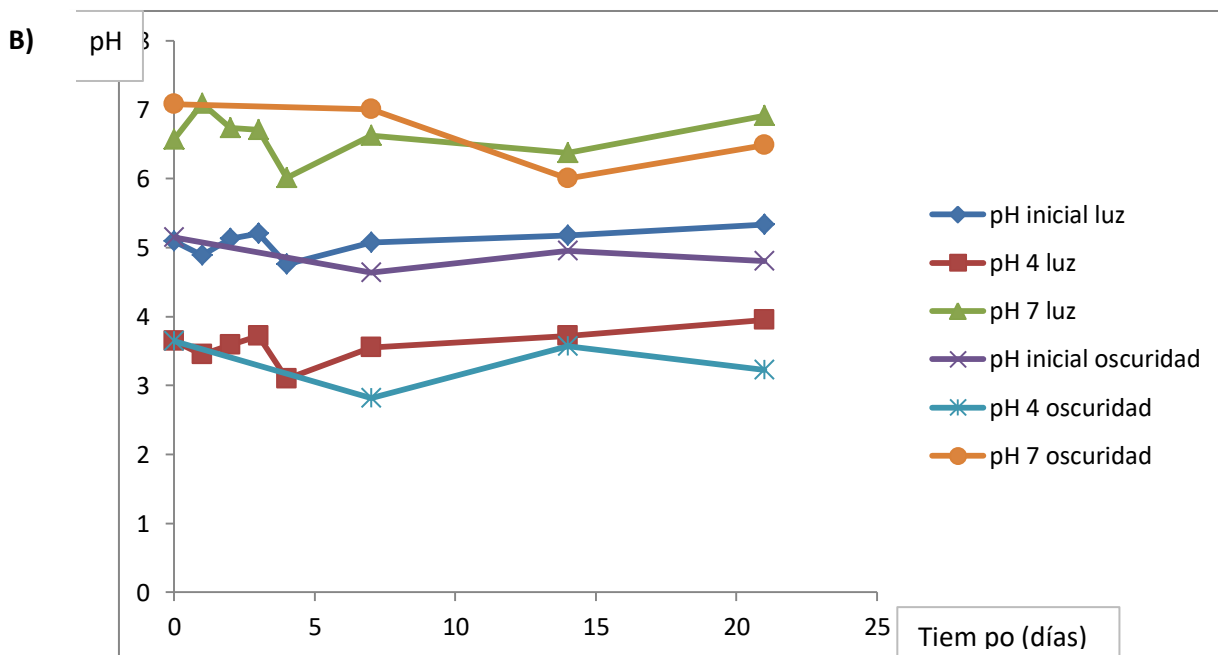
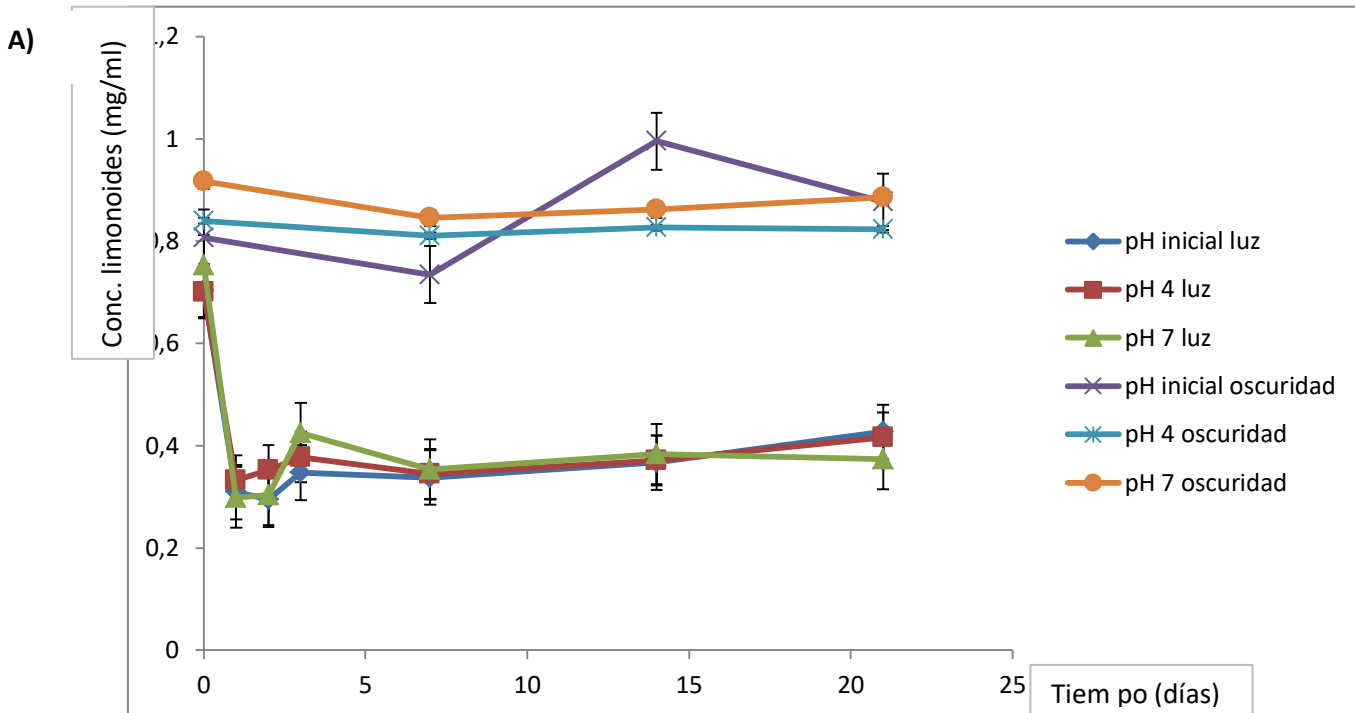
En cuanto al contenido de limonoides, no hay diferencias apreciables entre tratamientos (pH 4, pH 7 y pH original), lo que indicaría una buena estabilidad a pH's relativamente ácidos. Sin embargo de la visualización de la estructura química de limonoides (figura 3) se puede identificar abundancia de funcionalidades orgánicas hidrolizables (ésteres, éteres) a pH ácidos. Dichas reacciones no afectarían la estructura básica sino los sustituyentes, lo cual no sería percibido por ésta metodología (los productos de degradación continuarían siendo limonoides). En éste sentido, hay trabajos que reportan la sensibilidad de los limonoides a trazas de ácidos, sugiriendo la utilización de cromatografía flash y HPLC preparativa debido a la degradación de los mismos en sílica normal (Nakatani, 1994). Sin embargo también existen publicaciones como la de Jarvis (1998) en que reporta que la azadirachtina es muy estable a temperatura ambiente en soluciones acuosas de pH 4 a 6, y que es estable por meses en solventes orgánicos (siempre protegido de la luz, incluso con la presencia de estabilizadores UV).

En la figura 18 B se aprecia que el pH del extracto natural es aproximadamente 5, lo que se debe a que el solvente (etanol) con su carácter fuertemente polar extrae compuestos orgánicos ácidos (muy polares).

En cuanto a la variación del parámetro pH con el tiempo de tratamiento, éste permaneció prácticamente incambiado a lo largo de la realización del ensayo (las variaciones incluso podrían deberse a la deriva propia del instrumento), lo que quizá tenga su origen en un efecto buffer de metabolitos extraídos, incluyendo residuos aminoacídicos de proteínas, pares ácido base de ácidos orgánicos, posibles alcaloides, etc.

6.2.2- Comparativa con condiciones de almacenamiento bajo luz.

A continuación (figura 19) se presentan la comparación de los resultados mencionados en el apartado anterior respecto de los ensayos de degradación en condiciones luminosas realizados anteriormente en INIA Las Brujas. Dicha evaluación fue realizada solamente a lo largo de tres semanas, por lo que la comparación se realiza en ese intervalo de tiempo.



*Figura 19: Gráfico comparativo del almacenamiento de los extractos de *M. azedarach* en condiciones de luz y oscuridad en cuanto a contenido de limonoides (A) y pH (B).*

Los resultados plasmados en el gráfico 19 A demuestran que la degradación en condiciones luminosas es muy superior a la constatada en condiciones de oscuridad. Así, en condiciones luminosas la degradación es muy rápida al inicio, llegando al 50% al cabo de dos días, lo cual

se debe al carácter fotolábil de los limonoides ya mencionado. A partir del segundo día la concentración se mantuvo constante hasta la tercera semana en que se realizó el experimento. Esto es una evidencia de la propiedad de rápida fotodegradabilidad de los componentes limonoides del paraíso que se podría dar en condiciones de aplicación. Sin embargo en éste estudio no se realizó la aplicación sobre la matriz vegetal, lo que pondría en marcha procesos de biodegradación por parte de microorganismos que eliminarían dicha persistencia en el ambiente, como es el caso de la bacteria del suelo *Acinetobacter sp.* que utiliza limonoides como fuente de carbono (Vaks, 1981).

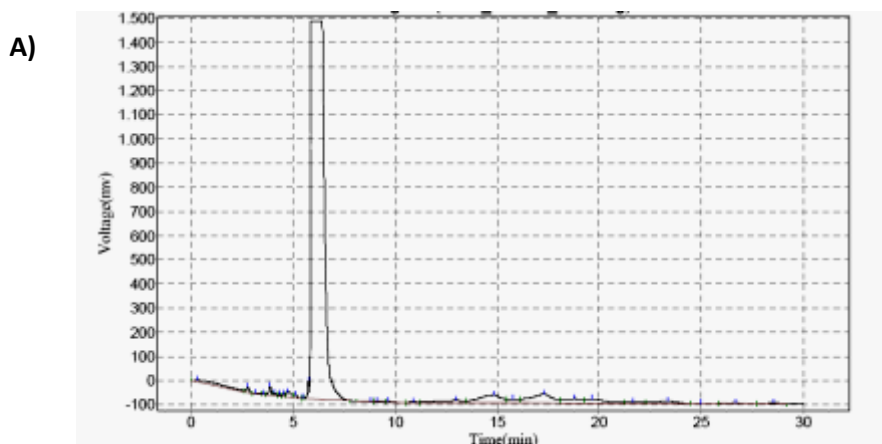
Por su parte, la comparación en el parámetro pH demuestra que el mismo se mantiene constante tanto a condiciones luminosas como de oscuridad, lo cual es coherente debido a la inexistencia de relación entre ambos aspectos.

Para complementar éstos estudios deberían realizarse ensayos de residualidad en matrices tales como agua y suelos. Lo mismo es importante debido a que es una buena herramienta para ver cuánto del producto aplicado no llega a la plaga (eficiencia de aplicación), para la evaluación del riesgo a que están expuestos los consumidores y para la evaluación de los posibles impactos ambientales (Ruch, Trifolio-M GmbH).

6.3- Aislamiento de limonoides

6.3.1- A partir de frutos de *Melia azedarach*.

Según lo indica la figura 9, dos fracciones se obtuvieron de éste procedimiento presumiblemente enriquecidas en limonoides. Sin embargo del análisis por HPLC, resultó que ambas fracciones estaban muy enriquecidas en un compuesto de tiempo de retención 5.7 a 6.2 minutos bajo las condiciones detalladas en Materiales y Métodos. A continuación se presenta el cromatograma de una de ellas (fracción 4) en comparación con el estándar de toosendanina, donde se aprecia claramente la diferencia en la retención lo que se debería a la mayor polaridad del compuesto desconocido respecto del patrón.



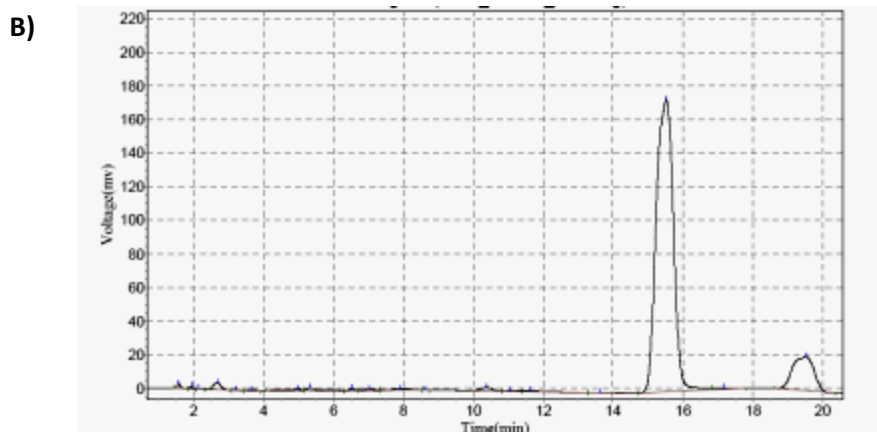


Figura 20: Cromatogramas comparativos de la fracción presumiblemente enriquecida en limonodes (fracción 4) del procedimiento de aislamiento de limonoides a partir de frutos (A), respecto del estándar de toosendanina (B).

6.3.2- A partir del extracto realizado en Timatic® de frutos de *M. azedarach*

6.3.2.1- Primer Procedimiento

Según se indica en la figura 11, éste procedimiento rindió al igual que el anterior, dos conjuntos de fracciones enriquecidas en limonoides según el análisis efectuado por TLC.

Sin embargo ambas porciones inyectadas en HPLC exhibieron el mismo pico que en el caso anterior, con una concentración muy alta que llegó a saturar el detector. En la figura 21 se muestra las fracciones 9 a 11, siendo que la 16 a 24 es muy parecida.

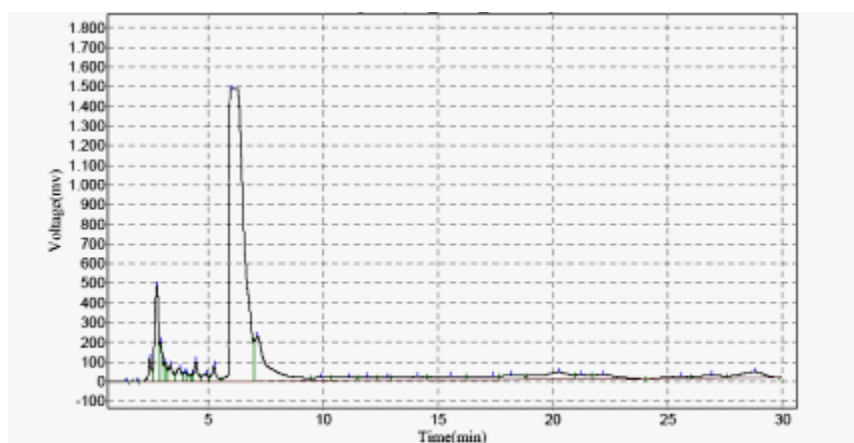


Figura 21: Cromatogramas de las fracciones 9 a 11: resultado del primer procedimiento de aislamiento de limonoides a partir del extracto etanólico de semillas de paraíso.

6.3.2.2- Segundo Procedimiento

El tercer procedimiento de aislamiento practicado, resultó en tres conjuntos de fracciones, de las cuales: la 8 presentó como mayoritario el mismo pico que en los casos anteriores (aunque

muy lejos de la saturación del detector); y las (3 a 8), y (15 a 20) se vieron muy enriquecidas en componentes de baja retención.

En el caso de la fracciones (15 a 20) se observó un pequeño pico en el mismo tiempo de retención de la toosendanina indicado en la figura 20, aspecto ausente en los otros dos conjuntos de fracciones. En dicha fracción aparece también (aunque como minoritario), el pico correspondiente al compuesto problema.

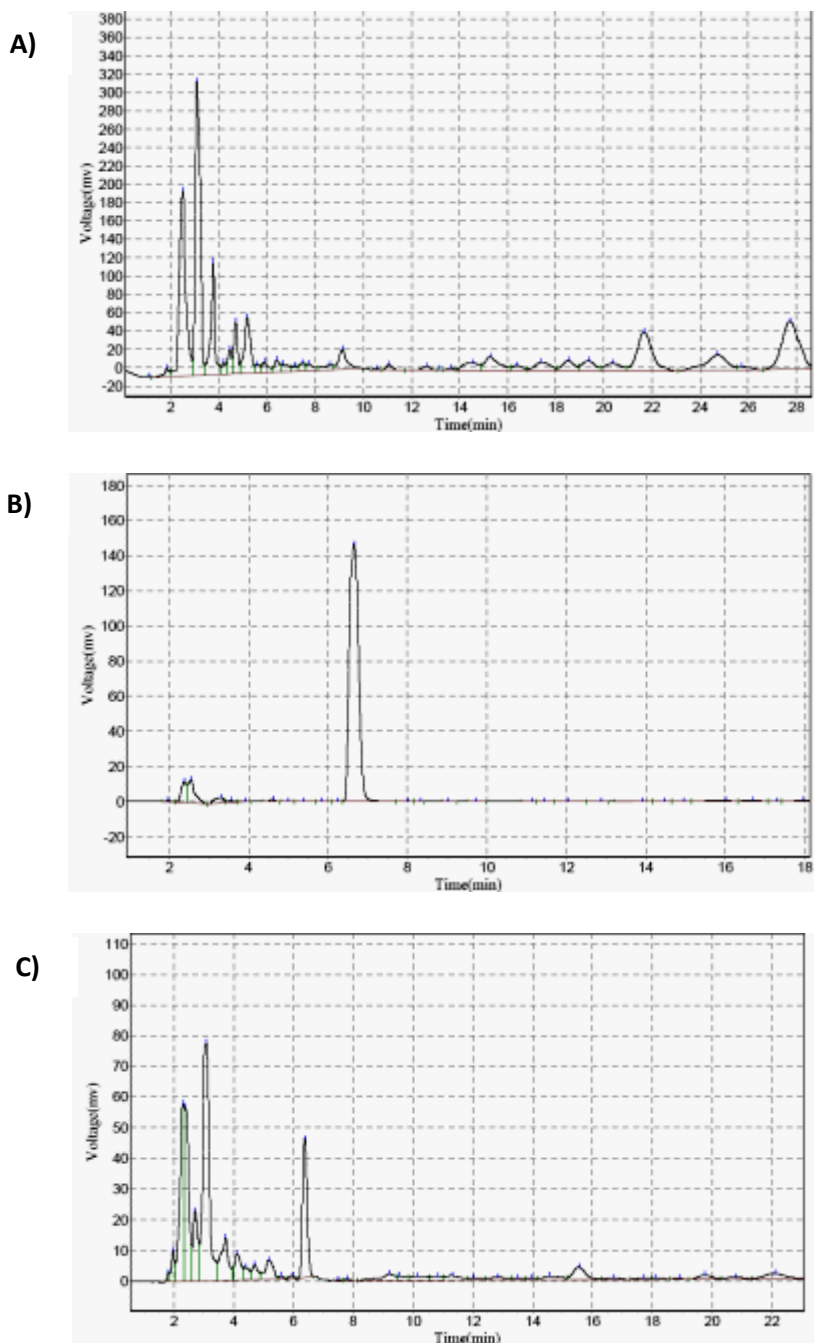


Figura 22: Cromatogramas resultantes de las fracciones del segundo procedimiento de aislamiento a partir del extracto etanólico de semillas de paraíso. Fracciones (3 a 8) (A), 8 (B) y (15-20) (C).

Para obtener algún elemento más en torno al componente desconocido, se realizó un espectro UV-Vis de la fracción 8 en el rango 200-800 nm, y la comparación de elución con los estándares rutina y quercetina, los cuales se exhiben a continuación.

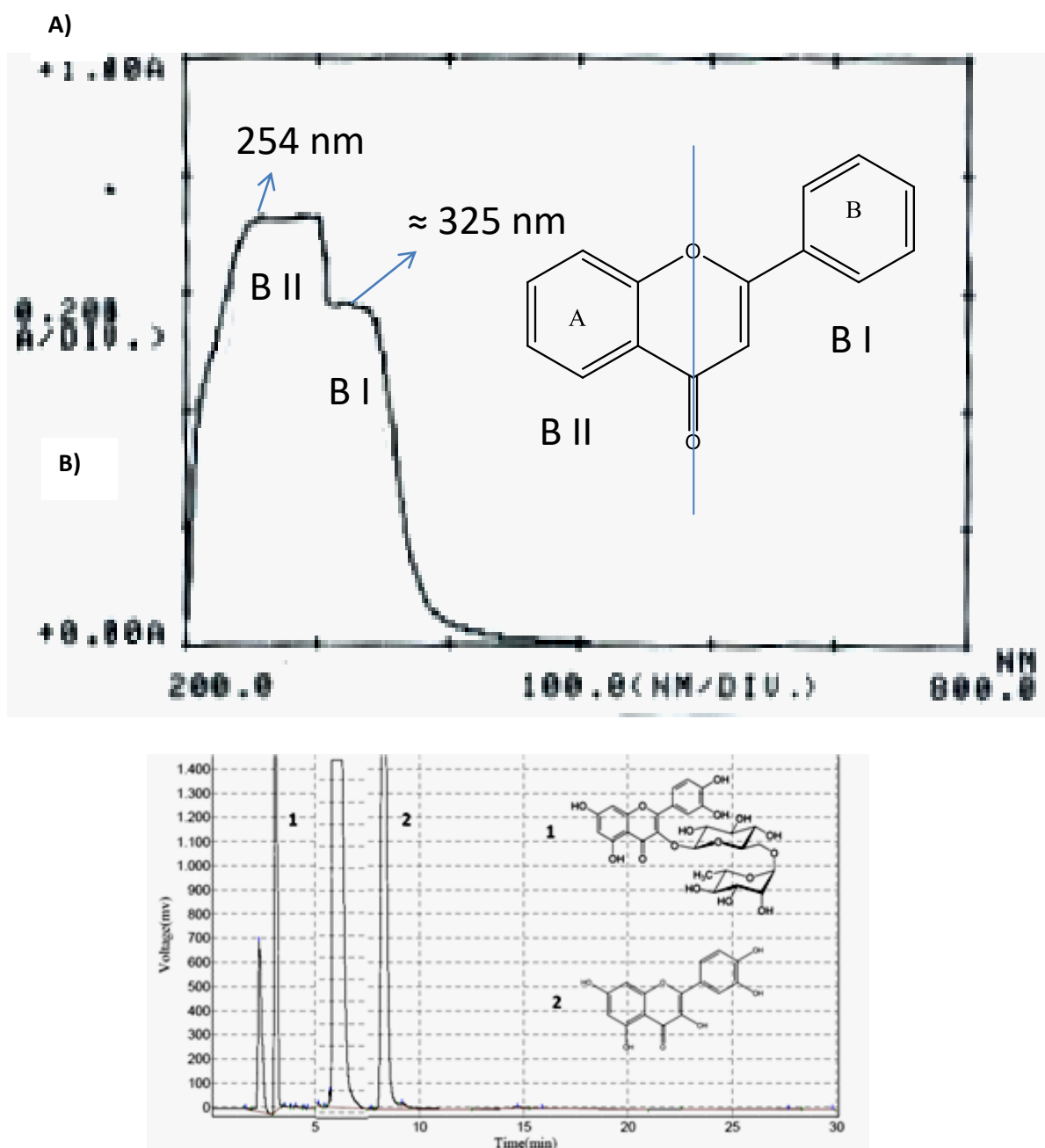


Figura 23: A) Espectro UV-Vis (200-800 nm) de la fracción 8, con patrón de bandas característico de flavonoides y B) Cromatograma comparativo de los patrones de flavonoides rutina y quercetina junto al compuesto desconocido (gráfico en misma escala).

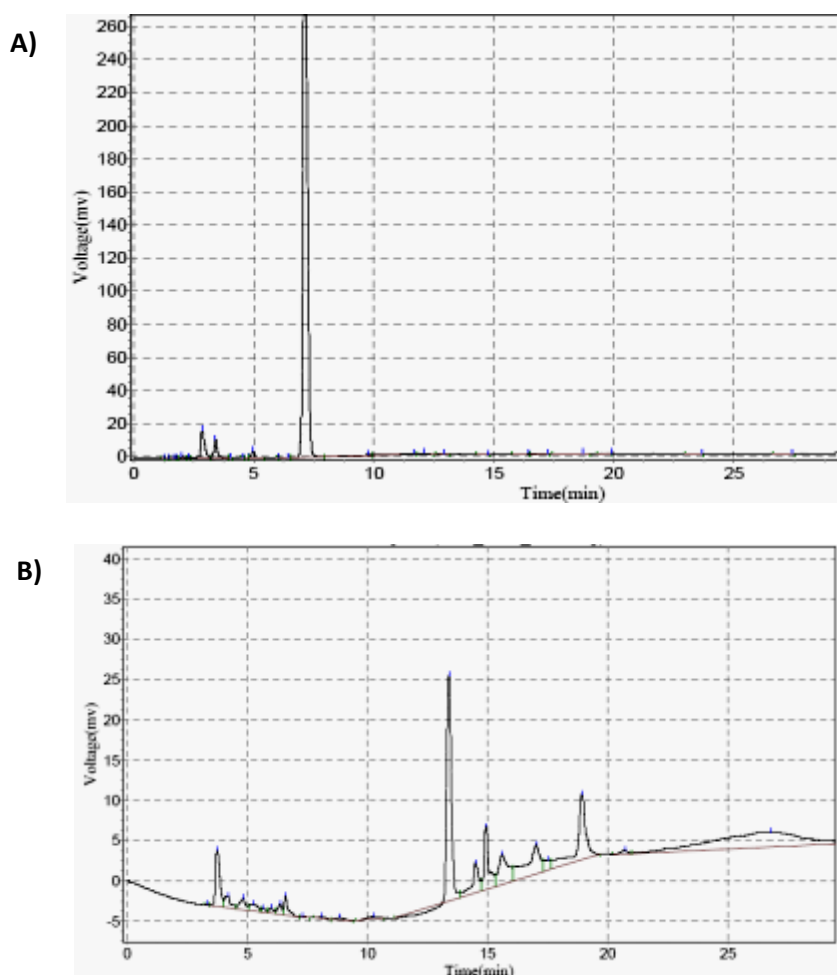
El patrón de bandas en el espectro UV/MeOH mostrado en la figura 23 A es típico de flavonas y flavonoles 3-O-sustituídos (Mabry, 1970; Martínez, 2005) con su banda I (correspondiente al anillo B) en un máximo de 325 nm y la banda II (correspondiente al anillo A) con un máximo a 254 nm, siendo precisamente ésta longitud de onda la típica para detección de flavonoides en

HPLC (Martínez, 2005). Según la figura 23 B, se pudo constatar que el componente desconocido no fue ninguno de los dos patrones de flavonoides inyectados.

6.3.3- Separación por SPE de diferentes órganos de *Melia azadarach*

En la evaluación de los diferentes órganos por extracción con SPE, se constató una diferencia en el perfil químico de corteza, hojas ramas y frutos. En éste último caso, tanto el extracto de frutos maduros, así como el de frutos verdes y las semillas tuvieron un perfil idéntico, con la presencia mayoritaria del compuesto previamente detectado en el aislamiento y aparentemente sin presencia de toosendanina.

La figura 24 muestra la comparación de los perfiles cromatográficos.



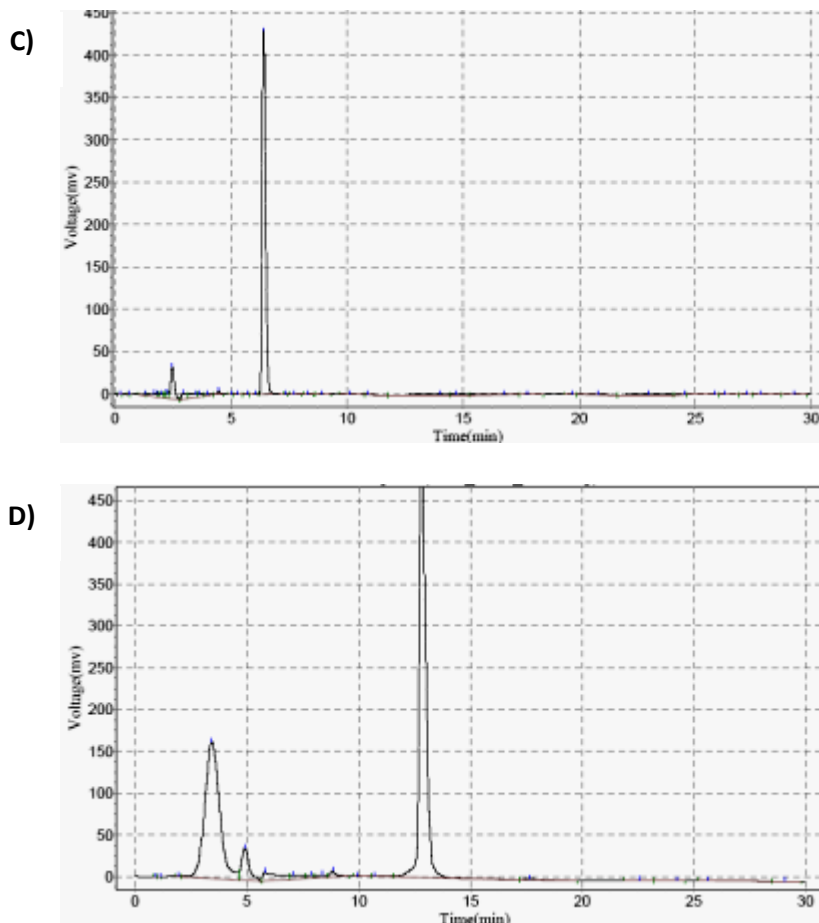


Figura 24: Cromatogramas comparativos de los extractos de corteza (A), hojas (B), frutos maduros (C) y ramas jóvenes (D) de Melia azedarach.

Como se puede constatar por la figura 24, los extractos de cada uno de los órganos aparecen muy limpios, lo cual hace ver que la metodología con SPE sea muy buena como clean-up. Sin embargo se constató nuevamente la presencia del compuesto problema (tr: 6.398 min) y aparecieron unos picos mayoritarios en corteza (tr: 7.140 min), ramas (tr: 12.865 min) y hojas (tr: 13.407 min). De acuerdo a la evaluación realizada por TLC de las diferentes fracciones, sólo la porción de frutos maduros, semillas y frutos verdes fueron los que presentaron revelado semejante a la toosendanina de acuerdo al revelador de Vainillina.

A pesar de que no es mostrado en la figura, no se pudo hacer una comparación fehaciente con el estándar de toosendanina, ya que en las veces en que fue realizado su cromatograma, varió considerablemente en su retención, generando mucha incertidumbre. Aún así el pico mostrado en el extracto de ramas es el más promisorio (a pesar del resultado negativo con el revelador vainillina) de ser un limonoide de acuerdo a su retención relativa en fase reversa.

6.3.4- Análisis por RMN.

Como se muestra en la figura 25, el espectro de la fracción 4 no es nada claro (alto nivel de ruido), a pesar que la misma tuviese un componente muy mayoritario, lo cual puede ser debido

a interferencias de impurezas. Lo anterior no es raro que acontezca en aislamiento de productos naturales (M. Díaz, com. pers.).

Las señales a desplazamientos químicos (δ) de 3.5 ppm y 7.25 ppm corresponden a los protones del agua y del solvente. Las señales a δ entre 0.7 y 1.7 corresponden a señales de metilos. Dada la poca claridad del espectro, no se pueden asignar señales ni suministrar integración de manera confiable.

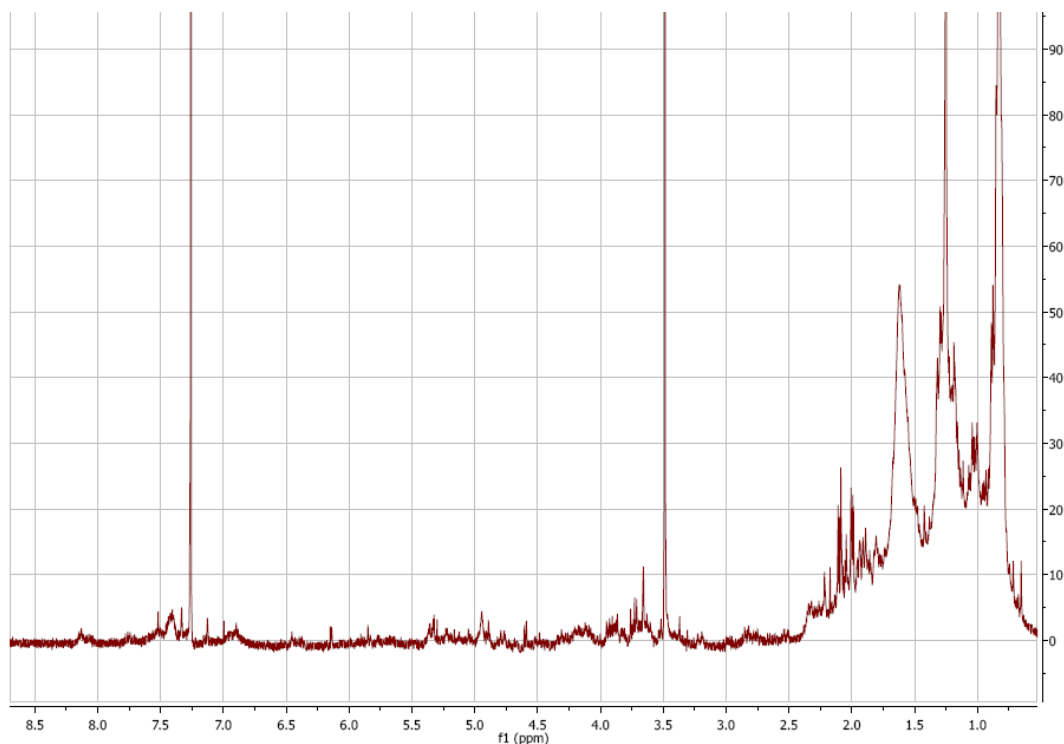


Figura 25: Espectro de ^1H RMN de la fracción 4 (componente desconocido).

En el experimento de COSY no se pudieron apreciar acoplamientos.

6.3.5- Resumen de la información estructural del compuesto desconocido.

*Según su índice de retención en HPLC- C_{18} : es más polar que la toosendanina y la quercetina, pero menos que la rutina.

*Solubilidad: EtOH, MeOH, AcOEt, AcCN, CH_2Cl_2 , CD_3Cl_3 .

*Insolubilidad: Hexano.

* Según reveladores de TLC: compuesto triterpenoide con heterociclo furánico o indólico.

*Según pruebas PPVP-HPLC: componente polifenólico.

*Sólido amarillo en evaporación a sequedad, impartiendo dicho color a los extractos.

*Según su espectro en UV/MeOH: componente flavonoide. Banda II: 254 nm, Banda I: 325 nm. Máximo de absorción a la longitud de onda típica de detección de flavonoides.

*Según RMN: presencia de metilos en la molécula.

*Distribución: frutos maduros, frutos verdes y semillas de *Melia azedarach*.

6.4- Efectividad del Bioplaguicida

6.4.1- A laboratorio.

A continuación se presentan el resultado que se obtuvo en el bioensayo de consumición con elección por parte del crisomélido *Diabrotica speciosa*, realizado con la metodología ya descrita.

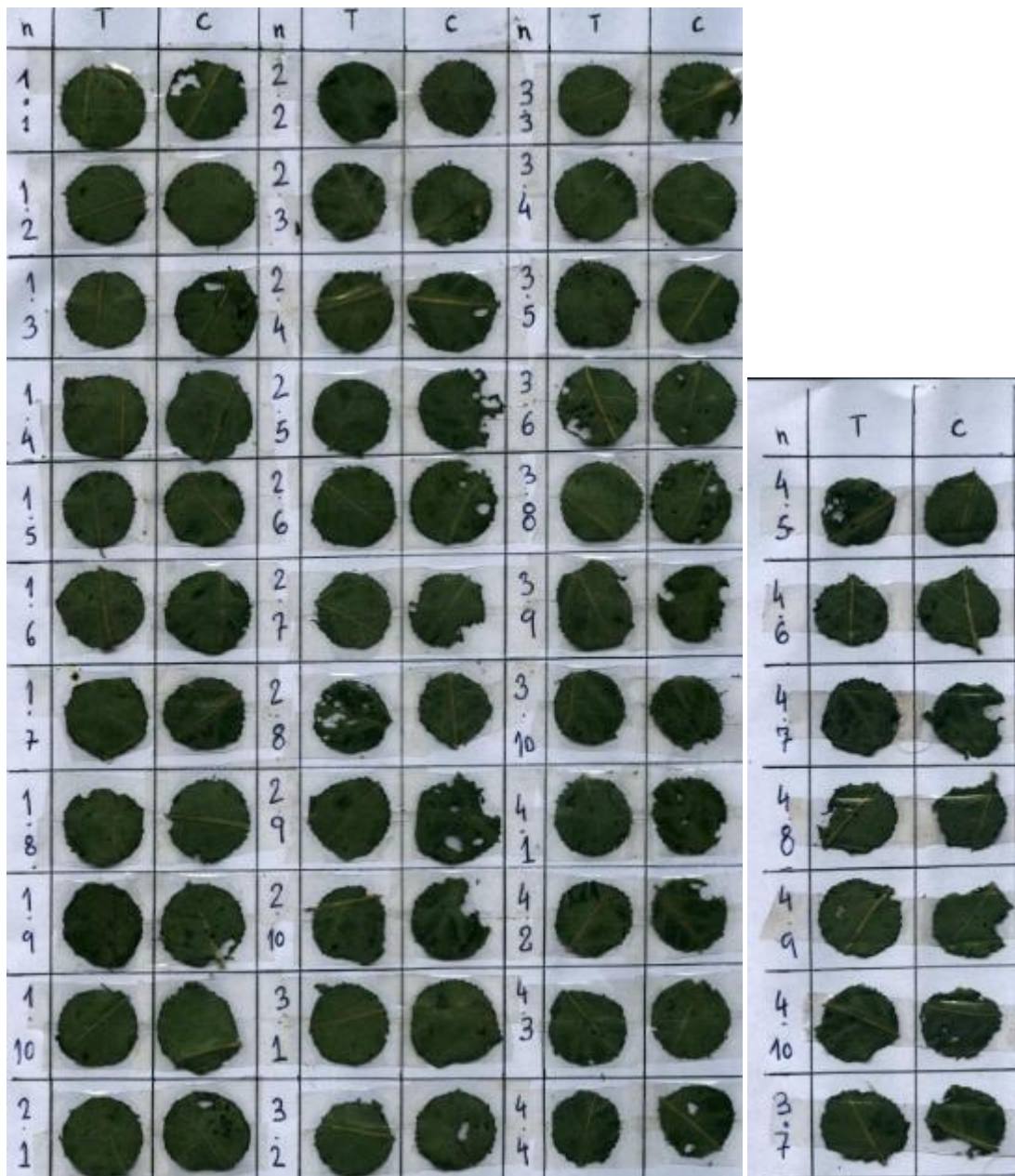


Figura 25: Datos crudos del ensayo de alimentación con Diabrotica speciosa. La notación indica el número de tratamiento y la repetición. Tratamientos 1) Melia 10% con Quillaja 1%, 2) Melia 10%, 3) Melia 5%, 4) Melia 1%.

Como se puede ver en las figura 25 y 26, hay una diferencia apreciable entre el consumo del tratamiento y del control para cada uno de los tratamientos evaluados, siendo siempre mayor el consumo para éste último caso. Lo antedicho verificaría el efecto deterrente y anti-alimentario (repelencia al consumo) propuesto para los extractos de fruto del árbol del paraíso.

Se calculó el índice de preferencia (IP; Díaz, 2010) e índice de consumo (FR; González-Coloma, 2009), los cuales dan una medida objetiva del consumo en cada tratamiento.

$$\% IP = (C - T) / (C + T) * 100$$

$$\% FR = 1 - (T/C)$$

De acuerdo a éstos parámetros, la inhibición en la alimentación fue mayor en el tratamiento con extracto de *Melia azedarach* al 1% y menor para el caso del tratamiento al 0.1%.

Es llamativo que sea mayor la inhibición a la concentración de 1% que a la de 10%, siendo que en ésta última sería mayor la concentración de limonoides; dicho comportamiento ya había sido observado en ensayos a campo en INIA Las Brujas (Borges, 2010). Lo anterior puede deberse a saturación de receptores de los principios activos (Liu, 2008)

El efecto del agregado de *Quillaja brasiliense* a los extractos de *M. azedarach* (tratamientos 1 y 2) no parece tener efecto sobre la alimentación, ya que ambos índices tienen valores muy próximos. Ello indicaría que las saponinas presentes en Quillaja, no tendrían un efecto antialimentario significativo.

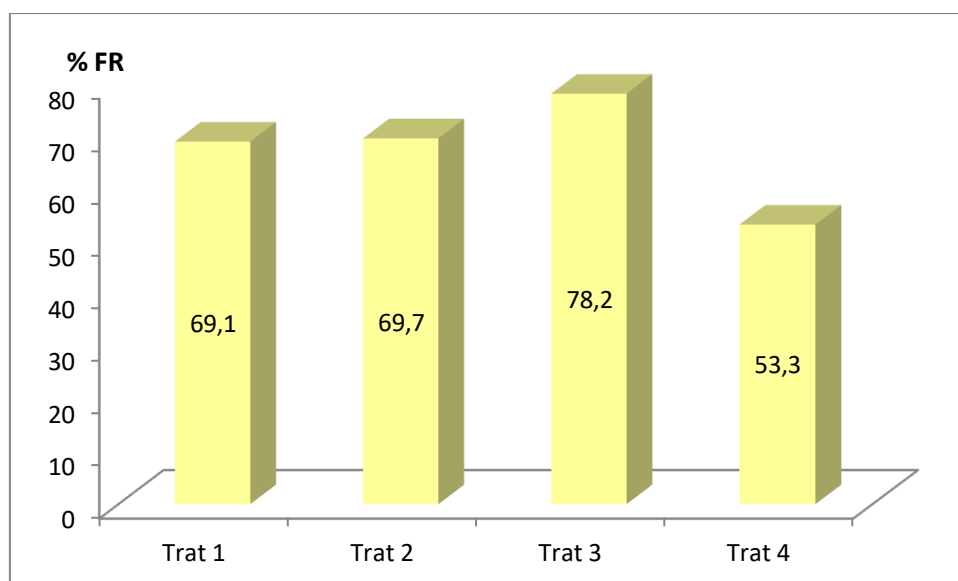
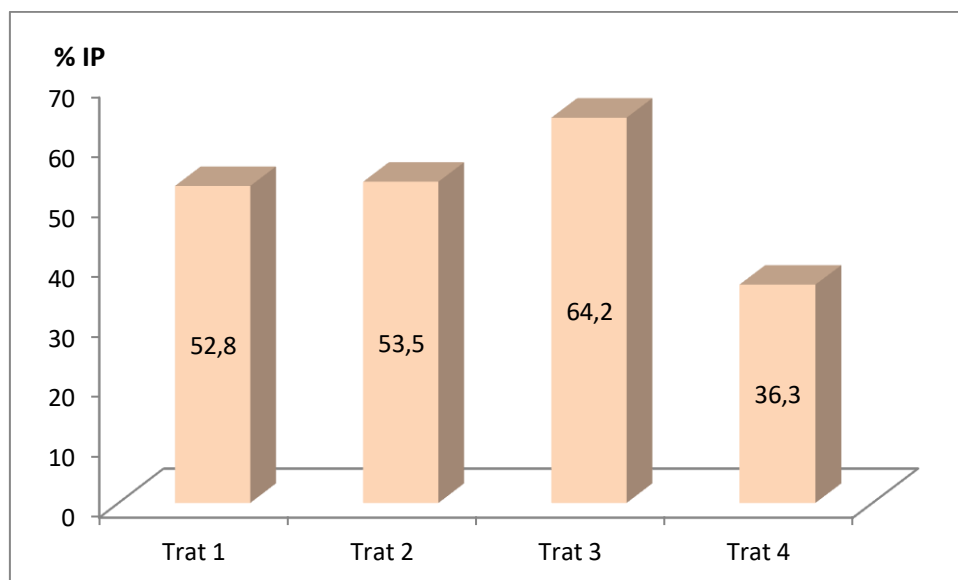


Figura 26: Resultado de bioensayo de consumo con elección de hojas de papa (Solanum tuberosum) para Diabrotica speciosa (Coleoptera: Chrysomelidae, en cuanto al índice de preferencia (IP) y el de consumo (FR). Tratamientos 1) Melia 10% con Quillaja 1%, 2) Melia 10%, 3) Melia 5%, 4) Melia 1%. (n=10 por tratamiento).

De acuerdo a González-Coloma (2009), para el caso del índice de consumo (FR), se considera que los extractos son activos si el valor numérico del mismo supera el 75 %. Según ese criterio, sólo el extracto de frutos de *Melia azedarach* al 1% resultaría activo (figura 26).

Para el caso de *Diabrotica speciosa*, Valladares (2003) ya había observado efecto deterrente de extractos alcohólicos de *Melia azedarach*, aunque con un porcentaje muy marcado: 95-100%, lo que puede deberse a diferencias en la composición de metabolitos entre árboles de diferentes poblaciones o a diferente tolerancia de la plaga.

6.4.2- A campo

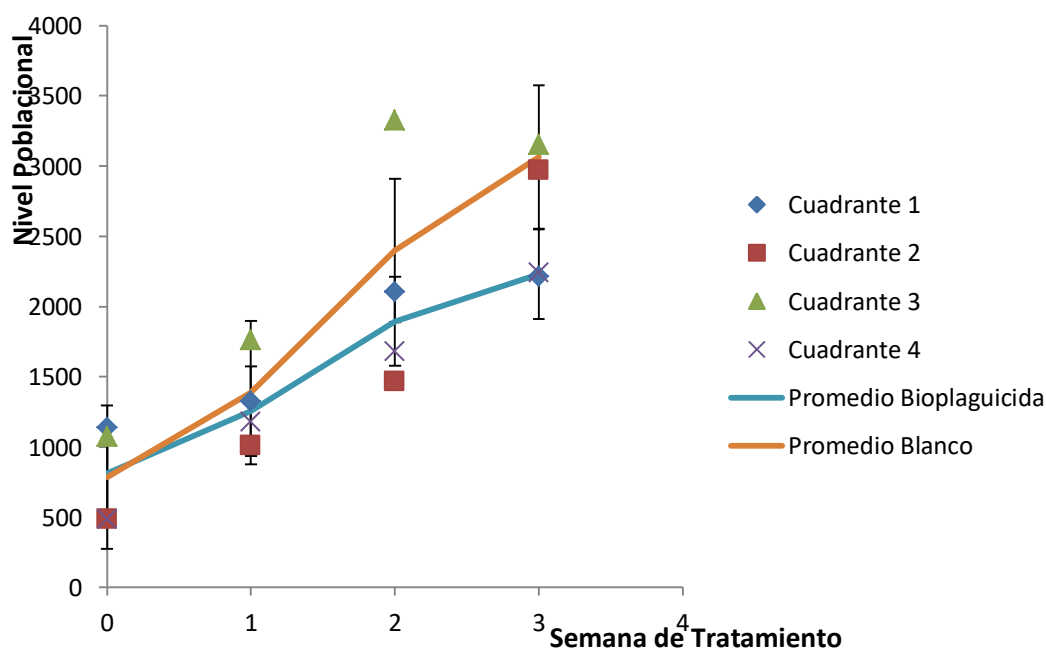
En la tabla siguiente se presentan los resultados crudos del ensayo.

		Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3
Cuadrante	Planta	Nº moscas	Nº moscas 2	Nº moscas 3	Nº moscas 4
1	1	67	117	220	380
1	2	22	75	11	230
1	3	58	210	166	350
1	4	18	153	510	150
1	5	172	14	227	257
1	6	318	82	119	170
1	7	19	212	216	10
1	8	80	230	320	69
1	9	104	120	204	120
1	10	282	114	112	482
Total 1	*	1140	1327	2105	2218
2	1	84	16	3	65
2	2	68	22	37	170
2	3	128	220	64	240
2	4	74	86	230	360
2	5	19	145	310	240
2	6	12	135	408	280
2	7	53	280	220	310
2	8	9	21	84	180
2	9	13	28	71	280
2	10	29	58	40	850
Total 2	*	489	1011	1467	2975
3	1	108	111	480	210
3	2	203	276	550	140
3	3	89	49	267	523
3	4	128	27	340	474
3	5	59	115	296	280
3	6	191	258	312	410
3	7	93	340	354	363
3	8	4	450	280	186
3	9	149	76	220	270
3	10	55	62	232	300
Total 3	*	1079	1764	3331	3156
4	1	84	220	298	210
4	2	68	65	160	270
4	3	128	42	224	120
4	4	74	175	120	270
4	5	19	120	77	180
4	6	12	72	190	200
4	7	53	96	220	280
4	8	9	40	64	150
4	9	13	164	120	340
4	10	29	187	210	224
Total 4	*	489	1181	1683	2244

*Tabla 3: Resultados crudos del conteo de adultos en el ensayo de campo contra *Trialeurodes vaporariorum* en las diferentes semanas de tratamiento con extracto de *Melia* al 10% y *Quillaja* al 1%. Cuadrantes de tratamiento: 1 y 4; cuadrantes testigos: 2 y 3.*

Los resultados permiten realizar varias observaciones:

- 1) El bioplaguicida no disminuyó la población de la plaga en términos absolutos, ya que su número aumentó a lo largo del desarrollo del ensayo. Es razonable que ello suceda en virtud de que la formulación (como la mayoría de los bioplaguicidas) tiene descripto efecto anti-alimentario más que efecto pesticida (mortalidad de la plaga).
- 2) La población final de adultos en las plantas tratadas con la formulación fue casi un tercio menos que en las plantas testigo (figura 27). Si bien deberían realizarse test estadísticos, las diferencias entre ambos conjuntos de datos (tratamiento y testigo) fueron incrementándose conforme transcurrió el ensayo (visualizado por el menor solapamiento de las barras de error típico en el tiempo). Ello permite inferir que en un tiempo razonable de tratamiento (y aplicando apenas se detecta la plaga) el bioplaguicida permitiría realizar un aceptable control poblacional del adulto del insecto dañino.
- 3) La disminución relativa de la plaga no necesariamente se puede deber a mortalidad de la misma, sino a un efecto deterrente que haya ahuyentado a los insectos hacia otros cuadrantes o fuera del invernáculo.
- 4) Los datos recabados no se pueden correlacionar con el daño causado, ya que no sólo los adultos se alimentan del cultivo, sino también las ninfas. Para una evaluación más precisa de la efectividad, se debería cuantificar aquél en las diferentes etapas del ensayo.



*Figura 27: Ensayo de campo en cultivo de tomate por aplicación de bioplaguicida frente a *Trialeurodes vaporariorum*. El nivel poblacional se describe en número total de individuos en el follaje superior de 10 plantas elegidas al azar (ver metodología).*

Alineado a lo obtenido de no mortalidad y posible deterrencia, en un reporte con la mosca blanca *Bemisia tabaci*, De Souza (2001) no observó efecto ni en la mortalidad ni en la duración de estados larvales con extractos acuosos de frutos maduros de *Melia azedarach*, aunque si afectaron los extractos de hojas y frutos verdes. En el mismo sentido, Nardo (1997), también observó la ausencia de mortalidad, pero comprobó la deterrencia a campo de los extractos acuosos de hojas y frutos de paraíso y su consiguiente disminución en la transmisión del mosaico dorado del poroto (virus fitopatogéno).

De esta manera, aunque la formulación no tenga incidencia directa en la mortalidad de los individuos, al inhibir la alimentación, contribuye a una menor incidencia de daños, tanto directos como indirectos, aportando de esta forma el propósito fundamental de la Agricultura Orgánica: el respeto de la Biodiversidad.

7- Conclusiones

Respondiendo a los objetivos inicialmente planteados, se puede decir que éste trabajo aportó información respecto a:

*La extracción de limonoides en la mini-planta extractora, deduciéndose la necesidad de realizar el proceso de extracción en menor tiempo que el hasta ahora practicado (por ejemplo en 400 minutos, 6.66 horas) en virtud de que a tiempos mayores sólo aumenta la extracción de componentes fijos (materia seca) y no así la cantidad de limonoides.

*El estudio de las condiciones de degradación de los limonoides totales (técnica: espectrofotometría UV) bajo condiciones de oscuridad y la comparación con estudios previos de almacenamiento bajo luz, demostraron claramente la foto-labilidad de ésta clase de metabolitos, y la persistencia de la formulación en almacenamiento en oscuridad. El primer punto es muy adecuado para formular productos ambientalmente seguros, mientras que el segundo punto de es fundamental a la hora de realizar una posible formulación comercial.

*Los procedimientos de aislamiento de sustancias seguidos a partir de extracto de frutos de *M. azedarach* llevaron a la caracterización de un flavonoide (sólido amarillo), del que se obtuvieron algunos datos estructurales (HPLC, RMN, TLC, UV).

*En los extractos preparados, los limonoides se presentan en muy baja concentración (en la comparación con el estándar de toosendanina), por lo cual no se pudo detectar por la técnica SPE-HPLC.

*La evaluación de los perfiles químicos en HPLC de diferentes órganos del paraíso, permitió establecer una clara diferencia entre los extractos de corteza, hojas, ramas y frutos; y una similitud entre los extractos de frutos maduros, verdes y semillas, abundando el componente flavonoide identificado.

*La presencia de compuestos ubicuos (flavonoides) en el extracto no debe menospreciarse, pues también pueden ser responsables de la actividad biológica o en su caso ser parte de un sinergismo, potenciando las sustancias activas.

*Las pruebas de efectividad del bioplaguicida realizadas, junto a la información ya generada a nivel nacional, demuestran que los extractos de frutos de *Melia azedarach* son una herramienta promisoriosa para la aplicación a predios orgánicos, ya que permite un cierto control de las plagas con mínimo riesgo ambiental y bajo costo económico.

Un gran aporte de éste proyecto de desarrollo de bioplaguicidas ha de ser en el aspecto social, ya que la participación de los productores en la generación de conocimientos y la interacción con los técnicos trabajando codo a codo, puede repercutir en la consecución de una herramienta de manejo de plagas “hecha en Uruguay”, fruto del trabajo de todos los actores involucrados.

9- Agradecimientos:

Los agradecimientos son tantos que tal vez pueda ocupar mucha tinta y papel...pero éste es mi sencillo homenaje a tanta personas que han dejado su huella en mí a lo largo de tantos años. Porque termina una carrera y sobre todo una experiencia de vida...

A **Dios** por permitirme haber podido concluir la carrera dándome fortaleza y coraje cuando lo he necesitado. Porque a pesar de que me costó mucho esfuerzo, siempre me dio el aliento para seguir.

A mi **familia**, mi madre **Marita**, mi hermano **Mauro**, y mi padre **Manuel** (in memoriam) sin los cuales nada de esto tendría sentido...

A todas las personas que contribuyeron a que pudiera concluir éste **trabajo**. A mis tutores Prof. Carmen Rossini y Qco. Facundo Ibáñez; y a la Qca. Martina Díaz y Prof. Pilar Menéndez, por toda la paciencia, buena disposición para enseñarme y confiar en mí. A mis compañeros de Laboratorio: Alejandro Fredes, Juan Pablo Burla, Mercedes Borges y Anabela Rezzano por las enseñanzas diarias, el compartir del día a día y la ayuda clave en los momentos complicados del trabajo. Al Sr. Horacio Pezaroglo, por la realización de los experimentos en RMN.

A los **compañeros en INIA**: Felipe García, Laura Orrego, Ana Laura, Paula Calistro, Adrián Cal, Wanda, Nicolás Frioni, Wilma Wasalek, Alicia Feippe, Virginia Ferrari, Adriana Lenzi.

A mis **tíos**: Ana, Jorge, Américo Gil, Luis Carbajal, Luis González, Rita, Estela Mallarino; mis **primos**: Ignacio, María, Andrés, Rafael, Alfonso (in memoriam). A mis **abuelos**: Blanca, Flores y Chiquita, Blanca Olivera; y Matilde, Valentín Luis y Manuel Ignacio (in memoriam). Porque a pesar de todos los problemas, corre la misma sangre por nuestras venas.

A mis grandes **ejemplos de vida** y regalo de Dios: Felipe Beraldo y Dorita Fuidio; Padre Manuel Pías; Padre Jesús; Washington “Quique” Rocca; Alina Rivera, Hno. Néstor Achigar; Hno. José Mario Dipacce; Adhemar y Miriam Migliónico, Oscar y Mimí Della Valle, “tigre” Coito y Romy, Pedro y Marta Martínez, Ezzio (in memoriam) y Marcela, Wilson y Alejandra González.

A mis **viejos amigos**, que he atesorado a lo largo de tantos años de trajinar y deseo conservar por siempre: Stephanie Barneche, Marcos Collazo, Alejandro Fredes, Jonhatan Da Cunha, Adrián Zecchi, Estefanía Geymonat, Yiyo Ramírez, Jesús Castro, Simone Ferraz, Rossina Figliolo, Franco Finozzi, Víctor De Lima, Ignacio Malán, Fátima Barruta, Andrés Millán, Andrés Barchi, Victoria Colombo, Ivana Medina, Analía Borba, Alana Martínez, Juan Manuel Costa, Juan Moraes, Michel Weber, Mario Muniz, Sebastián Lucas, Guillermo Ceriani, Mariana Sánchez, Javier Silva, Sebastián Pagliano, Alejandro Ponce de León, Nicolás González, Fabián Nande, María José Andina, Agustín González, Emiliano Molinari, Inés De Andreis, Agustina Parietti, Araceli Sokorov, Verónica Demarco, Federico Favre, Laura Montaldo, Pancho y Mohio Lucas, Belén Henderson; por alentarme y por estar allí donde uno los necesita. Porque a pesar de que el tiempo, la distancia o los aconteceres de la vida nos separen momentáneamente, cada uno sigue muy presente en mi corazón y forman parte de mi riqueza.

A los **grandes compañeros de ruta y amigos** en el largo camino “empresarial”: Mariano Romero, Ignacio Laborda, Mariana Rezk, Catheryn Díaz, Lucía Geiss, Mónica Martínez, Chiara Mascaró, Tanya Sawchuk, Selva Cora, Danilo Rizzo, Bruno Gnini, Darío Repetto, Fernanda Castellán (in memoriam), Patricia Troupkos,

También el agradecimiento a mis **compañeros y amigos** de siempre del Laboratorio de Ecología Química e ICB: Martina Díaz, Lucía Castillo, María Laura Umpiérrez, Soledad Camarano, Florencia Doño, Carolina Sellanes, Estela Santos, Paula Altesor, Verónica Rivero, Valeria Cal, Adalgisa Martínez, Andrea Martínez, Nicolás Pizzorno, Pablo Fernández, Claudio Rodríguez, Luisina Da Costa, Andrea Garay, Federico Reyes.

A mis **amigos** dispersos por la patria grande de **América Latina y el Mundo**: Ana Paula, Brunim, Brunão, Paulo Ricardo, Pâmela, Rafael Pedro, Robinho, Hellen, Flávia Carla, Bruna, Paulo Leão, Gustavo, Danilo, Daíse, Letícia, Evelin, Marquinho, Amanda T., Amanda C., Vânia, Tamara, Lucas, Milena, Lúcio, Livia, Livinha, Mow, Fábio, Gabriel, Kamila, Isabella, Natasshia, Pauleta, Renan, Ruan, Sofía, Tamiris, Tathiane, Idiberto (Turma de Química Ambiental. UNESP. **Brasil**), Marília, Fernandes, Caio, Sérgio, João, Milena, Priscilla, Livia, Kléber (**Brasil**), Agustina, Soledad, Verónica, Ricardo, Eugenia, Fabio, Florencia (**Argentina**), Carmen, Beatriz, José Gregorio, Daisy, Isabel (**Venezuela**), Victor, Cinthya, Graciela, Rodiak, Rafael (**Perú**),

Marcos (**Paraguay**), Lina María, Harvey, Camilo, Angélica (**Colombia**), María Fernanda (**Chile**), Miriam (**Suecia**).

A los **profes** que me han alentado a seguir y que tanto de ellos he aprendido: Andrés González, Carmen Rossini, Gustavo Salinas, Álvaro Díaz, Horacio Heinzen, Eduardo Dellacasa, Álvaro Vázquez, Pilar Menéndez, Verónica Cessio, Ana Bertucci, Margarita Brovotto, Graciela Mahler, Eduardo Alonso Paz, María Julia Bassagoda, Paula Rodríguez, Daniel Molinari, Iris Scatoni, Andrea De Nigris, Enrique Vispo, Silvana Vero, Danilo Davyt, Federico Iribarne, José Fuentes y tantos otros cuyas enseñanzas aún persisten en mí.
(UdelaR)

También a los **profes brasileños** que me ayudaron y enseñaron tanto, no sólo académicamente sino también para la vida: Vera Aparecida de Oliveira Tieira, Marcio Tieira, Mauricio Bóscolo, Altair Benedito Moreira, Márcia Cristina Bisinotti, Lilian Casatti, Fabricio Barreto Teresa, Elizeu Trabuco, Fabiano Pumpim, Vanildo Luiz Del Bianchi (**UNESP-Brasil**).

A los **profes que me señalaron el camino** para llegar a la Universidad: Laura y Rosa Belvisi, Ana Gereda, Lilián Darré, Nelson Cabillón, Mercedes Barchi, Susana Molinari, Patricia Cerizola, Zully Nerón, Marta Manisse, Ana María Zardo, Ángela Santana, Cristina Trotta, Luis Mengui, Verónica Palermo, Roberta Corts, Virginia Mello, Elida Fernández, Ana Tejada, Adriana Naguila, Mariana Milano, Danny Vázquez, Silvana Lalinde, Ana María Magnin, Pablo Goncalvez, Sandra Rodríguez, Sonia Suárez, Mirna Schreiner, Susana Ibarburú, Araceli Ghiusoli, Teresita Baldi, Débora Eguren, Marcelo Scotto, Jorge Armentano, Lucía Vignola, José García Dantaz, Amelia Varietti, Lucía Fuentes, Alejandra Conti, Aída Cochararo, José Arbiza y tantos otros a lo largo de seis años de trajinar liceal.

A mis queridas **maestras**: Laura Willie, Estela Silva, Stella Rodríguez.

A las **instituciones** que me han apoyado para poder realizar mis estudios a través de becas y apoyos: Empresa Alonso (Paysandú), Escuela No 12 (Paysandú), Liceo No 4 (Paysandú), Liceo Departamental No 1 (Paysandú), Intendencia Municipal de Paysandú (IMP), Fondo de Solidaridad, Bienestar Universitario-Universidad de la República (UdelaR), Residencia Universitaria Sagrada Familia (RUSAFA), Facultad de Química (UdelaR), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM), Universidad Estadual Paulista (UNESP-Brasil), Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

Y a todas aquellas personas, anónimas tal vez para éste escueto espacio, que hasta tal vez sin saberlo, han dejado una huella en mi vida.

Manuel Minteguiaga Carbajal

Marzo 2011.

9-Bibliografía:

*Abdelgaleil, S. A. M.; El-Aswad, A. F.; *Antifeedants and Growth Inhibitory Effects of Tetranortriterpenoids Isolated from three Meliaceae Species on the Cotton Leafworm, Spodoptera littoralis (Boisd.)*; *Journal of Applied Sciences Research*; Vol 1 No. 2; pp 234-241; 2005.

*Ahn, J. W.; Choi, S. U.; Lee, C. O.; *Cytotoxic limonoids from Melia azedarach var. japonica*; *Phytochemistry*; Vol 36 No. 6; pp 1493-1496; 1994.

*Abbasi, S.; Zandi, P.; Mirbagheri, E.; *Quantitation of limonoid in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods*; *Eur. Food Res. Technol.*; Vol 221; pp 202-207; 2005.

*Arnason, J. T.; Guillet, G.; Durst, T.; *Phytochemical diversity of insect defenses in tropical and temperate plant families*; in *Advances in Insect Chemical Ecology*. Edited by Carde, R. T. and Millar, J. G.; Cambridge University Press; 2004.

*Bentancourt, C.M.; Scatoni, I. B.; *Guía de Insectos y Ácaros de Importancia Agrícola y Forestal en el Uruguay*; Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur; Montevideo; 1999.

*Bentancourt, C. M.; *Manual de Entomología*; Facultad de Agronomía (UdelaR); 2004.

*Bentley, M.D.; Rajab, M.S.; Mendel, M. J.; Randall Alford, A.; *Limonoid Model Insect Antifeedants*; *J. Agric. Food Chem*; Vol 38, pp 1400-1403; 1990.

*Bhatl, B. R.; Droj, Y.; *Crop protection in Organic Vegetables farming through the use of Melia azedarach. A field experiment on efficacy of Melia azedarach to cabbage aphid (Brevicorina brassicae)*; In: 6TH IFOAM- Asia Conference; Yangpyung, Korea; 2004.

*Brunherotto, R.; Vendramin, J. D.; *Bioatividade de Extratos Aquosos de Melia azedarach L. sobre o desenvolvimento de Tuta absoluta (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae) em Tomateiro*; *Neotropical Entomology*; Vol 30 No. 3; pp 455-459; 2001.

*Breksa, A. P.; Ibarra, P. Jr.; *Colorimetric Method for the Estimation of Total Limonoid Aglycones and Glucosides Contents in Citrus Juice*; *J. Agric. Food Chem*; Vol 55, pp 5013-5017; 2007.

*Bohnenstegel, F. I.; Wray, V.; Witte, L.; Srivastava, R. P.; Proksch, P.; *Insecticidal meliacarpins (C-seco limonoids) from Melia azedarach*, *Phytochemistry*; Vol 50; pp 977-982; 1999.

*Borges, M.; Ibáñez, F.; Zoppolo, R.; Paullier, J.; Production of a biopesticide from botanical origin in small-scale for horticultural crop. In: 1ST Meeting of Latin American Association of Chemical Ecology; Colonia de Sacramento, Uruguay, 2010.

*Carpinella, M.C.; Fulginiti, S.; Britos, S.; Oviedo, M. M.; Alonso, R. A.; Palacios, S. M.; Toxicidad aguda de extractos de frutos de *Melia azedarach* L. en ratas; *Revista de Toxicología*; Vol 16; pp 22-24; 1999.

*Carpinella, M. C.; Ferrayoli, C.; Defagó M. T.; Valladares, G.; Palacios, S. M.; Potent Limonoid Insect Antifeedant from *Melia azedarach*; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*; Vol 66 No 8; pp 1731-1736; 2002.

*Carpinella, M. C.; Defagó M. T.; Valladares, G.; Palacios, S. M.; Antifeedant and Insecticide Properties of a Limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with Potential Use from Pest Management; *J. Agric. Food Chem*; Vol 51, pp 369-374; 2003.

*Carpinella, M. C.; Defagó, M. T.; Valladares, G.; Palacios, S. M.; Role of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) for the control of insects and acari: present status and future prospects; In *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, pp 81-123. Edited by M. Rai & C. Carpinella; Elsevier; Amsterdam; 2006.

*Carpinella, M.C; Ferrer, M. H.; Rollán, M.; Palacios, S. M.; Bactericide activity of extracts from different plant structures of *Melia azedarach* L.; *Molecular Medicinal Chemistry*; Vol 11; pp 10-11; 2006.

*Chapagain, B. P.; Wiesman, Z.; Phyto-Saponins as a Natural Adjuvant for Delivery of Agromaterials through Plant Cuticle Membranes; *J. Agric. Food. Chem*; Vol 54, pp 6277-6285; 2006.

*Champagne, D.E.; Koul, O.; Isman, M. B.; Scudder, G. G. E.; Towers, G. H. N.; Biological activity of limonoids from Rutales; *Phytochemistry*; Vol 31, No. 2; pp 377-394-, 1992.

*Charleston, D. S.; Kfir, R.; Dicke, M.; Vet, L. E. M.; Impact of botanical extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on populations of *Plutella xylostella* and its natural enemies: A field test of laboratory findings; *Biological Control*; Vol 39; pp 105-114; 2006.

*Coria, C.; Almirón, W.; Valladares, G.; Carpinella, C.; Ludueña, F.; Defagó, M.; Palacios, S.; Larvicide and oviposition deterrent effects of fruits and leaves from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae); *Bioresource Technology*; Article in Press; 2007.

*Costa, E. L. N.; Da Silva, R. F. P.; Fluza, L. M.; Efeitos, Aplicações e Limitações de Extratos de Plantas Inseticidas; *Acta Biológica Leopoldensia*; Vol 26. No. 2; pp 173-185; 2004.

*Dai, J.; Yaylayan, V. A.; Raghavan, C. S. V.; Paré, J. R.; *Extraction and Colorimetric Determination of Azadirachtin Limonoids in Neem Seed Kernel*; *J. Agric. Food. Chem*; Vol 47; pp 3738-3742; 1999.

*De Souza, A. P.; Vendramin, J. D.; *Atividade Inseticida de Extratos Aquosos de Meliáceas sobre a Mosca branca Bemisia tabaci (Genn.) Biótipo (Hemiptera:Aleyrodidae)*; *Neotropical Entomology*; Vol 30 No. 1; 133-137; 2001.

*Díaz, M. Rossini, C.; Castillo, L.; González, A.; *Caracterización química y de actividad biológica de miembros de la flora local uruguaya. En: 1er Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (ENACUI), Montevideo, Uruguay, 2009.*

*Díaz, M.; Castillo, L.; González, A; González-Coloma, A; Díaz-Hernández, C. E.; Alvarez, R. G.; Rossini, C.; *Triterpenoids from Melia azedarach Fruits: are they Potential Anti-Insect Agents?. In: 1ST Meeting of Latin American Association of Chemical Ecology; Colonia de Sacramento, Uruguay, 2010.*

*DINAMA, *1er Informe Anual del Estado del Ambiente- Uruguay 2009. Disponible en http://www.dinama.gub.uy/index.php?option=com_content&view=article&id=798. Ultimo acceso: 17/02/11.*

*Defagó, M.; Valladares, G.; Banchio, E.; Carpinella, C.; Palacios, S.; *Insecticide and antifeedant activity of different plants parts of Melia azedarach on Xanthogaleruca luteola, Fitoterapia, Article in Press, 2006.*

*European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). *Data sheets on quarantine pests: Diabrotica speciosa. Bulletin OEPP/EPPO, Vol 35; pp 374-376; 2005.*

*FAO; *Agricultura Orgánica, Ambiente y Seguridad Alimentaria; Editado por N. Scialabba y C. Hattam, 2003.*

*Glenna, J. L; Kuo, C. C.; Durley, R. C.; Pharis, R. P.; *Use of insoluble polyvinylpyrrolidone for purification of plant extracts and chromatography of plant hormones; Phytochemistry; Vol 11 No. 1; pp 345-351; 1972.*

*González-Coloma, A.; *Ensayos con Insectos, diseño experimental. En: Burrillo Alquézar, J.; González-Coloma, A.; Insecticidas y repelentes de insectos de origen natural; CYTED, Aragón, España; 2009.*

*González de Molina, M; Guzmán Casado; G. I.; *Tras los pasos de la Insustentabilidad. Agricultura y Medio Ambiente en perspectiva histórica (s. XVIII-XX): Icaria Ecología Humana, 2006.*

*Habib, M.; *A Genética na Agricultura Convencional; Charla presentada por la Red Temática de Medio Ambiente (RETEMA-UdelaR); Facultad de Arquitectura;19/08/2010.*

*Hammad, E. A. F.; Chinaberry, *Melia azedarach* L. A Biopesticidal Tree; *Encyclopedia of Entomology*; 2008.

*Houghton, P. J.; Raman, A.; *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*; Chapman & Hall; 1998.

*Huang, R. C.; Okamura, H.; Iwagawa, T.; Tadera, K.; Nakatani, M.; Azedarachin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*; *Phytochemistry*; Vol 38 No. 2; pp 593-594; 1995.

*Ibáñez, F.; Zoppolo, R.; "Manejo de plagas en Agricultura Orgánica. Extractos de paraíso para control de insectos". *Boletín de Divulgación* 94. INIA Las Brujas; 2008.

*Ibáñez, F.; Zoppolo, R.; Villamil, J; Ferrari, V.; Díaz, M.; *Desarrollo y estandarización de biopesticidas de origen vegetal. En: II Simposio Internacional de Agricultura Orgánica, Santiago de Chile, 2008.*

*Ibáñez, F.; Zoppolo, R.; *Estudios de producción y efectividad de extractos de Paraíso (Melia azedarach). En: Jornada de Divulgación: "Avances de Resultados en Agricultura Orgánica". Serie de Actividades de Difusión N° 551. INIA Las Brujas; 2008.*

*INIA, *Proyecto ANII_AIS 662: "Obtención, cuantificación y estandarización de extractos del paraíso (Melia azedarach) para su potencial empleo como bioplaguicidas"*, 2009.

*Isman, M. B.; *Neem and Others Botanicals Insecticides: Barriers to Commercialization; Phytoparasitica, Vol 25 No. 4; pp 339-344; 1997.*

*Isman, M. B.; *Insects Antifeedants; Pesticide Outlook; August 2002.*

*Jarvis, A. P.; Johnson, S.; Morgan, D.; *Stability of the Natural Insecticide Azadirachtin in Aqueous and Organic Solvents; Pestic. Sci.; Vol 53; pp 217-222; 1998.*

*Joiner, R. L.; Chambers, H. W.; Baetcke, K. P.; *Toxicity of Parathion and Several of its Photoalteration Products to Boll Weevil; Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Volume 6, Number 3, 220-224; 1971.*

*Liu, L.; Sayed Alam, M.; Hirata, K.; Matsuda, K.; Ozoe, Y.; *Actions of quinolizidine alkaloids on *Periplaneta americana* nicotinic acetylcholine receptors; Pest Management Sciences; Vol 64. No 12; pp 1222-1228; 2008.*

*Mabry, T.J.; Markham K. R.; Thomas, M. B.; *The Systematic Identification of Flavonoids; Springer-Verlag; 1970.*

*Maciel M. V.; Morais, S. M.; Bevilaqua, C. M. L.; Camurca-Vasconcelos; A. L. F.; Costa, C. T. C.; Castro, C. M. S.; *Ovicidal and larvicidal activity of Melia azedarach extracts on Haemonchus contortus; Veterinary Parasitology; Vol 140; pp 98-104; 2006.*

*Martínez M., A.; *Flavonoides; Facultad de Farmacia, Universidad de Antioquía. Medellín, 2005.*

Disponible en internet en:

*Melwita, E; Ju, Y. H.; *Separation of azadirachtin and other limonoids from crude neem oil via solvent precipitation; Separation and Purification Technology; Vol 74; pp 219-224; 2010.*

*Meng, X.; Peng, J.; Chen, Y.; *Determination of Toosendanin Extracted from Traditional Chinese Medicine: the fruit of Melia azedarach LC-FD Detection; Chromatographia; Vol 70 No 3/4; pp 609-611; 2009.*

*Nathan, S. S.; Sehoon, K.; *Effects of Melia azedarach L. extracts on the teak defoliator Hyblaea puera Cramer (Lepidoptera:Hyblaeidae); Crop Protection; Vol 25; pp 287-291; 2006.*

*Nakatani, M; Huang, R. C.; Okamura, H.; Naoki, H.; Iwagawa, T.; *Limonoid antifeedants from Chinese Melia azedarach, Phytochemistry; Vol 36 No. 1; pp 39-41; 1994.*

*Oelrichs, P. B.; Hill, M. W.; Vallely, P. J.; MacLeod, J. K.; Molinski, T. F.; *Toxic tetranortriterpenoids of the fruit of Melia azedarach; Phytochemistry; Vol 22 No. 2; pp 531-534; 1983.*

*Ong, E. S.; Ong, C. N.; *Qualitative and quantitative analysis of toosendanin in Melia toosendan Sieb. Et Zucc (Meliaceae) with liquid chromatography/tandem mass spectrometry; Rapid Commun. Mass Spectrom.; Vol 21; pp 589-598; 2007.*

*Peveling; R.; Ely, S. O.; *Side-effects of botanical insecticides derived from Meliaceae on coccinellid predators of the date palm scale; Crop Protection; Vol 25; pp 1253-1258; 2006.*

*Philogene, B. JR; *Plants Natural Products as Synergists, in: Regnault-Roger, C.; Philogene, B. JR.; Vincent, C.; Biopesticides of Plant Origin, Intercept Lavoisier Publishing; 2005.*

*Prakash, A.; Rao, J.; *Botanical pesticides in Agriculture; CRC Lewis Publishers; Boca Raton, 1997.*

*Puri, H. S.; *Neem. The Divine Tree, Azadirachta indica; Overseas Publishers Association; 1999.*

*Regnault-Roger, C.; Philogene, B. JR.; Vincent, C.; *Biopesticides of Plant Origin, Intercept Lavoisier Publishing; 2005.*

*Roy, A.; Saraf, S.; *Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom; Biol. Pharm. Bull.; Vol. 29, No. 2; pp 191-201; 2006.*

*Ruch, B.; *Quantification of Azadirachtin in Neem Products and in different compartments after Neem-Treatment; Trifolio-M GmbH, Lahnau, Germany.*

*Schroeder, D. R.; Nakanishi, K.; *A Simplified Isolation Procedure for Azadirachtin*; *Journal of Natural Products*; Vol. 50: N° 2; pp 241-244; 1987.

*Sharma, V.; Walia, S.; Kumar, J.; Muraleedharan, G.N.; Parmar, B. S.; *An Efficient Method for the Purification and Characterization of Nematicidal Azadirachtins A, B and H, Using MPLC and ESIMS*; *J. Agric. Food. Chem*; Vol 51, pp 3966-3972; 2003.

*Srivastava, S.D.; *Limonoids from the seeds of Melia azedarach*; *J. of Nat. Prod.*; Vol. 49, No 1; pp 56-61; 1986.

*Suresh, G.; Gopalakrishnan, G.; Daniel Wesley, S.; Pradeep Singh, N. D.; Malathi, R.; Rajan, S.S; *Insect Antifeedant Activity of Tetranortriterpenoids from the Rutales. A Perusal of Structural Relations*; *J. Agric. Food Chem*; Vol 50, pp 4484-4490; 2002.

*Stubbs, M.; *Density Dependence in the Life-Cycles of Animals and its Importance in K- and R-Strategies*; *Journal of Animal Ecology*; Vol. 46, No. 2; pp. 677-688; 1977.

*Tayeka, K.; Qiao, Z. H.; Hirobe, C.; Itowaka, H.; *Cytotoxic azadirachtin-type limonoids from Melia azedarach*; *Phytochemistry*; Vol 42 No. 3; pp 709-712; 1996.

*Vaks, B.; Lifshitz, A.; *Debiterring of Orange Juice by Bacteria which degrade Limonoids*; *J. Agric. Food. Chem*; Vol 29, pp 1258-1261; 1981.

*Valladares, G.; Garbin, L.; Defagó, M. T.; Carpinella, C.; Palacios, S.; *Actividad antialimentaria e insecticida de un extracto de hojas senescentes de Melia azedarach (Meliaceae)*; *Rev. Soc. Entomol. Argent.*; Vol 62, No. 1-2; pp 53-61; 2003.

*Viegas Júnior, C.; *Terpenos com atividade Inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos*; *Quím. Nova*; Vol 26, No. 3; 390-400; 2003.

*Zhou, H.; Hamazaki, A.; Fontana, J. D.; Takahashi, H.; Esumi, T.; Wandscheer, C. B.; Tsujimoto, H.; Fukuyama, Y.; *New Ring C-seco Limonoids from Brazilian Melia azedarach and their Cytotoxic Activity*; *J. Nat. Prod.*; Vol 67; pp 1544-1547; 2004.