

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA



Relación dosis-respuesta de la azadiractina en *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith): un estudio por instares larvales, bajo condiciones de laboratorio

Mayda Yarely Reatiga Pulido

CC. 1098476031

Zilenyi Vanessa Cañas Meaury

CC. 1005012510

Programa de Ingeniería Agronómica

Mayo, 2025

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA



Relación dosis-respuesta de la azadiractina en *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith): un estudio por instares larvales, bajo condiciones de laboratorio

Mayda Yarely Reatiga Pulido

CC. 1098476031

Zilenyi Vanessa Cañas Meaury

CC. 1005012510

Trabajo de grado de la modalidad de investigación presentado como requisito para optar el título de Ingeniero Agrónomo

Director: Humberto Giraldo Vanegas

Ingeniero Agrónomo, Ph. D. en Entomología

Facultad de Ciencias Agrarias

Programa de Ingeniería Agronómica

Mayo, 2025

Agradecimientos

Llegar hasta este punto ha sido un camino lleno de aprendizajes, desafíos y crecimiento personal. Este logro no hubiera sido posible sin el acompañamiento de personas fundamentales en mi vida, a quienes hoy quiero agradecer sinceramente. Quiero agradecer a Dios, por brindarme la oportunidad de vivir esta experiencia, de crecer personal y profesionalmente, y por darme la fortaleza para superar cada reto del camino. A mis padres, Ambrosio Cañas y Gloria Meaury por ser mi mayor fuente de fortaleza y ejemplo. Gracias por su amor, por su apoyo incansable y por enseñarme, con su vida, el valor de la dedicación y el esfuerzo. A mi hermano, Arturo Cañas por su compañía, sus palabras de ánimo y por estar presente brindándome su respaldo. A Adrián Cáceres, mi novio, por su comprensión, su apoyo emocional y su compañía incondicional en los momentos más exigentes. Gracias por estar, motivarme y confiar en mí. A mi tutor el I.A., Doctor en Entomología Humberto Giraldo Vanegas, por su valiosa orientación, por compartir sus conocimientos y por acompañarnos con paciencia y compromiso durante el desarrollo de esta tesis. A mi compañera de trabajo Mayda Reatiga, con quien compartí esta experiencia desde el inicio. Gracias por su dedicación, por el trabajo en equipo, por su compromiso y por cada esfuerzo compartido que hizo posible alcanzar esta meta juntas

Zilenyi Vanessa Cañas Meaury

Agradecimientos

Con total gratitud a Dios por permitirme participar en este proceso de aprendizaje, por motivarme y darme la fuerza para superar cada uno de los retos que se presentaron.

Dedico esta tesis de grado a mis padres, Yolanda Pulido y Juan Reatiga, por su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanos, Edison Reatiga, Andrea Reatiga y Danian Reatiga, quienes han respaldado incondicionalmente mi camino.

A mi pareja, Edison Villamizar, por motivarme en los días más difíciles y por su constante compañía.

Agradezco profundamente el apoyo y la dedicación de nuestro tutor, Humberto Giraldo Vanegas; sin él, este proceso no habría sido posible. Infinitas gracias por compartir sus conocimientos, su tiempo y su paciencia.

A mi compañera de tesis, Zilenyi Cañas, le agradezco por estar siempre presente, por formar un gran equipo juntas, por reforzar cada idea y mejorarla

Mayda Yarely Reatiga Pulido

CONTENIDO

1. Resumen.....	10
Abstract	11
2. Introducción.....	12
3. Planteamiento del problema.....	14
3.1 Formulación del problema	15
4. Justificación.....	16
5. Delimitación	18
6. Objetivo general	19
6.1. Objetivos específicos	19
7. Marco teórico.....	20
7.1. Antecedentes	20
7.1.1. Antecedentes regionales	20
7.1.2. Antecedentes nacionales.....	23
7.1.3. Antecedentes internacionales.....	24
7.2. Marco contextual	28
7.3 Bases conceptuales	29
7.3.1. Origen y características morfológicas del maíz	29
7.3.2. Clasificación taxonómica	29
7.3.3. Origen y distribución del cogollero del maíz	30
7.3.4. Clasificación taxonómica	30
7.3.5. Ciclo de vida	31
7.3.6. Daños ocasionados por <i>S. frugiperda</i>	33
7.3.7. Origen y características morfológicas del árbol de Neem.....	33

7.3.8. Clasificación taxonómica	34
7.3.9. Azadiractina	35
7.3.10. Concentración Letal Media.....	36
7.3.11. El Tiempo Letal Medio	36
7.4. Marco legal.....	37
7.4.1. Acuerdo No. 186.....	37
6.4.2. Resoluciones del Instituto Colombiano Agropecuario.....	38
8. Metodología.....	41
8.1. Tipo de Investigación.....	41
8.2. Diseño Metodológico.....	41
8.2.1. Hipótesis	42
8.3. Descripción de las variables y método de análisis de resultados	42
8.3.1. Variables dependientes (respuesta):	42
8.3.2. Variables independientes (factores experimentales):	43
8.3.3. Variables controladas:	43
8.4. Diseño de la investigación	44
8.4.1. Localización del ensayo	44
8.5. Diseño Experimental.....	44
8.6. Actividades preparatorias al montaje del bioensayo	44
8.6.1. Obtención de huevos de <i>S. frugiperda</i>	45
8.6.2. Implementación del Bioensayo Toxicológico	46
8.6.3. Preparación de las concentraciones.....	48
8.6.4. Criterios de selección y estandarización de instares larvales para el bioensayo. 49	
8.7. Descripción de las Actividades	50

8.7.1. Primer Objetivo: Determinar la concentración de azadiractina necesaria para causar la muerte del 50% de la población en prueba, en cada instar larval (CL ₅₀)	50
8.7.2. Segundo Objetivo: Estimar el tiempo requerido para que la azadiractina cause la muerte del 50% de la población en prueba, en cada instar larval (TL ₅₀).....	52
8.7.3. Análisis de datos.	52
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
9.1. Primer Objetivo Especifico	54
9.2. Discusión Científica del ANOVA Trifactorial.....	61
9.3. Análisis de Regresión Probit Conjunta (Todos los Instares).	65
9.3.3. Análisis integral de CL ₅₀ en los seis instares larvales de <i>S. frugiperda</i>	65
9.3.4. Comparación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) y el Coeficiente de Determinación (R ²), según el instar larval de <i>S. frugiperda</i> , tratados con aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.....	67
9.2. Segundo Objetivo Específico	69
9.2.1. Determinación del Tiempo Letal Medio (TL ₅₀) para los seis instares de <i>S. frugiperda</i>	69
9.2.2. Análisis del umbral fisiológico entre instares larvales de <i>S. frugiperda</i> tratados con aceite de neem	80
9.2.3. Discusión del ANOVA trifactorial.....	82
10. Conclusiones.....	87
11. Recomendaciones	88
12. Bibliografía.....	89
13. Anexos	96

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Zea mays</i> L.	29
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>S. frugiperda</i>	30
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	34
Tabla 4. Concentraciones (ml/L) y Concentración realmente aplicada (μ L/L), en el bioensayo en condiciones de laboratorio.	48
Tabla 5. Parámetros temporales de los instares larvarios de <i>S. frugiperda</i> utilizados en el diseño experimental.	49
Tabla 6. Comparación de medias de las mortalidades totales (%) causadas por seis concentraciones de aceite de Neem, sobre los seis instares larvales de <i>S. frugiperda</i> , en condiciones de laboratorio.....	54
Tabla 7. Ecuaciones de Regresión, Coeficiente de Determinación y Concentración Letal Media para cada instar larval de <i>S. frugiperda</i>	55
Tabla 8. Análisis de varianza trifactorial realizado en SPSS.	63
Tabla 9. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de primer instar de <i>S. frugiperda</i> expuestas a diferentes concentraciones de aceite de neem.	70
Tabla 10. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de segundo instar de <i>S. frugiperda</i> expuestas a diferentes concentraciones de aceite de neem.	71
Tabla 11. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de tercer instar de <i>S. frugiperda</i> tratadas con distintas concentraciones de aceite de neem.	72
Tabla 12. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de cuarto instar de <i>S. frugiperda</i> expuestas a distintas concentraciones de aceite de neem.	73
Tabla 13. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de quinto instar de <i>S. frugiperda</i> tratadas con diferentes concentraciones de aceite de neem.	74
Tabla 14. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de sexto instar de <i>S. frugiperda</i> expuestas a diferentes concentraciones de aceite de neem.	75
Tabla 15. Anova factorial de la Prueba de efectos inter-sujetos.....	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del laboratorio de Sanidad Vegetal.....	28
Figura 2. Morfología de <i>S. frugiperda</i>	32
Figura 3. Árbol de neem (A), frutos de neem (B), Insectisida neemazal: aceite de neem con azadiractina (C), semillas de neem (D).	34
Figura 4. Recolección de huevos (A), Recipiente de almacenamiento (B), individualización de larvas (C).	45
Figura 5. Recipiente de almacenamiento individual (D), Preparación de mezcla con Mixel TOP y NEEMAZAL (E), inmersión de discos de maíz en solución de control (F).	47
Figura 6. Concentraciones preparadas.	49
Figura 7. Regresión Probit del primer instar larval de <i>S. frugiperda</i> , sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio	56
Figura 8. Regresión Probit del segundo instar larval de <i>S. frugiperda</i> , sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.	57
Figura 9. Regresión Probit del tercer instar larval de <i>S. frugiperda</i> , sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.	58
Figura 10. Regresión Probit del cuarto instar larval de <i>S. frugiperda</i> , sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.	59
Figura 11. Regresión Probit del quinto instar larval de <i>S. frugiperda</i> , sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio	60
Figura 12. Regresión Probit del sexto instar larval de <i>S. frugiperda</i> , sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio	61
Figura 13. Regresión Probit Conjunta de los seis instares larvales de <i>S. frugiperda</i> , sometidos a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.	67
Figura 14. Comparación de la Concentración Letal Media ($\mu\text{L/l}$) y el Coeficiente de Determinación (R^2), según el instar larval de <i>S. frugiperda</i> , tratados con aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.	69
Figura 15. Comparación de los valores de TL_{50} entre los seis instares larvales de <i>S. frugiperda</i> expuestos al aceite de neem.....	79
Figura 16. Relación global entre la concentración del aceite de neem y el TL_{50} promedio para los seis instares larvales de <i>S. frugiperda</i>	80

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Instrumento para la toma de datos de Mortalidad de larvas.....	96
Anexo 2. Recolección de huevos.....	96
Anexo 3. Almacenamiento de posturas de <i>S. frugiperda</i> en vasos de 250 ml	97
Anexo 4. Siembra y recolección del maíz para la alimentación de las larvas.	97
Anexo 5. Individualización de cada larva en vasos de 25ml.....	98
Anexo 6. Ciclo de preparación para cada ensayo	98
Anexo 7. Recortes de discos de maíz y sumergencia a cada concentración	99
Anexo 8. Secado de los discos tratados y adición a cada envase que contiene una larva.....	99
Anexo 9. Toma de datos para el primer instar.....	100
Anexo 10. Toma de datos para el segundo instar	100
Anexo 11. Toma de datos para el tercer instar.	101
Anexo 12. Toma de datos para el cuarto instar	101
Anexo 13. Toma de datos para el quinto instar	101
Anexo 14. Toma de datos para el sexto instar.....	102
Anexo 15. Planillas de registro de datos para el primer ensayo con larvas de primer instar.	102
Anexo 16. Planillas de registro de datos para el segundo ensayo con larvas de segundo instar. ..	104
Anexo 17. Planillas de registro de datos para el tercer ensayo con larvas de tercer instar.....	105
Anexo 18. Planillas de registro de datos para el cuarto ensayo con larvas de cuarto instar.....	107
Anexo 19. Planillas de registro de datos para el quinto ensayo con larvas de quinto instar.	109
Anexo 20. Planillas de registro de datos para el sexto ensayo con larvas de sexto instar.....	111

1. Resumen

Este estudio evaluó el efecto de la Concentración Letal Media (CL₅₀) y el Tiempo Letal Medio (TL₅₀) del aceite de neem *Azadirachta indica* A. Juss, sobre los seis instares larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) bajo condiciones de laboratorio. Para la CL₅₀, los valores aumentaron progresivamente desde 579.67 µL/L en el primer instar hasta 921.36 µL/L en el sexto, lo que evidencio una disminución de la susceptibilidad larval conforme avanza el desarrollo. Los coeficientes de determinación (R²) oscilaron entre 0.94 y 0.95, lo que confirma un modelo predictivo robusto. La concentración promedio de CL₅₀ conjunta fue de 740.4 µL/L, suficiente para inducir una mortalidad del 50% en poblaciones mixtas. Respecto al TL₅₀, los instares jóvenes presentaron tiempos de letalidad más cortos (52.39 h en el primer instar y 37.88 h en el tercero), mientras que los instares avanzados mostraron una resistencia progresiva, alcanzando valores extremos de hasta 409.85 h, esta diferencia representa un incremento del 271.3 % entre los primeros y últimos instares, lo que equivale a un aumento aproximado de tres veces en comparación con los estadios iniciales. El análisis de regresión y el ANOVA trifactorial confirmaron que la eficacia del aceite de neem es dosis-dependiente y altamente influenciada por el instar larval y el tiempo de exposición. Estos resultados resaltan la importancia de aplicar el aceite de neem en etapas tempranas del ciclo larval para maximizar su efectividad y evitar el desarrollo de resistencia.

Palabras clave: gusano cogollero del maíz, aceite de neem, CL₅₀, TL₅₀, bioensayo, control fitoquímico.

Abstract

This study evaluated the effect of Median Lethal Concentration (MLC_{50}) and Median Lethal Time (ML_{50}) of neem oil, *Azadirachta indica* A. Juss, on the six larval instars of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) under laboratory conditions. ML_{50} values progressively increased from 579.67 $\mu\text{L/L}$ at the first instar to 921.36 $\mu\text{L/L}$ at the sixth, indicating a decrease in larval susceptibility with development. Coefficients of determination (R^2) ranged from 0.94 to 0.95, confirming a robust predictive model. The average pooled ML_{50} concentration was 740.4 $\mu\text{L/L}$, sufficient to induce 50% mortality in mixed populations. Regarding TL_{50} , young instars presented shorter lethality times (52.39 h in the first instar and 37.88 h in the third), while advanced instars showed progressive resistance, reaching extreme values of up to 409.85 h, this difference represents an increase of 271.3% between the first and last instars, which is equivalent to an approximate three-fold increase compared to the initial stages. Regression analysis and three-way ANOVA confirmed that the efficacy of neem oil is dose-dependent and highly influenced by the larval instar and exposure time. These results highlight the importance of applying neem oil at early stages of the larval cycle to maximize its effectiveness and prevent the development of resistance.

Keywords: corn earworm, neem oil, LC_{50} , LT_{50} , bioassay, phytochemical control.

2. Introducción

El maíz *Zea mays* L., es considerado uno de los tres cereales más consumidos a nivel mundial junto con el trigo y el arroz, este cereal pertenece a la familia de las gramíneas cuya descripción taxonómica corresponde a una especie monocotiledónea de crecimiento anual y un ciclo vegetativo muy amplio (Grande & Orozco, 2013). En Colombia, es uno de los cultivos más relevantes en el sector agroalimentario, y es el cultivo con mayor extensión de siembra después del café y el arroz, en cuanto a importaciones ocupa el primer lugar en Suramérica y el séptimo a nivel mundial (Fenalce, 2019).

El cultivo de maíz presenta diversos problemas fitosanitarios para su producción, dentro de las principales se encuentran las arvenses, enfermedades e insectos plaga, estos últimos destacan debido al daño que ocasionan y se estima que provocan pérdidas en rendimiento de 30%. Se presentan desde el establecimiento del cultivo hasta el almacenamiento del grano (Hernández et al., 2019). La incidencia de los insectos plaga y el daño que ocasionan en los cultivos, se debe por diversos factores como las condiciones ambientales, fenología del cultivo y hábitos del insecto plaga, ya sea alimenticios e inclusive características biológicas, se reporta que el maíz es dañado por más de 70 especies de insectos plaga, siendo una de las más limitantes *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) también conocido como gusano cogollero (Hernández et al., 2019).

S. frugiperda se detectó por primera vez en América, siendo originaria de las regiones tropicales y subtropicales, pertenece a la familia Noctuidae y al orden Lepidoptera, siendo una plaga polífaga que causa daños a cultivos de cereales económicamente importantes como maíz, arroz, sorgo, algodón y varios cultivos de hortalizas. Las lesiones comienzan con la etapa larvaria, que forma ventanas de papel de distintos tamaños en las hojas, lo que provoca una defoliación extensa de las plantas, la aparición de material fecal y, en una etapa posterior, el crecimiento y el desarrollo de las plantas se ven afectados (Sagar et al., 2020).

El gusano cogollero presenta cuatro estadios de desarrollo diferenciados (adulto, huevo, larva y pupa). Las larvas pasan por seis estadios o mudas, donde los dos primeros son los de mayor importancia para tomar las medidas de control. El daño ocasionado por las larvas durante los primeros días de desarrollo de la planta puede ser de dos tipos, corta la planta cerca del suelo (al actuar como oruga cortadora) o consume de forma parcial o total las láminas (oruga defoliadora), lo que puede causar la muerte de la planta si afecta al meristemo apical (Ávila et al., 2023).

Es importante mencionar que el principal método de control de *S. frugiperda* son los insecticidas químicos (Baudrot et al., 2023). Los efectos que posee la aplicación de productos químicos sobre los sistemas de producción agrícola han sido adaptados efectivamente, siendo una estrategia de amplio espectro y de acción rápida. Esto último ha favorecido a la contaminación con diversos efectos en el ambiente. (Hernández et al., 2019). Por lo anterior, es necesario crear alternativas de control biológico, físico y fitoquímico que reduzcan el uso de químicos. Dentro del control fitoquímico, están los extractos vegetales donde se encuentra el árbol de Neem *Azadirachta indica* (A. Juss), el cual contiene una variedad de compuestos, siendo la azadiractina (AZA) el principal compuesto activo extraído de las hojas y las semillas. Este producto vegetal es uno de los más favorables para el manejo integrado de plagas y es producido exclusivamente por *A. indica* (Carvajal, 2020).

Este estudio tuvo como propósito evaluar la susceptibilidad diferencial de los seis instares larvales de *S. frugiperda* frente a la azadiractina formulada en aceite, mediante la determinación cuantitativa de parámetros toxicológicos críticos como la Concentración Letal Media (CL₅₀) y el Tiempo Letal Medio (TL₅₀) bajo condiciones controladas de laboratorio. La investigación busca generar evidencia empírica que valide la incorporación de bioinsecticidas derivados del neem como componente efectivo en estrategias de manejo integrado del cogollero del maíz.

3. Planteamiento del problema

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) es considerada la plaga más importante del maíz en muchas regiones de América, además tiene un impacto económico causando daños del 60 % en el rendimiento (Tay et al., 2023). Este insecto representa una amenaza significativa debido a su capacidad de adaptarse a diversas condiciones ambientales y a su alta tasa de reproducción, lo que facilita su proliferación en campos agrícolas (Salazar et al., 2020)

El control de *S. frugiperda* tradicionalmente se ha centrado en el uso intensivo de insecticidas químicos como una medida rápida y efectiva para mitigar los daños. Sin embargo, esta estrategia tiene serias consecuencias. Por un lado, el uso constante y excesivo de químicos contribuye significativamente a la contaminación del medio ambiente, afectando la calidad del suelo, el agua y los ecosistemas. Por otro lado, genera un problema creciente de resistencia en las poblaciones de la plaga. Un ejemplo de esto, según Hernández (2019), es la resistencia de *S. frugiperda* a insecticidas como los carbamatos y los piretroides, lo que reduce la eficacia de estas herramientas de control. Además, esta dependencia de los químicos no solo tiene consecuencias económicas, sino también ecológicas. Uno de los efectos es la desaparición de enemigos naturales, como depredadores y parasitoides, que desempeñan un papel crucial en la regulación natural de las poblaciones de plagas.

Esto ocurre, en gran medida, debido a la ausencia de alternativas que permitan un manejo sostenible de la plaga. Ante esta situación, se han desarrollado nuevas opciones basadas en el uso de extractos vegetales, como el aceite de neem, que representa una opción prometedora.

3.1 Formulación del problema

¿Cuál es el efecto de diferentes concentraciones de azadiractina formulada en aceite sobre la mortalidad de los seis instares larvales de *S. frugiperda*, y cuánto tiempo se requiere para lograr este efecto?

4. Justificación

La investigación sobre el uso de la azadiractina, un compuesto derivado del árbol de neem (*A. indica*), es de gran relevancia en la protección de cultivos frente a plagas agrícolas. Este compuesto ha demostrado ser efectivo contra varias especies de insectos debido a su modo de acción, que incluye la regulación del crecimiento del insecto, es anti-gustativo, repelente, y causa la interrupción del ciclo de vida de *S. frugiperda* (Mendoza & Tejada, 2013), representa una de las plagas más perjudiciales para el cultivo del maíz, afectando la producción agrícola y generando significativas pérdidas económicas para los agricultores, según Ávila et al. (2023) la infestación severa de *S. frugiperda* causó pérdidas en cultivos de maíz de 22 a 67 % en varios países, debido a la disminución del área foliar y retraso o inhibición en la emisión de las inflorescencias.

El creciente reporte de surgimiento de poblaciones de *S. frugiperda* resistentes a insecticidas químicos ha llevado a una búsqueda de alternativas ecológicas que reduzcan el uso de pesticidas sintéticos y su impacto en el ambiente. El uso de la azadiractina como una alternativa fitosanitaria se ha considerado favorable debido a su baja toxicidad, su rápida biodegradabilidad y su eficacia como regulador del crecimiento de insectos (Carvajal, 2020). Sin embargo, para optimizar su aplicación en programas de manejo integrado de plagas (MIP), es fundamental determinar la relación dosis-respuesta específica para cada instar larval de *S. frugiperda*. Los diferentes instares larvales presentan variaciones en su fisiología, tamaño y capacidad de alimentación, factores que influyen en su susceptibilidad a la azadiractina (Schmutterer, 1990; Nathan et al., 2005). Identificar la dosis adecuada y los efectos de este compuesto en cada etapa de desarrollo larval permite una aplicación más precisa y eficiente, minimizando el riesgo de dosis que puedan contribuir a la resistencia y de sobredosis que puedan resultar costosas y ambientalmente perjudiciales.

La investigación bajo las condiciones de laboratorio facilita la medición precisa de variables y elimina factores externos que podrían alterar los resultados, lo cual es esencial

para obtener datos consistentes y confiables. A partir de estos, será posible desarrollar recomendaciones prácticas para la aplicación de la azadiractina en campo, optimizando su efectividad y maximizando el control de la plaga en cada una de sus etapas de desarrollo, permitiendo entender mejor los mecanismos de acción del compuesto en esta especie.

Es necesario realizar una investigación sobre las soluciones sostenibles y efectivas contra *S. frugiperda*, una plaga que, además de atacar cultivos de maíz, también afecta otros cultivos de importancia económica. La implementación de una estrategia de control basada en dosis ajustadas por instares larvales contribuiría no solo a la sostenibilidad de la producción agrícola, sino también a la reducción de la dependencia de pesticidas químicos, promoviendo así un enfoque agroecológico y sostenible en el manejo de plagas.

5. Delimitación

Esta investigación se enfocó en evaluar la respuesta de las larvas de *S. frugiperda* frente a la azadiractina en sus seis instares para determinar la Concentración Letal Media y el Tiempo Letal Medio. Este análisis se realizó en un entorno controlado de laboratorio en la ciudad de Pamplona. La relevancia de esta investigación fue la importancia de esta plaga en los cultivos de maíz de la región y la contaminación causada por el uso de insecticidas químicos para su control.

A partir de los resultados obtenidos, se buscó identificar el momento óptimo para la aplicación de la azadiractina en condiciones climáticas específicas de Pamplona, Norte de Santander.

6. Objetivo general

Establecer la dosis-respuesta de la azadiractina en los seis instares larvales de desarrollo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), en condiciones de laboratorio

6.1. Objetivos específicos

- Determinar la concentración de azadiractina necesaria para causar la muerte del 50% de la población en prueba, en cada instar larval (CL₅₀).
- Estimar el tiempo requerido para que la azadiractina cause la muerte del 50% de la población en prueba, en cada instar larval (TL₅₀).

7. Marco teórico

7.1. Antecedentes

7.1.1. Antecedentes regionales

Núñez-García, S. N.; Velásquez-López, S. M. y Giraldo-Vanegas, H. (2024). Determinación de los instares larvales del gusano cogollero del maíz y reconocimiento de parasitoides y depredadores en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 70 p.

El estudio busco determinar los instares larvales de *S. frugiperda* y reconocer los parasitoides y depredadores en Pamplona, Norte de Santander. El ensayo se desarrolló en laboratorio bajo condiciones contraladas de temperatura ($17\pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad ($65\pm 10\%$), usando dos grupos de larvas alimentadas con hojas de maíz y monitoreadas diariamente. Siguiendo la Ley de Dyar se registró la duración (días) y el ancho de la capsula cefálica con el fin de determinar las etapas larvales. Los resultados mostraron dos grupos de larvas, unas que completaron 6 instares con una duración de 5,19; 3,67; 4,36; 5,93; 6,39 y 13,63 días, respectivamente para cada instar y otro que presento 7 instares en el que su duración fue de 5,30; 3,52; 4,09; 5,41; 4,97; 6,17 y 11,59 días, respectivamente para cada instar. En el caso de las medidas de las capsulas cefálicas variaron desde 0,32 mm para el primer instar hasta 2,74 mm para el séptimo instar, con tasas de crecimiento desde 1,44 mm para el primer instar a 1,19 para el quinto instar, siendo los datos obtenidos similares a los de otros autores.

Ruiz-García, N. G. y Giraldo-Vanegas, H. (2024). Evaluación de la toxicidad de aceites de semillas de neem contra adultos del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais*

(Motschulsky), en condiciones de laboratorio. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 88 p.

En este estudio se evaluó el efecto fumigante toxico del aceite de neem y la cipermetrina contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky, estableciendo parámetros de mortalidad, CL₅₀ y TL₅₀. Se realizo un diseño completamente al azar contando con 11 tratamientos y 5 repeticiones por cada tratamiento. en frascos que contenían parejas de adultos de *S. zeamais* y alimento. Ambos productos presentaron altos porcentajes de mortalidad que estuvieron entre 98 a 100%, mientras que el control presento 1% de mortalidad. El CL₅₀ fue de 0,72 mL/L para el neem con un TL₅₀ entre 12 a 108 horas y para la cipermetrina el CL₅₀ fue de 6,31 mg/L con el TL₅₀ de 12 a 44 horas. Además, ambos tratamientos redujeron la emergencia de la siguiente generación de adultos, afectando la viabilidad de huevos y larvas. Estos resultados demuestran la efectividad del aceite de neem y la cipermetrina en el control de *S. zeamais*, con efectos subletales significativos.

Gualdrón-Panqueva, J.; Toloza-Balcucho, D. V. y Giraldo-Vanegas, H. (2017). Evaluación de los extractos de neem *Azadirachta indica* A. Juss, como repelente o insecticida contra la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en la variedad Castillo, en la Granja Experimental Villa Marina de la Universidad de Pamplona. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 102 p.

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de extractos de hojas y semillas de neem (*A. indica*) en la mortalidad y repelencia de la broca del café (*H. hampei*) en la variedad Castillo, en la Granja Experimental Villa Marina. Se llevaron a cabo siete tratamientos, en donde se incluían 3 concentraciones de semillas, 3 de hojas de neem y un control, realizando 4 repeticiones por tratamiento. Las soluciones aplicadas fueron preparadas a partir de hojas y semillas maceradas. Los granos de café tratados fueron infestados con hembras de broca y evaluados durante quince días. Como resultado se obtuvo que los extractos de semilla al 66% y 100% y el extracto de hoja al 33% produjeron la mayor mortalidad de broca y los niveles

más bajos de infestación en comparación con el control, demostrando la efectividad de estos extractos en el manejo de *H. hampei*.

Mondragón-Sánchez, Y. D.; Triana-Marroquín, B. S. y Giraldo-Vanegas, H. (2020). Determinación de la mortalidad, la DL₅₀ y el TL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *Azadirachta indica* A. Juss, sobre *Plutella xylostella* (L.), bajo condiciones de laboratorio. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 87 p.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el impacto de extractos acuosos de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre la mortalidad de larvas de segundo instar de *Plutella xylostella* (L.), en condiciones de laboratorio. Se calcularon porcentajes de mortalidad, DL₅₀ y TL₅₀ después de exponer las larvas a distintas concentraciones de los extractos. Los materiales se recolectaron en Cúcuta, Norte de Santander, en su estado fenológico en el que presentan mayor cantidad de azadiractina. Se prepararon diluciones al 66% y 33% a partir de la solución madre al 100%. El diseño experimental se realizó bajo un modelo completamente al azar, con cuatro tratamientos y cinco repeticiones, cada una con 5 unidades experimentales. Las larvas se criaron en el Laboratorio de Sanidad Vegetal y se realizaron observaciones periódicas. Los resultados indicaron que los extractos de semillas mostraron mortalidades del 96%, 84% y 68% en las concentraciones del 100%, 66% y 33%, respectivamente, mientras que los extractos de hojas obtuvieron 84%, 64% y 36%. La DL₅₀ para los extractos de semillas fue de 37.000 mg/L y de 57.250 mg/L para los de hoja. En términos de TL₅₀, la dosis al 100% del extracto de semilla mataron el 50% de las larvas en 22 horas, en comparación con la dosis del extracto de hoja que causaron una mortalidad al 50 % de las larvas en 39 horas, esto demuestra que los extractos de semilla, especialmente en la concentración de 100% son eficaces para el control de esta plaga en condiciones de laboratorio, probablemente debido a su alto contenido de terpenoides. Además, el número de imago emergentes y su sobrevivencia fue notablemente menor con la aplicación de estos extractos de neem.

7.1.2. Antecedentes nacionales

López, J. J., Chirinos, D. T., Ponce, W. H., Solórzano, R. F., & Alarcón, J. P. (2022). Actividad insecticida de formulados botánicos sobre el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 48(1).

En el presente estudio se evaluó el efecto de formulados de *Eucalyptus globulus*, *Jatropha curcas*, *Petiveria alliacea*, *Ricinus communis* y *Ruta graveolens*, midiendo su efecto sobre la mortalidad, la inhibición alimentaria y el peso de las larvas de *S. frugiperda*. Se usaron 3 concentraciones (5, 10 y 15 mL.L-1 de agua) de cada formulado para la realización de los bioensayos, en los que se incluye, tres hidrolatos preparados *E. globulus*, *R. graveolens* y *P. alliacea*, y los dos aceites formulados de *R. communis* y *J. curcas*, en larvas de segundo y tercer estadio. Para hacer una comparación de los resultados se establecieron 3 controles: insecticida químico (cipermetrina), botánico comercial (azadiractina) y testigo absoluto (agua).

Los resultados indicaron que el aceite de *J. curcas* con la concentración de 15 mL.L-1 de agua, alcanzo una mortalidad mayor con un porcentaje de 33.7%, seguida del hidrolato de *P. alliacea* con 26.2% con la misma concentración. En cuanto a la inhibición alimentaria, las larvas que fueron tratadas con los hidrolatos de *P. alliacea* y *R. graveolens* presentaron entre 71% y el 76% de inhibición, similar al testigo químico, y mostraron un menor incremento en el peso de las larvas. Estos resultados sugieren que los formulados botánicos evaluados presentan actividad insecticida en *S. frugiperda*, representando una opción viable para contrarrestar el uso de insecticidas químicos.

Álvarez Yepes, D. A. (2019). *Controladores de los biotipos de arroz y maíz de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera, Noctuidae) en especies de Meliaceae* (Doctoral dissertation).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad controladora y diferenciada de *Swietenia macrophylla*, *S. mahagoni* y *Carapa guianensis* sobre los biotipos de maíz y arroz de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) de una colonia de laboratorio. Para el estudio, se incluyeron bioensayos antialimentarios e insecticidas, usando extractos etanólicos de las hojas y tallos de las especies anteriormente mencionadas. Las pruebas se realizaron sobre larvas de tercer instar de dos biotipos diferentes de *S. frugiperda*, representando biotipos de arroz y maíz, con el fin de observar la efectividad de cada extracto en cada tipo de biotipo.

Los resultados mostraron que las fracciones de diclorometano de los tallos de *S. macrophylla* y *C. guianensis* destacaron por su actividad insecticida y antialimentaria; con *S. macrophylla* se obtuvo los mejores resultados en cuanto a reducción de la alimentación y mortalidad de las larvas. De igual manera, para determinar un posible mecanismo de acción de la fracción de tallos de *S. macrophylla*, se llevó a cabo un ensayo de inhibición de tirosinasa, evidenciando que dicha fracción se compone de ácidos grasos y fitoesteroles, en donde resalta con mayor cantidad el β -sitosterol 3-O- β -glucopiranosido, el cual tiene efectos insecticidas. Se observó, además, que los efectos variaban entre los biotipos, lo que resalta la importancia de considerar las diferencias intraespecíficas al diseñar estrategias de manejo de plagas. En resumen, los extractos de Meliaceae poseen compuestos con potencial para el control de *S. frugiperda*, constituyéndose como una nueva herramienta de control de plagas sostenible.

7.1.3. Antecedentes internacionales

Gutiérrez-García, S. D. C., Sánchez-Escudero, J., Pérez-Domínguez, J. F., Carballo-Carballo, A., Bergvinson, D., & Aguilera-Peña, M. M. (2010). Efecto del nim en el daño ocasionado por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en tres variables agronómicas de maíz resistente y susceptible. *Acta zoológica mexicana*, 26(1), 1-16.

El presente trabajo tuvo como objetivo conocer el daño ocasionado por el gusano cogollero en plantas de maíz resistente (CML-67) y maíz susceptible (CML-131) ambas tratadas con nim, en campo. Se realizaron 2 experimentos teniendo en cuenta el ciclo de invierno y primavera-verano en el Centro Internacional del Maíz y el Trigo (CIMMYT) en Poza Rica, Veracruz, México; ambos experimentos fueron aplicados tanto en la línea de maíz resistente como en la susceptible.

El primer experimento correspondía a las épocas de aplicación del nim, usando la concentración de 20,8 %, aplicada solo una vez en tres momentos: 4 h antes de la infestación artificial con *S. frugiperda*, 7 y 14 días después de la infestación. Por otra parte, el segundo experimento correspondía a las concentraciones de aplicación del nim, las cuales eran 20.8%, 2.0% y 0.2%, aplicadas 3 veces en cada fecha (4 h antes de la infestación artificial con *S. frugiperda*, 7 y 14 días después de la infestación). Además, para ambos experimentos se estableció un control con agua potable y otro con el insecticida químico Permetrina.

Se observó que en el primer experimento la línea resistente presentó un daño moderado a comparación con la línea susceptible en la que el daño fue alto, mencionando que el aceite de nim no presenta efectos biocidas contundentes, si no que actúa más como repelente e inhibidor de la alimentación de larvas. Para el segundo experimento, la concentración al 20.8% presentó una defoliación menor, pero también presentó efectos fitotóxicos que impactaron negativamente el rendimiento del cultivo, por otra parte, las concentraciones de 2% y 0.2%, al aplicarse antes de la presencia de la plaga y con intervalos

de 1 aplicación por semana resultaron en un mejor balance entre protección y rendimiento sin evidenciar fitotoxicidad.

Almeida Sanisaca, J. C. (2021). *Eficacia del neem y aceite vegetal para el control de Spodoptera frugiperda en el cultivo de maíz (Zea mays)* (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR).

El uso de plaguicidas para el control de *S. frugiperda* se ha vuelto frecuente y consigo trae efectos negativos en el ambiente, por ende, se han estado desarrollando investigaciones que ofrezcan alternativas más sostenibles para el control de esta plaga. El propósito de esta investigación fue evaluar la eficacia del neem y el aceite vegetal en emulsión para el control de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz (*Zea mays*).

Se llevó a cabo un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) con cuatro repeticiones, formando veinte parcelas experimentales, con una dimensión de 8 x 5 m cada una; se usaron 5 tratamientos: Biol 10 cc/lit, *Metarhizium* 5 gr/lit, Aceite de Neem (Neem x) 1.5 lt/ha, testigo comercial (Lorsban) 0.75 lt/ha y testigo Absoluto. Los resultados mostraron que hubo una menor presencia de larvas en total por planta con los tratamientos del Aceite de Neem y el Lorsban, lo que sugiere un mayor efecto insecticida de estos productos sobre *S. frugiperda*, en el caso de las variables agronómicas, la aplicación de estos tratamientos no afectó el desarrollo y la producción del maíz.

Gámez, M. A. (2021). *Eficacia de extractos botánicos de neem (Azadirachta indica), eucalipto (Eucalyptus spp.) y chile (Capsicum annuum) para el manejo de Spodoptera frugiperda, en condición de laboratorio del Campus Agropecuario, UNAN, León, en el periodo de julio a noviembre del 2020* (Doctoral dissertation).

El objetivo de esta investigación fue determinar la eficacia de los extractos botánicos de neem (*Azadirachta indica*), eucalipto (*Eucalyptus* spp.) y chile (*Capsicum annuum*) para el control del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en condiciones de laboratorio. Se realizó un diseño de bloques completos aleatorio (BCA), con 15 tratamientos de los 3 extractos, subdivididos en 5 concentraciones cada uno (800, 600, 400, 200 y 0 g/L), aplicados en 4 bloques definidos y teniendo un total de 300 unidades experimentales. Las variables medidas fueron: eficacia, mortalidad y Concentración letal media (CL₅₀).

Se observó que el extracto de neem presentó una mayor repelencia alcanzando el 60% en la concentración más alta, mientras que para la variable de eficacia el chile presentó un mayor índice (70%) y un CL₅₀ de 116 g/L, seguido de eucalipto con CL₅₀ de 177 g/L y neem con CL₅₀ de 268 g/L, además, se notó que la mortalidad aumenta con las concentraciones más altas. Aunque los extractos demostraron que son efectivos, dentro del estudio recomiendan que no se usen como única alternativa de manejo, si no que se incluyan con otros métodos dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

7.2. Marco contextual

El estudio se desarrolló en la ciudad de Pamplona, ubicada a 75 km de la ciudad de Cúcuta y a 124 km de Bucaramanga. Tiene una población de 76,983 habitantes. Con un área del territorio de 1.176 km², la altitud de 2.228 msnm y una temperatura promedio de 14 °C (Alcaldía de Pamplona, 2023).

Las actividades socioeconómicas de la región de Pamplona se basan en la agricultura, la explotación pecuaria, turismo entre otras. Los principales productos agrícolas son: La papa, fresa, ajo, trigo (Alcaldía de Pamplona, 2023).

La investigación se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica, ubicado en el Campus de la Universidad de Pamplona, a 7° 23' 14" de latitud Norte y a -72°39' 02" de longitud al Oeste de Greenwich, a una altura de 2.480 metros sobre el nivel del mar (Figura 1), con una temperatura promedio de 17 °C y 65% de Humedad Relativa.



Figura 1. Ubicación del laboratorio de Sanidad Vegetal

7.3 Bases conceptuales

7.3.1. Origen y características morfológicas del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es un cereal perteneciente a la familia Poaceae, su origen se dio en el continente americano. Fue cultivado por primera vez por los pueblos de Tehuacán en México, hace aproximadamente 10.000 años. De acuerdo con la variedad su desarrollo puede durar de 80 a 200 días. Es una planta monoica, es decir tiene una inflorescencia masculina que es la panoja y una femenina que es la mazorca (Grande y Orozco, 2012). la producción de mazorcas tiene lugar sobre todo en el tallo principal que es leñoso y cilíndrico, longitudinalmente compuesto de nudos y entrenudos, los cuales varían de 8-25, exponiendo una hoja en cada nudo que son largas y anchas y los bordes generalmente lisos y una yema en la base de cada entrenudo donde se desarrolla de 1-3 mazorca, que contienen los ovarios que, a su vez, se convertirán en granos después de la polinización. Los granos o carióspsides que se encuentran desde 600-1000 por mazorca, dispuestos en hileras, con un promedio de 14 y pueden ser dentados o semi dentados, cristalinos u opacos, su color varía entre blancos y amarillos dependiendo de la variedad (Valladares, 2010).

7.3.2. Clasificación taxonómica

En la Tabla 1, se presenta la clasificación taxonómica del maíz

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Zea mays* L.

Reino	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Clase	Liliopsida

Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i> L.

Fuente: GBIF (2025).

7.3.3. Origen y distribución del cogollero del maíz

Tiene su origen en regiones tropicales y subtropicales siendo más relevantes las del hemisferio occidental abarca desde los E.U.A. hasta Argentina y Chile, su amplia distribución se extiende desde el sur de Canadá, Florida y Louisiana en E.U.A, México, América Central, el Caribe- pasando por Colombia, Brasil y Venezuela, hasta llegar al centro de Argentina, es una plaga típicamente americana que puede migrar a zonas más frías en época de verano, en Sudamérica es la plaga más importante no solo por su intensidad sino por su persistencia (Virla et al., 1999).

7.3.4. Clasificación taxonómica

En la Tabla 2, se presenta la clasificación taxonómica del gusano cogollero del maíz.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *S. frugiperda*

Dominio	Eukaryota
Reino	Metazoa
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Lepidoptera

Familia	Noctuidae
Género	<i>Spodoptera</i>
Especie	<i>frugiperda</i>
	(J. E. Smith)

Fuente: Álvarez et al. (2022).

7.3.5. Ciclo de vida

A. Adulto

La fase adulta de *S. frugiperda*, una polilla de tamaño mediano mide entre 32 y 38 mm de expansión alar y presenta dimorfismo sexual. Las hembras tienen alas traseras blancuzcas, mientras que los machos exponen patrones llamativos en las alas delanteras y traseras blancas. En reposo, doblan las alas sobre el cuerpo, formando un ángulo agudo, y presentan una prominencia en el tórax. Se esconden en hojarasca y lugares sombreados durante el día y son activas al anochecer (Alcántara, 2011).

B. Huevo

Es de forma esférica y de color amarillento brillante o plumizo con diámetro de 0,5 mm y ovopositado durante 4 a 15 días por la hembra en el envés de las hojas en masa de 500 a 1.000 huevecillos, cubiertos por las escamas y secreciones de la hembra, esta inicia su proceso de oviposición en uno a dos días en verano o de tres o más días en invierno después de su emergencia (Alcántara, 2011).

C. Larva

Generalmente hay seis estadios larvales en *S. frugiperda*. Las larvas alcanzan longitudes de aproximadamente 1,7; 3,5; 6,4; 10,0; 17,2 y 34,2 mm, respectivamente, durante estos estadios. Las larvas jóvenes son de color verdoso con una cabeza negra, en el segundo y tercer estadio esta se vuelve anaranjada, la parte dorsal del cuerpo se vuelve pardusca y comienzan a formarse líneas blancas laterales. En los estadios cuarto a sexto, la cabeza es de color marrón rojizo, moteada de blanco, y el cuerpo marrón tiene líneas subdorsales y laterales blancas. En la forma verde, las manchas dorsales elevadas son pálidas en lugar de oscuras. Las larvas tienden a ocultarse durante el momento más brillante del día. La duración de la etapa larvaria tiende a ser de unos 14 días durante el verano y de 30 días durante invierno (Núñez-García et al., 2024).

D. Pupa

Es obtecta de color marrón oscuro de paredes esclerotizadas que termina en dos proyecciones a manera de puntas llamadas cremasters (Figura 2). Mide aproximadamente de 18 a 20 mm de longitud. Este estado pupal suele formarse en el suelo en una profundidad de 2,5 a 5,0 cm (Alcántara, 2011).

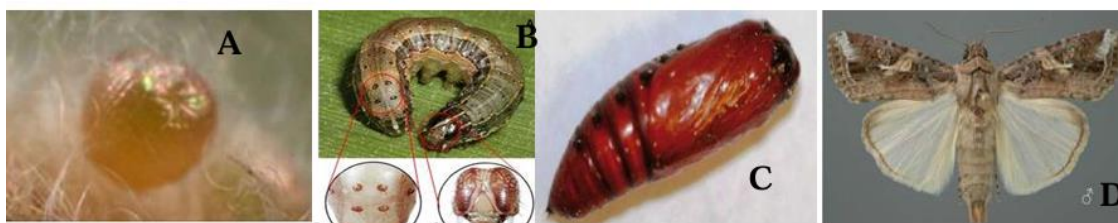


Figura 2. Morfología de *Spodoptera frugiperda*

Nota: Posturas (A), larva (B), pupa (C) y adulto (D).

Fuente. Álvarez et al. (2.022).

7.3.6. Daños ocasionados por *S. frugiperda*

El ataque de *S. frugiperda*, se inicia con la postura de los huevos en grupos sobre las hojas, donde las larvas recién emergidas y en sus primeros estadios se alimentan de la epidermis de la hoja tierna haciendo ligeros raspados, luego a partir del tercer estadio pasan rápidamente al estuche de la planta donde se alimentan de las hojas del cogollo produciendo gran número de perforaciones que ocasiona el doblado de las hojas hacia abajo, anulándose de esta manera todas las hojas. Dichas larvas perforan la envoltura de la mazorca, alimentándose de los granos, facilitando el ingreso, la proliferación de microorganismos y el acceso de otros insectos (Alcántara, 2011).

El cogollero se presenta con mayor incidencia e intensidad de daños en las primeras etapas del cultivo, que es el periodo crítico de la planta, en la que los cartuchos de la planta sufren mayor ataque hasta la emisión de la inflorescencia masculina (Alcántara, 2011).

7.3.7. Origen y características morfológicas del árbol de Neem

Azadirachta indica A. Juss, perteneciente a la familia Meliaceae y es nativo de India. Se encuentra ampliamente distribuido en el Sur y Sureste de Asia y en la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, es una especie de rápido crecimiento, de porte mediano, tallo corto y recto. Su copa es redonda u ovalada, posee una corteza gris moderadamente gruesa, su duramen rojizo es duro y resistente, los frutos son drupas oblongas, numerosos de color amarillento cuando están jóvenes y rojizos cuando alcanzan la madurez. Los endocarpios poseen una sola semilla grande, sus hojas son alternas, compuestas y pinnadas, con un número variable de folíolos que pueden ser de 8 a 31. Son de color verde intenso y tienen una forma lanceolada (Poma, 2016).

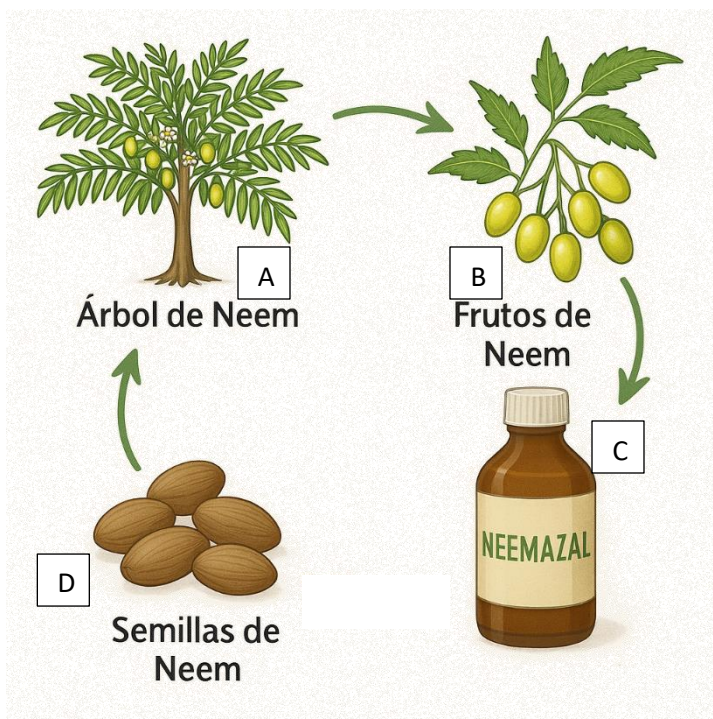


Figura 3. Árbol de neem (A), frutos de neem (B), Insectisida neemazal: aceite de neem con azadiractina (C), semillas de neem (D).

Fuente: Autores.

7.3.8. Clasificación taxonómica

En la Tabla 3, se presenta la clasificación taxonómica del árbol de Neem.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Azadirachta indica* A. Juss

Reino	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Meliaceae
Genero	<i>Azadirachta</i>
Especie	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.

Fuente: (GBIF, 2025).

7.3.9. Azadiractina

El árbol de Neem causa gran interés en el control fitoquímico de plagas como insecticida natural, cerca de 300 compuestos han sido aislados y caracterizados, uno de estos; la azadiractina, la cual es una tetranortriterpenoide, considerado como el más importante principio activo causante de varios efectos en las plagas, siendo un regulador de crecimiento de los insectos, bloqueando la biosíntesis de la ecdysona que es una hormona que controla los cambios fisiológicos en el insecto.

El aceite que se extrae de algunas partes del árbol de neem (hojas, semillas, corteza) posee la azadiractina que es un agente activo que se ha comprobado que funciona como insecticida natural que compite con los insecticidas sintéticos, ya que algunos insectos han desarrollado resistencia a estos y son controlados por derivados del aceite de neem, de esta manera, extractos con alta concentración de azadiractina podrían ser los precursores de una nueva generación de productos insecticidas, fungicidas, acaricidas y protectores de las cosechas sin contaminar el entorno (Arias et al., 2009).

Su mecanismo de acción es por contacto e ingestión sobre la actividad de ecdysona, interfiriendo gravemente los procesos de muda. El insecto afectado no puede completar la muda y muere. Tras la ingestión de pequeñas cantidades (nanogramos) el insecto se vuelve inactivo y deja de alimentarse (Poma, 2016).

7.3.10. Concentración Letal Media

La Concentración Letal Media (CL_{50}) es una medida de la toxicidad aguda de una sustancia química en el aire. Se define como la concentración de una sustancia química en el aire que, cuando se inhala durante un período de tiempo determinado, causa la muerte del 50% de los organismos de prueba expuestos. La CL_{50} se expresa en partes por millón (ppm) o en miligramos por metro cúbico (mg/m^3). Se calcula mediante pruebas de toxicidad en organismos de laboratorio. En estas pruebas, son expuestos a diferentes concentraciones de una sustancia química en el aire durante un período de tiempo determinado. Se observa la cantidad de muertes en un período de tiempo determinado y se calcula la concentración que mató al 50% (Benítez, 2023).

7.3.11. El Tiempo Letal Medio

El Tiempo Letal Medio (TL_{50}) es una medida en toxicología y entomología que representa el tiempo necesario para que el 50% de una población expuesta a una dosis específica de un agente tóxico muera. Se obtiene a partir de pruebas experimentales en las que se monitorea la mortalidad de una población a lo largo del tiempo tras la exposición al agente. Esta métrica es útil para evaluar la eficacia y la velocidad de acción de un agente en el control de plagas o patógenos, especialmente en ensayos de laboratorio.

7.4. Marco legal

7.4.1. Acuerdo No. 186

El presente anteproyecto se rige bajo la normatividad establecida por la Universidad de Pamplona en el reglamento estudiantil, según el acuerdo número 186 de 02 de diciembre 2005.

Capítulo VI. Trabajo de Grado

Artículo 35. La Universidad de Pamplona establece en el plan de estudio de los programas un requisito para la obtención del título profesional, se debe presentar un trabajo especial por parte del estudiante denominado “TRABAJO DE GRADO”, en el cual se consolida al estudiante su información integral, lo cual permite: Diagnosticar problemas y necesidades, a partir, de los conocimientos adquiridos en la etapa académica, acopiar y analizar la información para establecer soluciones a problemas y necesidades específicas, además de; desarrollar planes y ejecutar proyectos, que le permitan demostrar su capacidad en la toma de decisiones.

PARÁGRAFO PRIMERO. Según las características del trabajo de grado se puede realizar de manera individual o en grupo. Corresponde al comité que se integren para realizar uno solo. En todos los casos, se presentará un sólo informe.

PARÁGRAFO SEGUNDO. “El Trabajo de Grado se podrá matricular a partir del 8º. Semestre, dependiendo de la modalidad que se emplee, hasta con máximo dos (2)

asignaturas. El Trabajo de Grado deberá ser sustentado ante un Jurado, que está compuesto por tres (3) personas conocedoras del tema y decidir la calificación: “Aprobado”, “Excelente” o “Incompleto”, en llegado caso de que no se cumpla con los objetivos propuestos en la modalidad en la cual se adelanta dicho trabajo, en tal caso, el estudiante tendrá que matricularlo nuevamente en el siguiente semestre académico.

Artículo 36. Modalidades de Trabajo de Grado: este trabajo se desarrolla bajo la modalidad de investigación, el cual comprende diseños y ejecución de proyectos que ayuden aportar soluciones a los problemas teóricos o prácticos, adecuar y apropiar tecnologías y validar conocimientos producidos en otros contextos (Universidad de Pamplona, 2005).

6.4.2. Resoluciones del Instituto Colombiano Agropecuario

6.4.2.1. Ley 9 de 1979: de las sustancias peligrosas -plaguicidas- artículos pirotécnicos

Artículo 130°.- En la importación, fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, manejo o disposición de sustancias peligrosas deberán tomarse todas las medidas y precauciones necesarias para prevenir daños a la salud humana, animal o al ambiente, de acuerdo con la reglamentación del Ministerio de Salud.

Plaguicidas.

Artículo 136°.- El Ministerio de Salud establecerá las normas para la protección de la salud y la seguridad de las personas contra los riesgos que se deriven de la fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, uso o disposición de plaguicidas.

Artículo 138°.- El registro que aprobare el Ministerio de Salud para plaguicidas destinados a uso agropecuario no exime a los interesados del cumplimiento de las disposiciones que para tales productos tengan establecidas las autoridades de agricultura.

Artículo 139°.- El Ministerio de Salud podrá realizar la importación o fabricación de muestras de plaguicidas para fines de investigación, experimentación o registro. Cuando la experimentación con estos productos pueda causar daño a la salud de los trabajadores, de la población o del ambiente tal actividad debe someterse a la vigilancia de las autoridades de salud, las cuales exigirán la adopción de las medidas necesarias para prevenir o remediar tales daños.

Artículo 144°.- Los residuos procedentes de establecimientos donde se fabriquen, formulen, envasen o manipulen plaguicidas, así como los procedentes de operaciones de aplicación no deberán ser vertidos directamente a cursos o reservorios de agua, al suelo o al aire.

6.4.2.2. Ministerio de Salud. Decreto 775 del 16 de abril de 1990

Por el cual se reglamentan parcialmente los Títulos III, V, VI, VII y XI de la Ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas.

Artículo 1° Del objeto del control y vigilancia epidemiológica. El control y la vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas, deberá efectuarse con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro del ambiente.

Artículo 2° Régimen aplicable al uso y manejo de plaguicidas. El uso y manejo de plaguicidas estarán sujetos a las disposiciones contenidas en la Ley 09 de 1979, el Decreto 2811 de 1974, Reglamento Sanitario Internacional, las demás normas complementarias previstas en el presente Decreto y las que dicten los Ministerios de Salud y de Agricultura o sus institutos adscritos.

6.4.2.3. Decreto 1376 de 2013

Decreto del Ministerio del Ambiente, el cual reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. En este decreto se toma espécimen de especie silvestre como: organismo silvestre de la diversidad biológica vivo o muerto o sus productos, partes, en adelante. Para su recolección es importante la referencia de información básica inherente a los especímenes como la taxonomía, localidad de colecta, fecha de colecta y colector, entre otras. También se dictan disposiciones acerca de las Instituciones Nacionales de Investigación entre las cuales están las Instituciones de Educación Superior.

8. Metodología

8.1. Tipo de Investigación

La investigación desarrollada fue de tipo experimental con enfoque cuantitativo, utilizando un diseño completamente al azar con un arreglo factorial. Se manipularon distintas concentraciones de azadiractina formulada en aceite de neem como variable independiente, con el objetivo de evaluar su efecto sobre la mortalidad de *S. frugiperda*, variable dependiente del estudio. El bioensayo se llevó a cabo en condiciones controladas de laboratorio y se enfocó en determinar la toxicidad del bioinsecticida en los seis instares larvales del gusano cogollero del maíz, permitiendo establecer relaciones dosis-respuesta y estimar los valores de Concentración Letal Media (CL₅₀) y Tiempo Letal Medio (TL₅₀) de forma precisa.

8.2. Diseño Metodológico

Para el presente bioensayo se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, empleando un gradiente de siete concentraciones del aceite de Neem *Azadirachta indica* A. Juss con principio activo azadiractina: 0,00 (control) y seis concentraciones. Cada tratamiento contó con cinco réplicas independientes, y cada unidad experimental estuvo constituida por cinco larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Este procedimiento experimental se ejecutó de manera sistemática en cada uno de los seis instares larvales con un total de 1.050 unidades experimentales ($n = 7 \text{ concentraciones} \times 5 \text{ réplicas} \times 5 \text{ larvas} \times 6 \text{ instares larvales}$).

8.2.1. Hipótesis

La azadiractina formulada en aceite, presenta diferentes niveles de toxicidad en los seis instares larvales de *S. frugiperda*, siendo esta toxicidad dependiente del instar, de la concentración y el tiempo de exposición, pudiendo ser más efectiva en los instares más jóvenes.

Hipótesis Nula: No hay diferencia significativa en la mortalidad de los instares larvales de *S. frugiperda* expuestos a diferentes tiempos de exposición y concentraciones de azadiractina.

Hipótesis Alternativa: La mortalidad de los instares larvales de *S. frugiperda* varía significativamente en función de los tiempos de exposición y la concentración de azadiractina

8.3. Descripción de las variables y método de análisis de resultados

8.3.1. Variables dependientes (respuesta):

- Mortalidad de larvas de *S. frugiperda*: Variable cuantitativa continua expresada en porcentaje (%).
- Tiempo Letal Medio (TL₅₀): Variable cuantitativa continua que representa el tiempo requerido para alcanzar el 50% de mortalidad, expresada en horas.

- Concentración Letal Media (CL_{50}): Variable cuantitativa continua que indica la concentración del aceite de Neem necesaria para producir la mortalidad del 50% de la población larval, expresada en ppm o porcentaje.

8.3.2. Variables independientes (factores experimentales):

- Instar larval: Variable cualitativa ordinal con seis niveles (L1, L2, L3, L4, L5 y L6).
- Concentración del aceite de Neem: Variable cuantitativa continua correspondiente a las distintas concentraciones aplicadas en el bioensayo.
- Tiempo de exposición: Variable cuantitativa continua medida en horas desde el inicio del tratamiento.

8.3.3. Variables controladas:

- Edad de las larvas: Variable cuantitativa discreta, determinada específicamente para cada instar (3, 7, 11, 17, 22 y 35 días de edad) para evitar solapamiento entre los instares.
- Condiciones ambientales: Variables cuantitativas continuas que incluyen temperatura, humedad relativa y fotoperiodo mantenidas constantes durante el experimento.

8.4. Diseño de la investigación

8.4.1. Localización del ensayo

Las larvas de *S. frugiperda* destinadas al bioensayo fueron obtenidas de una cría mantenida en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Pamplona, situado a una altitud de 2.586 metros sobre el nivel del mar, en el municipio de Pamplona, Norte de Santander. El estudio completo se llevó a cabo en este laboratorio, con una temperatura promedio de 17 ± 1 °C y una Humedad Relativa del 65 ± 10 %.

8.5. Diseño Experimental

El estudio se implementó bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial, empleando un gradiente de siete concentraciones del aceite de Neem *Azadirachta indica* A. Juss con principio activo azadiractina: 0,00 (control) y seis concentraciones a 275; 550; 833; 1.108; 1.383 y 1.667 $\mu\text{L/L}$. Cada tratamiento contó con cinco réplicas independientes, y cada unidad experimental estuvo constituida por cinco larvas de *S. frugiperda*. Este procedimiento experimental se ejecutó en cada uno de los seis instares larvales (L1-L6) del insecto. El ensayo comprendió un total de 1.050 unidades experimentales, sometidas a condiciones controladas de laboratorio, temperatura de 17 ± 1 °C y una Humedad Relativa del 65 ± 10 % y fotoperiodo de 12:12 (luz).

8.6. Actividades preparatorias al montaje del bioensayo

8.6.1. Obtención de huevos de *S. frugiperda*

Los huevos utilizados en el bioensayo se obtuvieron de una cría mantenida en el Laboratorio de Sanidad Vegetal, esta cría su punto de recolección es de la ciudad de Bucaramanga en el departamento de Santander. Fueron manipulados con cuidado para ser colocados en recipientes plásticos de 1 litro, cubiertos con una tapa que incorpora tela tul asegurada con una banda elástica, permitiendo condiciones similares al entorno exterior. Cada recipiente fue etiquetado con la fecha de recolección para monitorear el periodo hasta la eclosión de las larvas neonatas. A partir del segundo día, las larvas se individualizaron en recipientes plásticos de 25 ml y alimentadas con hojas de maíz tierno previamente desinfectadas. Este proceso consistió en sumergir las hojas en una solución al 0,5 % de hipoclorito de sodio, enjuagarlas con agua destilada y dejarlas secar antes de ser utilizadas. Este manejo continuo hasta completar su desarrollo larval.

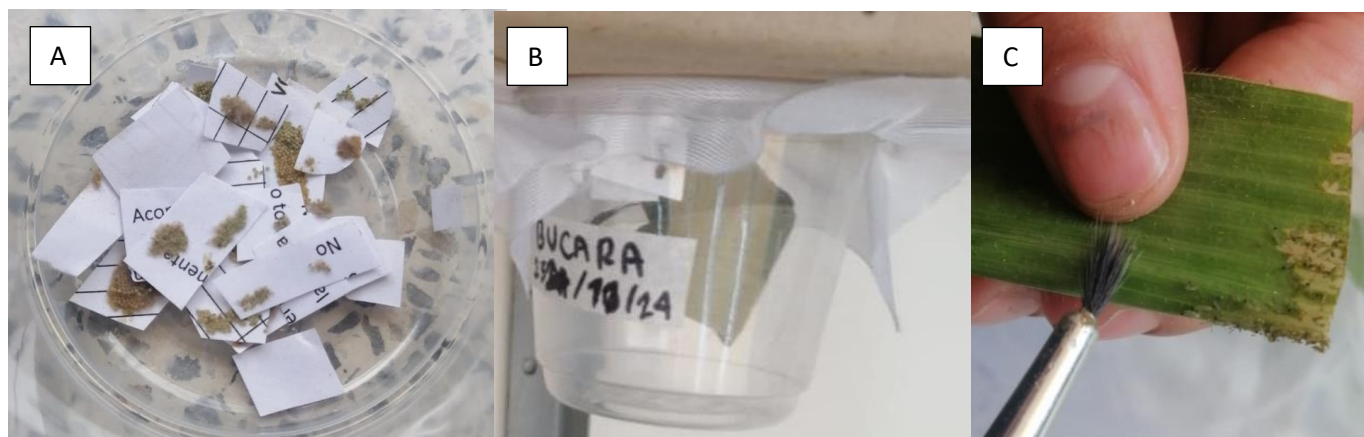


Figura 4. Recolección de huevos (A), Recipiente de almacenamiento (B), individualización de larvas (C).

Fuente: Autores

La investigación requirió un total de 1.050 larvas, distribuidas en grupos de 175 para cada uno de los seis instares larvales que se analizaron durante su ciclo de vida. El diseño experimental se basó en estudios previos realizados por Núñez-García et al. (2024) y Núñez-

García y Giraldo-Vanegas (2024), quienes determinaron que las larvas de *S. frugiperda* en las condiciones de Pamplona (Colombia) presentan ciclos de desarrollo de seis o siete instares larvales. Para las larvas con seis estadios, los tiempos promedio observados fueron: 5,19 días en el primer estadio, 3,67 días en el segundo, 4,36 días en el tercero, 5,93 días en el cuarto, 6,39 días en el quinto y 13,63 días en el sexto. En el caso de las larvas que completaron siete instares, los tiempos promedio fueron: 5,30 días en el primer estadio, 3,52 días en el segundo, 4,09 días en el tercero, 5,41 días en el cuarto, 4,97 días en el quinto, 6,17 días en el sexto y 11,59 días en el séptimo.

8.6.2. Implementación del Bioensayo Toxicológico

Para el establecimiento del primer grupo experimental, se seleccionaron larvas de *S. frugiperda* de 72 ± 2 horas post-eclosión (L1), las cuales fueron distribuidas individualmente en recipientes cilíndricos de polipropileno de 25 ml. Como sustrato alimenticio y vector de exposición al compuesto bioactivo, se utilizaron discos foliares de 3 cm de diámetro de *Z. mays*, previamente sometidos a un protocolo de asepsia mediante inmersión en solución de NaClO al 0,5% durante 30 segundos, seguido de triple lavado con agua destilada estéril y posterior desecación a temperatura ambiente por 15 minutos.

La aplicación del principio activo (azadiractina) se realizó mediante técnica de inmersión, sumergiendo los discos foliares durante 10 segundos en las correspondientes soluciones de aceite de *Azadirachta indica* A. Juss, a las concentraciones preestablecidas. Tras el secado del exceso de solvente, los discos tratados fueron transferidos a las unidades experimentales, incorporando posteriormente una larva por recipiente según el diseño aleatorizado. Los recipientes fueron sellados con tapas perforadas recubiertas con malla de tul (porosidad: 0,2 mm) para facilitar el intercambio gaseoso e impedir el escape de las larvas.

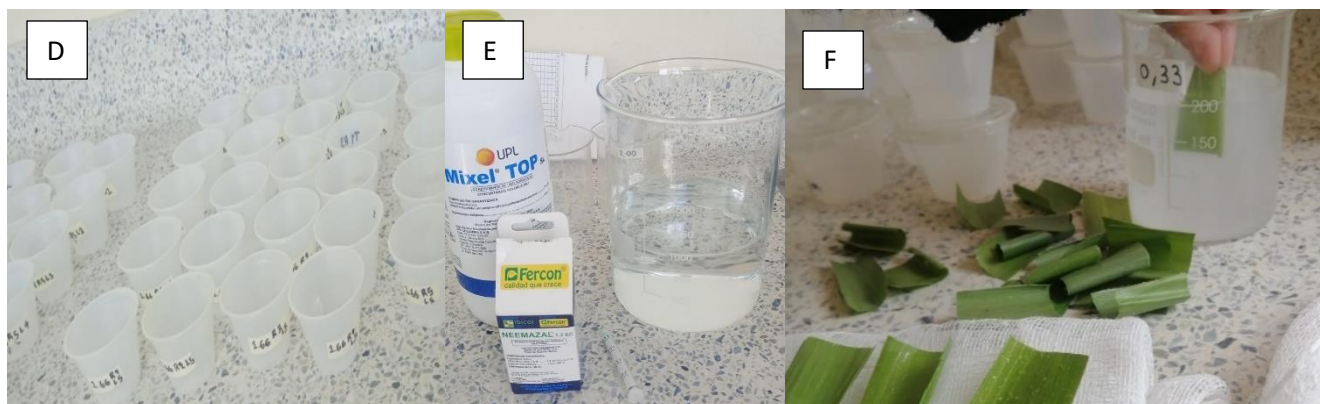


Figura 5. Recipiente de almacenamiento individual (D), Preparación de mezcla con Mixel TOP y NEEMAZAL (E), inmersión de discos de maíz en solución de control (F).

Fuente: Autores

Este protocolo experimental se replicó sistemáticamente para los instares larvales subsiguientes, respetando estrictamente los intervalos ontogenéticos preestablecidos: $7 \pm 0,5$ días para L2, $11 \pm 0,5$ días para L3, $17 \pm 0,5$ días para L4, $22 \pm 0,5$ días para L5 y 35 ± 1 día para L6. Las unidades experimentales se mantuvieron bajo condiciones del laboratorio durante todo el período experimental.

Las concentraciones del aceite de neem (Tabla 4) fueron preparadas mediante diluciones seriadas, partiendo de la concentración (v/v) recomendada por el fabricante (1,00 ml/L). Estas concentraciones incluyeron un tratamiento control absoluto, utilizando las hojas de maíz sumergidas en agua estéril como referencia. Este diseño experimental permitió analizar de manera precisa los efectos letales de las distintas concentraciones del aceite de neem en las larvas de *S. frugiperda* es sus diferentes instares. El aceite NeemAZAL[®] viene formulado a 1,2 EC, motivo por el cual las concentraciones aplicadas en el presente bioensayo fueron de 275, 550, 833, 1108, 1383 y 1667 $\mu\text{L/L}$.

Tabla 4. Concentraciones (ml/L) y Concentración realmente aplicada (μL/L), en el bioensayo en condiciones de laboratorio.

Tratamiento	Concentración (ml/L)	Concentración aplicada (μL/l)
Testigo absoluto	0,00	0,00
T2	0,33	275
T3	0,66	550
T4	1,00	833
T5	1,33	1108
T6	1,66	1383
T7	2,00	1667

Fuente: autores

8.6.3. Preparación de las concentraciones

Para la preparación de las concentraciones se realizaron disoluciones a partir de la concentración de 1,00 ml/L recomendada por el fabricante, se obtuvieron las concentraciones de 0,00; 0,33; 0,66; 1,00; 1,33; 1,66 y 2,00 ml/L de aceite de Neem, utilizando la siguiente fórmula:

$$V = \frac{C_d (x) V_d}{C_c}$$

Donde:

Vd: Volumen deseado

Cd: concentración deseada

Cc: concentración conocida (solución madre)

A cada concentración y al testigo, se le adiciono 0,50 ml/L del producto MIXEL TOP que es un tenso activo no iónico y no reactivo, con características especiales de hipotensor y humectante, acción que ejerce al romper la tensión superficial del agua, mejorando el cubrimiento y la adherencia de los tratamientos en los discos.



Figura 6. Concentraciones preparadas.

Fuente: Autores

8.6.4. Criterios de selección y estandarización de instares larvales para el bioensayo.

Para garantizar la precisión metodológica en los bioensayos, se implementó un riguroso protocolo de selección de los especímenes experimentales. La incorporación de cada instar larval al ensayo se realizó únicamente tras la verificación visual de la ecdisis completa (muda), confirmando así la transición efectiva al instar correspondiente. Con base en la duración promedio de cada estadio y sus respectivas desviaciones estándar, se establecieron edades específicas de selección para cada instar: 3 días para L1, 7 días para L2, 11 días para L3, 17 días para L4, 22 días para L5 y 35 días para L6. Este enfoque metodológico permitió evitar el solapamiento entre instares larvarios consecutivos, considerando que la duración promedio con desviación estándar de cada instar fue: $5,19 \pm 0,39$ días para L1; $3,67 \pm 0,53$ días para L2; $4,36 \pm 0,54$ días para L3; $5,93 \pm 0,46$ días para L4; $6,39 \pm 1,22$ días para L5 y $13,63 \pm 1,75$ días para L6 (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros temporales de los instares larvarios de *S. frugiperda* utilizados en el diseño experimental.

Parámetro	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Promedio (días ± DS)	5,19±0,39	3,67±0,53	4,36±0,54	5,93±0,46	6,39± 1,22	13,63± 1,75
Edad acumulada	5,19	8,86	13,22	19,15	25,54	39,17
Edad en bioensayo	3	7	11	17	22	35

Nota: La edad de selección para cada instar fue determinada estratégicamente para minimizar la probabilidad de confusión entre estadios consecutivos, considerando la variabilidad natural en los tiempos de desarrollo.

Fuente: autores

8.7. Descripción de las Actividades

8.7.1. Primer Objetivo: Determinar la concentración de azadiractina necesaria para causar la muerte del 50% de la población en prueba, en cada instar larval (CL₅₀)

Las larvas para el bioensayo fueron sometidas a un ayuno de tres horas, al término del cual se colocaron sobre los discos, que previamente habían sido desinfestados con hipoclorito de sodio al 0,5%, para evitar mortalidades causadas por factores diferentes al bioensayo, como entomopatógenos. Los discos fueron sumergidos durante cinco segundos en cada uno de los tratamientos a diferentes concentraciones de 0,00; 0,33; 0,66; 1,00; 1,33; 1,66 y 2,00 ml/L de aceite de Neem.

Una vez retirados los discos, se pusieron a secar a temperatura ambiente por dos horas. Cada disco se colocó individualizado en cajas plásticas de 5 cm de diámetro, sobre discos de papel filtro del mismo diámetro y, sobre cada disco se colocó una larva de *S. frugiperda*. Es importante hacer la anotación que todas las larvas que se usaron en este primer

ensayo fueron larvas de tres días de edad, para uniformizar esta variable, debido al desarrollo ontogénico de los seis instares larvales, ya que la tolerancia a los tóxicos aumenta con la edad de las larvas de lepidópteros. Cada caja plástica fue identificada con tratamiento, repetición, número de larva y fecha de iniciación del ensayo.

La mortalidad de una larva se comprobó con la observación directa a través de una lupa estereoscópica y con la ayuda de un pelo de pincel, la larva fue molestada para comprobar si respondía a estos estímulos, de todas maneras, estas larvas se mantuvieron aparte haciéndoles un seguimiento para estar seguros de su muerte. Además, la sintomatología que se presentó en las larvas afectadas, la apariencia inicial de color café claro y acortamiento del cuerpo, hasta aparentar una sequedad intensa, también fueron los signos indicadores sobre la muerte de las larvas.

Las larvas permanecieron cuatro días con los discos tratados en sus diferentes concentraciones, para cumplir con el tiempo determinado de cuatro días de exposición a los tratamientos. Al quinto día y cada tres días los discos de hojas de maíz fueron cambiados por discos de 3 cm de diámetro, desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,5% y lavados en agua destilada, para que las larvas continuaran su desarrollo hasta el estado de pupa o murieran en el transcurso de los días.

Para determinar la CL_{50} se procedió a realizar las observaciones diarias, cada doce horas para comprobar la mortalidad de la población sometida a los diferentes tratamientos. Al final del bioensayo y teniendo los datos de mortalidad y concentraciones en cada instar larval se realizaron las transformaciones necesarias para determinar la Concentración Letal Media (CL_{50}) para cada instar larval

Para cumplir con este primer objetivo para la determinación de la concentración letal mediante análisis Probit, se consideraron exclusivamente los datos de mortalidad registrados

hasta las 96 horas de exposición, en lugar de la mortalidad acumulada al término del ensayo. Esta decisión metodológica se fundamentó en que las concentraciones evaluadas del aceite de Neem alcanzaron porcentajes de mortalidad entre 98-100% en todos los instares larvarios de *S. frugiperda* al finalizar el experimento, lo cual imposibilitó el ajuste al modelo Probit debido a la ausencia de variabilidad requerida para este análisis estadístico.

8.7.2. Segundo Objetivo: Estimar el tiempo requerido para que la azadiractina cause la muerte del 50% de la población en prueba, en cada instar larval (TL₅₀).

Para calcular el Tiempo Letal Medio (TL₅₀), las mortalidades se tomaron hasta las 96 horas de exposición de las larvas, sin cambiar los discos tratados; ya que, según los Protocolos de Toxicidad se maneja el concepto del TL₅₀. Al quinto día se cambió el disco tratado por un disco de maíz desinfectado, pero no tratado, los cuales se renovaron cada tres días hasta la formación de pupas y adultos de *S. frugiperda*, que sobrevivieron a las diferentes concentraciones de la azadiractina. Al comprobarse la mortalidad de una larva, se anotó en el instrumento diseñado (Anexo 1), el tratamiento, la repetición, el número de larva en esa repetición y hora de observación de su muerte.

8.7.3. Análisis de datos.

Los testigos absolutos de los instares exhibieron una tasa de mortalidad insignificante (0,00-4,00%), con un promedio de todos los seis instares de 0,66% lo que, según directrices de organismos internacionales, exime la necesidad de aplicar la corrección de Abbott (1925) para el análisis de los datos experimentales. Por consiguiente, los análisis toxicológicos se realizaron sin incluir las mortalidades registradas en dichos controles absolutos. Las

mortalidades en el testigo inferiores al 5% son consideradas normales y atribuibles a factores no experimentales como manipulación, transporte o condiciones ambientales. Organismos como la FAO, la EPA (Environmental Protection Agency), la OCDE y la EPPO recomiendan explícitamente que no se aplique la corrección de Abbott en estos casos (EPPO, 2025).

Previo al análisis inferencial, se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Posteriormente, se implementó un Análisis de Varianza trifactorial (ANOVA) para detectar diferencias significativas entre tratamientos. La discriminación específica entre grupos se efectuó mediante la prueba post hoc de Tukey, estableciendo un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Esta metodología analítica proporcionó un marco estadístico robusto para la interpretación de los resultados, sustentando la fiabilidad de las inferencias establecidas respecto a las diferencias entre los grupos experimentales evaluados.

Los parámetros de CL_{50} en cada instar larval se determinaron con un Análisis Probit, transformando las seis concentraciones de aceite de neem a $\log_{10}$ y las mortalidades se transformaron a Probit. Un análisis de regresión simple determinó la relación entre la mortalidad y la concentración, lo que permitió construir la respuesta concentración-efecto. Con los datos de mortalidad acumulados cada doce horas, durante cuatro días (96 horas), se determinó el tiempo al cual murió el 50% de la población (TL_{50}) para cada concentración y en cada uno de los instares larvales. Para realizar todos los análisis estadísticos de los datos se utilizaron los Software SPSS Statistics 26.0 y Python.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Primer Objetivo Especifico

Determinar la concentración de azadiractina necesaria para causar la muerte del 50% de la población en prueba, en cada instar larval (CL₅₀).

En la Tabla 6 se observa que las mortalidades acumuladas al final del bioensayo, inducidas por las seis concentraciones del aceite de neem aplicadas sobre los seis instares larvales de *S. frugiperda*, superaron el 99,20%. En contraste, las mortalidades registradas en el control absoluto no sobrepasaron el 4,00% en ninguno de los instares evaluados. Debido a esta marcada diferencia, que refleja una mortalidad casi total en los tratamientos y nula en el control, no fue posible aplicar modelos de regresión para estimar con precisión los valores de Concentración Letal Media (CL₅₀) ni Tiempo Letal Medio (TL₅₀) basados en la mortalidad final. Por esta razón, los análisis se realizaron considerando únicamente las mortalidades acumuladas hasta las 96 horas posteriores a la exposición, permitiendo así una caracterización más adecuada de la dinámica tóxica del bioinsecticida en cada instar larval.

Tabla 6. Comparación de medias de las mortalidades totales (%) causadas por seis concentraciones de aceite de Neem, sobre los seis instares larvales de *S. frugiperda*.

Concentración (μ L/L)	Mortalidad Total (%)	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Control	0,66 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,50 a	4,00 a
275	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b
550	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b
833	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b
1108	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b
1383	99,87 b	99,20 a	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b
1667	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b	100,00 b

Nota: Los promedios de mortalidad en cada columna con letra diferente son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Fuente: autores

En la Tabla 7, se presentan las ecuaciones de regresión Probit de cada instar las cuales muestran Coeficientes de Determinación (R^2) muy altos desde 0,94 hasta 0,95, lo que refleja una excelente capacidad predictiva del modelo y un ajuste robusto de los datos experimentales. Esto permite confiar en que el comportamiento de la Concentración Letal Media (CL_{50}) responde de manera consistente y estadísticamente válida al modelo propuesto.

El patrón creciente del CL_{50} es una manifestación comúnmente reportada en bioensayos con insecticidas, donde los estados inmaduros de los insectos son más vulnerables a agentes tóxicos. Esta vulnerabilidad se relaciona con varios factores fisiológicos y bioquímicos. Las larvas jóvenes poseen una cutícula más delgada, menor capacidad de detoxificación y menor volumen corporal, lo que permite una rápida absorción del compuesto tóxico y, por tanto, una mayor mortalidad a bajas concentraciones (Nation, 2008; Després et al., 2007). En contraste, las larvas de instares avanzados exhiben mecanismos de defensa más desarrollados, como el engrosamiento de la cutícula, mayor actividad de enzimas detoxificantes e incremento del tejido adiposo y una mayor masa corporal que diluye el efecto del tóxico consumido (Li et al., 2007; Feyereisen, 2012).

Tabla 7. Ecuaciones de Regresión, Coeficiente de Determinación y Concentración Letal Media para cada instar larval de *S. frugiperda*.

Instar	Ecuación de Regresión	R^2	CL_{50} ($\log_{10}$)	CL_{50} ($\mu\text{L/L}$)
1	$y = 3,28x - 4,06$	0,95	2,76	579,67
2	$y = 3,22x - 4,06$	0,95	2,82	654,18
3	$y = 3,22x - 4,16$	0,95	2,85	702,69
4	$y = 3,14x - 4,11$	0,94	2,90	795,69
5	$y = 3,14x - 4,21$	0,94	2,93	856,22

6	$y = 3,14x - 4,31$	0,94	2,96	921,36
Fuente: autores				

El primer instar larval presentó una CL_{50} de 579.67 $\mu\text{L/l}$ con un modelo de regresión probit de $y = 3.28x - 4.06$ y un Coeficiente de Determinación (R^2) de 0.95. Este valor representa la concentración más baja requerida para alcanzar la mortalidad media del 50 %, de la población en prueba, lo que sugiere una alta susceptibilidad del primer instar las moléculas del aceite de neem. Esta sensibilidad concuerda con lo reportado por Castiglioni et al. (2013), quienes indicaron que los instares tempranos de *S. frugiperda* presentan una mayor permeabilidad cuticular y menor capacidad de detoxificación, lo que facilita la acción de insecticidas biológicos o químicos.

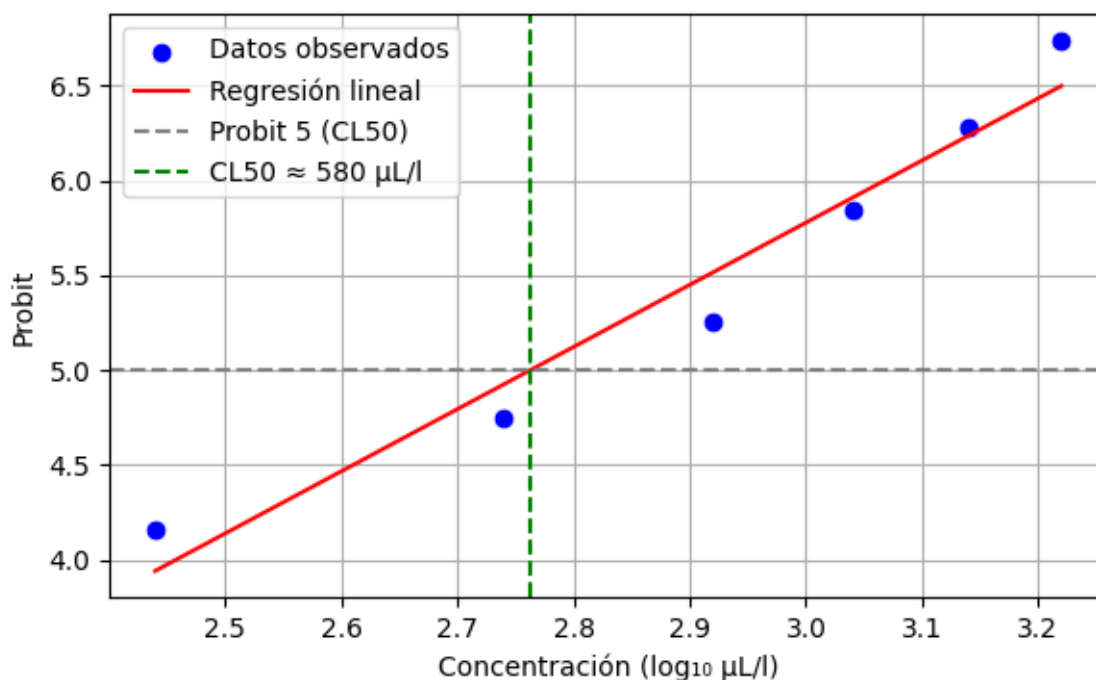


Figura 7. Regresión Probit del primer instar larval de *S. frugiperda*, sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

En el segundo instar, la CL_{50} aumentó a $654.18 \mu\text{L/l}$, con una regresión de $y = 3.22x - 4.06$ y un $R^2 = 0.95$. Aunque aún se observa una alta susceptibilidad, el ligero incremento en la CL_{50} indica un desarrollo incipiente de mecanismos fisiológicos de defensa, como el engrosamiento cuticular o la activación de enzimas detoxificantes, fenómenos descritos por Yu (2008) en larvas de lepidópteros bajo exposición a xenobióticos.

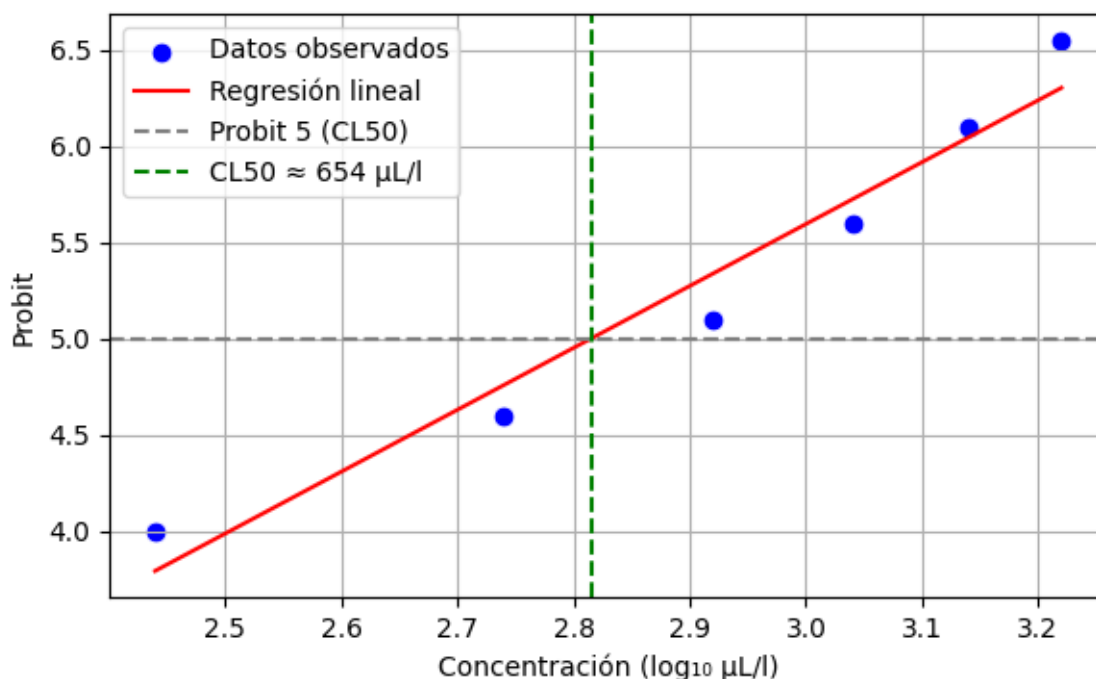


Figura 8. Regresión Probit del segundo instar larval de *S. frugiperda*, sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

El tercer instar mostró una CL_{50} de $702.69 \mu\text{L/l}$, con una ecuación de regresión $y = 3.22x - 4.16$ y un $R^2 = 0.95$. Este ascenso progresivo en la CL_{50} es coherente con un patrón de resistencia fisiológica gradual. En esta etapa, las larvas suelen aumentar su actividad alimentaria y volumen corporal, lo cual puede diluir el efecto del tratamiento, como lo

evidenció Zalucki et al. (2012), quienes señalaron que el tamaño corporal influye en la capacidad de tolerancia al insecticida.

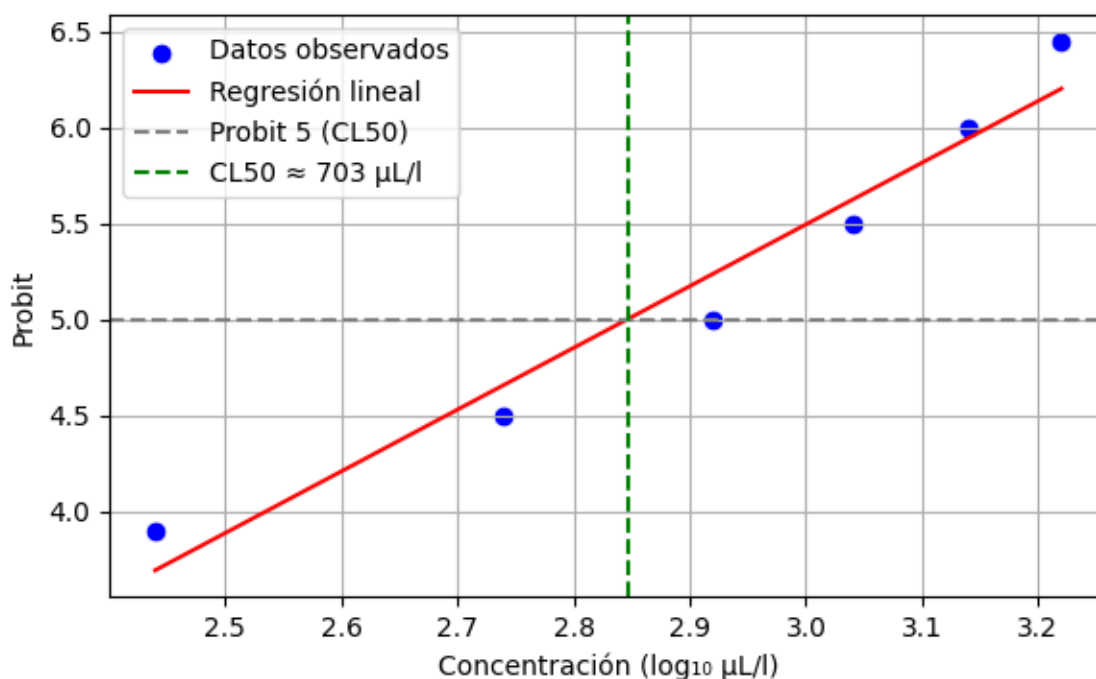


Figura 9. Regresión Probit del tercer instar larval de *S. frugiperda*, sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

La CL_{50} continúa su incremento hasta 795.69 µL/l, con una ecuación de regresión $y = 3.14x - 4.11$ y un $R^2 = 0.94$. Aunque la pendiente disminuye ligeramente, se mantiene una alta correlación. Este valor refleja una menor susceptibilidad y sugiere que a partir de este instar se requieren mayores concentraciones para lograr efectos letales medios. Lo anterior es compatible con estudios de Gutiérrez-Moreno et al. (2019), donde se evidencia que las larvas más avanzadas de *S. frugiperda* requieren dosis significativamente más altas para alcanzar la CL_{50} , debido al desarrollo de una mayor masa corporal y el metabolismo más eficiente.

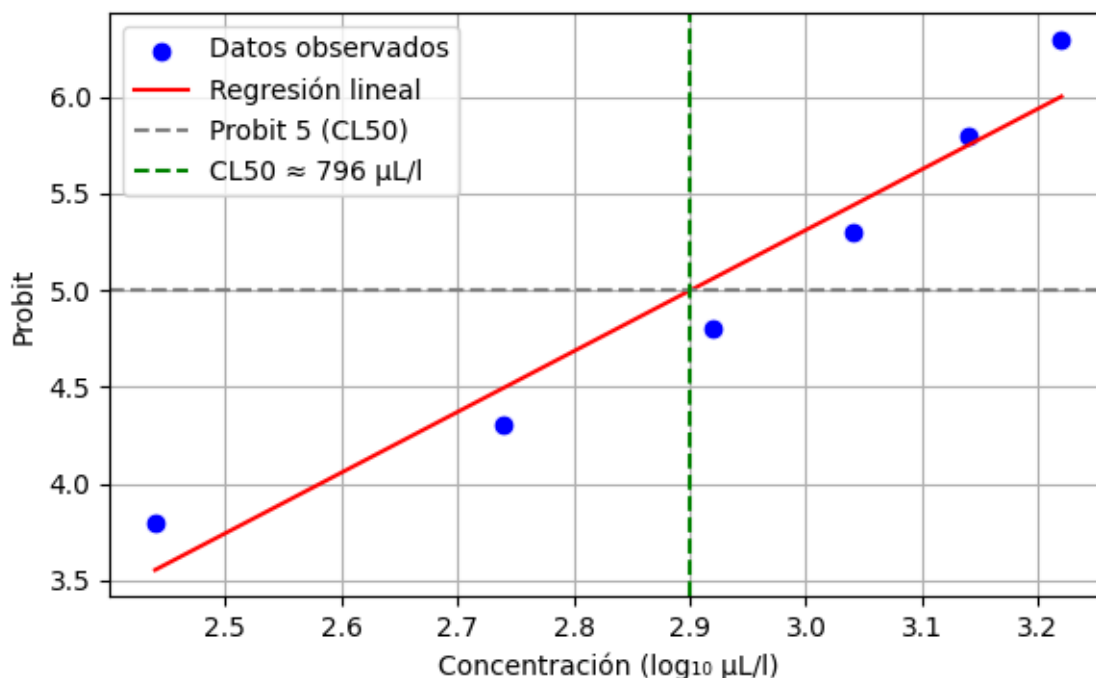


Figura 10. Regresión Probit del cuarto instar larval de *S. frugiperda*, sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

En el quinto instar, la CL₅₀ se eleva a 856.22 µL/l con la regresión $y = 3.14x - 4.21$ ($R^2 = 0.94$). Este incremento notable reafirma la tendencia observada, reforzando la noción de que el instar larval influye significativamente en la eficacia de los tratamientos. Las larvas en este instar pueden haber acumulado reservas lipídicas que modulan la distribución del compuesto en el cuerpo, como proponen Kariuki y Onyango (2014) al evaluar la fisiología larval frente a toxinas vegetales.

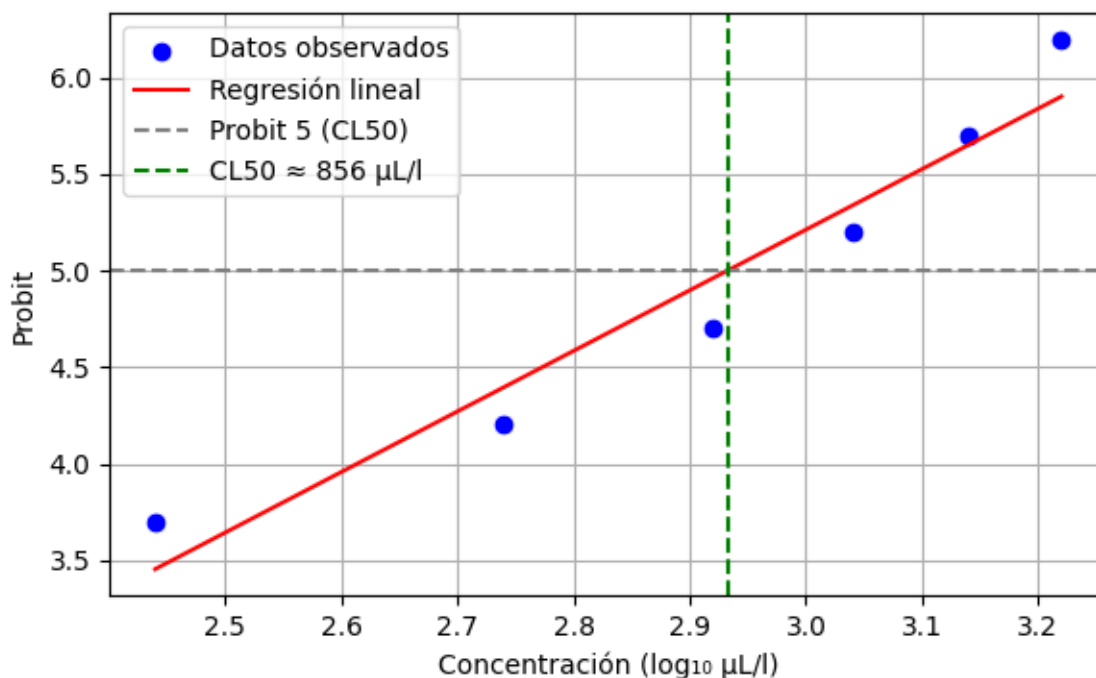


Figura 11. Regresión Probit del quinto instar larval de *S. frugiperda*, sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

Finalmente, el sexto instar mostró la CL₅₀ más alta de 921.36 µL/l, con la regresión de $y = 3.14x - 4.31$ ($R^2 = 0.94$). Esta fase presenta la mayor tolerancia al tratamiento, lo cual puede deberse a un sistema enzimático de detoxificación completamente funcional y a una cutícula más gruesa y desarrollada, dificultando la penetración de compuestos. Según Pereira et al. (2017), este instar representa el mayor desafío en el control químico o biológico de *S. frugiperda*, siendo menos susceptible a la mayoría de los insecticidas.

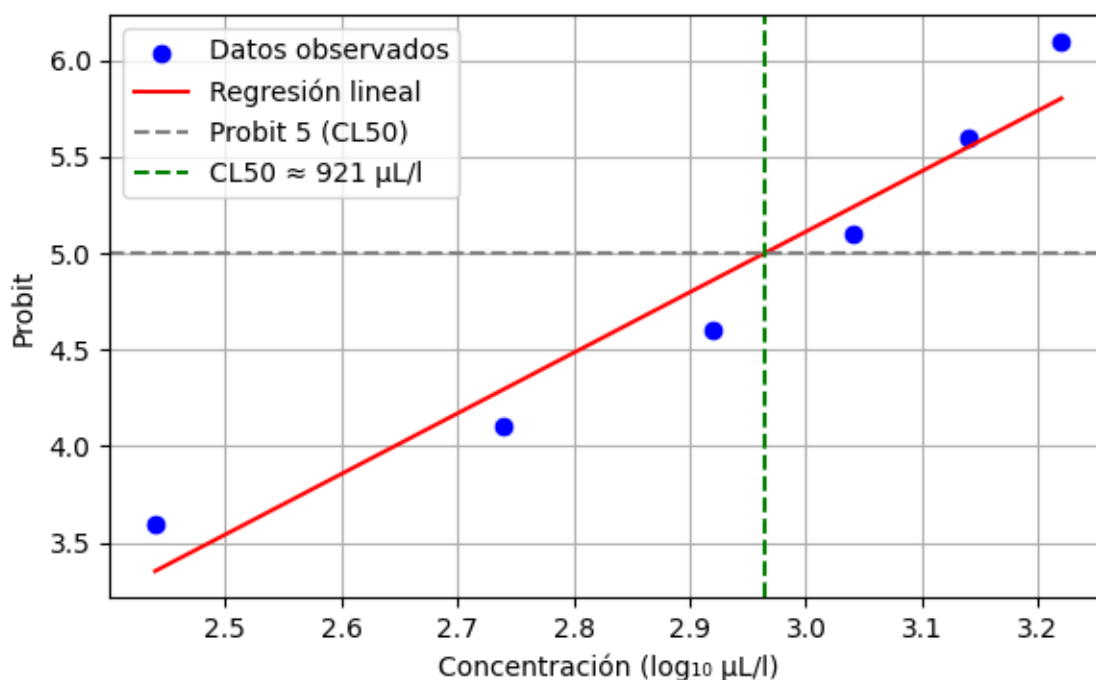


Figura 12. Regresión Probit del sexto instar larval de *S. frugiperda*, sometido a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

9.2. Discusión Científica del ANOVA Trifactorial

El análisis de varianza trifactorial realizado en SPSS (Tabla 8) permitió evaluar el efecto de tres factores (instar larval, concentración del bioinsecticida y tiempo de exposición) sobre la mortalidad larval de *S. frugiperda*. Este ANOVA multifactorial determinó no solo los efectos individuales (principales) de cada factor, sino también las interacciones entre ellos, fundamentales en estudios bioecotoxicológicos donde las respuestas pueden ser sinérgicas, antagonistas o independientes.

El efecto principal del instar fue altamente significativo ($p < 0.001$), lo cual confirma que la susceptibilidad al bioinsecticida disminuye conforme avanza el desarrollo larval. El

valor F para el factor instar fue de 152,70, el mayor entre los efectos principales, lo que sugiere que el instar de desarrollo larval influye considerablemente en la respuesta al bioinsecticida. Este resultado está respaldado por los valores crecientes de CL_{50} obtenidos en los modelos Probit individuales de 579,67 a 921,36 $\mu\text{L/l}$; evidenciando una resistencia progresiva desde el segundo hasta el sexto instar.

El efecto principal de la concentración también fue significativo ($p < 0.001$), coherente con una respuesta dosis-dependiente. Las curvas de regresión mostraron pendientes positivas en todos los instares, indicando un aumento proporcional de la mortalidad con el incremento de la concentración. Este comportamiento confirma la eficacia del bioinsecticida y valida su aplicación bajo una estrategia de manejo integrado de plagas (MIP).

El efecto principal del tiempo de exposición fue igualmente significativo, mostrando un aumento acumulativo en la mortalidad observado hasta las 96 horas. Esto sugiere que el bioinsecticida requiere un tiempo de acción relativamente lento, característica frecuente en bioinsecticidas de origen vegetal o microbiano.

Asimismo, las interacciones instar x concentración e instar x hora también resultaron significativas ($p \leq 0,001$), evidenciando que la toxicidad del neem varía en función tanto del desarrollo larval como la duración de exposición. Esto permite identificar combinaciones óptimas de dosis y tiempo para lograr una eficacia máxima; mientras que, la interacción concentración x hora y la interacción triple no fueron significativas ($p > 0,05$), lo que indica que estos efectos combinados no alteran sustancialmente la mortalidad observada.

Desde el punto de vista entomológico y toxicológico, este análisis permite concluir que la eficacia del bioinsecticida se maximiza en instares larvales tempranos, donde las larvas presentan menor masa corporal, menor capacidad de detoxificación enzimática y mayor vulnerabilidad fisiológica. A nivel práctico, los datos obtenidos refuerzan la necesidad de monitoreo temprano de la plaga y la implementación de estrategias de control dirigidas a las

primeras fases larvales, lo cual permitiría optimizar los resultados y minimizar la presión de selección sobre las poblaciones.

Tabla 8. Análisis de varianza trifactorial realizado en SPSS.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Mortalidad (%)						
Origen	Tipo III de gl	Media	F	Sig.		
	suma de cuadrados	cuadrática				
Modelo	1584261, 116a	287	5520,074	6,362	,000	
corregido						
Intersección	2000251,084	1	2000251,084	2305,376	,000	
Instar	662453,087	5	132490,617	152,701	,000	
Concentraci	51152,587	5	10230,517	11,791	,000	
ón µL/l						
Hora	549314,699	7	78473,528	90,444	,000	
Instar*Conc	67286,267	25	2691,451	3,102	,000	
entración						
µL/l						
Instar*Hora	94741,163	35	2706,890	3,120	,000	
Concentraci	35029,663	35	1000,848	1,154	,249	
ón						
µL/l*Hora						
Instar*Conc	124283,649	175	710,192	,819	,953	
entración						
µL/l * Hora						
Error	999528,800	1152	867,647			
Total	4584041,000	1440				
Total,	2583789,916	1439				
corregido						

Nota: R al cuadrado = ,613 (R al cuadrado ajustada = ,517)

Fuente: autores

9.3. Análisis de Regresión Probit Conjunta (Todos los Instares).

9.3.3. Análisis integral de CL₅₀ en los seis instares larvales de *S. frugiperda*.

La Figura 9, muestra el análisis conjunto de la mortalidad de los seis instares larvas de *S. frugiperda*, en función de diferentes concentraciones log₁₀ del aceite de Neem. Se observa que los datos de mortalidad, transformados a escala Probit, presentan una relación positiva y lineal con la concentración aplicada, como lo indica la pendiente ascendente de la línea negra correspondiente al modelo de regresión conjunta.

Cada color en los puntos representa un instar larval específico. Se aprecia que, aunque existen ligeras variaciones entre instares, en general todos siguen una tendencia común, a mayor concentración del bioplaguicida, mayor mortalidad larval, lo cual es consistente con el principio básico de la toxicología dosis-respuesta. Las diferencias verticales (ligeros desplazamientos) entre los instares indican que hay alguna variabilidad en la sensibilidad larval entre los diferentes instares de desarrollo, pero la tendencia general permite construir un solo modelo predictivo para todo el conjunto.

La línea de regresión conjunta corta el eje del Probit en el valor de 5, que corresponde a la mortalidad del 50%, a una concentración logarítmica cercana a 2.87, lo que corresponde aproximadamente a una concentración real de 740,4 µL/l (como se indica con la línea verde punteada). Esto significa que, en términos globales, esta concentración sería suficiente para provocar el 50% de mortalidad promedio en una población mixta de larvas de diferentes instares.

El ajuste del modelo conjunto demuestra que es posible generalizar un comportamiento dosis-respuesta para todas las etapas larvales, lo que facilita enormemente la planificación de programas de manejo en el campo. No obstante, debe tenerse en cuenta que larvas de instares más avanzados podrían requerir concentraciones ligeramente superiores para alcanzar los mismos niveles de control que los instares tempranos, como sugieren los ligeros desplazamientos de los puntos de datos.

La calidad del ajuste visual y la distribución ordenada de los puntos alrededor de la línea de regresión refuerzan la validez del modelo conjunto, lo que respalda el uso del valor de 740,4 $\mu\text{L/l}$ como una referencia técnica para diseñar estrategias de control efectivo con aceite de Neem en poblaciones mixtas de *S. frugiperda*.

Los datos presentados muestran la evolución del CL_{50} en función del desarrollo ontogenético de *S. frugiperda*, desde el primer hasta el sexto instar. El CL_{50} se incrementa progresivamente desde 579,67 $\mu\text{L/l}$ en el primer instar hasta 921,36 $\mu\text{L/l}$ en el sexto instar, lo cual indica una disminución de la susceptibilidad larval al aceite de neem conforme avanza el desarrollo del insecto.

La interpretación de la Figura 9, donde se observa la CL_{50} versus la concentración muestra una curva ascendente continua, lo que confirma la tendencia de incremento progresivo de la tolerancia larval al bioinsecticida. Este comportamiento sugiere la existencia de una relación dosis-respuesta dependiente del instar larval. La pendiente de las ecuaciones de regresión también disminuye ligeramente desde 3,28 a 3,14, lo cual puede interpretarse como una leve disminución en la homogeneidad de la respuesta entre individuos a medida que aumenta el instar, posiblemente relacionada con una mayor variabilidad fisiológica entre larvas maduras.

Desde el punto de vista del manejo integrado de plagas (MIP), este patrón tiene implicaciones prácticas importantes. La eficacia del control con insecticidas, ya sean químicos o botánicos, es mayor cuando se aplica en instares tempranos del insecto, antes de que este desarrolle mecanismos de tolerancia. Aplicaciones tardías no solo son menos eficaces, sino que pueden favorecer la selección de individuos resistentes, especialmente si la concentración utilizada no es suficiente para superar el umbral de tolerancia en los instares superiores (Sparks & Nauen, 2015).

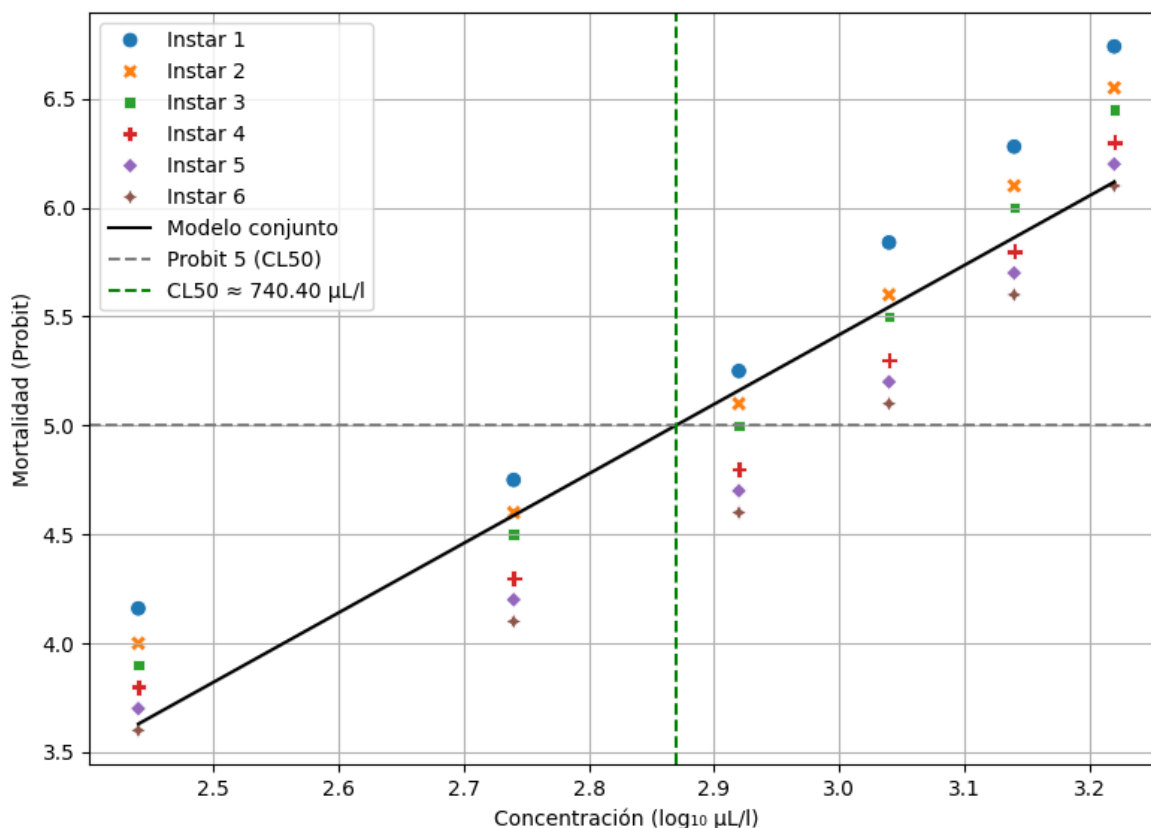


Figura 13. Regresión Probit Conjunta de los seis instares larvales de *S. frugiperda*, sometidos a seis concentraciones de aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

9.3.4. Comparación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) y el Coeficiente de Determinación (R²), según el instar larval de *S. frugiperda*, tratados con aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.

La evaluación del comportamiento de la Concentración Letal Media (CL₅₀) en los diferentes instares larvales de *S. frugiperda* tratados con aceite de Neem mostró una tendencia creciente. Los valores de CL₅₀ aumentaron progresivamente desde el primer instar hasta el sexto instar, indicando que las larvas de los instares más avanzados requieren mayores concentraciones del bioinsecticida para alcanzar un 50% de mortalidad. Este comportamiento

concuerta con la fisiología del insecto, ya que las larvas mayores tienen una mayor masa corporal, mejores mecanismos de detoxificación enzimática y mayor resistencia fisiológica, factores que disminuyen su sensibilidad a los tratamientos.

El Coeficiente de Determinación (R^2) de los modelos de regresión Probit fue consistentemente elevado, cercano a 0.95 en todos los instares, lo que sugiere un ajuste robusto de los datos al modelo estadístico. Sin embargo, se detectó una ligera disminución del R^2 en instares más avanzados, lo que podría asociarse a una mayor variabilidad individual en las respuestas fisiológicas frente al aceite de Neem.

Desde el punto de vista práctico, los resultados recomiendan priorizar el control en los tres primeros instares larvales, donde se logra una mayor eficacia con menores dosis y se presenta una respuesta más homogénea. Esta estrategia optimiza el uso de bioinsecticidas, reduce costos y minimiza la presión de selección hacia resistencia.

La Concentración Letal Media estimada para el conjunto de instares fue de 740,4 $\mu\text{L/l}$, lo que representa un valor promedio que puede servir de referencia en programas de manejo en campo. No obstante, por ejemplo, en un cultivo de maíz donde coexisten larvas de diferentes instares, este valor debe ser interpretado con cautela. Aunque la CL_{50} conjunta proporciona una base general, las larvas en instares tempranos serían controladas eficazmente con concentraciones cercanas o incluso inferiores a 740,4 $\mu\text{L/l}$; mientras que larvas más avanzadas de los instares cuarto, quinto y sexto podrían requerir concentraciones superiores para alcanzar niveles de mortalidad comparables. Por tanto, en situaciones de campo mixtas, podría ser recomendable ajustar las dosis hacia niveles más altos que la CL_{50} conjunta, o reforzar el monitoreo para realizar aplicaciones oportunas cuando predominan instares susceptibles, maximizando así la eficiencia del control y reduciendo el impacto ambiental.

Los resultados destacan la importancia de la vigilancia fitosanitaria temprana y la aplicación estratégica de tratamientos en función del instar de desarrollo de la plaga para lograr un manejo exitoso y sostenible de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz, principalmente.

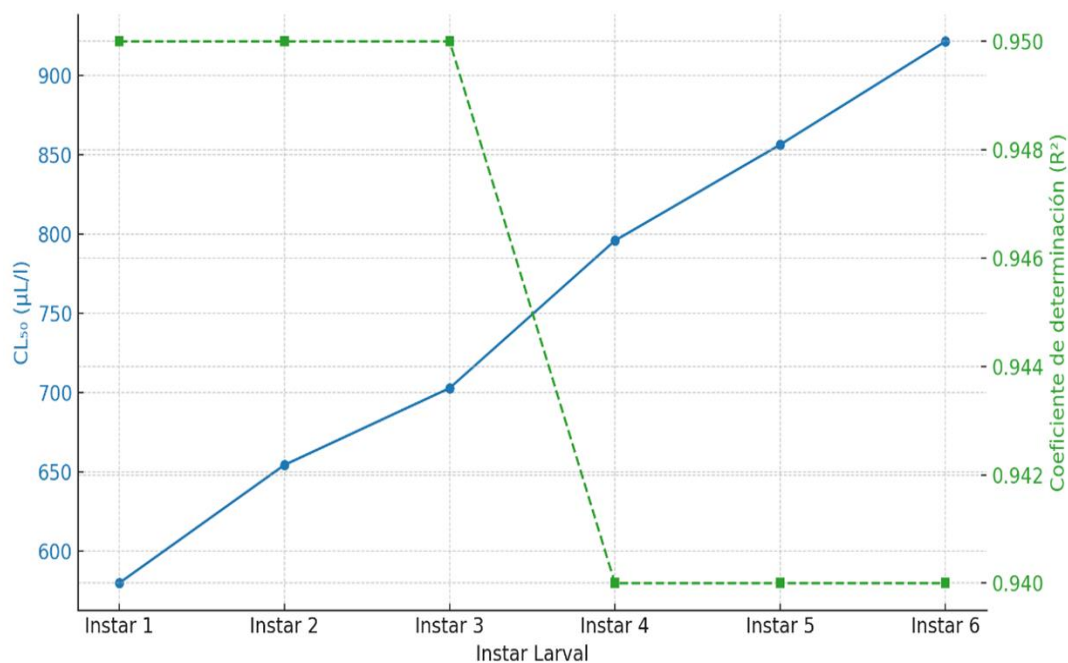


Figura 14. Comparación de la Concentración Letal Media ($\mu\text{L/l}$) y el Coeficiente de Determinación (R^2), según el instar larval de *S. frugiperda*, tratados con aceite de Neem, en condiciones de laboratorio.

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

9.2. Segundo Objetivo Específico

9.2.1. Determinación del Tiempo Letal Medio (TL_{50}) para los seis instares de *S. frugiperda*.

9.2.1.1. Análisis de Regresión

A. Primer instar

Los resultados correspondientes al primer instar larval, presentados en la **Tabla 9**, muestran una sensibilidad moderada al aceite de neem. Los valores de TL_{50} oscilaron entre 31,07 y 67,02 horas, con un promedio de 52,39 horas. El valor más bajo de TL_{50} se registró con la concentración intermedia de 1383 $\mu\text{L/L}$, lo cual podría atribuirse a una mayor vulnerabilidad fisiológica durante las primeras etapas del desarrollo, antes del fortalecimiento de los mecanismos de detoxificación del insecto. Los coeficientes de determinación (R^2), que variaron entre 0,55 y 0,78, indican un ajuste aceptable del modelo de regresión, aunque con cierta dispersión atribuible a la variabilidad individual típica de este primer instar inmaduro.

Adicionalmente, se observó una relación positiva entre la concentración y la mortalidad en el primer instar, representada por la ecuación de regresión $y = 0.87x + 6.85$ y un Coeficiente de Determinación de $R^2 = 0.68$, lo que sugiere una clara respuesta dosis-dependiente. Aunque se identificaron algunos valores atípicos, como un aumento del TL_{50} con el incremento de la concentración, esto podría deberse a la heterogeneidad en la distribución del producto o a variaciones biológicas, sin que ello afecte la tendencia general de eficacia del neem en larvas tempranas.

Tabla 8. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de primer instar de *S. frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones de aceite de neem.

Concentración ($\mu\text{L/L}$)	Ecuación Regresión	R^2	TL_{50} (horas)
275	$y=0,90x +4,86$	0,71	50,16
550	$y=0,82x +2,43$	0,55	58,01
833	$y=0,94x -13$	0,77	67,02
1108	$y=0,99x -2,86$	0,78	53,39
1383	$y=0,86x +23,28$	0,60	31,07
1667	$y=0,73x +10,14$	0,65	54,60

Fuente: autores

B. Segundo instar

En el segundo instar se evidenció una mayor sensibilidad larval, con una reducción progresiva del TL_{50} desde 54,99 hasta 21,27 horas al aumentar la concentración del aceite (Tabla 10), con un promedio de 39,55 horas. Esto sugiere una clara relación dosis-respuesta, en la cual las concentraciones más elevadas provocaron una acción letal más rápida. La menor TL_{50} se registró en la concentración 1667 $\mu\text{L/L}$, lo que confirma la eficacia del neem en este instar. Los valores de R^2 , que oscilaron entre 0,61 y 0,74, respaldan la consistencia del modelo de regresión.

La regresión obtenida para este instar ($y = -0.02x + 55.57$; $R^2 = 0.84$) describe una relación inversa entre la concentración y el TL_{50} , reforzando la conclusión de que el neem fue más efectivo a dosis altas. Esta respuesta podría estar relacionada con el inicio del desarrollo de mecanismos de defensa fisiológicos y conductuales en larvas de segundo instar.

Tabla 9. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de segundo instar de *S. frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones de aceite de neem.

Concentración ($\mu\text{L/L}$)	Ecuación Regresión	R^2	TL_{50} (horas)
275	$y=1,03x -6,71$	0,74	54,99
550	$y=1,18x -11,14$	0,74	51,81
833	$y=0,99x +13,14$	0,67	37,23
1108	$y=1,05x +7,43$	0,74	40,54
1383	$y=0,94x +20,43$	0,74	31,46
1667	$y=0,86x +31,71$	0,61	21,27

Fuente: autores

C. Tercer instar

En la **Tabla 11** se presentan los TL_{50} para el tercer instar larval, que oscilaron entre 30,05 y 57,35 horas, con un promedio general de 37,88 horas. Aunque se mantuvo la tendencia de disminución del TL_{50} con el aumento de la concentración, hubo excepciones notables. Por ejemplo, a 1383 $\mu\text{L/L}$ se observó un TL_{50} de 57 horas, lo cual podría estar relacionado con variabilidad biológica o el inicio de procesos de resistencia. En particular, la concentración de 1108 $\mu\text{L/L}$ arrojó un R^2 de solo 0,13, reflejando una baja confiabilidad en ese modelo. Sin embargo, en general, los R^2 fueron moderados a altos, lo que sustenta la validez de los datos.

La ecuación de regresión global para este instar ($y = -0.03x + 57.11$; $R^2 = 0.64$) indica una reducción del TL_{50} con el incremento de la concentración, similar al patrón observado en el segundo instar. El valor moderado de R^2 sugiere cierta dispersión en los datos, posiblemente atribuible a diferencias en la ingestión del aceite o en el estado fisiológico de las larvas.

Tabla 10. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de tercer instar de *S. frugiperda* tratadas con distintas concentraciones de aceite de neem.

Concentración ($\mu\text{L/L}$)	Ecuación Regresión	R^2	TL_{50} (horas)
275	$y=0,69x + 10,43$	0,75	57,35
550	$y=0,80x + 9,23$	0,63	50,96
833	$y=0,87x + 23,86$	0,64	30,05
1108	$y=1,98x - 29,14$	0,13	39,97
1383	$y=0,94x - 3,57$	0,68	57,00
1667	$y=0,77x + 26,71$	0,50	30,25

Fuente: autores

D. Cuarto instar

Los resultados del cuarto instar (Tabla 12) mostraron una menor eficacia del aceite de neem, reflejada en los elevados TL_{50} , que van desde 90,60 hasta 292,48 horas. La concentración 550 $\mu\text{L/L}$ arrojó el TL_{50} más alto, lo cual es coherente con la lógica del incremento en el tiempo requerido para alcanzar mortalidad a bajas dosis. Sin embargo, incluso a concentraciones mayores, los TL_{50} se mantuvieron altos, indicando una reducción significativa de la toxicidad del neem en esta etapa larval. Los R^2 fueron bajos, entre 0,12 y 0,57, lo que evidencia una alta variabilidad en los datos, posiblemente influida por la mayor capacidad detoxificante y mayor masa corporal del insecto en este instar.

Para los instares cuarto, quinto y sexto, la respuesta fue más compleja. El cuarto instar arrojó un TL_{50} elevado (promedio cercano a 146 h) con una regresión negativa ($y = -0.06x + 195.46$; $R^2 = 0.64$), indicando que la eficacia del neem disminuyó considerablemente, probablemente debido al mayor tamaño corporal y una cutícula más resistente, como ha sido descrito en larvas avanzadas de lepidópteros (Schmutterer, 1990).

Tabla 11. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de cuarto instar de *S. frugiperda* expuestas a distintas concentraciones de aceite de neem.

Concentración ($\mu\text{L/L}$)	Ecuación Regresión	R^2	TL_{50} (horas)
275	$y=0,48x -8,14$	0,47	121,13
550	$y=0,17x +0,28$	0,12	292,48
833	$y=0,60x -10,87$	0,43	101,45
1108	$y=0,55x -7,28$	0,33	104,15
1383	$y=0,73x -16,14$	0,57	90,60
1667	$y=0,34x -6,43$	0,56	165,97

Fuente: autores

E. Quinto instar

Las larvas en el quinto instar evidenciaron una marcada resistencia al aceite de neem, con TL_{50} extremos, alcanzando un máximo de 409,85 horas a 550 $\mu\text{L/L}$, un TL_{50} promedio de 196.69 horas. Aunque hubo una ligera disminución del TL_{50} a mayores concentraciones (hasta 95,17 horas a 1667 $\mu\text{L/L}$), los resultados siguen siendo elevados en comparación con los primeros tres instares. Los R^2 fueron bajos en general (entre 0,16 y 0,48), indicando que la regresión no explica de forma robusta la variabilidad observada (Tabla 13). Este patrón podría explicarse por una combinación de mecanismos fisiológicos de tolerancia y mayor volumen corporal que disminuye la eficacia del aceite de Neem en este quinto instar avanzado.

El quinto instar presentó la mayor variabilidad y valores extremos (hasta 409.85 horas de TL_{50} en algunas concentraciones), con una ecuación de regresión más pronunciadamente negativa ($y = -0.11x + 290.36$; $R^2 = 0.68$). Esta respuesta puede estar influenciada por una combinación de factores fisiológicos, incluyendo tasas metabólicas elevadas, cambios en la permeabilidad cuticular y la capacidad de metabolizar compuestos tóxicos.

Tabla 12. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de quinto instar de *S. frugiperda* tratadas con diferentes concentraciones de aceite de neem.

Concentración ($\mu\text{L/L}$)	Ecuación Regresión	R^2	TL_{50} (horas)
275	$y=0,26x -6,14$	0,38	215,92
550	$y=0,13x -3,28$	0,16	409,85
833	$y=0,23x -4,14$	0,23	235,39
1108	$y=0,49x -6,57$	0,46	115,45
1383	$y=0,53x -7,43$	0,48	108,36
1667	$y=0,65x -11,86$	0,48	95,17

Fuente: autores

F. Sexto instar

Los datos correspondientes al sexto instar, resumidos en la **Tabla 14**, evidencian los TL_{50} más altos del estudio, con valores que oscilaron entre 93,18 y 215,85 horas. El TL_{50} promedio de 135.77 horas. Aunque las concentraciones más elevadas redujeron los tiempos letales, el efecto sigue siendo limitado en términos de rapidez. Los valores de R^2 se mantuvieron entre 0,34 y 0,57, lo que indica una explicación moderada del modelo, pero aún con un componente importante de variabilidad no explicado. Esta etapa representa la mayor resistencia al neem, evidenciando una clara disminución de eficacia larvícida conforme avanza el desarrollo larval de *S. frugiperda*.

El sexto instar mostró una tendencia negativa moderada ($y = -0.06x + 181.91$; $R^2 = 0.68$), con valores de TL_{50} que, aunque menores que los del quinto instar, permanecieron elevados. Esto confirma que las larvas en los últimos instares requieren mayores concentraciones o exposiciones prolongadas para alcanzar niveles de mortalidad similares a los de los instares tempranos. Esto implica que, aunque las larvas más grandes son más resistentes, la eficacia del neem aún depende proporcionalmente de la concentración administrada.

Tabla 13. Tiempo Letal Medio (TL_{50}), ecuaciones de regresión y coeficientes de determinación (R^2) para larvas de sexto instar de *S. frugiperda* expuestas a diferentes concentraciones de aceite de neem.

Concentración ($\mu\text{L/L}$)	Ecuación Regresión	R^2	TL_{50} (horas)
275	$y=0,40x -11,14$	0,47	152,85
550	$y=0,27x -8,28$	0,34	215,85
833	$y=0,37x -9,14$	0,38	159,84
1108	$y=0,63x -11,57$	0,55	97,73
1383	$y=0,67x -12,43$	0,57	93,18

9.2.1.2. Discusión

Los resultados obtenidos en este bioensayo revelan una marcada variación en la sensibilidad de *S. frugiperda* al aceite de neem *Azadirachta indica* A. Juss, según el instar larval. Esta variabilidad en los TL_{50} , calculados a partir de la mortalidad acumulada entre las 12 y 96 horas, subraya la importancia de aplicar el aceite en el momento adecuado como parte del manejo integrado de plagas. Se evidenció que la eficacia del neem disminuye progresivamente conforme las larvas avanzan en su desarrollo, lo que concuerda con investigaciones anteriores que indican que los instares tempranos son más susceptibles debido a su cutícula más delgada y menor capacidad de detoxificación (Schmutterer, 1990; Mordue & Nisbet, 2000).

En el primer instar, se obtuvo un TL_{50} promedio de 52,37 horas, con una regresión positiva ($y = 0,87x + 6,85$; $R^2 = 0,68$), lo cual indica que el aumento en la concentración del neem genera un efecto acumulativo sobre el tiempo. Esta respuesta podría explicarse por la limitada capacidad enzimática de las larvas jóvenes para metabolizar compuestos aleloquímicos como los limonoides presentes en el neem (Koul et al., 2004).

En contraste, el segundo instar presentó una relación negativa entre concentración y TL_{50} ($y = -0,02x + 55,57$; $R^2 = 0,84$), lo cual sugiere que una mayor concentración reduce el tiempo necesario para alcanzar el 50% de mortalidad. El alto valor de R^2 respalda una acción consistente del neem en este instar larval.

Para el tercer instar ($y = -0,03x + 57,11$; $R^2 = 0,64$), se mantuvo la tendencia decreciente del TL_{50} con el incremento de la concentración, aunque con mayor dispersión. Esta variabilidad podría deberse a cambios fisiológicos iniciales, como el engrosamiento de

la cutícula o el inicio de mecanismos de detoxificación, sin que ello reste efectividad al bioplaguicida.

Los instares más avanzados (cuarto, quinto y sexto) registraron TL_{50} más elevados, lo que indica una menor vulnerabilidad al neem. Esta resistencia relativa podría estar relacionada con una cutícula más desarrollada y una mayor capacidad detoxificante. De forma destacada, el cuarto instar mostró un TL_{50} sumamente alto (292,48 h) a 550 μ L/L, lo que podría sugerir una tolerancia transitoria a esta concentración. En el caso del quinto y sexto instares, también se observaron TL_{50} elevados, aunque con una tendencia descendente conforme aumentó la concentración, lo cual indica que solo las concentraciones más altas son efectivas para estos dos últimos instares (Figura x).

La figura 11 de TL_{50} obtenida a partir del tratamiento con aceite de neem sobre larvas de *S. frugiperda* en distintos instares larvales revela diferencias marcadas en la susceptibilidad entre instares. Las larvas del **primer instar** (línea azul oscuro) mostraron un TL_{50} que osciló entre 45 y 65 horas, con una leve tendencia al aumento en concentraciones intermedias. Este comportamiento refleja una alta susceptibilidad a bajas concentraciones del extracto, como se ha reportado en investigaciones similares donde se destaca la eficacia del neem sobre estados larvales tempranos (Mordue & Nisbet, 2000; Koul et al., 2004). Las larvas del **segundo instar** (línea naranja) presentaron un comportamiento similar, con tiempos letales entre 40 y 60 horas y una ligera reducción del TL_{50} en concentraciones medias, lo cual sugiere la incipiente aparición de mecanismos de detoxificación fisiológica que podrían aumentar levemente su tolerancia (Isman, 2006).

Por otro lado, el **tercer instar** (línea verde oscuro) mostró los valores de TL_{50} más bajos del estudio, en torno a las 35 horas y con una tendencia descendente conforme aumentaba la concentración. Esta respuesta podría explicarse por un equilibrio entre la madurez fisiológica de la larva y su vulnerabilidad al compuesto activo del neem, lo cual ha sido documentado como un punto crítico de efectividad de los bioplaguicidas (Prakash et al., 2008). Las larvas del **cuarto instar** (línea azul claro) mostraron un aumento pronunciado del TL_{50} hasta 550 μ L/L, donde alcanzaron cerca de 290 horas, seguido de una fuerte reducción

en concentraciones superiores. Este comportamiento no lineal indica un pico de tolerancia intermedio probablemente relacionado con el desarrollo de una cutícula más densa o un sistema enzimático más eficiente (Musabyimana et al., 2001).

En el caso del **quinto instar** (línea morada), se observó el TL_{50} más alto del estudio, superando las 400 horas a 550 $\mu\text{L/L}$. Este resultado sugiere que este instar representa el punto máximo de resistencia fisiológica al neem en el ciclo larval de *S. frugiperda*. Sin embargo, a partir de esa concentración, el TL_{50} descendió de forma continua, evidenciando que dosis más altas del producto aún logran superar esta barrera fisiológica (Nathan et al., 2005). Finalmente, el **sexto instar** (línea verde claro) presentó una curva moderada, iniciando con un TL_{50} cercano a las 150 horas, aumentando levemente hasta 210 horas y luego disminuyendo con el aumento de la concentración. Este patrón es consistente con larvas en maduración o próximas a la pupación, que suelen reducir su actividad alimentaria y presentar menor exposición efectiva al tóxico (Martínez, 2012).

En general, la tendencia decreciente del TL_{50} con el incremento de la concentración confirma la naturaleza dosis-dependiente del efecto del aceite de neem. Esta relación ha sido ampliamente documentada para compuestos bioactivos de origen vegetal (Isman, 2008; Mordue & Nisbet, 2000). De manera coherente con otros estudios, se confirma que la eficacia del neem es significativamente mayor en los primeros instares larvales de *S. frugiperda* (Koul et al., 2004; Nathan et al., 2005), por lo cual se recomienda su aplicación en fases tempranas del ciclo de vida del insecto para maximizar su efectividad y reducir la presión de selección sobre los instares más resistentes.

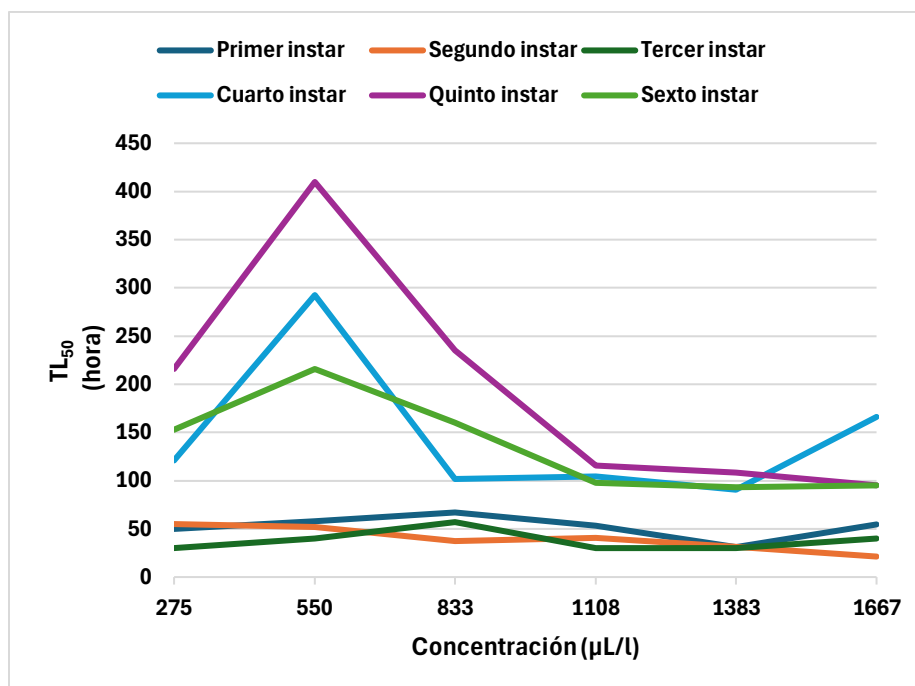


Figura 15. Comparación de los valores de TL_{50} entre los seis instares larvales de *S. frugiperda* expuestos al aceite de neem.

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

En la figura 12, que resume los datos promedios de los seis instares, se evidenció una relación inversa entre la concentración del neem y el TL_{50} promedio. La regresión lineal global se ajustó a la ecuación $y = -0,052x + 151,71$, con un $R^2 = 0,42$, lo que sugiere una correlación moderada. El TL_{50} promedio calculado para todos los instares larvales fue de 1958,51 µL/L, lo que representa la concentración necesaria para inducir un 50% de mortalidad promedio en larvas de diferentes edades.

La variabilidad observada en los TL_{50} entre los diferentes instares puede atribuirse a múltiples factores fisiológicos. Los instares tempranos poseen sistemas enzimáticos de desintoxicación menos desarrollados y una mayor relación superficie/volumen corporal, lo que facilitaría la absorción y acción de los compuestos activos del neem (Schmutterer, 1990; Nathan et al., 2005). Además, la azadiractina interfiere con la síntesis y liberación de

ecdisteroides, hormonas críticas para la muda, un proceso particularmente sensible en los primeros instares (Mordue y Blackwell, 1993; Subrahmanyam, 1990).

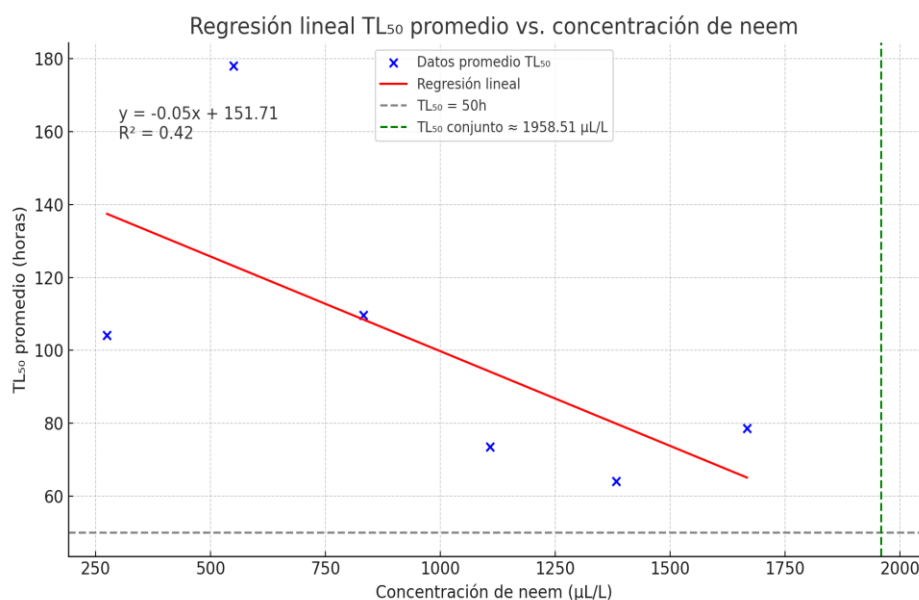


Figura 16. Relación global entre la concentración del aceite de neem y el TL₅₀ promedio para los seis instares larvales de *S. frugiperda*.

Nota: Figura generada por Python

Fuente: autores

9.2.2. Análisis del umbral fisiológico entre instares larvales de *S. frugiperda* tratados con aceite de neem

Diversos estudios han evidenciado que la susceptibilidad de los insectos a compuestos bioinsecticidas varía de manera significativa a lo largo de sus diferentes instares larvales, y *S. frugiperda* no es la excepción. En este contexto, los datos muestran una clara separación fisiológica entre los tres primeros instares larvales y los instares posteriores, en términos de la respuesta al aceite de neem, medido a través del TL₅₀. Este umbral se manifiesta en un patrón de mayor susceptibilidad en los tres primeros instares, con TL₅₀ relativamente bajos, y una marcada elevación del TL₅₀ en los instares cuarto y quinto, particularmente en

concentraciones intermedias del extracto, antes de volver a disminuir en concentraciones más altas.

Desde un punto de vista fisiológico, los instares tempranos presentan estructuras corporales más vulnerables, con una cutícula fina y permeable que facilita la penetración del compuesto activo, azadiractina, a través de la vía tópica o ingestiva. Además, sus mecanismos enzimáticos de detoxificación como las monooxigenasas dependientes del citocromo P450, glutatón-S-transferasas y carboxilesterasas están poco desarrollados, lo que limita su capacidad para neutralizar o excretar los compuestos tóxicos (Després et al., 2007; Sparks & Nauen, 2015). Esto justifica los TL_{50} más bajos y la mayor mortalidad observada en estos instares ante concentraciones relativamente bajas de neem.

El “salto” fisiológico observado a partir del cuarto instar se explica por la maduración progresiva del sistema de defensa bioquímico del insecto. Estudios previos indican que las larvas de instares avanzados no solo presentan un engrosamiento de la cutícula que actúa como barrera física, sino que también muestran una mayor expresión de genes asociados a enzimas detoxificantes, lo que incrementa su tolerancia a xenobióticos (Li et al., 2007; Feyereisen, 2012). Este umbral se traduce en TL_{50} notablemente más altos, en especial en concentraciones intermedias del extracto, reflejando un retardo en la acción letal del compuesto. Además, los tejidos grasos de las larvas mayores pueden actuar como reservorios transitorios de toxinas, disminuyendo la disponibilidad inmediata del insecticida en los órganos diana (Nation, 2008).

Sin embargo, el hecho de que los TL_{50} vuelvan a disminuir a concentraciones mayores ($>1100 \mu\text{L/L}$) indica que la capacidad de detoxificación tiene un límite fisiológico. Cuando las dosis de neem superan ese umbral, incluso las larvas más desarrolladas sucumben a sus efectos letales, lo que refuerza la hipótesis de que la eficacia del neem es dosis-dependiente, aunque modulada por el instar larval.

En síntesis, el umbral entre los tres primeros instares y los instares avanzados constituye un fenómeno fisiológico bien documentado en la literatura entomológica. Tiene

profundas implicaciones en el diseño de estrategias de control biológico, ya que sugiere que la aplicación temprana del bioinsecticida, cuando las larvas se encuentran en estadios más susceptibles, puede maximizar su eficacia y reducir la presión de selección por resistencia. Este conocimiento también es clave para la programación de bioensayos, permitiendo una mejor interpretación de los resultados en función del desarrollo ontogenético del insecto plaga.

Existe un aumento del TL_{50} promedio del 271,3% entre los tres primeros instares y los instares cuarto, quinto y sexto. Este valor cuantifica con claridad el umbral fisiológico, reflejando que las larvas avanzadas requieren un tiempo letal medio casi tres veces mayor para alcanzar el 50% de mortalidad frente al mismo agente (aceite de neem). Esto sustenta la hipótesis de un salto fisiológico y justifica la necesidad de aplicar tratamientos tempranos en programas de manejo integrado de *S. frugiperda*.

9.2.3. Discusión del ANOVA trifactorial

En la Tabla 15, se presenta el Anova factorial de la Prueba de efectos inter-sujetos, la cual arroja la siguiente información:

9.2.3.1. Coherencia global del modelo y calidad del ajuste

El modelo presenta un valor de significancia global ($p \leq 0,001$) y un alto Coeficiente de Determinación ajustado ($R^2 = 0,66$), lo cual indica que cerca del 66% de la variabilidad total en la mortalidad acumulada de larvas de *S. frugiperda* es explicada por los factores evaluados como el instar larval, la concentración del aceite de neem y el tiempo (hora), así como sus interacciones. Este resultado valida la pertinencia del diseño experimental y respalda la solidez del análisis estadístico para describir el comportamiento de la variable dependiente (mortalidad).

9.2.3.2. Efecto principal del instar larval

El efecto del instar larval fue altamente significativo ($F = 287,439$; $p \leq 0,001$), evidenciando que la susceptibilidad de las larvas a la acción del aceite de neem varió significativamente según el instar de desarrollo. Esto es coherente con estudios previos que indican que las larvas más jóvenes suelen ser más susceptibles a bioplaguicidas, debido a su menor grosor de cutícula, menor capacidad de detoxificación enzimática y mayor permeabilidad a compuestos bioactivos (Mordue & Nisbet, 2000; Isman, 2006).

9.2.3.3. Efecto principal de la concentración

El factor concentración de aceite de neem ($\mu\text{L/L}$) también mostró un efecto altamente significativo ($F = 23,846$; $p \leq 0,001$), confirmando una clara relación dosis-respuesta, en la cual el aumento de la concentración se traduce en una mayor mortalidad larval. Esta respuesta es consistente con la literatura sobre la azadiractina, principal compuesto activo del neem, conocido por su acción antialimentaria, inhibidora del crecimiento y letal en insectos (Schmutterer, 1990; Koul, 2004).

9.2.3.4. Efecto principal del tiempo

El tiempo (hora) tuvo igualmente un efecto significativo ($F = 173,447$; ($p \leq 0,0001$), lo que indica que la mortalidad larval se incrementó significativamente con el paso de las horas, reflejando la acción progresiva del bioplaguicida y validando el uso del parámetro Tiempo Letal Medio (TL_{50}) como medida de efectividad. El patrón temporal es clave en estudios de toxicidad, especialmente con compuestos de acción retardada como el aceite de neem.

9.2.3.5. Interacción entre instar y concentración

La interacción Instar x Concentración resultó significativa ($F = 4,400$; $p \leq 0,000$), lo cual sugiere que el efecto de la concentración depende del instar larval. En otras palabras, una misma concentración de neem no produce el mismo nivel de mortalidad en todos los instares. Esto refuerza la necesidad de considerar el instar del insecto objetivo al diseñar estrategias de aplicación de bioplaguicidas, ya que la sensibilidad varía con el desarrollo ontogenético.

9.2.3.6. Interacción entre instar y tiempo

La interacción Instar x Hora fue significativa ($F = 1,803$; $p \leq 0,003$), evidenciando que la evolución de la mortalidad en el tiempo no es uniforme entre los distintos instares. Esto sugiere que algunos instares alcanzan el TL_{50} más rápidamente que otros, probablemente debido a diferencias en metabolismo, absorción o mecanismos de defensa. Este tipo de análisis es clave para afinar los tiempos de evaluación y optimizar los protocolos de aplicación.

9.2.3.7. Interacción entre concentración y tiempo

La interacción Concentración x Hora no fue significativa ($F = 0,880$; $p = 0,670$), indicando que la variación en el efecto del tiempo no depende significativamente de la concentración del aceite. Es decir, aunque hay un efecto claro de la concentración y del tiempo por separado, sus efectos combinados no generan sinergias o antagonismos detectables estadísticamente, al menos dentro del rango de concentraciones evaluado.

9.2.3.8. Interacción triple: Instar x Concentración x Hora

La interacción triple fue no significativa ($F = 0,609$; $p = 1,000$), lo cual implica que no hay una dependencia compleja entre los tres factores simultáneamente. Esta ausencia de efecto triple facilita la interpretación del modelo, permitiendo analizar los efectos e interacciones dobles sin perder poder explicativo, y reduciendo la complejidad de los patrones de respuesta.

9.2.3.9. Error experimental y confiabilidad

El valor del error medio cuadrático (2,429) es relativamente bajo en comparación con las medias cuadráticas de los efectos principales, lo cual indica buena precisión del modelo y bajo nivel de variación no explicada. La estructura experimental con réplicas y control del error por bloques completamente al azar contribuyó significativamente a este resultado.

Tabla 14. Anova factorial de la Prueba de efectos inter-sujetos.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	7484,033 ^a	287	26,077	10,735	0,000
Intersección	19791,599	1	19791,599	8147,669	0,000
Instar	3491,113	5	698,223	287,439	0,000
Concentraciónmm ³ l	289,623	5	57,925	23,846	0,000
Hora	2949,252	7	421,322	173,447	0,000
Instar *	267,196	25	10,688	4,400	0,000
Concentraciónmm ³ l					
Instar * Hora	153,328	35	4,381	1,803	0,003
Concentraciónmm ³ l	74,803	35	2,137	0,880	0,670
* Hora					

Instar	*	258,718	175	1,478	0,609	1,000
Concentraciónmm ³ l						
* Hora						
Error		2798,337	1152	2,429		
Total						
		30073,968	1440			
Total, corregido						
		10282,369	1439			

Nota: a. R al cuadrado = ,728 (R al cuadrado ajustada = ,660)

Fuente: SPSS v. 26

10. Conclusiones

La eficacia del aceite de neem es mayor en los primeros instares larvales de *S. frugiperda*, tanto en términos de menor concentración letal media (CL_{50}) como de tiempos letales medios (TL_{50}) más cortos. Esto se debe a la menor capacidad de detoxificación y mayor permeabilidad de la cutícula en las larvas jóvenes.

Existe una relación directa entre el desarrollo larval y la resistencia fisiológica al neem, evidenciada por un aumento progresivo en los valores de CL_{50} (de 579,67 $\mu\text{L/L}$ en el primer instar a 921,36 $\mu\text{L/L}$ en el sexto) y un incremento del 271,3% en los TL_{50} entre los primeros y últimos instares. Este umbral fisiológico representa una barrera significativa en la eficacia del tratamiento en etapas tardías.

El comportamiento dosis-dependiente fue evidente en ambos parámetros, donde mayores concentraciones de neem lograron reducir el TL_{50} incluso en instares avanzados, aunque con menor eficiencia. Esto valida el uso de regresiones Probit y modelos de ANOVA multifactorial para predecir y ajustar estrategias de aplicación del bioplaguicida.

11. Recomendaciones

Aplicar el aceite de neem durante los tres primeros instares larvales, cuando la susceptibilidad de *S. frugiperda* es mayor, para lograr el máximo impacto con menores dosis, reduciendo así costos y el riesgo de generar resistencia en la población plaga.

En situaciones de campo con poblaciones mixtas, se recomienda ajustar la concentración del producto por encima del valor promedio de CL_{50} (740,4 $\mu\text{L/L}$), especialmente cuando predominan larvas en instares cuarto a sexto, para asegurar niveles de mortalidad adecuados.

Incorporar el monitoreo del estadio larval y tiempos de exposición en el diseño de programas de manejo integrado, combinando la aplicación de neem con prácticas culturales y otros biocontroladores, optimizando la eficacia del tratamiento y promoviendo un control sostenible de *S. frugiperda*.

12. Bibliografía

- Abbott W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ. Entomol.* 18:265-267.
- Alcántara, C. (2011). *Control de Spodoptera frugiperda "cogollero del maíz" con caldo sulfocálcico en el cultivo del maíz*. (Tesis de pegrado, Universidad nacional de San Cristóbal, peru). [content](#)
- Almeida, C. (2021). *Eficacia del neem y aceite vegetal para el control de Spodoptera frugiperda en el cultivo de maíz (Zea mays)* (Doctoral dissertation, Universidad agraria del Ecuador).
- Álvarez, D. (2019). *Controladores de los biotipos de arroz y maíz de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera, Noctuidae) en especies de Meliaceae* (Doctoral dissertation).
- Álvarez, M., Borja, N., & Giraldo, H. (2022). Fluctuación poblacional del gusano Cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), en tres subsistemas de maíz, en la vereda Puerto Nuevo, municipio Fuente de Oro, Meta (Tesis de pregrado, Universidad de pamplona, Colombia). [Alvarez_Borja_2021_TG..pdf](#)
- Arias, D., Vázquez, G., Montañez, L., Álvarez, R., & Pérez, V. (2009). Determinación del Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*). *Revista ingeniería UC*, 16(3), 22-26.
- Ávila, D., Cervantes, F., Rodríguez, G., Gámez, A., García, J., & Mendoza, M. (2023). Daño y dinámica poblacional del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en líneas élite de maíz. *Agronomía Mesoamericana*, 34(3).
- Baudrot, V., Schouten, R., Umina, P. A., Hoffmann, A. A., Bird, L., Miles, M., & Maino, J. L. (2023). Managing pesticide resistance in *Spodoptera frugiperda*: A spatially explicit framework for identifying optimal treatment strategies. *Ecological Modelling*, 483, 110416.
- Benítez, J. (2023). ¿Qué es la concentración letal media (LC₅₀) y como se calcula? *Capcot*. [Mensaje en un blog]. [¿Qué es la Concentración Letal Media \(LC₅₀\) y como se calcula?](#)
- Campos, E.V.R., de Oliveira, J.L., Pascoli, M., de Lima, R., & Fraceto, L.F. (2016). Neem oil and crop protection: from now to the future. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1494. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01494>

- Carvajal, L. (2020). Actividad insecticida de extractos de *Azadirachta indica* A. Juss.(Neem-Meliaceae) sobre áfidos plagas en dos cultivos del género *Vigna* (Fabaceae) en el departamento de Córdoba (Colombia) (Doctoral dissertation, Tesis de grado. Universidad de Córdoba. Facultad de Ciencias Básicas, Biología).
- Castiglioni, E., Vendramim, J. D., & Lourenção, A. L. (2013). Tolerância de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) a inseticidas em diferentes estádios larvais. *Bragantia*, 72(2), 142–149.
- Charleston, D.S., Kfir, R., Dicke, M., & Vet, L.E.M. (2006). Impact of botanical extracts derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on populations of *Plutella xylostella* and its natural enemies: A field test of laboratory findings. *Biological Control*, 39(1), 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.03.012>
- Després, L., David, J.-P., & Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(6), 298–307. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.02.010>
- DGSV-CNRF. (2020). Gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria Dirección General de Sanidad Vegetal- Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria-Grupo Especialista Fitosanitario. Ficha Técnica.Tecámac, México 22 p.
- Esporreado, D. (2016). *Modelización en ecotoxicología*. Cambridge University press. Modelización en Ecotoxicología - ScienceDirect
- European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). United States Environmental Protection Agency (EPA). (2025). Ecological Effects Test Guidelines OCSP 850.3020: Honey Bee Acute Contact Toxicity Test. 14 p. Recuperado el 21 abril 2025.
- FAO. (2022). La Acción mundial de la FAO de lucha contra el gusano cogollero del maíz se prolonga hasta finales de 2023 con un alcance más amplio. Obtenido de <https://www.fao.org/newsroom/detail/fao-global-action-for-fall-armyworm-control-extended-to-end-of-2023-with-broader-scope/es>
- Fenalce. (2019). Maíz para Colombia visión 2030. Obtenido de <https://fenalce.co/wp-content/uploads/2021/10/Maiz-para-Colombia.pdf>
- Fenalce. (2024). Fenalce hace un llamado al Gobierno nacional para aliviar situación de productores de maíz y soya. Obtenido de <https://fenalce.co/wp-content/uploads/2024/05/Comunicado->

[Fenalce-Llamado-al-Gobierno-para-aliviar-situacio%CC%81n-de-productores-de-mai%CC%81z-y-soya-1.pdf](#)

- Feyereisen, R. (2012). Insect CYP genes and P450 enzymes. In *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (pp. 236–316). Academic Press.
- Gámez, M. (2021). *Eficacia de extractos botánicos de neem (Azadirachta indica), eucalipto (Eucalyptus spp) y chile (Capsicum annuum) para el manejo de Spodoptera frugiperda, en condición de laboratorio del Campus Agropecuario, UNAN, León, en el periodo de julio a noviembre del 2020* (Doctoral dissertation).
- García, F., Mosquera, A., Vargas, C., & Rojas, L. (1999). Manejo integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). Boletín Técnico-Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Colombia), (7).
- Grande, C., & Orozco, B. (2013). Producción y procesamiento del maíz en Colombia. *Revista Guillermo de Ockham*, 11(1), 97-110.
- Gualdrón-Panqueva, J.; Toloza-Balcucho, D. V. y Giraldo-Vanegas, H. (2017). Evaluación de los extractos de neem *Azadirachta indica* A. Juss, como repelente o insecticida contra la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en la variedad Castillo, en la Granja Experimental Villa Marina de la Universidad de Pamplona. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 102 p.
- Gutiérrez, S., Sánchez, J., Pérez, J., Carballo, A., Bergvinson, D., & Aguilera, M. (2010). Efecto del nim en el daño ocasionado por el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en tres variables agronómicas de maíz resistente y susceptible. *Acta zoológica mexicana*, 26(1), 1-16.
- Gutierrez-Moreno, R., Mota-Sánchez, D., Blanco, C. A., Whalon, M. E., Terán-Santofimio, H., Rodríguez-Maciél, J. C., & DiFonzo, C. (2019). Field-evolved resistance of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 112(2), 792–802.
- Hernández, A., Estrada, B., Rodríguez, R., García, J., Patiño, S., & Osorio, E. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 803-813.

- Isman, M.B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Isman, M.B. (2008). Perspective Botanical insecticides: for richer, for poorer. *Pest Management Science*, 64(1), 8–11.
- Isman, M.B. (2015). A renaissance for botanical insecticides? *Pest Management Science*, 71(12), 1587-1590. <https://doi.org/10.1002/ps.4088>
- Kariuki, M. W., & Onyango, F. O. (2014). Influence of larval age on efficacy of plant-derived insecticides against *Spodoptera littoralis*. *Journal of Applied Biosciences*, 79(1), 6891–6898.
- Koul, O., Walia, S., & Dhaliwal, G.S. (2004). Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*, 1(1-2), 63–84.
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, 52, 231–253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- López, J., Chirinos, D., Ponce, W., Solórzano, R., & Alarcón, J. (2022). Actividad insecticida de formulados botánicos sobre el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 48(1).
- Martínez, S.S. (2012). *Neem: árbol de los mil usos en el control de plagas y enfermedades*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Martínez, S.S., & van Emden, H.F. (2001). Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotropical Entomology*, 30(1), 113-125. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2001000100017>
- Mendoza, R., Tejada, E. 2013. Control biológico de plagas en el cultivo del maíz mediante el uso del Nim (*Azadirachta indica*). Cartillas de Buenas Prácticas, Serie Pecuaria, FAO Bolivia
- Mondragón-Sánchez, Y. D.; Triana-Marroquín, B. S. y Giraldo-Vanegas, H. (2020). Determinación de la mortalidad, la DL₅₀ y el TL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *Azadirachta indica* A. Juss, sobre *Plutella xylostella* (L.), bajo condiciones de laboratorio. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 87 p.
- Mordue (Luntz), A.J. & Nisbet, A.J. (2000). Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. Soc. Entomol. Bras.*, 29(4): 615–632.

- Mordue, A.J., & Blackwell, A. (1993). Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology*, 39(11), 903-924. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(93\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90001-8)
- Mordue, A.J., & Nisbet, A.J. (2000). Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29(4), 615–632.
- Mordue, A.J., Morgan, E.D., & Nisbet, A.J. (2010). Azadirachtin, a natural product in insect control. In L.I. Gilbert & S.S. Gill (Eds.), *Insect Control: Biological and Synthetic Agents* (pp. 185-203). Academic Press.
- Mulla, M.S., & Su, T. (1999). Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(2), 133-152.
- Musabyimana, T., Saxena, R.C., Kairu, E.W., Ogot, C.P.K.O., & Khan, Z.R. (2001). Effects of neem seed derivatives on behavioral and physiological responses of the stem-borer *Chilo partellus* in maize. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 99(1), 129–136.
- Nathan, S.S., Choi, M.Y., Seo, H.Y., Paik, C.H., Kalaivani, K., & Kim, J.D. (2005). Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase (AChE) activity and histology of the brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stål). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(1), 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.12.006>
- Nathan, S.S., Kalaivani, K., & Sehoon, K. (2005). Effects of neem limonoids on malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Tropica*, 96(1), 47–55.
- Nation, J. L. (2008). *Insect Physiology and Biochemistry* (2nd ed.). CRC Press.
- Núñez-García, S. N.; Velásquez-López, S. M. y Giraldo-Vanegas, H. (2024). Determinación de los instares larvales del gusano cogollero del maíz y reconocimiento de parasitoides y depredadores en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 70 p.
- Pereira, A. E., Baldin, E. L. L., Pannuti, L. E. R., & Morando, R. (2017). Development of resistance in *Spodoptera frugiperda* to synthetic and microbial insecticides. *Pest Management Science*, 73(7), 1291–1298.
- Poma, H. (2016). Determinación de la efectividad del uso de tres tipos de bioinsecticida a base del neem (*Azadirachta indica*) en el control del pulgón verde (*Myzus persicae*) (Tesis Doctoral, universidad mayor de San Andrés, Bolivia). <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/7644>

- Prakash, A., Rao, J., & Nandagopal, V. (2008). Future of botanical pesticides in rice, wheat, pulses and vegetables pest management. *Journal of Biopesticides*, 1(2), 154–169.
- Ruiz-García, N. G. y Giraldo-Vanegas, H. (2024). Evaluación de la toxicidad de aceites de semillas de neem contra adultos del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Motschulsky), en condiciones de laboratorio. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 88 p.
- Salazar-Blanco, J. D., Cadet-Piedra, E., & González-Fuentes, F. (2020). Monitoreo de *Spodoptera* spp. en caña de azúcar: uso de trampas con feromonas sexuales 1 *Spodoptera* spp. monitoring in sugarcane: use of sex pheromone traps.
- Schmutterer, H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, 35, 271-297.
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.35.010190.001415>
- Senthil-Nathan, S. (2013). Physiological and biochemical effect of neem and other Meliaceae plants secondary metabolites against Lepidopteran insects. *Frontiers in Physiology*, 4, 359.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00359>
- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122–128.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Subrahmanyam, B. (1990). Azadirachtin—a naturally occurring insect growth regulator. *Proceedings of Indian National Science Academy B*, 56, 217-224.
- Tay, W. T., Meagher Jr, R. L., Czepak, C., & Groot, A. T. (2023). *Spodoptera frugiperda*: ecology, evolution, and management options of an invasive species. *Annual Review of Entomology*, 68(1), 299-317
- Valencia-Buitrago, E. Y. y Giraldo-Vanegas, H. (2021). Protección de extractos acuosos de semillas de Neem contra la mosca del mediterráneo y la calidad de los frutos de *Prunus persica* cv. Gran Jarillo, en Bárega, Norte de Santander. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Pamplona. 66 p.
- Valladares, C. (2010). Taxonomía y Botánica de los Cultivos de Grano. *Universidad Nacional Autónoma de Honduras*, Vol.3
- Virla, E., Colomo, M., Berta, C., & Valverde, L. (1999). El complejo de los parasitoides del "gusano cogollero" Del maíz, *Spodoptera frugiperda*. *Revista Neotropica*, 45(113-114) 3-14

Yu, S. J. (2008). *The toxicology and biochemistry of insecticides*. CRC press.

Zalucki, M. P., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L., & Furlong, M. J. (2012). Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? *Journal of Economic Entomology*, 105(4), 1115–1129.

13. Anexos

Anexo 1. Instrumento para la toma de datos de Mortalidad de larvas.

		HORAS																																		
REP.	L.	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	156	168	180	192	204	216	228	240	252	264	276	288	300	312	324	336	348	360	372					
1	1																																			
	2																																			
	3																																			
	4																																			
	5																																			
2	1																																			
	2																																			
	3																																			
	4																																			
	5																																			
3	1																																			
	2																																			
	3																																			
	4																																			
	5																																			
4	1																																			
	2																																			
	3																																			
	4																																			
	5																																			
5	1																																			
	2																																			
	3																																			
	4																																			
	5																																			

Anexo 2.Recolección de huevos.



Nota: Pupas y adultos de *S. frugiperda* en gladiola (A), Recolección de postura (B).

Anexo 3. Almacenamiento de posturas de *S. frugiperda* en vasos de 250 ml



Anexo 4. Siembra y recolección del maíz para la alimentación de las larvas.

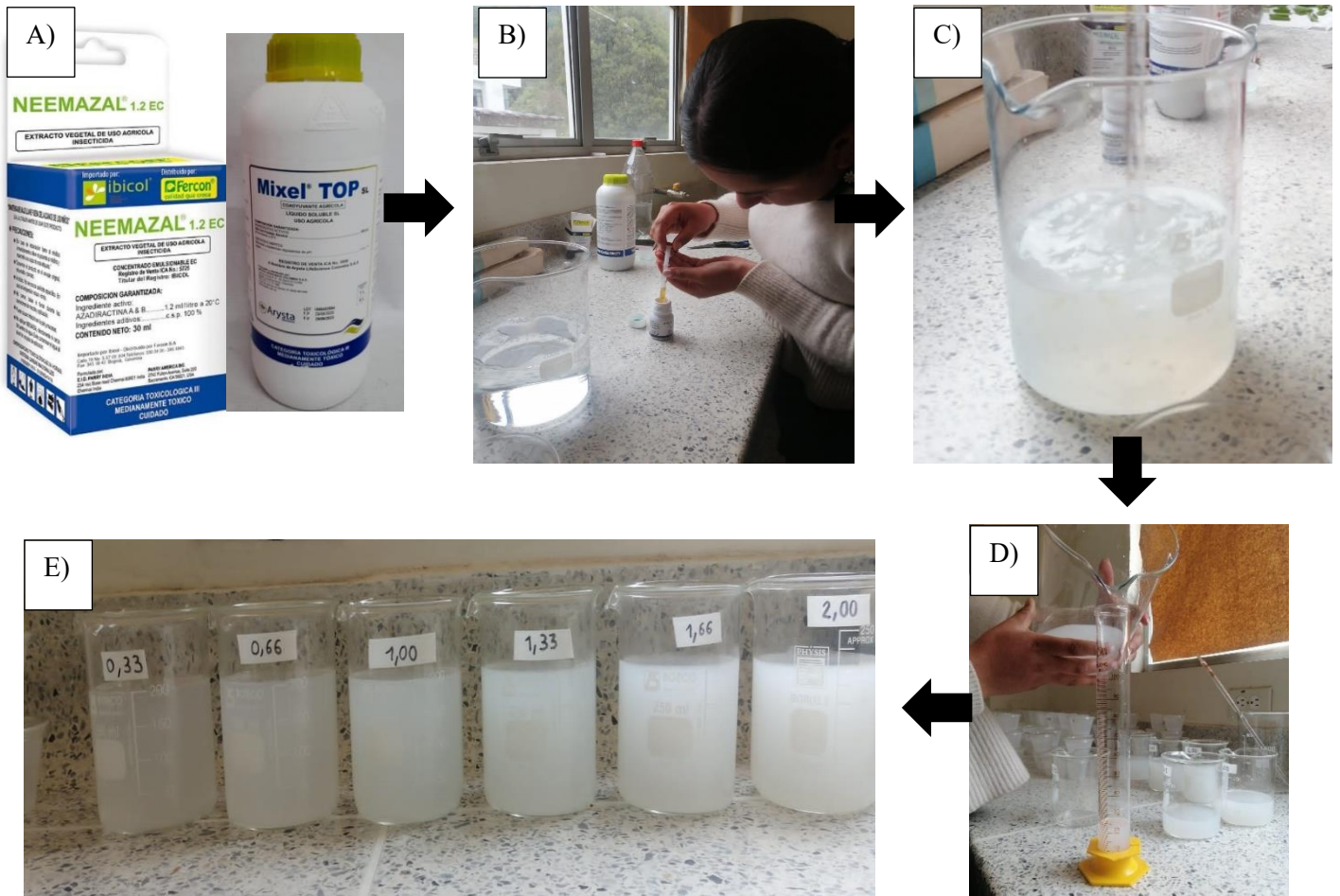


Anexo 5. Individualización de cada larva en vasos de 25ml.



Nota. Individualización para montar el primer ensayo con larvas del primer instar (L1), edad de 3 días.

Anexo 6. Ciclo de preparación para cada ensayo



Nota: Productos utilizados (A), Medida de productos para crear la mezcla madre (B), Mezcla preparada (C), Medición para crear cada una de las concentraciones (D), Concentraciones finales (E).

Anexo 7. Recortes de discos de maíz y sumergencia a cada concentración



Anexo 8. Secado de los discos tratados y adición a cada envase que contiene una larva.



Anexo 9. Toma de datos para el primer instar



Anexo 10. Toma de datos para el segundo instar



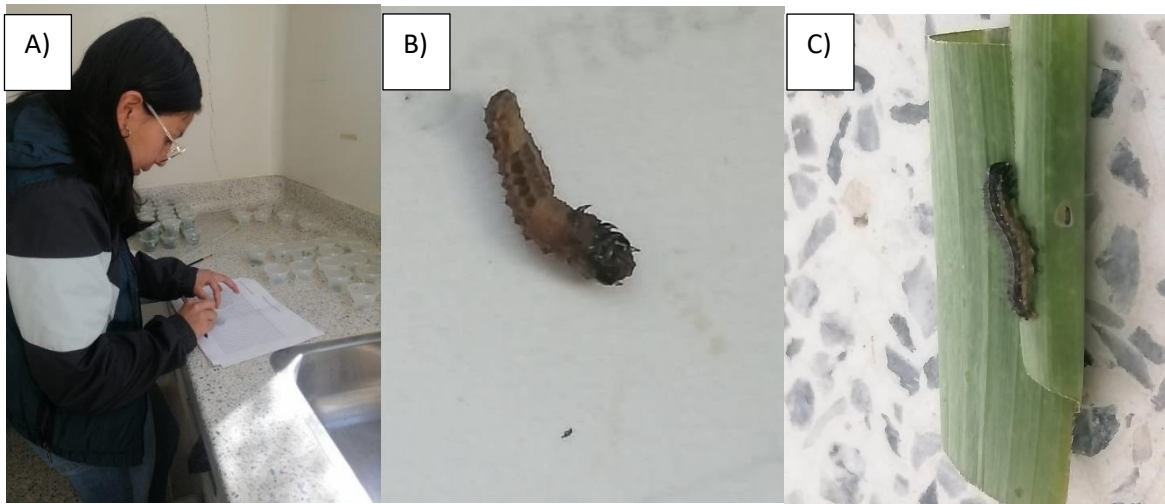
Anexo 11. Toma de datos para el tercer instar.



Anexo 12. Toma de datos para el cuarto instar



Anexo 13. Toma de datos para el quinto instar



Nota: toma de datos (A), Registro de larva muerta (B), larva de quinto instar (C).

Anexo 14. Toma de datos para el sexto instar



Anexo 15. Planillas de registro de datos para el primer ensayo con larvas de primer instar.

A) Concentración: 0,33

B) Concentración: 0,66

[illegible]

D) $\text{Fracción: } 7,33 \text{ } 1eV$

[illegible][illegible]

Nota: Registro de datos para el instar 1 concentración de 0,33% cada X significa la hora de muerte de cada larva, en el eje horizontal está el numero de horas y en vertical el número de repetición y numero de larva (A), Registro de datos para el instar 1 concentración de 0,66% (B), Registro de datos para el instar 1 concentración de 1,00%(C), Registro de datos para el instar 1 concentración de 1,33%(D), Registro de datos para el instar 1 concentración de 1,66%(E), Registro de datos para el instar 1 concentración de 2,00% (F).

Anexo 16. Planillas de registro de datos para el segundo ensayo con larvas de segundo instar.

[illegible]

		Categorización: 0-66- Segundo Instav.															
		1	02	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	
1	1	✓	✓	✗	*	-	-	*	*	*							
	2	✓	✗				-	*	*	*							
	3	✓	✓	✓	✓	✗	-	*	*	*							
	4	✓	✓	✗	*	*	*	*	*	*							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
2	1	✓	✓	✓	✓	✓	✗	*	*	*							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
	3	✓	✗	✓	✓	✓	✗	*	*	*							
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	*	✗	*							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
3	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	3	✓	✓	✗	*	*	*	*	*	*							
	4	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	*							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
4	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	3	✓	✓	✗	*	*	*	*	*	*							
	4	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	*							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
5	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	3	✓	✓	✗	*	*	*	*	*	*							
	4	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	*							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
6	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	3	✓	✓	✗	*	*	*	*	*	*							
	4	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	*							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
7	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	3	✓	✓	✗	*	*	*	*	*	*							
	4	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	*							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
8	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗	*							
	3	✓	✓	✗	*	*	*	*	*	*							
	4	✓	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗								

1)

005	1	15	24	30	45	60	75	94	96	100	120	127	150	160
5	1	✓	✓	✗	✓	-	-							
	2	✓	✓	✗	✓	-	-							
	3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗						
	4	✓	✗	✓	✓	✓	✓							
	5	✗	✓	✓	✓	✓	✓							
f	1	✓	✓	✓	✓	✗	✓							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
	3	✓	✓	✓	✗	✓	✓							
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗		
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
i	1	✓	✗	✓	✓	✓	✓							
	2	✓	✓	✓	✓	✗	✓							
	3	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓						
	5	✓	✗	✓	✓	✓	✓							
•	1	✓	✗	✓	✓	✓	✓							
	2	✗	✓	✓	✓	✓	✓							
	3	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
	4	✓	✓	✓	✗	✓	✓							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✓						
•	1	✓	✓	✗	✓	✓	✓							
	2	✓	✓	✗	✓	✓	✓							
	3	✗	✓	✓	✓	✓	✓							
	4	✗	✗	✓	✓	✓	✓							
	5	✓	✓	✗	✓	✓	✓							

J)

Entración: 1.33 Segundo mstov

REP.	1	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132
1	1	✓	X	•	•	•	•					
	2	✓	X	•	•	•	•					
	3	✓	✓	X	•	•	•					
	4	✓	✓	•	•	•	•					
	5	✓	✓	✓	✓	✓	X					
2	1	✓	✓	X	•	•	•					
	2	✓	✓	✓	✓	X	•					
	3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X				
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X			
	5	✓	✓	✓	✓	✓	X	•				
3	1	X	•	•	•	•	•					
	2	✓	✓	✓	✓	X	•					
	3	X	•	•	•	•	•					
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X				
	5	✓	✓	✓	✓	✓	X	•				
4	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X			
	2	✓	✓	X	•	•	•					
	3	✓	✓	✓	✓	✓	X	•				
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	X				
	5	X	•	•	•	•	•	•				
5	1	✓	✓	X	•	•	•					
	2	X	•	•	•	•	•					
	3	✓	✓	X	•	•	•					
	4	✓	X	•	•	•	•					
	5	✓	✓	✓	✓	✓	X					

ntación: 16G - Segundo instav

REP.	1.	13	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132
1	1	✓	✓	✓	✓	✗	-					
	2	✗	*	*	*	*	*					
	3	✗	*	*	*	*	*					
	4	✓	✗	*	*	*	*					
	5	✓	✓	✗	*	*	*					
2	1	✓	✗	*	*	*	*					
	2	✗	*	*	*	*	*					
	3	✓	✓	✓	✓	-	✗					
	4	✓	✓	✓	✓	*	✗					
	5	✓	✗	*	*	*	*					
3	1	✓	✓	✗	*	*	*					
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✗					
	3	✓	✗	*	*	*	*					
	4	✓	✓	✓	✓	✗	*					
	5	✓	✓	✗	*	*	*					
4	1	✓	✓	✗	*	*	*					
	2	✓	✓	✗	*	*	*					
	3	✓	✓	✗	*	*	*					
	4	✓	✓	✗	*	*	*					
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗				
5	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗				
	2	✗	*	*	*	*	*					
	3	✓	✓	✓	✓	✗	*					
	4	✗	*	*	*	*	*					
	5	✓	✗	*	*	*	*					

Entrada: 2:00 - Segundo Instar

[illegible]

Nota: Registro de datos para el instar 2 concentración de 0,33% cada X significa la hora de muerte de cada larva, en el eje horizontal está el número de horas y en vertical el número de repetición y numero de larva (G), Registro de datos para el instar 2 concentración de 0,66% (H), Registro de datos para el instar 2 concentración de 1,00%(I), Registro de datos para el instar 2 concentración de 1,33%(J), Registro de datos para el instar 2 concentración de 1,66%(K), Registro de datos para el instar 2 concentración de 2,00% (L).

Anexo 17. Planillas de registro de datos para el tercer ensayo con larvas de tercer instar.

[illegible]

ación: 0.66 tercer instar.

[illegible]

Entrada: C 100 Tercero instal.

[illegible]

extracción: 1,33 sec y 1570Y

[illegible]

tración: 1,663e1 instav

REF.	1	11	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180
1	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
	2	✓	✓	✓	✓	✗										
	3	✗	*	*	*	*										
	4		✓	✓	✓	✗										
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗					
2	1	✓	✓	✗	*	*										
	2	✓	✓	✓	✓	✗										
	3	✗	*	*	*	*										
	4	✓	✓	✓	✓	✗										
	5	✓	✓	✗	*	*										
3	1	✓	✓	*	*	*										
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗								
	3	✓	✓	✗	*	*										
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗						
4	1	✓	✓	✓	✓	✗										
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗								
	3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗							
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗						
	5	✗	*	*	*	*										
5	1		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓							
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗						
	3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗					
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗				
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗			
6	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓						
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗					
	3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗				
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗			
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗		

Concentración: 3,0034E-05 mol/l

REP.	1	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132
1	1	✓	✗	•	•	•						
	2	✗	•	•	•	•						
	3	✓	✓	✗	•	•						
	4	✓	✓	✗	•	•						
	5	✓	✓	✗	•	•						
2	1	✓	✓	✓	✗	•						
	2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗		
	3	✗	•	•	•	•						
	4	✓	•	•	•	•						
	5	✓	✓	✓	✓	✗						
3	1	✓	✓	✓	✓	✗						
	2	✓	✓	✓	✗	•						
	3	✓	✓	✓	✗	•						
	4	✓	✓	✗	•	•						
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗			
4	1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	
	2	✗	•	•	•	•						
	3	✗	•	•	•	•						
	4	✓	✓	✓	✓	✓	✗					
	5	✓	✓	✓	✓	✓	✓					
5	1	✓	•	•	•	•						
	2	✗	✗	•	•	•						
	3	✗	•	•	•	•						
	4	✓	✓	✗	•	•						
	5	✓	✓	✗	•	•						

Nota: Registro de datos para el instar 3 concentración de 0,33% cada X significa la hora de muerte de cada larva, en el eje horizontal está el número de horas y en vertical el número de repetición y numero de larva (M), Registro de datos para el instar 3 concentración de 0,66% (N), Registro de datos para el instar 3 concentración de 1,00%(O), Registro de datos para el instar 3 concentración de 1,33%(P), Registro de datos para el instar 3 concentración de 1,66%(Q), Registro de datos para el instar 3 concentración de 2,00% (R).

Anexo 18. Planillas de registro de datos para el cuarto ensayo con larvas de cuarto instar.

S)

[illegible]

T)

[illegible]

U)

[illegible]

[illegible][illegible][illegible]

Nota: Registro de datos para el instar 4 concentración de 0,33% cada X significa la hora de muerte de cada larva, en el eje horizontal está el número de horas y en vertical el número de repetición y numero de larva (S), Registro de datos para el instar 4 concentración de 0,66% (T), Registro de datos para el instar 4 concentración de 1,00%(U), Registro de datos para el instar 4 concentración de 1,33%(V), Registro de datos para el instar 4 concentración de 1,66%(W), Registro de datos para el instar 4 concentración de 2,00% (X).

Anexo 19. Planillas de registro de datos para el quinto ensayo con larvas de quinto instar.

A)

tración: 0,33 - 5to instar

[illegible]

B)

ración: 0,66 -sto

[illegible]

ración: 1 Sto

[illegible]

INSTRUMENTO PARA LA TOMA DE DATOS

Concentración: 1,33 $\pm$ 0

[illegible]

Nota: Registro de datos para el instar 5, concentración de 0,33% cada X significa la hora de muerte de cada larva, en el eje horizontal está el número de horas y en vertical el número de repetición y numero de larva (A), Registro de datos para el instar 5 concentración de 0,66% (B), Registro de datos para el instar 5 concentración de 1,00%(C), Registro de datos para el instar 5 concentración de 1,33%(D), Registro de datos para el instar 5 concentración de 1,66%(E), Registro de datos para el instar 5 concentración de 2,00% (F).

Anexo 20. Planillas de registro de datos para el sexto ensayo con larvas de sexto instar.

G)

tración: 0,33 - 6to instav

[illegible]

H)

extracción: 0,66 - 6to instav

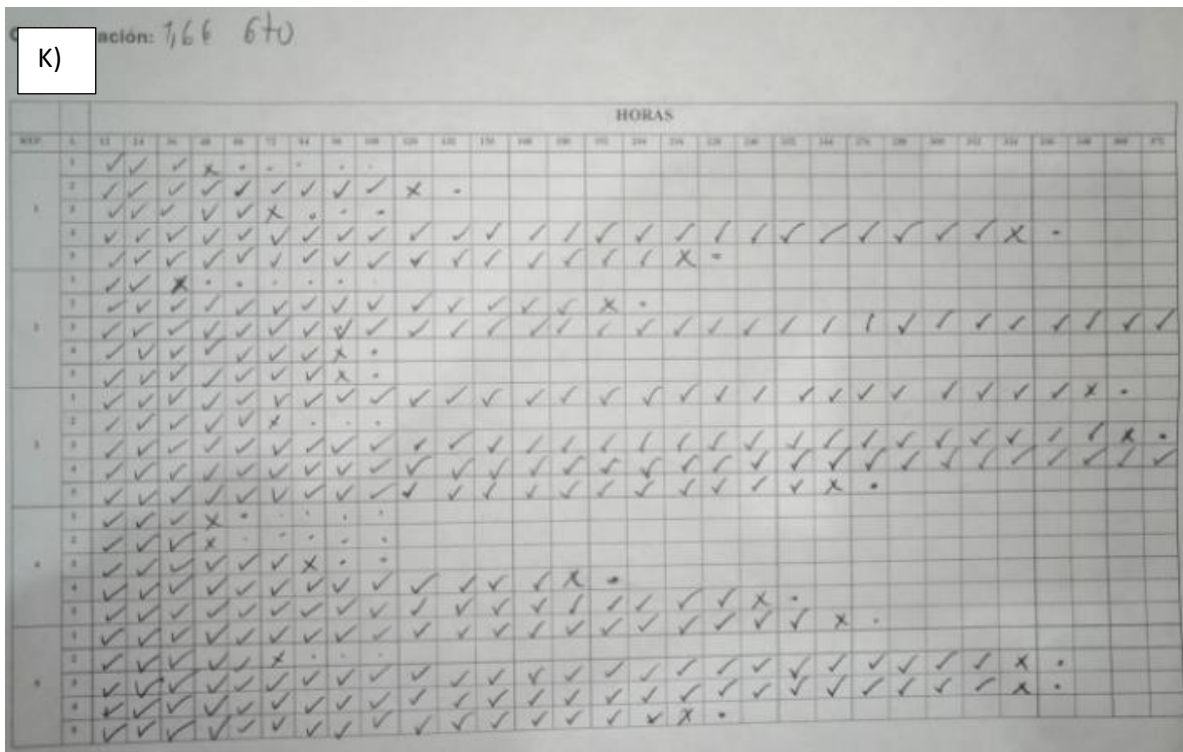
[illegible]

tración: 1 670

[illegible]

ración: 1,33 670

[illegible]



Nota: Registro de datos para el instar 6, concentración de 0,33% cada X significa la hora de muerte de cada larva, en el eje horizontal está el número de horas y en vertical el número de repetición y numero de larva (G), Registro de datos para el instar 6 concentración de 0,66% (H), Registro de datos para el instar 6 concentración de 1,00%(I), Registro de datos para el instar 6 concentración de 1,33%(J), Registro de datos para el instar 6 concentración de 1,66%(K), Registro de datos para el instar 6 concentración de 2,00% (L).