

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua

UNAN-Managua

Recinto Universitario “Rubén Darío”

Facultad de Ciencias e Ingenierías

Departamento de Biología

Departamento de Química



Monografía para optar a los Títulos de licenciados en Biología con Mención en
Administración de Recursos Naturales y Química Industrial.

**Composición proximal y potencial insecticida de la semilla de
Annona muricata L. para el control de *Spodoptera frugiperda*
J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) 2015-2016.**

Autores:

Bra. María Ruth Guerra Blandino
Br. José Ramón Poveda Suárez

Tutor:

Lic. Juan Carlos Ruiz Urbina

Asesores:

PhD. Katia Montenegro
Lic. Samantha Miranda Calero
Ing. Ena Mabel Rivers Carcache
Lic. Josué Pérez Soto

Managua, Noviembre de 2016.

Dedicatoria

A mi familia y amigos, quienes siempre están allí para mí y sobrellevaron todo este proceso conmigo.

A Coli y Pancake, por ser fuente de inspiración, constancia y amor en mi vida.

María Ruth Guerra Blandino.

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico principalmente a Dios porque él me ha dado la oportunidad de llegar hasta aquí, me ha dado vida y fuerza para poder alcanzar otra meta más a lo largo de mi vida, por su amor incondicional y su gran misericordia para con cada uno de nosotros a él sea dada toda gloria, honor y honra.

A mis padres por ser una parte fundamental en mi vida gracias por su apoyo y paciencia a lo largo de este camino, por su amor y dedicación, por enseñarme el valor de la vida y aprender a luchar por cumplir mis objetivos.

A mis hermanos Andrea, Luis, y Saúl por ser la fuente de inspiración para conseguir este logro que espero algún día pueda ser de utilidad para ustedes.

A Gabriela por su amor y compañía todos estos años y por todos los que vienen.

A mis tíos, primos y demás familiares, a mis amigos y a todas esas personas que de una u otra forma estuvieron presentes gracias por su ayuda, apoyo y consejos.

A todos gracias...

José Ramón Poveda Suarez.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia y amigos por todo el amor y apoyo que me han dado siempre, por estar cuando los necesito y acompañarme con gracia en esta etapa.

Gracias al Laboratorio de Biotecnología por darme la oportunidad de participar en el proyecto, brindándonos total acceso a los laboratorios y sus recursos, en especial a todo el personal que siempre nos apoyó durante la realización de los análisis y ante cualquier duda referente a los métodos.

Muchas gracias a Samantha Miranda Calero, Ena Rivers Carcache, Jorge Esquivel y a nuestro tutor Juan Carlos Ruiz Urbina por tomarse el tiempo de enseñarme todas las técnicas de laboratorio con mucha paciencia, por pasar más allá de las horas de oficina siempre que había un análisis en proceso, por escuchar nuestras propuestas y brindarnos toda la confianza desde el primer día, haciéndome sentir siempre integrada en el proceso.

A la Dra. Katia Montenegro por su minuciosa revisión del trabajo y por todas sus sugerencias en el enriquecimiento de información.

Gracias al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) por el cual la concepción de este proyecto fue concretada, en particular gracias a Henry Pedroza Chamorro quien se encargó de asegurar los elementos más importantes de la investigación: los frutos, las larvas y el maíz, sin importar la época del año o las distancias él hizo lo imposible constantemente dándonos una buena noticia ante cualquier necesidad.

Al profesor Josué Pérez Soto por quien aplique a la convocatoria de esta investigación en primer lugar, gracias por todo el tiempo que dedicó a sentarse conmigo para revisar el trabajo punto por punto las veces que fuera necesario, por toda la paciencia y el apoyo continuamente motivándome a seguir desde el principio hasta el final, muchas gracias profe.

También agradezco a Edwin Alvarado, Nohemí Carballo Castillo y Luis Moreno Salmerón por ayudarme a alimentar larvas, cortar maíz y acomodar frascos durante una semana, días que no fueron fáciles pero tampoco aburridos gracias a ustedes.

María Ruth Guerra Blandino.

Agradecimientos

Doy gracias primeramente a Dios quien ha sido desde el inicio el arquitecto de esta obra, por la vida que nos ha dado para poder alcanzar este logro por su amor y su bondad que sobrepasa nuestro entendimiento.

A mis padres por ser mis primeros educadores, por enseñarme el valor del esfuerzo y el trabajo duro, por inculcarme valores morales y buenos principios y por estar siempre presentes en cada etapa de mi vida.

A Gioconda por su amor, paciencia y sabios consejos aun en los momentos más difíciles, por ser como una segunda madre para mí y sobre todo por enseñarme a amar a Dios más que a cualquier cosa.

A mis hermanos que más que mi familia son la razón de seguir adelante, para quienes espero ser un buen ejemplo y son mi mayor orgullo.

A Gabriela por ser mi apoyo, por su cariño y paciencia en todo este proceso gracias cariño.

Al laboratorio de Biotecnología por abrir las puertas de su institución a un joven con hambre de conocimientos. En especial a Samantha Miranda, Jorge Esquivel, Ena Rivers, Maybis López y a nuestro tutor: Juan Carlos Ruiz, gracias por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años puesto que el aprendizaje es el mayor regalo que pueda ser otorgado a una persona.

También quiero agradecer al Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria(INTA) en especial a la Dra. Fátima Bolaños y a Henry Manuel Pedroza por el apoyo brindado por parte de tan honorable institución por permitirnos formar parte de este maravilloso proyecto. Gracias Henry por estar siempre a la altura ante cualquier situación y por estar al pendiente durante todo el proceso.

A mis amigos y colegas por formar parte de mi vida en todos estos años, en fin hay mucho porque agradecer y muchos a quienes agradecer y aunque quizás sus nombres no estén escritos entre estas líneas sé que siempre han estado presentes.

A todos Gracias...

José Ramón Poveda Suarez.

Resumen

Annona muricata L. es una especie tropical de interés por las propiedades tóxicas sobre ciertos insectos, que poseen algunas de sus partes (semillas, hojas, flor, etc.). En este trabajo se analizó la composición proximal y potencial insecticida de las semillas de guanábana sobre el gusano cogollero, un lepidóptero que amenaza los cultivos de maíz en el país. Las muestras de harina de semilla presentaron una composición proximal de: 4.29 % Humedad, 95.71 % Materia seca, 1.34 % Cenizas, 2.59% Nitrógeno, 16.19 % Proteína, 31.14 % Extracto etéreo, utilizando la metodología de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists). La obtención de los extractos utilizados en el bioensayo final fue por método Soxhlet para ambas partes de la semilla (endospermo y semilla completa); las redisoluciones fueron evaluadas con dos solventes distintos: etanol y agua desionizada. Las larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, fueron criadas en el laboratorio desde su eclosión hasta el tercer estadio larval cuando se les suministraron los extractos de guanábana a través de las hojas de maíz con que se alimentaban. Se establecieron 5 concentraciones entre 0.7 % -25 %, dentro de estos intervalos se calcularon las CL_{50} para cada tipo de extracto en el bioensayo con duración total de 48 horas, en endospermo la concentración mediana letal fue de 2.13 % mientras que para semilla completa fue 1.85 %, siendo este último el de mayor eficacia de acuerdo a las pruebas estadísticas obteniendo mortalidades hasta de 100% en las concentraciones más altas de 7 % a 25 %.

Contenido

Capítulo I: Aspectos Generales	2
1.1. Introducción.....	2
1.2. Antecedentes	4
1.3. Problema	5
1.4. Justificación.....	6
1.5. Objetivos	7
Capitulo II: Marco Teórico	8
2.1. Generalidades de <i>Annona muricata</i> L.	8
2.2. Ubicación taxonómica.....	8
2.3. Características Morfológicas	9
2.4. Distribución	9
2.5. Usos de la Guanábana	10
2.6. Toxicidad	11
2.6.1. Acetogeninas.....	11
2.7. Composición proximal	13
2.7.1. Cenizas.....	14
2.7.2. Contenido de humedad y materia seca	14
2.7.3. Extracto etéreo	14
2.7.4. Proteínas	14
2.8. <i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith.	15
2.8.1. Clasificación taxonómica del gusano cogollero	15
2.8.2. Ciclo de vida.....	15
2.9. Bioinsecticida	17
2.10. Concentración Letal 50% (CL ₅₀)	18

2.11. Bioensayo	19
2.12. Análisis estadísticos	20
2.12.1. Análisis de Varianza (ANOVA).....	20
2.12.2. Análisis de Kruskal-Wallis	20
2.12.3. Análisis Probit	21
Capítulo III: Hipótesis	22
Capítulo IV: Diseño metodológico	23
4.1. Tipo de estudio	23
4.2. Población y muestra	23
4.2.1. Población.....	23
4.2.2. Muestra.....	23
4.3. Variables	24
4.4. Materiales y métodos.....	24
4.4.1. Materiales para la recolecta de información	24
4.4.2. Diseño Experimental.....	25
4.4.3. Plan de tabulación y análisis	31
Capítulo V: Resultados y Discusión	32
5.1. Prueba de hipótesis	32
5.2. Resultados y discusión.....	33
5.2.1. Composición proximal.....	33
5.2.2. Extractos etanólicos de la harina de semilla de Guanábana	36
5.2.3. Concentración letal 50% (CL50) en extractos obtenidos	37
5.2.4. Eficacia de los extractos como larvicidas.	44
5.2.4.1. Prueba de Kruskal-Wallis.	45
Capítulo VI: Conclusiones	49

Capítulo VII: Recomendaciones	50
Bibliografía.....	51
Anexos	58

Índice de Figuras

Figura 1: Acetogenina con actividad citotóxica _____	12
Figura 2. Porcentajes de parámetros proximales y desviación estándar relativa en semilla de Guanábana. _____	33
Figura 3: Porcentajes de humedad y materia seca en guanábana. _____	34
Figura 4. Concentración letal media (CL ₅₀) del extracto de endospermo _____	38
Figura 5: CL ₅₀ en los tiempos de exposición, Endospermo _____	39
Figura 6: Mortalidad tiempos de exposición vs. Concentración, Endospermo ____	40
Figura 7. Concentración letal media (CL ₅₀) del extracto de semilla completa. ____	41
Figura 8. CL ₅₀ en los tiempos de exposición, Semilla completa _____	42
Figura 9. Mortalidad tiempos de exposición vs. Concentración, Semilla completa	43
Figura 10. Actividad anti-alimentaria. _____	44
Figura 11. Prueba de Kruskal-Wallis _____	45
Figura 12. Análisis de varianza de la mortalidad en diferentes concentraciones _	46
Figura 13: Ciclo de Vida de Spodoptera frugiperda J. E. Smith. _____	60
Figura 14: Estadios larvales de Spodoptera frugiperda J. E. Smith. _____	60
Figura 15. Partes de la semilla utilizada en los extractos _____	62
Figura 16. Eclosiones de larvas _____	63
Figura 17. Primer estadio larval _____	63
Figura 18. Segundo estadio larval _____	64
Figura 19. Tercer estadio larval _____	64
Figura 20: Flujograma de extracción Soxhlet _____	67
Figura 21: Flujograma de extracción por Reposo _____	68
Figura 22: Flujograma de extracción por Baño María _____	68
Figura 23. Caracterización de los frutos y obtención de las semillas _____	78
Figura 24. Separación de las semillas _____	79
Figura 25. Análisis de Cenizas _____	80
Figura 26. Análisis de Humedad y Materia Seca _____	81
Figura 27. Análisis de Extracto Etéreo _____	82
Figura 28. Análisis de Proteínas, Digestión _____	83
Figura 29. Análisis de Proteínas, Destilación y Titulación _____	84

Figura 30. Extractos _____	85
Figura 31. Mantenimiento de larvas _____	86
Figura 32. Preparación del bioensayo _____	87
Figura 33. Bioensayo _____	88

Índice de Tablas

Tabla 1: Ubicación taxonómica de <i>Annona muricata</i> L. _____	8
Tabla 2: Estudio fitoquímico de la <i>Annona muricata</i> L. _____	13
Tabla 3: Ubicación taxonómica de <i>Spodoptera frugiperda</i> J. E Smith _____	15
Tabla 4: Esquema de Variables _____	24
Tabla 5: Código de los análisis proximales por la AOAC _____	27
Tabla 6. Comparación de la composición proximal de semillas de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.) en diferentes países. _____	35
Tabla 7: Controles de calidad de parámetros proximales en harina de semilla de Guanábana. _____	36
Tabla 8: Porcentajes de recobro para extracto de la semilla de Guanábana. _____	37

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Porcentaje de humedad _____	69
Ecuación 2. Porcentaje de sólidos _____	70
Ecuación 3. Porcentaje de Cenizas _____	71
Ecuación 4. Porcentaje de Grasas _____	73
Ecuación 5. Porcentaje de Nitrógeno _____	75
Ecuación 6: Factor de conversión a porcentaje de Proteínas _____	75
Ecuación 7. Fórmula para soluciones y diluciones _____	76

Capítulo I: Aspectos Generales

1.1. Introducción

Nicaragua es un país eminentemente agrícola con más de 8320 km² de suelos cultivables, de los cuales el 56% se dedica a la producción de cereales. El maíz es probablemente el cereal de más importancia en el país ya que forma parte esencial de nuestra dieta siendo utilizado para la elaboración de tortillas, productos alimenticios procesados (rosquillas, reposterías, dulces, bebidas) y concentrados o piensos para animales (Bornemann *et al.*, 2012).

La producción del maíz en el país se da principalmente en la región del pacífico, donde el cultivo se ve afectado por diversas plagas como: chicharrita del maíz (*Dalbulus maidis* De Long) y escarabajo del maíz (*Helicoverpa zea* Boddie) (Jiménez & Rodríguez, 2014). Entre estas se distingue el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith), un insecto lepidóptero que en su etapa larval puede devastar una plantación completa y una vez que la fuente de alimento se agota se moverá a la fuente más próxima en la que la oruga no parará de alimentarse hasta completar su desarrollo lo que la hace una plaga persistente.

Usualmente esta plaga es tratada con insecticidas sintéticos como el Counter 10% G, Lorsban 4 E.C y piretroides como la Cipermetrina combinada con Diazinon (Espinoza *et al.*, 1999; INTA, 2010), que provocan efectos agudos a corto plazo, pero pueden ser también perjudiciales a largo plazo. Además, estos plaguicidas no solo afectan a la plaga objetivo, sino que pueden exterminar también a otros organismos no perjudiciales para los cultivos.

Para reducir los impactos negativos en la salud y el ambiente ha surgido la necesidad de buscar alternativas más ecológicas y sustentables como desarrollar biocidas en base a plantas que provocan efectos insecticidas sobre una amplia gama de insectos en varias etapas de su desarrollo.

Annonaceae es una gran familia de plantas (130 géneros tienen 2300 especies) de amplia distribución en las regiones tropicales de África, Centro y Sur América, Asia y Australia. Esta familia ha recibido mucha atención en el ámbito fitoquímico y farmacológico debido al descubrimiento de las acetogeninas, una clase de compuestos naturales con gran variedad de propiedades biológicas, presentando al menos 29 especies cuyas propiedades se distinguen por ser insecticidas y parasiticidas.

La especie *Annonamuricata*L., además de poseer importancia alimenticia e industrial, ha generado un gran interés debido a los compuestos activos que se encuentran en la corteza, raíz y semillas del árbol, ya que estos metabolitos tienen reportada actividad bioinsecticida. Los extractos crudos de acetogeninas y alcaloides presentes en las semillas pueden ser utilizados como plaguicidas económicos, efectivos y no contaminantes del medio ambiente.

El presente estudio pretende brindar una alternativa a escala de laboratorio para la protección de cultivos y el aumento de la productividad, mejorando al mismo tiempo la calidad de vida de los productores disminuyendo el riesgo de adquirir enfermedades mediante la manipulación o sobre exposición a plaguicidas de origen sintético, estableciendo pruebas de toxicidad (bioensayos) que demuestren el potencial insecticida de la guanábana y determinando la composición proximal de la misma para exponer su aprovechamiento como materia prima no solo de insecticidas orgánicos sino también como piensos para animales debido a su valor nutricional.

1.2. Antecedentes

La especie *Annona muricata* L. es conocida popularmente por el sabor de su fruta y el consumo de ella, sin embargo, no solo el fruto del árbol aprovechable ya que las hojas, semillas y corteza también poseen propiedades que pueden resultar provechosas en las industrias farmacológicas y nutricional suplementaria, lo que ha generado interés investigativo en determinar su composición química.

Entre esas pesquisas destaca el estudio realizado por Kimbonguila *et al.*, (2010) que aporta información sobre la composición proximal y otras propiedades físico-químicas (Calorimetría, viscosidad y ácidos grasos) de la semilla y aceite de guanábana, proponiendo el uso del mismo para la industria. Además se encuentra también el estudio de Vitet *et al.*, (2014) sobre la composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana, siendo las semillas las que presentaron los contenidos más altos de proteínas y grasas.

También existen reportes de estudios sobre la toxicidad provocada por la guanábana en organismos específicos y los principios activos que producen estos efectos. Entre estas investigaciones resaltan las de Bobadilla *et al.*, (2002, 2005) sobre el efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *A. muricata* sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* spp., así como la evaluación larvicida de suspensiones acuosas de diferentes partes de la planta sobre *Aedes aegypti*.

Leatemia e Isman (2004) también resaltan la importancia del uso de extractos de las anonáceas como defensa y actividad anti-alimentaria en plagas al provocar inhibición en el crecimiento larval de lepidópteros y enemigos naturales, tales como algunas especies de *Spodoptera* sp. Freitas *et al.*, (2014) reportaron el contenido de fenoles y flavonoides y los efectos letales de extractos metanólicos de tres especies de anonáceas en todo el ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).

1.3. Problema

En Nicaragua, diversas plagas atacan una variedad de cultivos, en los que se incluye el maíz, atacado por el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith), causando graves daños en la productividad mientras está en su etapa larval convirtiéndose en un problema severo para los productores de este rubro.

Los métodos usuales de control para esta plaga, se realizan con insecticidas químicos que perjudican al ambiente por su lenta degradación y su alta capacidad de acumulación lo que deteriora la calidad del suelo, así como la salud de los productores que se ven expuestos a altas concentraciones durante la aplicación de estos compuestos (Cipermetrina, Losrbán y Diazinon).

Dentro del marco de cooperación interinstitucional entre el INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria) y el Laboratorio de Biotecnología de la UNAN-Managua surge la presente investigación para evaluar el potencial insecticida de extractos acuosos de semillas de *Annona muricata* L. por medio de bioensayos de toxicidad aguda brindando una solución alternativa en el control del gusano cogollero a escala de laboratorio.

1.4. Justificación

Dentro del manejo integrado se debe tratar con plagas que ocasionan graves daños a parcelas de cultivos enteras, bajando el rendimiento de la producción, lo que nos lleva a buscar nuevas formas de manejo para que este cultivo pueda aprovecharse al máximo(Boeke *et al.*, 2004), evaluando biocidas de extractos vegetales, con el propósito de producir un efecto negativo sobre algún organismo por acumulación de toxinas(Leatemala & Isman, 2004).

La ventaja en el uso de extractos vegetales como fuentes de compuestos biocidas es que muestran diversas bioactividades por lo que su toxicidad puede ser mayor en relación a compuestos químicos puros, tienen mayor capacidad de biodegradación al ser moléculas naturales y podrían disminuir la necesidad del uso de insecticidas sintéticos (Bobadilla *et al.*, 2002).

Las especies del género *Annona*, además de controlar plagas agrícolas también son efectivas contra insectos de importancia para la salud humana como son los mosquitos del género *Anopheles* (Rodríguez, 2000), piojos *Pediculus humanus* Haeckel., pulga común *Pulex irritans* L. y chinches de cama *Cimex lectularius* L. (Vásquez, 1944). El efecto biocida, se produce gracias a un grupo de Fito constituyentes distribuidos amplia o restringidamente en todas las partes de las anonáceas (Ratnayake *et al.*, 1992), llamados Acetogeninas (Bobadilla *et al.*, 2005) con efecto anti-alimentario (Guadaño *et al.*, 2000) e incluso pueden superar en toxicidad a *Azadirachta indica* A. Juss. "Neem" (Rodríguez, 2000).

Esta investigación propone las propiedades tóxicas de los metabolitos presentes en las semillas de *Annona muricata* L., como agente controlador de larvas del tercer estadio del gusano cogollero del maíz, cuantificando el efecto insecticida de sus extractos acuosos mediante la determinación de la Concentración mediana letal del 50% durante un período de exposición de 48 horas. Adicionalmente se hace la caracterización proximal de las semillas de guanábana para determinar su composición bajo las condiciones edafoclimáticas imperantes en el país.

1.5. Objetivos

Objetivo general:

Determinar la composición proximal y el potencial insecticida de semillas de guanábana (*Annona muricata* L.) para el control del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith).

Objetivos específicos:

1. Determinar la composición proximal de harina de semilla de guanábana en términos de cenizas, humedad, materia seca, extracto etéreo y proteínas.
2. Obtener extractos etanólicos de la harina de semilla de endospermo y semilla completa por la técnica Soxhlet.
3. Calcular la concentración mediana letal a las 48 h (CL_{50}) de los extractos etanólicos a través de bioensayos con larvas en el tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith y comparar su eficacia en base a porcentajes de mortalidad.

Capítulo II: Marco Teórico

2.1. Generalidades de *Annonamuricata* L.

La guanábana normalmente se encuentra en huertos caseros y ocasionalmente da sombra a cultivos como el café en el Pacífico Sur de Nicaragua. Florece y fructifica constantemente según las zonas donde se cultive.

Cada árbol produce de 12-24 frutos promedio por año, cambiando con respecto a la variedad (ácido, sub-ácido y dulce). Las características más apetecibles de esta fruta son su aroma y sabor, además es fuente de vitamina B y C, calcio y fósforo.

Los cultivos de este árbol precisan de buen manejo y monitoreo constante, para prevenir enfermedades y plagas como: las larvas de broca del fruto (*Cerconota annonella* Sepp.) que perforan el fruto y lo arruinan; la broca del tronco (*Cratosomus bombina* Frabicius.) es un escarabajo cuyas larvas penetran en la madera, formando galerías. El perforador de la semilla (*Bephrata maculicollis* Cameron.) o avispa de la guanábana, es un heminóptero cuyas larvas hacen galerías hasta encontrar las semillas que consumirán dejando que los frutos se pasmen y momifiquen; la antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides* Penz.) es un hongo que ataca: hojas, ramas, flores y frutos, produciendo la podredumbre negra del fruto, especialmente en la época lluviosa (Cordero & Boshier, 2003).

2.2. Ubicación taxonómica

Tabla 1: Ubicación taxonómica de *Annona muricata* L.

Taxonomía	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Subclase	Magnoliidae
Supraorden	Magnolianaes
Orden	Magnoliales
Familia	Annonaceae
Género	<i>Annona</i>
Especie	<i>Annona muricata</i> L.

2.3. Características Morfológicas

Árboles pequeños, hasta 12 m de alto; ramas jóvenes cortamente ferrugíneo-seríceas, pronto glabrescentes.

Hojas oblongas a obovadas, 3.6–15.1 cm de largo y 2–5.2 cm de ancho, ápice obtuso a cortamente agudo, base cuneada a redondeada, cartáceas a subcoriáceas, glabras y lustrosas en el haz, cortamente seríceas hacia la base en el envés, pronto glabrescentes, con domacios en las axilas de los nervios laterales; pecíolos 0.3–0.6 cm de largo, ferrugíneo-seríceos.

Flores solitarias, terminales, opuestas a las axilas o caulifloras, pedicelos 1.1–2.1 cm de largo, ferrugíneo-seríceos, con brácteas ovadas; sépalos triangular-ovados, 0.6 cm de largo y de ancho, reflexos, ápice agudo, escasamente puberulentos; pétalos exteriores ampliamente ovados, hasta 3.5 cm de largo y 2.5 cm de ancho, ápice largamente acuminado, reflexos en la antesis, carnosos, amarillos, pétalos internos imbricados, elípticos a redondeados, algo más pequeños que los exteriores, ápice redondeado, en la base adelgazados en forma de uña, amarillos, con cuerpos alimenticios cremas y dispuestos en la parte interna a lo largo de los márgenes hacia la base; estambres 4.5 mm de largo, filamentos 1 mm de largo, conectivos ensanchados, discoides, menudamente papilados, receptáculo setáceo en las bases de los estambres; ovarios 3 mm de largo, furvescentes a ferrugíneo-estrigosos, estigmas capitados.

Fruto ovoide a oblongo-ovoide, hasta 30 cm de largo y 15 cm de diámetro, equinado, espinas curvadas. (Stevens *et al.*, 2001)

2.4. Distribución

La guanábana posiblemente es originaria de Sudamérica aunque se encuentra ampliamente difundida por toda América tropical y el Caribe. Se distribuye en las tierras bajas a una altitud de 0 a 700 msnm (Cordero & Boshier, 2003). Extensamente sembrada y naturalizada en los trópicos de América y de África

Occidental. Se extiende a lo largo de las Antillas excepto en las Bahamas y desde México hasta Brasil (Orwaet *al.*, 2009).

2.5. Usos de la Guanábana

La guanábana es una planta con características peculiares que gracias a su amplia distribución posee un aprovechamiento variado.

- **Aromatizante:** La fruta y las flores son utilizadas por su fuerte aroma en aceites esenciales aromáticos.
- **Madera:** Es suave, ligera, de albura blanquecina y duramen marrón, no duradera por lo que es raramente usada para aserrío pero si ha sido usada para yugos de bueyes, implementos de trabajo y mangos para herramientas; además es aprovechada en leña, como combustible (Cordero & Boshier, 2003; Orwaet *al.*, 2009).
- **Comestible:** La pulpa del fruto es muy jugosa y se puede comer directamente, pero mayormente se usa para confeccionar bebidas, helados, conservas, jaleas, y bebidas alcohólicas. El fruto verde se cocina como verdura en Filipinas (Cordero & Boshier, 2003) mientras que las más maduras y firmes se usan para confitería, para hacer dulces de delicado sabor y aroma (Orwaet *al.*, 2009).
- **Medicinal:** Las hojas pulverizadas son aplicadas en abscesos y protuberancias o como remedios para la distensión y la dispepsia, para la piel escamosa y otras afecciones dermatológicas, para reumatismo, tos y resfriados, en cocciones para aliviar la fatiga y alicientes del tracto estomacal, al igual que como un parasiticida (Blessing *et al.*, 2010).

El masaje con las hojas es bueno para los nervios, mientras que la cocción de hojas más corteza es buena para los ataques de ansiedad. Los tés de

flores o bulbos de flores, mezclados con miel son usados contra la gripe, dolores de pecho y desordenes nerviosos. Y la corteza y frutas verdes, que contienen taninos tratan la diarrea y disentería. La corteza verde se frota en heridas como coagulante. (Orwaet *al.*, 2009). Mientras que el tallo y las hojas demostraron la citotoxicidad sobre células cancerígenas (Arroyoet *al.*, 2005).

- **Veneno:** Todas las partes del árbol poseen propiedades insecticidas debido a las acetogeninas. El polvo molido de hojas secas y la savia de las hojas frescas es un veneno útil para destruir alimañas, mientras que el polvo y aceite de las semillas se utiliza para matar piojos, chinches, polillas y cucarachas (Cordero & Boshier, 2003; Alaliet *al.*, 1998).

Todas las partes de la planta por sus propiedades insecticidas pueden ser usadas en la pesca artesanal intoxicando o destruyendo las agallas de los peces matándoles por hipoxia (Orwaet *al.*, 2009).

2.6. Toxicidad

La toxicidad atribuida a *Annona muricata* L. y a las anonáceas en general depende en gran parte de la concentración de ciertos metabolitos secundarios llamados acetogeninas, que posee el árbol, en relación a la parte del mismo que se vaya a emplear en los ensayos de toxicidad.

2.6.1. Acetogeninas

La Guanábana es una de las anonáceas más estudiadas, se le han aislado metabolitos como alcaloides, ácidos grasos, amidas y acetogeninas, tanto de la corteza, como en las semillas, el tallo y las hojas (Tabla 2). Siendo las acetogeninas los compuestos de interés por su comprobada actividad biológica.

Las acetogeninas poseen un grupo γ -lactónico α,β -insaturado o saturado y uno, dos, o tres anillos tetrahidrofuránicos sobre una larga cadena alquílica, son

sustancias que poseen importantes propiedades biológicas: antitumoral, inmunosupresora, antimicrobiana, actividad citotóxica y actividad bioplaguicida (Flórez Londoño & Martínez Muñoz, 2010).

En la actividad citotóxica, se ha demostrado que las acetogeninas son inhibidores de la coenzima NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) que transporta la energía necesaria para la formación de ATP (Adenosín Trifosfato) durante la reacción redox, evitando por consiguiente la formación de ATP en la respiración mitocondrial e induciendo en las células una muerte programada (apoptosis), se ha demostrado que las acetogeninas buscan selectivamente las células cancerígenas para atacarlas y las células normales permanecen intactas (Flórez Londoño & Martínez Muñoz, 2010).

Dentro de la actividad bioplaguicida de las acetogeninas, algunas han mostrado fuerte actividad ovicida y larvicida. Si el anillo γ -lactónico α,β -insaturado está presente, los resultados de actividad bioplaguicida son mejores que aquellos obtenidos con acetogeninas saturadas. Sin embargo, mezclas de éstos compuestos encontrados en extractos crudos, provocan efectos sinérgicos potenciando la aplicación de las acetogeninas como bioplaguicidas biodegradables (Flórez Londoño & Martínez Muñoz, 2010).

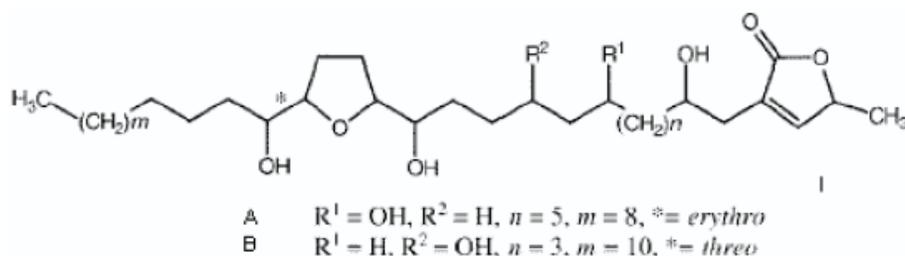


Figura 1: Acetogenina con actividad citotóxica
Fuente: Flórez Londoño & Martínez Muñoz, 2010.

La toxicidad exhibida por la exposición de insectos a las acetogeninas, incluye una disminución en la movilidad y crecimiento antes de la muerte. Tales síntomas son

normalmente atribuidos a los bajos niveles de ATP causados por los inhibidores respiratorios (Flórez Londoño & Martínez Muñoz, 2010).

Tabla 2: Estudio Fitoquímico de la *Annona muricata* L. (Flórez Londoño & Martínez Muñoz, 2010)

Nombre del compuesto	Tipo del compuesto	Fuente	Actividad biológica
Cis-annonacina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomuricina E	Acetogenina	Hojas	Citotóxica
Cohibina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Ácido butanoico	Aceite	Semillas	-----
Javoricina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Motecristina	Precursor de Acetogenina	Raíz	-----
Cis-solamina	Acetogenina	Raíz	Citotóxica
Annopentocina	Acetogenina	Hojas	Citotóxica
Longicina	Acetogenina	Semillas	Citotóxica
Annomutacina	Acetogenina	Hojas	Citotóxica

2.7. Composición proximal

El sistema proximal para el análisis ordinario de los piensos se diseñó a mediados del siglo XIX en la estación experimental de Weende, en Alemania. Los análisis comprendidos dentro de este grupo, se aplican en primer lugar para conocer las propiedades de una materia prima como un control, obteniendo una clasificación muy amplia y con un nivel máximo de los componentes de alimentos. El sistema consiste en la determinación analítica de humedad, materia seca, grasas totales (extracto etéreo), las proteínas crudas (nitrógeno total) y cenizas en la muestra (FAO, Analisis Proximal, 2016)

2.7.1. Cenizas

La producción de cenizas por los vegetales incinerados se debe a la combustión de sustancias minerales que entran en la constitución de las plantas; contienen, en proporciones importantes, potasa, carbonatos y fosfatos de cal y de magnesio, sílice y óxidos de hierro y de manganeso, que son los que les dan su color. (De Toro y Gisbert, 1962).

2.7.2. Contenido de humedad y materia seca

La humedad es el agua que impregna a un cuerpo o que, vaporizada, se mezcla con el aire (Mentor, 1960). El contenido de humedad influye en la conserva de los alimentos ya que niveles superiores al 8% favorecen la presencia de insectos y arriba del 14% presentan riesgo de contaminación por hongos y bacterias (Cockerell *et al.*, 1971).

2.7.3. Extracto etéreo

Es el conjunto de sustancias de un alimento que se extraen con éter etílico (esteres de los ácidos grasos, fosfolípidos, lecitinas, esteroides, ceras, ácidos grasos libres). Los cuerpos grasos son sustancias neutras, de consistencia variable, sin olor ni sabor bien pronunciados, que arden con llama poco coloreada, produciendo un humo más o menos espeso. Según su grado de fusibilidad, pueden clasificarse las materias grasas en aceites, líquidos a temperatura ordinaria, y en mantecas, grasas y sebos, sólidos, blandos, que se derriten entre 25 y 30 grados, y en ceras, duras y quebradizas, que no se derriten sino a partir de 60 grados (De Toro y Gisbert, 1962).

2.7.4. Proteínas

Las proteínas son sustancias básicas para la vida, con altos porcentajes de nitrógeno, así como de oxígeno, hidrógeno y carbono. En la mayor parte de ellas existe azufre y en algunas fósforo y hierro. Las proteínas son sustancias complejas, formadas por la unión de ciertas sustancias más simples llamadas

aminoácidos, que los vegetales sintetizan a partir de los nitratos y las sales amoniacales en el suelo (Enciclopedia Britannica, 1962). Los seres humanos poseen 20 aminoácidos de los cuales nueve son esenciales para la nutrición humana y animal, ya que no son producidos por nuestros cuerpos por tanto deben ser obtenidos a través de los alimentos, principalmente de las carnes, sin embargo el contenido de proteínas de las plantas puede suplir la necesidad de estos aminoácidos al combinarse con otros vegetales que complementen la síntesis de proteínas con alto valor biológico (Campbell *et al.*, 2001)

2.8. *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith.

Esta especie de lepidóptero fue reportado por primera vez en el libro “La historia natural de los raros insectos lepidópteros de Georgia” del año 1797, que incluía la descripción de nuevas especies encontradas por el zoólogo inglés James Edward Smith.

2.8.1. Clasificación taxonómica del gusano cogollero

Tabla 3: Ubicación taxonómica de *Spodoptera frugiperda* J. E Smith

Taxonomía	
Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Lepidoptera
Suborden	Glossata
Infraorden	Heteroneura
Familia	Noctuidae
Subfamilia	Amphirynae
Genero	Spodoptera
Especie	<i>Spodoptera frugiperda</i> J.E. Smith.

2.8.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de este lepidóptero se completa en aproximadamente 30 días en clima tropical (Ver anexo 2).

Huevo:La forma del huevo es como un domo, plano en la base y se ensancha hacia arriba, mide alrededor de 0.4 mm en diámetro y 0.3 mm de altura. El número de huevos por masa varía considerablemente, pero suele oscilar entre 100 a 200, mientras que la producción total de huevos por hembra es de 1500 con un máximo de 2000.

Los huevos son depositados en una sola capa fija al follaje. La hembra también deposita una capa grisácea de escamas entre los huevecillos y encima de toda la masa de huevos para protegerlos del entorno, dejándolos con una apariencia peluda y mohosa. El tiempo de incubación es de 3 a 5 días (Capinera, 1999).

Larva: El gusano cogollero atraviesa 6 estadios larvales en alrededor de 14 días (Ver anexo 2) ocultándose durante el tiempo más brillante del día. En el primer estadio las larvas son de color verdoso con la cabeza negra, esta cambia de negro a anaranjado en el segundo estadio. En el tercer estadio, la superficie dorsal del cuerpo se vuelve de color marrón, y las líneas blancas laterales comienzan a formarse. Del cuarto al sexto estadio la cabeza es de color marrón rojizo y el cuerpo de color marrón con líneas laterales y sub-dorsales blancas. La cara de la larva madura está marcada con una “Y” invertida.

Las protuberancias que se producen dorsalmente en el cuerpo por lo general son de color oscuro y tienen espinas, también puede presentarse una variación en el color en vez de marrón ser verde con protuberancias en colores claros en vez de oscuras.

Pupa:La pupación tiene lugar normalmente en el suelo, a una profundidad de 2 a 8 cm. La larva construye un capullo suelto, de forma ovalada, atando partículas de suelo con la seda. Si el suelo es demasiado duro, las larvas pueden tejer restos de hojas y otros materiales con la seda para formar un capullo en la superficie del suelo. La pupa es de color marrón rojizo, y la duración de la fase de pupa es de aproximadamente 8 a 9 días (Capinera, 1999).

Adulto: Las polillas tienen una envergadura de 3.2 a 4 cm. En la polilla macho, las alas anteriores generalmente son grises y marrones, con manchas blancas triangulares en la punta y centro del ala. Las alas anteriores de las hembras están menos marcadas, variando desde un color marrón grisáceo uniforme a un moteado de gris y marrón. El ala posterior es blanca-plateado iridiscente con un borde oscuro estrecho en ambos sexos.

Los adultos son nocturnos, y son más activos durante noches cálidas y húmedas. Después de un período pre-ovoposición de tres a cuatro días, la hembra normalmente deposita la mayoría de sus huevos durante los primeros 4 o 5 días de vida, pero algunas ovoposiciones ocurren hasta las 3 semanas. La duración de la vida adulta se estima en un promedio de unos 10 días, con un intervalo de aproximadamente 7 a 21 días (Capinera, 1999).

2.9. Bioinsecticida

Los bioinsecticidas son cualquier plaguicida de origen biológico, organismos vivos o sustancias sintetizadas por ellos, sean hongos, bacterias, virus y compuestos obtenidos de las plantas, que se utilizan directamente o extraídos mediante infusiones, extracciones u otros sistemas, sobre una plaga.

En agricultura ecológica los bioinsecticidas pueden suponer una herramienta valiosa para complementar la rica variedad de prácticas culturales que eviten los daños en las cosechas. Pueden constituir una de las claves del futuro, ya que cuentan con muchas ventajas sobre los compuestos químicos:

- No producen residuos peligrosos.
- Reduce significativamente el impacto sobre las especies que no son objeto de los tratamientos.
- Cuando son producidos localmente pueden ser más económicos que los insecticidas químicos.
- A largo plazo también pueden ser más efectivos que los plaguicidas sintéticos (Klocke, 1987).

A pesar de todos los beneficios que pueden brindar los bioinsecticidas tanto al medio ambiente como a las cosechas es importante tomar en cuenta que a menudo, su velocidad de actuación es lenta por lo que en casos de plagas cuyos daños pueden ser graves en muy poco tiempo, pueden no ser muy efectivos de usar; al igual que su efectividad es variable debido a la influencia de diversos aspectos bióticos y abióticos puesto que los bioinsecticidas son organismos vivos o procedentes de los mismos por lo que están sujetos a las condiciones ecológicas. (Regnault-Roger *et al.*, 2004)

2.10. Concentración Letal 50% (CL₅₀)

Esta prueba fue creada en 1927 por el farmacólogo británico John William Trevan; la concentración letal 50% (CL₅₀) es aquella concentración de insecticida, que al ser administrada por cualquier vía de ingreso (por ingestión o contacto), en un período de tiempo definido mata al 50% de la población de organismos objetivo (Silva Aguayo, s.f).

Cuando se realiza un experimento para conocer la toxicidad de un insecticida sobre un determinado insecto puede ocurrir que se use una metodología directa o indirecta, la forma directa se refiere a aplicar un volumen conocido de una sustancia con concentración conocida sobre el insecto (directamente) lo que se conoce como dosis y corresponde a la Dosis letal (DL₅₀).

La forma indirecta trata de la saturación de un medio en una sustancia de concentración conocida (sumergir una hoja en el insecticida, por ejemplo) y posteriormente colocar los insectos en el medio sin certeza de cuanto volumen está en contacto con cada organismo, ya esto se le conoce como dosificación, al hablar de dosificación se habla de Concentración letal (CL₅₀) y es expresada en la unidad que la solución es evaluada (ppm, w/v%, g/kg).

Aunque la veracidad de la prueba es demostrada al matar la mitad de los organismos de prueba, los resultados siempre están en dependencia del

metabolismo y las características genéticas del animal (el sujeto de prueba utilizado), ya que unas son más resistentes que otras.

También dependen de los factores ambientales y el modo de administración, es decir, algunas sustancias resultan menos tóxicas cuando son administradas oralmente que cuando son administradas de forma intravenosa, por esta razón se especifica la forma en que la sustancia fue aplicada. Todos estos factores resultan limitantes a la hora de realizar la prueba (Walker *et al.*, 2012).

La determinación estadística de la CL_{50} suele realizarse con el 95% de intervalo de confianza y utilizando el conteo de análisis indagados a las horas dispuestas después de realizada la prueba experimental.

Se debe tener en cuenta que no se puede evaluar una sola dosis o concentración sino que debe probarse un grupo de ellas en forma de progresión aritmética.

2.11. Bioensayo

Un bioensayo es una investigación que tiene por objetivo evaluar las propiedades de un compuesto químico u orgánico en base a la respuesta que provoca en un ser vivo.

Este tipo de prueba puede ser directa: para cada sustancia de una muestra de dosis umbral, \log (dosis umbral); o indirecta cuando se considera para cada sustancia una curva dosis/respuesta, es decir, una función que refleje la respuesta obtenida para la aplicación de las diferentes dosis de sustancia.

Las respuestas del bioensayo son una medida del resultado de la aplicación de la sustancia en determinadas dosis o concentraciones. Las respuestas pueden ser cuantitativas cuando se mide en cada individuo una variante cuantitativa discreta o continua; o respuestas de porcentaje: para cada nivel de dosis se mide el porcentaje de individuos que presentan una respuesta determinada.

2.12. Análisis estadísticos

2.12.1. Análisis de Varianza (ANOVA)

El análisis de varianza también conocido como ANOVA es una de las herramientas más utilizadas en el campo de las ciencias biológicas para probar o rechazar hipótesis referidas a parámetros de posición de dos o más poblaciones de estudio (Di Rienzo *et al.*, 2005). Se realizó comparaciones de los intervalos de concentración utilizados en el bioensayo, usando pruebas de ANOVA, para los cuales se analizaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza desde el programa InfoStat (Balzarini *et al.*, 2008; Di Rienzo *et al.*, 2011), a posteriori se realizó comparaciones de Fisher que permitieron observar cuales grupos presentan diferencias significativas.

2.12.2. Análisis de Kruskal-Wallis

El análisis de Kruskal-Wallis es un procedimiento de varianza (ANOVA) para comparar las medias de k poblaciones, como una técnica no paramétrica para probar si las poblaciones difieren en localización. Al igual que otras técnicas no paramétricas el procedimiento de Kruskal-Wallis no requiere suposiciones acerca de la forma real de las distribuciones de probabilidad (Wackerly *et al.*, 2010).

La prueba de Kruskal-Wallis, también llamada prueba H de Kruskal-Wallis, es una generalización de la prueba de la suma de rangos para el caso de $k > 2$ muestras. Se utiliza para probar la hipótesis nula H_0 de que k muestras independientes provienen de poblaciones idénticas. Presentada en 1952 por W. H. Kruskal y W. A. Wallis, la prueba constituye un procedimiento no paramétrico para probar la igualdad de las medias, en el análisis de varianza de un factor, cuando el experimentador desea evitar la suposición de que las muestras se seleccionaron de poblaciones normales (Walpole *et al.*, 2007).

2.12.3. Análisis Probit

El análisis de Regresión Probit es un algoritmo para datos no categorizados, la respuesta binaria es el resultado clásico en estudios de tolerancia. Ejemplos típicos son los estudios en los que se denomina “dosis-respuesta” como el utilizado para determinar la dosis letal 50 de un biocida. Si un individuo muere cuando es desafiado con una dosis $x > T$, se dice que el individuo tiene una tolerancia T . La tolerancia varía entre individuos y puede considerarse una variable aleatoria y $F(t) = P(T < t)$. Si $F()$ es la función de distribución normal estándar acumulada. El modelo el método apropiado para analizar estos ensayos es ajustando un modelo probit (Di Rienzo J., 2010).

Capítulo III: Hipótesis

H₀:

La toxicidad de los extractos etanólicos de endospermo y semilla completa de *Annona muricata* L. no presentan diferencias significativas sobre la mortalidad de las larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith

(H₀: $\mu = \mu_0$)

H_a:

La toxicidad de los extractos etanólicos de endospermo y semilla completa de *Annona muricata* L. presentan diferencias significativas sobre la mortalidad de las larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith.

(H_a: $\mu \neq \mu_0$)

Capítulo IV: Diseño metodológico

4.1. Tipo de estudio

La investigación es de tipo experimental ya que hay manipulación intencional de una o más variables independientes, se mide el efecto que la variable independiente tiene sobre la variable dependiente y el control o la validez interna de la situación experimental (Hernández Sampieri *et al.*, 2014).

4.2. Población y muestra

4.2.1. Población

Annona muricata L.: Treinta frutas de guanábana compradas en mercados de Masaya y Carazo.

Spodoptera frugiperda J. E. Smith.: Diez masas de huevos de aproximadamente 250 huevecillos cada una, equivalentes a 2500 eclosiones. Debido a la competencia por el alimento y el canibalismo entre larvas la población se redujo a aproximadamente a 2000 larvas que fueron criadas en el laboratorio para ser usadas en los bioensayos o pruebas de toxicidad.

4.2.2. Muestra

Annona muricata L.: 1386 semillas extraídas de las 30 frutas de guanábana.

Spodoptera frugiperda J. E. Smith.: 390 larvas divididas en cinco concentraciones para cada tipo de extracto (Endospermo y Semilla completa) más tres grupos de control, es decir, 150 larvas entre las 5 concentraciones del extracto de endospermo, 150 larvas entre las 5 concentraciones del extracto de semilla completa más 90 larvas de los tres controles, dejando un total de 390 larvas ocupadas en el estudio.

4.3. Variables

Tabla 4: Esquema de Variables

Variable	Indicador	Clasificación de la variable	Tipo de variable.
Composición proximal	Porcentajes de proteínas, cenizas, extracto etéreo, humedad y materia seca	Cuantitativa	Independiente
Extractos etanólicos	Endospermo y Semilla entera	Cuantitativa	Independiente
Letalidad	% de mortalidad de individuos CL50 48 h	Cualitativa Cuantitativa	Dependiente

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Materiales para la recolecta de información

Reactivos: Los compuestos necesarios para obtener los extractos y realizar los análisis químicos proximales dentro de la fase de laboratorio (Ver anexo 11).

Equipos de laboratorio: Son los equipos empleados para ejecutar todos los métodos de análisis químicos en el laboratorio (Ver anexo 11).

Cristalería: Material del laboratorio en que se realizaron las diluciones, los análisis, reconcentraciones y soluciones químicas (Ver anexo 11).

Ficha de campo: Sirve para recolectar información sobre la población a investigar anotando los hechos significativos

Observación *in situ*: La observación es quizás el primer elemento dentro del método científico que permite indagar sobre los enunciados empíricos (Bunge, 1975).

Software InfoStat: Se usa para la tabulación y análisis de los datos cuantitativos a través de los Análisis Probit, ANOVA yKruskal-Wallis.

4.4.2. Diseño Experimental

4.4.2.1. Semillas de *Annona muricata* L.

A los 30 frutos de guanábana se les caracterizó en términos morfológicos: longitud, diámetro y peso, así como características anatómicas: cáscara, pulpa y semillas, llenando un formulario de marcadores internacionales establecidos por Bioversity International y CHERLA (2008) adaptados para la especie (Ver anexo3), todo esto con el fin de registrar a cada fruta individualmente y adicionalmente se tomó una fotografía de cada fruto.

Las semillas se extrajeron manualmente, se caracterizaron en el mismo formato, incluyendo tamaño, color, peso individual y peso general, se secaron a temperatura ambiente durante 7 días y en horno de convección a 40°C durante 24 horas.

La mitad de semillas se separó en Endospermo, dejando la otra mitad en Semillas Enteras (Ver anexo 4) para obtener así dos tipos de extractos, en función de descubrir que parte de la semilla resultabamás efectiva como bioinsecticida. Posteriormente se homogenizaron las muestras en un molino con tamaño de poro de 0.5 mm. Las harinas obtenidas se almacenaron en recipientes herméticos a 4°C (Ver anexo 12).

4.4.2.2. Larvas de *Spodoptera frugiperda*J. E. Smith

Las masas de huevo del gusano cogollero fueron obtenidas en el Laboratorio de Entomología Nacional de UNAN-León, se mantuvieron en magentas, fueron expuestas a fotoperíodos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con un 60% de humedad relativa las 24 horas y a temperatura de 26°C ± 3°C de variación aceptable.

Durante el primer estadio larval las orugas se mantuvieron bajo las mismas condiciones, al alcanzar el segundo estadio larval se trasladaron a tubos de ensayo colocando 1 larva por tubo, hasta el tercer estadio larval, preciso para el bioensayo, cuando se cambiaron a frascos de vidrio. Las larvas se alimentaron con pequeños rectángulos foliares de maíz, reemplazando el alimento cada 24 horas y limpiando los recipientes, para mayor control del alimento todo el proceso fue registrado en tablas de alimentación (Ver anexo 6).

4.4.2.3. Extracciones por Método Soxhlet

Para realizar los extractos las harinas se concentraron por método Soxhlet. Primero se pesaron 15-25g de harina de semilla de guanábana por duplicado, se colocaron en un dedal de hemicelulosa dentro del equipo Soxhlet y se adicionó el solvente (etanol 96%), el tiempo de extracción fue de 16 horas debido a la naturaleza aceitosa de la semilla (Ver anexo 10).

Al finalizar los extractos se almacenaron en envases oscuros y se dejaron en reposo durante aproximadamente una semana a temperatura ambiente en un lugar limpio, seco y protegido de la luz directa del sol, hasta eliminar la mayor cantidad de solvente.

4.4.2.4. Composición proximal

Todas las muestras colectadas para los diferentes análisis fueron rotuladas con la información de campo pertinente según el formato de campo para la colecta de muestras antes de ser colocadas en termos con hielo para ser transportadas al Laboratorio de Biotecnología para su respectivo análisis.

Como parte del control interno del laboratorio las muestras se registraron en la bitácora de ingreso de muestras bajo códigos para su control y trazabilidad, posteriormente se procedió con el pre-tratamiento, caracterización del fruto y tratamiento previos a cada uno de los parámetros proximales.

Las técnicas utilizadas en el análisis químico proximal de las muestras de harina de semilla de *Annona muricata* L. son métodos oficiales de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), con algunas modificaciones para cada uno de los análisis, detallados a continuación de acuerdo a sus códigos en la AOAC:

Tabla 5: Código de los análisis proximales por la AOAC

Cenizas	Humedad	Extracto etéreo	Proteínas
AOAC 923.03	AOAC 925.1	AOAC 920.39	AOAC 2001.11

4.4.2.4.1. Determinación de cenizas

Se realizó mediante incineración directa en base al método oficial de la AOAC 923.03 empleando un horno tipo mufla. Es una determinación gravimétrica por diferencia de pesos después de una carbonización o incinerado a una temperatura de 550°C (Ver anexo 9 y 13).

4.4.2.4.2. Humedad y Materia seca

La determinación de humedad se realizó por medio del método de sólidos totales y humedad en harina 925.10 de la AOAC (2000), empleando un horno tipo mufla; consiste en una determinación gravimétrica por diferencia de pesos de la muestra antes y después de secarla a una temperatura constante de 130°C durante una hora. (Ver anexo 9 y 13)

4.4.2.4.3. Determinación de extracto etéreo

El método consiste en que el solvente (éter de petróleo) entra en contacto con una muestra por un tiempo de 16 horas. Se pesó 10 gramos de muestra en un dedal de hemicelulosa y se colocó en el equipo de extracción utilizando una fuente de calor programada a la temperatura de ebullición del solvente (38-54 °C).

El solvente se evapora, condensa y cae sobre la muestra (para solubilizar las grasas presentes), se acumula en el aparato de extracción y descarga. Una vez

que el equipo ha estado funcionando el tiempo específico para cada matriz, el solvente se recupera.

La segunda fase del método inicio con la destilación del solvente, eliminándolo del balón por evaporación, quedando el residuo lipídico extraído, el cual se determina por diferencia de peso entre la masa del balón que contiene el residuo y el balón vacío (Ver anexo 9 y 13).

4.4.2.4.4. Análisis de proteínas

Se mide utilizando el método de Kjeldahl (1883) que consta de tres etapas: Digestión, Destilación y Titulación, proceso en el cual se mide el nitrógeno orgánico total. En este método se digiere la materia orgánica con ácido sulfúrico concentrado caliente. Para elevar el punto de ebullición del ácido se le añade una «mezcla catalizadora», que normalmente contiene un agente catalítico (mercurio, cobre o selenio) junto con sulfato de potasio. Todo el nitrógeno orgánico se convierte en amoníaco, que se suele medir mediante titulación (Ver anexo 9 y 13).

4.4.2.5. Montaje del bioensayo

Siguiendo los lineamientos de ensayos entomológicos descritos por Roberson, *et al.* (2007) y Leatemala & Isman (2004) adaptándolos a las condiciones del laboratorio las larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith se mantuvieron en frascos a los que se les proporcionaron 3 rectángulos foliares de maíz previamente sumergidos en los extractos de semilla de *Annona muricata* L. A las larvas se les cambio alimento cada 24 horas, pero solo la primera porción de comida estuvo rociada con los extractos para evitar que se doblara la concentración al aplicar 2 veces el tratamiento en las hojas de maíz.

Se aplicaron cinco concentraciones diferentes (0.7%, 3%, 7%, 15%, 25%) de los extractos de *Annona muricata* L. en las hojas de maíz con que se alimentó a las larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, cada hoja fue rociada con 40 ml de extracto aproximadamente hasta el punto de escurrimiento, la mortalidad asociada

a cada concentración se registró cada 8 horas hasta un total de 48 horas después de la única aplicación; la CL50% se calculó con análisis Probit en base a las mortalidades de cada extracto (Ver anexo 15)

La efectividad se estipuló en función del rendimiento obtenido por cada uno de los extractos en base a la mortalidad de las larvas, realizando un ANOVA para encontrar la diferencia entre los índices de mortalidad de cada uno. Se consideró como la concentración más efectiva, aquella que en menor concentración elimine al 50% de los individuos o lo más cerca posible de la mitad.

4.4.2.5.1. Resultado de pruebas preliminares

Como parte de la metodología para la realización de pruebas de toxicidad (Walker *et al.*, 2012) se montaron dos ensayos preliminares con el fin de establecer el método de extracción más efectivo, los intervalos de concentraciones a aplicar, el mantenimiento de las larvas y el estadio que estas deben alcanzar para las pruebas.

Tomando en cuenta la experiencia establecida por Ascencio (2012), Barillas& Rivera, (2008) y Bobadilla *et al.*, (2002) en el primer bioensayo de prueba se analizaron y estandarizaron tres métodos de extracción diferentes: Soxhlet, Reposo y Baño María (calentamiento) (Ver anexo 8), utilizando como solventes etanol al 96 y 99 %. Este solvente fue seleccionado por su capacidad para extraer los compuestos de interés y por la toxicidad que presentan otros solventes reportados en bibliografías internacionales (Bobadilla *et al.*, 2002) (por ejemplo hexano, cloroformo, etc.).

Se realizaron extracciones con 25 g de harina de semilla completa, endospermo y testa. Las concentraciones dispuestas para el bioensayo fueron de 0.01 % hasta 0.25 %. El método de extracción más efectivo fue Soxhlet ya que presentó mortalidad durante el tiempo de exposición del bioensayo mientras que Baño María y Reposo no tuvieron los efectos esperados, a partir de esto el mejor

solvente fue etanol al 96% ya que las hojas de maíz se deshidrataban más rápido con etanol al 99% y las larvas no las comían, por lo tanto no ingerían el tóxico.

Las larvas utilizadas fueron colectadas de campo por lo que no se tenía control sobre el estadio larval ni el tamaño. Se mantuvieron en tubos de ensayo sin embargo muchas larvas murieron de estrés generado por la captura; el resto se trasladó a frascos de vidrio para aplicarles las concentraciones, las larvas de mayor tamaño aceleraban la fase de pupa como reacción a la exposición de los extractos, no ingerían hojas de maíz maduras solo las láminas foliares nuevas y rechazaban por completo las hojas deshidratadas por el etanol 99%. Para la prueba dos se optó por criar larvas en el laboratorio para mantener un estadio larval y tamaño homogéneo, y proporcionarles alimento fresco.

El propósito de la segunda prueba preliminar fue identificar la porción de la semilla con mayor potencial insecticida, así se extractaron independientemente muestras de: semilla, testa y endospermo. Se utilizó Soxhlet como método de extracción disminuyendo la cantidad de harina a 15 g y utilizando un volumen de 100 ml de etanol al 96%. La modificación en la cantidad de harina resultó en la reducción de la concentración madre obtenida (15 %).

Las concentraciones utilizadas para cada extracto fueron de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 5, 15 %, se disolvieron con agua destilada a 50°C manteniendo agitación constante a lo largo del proceso para evitar la deshidratación de las hojas. De igual manera los extractos se almacenaron en contenedores ámbar para evitar degradación por luz y se prepararon el mismo día de la aplicación para evitar precipitación o comportamiento bifásico.

Las larvas fueron criadas en laboratorio, en base a la bibliografía (Leatemala & Isman, 2004) se dispuso que alcanzaran el cuarto estadio para aplicarles la prueba, sin embargo debido a la duración del bioensayo las larvas alcanzaban el quinto estadio y algunas entraban en letargo antes de convertirse en pupa lo que afectaba los porcentajes de mortalidad, por esto para el bioensayo final se utilizaron larvas más jóvenes en el tercer estadio.

En toda la prueba se observaron diferencias notorias entre los extractos de las partes de semilla, donde endospermo y semilla completa ocasionaron mayor mortalidad larval de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, no obstante se resolvió aumentar el valor de las concentraciones para mejorar el índice de mortalidad. Por esa razón se realizó una prueba rápida con concentraciones de 5 % y 15 % para estimar un nuevo rango de concentraciones para el siguiente bioensayo.

En base a los datos obtenidos en las pruebas preliminares, para el bioensayo final solo se utilizó semilla completa y endospermo, para asegurar la correcta interpretación de las variables se evaluó cada concentración por triplicado usando el mismo método de extracción Soxhlet; las larvas fueron criadas en laboratorio hasta el tercer estadio larval cuando se les aplicaron las concentraciones.

4.4.3. Plan de tabulación y análisis

Para el análisis de datos se utilizaron los programas de Microsoft Excel el cual nos permitió obtener los porcentajes de mortalidad en la población de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith., a través de tablas dinámicas.

Para analizar si existe una diferencia entre las partes de las semillas utilizadas, las concentraciones de extractos aplicadas a las larvas y los tiempos de conteo, se usó el análisis de varianza a través del programa InfoStat (Balzarini *et al.*, 2008; Di Rienzo *et al.*, 2011) lo cual permitió probar la hipótesis referida a estos parámetros.

La localización numérica de la CL50% se determinó a través del análisis de regresión Probit que brindará una estimación de probabilidad sobre cuál es la concentración letal media en base a los porcentajes de mortalidad.

Capítulo V: Resultados y Discusión

5.1. Prueba de hipótesis

Dada la hipótesis:

H₀:

La toxicidad de los extractos etanólicos de endospermo y semilla completa de *Annona muricata* L. no presentan diferencias significativas sobre la mortalidad de las larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith

$$(H_0: \mu = \mu_0)$$

H_a:

La toxicidad de los extractos etanólicos de endospermo y semilla completa de *Annona muricata* L. presentan diferencias significativas sobre la mortalidad de las larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith.

$$(H_a: \mu \neq \mu_0)$$

Cuyos datos obtenidos con un diseño estadístico completamente aleatorio, se sometieron a pruebas de ANOVA respetando los supuestos de dicha prueba; los cuales con una ecuación de la muestra $\mu = \mu_0$, y un nivel de significancia de 0,05 de una prueba bilateral se concluye lo siguiente:

Se rechaza la hipótesis H₀. Por lo tanto, la toxicidad de los extractos de las semillas de *Annona muricata* L. presenta diferencia significativa en la mortalidad de las larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, con respecto a las concentraciones aplicadas en el bioensayo.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Composición proximal

Los resultados de los análisis de la composición proximal de la harina de semilla de guanábana se presentan en las Figs. 2 y 3 y Tabla 6.

El extracto etéreo (31.14 ± 0.56 %) fue el parámetro con mayor porcentaje dentro de la composición proximal de la semilla de guanábana seguido de las proteínas (16.19 ± 0.16 %), Nitrógeno total (2.59 ± 0.16 %) y Cenizas (1.34 ± 0.03 %). El porcentaje de materia seca y humedad determinados fue del 95.71 ± 0.02 % y 4.3 ± 0.02 %, respectivamente (Fig. 3).

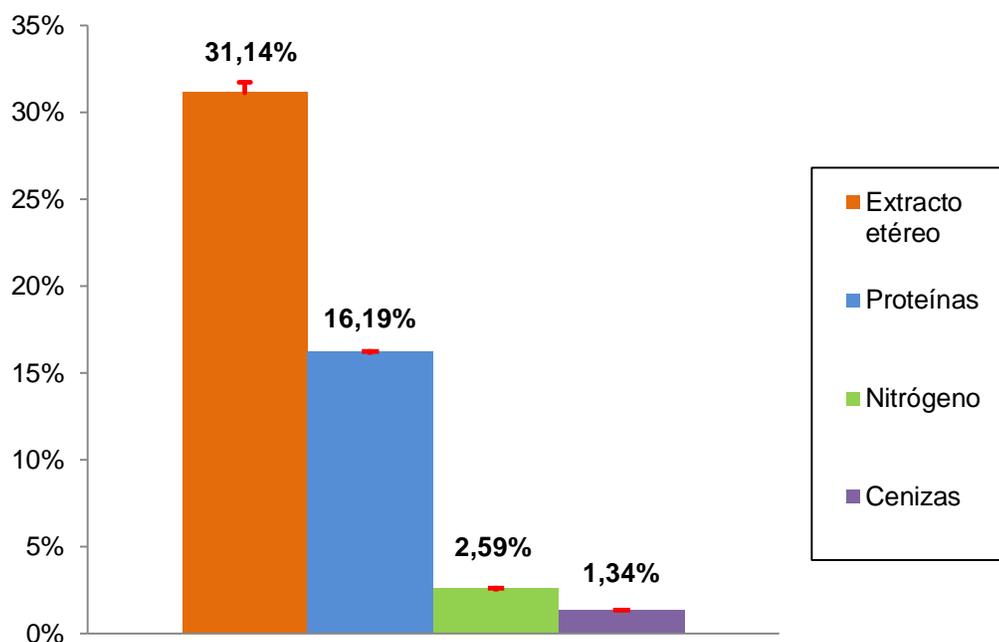


Figura 2. Porcentajes de composición de parámetros proximales y desviación estándar relativa en semilla de Guanábana.

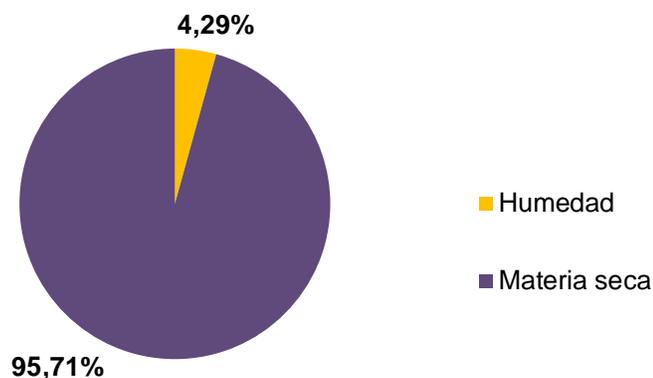


Figura 3: Porcentajes de humedad y materia seca en guanábana.

Al comparar estos resultados con los valores reportados en la literatura se puede observar que las semillas nicaragüenses presentan los valores de materia seca más altos y los de humedad más bajos con respecto a semillas del Congo (Kimbonguila *et al.* 2010) y Venezuela (Vit *et al.* 2014). Debido a esta composición (alto contenido de grasas y un bajo contenido de agua) se dificulta la homogenización de las soluciones especialmente en agua.

La semilla nacional también reporta mayor contenido de grasas totales (extracto etéreo) y proteínas que los obtenidos por Vit *et al.*, (2014) sin embargo las semillas de Venezuela tienen un mayor porcentaje en cuanto a cenizas se refiere (1.44%). Por otro lado al cotejar los resultados con los de las semillas de Kimbonguila *et al.*, (2010) este reporta valores mayores en cuanto a cenizas, y extracto etéreo (9.7%, y 40% respectivamente) un valor considerable en cuanto a la fracción lipídica lo que despierta el interés en cuanto a su uso en relación a calidad nutricional de los alimentos, y reporta un valor menor en proteínas (8.5%) con relación al obtenido durante los análisis (16.19%) (Tabla 6).

La variación en los contenidos proximales, a pesar de ser la misma especie, puede deberse a las diferencias en las condiciones climáticas y del suelo con respecto a cada país, aportando mayor o menor cantidad de nutrientes a la planta, también influye la variedad de guanábana que se utilizó para los análisis (Ácida, subácida o dulce), además evidencia el potencial que tiene la semilla como bio-insumo.

Tabla 6. Comparación de la composición proximal de semillas de guanábana (*Annona muricata* L.) en diferentes países.

Parámetros proximales (%)	Kimbonguila <i>et al.</i> , 2010 Congo	Vit <i>et al.</i> , 2014 Venezuela	Este estudio 2016 Nicaragua
Humedad	7.7	9.87	4.29± 0.03
Cenizas	9.7	1.44	1.34±0.03
Extracto etéreo	40	25.75	31.14± 0.56
Materia seca	92.3*	90.13*	95.71 ±0.03
Nitrógeno	1.36**	2.36**	2.59 ±0.16
Proteínas	8.5	14.77	16.19 ±0.16

Nota: *Valor recalculado por diferencia entre 100 % y el contenido de humedad;
 **valor recalculado a partir del contenido de proteínas.

5.2.1.1. Control de calidad de parámetros proximales

Como parte la realización de los análisis proximales se ejecuta conjuntamente el control de calidad de los análisis siguiendo los lineamientos de determinación analítica provistos en la AOAC (Association of Official Analytical Chemists) y el manual de uso, mantenimiento, calibración y control de equipos del laboratorio. Se incluyeron controles del procedimiento analítico tales como: réplicas de laboratorio, blancos de laboratorio, enriquecidos y agregados. Este grupo de controles sirve para indicar el grado de contaminación de los reactivos, materiales utilizados, y para medir la afectación general a la exactitud y precisión analítica debido a las operaciones de laboratorio.

La reproducibilidad de los resultados de la muestra, se evaluó por medio de réplicas de la muestra (en este caso realizadas por triplicado en cada uno de los análisis), para demostrar el grado de homogeneidad y representatividad de las muestras. Asegurando el estado óptimo de las muestras mediante cadenas de custodia durante todo el proceso, (el muestreo, la manipulación, el transporte, el almacenamiento, la preparación y el análisis). La precisión de nuestros resultados obtenidos se refleja a través de la desviación estándar relativa (RSD) (Tabla 7).

La exactitud se evaluó a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos en los blancos y muestras enriquecidas de semilla de guanábana. Estos se utilizan para demostrar la fiabilidad del método y se consideran aceptables cuando la recuperación del 90% de los análisis de interés se encuentra entre 90 y 110% de la concentración adicionada o enriquecida.

En la Tabla 7 se resumen los resultados de los controles de calidad realizados para cada uno de los análisis, los cuales fueron comparados con la guía de interpretación de resultados establecido por la AOAC determinando que todos se encuentran dentro de los rangos permisibles (% RSD \leq 1.9 y % recobro: 95-105%).

Tabla 7: Controles de calidad de los parámetros proximales en harina de semilla de Guanábana.

Parámetros	Controles de calidad	%RSD	% Recobro
Humedad	Muestra por triplicado	0.27	-
	Muestra enriquecida (agregado)	1.62	100.55
Cenizas	Muestra por triplicado	1.80	-
Extracto etéreo	Muestra por triplicado	1.80	-
	Muestra enriquecida	0.03	96.96
	Blanco enriquecido	1.03	98.09
Proteínas	Muestra por triplicado	0.27	-
	Blanco enriquecido	-	94.07

5.2.2. Extractos etanólicos de la harina de semilla de Guanábana

Durante todo el proceso experimental se probaron tres extractos diferentes, los primeros dos de las partes individuales de la semilla (testa y endospermo) y el último de la semilla completa.

Tomando como base la experiencia establecida por Ascencio, 2012, Barillas, Barillas & Rivera, 2008 y Bobadilla *et al.* (2002) se estandarizaron y analizaron tres métodos de extracción diferentes: Soxhlet, Reposo y Baño María, utilizando como

solvente en todas las pruebas etanol (96 %). Éste fue seleccionado tomando en cuenta la toxicidad asociada a otros solventes reportados en bibliografías internacionales (Bobadilla *et al.*, 2002) como por ejemplo hexano, cloroformo, entre otros así como su capacidad para separar los compuestos de interés.

En base a los resultados obtenidos en el primer bioensayo, se definió como método óptimo la extracción Soxhlet por presentar la mayor mortalidad de larvas y en base a esta experiencia se definieron nuevos intervalos de concentraciones para un segundo bioensayo a fin de identificar la porción de la semilla con mayor potencial insecticida, razón por la cual se extractaron independientemente muestras de: semilla completa, testa y endospermo. De igual manera se obtuvieron resultados de recobro para cada muestra.

Tabla 8: Porcentajes de recobro para cada extracto de la semilla de Guanábana.

Porción de muestra utilizada	% recobro
Testa	87.51%
Semilla completa	89.20%
Endospermo	90.86%

Durante la aplicación de los extractos en el primer bioensayo se determinó que el solvente empleado produce deshidratación de las hojas utilizadas como alimento, por tal razón en el siguiente bioensayo los extractos se disolvieron con agua destilada a 50°C (punto de fusión de las acetogeninas 60 °C a 80 °C) y agitación constante para homogenizar la solución. Al final del proceso se constató que los extractos obtenidos de endospermo y semilla completa poseen un mayor efecto insecticida.

5.2.3. Concentración letal 50% (CL50) en extractos obtenidos

5.2.3.1. Extracto de endospermo

La CL₅₀(concentración necesaria para matar al 50 % de los individuos de prueba durante 48 h de exposición) del extracto etanólico obtenido del endospermo de

Annona muricata L. fue de 2.13 % ($p = 0.0001$) (Fig. 4). Esta se determinó por análisis Probit de las mortalidades detectadas en las 30 réplicas de larvas en tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con hojas de maíz contaminadas con extracto etanólico de las cinco concentraciones ensayadas (desde 0.7 hasta 25 %).

El resultado del Análisis Probit demuestra que la CL 50 % está comprendida entre las concentraciones más bajas utilizadas para el bioensayo 0.7% - 3% que mataron al 3.33% y 86.66% respectivamente, mientras que a partir de la concentración de 7% a 25% se registró un 100% de mortalidad en este tratamiento.

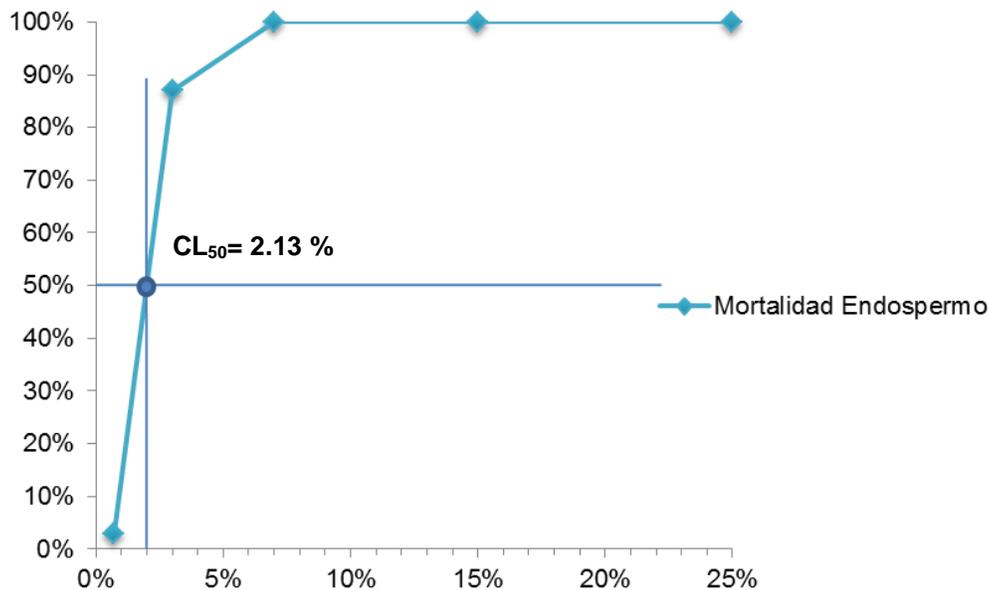


Figura 4. Concentración letal media (CL₅₀) del extracto de endospermo

La toxicidad aguda se calculó en base a los datos colectados en el bioensayo de 48 horas, sin embargo la concentración mediana letal no es una constante a través del tiempo, por lo que se establecieron varios tiempos de conteo cada 8 horas durante el bioensayo y se les calculó la CL₅₀, de acuerdo a los principios ecotoxicológicos de Walker *et al.*, 2012, la curva de la Figura 5. muestra como la toxicidad aguda disminuye a medida que el tiempo de exposición aumenta hasta alcanzar la concentración umbral cerca de las 48 horas donde la curva empieza a

paralelizarse con la asíntota X, no obstante entre los dos últimos tiempos de conteo 40 - 48 horas se distingue una variación de las CL₅₀ de 2.20% a 2.13% respectivamente, indicando que la concentración umbral no es definitiva ya que la mortalidad puede variar si aumentara el tiempo de observación a más de 48 horas, hasta que la toxicidad aguda deje de variar a través del tiempo convirtiéndose en una recta.

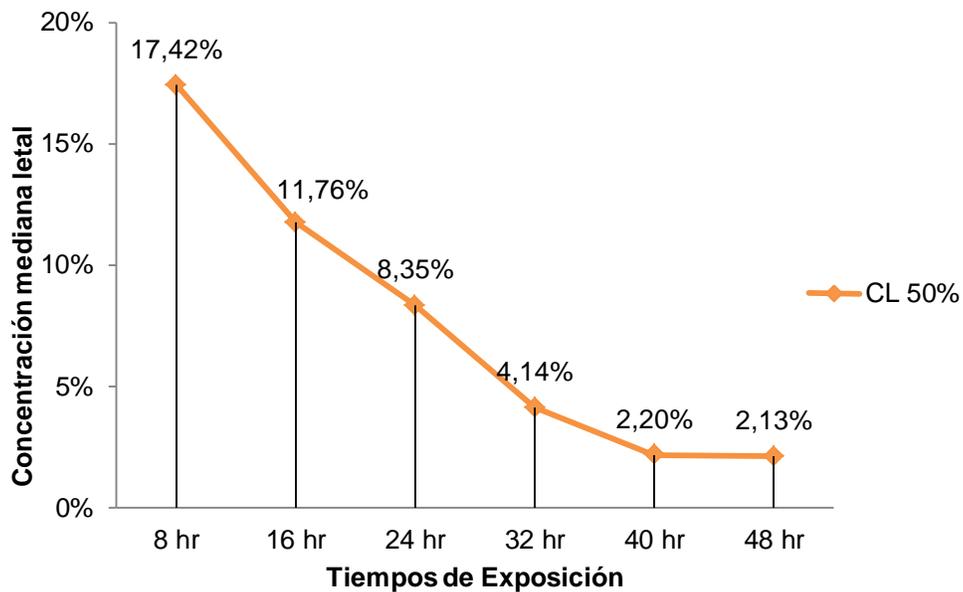


Figura 5: CL₅₀ en los tiempos de exposición, Endospermo

La dispersión de la mortalidad a través del tiempo según el análisis de Litchfield & Wilcoxon, 1949 es contrastada con el logaritmo de la dosis y la probabilidad de cada mortalidad para obtener una idea de su distribución en el plano, en el que cada línea representa la dispersión de mortalidad y su descenso por concentración y tiempo como se observa en la Figura 6.

Las líneas siguen un patrón ordenado decreciendo de las 48 horas al primer tiempo de conteo de 8 horas, cada espacio entre líneas de tendencia corresponde a la variación de mortalidad que se registró entre cada tiempo por concentración, siendo así las líneas de 40 y 48 horas presentan una diferencia de 0.7 % en sus porcentajes de mortalidad por lo que se reflejan muy próximas en el gráfico.

Mientras que las líneas que tienen mayor distancia entre sí son las de 8 horas con respecto a la de 16 horas con una diferencia de 5.66 % en los porcentajes de mortalidad; y las líneas de 24 horas con respecto a la de 32 horas con una diferencia de 4.21 % en la mortalidad.

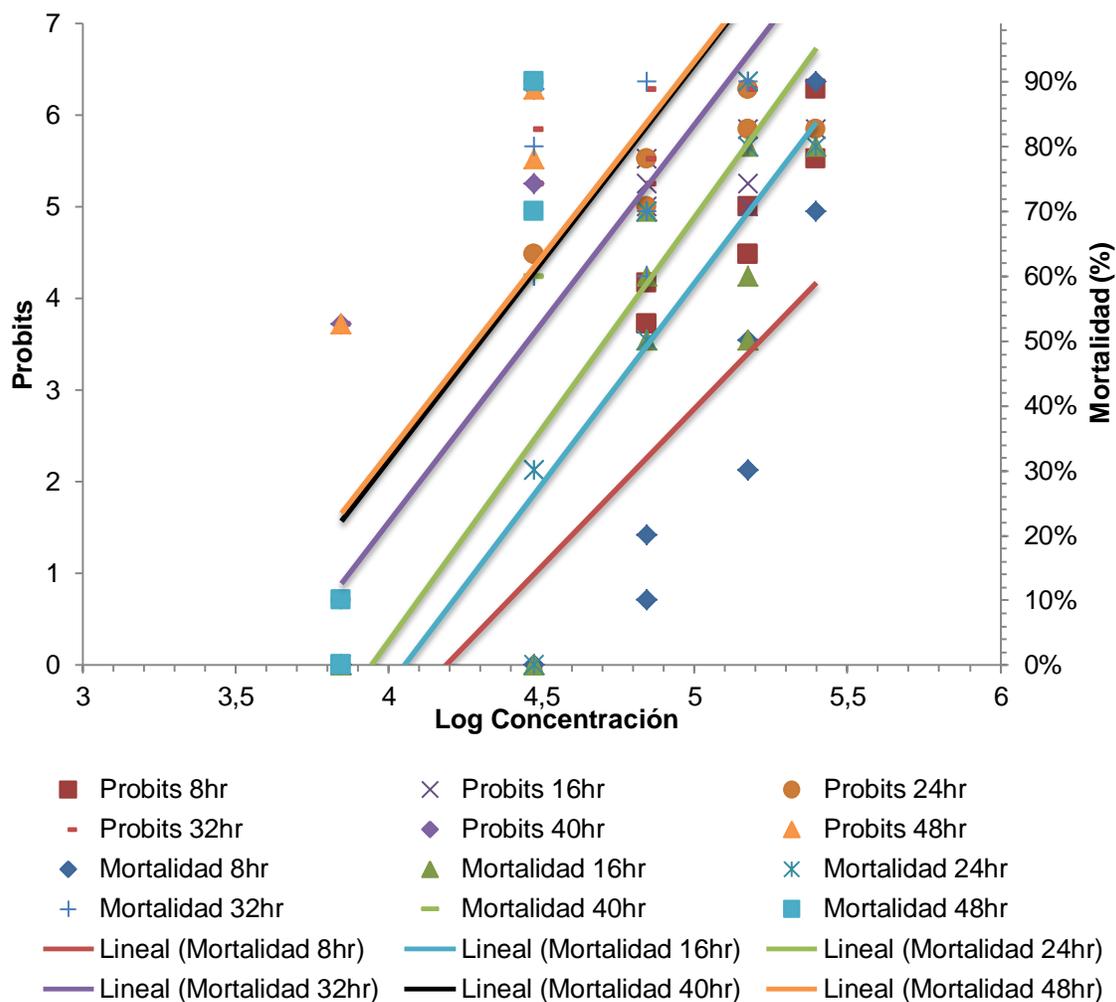


Figura 6: Mortalidad en los tiempos de exposición vs. Concentración, Endospermo

5.2.3.2. Extracto de semilla completa.

La CL₅₀ (concentración necesaria para matar al 50 % de los individuos de prueba durante 48 h de exposición) del extracto etanólico obtenido de la semilla completa de *Annona muricata* L. fue de 1.85 % ($p = 0.0001$) (Figura 4). Esta se determinó por análisis Probit de las mortalidades detectadas en las 30 réplicas de larvas de

tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith, alimentadas con hojas de maíz contaminadas con extracto etanólico de las cinco concentraciones ensayadas (desde 0.7 % hasta 25 %).

El resultado del Análisis Probit nos muestra que la CL 50 % está comprendida entre las concentraciones más bajas utilizadas para el bioensayo 0.7% - 3 % que mataron al 3.33 % y 96.66 % respectivamente, mientras que a partir de la concentración de 7% a 25% se registró un 100% de mortalidad en este tratamiento.

La diferencia entre los valores de ambos tratamientos se debe al tiempo de acción de cada extracto y a la cantidad de individuos muertos registrados en ese tiempo, proponiendo la semilla completa como el extracto que precisa de menor concentración para causar un efecto letal medio sobre una población de insectos en un tiempo de 48 horas después de la aplicación.

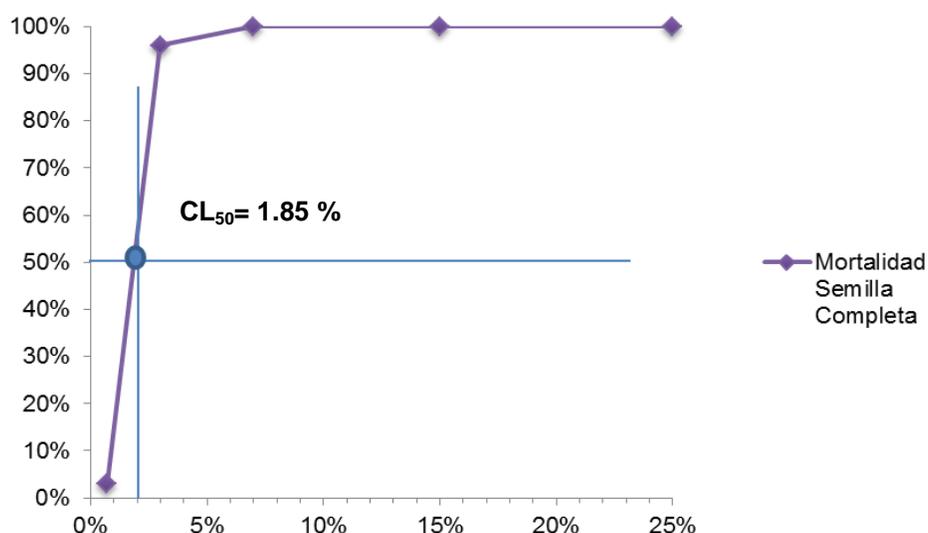


Figura 7. Concentración letal media (CL₅₀) del extracto de semilla completa.

En la figura 8 se muestra la curva de la concentración mediana letal a través de los tiempos de exposición durante las 48 horas para el extracto de semilla completa, se nota como la curva decrece hasta las 40 horas cuando adquiere un comportamiento totalmente lineal con respecto al eje X alcanzando su concentración umbral definitiva, es decir que ya no se experimentan alteraciones en la mortalidad aunque se incrementen los tiempos de exposición, cumpliendo

perfectamente con los principios eco toxicológicos de Walker *et al.*, 2012; cuando el umbral se alcanza todo el sistema experimental se estabiliza, por tanto la concentración de toxinas en el organismo de las larvas no podía aumentar o disminuir sin importar si ingerían alimento o no durante y después de las 48 horas, así los sujetos que lograron sobrevivir a estas condiciones después del último tiempo de conteo sobrevivieron a través del tiempo sobrellevando las toxinas en sus metabolismos.

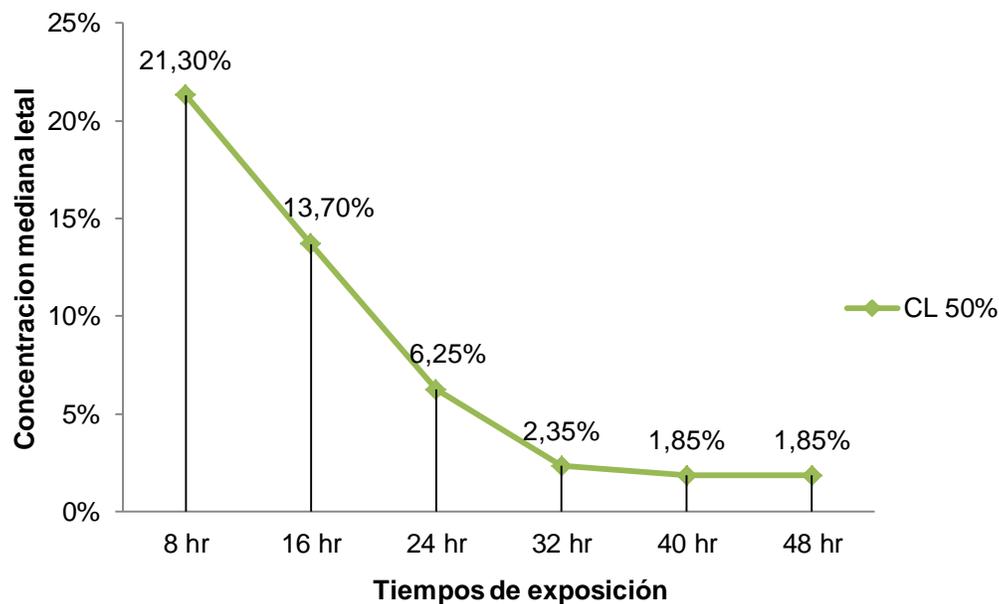


Figura 8. CL₅₀ en los tiempos de exposición, Semilla completa

En la figura 9 sobre la dispersión de la mortalidad a través del tiempo según el análisis de Litchfield & Wilcoxon, 1949, muestra el orden que siguen las líneas de tendencia en este extracto, las cuales decrecen similar a Endospermo de acuerdo al tiempo; sin embargo la diferencia de mortalidad entre todas las líneas es más amplia. Entre las líneas de 8 horas y 16 horas la variación en los porcentajes de mortalidad es de 7.6 %, entre las 16 horas y 24 horas la diferencia de mortalidad es de 7.45 %, para las líneas de 24 a 32 horas la variación es de 3.9 %, mientras que la menor diferencia en la mortalidad se distribuye entre las 32 horas y 40 horas con 0.5 % de diferenciación en la mortalidad.

En el caso de 40 y 48 horas las líneas están superpuestas entre sí, debido a que la concentración umbral se alcanzó desde las 40 horas ya no hay variación de mortalidad a través del tiempo, resultando en el mismo porcentaje para las 48 horas.

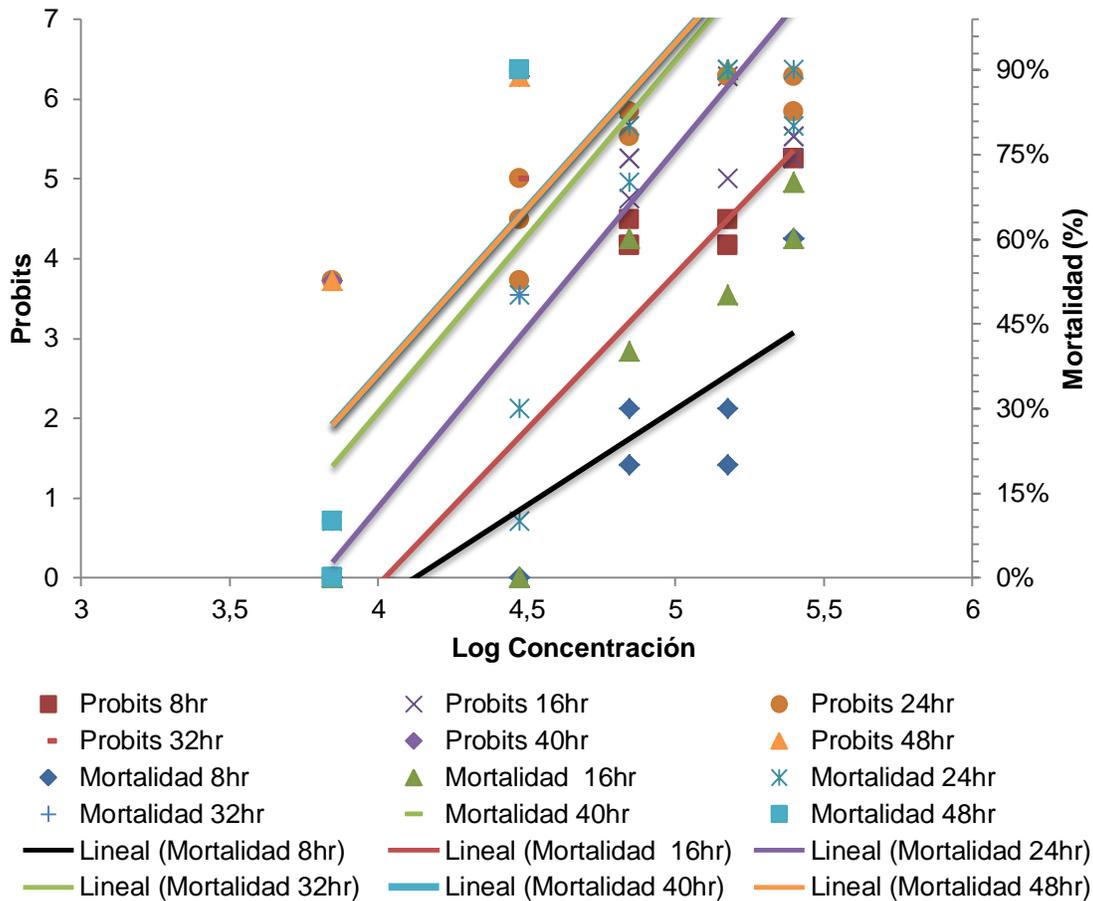


Figura 9. Mortalidad en los tiempos de exposición vs. Concentración, Semilla completa

La determinación de la CL_{50} nos indicó que realmente los extractos poseen propiedades lo suficientemente tóxicas como para matar a la mitad de las larvas e inclusive a más ya que se obtuvieron mortalidades del 100% en ciertas concentraciones, sin embargo a pesar de estar probada su toxicidad este es un experimento limitado a las condiciones de un laboratorio, por lo que para estandarizar una concentración que pueda ser utilizada como bioinsecticida se deberá realizar primero una validación en campo del extracto de semilla completa que resultó ser el más eficiente.

5.2.3.3. Efecto Anti-alimentario

Durante el bioensayo se registró la ingesta de alimento por parte de las larvas y se observó que entre más alta la concentración más porcentajes de mortalidad con leve evidencia de alimentación se reportaban, manifestando que los extractos tienen un efecto repelente o anti-alimentario sobre las larvas que combinado con la toxicidad por contacto ocasiona la muerte en pocas horas de la mayor parte de las larvas dentro del experimento, coincidiendo con lo ya reportado por Leatemia e Isman (2004). Revelando así que los extractos actúan por ingesta, por contacto o repelencia, elevando el potencial de *Annona muricata*L. como fuente de un bioinsecticida.

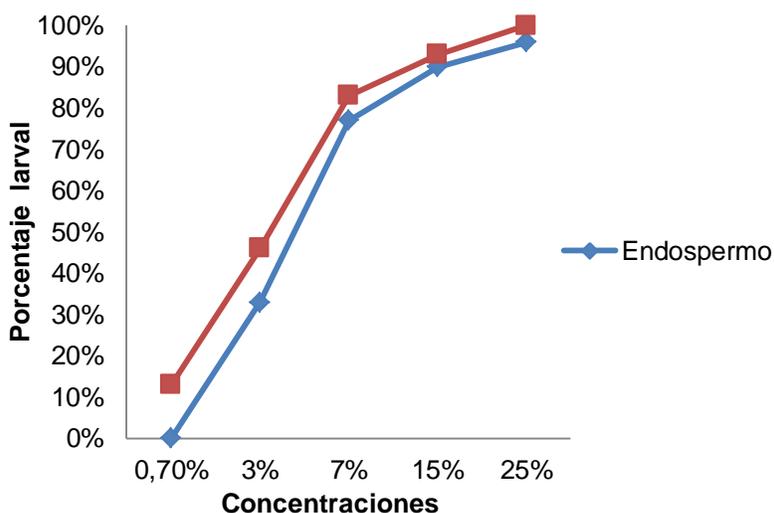


Figura 10. Actividad anti-alimentaria.

5.2.4. Eficacia de los extractos como larvicidas.

Durante todo el proceso de experimentación se probaron tres extractos diferentes, los primeros dos de ambas partes de la semilla (testa y endospermo) por separado y el último de la semilla completa.

Se realizó el montaje del primer bioensayo con los tres tipos de extractos a bajas concentraciones, con la finalidad de despejar los extractos con mayor potencial insecticida, es por eso que la mortalidad resultante de estas concentraciones no es relevante para este estudio ya que los datos no se distribuyen de forma regular

lo que evita su correcta interpretación, gracias a esta experiencia se llegó a la decisión de aumentar el valor de las concentraciones para mejorar el índice de mortalidad.

Sin embargo con este bioensayo de prueba se comprobó la eficiencia de los extractos, ya que los datos no cumplen con los supuestos del ANOVA se optó por realizar una prueba de Kruskal-Wallis que no requiere normalidad de los datos.

5.2.4.1. Prueba de Kruskal-Wallis.

El resultado de la prueba de Kruskal-Wallis demuestra que los extractos aplicados presentan una diferencia significativa ($p = 0.0207$, $H = 6.97$) en cuanto a la efectividad de cada uno sobre la mortalidad de las larvas.

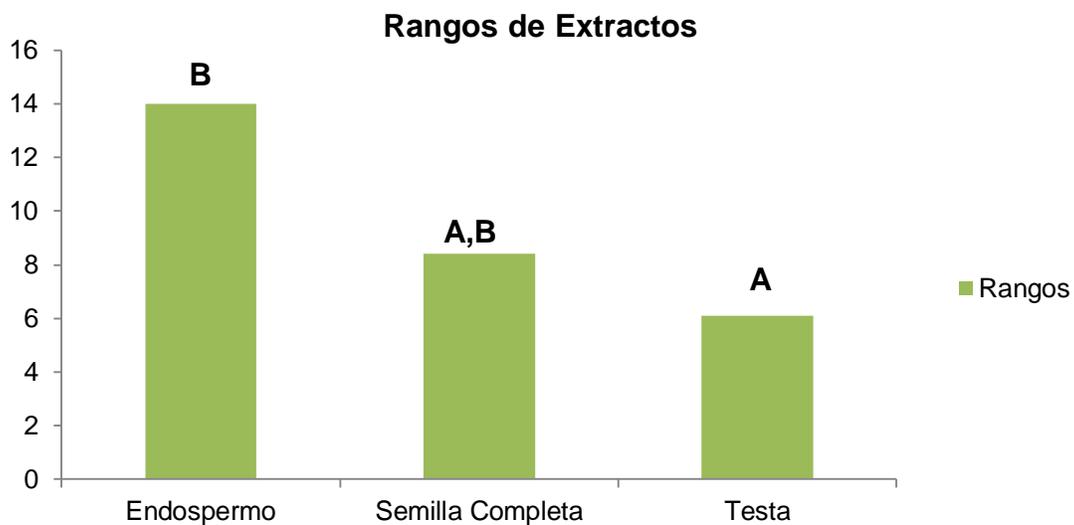


Figura 11. Prueba de Kruskal-Wallis

Nota: Valores con letra común no son diferentes.

En la Figura 9. se observa que de los tres extractos analizados: Endospermo y Semilla Completa tuvieron mayores índices de mortalidad a pesar de haber utilizado concentraciones tan bajas; siendo Semilla Completa el que presenta valores más similares a Testa y Endospermo, debido a que ambos la componen.

La eficacia de la Semilla completa y Endospermo se atribuye posiblemente a la cantidad de aceite contenida en los extractos, ya que el principio activo de la toxicidad son las acetogeninas que como se explicaba son un compuesto ceroso.

Por otro lado la ineficiencia de la Testa se debe a que está compuesta por esclerénquima, específicamente de esclereidas células muertas con paredes celulares gruesas y muy rígidas endurecidas con lignina, cuya principal función es la protección del endospermo y el embrión de la semilla. Es decir que cumple una función mecánica por lo que metabolitos químicos como las acetogeninas suelen no estar presentes en la testa, por esta razón el extracto de testa fue eliminado del bioensayo final.

5.2.4.2. ANOVA sobre las concentraciones aplicadas a las larvas.

El análisis de varianza nos muestra que las concentraciones implementadas presentan una diferencia significativa ($p = 0.0001$, $F = 335.85$) en cuanto a la mortalidad de las larvas.

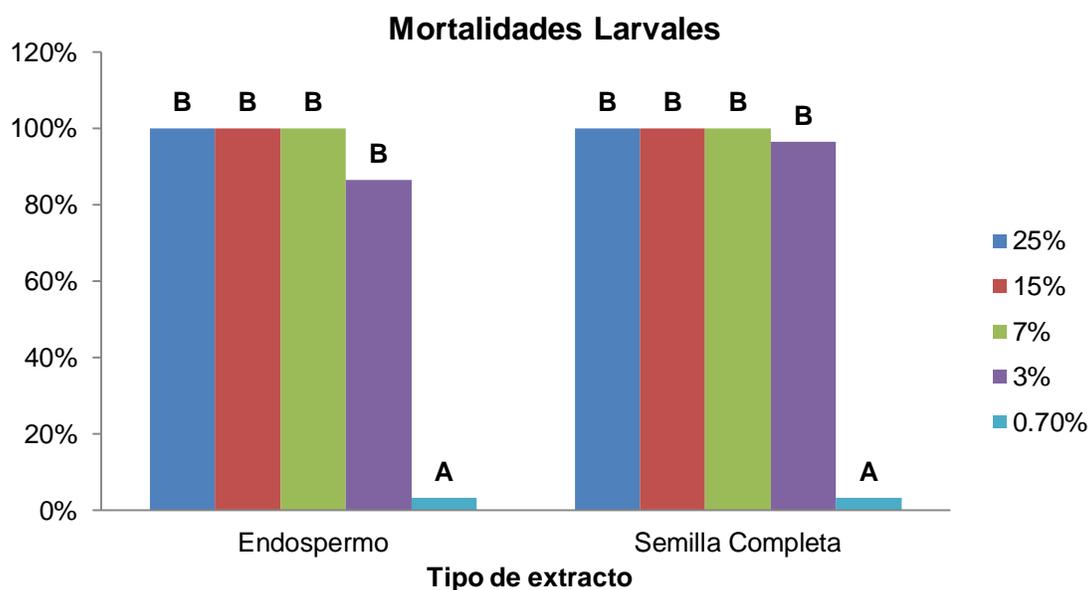


Figura 12. Análisis de varianza de la mortalidad en las diferentes concentraciones.

Nota: Valores con letra común no son diferentes.

De las cinco concentraciones utilizadas (25%, 15%, 7%, 3% y 0.7%) la que registra una diferencia en las medias de mortalidad es 0.7% que eliminó al 3.33% de las larvas en ambos tratamientos, en comparación a las cuatro concentraciones restantes que mataron a más del 50% de los individuos de prueba.

El rango de concentraciones establecidas entre 0.7% hasta 25% utilizando únicamente los extractos de endospermo y semilla completa, demostró los valores más altos de mortalidad en 25%, 15% y 7% con un 100% de larvas muertas y los valores más bajos de mortalidad en 0.7% con un 3.33% de muertos.

La diferencia registrada por las pruebas estadísticas aplicadas se encuentra en 0.7% que eliminó al 3.33% de las larvas en ambos tratamientos, en comparación a las cuatro concentraciones restantes que mataron a más del 50% de los individuos de prueba, resultado esperado ya que fue la concentración más baja utilizada sin embargo cabe recalcar que también fue la concentración de donde se registró menor efecto anti-alimentario o repelente relacionado probablemente con la poca cantidad de grasas presentes en el extracto.

La hipótesis nula se rechaza comprobando que el efecto bioinsecticida de los extractos etanólicos de las semillas de *Annona muricata* L. presentan diferencias en las mortalidades de las larvas de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith de acuerdo a las concentraciones aplicadas en el bioensayo, constatando que la guanábana si presenta toxicidad en sus órganos vegetales que se puede ajustar para otros individuos de prueba empleando diferentes rangos de concentración.

Se comprobó que al ser las acetogeninas un compuesto ceroso los extractos de Semilla Completa y Endospermo demostraron mortalidades altas y similares, ya que presentaron mayor cantidad de aceites en las concentraciones, llegando incluso a presentar dos fases en las concentraciones más altas.

El intervalo de tiempo que registró mayor número de larvas muertas fue el de 8 horas después de la aplicación de los extractos con un total de 110 larvas

muertas, es decir el 73.33% en el extracto de Endospermo, y 113 equivalente al 75.33% en Semilla Completa.

Los valores más altos de mortalidad se presentaron en las concentraciones de 25%, 15% y 7% con un 100% de larvas muertas y los valores más bajos de mortalidad se obtuvieron en la concentración de 0.7% con un 3.33% de muertos.

Capítulo VI: Conclusiones

Con base a los resultados de los análisis implementados para este experimento podemos concluir que:

1. Los análisis proximales para las muestras de harina de semilla mostraron un 1.36 % de cenizas, 4.29% de humedad, 95.71% de materia seca, 31.14 % de extracto etéreo, 2.59% de Nitrógeno y 16.19% de proteína.
2. Los tres extractos de semilla (testa, endospermo y semilla completa) se obtuvieron a través del método de extracción Soxhlet con porcentajes de recobro de: 87.51 % para testa, 89.20 % semilla completa y 90.86 % endospermo, utilizando agua desionizada como solvente debido a la deshidratación que producía el etanol 96%, sin embargo en el bioensayo solo se utilizaron endospermo y semilla completa por poseer mayor toxicidad.
3. La Concentración Letal 50% estimada a través del Análisis Probit para el extracto de Semilla Completa fue de 1.85 % y para Endospermo de 2.13 %.
4. Según el análisis de varianza realizado, el extracto que mostró mayor eficacia como bioinsecticida fue Semilla Completa, conformada por Endospermo y Testa, obteniendo valores ligeramente más altos al extracto de Endospermo al emplear las mismas concentraciones con porcentajes de mortalidad larval del 100 % para 25 %, 15 % y 7 %, 96.6 % en la concentración al 3 % y 3.33% en 0.7%.

Capítulo VII: Recomendaciones

- ❖ Para futuros estudios se estima conveniente realizar análisis de la composición y distribución de acetogeninas y demás compuestos insecticidas en las porciones hidro- e hipo-solubles de las semillas debido a que la homogenización de la solución no es total tanto en soluciones acuosas como en alcohol y se debe asegurar la utilización de la porción de mayor concentración, utilizando semillas frescas para evitar la degradación de la muestra.
- ❖ Para fines de formulación de un bioinsecticida que pueda ser utilizado en campo y tomando en cuenta la necesidad de aplicar calentamiento y agitación a los extractos para su total dilución en agua se considera conveniente la adición de un agente dispersante o emulsificante.
- ❖ Se recomienda a otros tesisistas o investigadores realizar bioensayos futuros para comparar la efectividad bioinsecticida de otras partes de *Annona muricata* L. ya que la concentración de principios activos puede variar según el órgano del árbol, la localización geográfica y la influencia de las condiciones edafoclimáticas.
- ❖ A los investigadores se les sugiere tomar en cuenta la utilización de otros organismos de prueba en futuros bioensayos para determinar a qué otras especies resulta tóxica la guanábana.
- ❖ Se insta a los investigadores interesados a explorar el potencial que poseen nuestros recursos naturales como fuentes de compuestos con diversas bioactividades aplicables en agronomía, medicina e industria.
- ❖ Conservación de todos los recursos naturales que posee nuestro país para poder seguir aprovechando sus beneficios.

Bibliografía

- Alali, F. Q., Kaakeh, W., Bennett, G. W., & McLaughlin, J. L. (1998).** Annonaceous Acetogenins as Natural Pesticides: Potent Toxicity Against Insecticide-Susceptible and -Resistant German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* , 91(3), 641-649.
- Aristides Quillet. (1974).** *Diccionario Enciclopedico Quillet* (Vol. II). Mexico: Editorial Argentina Aristides Quillet.
- Arroyo A, J., Prashad G, M., Vásquez B., Y., Li P, E., & Tomás C, G. (2005).** Actividad citotóxica in Vitro de la mezcla de *Annona muricata* y *Krameria lappacea* sobre células cancerosas de glándula mamaria, pulmón y sistema nervioso central. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22(4), 247-253.
- Ascencio, J. I. (2012).** *Evaluación de la actividad insecticida y repelente del extracto obtenido a partir de la semilla de Annona diversifolia (Anona) sobre el Zabrotes subfaciatus (Gorgojo comun del frijol)* . Universidad de El Salvador, Departamento de Química y Farmacia. San Salvador: Universidad de El Salvador.
- Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. A., & Robledo, C. W. (2008).** *Manual del Usuario*. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- Barillas, B. O., & Rivera, J. L. (2008).** *Evaluación de la actividad insecticida, repelente y disuasiva alimentaria del extracto etanolico obtenido a partir de la semilla de Annona diversifolia (Anona) sobre el Sitophilus zeamais, Motschulsky (Gorgojo del maíz)*. Universidad de El Salvador, Departamento de Química y Farmacia. San Salvador: Universidad de El Salvador.

- Blessing, L., Álvarez, O., Popich, S., Neske, A., & Bardón, A. (2010).** Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Pest Science*, 80, 307-310.
- Bobadilla, M., Zavala, F., Sisniegas, M., Zavaleta, G., Mostacero, J., & Taramona, L. (2005).** Evaluación larvica de suspensiones acuosas de *Annona muricata* Linnaeus «guanábana» sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). *Revista peruana de Biología*, 12(1), 145-152.
- Bobadilla, M., Zavaleta, G., Gil, F., Pollack, L., & Sisniegas, M. (2002).** Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimola* Miller “chirimoya” Y *A. muricata* Linnaeus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. *Revista Peruana de Biología*, 9(2), 64-73.
- Boeke, S. J., Kossou, D., Van Huis, A., Van Loon, J., & Dicke, M. (2004).** Field trials with plants products to protect stored cowpea against insect damage. *International Journal of Pest Management*, 50(1), 1-9.
- Bornemann, G., Neira Cuadra, O., Narváez Silva, C., & Solórzano, J. L. (2012).** Desafíos desde la seguridad alimentaria y nutricional en Nicaragua. 1-119. Nicaragua.
- Bunge, M. (1975).** *La investigación Científica: su estrategia y su filosofía*. Barcelona: Editorial Ariel.
- Bustamante, D. E., Del Prado, H., Domenicucci, T., Guariglia, C., Hidalgo, J., López Winne, H., y otros. (2006).** *Atlas Visual de la Ciencia* (Vol. III). Barcelona: Editorial Sol 90.
- Campbell, N. A., Mitchel, L. G., & Reece, J. B. (2001).** *Biología: Conceptos y relaciones* (3 ed.). Mexico: Pearson Education.
- Capinera, J. L. (1999).** *Featured Creatures*. (J. L. Gillett-Kaufman, Ed.) Recuperado el 23 de Septiembre de 2015, de UF|IFAS: University of Florida: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm

- Castillo, N., González, D., Gómez, J. V., & González, C. (2013).** Efecto de los extractos acuosos de anonáceas sobre *Tetranychus tumidus* Banks. *Metodos en Ecología y Sistemática*, 8(3), 42-53.
- Cockerell, I., Francis, B. J., & Halliday, D. (1971).** Changes in the nutritive value of concentrate feeding stuffs during storage. *Proceedings of Conference on Development of feed resource and improvement of animal feeding methods in the CENTO Region countries*, 1-7.
- Cordero, J., & Boshier, D. H. (2003).** *Árboles de Centroamerica*. Costa Rica: OFI/CATIE.
- De Toro y Gisbert, M. (1962).** *Larousse Universal Ilustrado* (VI ed.). Paris, Francia.
- Di Rienzo, J. (2010).** *Análisis de Regresión Probit*. Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Tablada, Y. C. (2011).** InfoStat versión 2011. 8, 195-199. Argentina. Recuperado el 27 de Febrero de 2016, de <http://www.infostat.com.ar>
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Gonzalez, L. A., Tablada, E. M., Diaz, M. P., Robledo, C. W., y otros. (2005).** *Estadística para las Ciencias Agropecuarias* (Sexta ed.). (J. A. Di Rienzo, & F. Casanoves, Edits.) Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- Enciclopedia Britannica. (1962).** *Enciclopedia Bansa* (Vol. XII). Estados Unidos: Enciclopedia Britannica, INC.
- Espinoza, S. A., Urbina, A. R., Obando, S. R., & Vanegas, J. R. (1999).** *Cultivo del maiz*. Managua, Nicaragua: Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuaria.
- FAO, Analisis Proximales. (s.f.).** Recuperado el 26 de 03 de 2016, de FAO: <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab489s/ab489s03.htm>

- Flórez Londoño, Y., & Martínez Muñoz, E. (2010).** *Obtencion y evaluacion de extractos bioactivos presentes en semillas de Annona muricata de la region cafetera.* Tesis de grado, Universidad Tecnologica de Pereira, Escuela de Tecnologia Química Pereira.
- Freitas, A. F., Pereira, F. F., Formagio, A. S., Lucchetta, J. T., Vieira, M. C., & Mussury, R. M. (2014).** Effects of methanolic extracts of *Annona* species on the development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*.
- Guadaño, A., Gutierrez, C., De la Peña, E., Cortes, D., & González-Coloma, A. (2000).** Insecticidal and Mutagenic Evaluation of Two Annonaceous Acetogenins. *Journal of Natural Products*, 63(6), 773-776.
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, M. (2014).** *Metodología de la investigación* (Quinta edición ed.). Mexico: McGraw Hill.
- Hernández, S. (2016).** *Fundación Triptolemos*. Obtenido de La importancia de las proteínas: www.triptolemos.org
- INTA. (2010).** *Cultivo del maiz*. Guia Tecnologica 3, Instituto Nicaraguense de Tecnología Agropecuaria, Managua.
- Jiménez, E. S., & Rodríguez, O. (2014).** *Insectos plagas de cultivos en Nicaragua* (1 ed.). Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Kimbonguila, A., Nzikou, J. M., Matos, L., Loumouamou, B., Ndangui, C. B., Pambou-Tobi, N., y otros. (2010).** Proximate Composition and Physicochemical Properties on the Seeds and Oil of *Annona muricata* grown in Congo-Brazzaville. *Research Journal of Enviromental and Earth Sciences*, 2(1), 13-18.
- Klocke, J. A. (1987).** Natural plant compounds useful in insert control. *In ACS symposium series*(330), 396-415.

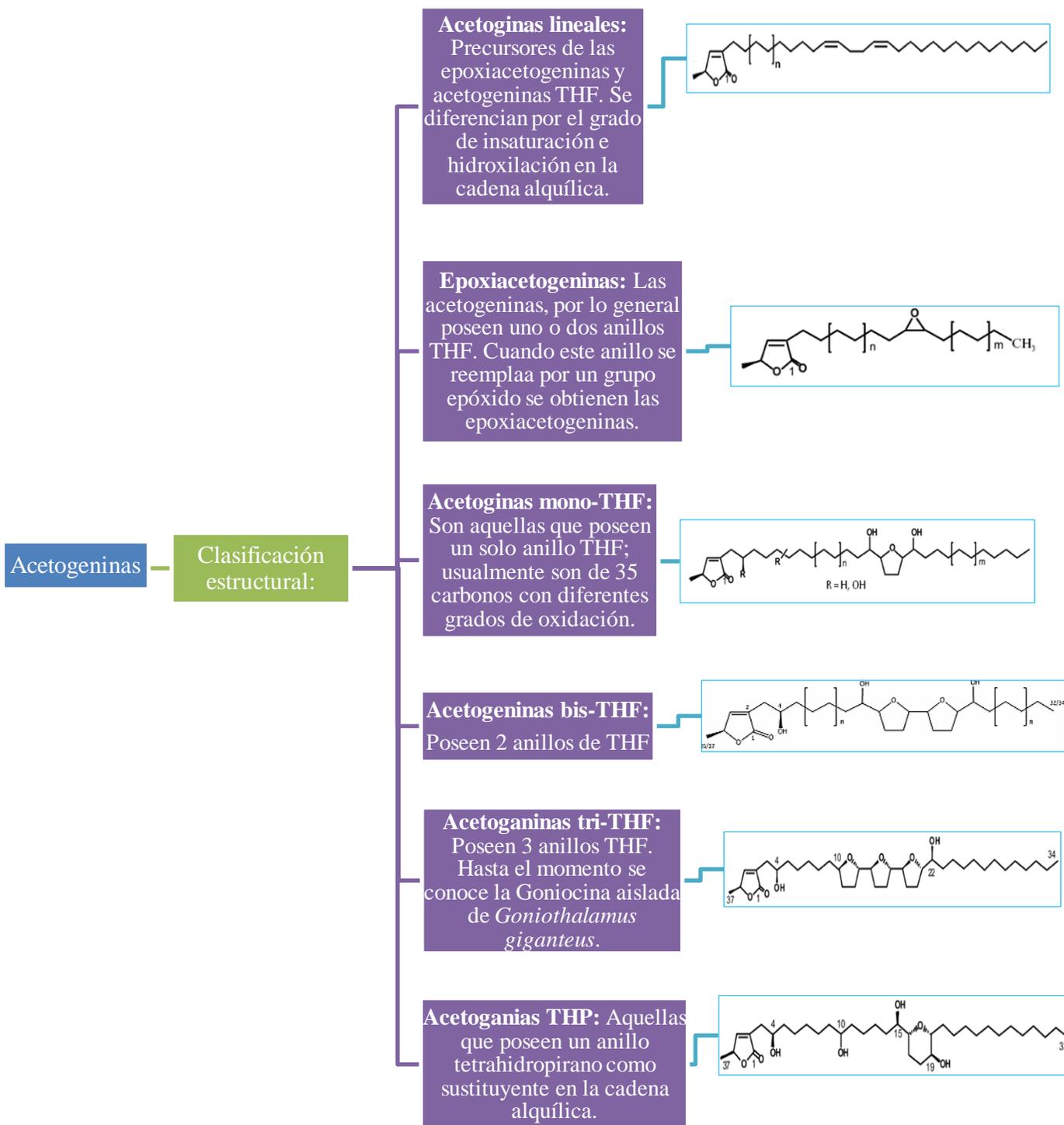
- Leatemia , J. A., & Isman, M. B. (2004).** Toxicity and antifeedant activity of crude seed extracts of *Annona squamosa* (Annonaceae) against lepidopteran pests and natural enemies. *International Journal of Tropical Insect Science*, 24(2), 150-158.
- Leatemia, J. A., & Isman, M. B. (2004).** Insecticidal Activity of Crude Seed Extracts of *Annona* spp., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* against Lepidopteran Larvae. *Phytoparasitica*, 32(1), 30-37.
- Litchfield, J. T., & Wilcoxon, F. (1949).** A simplified method of evaluating Dose-Effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96(2), 99-113.
- Mentor. (1960).** *Nuevo Diccionario Enciclopédico Ilustrado* (Segunda ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Sopena Argentina S.A.
- Onimawo, I. A. (2002).** Proximate composition and selected physicochemical properties of the seed, pulp and oil of sour sop (*Annona muricata*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 57(2), 165-171.
- Orwa, C., Mutua, A., Kindt, R., Jamnadass, R., & Anthony, S. (2009).** *Annona muricata* L. Recuperado el 23 de Septiembre de 2015, de Agroforestry Database: a tree reference and selection guide : <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>
- Rand, G. M. (1995).** *Fundamentals of aquatic toxicology* (Segunda ed.). (G. M. Rand, Ed.) Florida, Estados Unidos: Taylor & Francis.
- Ratnayake, S., Kent Rupprecht, J., Potter, W. M., & McLaughlin, J. L. (1992).** Evaluation of Various Parts of the Paw Paw Tree, *Asimina triloba* (Annonaceae), as Commercial Sources of the Pesticidal Annonaceous Acetogenins. *Journal of Economic Entomology*, 85(6), 2353-2356.
- Real Academia Española. (2001).** *Diccionario de la Lengua Española* (Vegésima segunda ed., Vol. V). (R. A. Española, Ed.) Colombia.

- REFUGIO, ASA. Asociación de Semilleros Argentinos. (s.f.).***Manejo del Gusano Cogollero en Cultivos de Maíz.* Recuperado el 11 de Febrero de 2016, de PIONEER Argentina: www.pioneer.com/ar
- Regnault-Roger, C., JR Philogène, B., & Vincent, C. (2004).***Biopesticidas de origen vegetal* (Segunda ed.). (C. Regnault-Roger, B. JR Philogène, & C. Vincent, Edits.) Mundi-Prensa.
- Roberson, J. L., Savin, N. E., Russell, R. M., & Preisler, H. K. (2007).***Bioassays with Arthropods* (Segunda ed.). (T. a. Group, Ed.) Estados Unidos: CRC Press.
- Rodríguez, C. (2000).***Plantas contra Plagas: Potencial practico de ajo, anona, nim, chile y tabaco.* Mexico, D.F., Mexico: RAPAM.
- Santos Pimenta, L. P., Pinto , G. B., Takahashi, J. A., F. e Silva, L. G., & Boaventura, M. D. (2003).**Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, 10, 209-212.
- Science museum. (s.f.).***Medium lethal dose (LD50).* Recuperado el 02 de Octubre de 2014, de Brought to Life, Exploring the history of medicine: <http://www.sciencemuseum.org.uk/broughttolife/techniques/ld50.aspx>
- Silva Aguayo, G. (s.f.).***Qué es y cómo se calcula la DL50 en insecticidas.* Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía, Chile.
- Stevens, W. D., Ulloa Ulloa, C., Pool, A., & Montiel, O. M. (2001).***Flora de Nicaragua.* (W. D. Stevens, C. Ulloa Ulloa, A. Pool, & O. M. Montiel, Edits.) Recuperado el 24 de Septiembre de 2015, de Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/Project/FN>
- Vásquez, S. (1944).***Estudio y comprobación insecticida de Annona squamosa peruana.* Universidad Nacional de Trujillo, Departamento de Química. Perú: Universidad Nacional de Trujillo.

- Vit, P., Santiago, B., & Pérez Pérez, E. M. (2014).** Composición química y actividad antioxidante de pulpa, hoja y semilla de guanábana (*Annona muricata* L.). *Interciencia*, 39(5), 350-353.
- Wackerly, D., Mendenhall, W., & Scheaffer, R. (2010).** *Estadística Matemática con Aplicaciones* (Séptima ed.). (S. Cervantes González, Ed.) Santa Fe, México D.F, México: CENGAGE Learning.
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2012).** *Principles of ecotoxicology* (Cuarta ed.). Florida, Estados Unidos: Taylor & Francis Group.
- Walpole, R., Myers, R., Myers, S., & Ye, K. (2007).** *Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias* (Octava ed.). México: Pearson Educación.

Anexos

Anexo 1: Esquema de la clasificación de Acetogeninas.



Anexo 2: Ciclo de vida y estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.

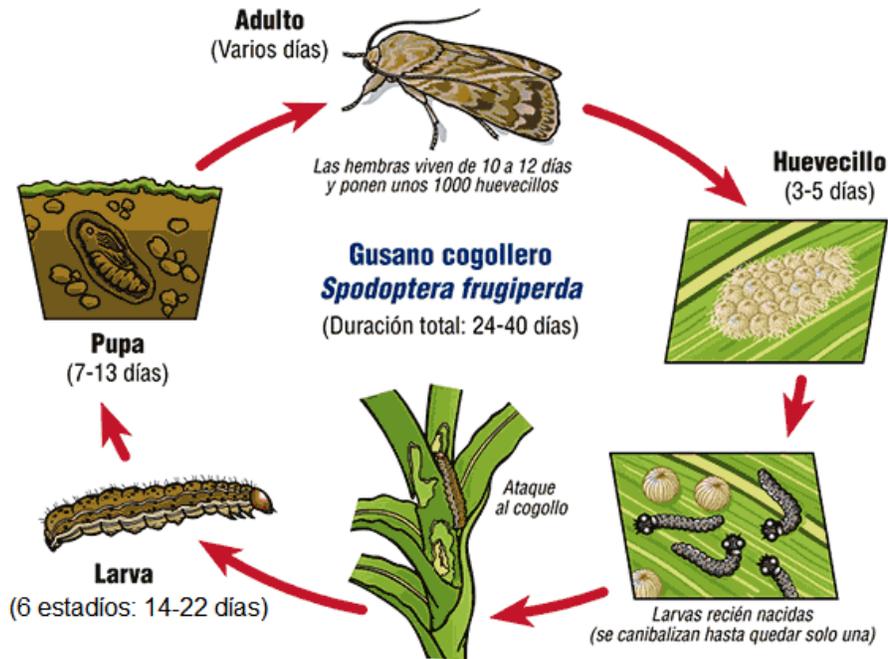


Figura 13: Ciclo de Vida de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Retirado de Manejo integrado del Gusano Cogollero en Maíz y Sorgo INTAGRI, Departamento Técnico. 13/04/2016.

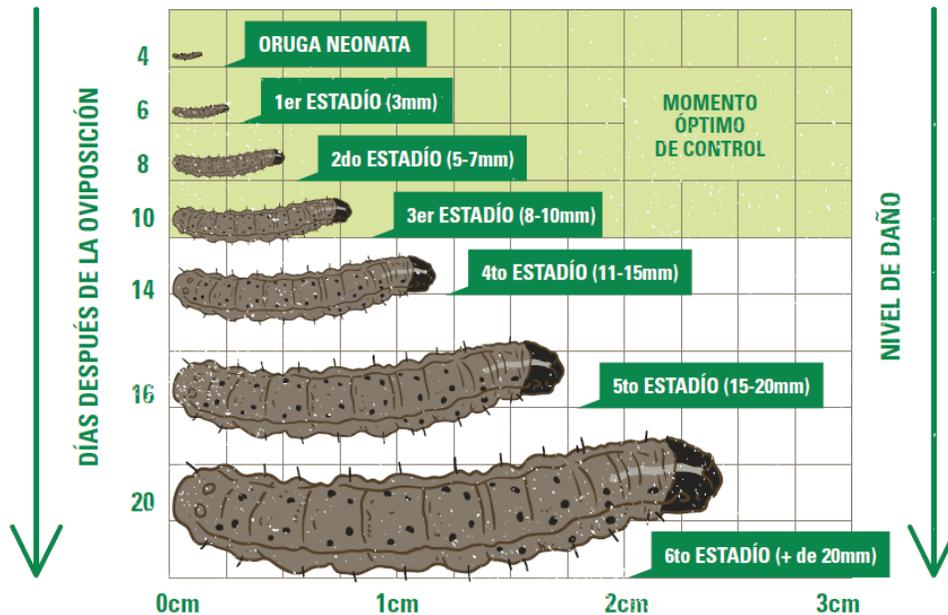


Figura 14: Estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Retirado de Manejo de Gusano Cogollero en Cultivos de Maíz PIONEER, ASA. 15/04/2016.

Anexo 3: Formato de caracterización de las frutas y semillas de Guanábana.



FORMATO PARA CARACTERIZACION DE MUESTRAS DE GUANÁBANA (<i>Annona muricata</i>)	FCM-BIOTEC- Fecha: 2015/09/18 Revisión No 1 Página 61 de 1
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA UNAN MANAGUA	



Nombre del Proyecto/Cliente: Potencial insecticida de la <i>A. muricata</i> sobre <i>S. frugiperda</i> .			
Identificación de la muestra:			
Datos del fruto			
1.1. Forma del fruto			
1 Redonda 2 Achatada 3 Cordiforme 4 Cordiforme alargado 5 Oval			
1.2. Longitud fruto (cm/mm)		1.3. Diámetro del fruto (cm/mm)	
1.4. Peso del fruto maduro (g)			
1.5. Tipo de exocarpo			
1. Lisa 2. Depresiones suaves 3. Protuberancias pequeñas 4. Protuberancias medianas 5. Protuberancias largas			
1.6. Color del exocarpo		1.7. Peso de todas las semillas frescas (g)	
1. Verde claro 2. Verde 3. Verde oscuro 4. Verde amarillento 5. Amarillo 6. Verde amarronado 7. Marrón		1.8. Número de semillas por fruto (g)	
		2. Peso de diez semillas frescas (g)	
		2.1. Color de la semilla 1. Gris 2. Marron 3. Negro	
		2.2. Textura de la pulpa 1. Acuosa 2. Cremosa 3. Granular 4. Dura	
2.3 Longitud de la semilla cm/mm		2.4. Ancho de la semilla cm/mm	
2.5. Color de la pulpa 1. Blanco 2. Crema		2.6. Sabor de la pulpa 1. Dulce 2. Ácido	

Anexo 4: Partes de la semilla utilizadas.



TESTA 1)



ENDOSPERMO 2)



**SEMILLA
COMPLETA** 3)

Figura 15. Partes de la semilla utilizada en los extractos: 1) Testa, 2) Endospermo, 3) Semilla Completa.

Anexo 5: Larvas de *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith.

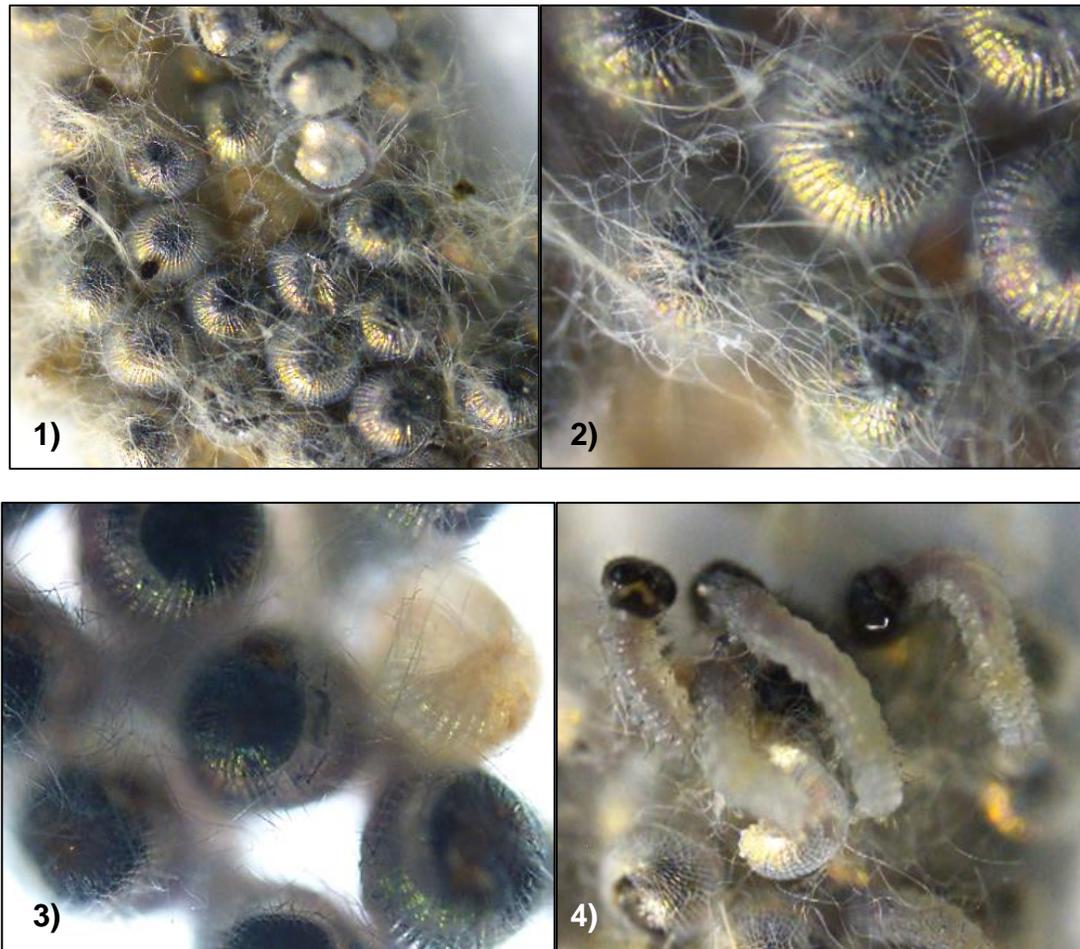


Figura 16. Eclosiones de larvas: 1) Masas de huevos; 2) Capa algodonosa protectora; 3) Iridiscencia de los huevecillos; 4) Eclosión de larvas neonatas.



Figura 17. Primer estadio larval: 1) Cuerpo entero; 2) Detalle de las espinas corporales.

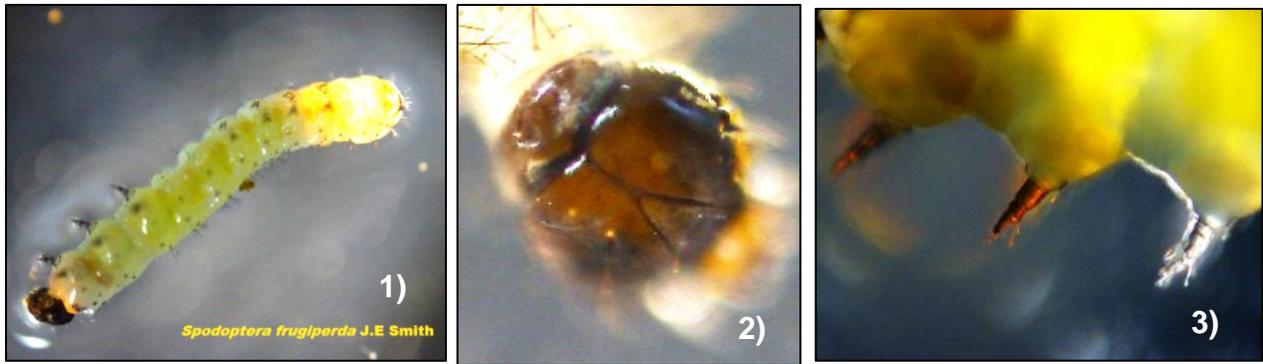


Figura 18. Segundo estadio larval:1)Cuerpo entero; 2)"Y" invertida en la cabeza,3)Seudópodos.



Figura 19. Tercer estadio larval:1) Larva alimentándose en los frascos, 2) Larva enroscada en posición defensiva, 3) Canibalismo

Anexo 7: Tabla de mortalidad de larvas.



Tabla de recolección de datos del bioensayo sobre el potencial insecticida de *Annona muricata*L. en *Spodoptera frugiperda*J. E. Smith

Tiempo (horas)	8		16	24	32		40	48	56		64	72	Total	Observación
	E.A.	Mort.			E.A.	Mort.			E.A.	Mort.				
25 %														
25 % (ii)														
25 % (iii)														
15 %														
15% (ii)														
15% (iii)														
7 %														
7% (ii)														
7 % (iii)														
3 %														
3 % (ii)														
3 % (iii)														
0.7 %														
0.7 % (ii)														
0.7 % (iii)														

Notas:

Anexo 8:Flujograma de métodos de extracción

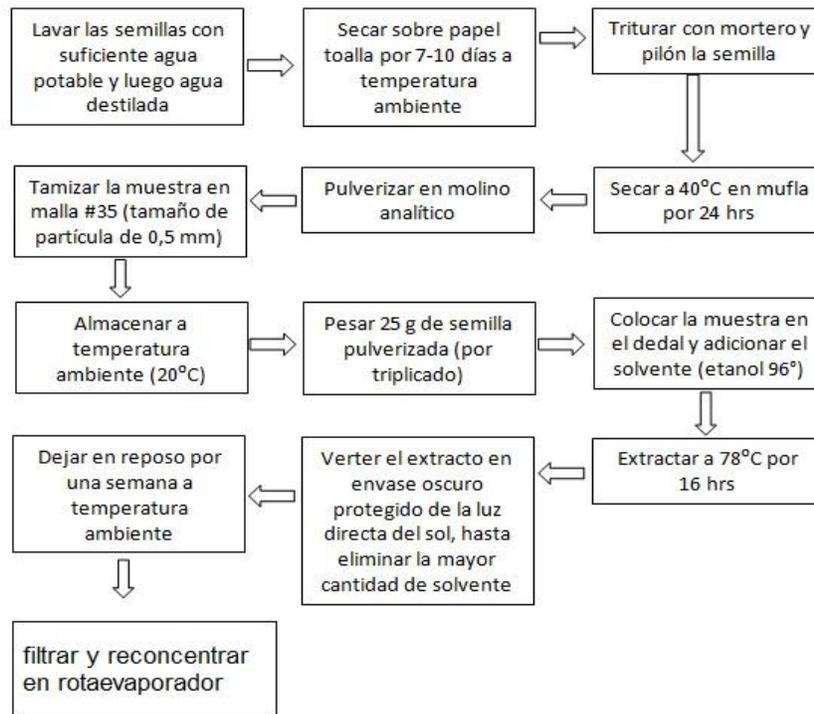


Figura 20: Flujograma de extracción Soxhlet

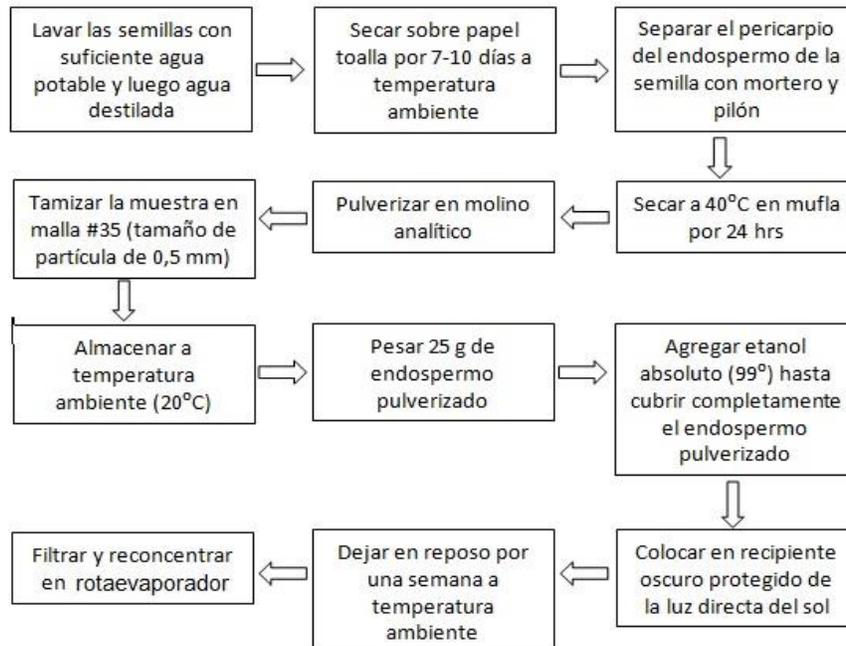


Figura 21: Flujograma de extracción por Reposo

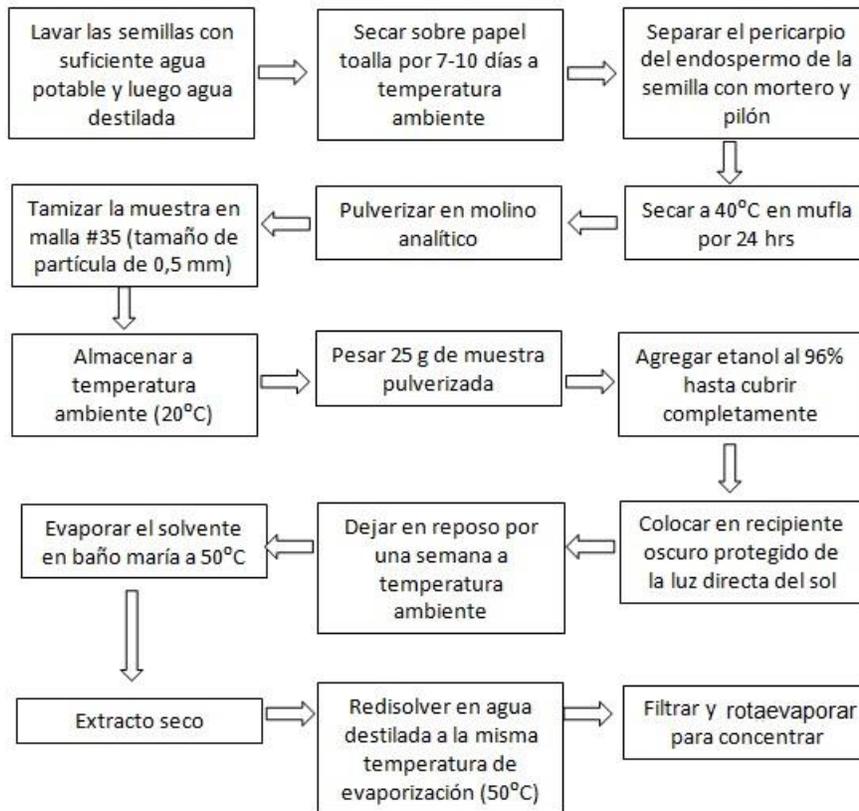


Figura 22: Flujograma de extracción por Baño María.

Anexo 9: Métodos de análisis proximales.

Determinación de Humedad y Materia Seca:

Procedimiento.

- Calibrar la balanza analítica previo a su uso según las indicaciones obtenidas por el fabricante.
- Colocar el número de crisoles a utilizar previamente rotulados para facilitar la identificación de la muestra en el horno tipo mufla (estufa) a una temperatura de 130° con una desviación de ± 3°C por un periodo de 1 hora, hasta obtener un peso constante.
Nota: manipular los crisoles con pinzas y tener precaución al ingresar los crisoles a la mufla, evitar el contacto de la piel con las paredes de la estufa.
- Dejar enfriar en desecador por al menos 40 min o hasta alcanzar temperatura ambiente.
- Tarar la balanza hasta que aparezca “0.0000g,” pesar los crisoles y registrar los valores obtenidos
- Pesar 2g de muestra previamente homogenizada y registrar su peso.
- Colocar los crisoles con la muestra en el horno (mufla) a 130° ± 3°C por un periodo de 1 hora.
Nota: la hora en el horno inicia cuando este logre su estabilización a 130°C
- Transcurrida la hora en el horno transferir los crisoles con la muestra a un desecador por un periodo de 40min (cuando hay varias muestras en un mismo desecador es recomendable incrementar el tiempo de enfriamiento a un estimado de 1 hora).
- Tarar la balanza y luego pesar los crisoles con la muestra seca
- Repetir este procedimiento hasta que las diferencias entre las lecturas (pesadas sucesivas) no excedan de 5mg.
- Realice la cuantificación de los resultados obtenidos para el % de humedad y la cantidad de sólidos totales a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\%humedad = \frac{P2 - P3}{P2 - P1} * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de humedad

$$\% \text{Sólidos totales} = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} * 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de sólidos

Dónde:

P1: Peso del crisol.

P2: Peso del crisol más muestra húmeda.

P3: Peso del crisol más muestra seca

Determinación de Cenizas:

Materiales (equipos, cristalería, reactivos).

- Balanza analítica con una precisión de 1 mg
- Crisol de porcelana poco profundo y relativamente ancho
- Pinzas
- Desecador
- Horno tipo Mufla
- Espátulas de acero inoxidable
- Guantes de asbesto

Reactivos.

Óxido de Calcio (CaO) calcinado y activo, No.CAS: 1305-78-8 Silica gel No. CAS: 7631-86-9

Procedimiento

- Calibrar la balanza antes de su uso de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Tarar la balanza vacía hasta que en la pantalla aparezca "0.0000 g".
- Calentar el crisol en la mufla por 2 horas a 550°C.
- Enfriar el crisol incinerado en un desecador y pesar en cuanto este alcance la temperatura ambiente.
- Pesar 3-5 gramos de la muestra previamente homogenizada en el crisol.
- Colocar el crisol con la muestra en la mufla e incinerar a aproximadamente 550°C (rojo oscuro) por 5 horas hasta generar cenizas de color gris claro o hasta peso constante.
- Transferir el(los) crisol(es) a un desecador (con CaO como agente desecante) hasta que alcance la temperatura ambiente.
- Pesar el crisol con la muestra tan pronto alcance temperatura ambiente y registrar el peso.
- Realice la Cuantificación de los resultados obtenidos para el % de cenizas en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{Cenizas} = \frac{P3 - P1}{P2 - P1} * 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de Cenizas

Dónde:

P1: Peso del crisol

P2: Peso del crisol + muestra.

P3: Peso del crisol + muestra incinerada.

Determinación de Extracto Etéreo.

Materiales:

Cristalería

- Desecador hermético.
- Balones
- Espátulas de acero inoxidable.
- Aparato de extracción Soxhlet, con sistema de extracción de 250 ml (Glass Col)
- Equipo de destilación

Equipos

- Balanza analítica con una precisión de 1 mg.
- Hornoprovistodeapertura para la ventilación y capacidad de mantener una temperatura de $130 \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Mantas de calentamiento (Glass Col)
- Termómetro
- Balanza analítica con legibilidad de 0.1 mg.

Materiales

- Dedal de extracción (Whatman).

Reactivos.

- Éter de petróleo No CAS 68476-50-6.

Procedimiento de lavado de balones y equipo de extracción.

Tratamiento del balón:

- Lavar los balones conteniendo 4 perlas de ebullición con éter de petróleo, secar dentro de la mufla a 103°C durante 30 minutos. Llevar los balones a peso constante.
- Lavar el equipo de extracción con éter de petróleo y dejar evaporar por unos minutos.

Procedimiento de extracción de lípidos con el solvente.

Realizar el análisis por duplicado.

- Pesar 10 g de muestra homogenizada, dentro del dedal de celulosa y registrar peso.
- Colocar el balón sobre la manta calefactora, conectada al soporte universal y añadir 130 ml de éter de petróleo al balón.
- Colocar el dedal de extracción dentro de los tubos condensadores, conteniendo 10 g de muestra y 20 ml de éter de petróleo.
- Fijar las piezas sobre el balón, completar el montaje del dispositivo de extracción (refrigerante, mangueras de flujo de agua). Verificar que no halla fuga de solvente.
- Tapar la parte superior del reflujo con sulfato sódico anhídrido envuelto en un pedazo de algodón. Colocar un frasco de vidrio para mayor seguridad.
- Conectar la manta calefactora y regular la temperatura en un rango de 38-54 0C (punto de ebullición del éter).
- Mantener la muestra en reflujo durante 16 horas. Durante este tiempo los lípidos se irán acumulando en el balón, al finalizar la última extracción, retirar el condensador, extraer dedal y retirar de la manta el balón conteniendo éter recuperado.

Procedimiento de recuperación del éter.

- Armar el equipo de destilación, colocar el balón sobre la manta calefactora (38-54 0C), y realizar el destilado por tiempo necesario.
- Después que se evapore la mayor parte del solvente, los lípidos quedan retenidos en el balón y el éter recuperado se colecta en un envase rotulado.
- Una vez separado el solvente, el balón se seca durante 60 minutos a 130 °C en mufla. Esperar que se enfríe y pesarlo.

Cuantificación del contenido de grasa

$$\% \text{ de Grasa} = \frac{m2 - m1}{M} \times 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de Grasas

Dónde:

m1: Masa en gramos del balón vacío.

m2: Masa en gramos del balón con grasa después el secado.

M: Masa de la muestra en gramos.

Determinación de Proteínas.

A. Digestión de la muestra.

- Estabilizar el bloque digestor una hora antes de iniciado el proceso a 400°C
- Pesar las muestras en una balanza analítica con sensibilidad de 0.001. con ayuda de papel aluminio.
- Transferir las muestras a los tubos Kjeldahl.
- Adicionar una tableta Kjeldahl a cada tubo que contenga muestra, para muestras entre 500 mg,-1000mg añadir de 10 ml a 12 ml de H₂SO₄ respectivamente
- Añadir 4 perlas de ebullición. Digestar durante 60 minutos dentro de la campana de extracción en un bloque de digestión precalentado a 380°C.
- sacar el rack con los tubos Kjeldahl del bloque digestor dejar enfriar de 5-8 minutos.
- Adicionar 30 ml de H₂O destilada a 70°C aproximadamente a cada tubo que contiene la muestra digestada.

B. Destilación y titulación de la muestras

- Para efectuar la destilación, colocar un beacker PYREX, un vaso de precipitado o Erlenmeyer de 125 ml de capacidad, conteniendo 5 ml de ácido bórico saturado (H₃BO₃) y 2-4 gotas del indicador, y colocarlo bajo el condensador.
- Asegúrese que la terminal del condensador este inmersa en la solución.
- Seguidamente, transferir la muestra digestada a la cámara interna del sistema de destilación Kjeldahl. A continuación, añadir 50 ml de hidróxido de sodio al 40 % (NaOH).
- Realizar al menos dos lavados de todo el sistema con H₂O destilada y Extrán previo a dar pase a cada muestra.
- Encender el generador de vapor y destilar a 80-90°C, hasta obtener aproximadamente 15 ml de destilado y diluirlo hasta 50 ml.
- Titular directamente con 0.02 M ácido clorhídrico, colocado en una bureta hasta obtener el cambio de color a violeta.

Nota: Usar 2.5 ml H₃BO₃, y 1-2 gotas del indicador, y diluir a aproximadamente a 25 ml si 0.01 M HCl es usado.

- Efectuar la determinación de los blancos, los testigos y las muestras.
- Identificación y cuantificación de los compuestos de interés

$$N = \frac{(ml\ HCl - ml\ Blanco) * molaridad * 14.007}{mg\ muestra} * 100$$

Ecuación 5. Porcentaje de Nitrógeno

$$\% \text{ Proteinas} = (\% N)(6.25)$$

Ecuación 6: Factor de conversión a porcentaje de Proteínas

Anexo 10: Método de Extracción Soxhlet.

Método de Extracción Soxhlet.

Amar el equipo de extracción Soxhlet. Pesar en una balanza analítica 15g de harina de semilla de guanábana por duplicado. Colocar en la corneta del equipo, el dedal (cartucho elaborado de filtro de hemicelulosa) que contiene 15g de harina de la semilla previamente pesados y proceder a adicionar el solvente (etanol 96%), por un tiempo de extracción de 16 horas.

Colocar el extracto en un envase oscuro y dejar en reposo durante aproximadamente una semana a temperatura ambiente en un lugar limpio, seco y protegido de la luz directa del sol, hasta eliminar la mayor cantidad de solvente.

Preparación de la solución madre a concentración de 150,000 ppm

Pesar 15 g de harina en una balanza analítica de precisión 0.0001 colocar la muestra en dedales de hemicelulosa. Montar el equipo de extracción Soxhlet, en un balón volumétrico de 250 ml, adicionar aproximadamente 100 ml del solvente utilizado en la extracción (etanol 96%), por un tiempo de extracción de 16 horas.

4.2.3.4 Preparación del extracto a diferentes concentraciones.

Para la preparación de las soluciones a diferentes concentraciones se utilizó la siguiente fórmula matemática:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Ecuación 7. Fórmula para soluciones y diluciones

Dónde:

C1: Concentración de la solución madre

V1: Alícuota a tomar de la solución madre, para preparar la concentración adecuada

C2: Concentración a preparar

V2: Volumen a preparar

Anexo 11: Lista de Materiales.

Reactivos

Etanol 96% y 99%

Agua Destilada

Agua Desionizada

Ácido Clorhídrico
(HCl)

Tabletas Kjeldahl

Hidróxido de Sodio
(NaOH)

Éter de Petróleo

Ácido Sulfúrico
(H₂SO₄)

Ácido Bórico (H₃Bo₃)

Rojo de Metilo

Verde de Bromocrisol

Extrán

Cloro (Cl)

Silica Gel

Aceite Vegetal

Nitrógeno (N)

Equipo de laboratorio

Balanza analítica
Sartorius

Balanza de
precisión Sartorius

Mantas de
Calentamiento

Plato caliente y
agitador

Bloque de digestión
Kjeldahl

Destilador

Campana extractora
de gases

Horno de Convección

Horno Muffla

Desecador

Micropipeta Brand

Termómetro

Dedales

Pinzas

Pizetas

Goteros

Espátulas

Bisturí

Cristalería

Buretra

Equipo Soxhlet

Tubos Kjeldahl

Condensador

Tubos de ensayo
PYREX

Balones de 100ml
PYREX

Balones de aforo

Pipetas Pasteur

Beakers 1000-10 ml

Crisoles

Perlas de ebullición

Erlenmeyer

Probetas

Platos Petri

Morteros y pilones

Embudos de cristal

Frascos gerber y
mostaceros

Tubos Falcon

Magentas

Frascos Ámbar

Anexo 12: Procesamiento de los frutos de *Annona muricata* L. (Guanábana).

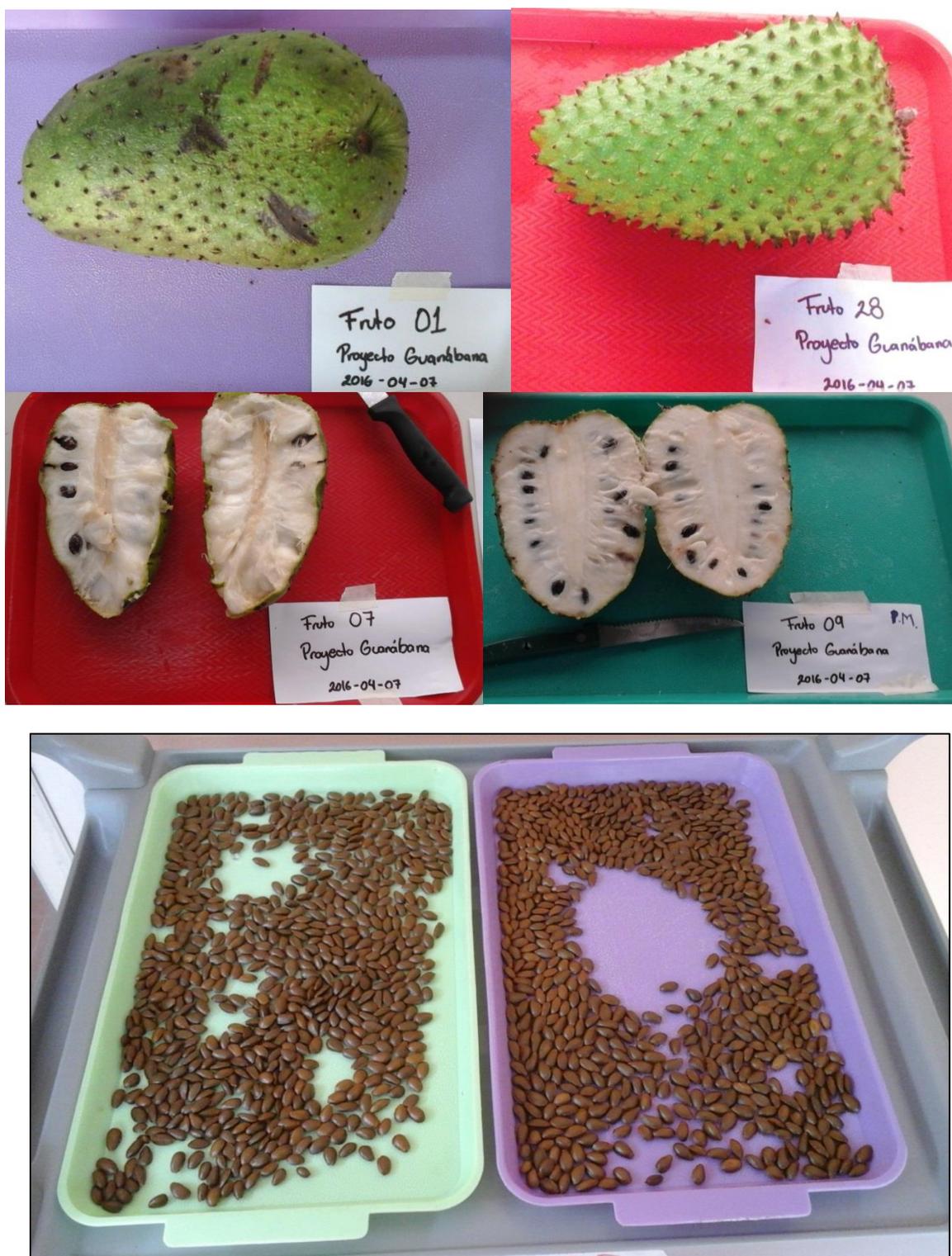


Figura 23. Caracterización de los frutos y obtención de las semillas



Figura 24. Separación de las semillas: 1) División manual de las partes de la semilla, 2) Testa y Endospermo.

Anexo 13: Análisis proximales.



Figura 25. Análisis de Cenizas: 1) Peso de la muestra de harina, 2) Muestras pesadas listas para entrar en la mufla, 3) Incineración de las muestras, 4) Muestras incineradas en el desecador, 5) Peso final de las cenizas, 6) Cenizas obtenidas por número de crisol.

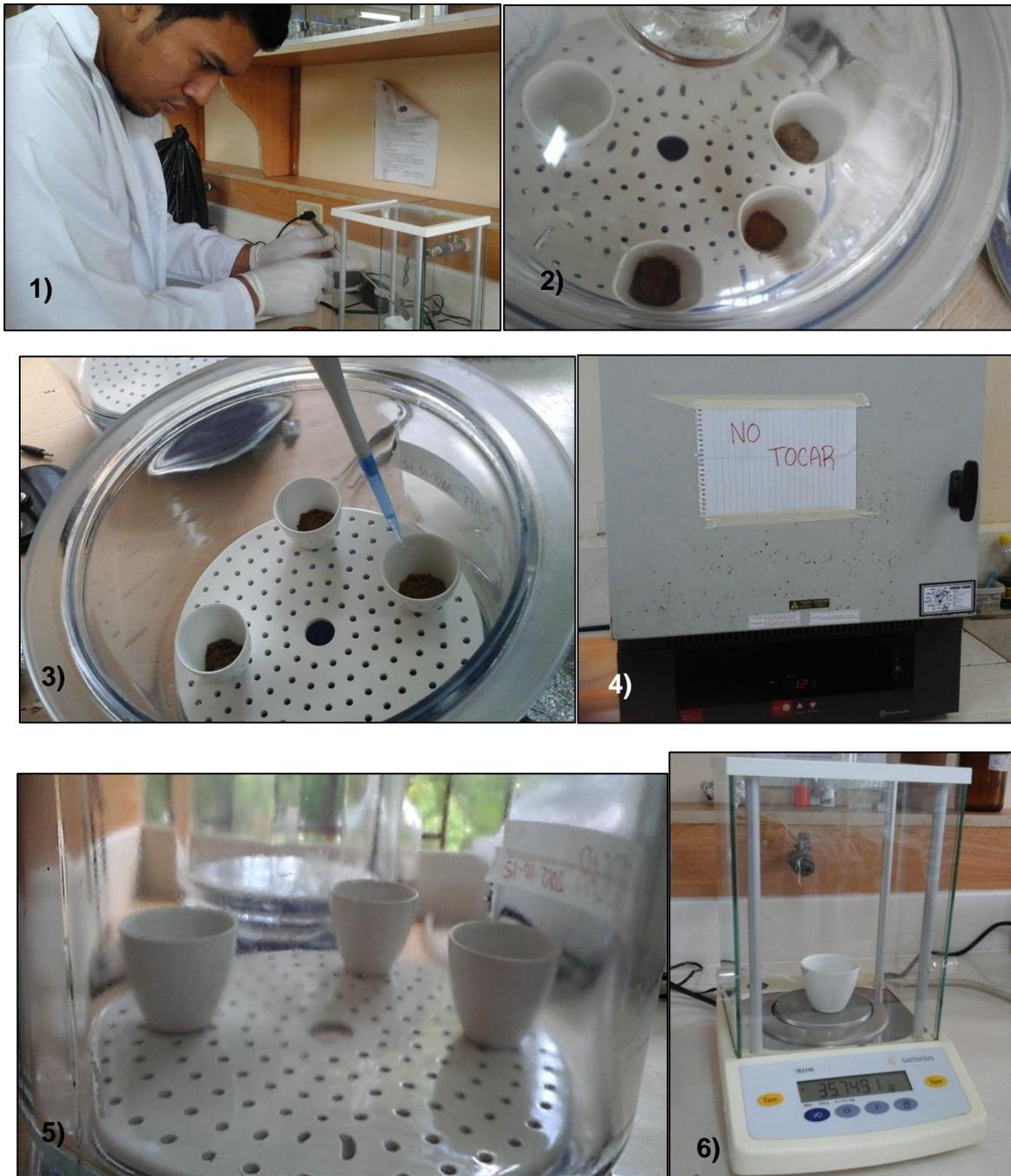


Figura 26. Análisis de Humedad y Materia Seca:1) Peso de la muestra, 2)Muestras en el desecador, 3) Adición de agua a las muestras, 4) Secado de las muestras en Mufla,5) Muestras recién salidas de la mufla enfriando en el desecador, 6) Peso total de la muestras después del secado.

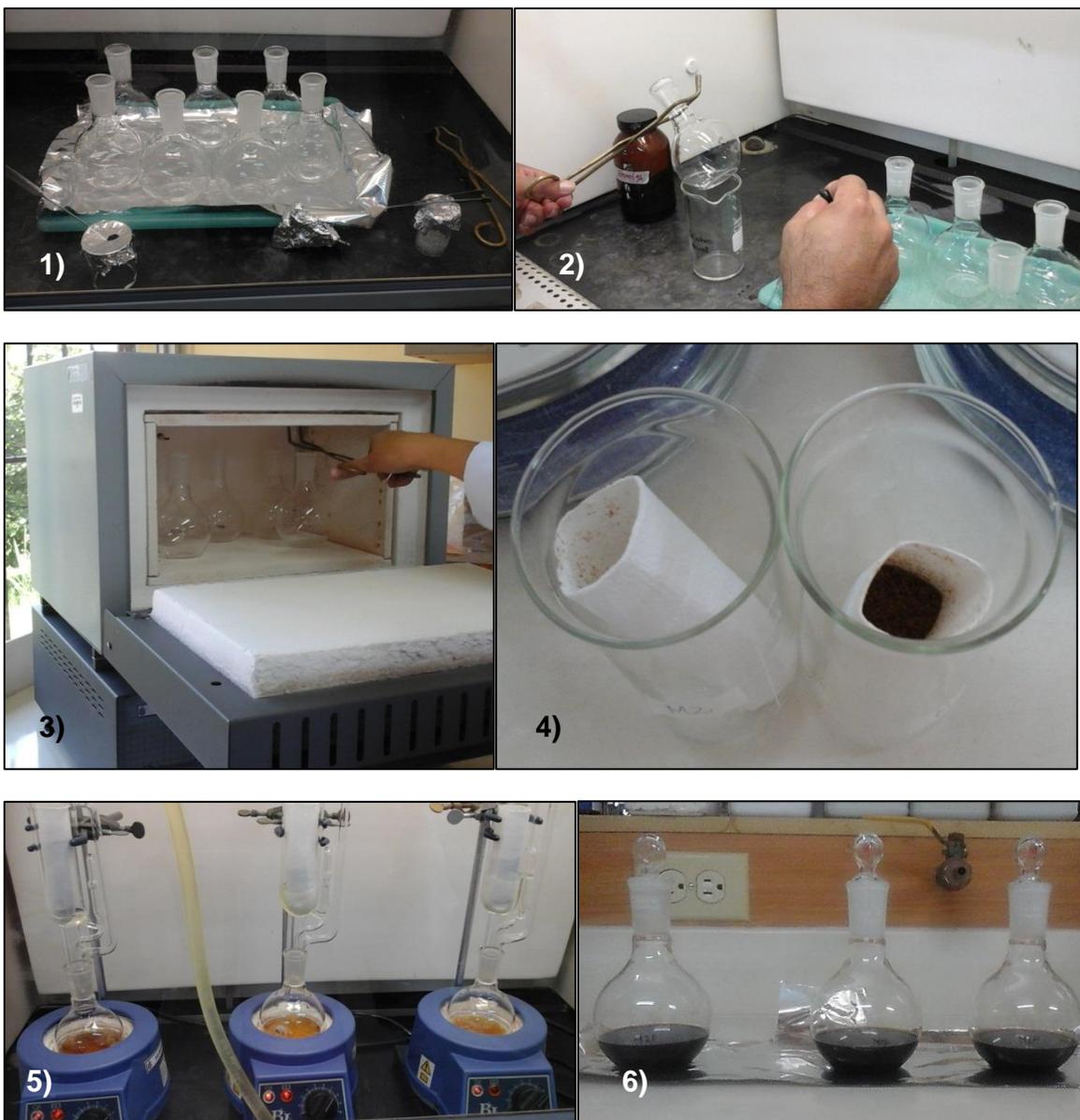


Figura 27. Análisis de Extracto Etéreo: 1) Preparación de balones, 2) Endulzado de balones con etanol 96%, 3) Balones a peso constante, 4) Muestras de harina de semilla en dedales de hemicelulosa, 5) Destilación Soxhlet, 6) Extracto etéreo obtenido.

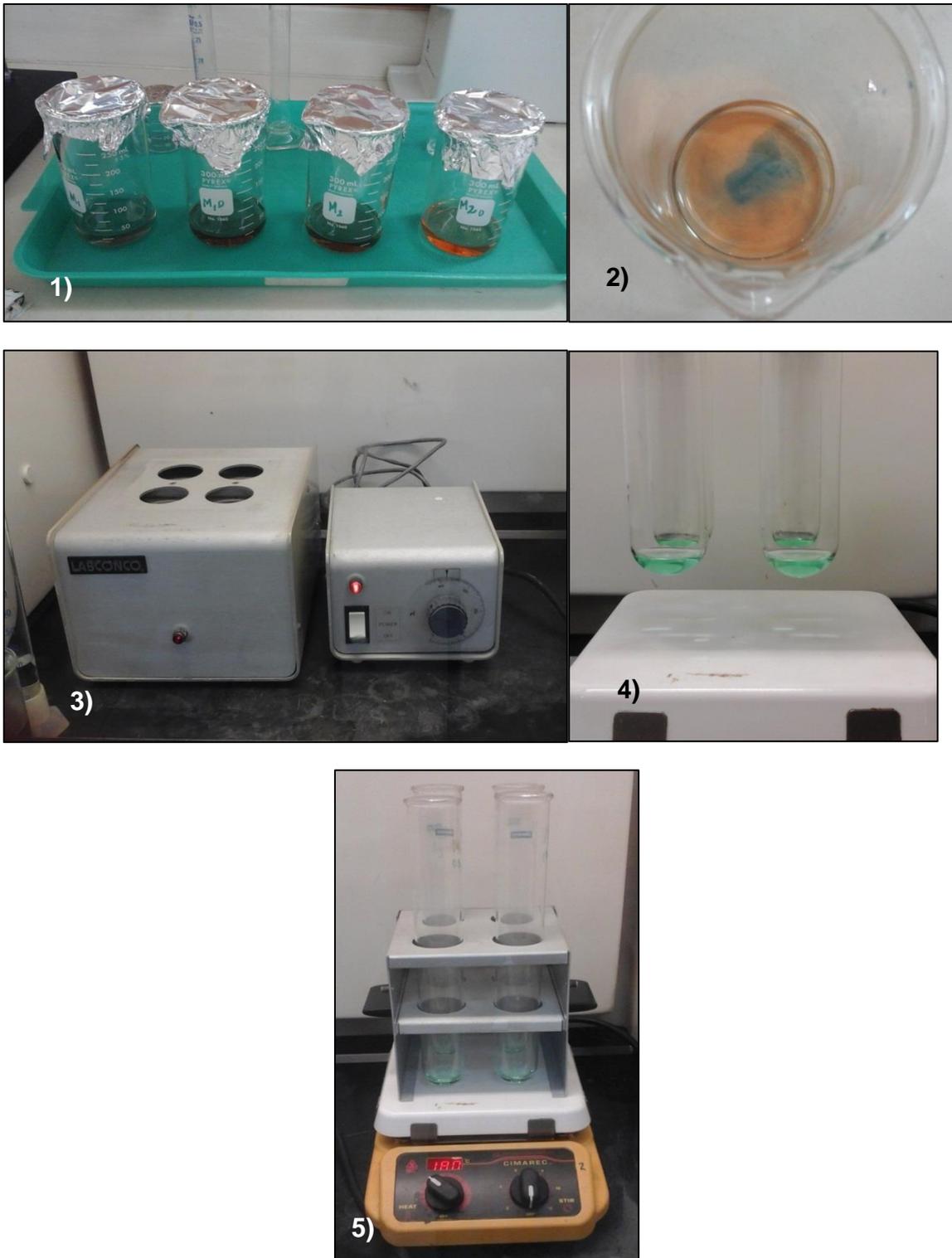


Figura 28. Análisis de Proteínas, Digestión: 1) Beakers con indicador Rojo de Metilo, 2) Adición de Verde de Bromocrisol a beakers, 3) Bloque digestor, 4) Muestras digeridas, 5) Tubos Kjeldahl con muestras digeridas aclimatándose con temperatura más baja.

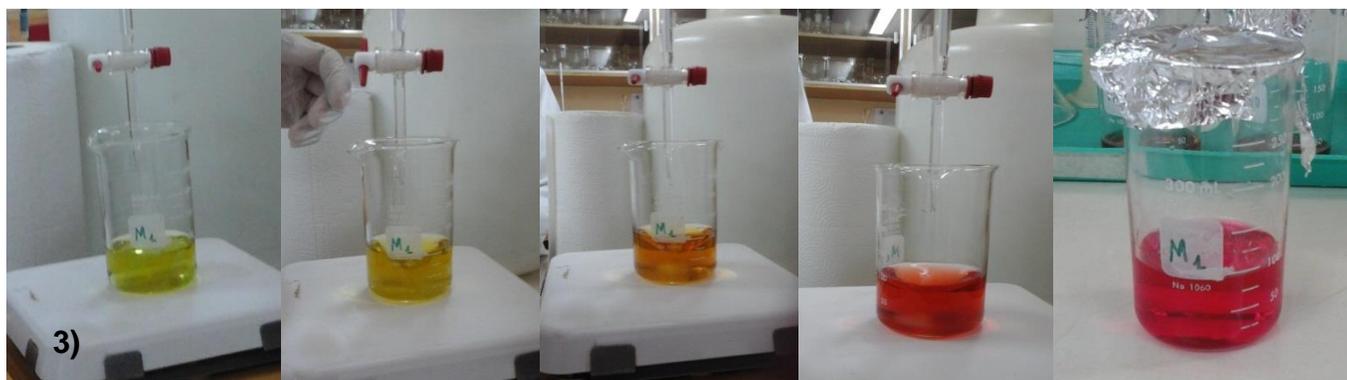
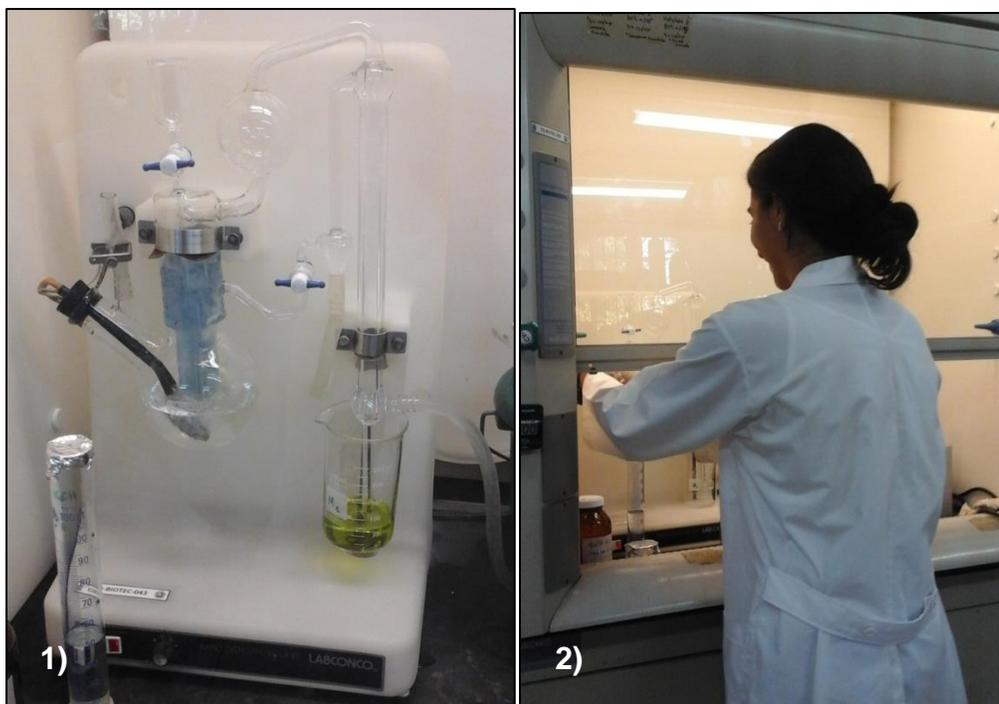


Figura 29. Análisis de Proteínas, Destilación y Titulación: 1) Micro destilador con muestra digerida, 2) Destilando cada 8 minutos, 3) Titulación y cambio de color de la muestra, 4) Color final de la muestra.

Anexo 14: Extractos etanólicos de semilla de *Annona muricata* L.

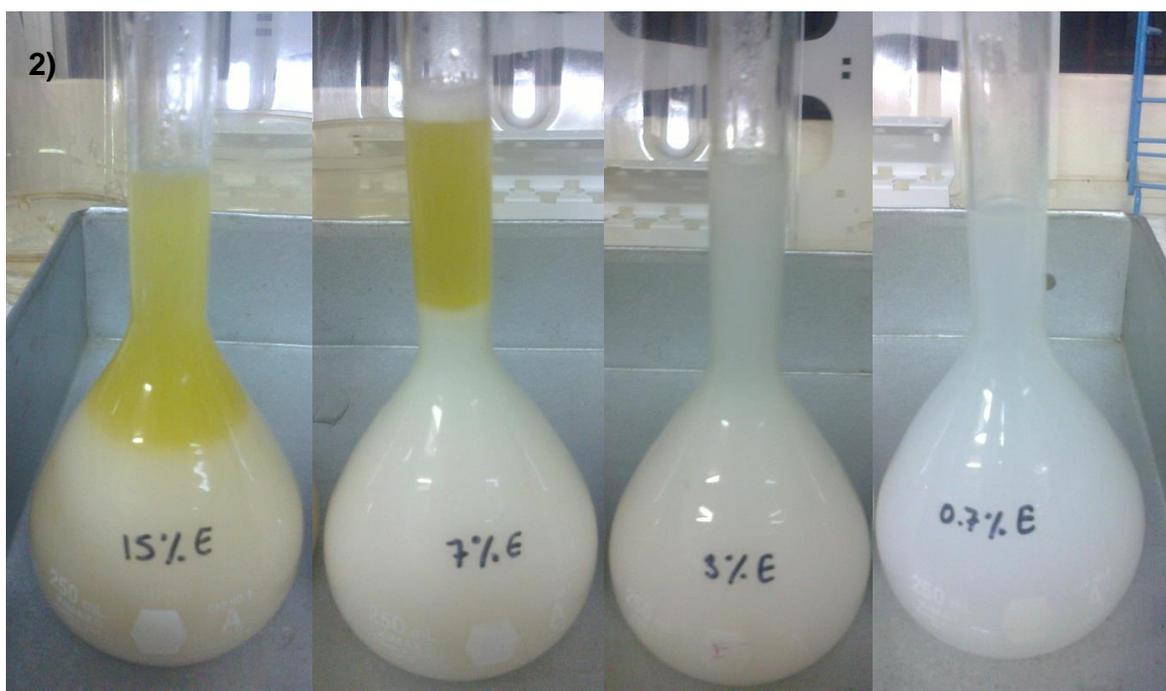


Figura 30. Extractos (previos al calentamiento y agitación para homogenización): 1) Concentraciones de Semilla Completa, 2) Concentraciones de Endospermo.

Anexo 15: Montaje del Bioensayo.



Figura 31. Mantenimiento de larvas: 1) Magentas con alimento, 2) Larvas dentro de las magentas, 3) Larvas separadas en tubos de ensayo, 4) Preparación de alimentos.



Figura 32. Preparación del bioensayo: 1) Etiketación de frascos por concentración, 2) Traslado de gusanos a los frascos, 3) Orden y sellado de frascos.



Figura 33. Bioensayo:1) Mesa con extracto de Endospermo, 2) Mesa con extracto de Semilla Completa, 3) Aplicación de las concentraciones, 4) Recolecta de datos.