



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
ESCUELA DE QUÍMICA

Anteproyecto de Tesis sometido a consideración de la Comisión de Evaluación de  
Anteproyectos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciada en  
Química

Evaluación del efecto de Azadiractina sobre (*Hypothenemus hampei*) Cultivos de  
Coffea arabica producidos en Palmira Arriba, Boquete mediante Cromatografía  
Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Lenis Sánchez  
4-830-594

Profesor asesor:  
Profesora. Vielka de Guevara

Profesor Co-Asesor:  
Profesor. Omar Chacón  
Profesor. José Baúles

David, Chiriquí  
Mayo, 2024

## Índice

Resumen.....	1
1. Marco Reerencial.....	2
1.1 Generalidades de la Azadiractina y del método analítico HPCL.....	2
1.1.1 Importancia de la Azadiractina en la Agricultura.....	2
1.1.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	2
1.1.3 Mecanismo de Acción de la Azadiractina.....	3
1.14 Aplicación del HPLC en el Estudio de la Azadiractina.....	3
1.1.5 Impacto de la Azadiractina en Plagas de Coffea arabica.....	3
1.2 Antecedentes .....	4
1.2.1 Antecedentes nacionales.....	4
1.2.2 Antecedentes Internacionales.....	4
2. Definición del problema.....	5-6
3. Justificación e Importancia de la Investigación.....	6-7
4. Hipótesis.....	7
4.1 Hipótesis alternativa.....	7
4.2 Hipótesis nula.....	7
5. Objetivos de la investigación.....	7
5.1 Objetivo general .....	7-8
5.2 Objetivos específicos .....	8
6. Cobertura .....	8
7. Metodología.....	8
7.1 Generalidades.....	8

7.2 Etapa 1 Diagnostico de la capacidad analítica del laboratorio y diseño de validación.....	8
7.2.1 Cuestionario .....	8
7.2.3 Diseño de validación.....	9
7.2.3.1 Linealidad .....	9
7.2.3.2 Limite de cuantificación .....	10
7.2.3.3 Precisión .....	10
7.2.3.4 Exactitud .....	11
7.3 Etapa 2 Revisión Documental .....	11
7.4 Etapa 3 Muestreo .....	12
7.5 Etapa 4 Tratamiento estadístico de los datos .....	12.
8. Cronograma de actividades .....	13
9. Presupuesto.....	14
10. Referencias.....	15-16
11. Anexos .....	17
...	

## **Título del Trabajo de investigación**

Evaluación del efecto de Azadiractina sobre (*Hypothenemus hampei*) Cultivos de Coffea arabica producidos en Palmira Arriba, Boquete mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

## **Resumen**

Este estudio experimental y analítico evalúa el impacto de la azadiractina en el control del escarabajo del café (*Hypothenemus hampei*) en cultivos de Coffea arabica en Palmira Arriba, Boquete, utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se enfoca en analizar los componentes activos de la azadiractina, entender cómo actúan en la reducción de plagas y comparar su eficacia en parcelas contaminadas y parcelas control. Para lograr esto, se recolectarán muestras en varias parcelas de Palmira Arriba y se analizarán en el Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) ubicado en la universidad autónoma de Chiriquí durante los meses de mayo hasta diciembre del 2024. La técnica de HPLC permitirá una caracterización detallada de los componentes activos de la azadiractina, mientras que los bioensayos de laboratorio observarán las respuestas de *Hypothenemus hampei* a distintas concentraciones de este compuesto. Los resultados esperados incluyen una disminución notable en la población de *Hypothenemus hampei* en las parcelas tratadas con azadiractina, confirmando su eficacia como una alternativa más segura a los pesticidas químicos. Además, HPLC debería proporcionar una caracterización precisa de los componentes activos de la azadiractina, mejorando su uso en el manejo de plagas. En conclusión, este estudio podría establecer una base científica sólida para prácticas agrícolas más sostenibles en la producción de café en Boquete. Los hallazgos tienen el potencial de impulsar el desarrollo sostenible y el bienestar de la comunidad local, ofreciendo beneficios económicos, ambientales y sociales. La implementación de estas prácticas sostenibles no solo mejorará la producción de café, sino que también protegerá el ecosistema local y la salud de los trabajadores agrícolas y consumidores. Con esto, se espera que Boquete se convierta en un modelo de producción de café sostenible y responsable, promoviendo prácticas agrícolas que puedan ser replicadas en otras regiones cafetaleras del país y del mundo.

## **1. Marco referencial**

### **1.1 Generalidades de la Azadiractina y del método analítico HPCL**

La azadiractina es un limonoide extraído de las semillas del árbol de neem (*Azadirachta indica*), una planta nativa del subcontinente indio y conocida por sus propiedades medicinales y pesticidas desde hace siglos. La azadiractina es uno de los más de 100 compuestos bioactivos identificados en el neem, y es particularmente valorada por su capacidad para actuar como un insecticida natural. Este compuesto afecta a más de 200 especies de insectos, interfiriendo con su sistema endocrino, lo que impide su alimentación, crecimiento y reproducción (Mordue & Blackwell, 2014).

#### **1.1.1 Importancia de la Azadiractina en la Agricultura**

El uso de la azadiractina en la agricultura se ha incrementado debido a la creciente demanda de métodos de control de plagas más seguros y ecológicos. A diferencia de muchos pesticidas sintéticos, la azadiractina presenta baja toxicidad para los mamíferos, aves y peces, y se degrada rápidamente en el ambiente, lo que minimiza los riesgos de acumulación y contaminación (Isman, 2006). Además, la azadiractina no provoca resistencia en las plagas tan rápidamente como los pesticidas convencionales, lo que la convierte en una herramienta valiosa en el manejo integrado de plagas (IPM).

#### **1.1.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es una técnica analítica esencial en la identificación y cuantificación de compuestos bioactivos en mezclas complejas. En el caso de la azadiractina, el HPLC permite su separación de otros compuestos presentes en los extractos de neem, garantizando una cuantificación precisa y confiable. El HPLC se basa en la utilización de una fase móvil (un solvente o una mezcla de solventes) y una fase estacionaria (una columna llena de material adsorbente), donde los diferentes compuestos se separan según su interacción con estas fases (Snyder et al., 2012).

### 1.1.3 Mecanismo de Acción de la Azadiractina

La azadiractina actúa principalmente interfiriendo con el sistema endocrino de los insectos. Inhibe la síntesis de ecdisona, una hormona crucial para la muda y la metamorfosis de los insectos. Esta interferencia resulta en la interrupción del ciclo de vida del insecto, previniendo su desarrollo y reproducción (Mordue & Nisbet, 2000). Además, la azadiractina también actúa como un antialimentario, lo que significa que los insectos dejan de alimentarse al entrar en contacto con ella, lo que eventualmente conduce a la inanición (Schmutterer, 2015).

### 1.1.4 Aplicación del HPLC en el Estudio de la Azadiractina

El análisis de azadiractina mediante HPLC implica varios pasos críticos, incluyendo la preparación de la muestra, la elección de la fase móvil y estacionaria adecuada, y la detección y cuantificación del compuesto. La preparación de la muestra puede involucrar la extracción de azadiractina de productos comerciales o directamente de semillas de neem. Una vez preparada, la muestra se inyecta en el sistema HPLC, donde los componentes se separan en función de su afinidad por la fase estacionaria y su solubilidad en la fase móvil (Snyder et al., 2012).

Para la detección de la azadiractina, generalmente se utiliza un detector de espectrofotometría UV-Vis, dado que la azadiractina absorbe fuertemente en el rango ultravioleta. Los resultados del HPLC proporcionan un cromatograma que muestra la separación de los componentes y permite la identificación y cuantificación precisa de la azadiractina mediante la comparación con estándares conocidos (Schmutterer, 2018).

### 1.1.5 Impacto de la Azadiractina en Plagas de Coffea arabica

El Coffea arabica es altamente susceptible a diversas plagas, siendo el barrenador del café (*Hypothenemus hampei*) una de las más devastadoras. El uso de azadiractina en el control de esta plaga ha demostrado ser eficaz, reduciendo significativamente las poblaciones de insectos y, por lo tanto, el daño a los cultivos. La azadiractina afecta a los barrenadores interfiriendo con su desarrollo y reproducción, lo que lleva a una disminución de su incidencia en los campos de café (Miller & Strickler, 2014).

Estudios han demostrado que la aplicación de productos a base de azadiractina puede llevar a una reducción del 50-90% en la infestación de plagas en cultivos de

*Coffea arabica*, mejorando significativamente la calidad y el rendimiento de las cosechas (Kraus, 2012). Además, su uso es compatible con otras prácticas de manejo integrado de plagas, lo que permite a los agricultores adoptar un enfoque más holístico y sostenible en la protección de sus cultivos (Mordue & Blackwell, 2017).

## 1.2 Antecedentes

### 1.2.1 Antecedentes nacionales

A pesar que no se hayan realizado tantas investigaciones sobre el efecto de la azadiractina y su efecto en plagas agrícolas, en la provincia de Los Santos evaluaron el impacto de la azadiractina para el control de garrapatas en ganado bovino.

En el 2017 (Guerrero Rojas & Guerrero Sánchez) Con el objetivo de contribuir a la generación de tecnologías más limpias, realizaron al nivel de bioensayo, una evaluación del extracto de *Azadirachta indica*, para control de garrapatas (*Boophilus microplus*), en la Estación Experimental El Ejido, IDIAP- Los Santos, Panamá. Se evaluaron 5 tratamientos y 4 repeticiones/tratamiento. Los tratamientos estudiados: T1= Amitraz al 20.8%; T2= Agua; T3= solución de semillas de Neem al 1%; T4= solución de hojas de Neem al 3%; y T5= solución de corteza de Neem al 50%. Los datos fueron analizados en SAS, cuyos resultados indicaron: T1, 85%; el T2, 10%; T3, 80%; T4, 75%; y T5, 80% de mortalidad respectivamente. No se observó diferencias significativas, entre los tratamientos de Neem, en comparación al convencional. En fincas ganaderas, utilizando extracto de semillas de Neem, la frecuencia entre baños varió de 47 a 154 días, demostrando la eficacia del producto, beneficios económicos y ambientales. Todos los tratamientos a base de Neem, mostraron efectividad en control de garrapatas, observándose mayor control con el uso de extractos de semillas y corteza de Neem.

### 1.2.2 Antecedentes Internacionales

Existen varios estudios sobre el impacto de los extractos acuosos de hojas de *Azadirachta indica*, en una población de insectos pertenecientes a diferentes cultivos. Estos estudios se centran en la adición de diferentes concentraciones del extracto para evaluar su efectividad en cuanto a la exterminación de plagas.

En el 2021 Tafurt, G. Realizo un estudio del impacto de diferentes concentraciones de *Azadirachta indica* en plagas agrícolas de los cultivos de arroz. Los tratamientos de las parcelas de arroz se efectuaron con tres disoluciones acuosas preparadas a partir de hojas de *A. indica* (T1 = 5 %, T2 = 10 %, T3 = 20 %), además se utilizó un control negativo (T4 = 0 %). Se realizaron muestreos semanales de la población de insectos para comprobar la eficacia de los extractos.

Se procesaron 7418 individuos pertenecientes a 12 órdenes: Diptera (2720) fue el orden más representativo, seguido de Hemiptera (1854) y Coleoptera (1045). No se obtuvieron plagas significativas. Delphacidae fue la familia más abundante (se capturaron 92 individuos). Finalmente, se observó una eficacia del 74 % para el tercer tratamiento (T3). Con ello se concluyó que el uso de *A. indica* tuvo un efecto controlador sobre la población de insectos del cultivo.

En el año 2019 - Morante-Silva, P. Ruíz-González, C. Atarama-Montero, N. Andrade-Herrera, K. N. Evaluaron el efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* “Neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) en laboratorio. Extracto de *A. indica* sobre viabilidad de *Ae. aegypti*. Rev. peru. entomol. 54 (1): 1- 11. *Aedes aegypti* es el insecto vector causante de dengue, zika y chikungunya. Mundialmente, para controlarlo se utilizan productos organofosforados, frente a los cuales el vector ha mostrado resistencia. Se determinó el efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* sobre la viabilidad del huevo y larva de *Ae. aegypti* en laboratorio. El bioensayo se realizó con huevos y larvas del IV estadio de *Ae. aegypti* sometidas a tres concentraciones de extracto etanólico de *A. indica* (C1 = 0,0017g/ml, C2 = 0,0034g/ml y C3 = 0,0051g/ml). Los huevos presentaron porcentajes superiores al 70% de viabilidad en las tres concentraciones, mientras que las larvas presentaron un porcentaje de mortalidad superior al 70% con la C3.

## **2. Definición del problema**

El distrito de Boquete, se destaca por su rica producción de café, particularmente la variedad *Coffea arabica*. Esta actividad agrícola no solo constituye el sustento económico de muchas familias locales, sino que también es una parte integral de la identidad cultural de la región. Sin embargo, este preciado recurso se ve amenazado por una serie de plagas agrícolas que ponen en riesgo tanto la calidad como la cantidad de la cosecha de café. Estas plagas representan un desafío crítico para la productividad y la sostenibilidad de las fincas cafetaleras en Boquete.

El uso frecuente de plaguicidas químicos para el control de estas plagas ha planteado preocupaciones significativas en términos de impacto ambiental y riesgos para la salud humana. La contaminación del suelo y del agua, junto con los riesgos asociados para los trabajadores agrícolas y los consumidores, ha generado una creciente necesidad de encontrar alternativas más seguras y sostenibles para el control de plagas en la producción de café.

En este contexto, la azadiractina, un compuesto natural derivado del árbol de neem (*Azadirachta indica*), ha surgido como una posible solución. Sin embargo, la efectividad precisa de la azadiractina en el control de las plagas específicas que afectan a *Coffea arabica* en Boquete aún no se ha explorado completamente.



Además, la variabilidad en las concentraciones de azadiractina en los extractos naturales plantea interrogantes sobre su eficacia y aplicabilidad en el contexto local.

Las siguientes preguntas surgen naturalmente de esta situación:

1. ¿Qué concentración de solución de azadiractina será la más adecuada para la efectiva exterminación de (*Hypothenemus hampei*)?
2. ¿Qué nivel de eficacia presenta la azadiractina en el control de plagas específicas que afectan al *Coffea arabica*?
3. ¿Cómo puede contribuir la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a la evaluación precisa de la azadiractina y su impacto en el control de (*Hypothenemus hampei*) en comparación con los métodos convencionales?

### **3. Justificación e Importancia de la Investigación**

Las fincas cafeteras de Boquete están entre los 1.000 hasta los 2.100 m. s. n. m. (3.280 a 6.900 pies) y gracias al rico suelo de la región producen más de 10 variedades de café como Caturra Rojo y Amarillo, Catuaí, Java, Mundo Novo, Pache y, sobre todo, el premiado Geisha. Por lo que es una actividad económica vital que sustenta no solo la economía local, sino también la identidad cultural arraigada en la comunidad. Sin embargo, esta actividad se ve amenazada por una serie de plagas agrícolas principalmente por (*Hypothenemus hampei*) que afectan la calidad y la cantidad de la cosecha de café, planteando desafíos críticos para la productividad y la sostenibilidad de las fincas cafetaleras en la región.

El uso extensivo de plaguicidas químicos para el control de plagas ha generado preocupaciones significativas en términos de impacto ambiental y riesgos para la salud humana. La contaminación del suelo y del agua, junto con los riesgos asociados para los trabajadores agrícolas y los consumidores, ha despertado la necesidad urgente de encontrar alternativas más seguras y sostenibles para el control de plagas en la producción de café.

En este contexto, la azadiractina, un compuesto natural derivado del árbol de neem (*Azadirachta indica*), ha surgido como una posible solución. Sin embargo, la efectividad precisa de la azadiractina en el control de las plagas específicas que afectan a *Coffea arabica* en Boquete aún no se ha explorado completamente. Además, la variabilidad en las concentraciones de azadiractina en los extractos naturales plantea interrogantes sobre su eficacia y aplicabilidad en el contexto local.

Esta investigación reviste una importancia significativa al abordar un problema crítico en la producción de café en Boquete, al tiempo que tiene el potencial de generar impactos positivos significativos en términos económicos, ambientales y sociales. Al proporcionar una base científica sólida para la implementación de prácticas agrícolas más sostenibles, esta investigación puede contribuir de manera tangible al desarrollo sostenible y al bienestar de la comunidad local en Boquete y más allá.

## 4. Hipótesis

### 4.1 Hipótesis alternativa:

Ha1: La aplicación de azadiractina en cultivos de *Coffea arabica* en Palmira Arriba, Boquete, reduce significativamente la población de (*Hypothenemus hampei*).

Ha2: La cromatografía de alta resolución (HPLC) permite una caracterización completa y precisa de los compuestos presentes en la azadiractina incluyendo la identificación y cuantificación de los componentes activos.

### 4.2 Hipótesis nula:

H01: La aplicación de azadiractina en cultivos de *Coffea arabica* en Palmira Arriba, Boquete, no reduce significativamente la población de (*Hypothenemus hampei*)

H02: La cromatografía de alta resolución (HPLC) no permite una caracterización completa y precisa de los compuestos presentes en la azadiractina incluyendo la identificación y cuantificación de los componentes activos.

## 5. Objetivos de la investigación

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de Azadiractina sobre (*Hypothenemus hampei*) Cultivos de *Coffea arabica* producidos en Palmira Arriba, Boquete mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

### 5.2 Objetivos específicos

1. Identificar y Cuantificar los componentes activos presentes en la azadiractina mediante la cromatografía de la alta resolución HPCL que actúan sobre (*Hypothenemus hampei*)

2. Determinar los mecanismos de Acción de la azadiractina en la Reducción de plagas en los cultivos De café, utilizando bioensayos de Laboratorio con (*Hypothenemus hampei*) para Observar sus respuestas a Diferentes concentraciones de Azadiractina.

3. Evaluar la eficiencia de Azadiractina en parcelas contaminadas comparándolas con parcelas control de Café arábica y medir su efectividad en la reducción de *Hypothenemus hampei*

## **6. Cobertura**

Este proyecto es experimental y analítico, ya que se llevará a cabo la evaluación del efecto de la azadiractina sobre el escarabajo del café (*Hypothenemus hampei*) en cultivos de *Coffea arabica* en Palmira Arriba, Boquete, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Además, se realizarán bioensayos de laboratorio para observar las respuestas del insecto a diferentes concentraciones de azadiractina y se evaluará la eficiencia de la azadiractina en parcelas contaminadas comparándolas con parcelas control.

El estudio se llevará a cabo durante 8 meses (mayo a diciembre) del año 2024. Para lograr un muestreo representativo, se ha planificado la recolección de muestras en diferentes parcelas dentro de Palmira Arriba, Boquete.

## **7. Metodología**

### **7.1 Generalidades**

La investigación se realizará en el centro de investigación de productos naturales y biotecnología (CIPNABIOT) ubicado en la universidad autónoma de Chiriquí. Este estudio consistirá en evaluar el efecto de la Azadiractina sobre *Hypothenemus hampei* en cultivos de *Coffea arabica* producidos en Palmira Arriba, Boquete, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

### **7.2 Etapa 1. Diagnóstico de la capacidad analítica del laboratorio y diseño de la validación**

Para llevar a cabo la validación se requiere verificar que se cuenta con los equipos calificados, verificados o calibrados, los métodos documentados, patrones de referencia, analistas calificados y las condiciones ambientales.

El equipo que se utilizará para determinar los componentes activos de la Azadiractina será el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), marca Agilent, modelo 1260 Infinity, con un rango de detección que abarca longitudes de onda de 190 a 800 nm.

#### 7.2.1 Cuestionario

Diseño de un cuestionario de verificación para diagnosticar las capacidades del centro de investigación de productos naturales y biotecnología (CIPNABIOT), basado en la norma ISO 17025:2017 en el cual se evaluará:

- Personal capacitado
- Equipamiento
- Materiales
- Reactivos y materiales de referencia
- Instalaciones

#### 7.2.2 Validación del cuestionario

- Juicio de expertos

#### 7.2.3 Diseño de la validación

El método elegido se basará en las técnicas cromatográficas establecidas en el HPLC. Los parámetros que se validarán son:

##### 7.2.3.1 Linealidad

Dependiendo del método se utilizarán diferentes materiales de referencia como patrones de una curva de calibración para determinar la relación del valor especificado para cada material de referencia y la señal del equipo. Los parámetros de linealidad que se evaluarán son:

Tabla 1. Cálculo para datos de linealidad

Parámetro	Fórmula estadística
<b>Pendiente</b>	$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$
<b>Coeficiente de correlación</b>	$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2] [\sum_i (y_i - \bar{y})^2]^{1/2}}$
<b>Coeficiente de determinación</b>	$R^2 = r^2$
<b>Intercepto</b>	$a = \bar{y} - b\bar{x}$
<b>Desviación estándar de la ordenada</b>	$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$
<b>Desviación estándar de la pendiente</b>	$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$
<b>Desviación del intercepto</b>	$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$
<b>Prueba t para el coeficiente de correlación</b>	$t_b = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$
<b>Prueba t para el intercepto</b>	$t_a = a/s_a$

Fuente: Tomada a partir de Gonzales (2021)

#### 7.2.3.2 Límite de cuantificación

Los valores del límite de cuantificación se determinarán a través de la lectura de diez repeticiones de un blanco fortificado con los componentes activos a evaluar en su menor concentración.

Tabla 2. Ecuaciones utilizadas para el límite de cuantificación

Parámetro	Fórmula estadística
<b>Media aritmética</b>	$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$
<b>Desviación estándar (s) de n medidas</b>	$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$
<b>Límite de detección</b>	$LQ = \bar{x} + 10s$

Fuente: Tomada a partir de EURACHEM (2016)

### 7.2.3.3 Precisión

- Repetibilidad

En la determinación de la repetibilidad, un analista realizará diez mediciones de una misma muestra bajo condiciones específicas y se evaluarán pruebas estadísticas.

Tabla 3. Parámetros para el análisis estadístico

Parámetro	Fórmula estadística
<b>Media aritmética</b>	$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$
<b>Desviación estándar (s) de n medidas</b>	$s = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$
<b>Variación de las medidas</b>	$s^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)$
<b>Coefficiente de variación</b>	$CV = 100s/\bar{x}$
<b>Estadístico de Grubbs para datos anómalos</b>	$G_{Máx.} = \frac{(x_{Máx} - \bar{x})}{s}$ $G_{Mín.} = \frac{(\bar{x} - x_{Mín})}{s}$

Fuente: Tomada a partir de EURACHEM (2016)

### 7.2.3.4 Exactitud

El parámetro de exactitud se determinará mediante el porcentaje (%) de recuperación, tomando tres concentraciones diferentes de una disolución estándar o material de referencia de concentración conocida.

$$\%Recuperación = \frac{[ ]_{Experimental}}{[ ]_{Teórica}} \times 100\%$$

## 7.3 Etapa 2. Revisión Documental

Para la búsqueda de referencias se utilizarán distintos buscadores como:

- Google Académico
- Elsevier
- Biblioteca Virtual de la UNACHI.

- SciELO
- NIH (Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos)
- Hindawi

#### 7.4 Etapa 3. Muestreo

##### Procedimiento

- Primeramente, los cultivos de *Coffea arabica* serán tratados con diferentes concentraciones de Azadiractina.
- Se realizarán bioensayos de laboratorio con *Hypothenemus hampei* para observar sus respuestas a diferentes concentraciones de Azadiractina.
- Las muestras de café tratadas se homogenizarán y se someterán a análisis mediante HPLC.
- Se pesarán 300 mg de la muestra (molida) en el recipiente de digestión. Se añadirá una mezcla de solventes adecuada para la extracción de los componentes activos.
- Las muestras se analizarán mediante HPLC, utilizando materiales de referencia certificados.

##### Tiempo

El análisis y obtención de resultados se llevará a cabo durante 8 meses

#### 7.5 Etapa 4. Tratamiento estadístico de los datos

El tratamiento estadístico de los datos permite el manejo y análisis de los mismos, lo que a su vez permite realizar juicios con criterio que llevan a una correcta evaluación. El uso de estadística descriptiva e inferencial asociada a un estudio de variabilidad de métodos analíticos es crucial para garantizar la precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos.

Se utilizarán herramientas como Excel y el software Past. Los tratamientos estadísticos inferencial y descriptivos serán:

- Desviación estándar

- Media
- Coeficiente de variación
- Test de Grubbs
- Prueba de Cochran
- ANOVA
- Gráfica de barras
- Tablas de distribución de frecuencias

## 8. Cronograma de actividades

Tabla 4. Cronograma de actividades

Etapa	Actividad	M	J	J	A	S	O	N	D
Elaboración de anteproyecto	Planificación del Anteproyecto								
	Revisión de literatura								
	Redacción de Anteproyecto								
	Revisión con la asesora								
	Aprobación								
Realización experimental	Muestreo								
	Ensayos preliminares								
	Preparación de la muestra para el método de digestión								
	Análisis de metales en grano								
	Variables de medición								
Resultados y redacción	Resultados: Obtención, tratamiento y discusión								



	Redacción del trabajo								
	Sustentación de la investigación								

## 9. Presupuesto

Tabla 5. Presupuestos

Componentes	Costos B/.	Fuente de financiamiento
<b>Equipos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• HPCL</li> <li>• Homogenizador</li> <li>• Balanza analítica</li> <li>• Digestor de muestras</li> <li>• Bioensayos de laboratorio</li> </ul>	-----	(CIPNABIOT)
<b>Reactivos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Metanol, Acetonitrilo, Agua ultrapura (grado HPCL)</li> <li>• HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v.</li> <li>• Acetato de etileno y hexano</li> </ul>	-----	(CIPNABIOT)
<b>Trasporte (8 meses)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Combustible del auto personal (200 B./ por mes)</li> </ul>	1600	Propio
<b>Viático (8 meses)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentación (70 B./ por mes)</li> </ul>	560	Propio
<b>Gastos administrativos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Webs de información científica (\$30.00)</li> <li>• Empaste de tesis (\$20.00*6 ejemplares)</li> </ul>	330	Propio

• Copias en papel especial de tesis (\$35.00*6 ejemplares)		
Imprevistos	500	Propio
TOTAL	2990.00	-----

## 10. Referencias

Morante-Silva, P., Ruíz-González, C., Atarama-Montero, N., & Andrade-Herrera, K. N. (2019). Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* "Neem" sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) en laboratorio. *Revista Peruana*

Guerrero Rojas, B., & Guerrero Sánchez, P. E. (2014). Evaluación de extracto de Neem (*Azadirachta indica*) para controlar garrapatas (*Boophilus microplus*) en ganado bovino. En *\*Alternativas tecnológicas de producción más limpia en ganadería de leche y carne bovina (Proyecto de investigación)*. IDIAP-Los Santos, Panamá.

Graziele Dutra Stumm, María Muñoz Arbeláez, & Geovanna Tafurt-García. (2022). Impacto de *Azadirachta indica* sobre la población de insectos en un cultivo experimental de arroz. *Acta Agronómica*, 71(4), 423–430. <https://www.redalyc.org/journal/1699/169977729012/html/>

Isman, M. B. (2006). Insecticidas botánicos, disuasivos y repelentes en la agricultura moderna y un mundo cada vez más regulado. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151146

Kraus, W. (2012). *Azadiractina y otros limonoides de especies de \*Melia: Efectos sobre los insectos*. En Jacobson, M. (Ed.), *Insecticides of Plant Origin* (pp. 171-188). Boca Raton, FL: CRC Press. ISBN: 9781351078998

Miller, J. R., & Strickler, K. (2014). Interacciones insecto-planta: Mecanismos e implicaciones. En *Advances in Applied Insect Physiology*

(Vol. 27, pp. 101-118). Academic Press. doi:10.1016/S0065-2806(08)60058-0

Mordue (Luntz), A. J., & Blackwell, A. (2014). Azadiractina: una actualización. *Journal of Insect Physiology*, 40(11), 1073-1076. doi:10.1016/0022-1910(94)00123-3

Mordue (Luntz), A. J., & Blackwell, A. (2017). Azadiractina: una actualización.\* En *Pesticides in Agriculture and the Environment* (pp. 109-124). Marcel Dekker, Inc. ISBN: 9781351442516

Mordue (Luntz), A. J., & Nisbet, A. J. (2000). Azadiractina del árbol de neem *Azadirachta indica*: su acción contra los insectos. *Anales de la Sociedad Entomológica de Brasil*, 29(4), 615-632. doi:10.1590/S0304-86502000000400004

Schmutterer, H. (2015). El árbol de neem, *Azadirachta indica* A. Juss., y otras plantas meliáceas: fuentes de productos naturales únicos para el manejo integrado de plagas, medicina, industria y otros fines. Weinheim: VCH. ISBN: 9783527617720

Schmutterer, H. (2018). Propiedades y potencial de los pesticidas naturales del árbol de neem, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, 35(1), 271-297. doi:10.1146/annurev.en.35.010190.001415

Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2012). \*Introducción a la Cromatografía Líquida Moderna (3ra ed.). Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. ISBN: 9780470167540

