

## FITO-NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y SU ACTIVIDAD INSECTICIDA CONTRA EL GORGOJO ROJO (*Tribolium castaneum*) Y EL PIOJO HARINOSO (*Phenacoccus solenopsis*)

### METALLIC PHYTO-NANOPARTICLES AND THEIR INSECTICIDAL ACTIVITY AGAINST RED WEEVIL (*Tribolium castaneum*) AND MEALYBUG (*Phenacoccus solenopsis*)

Arnoldo Alfaro-Corres<sup>1a</sup>, Daniel González Mendoza<sup>2</sup>, Esaú Ruiz-Sánchez<sup>1b</sup>, Benjamin Valdez-Salas<sup>3a</sup>, Vianey Mendez-Trujillo<sup>4\*</sup> y Ernesto Beltran-Partida<sup>3b</sup>

<sup>1a</sup> Tecnológico Nacional de México/I.T. Conkal, Avenida Tecnológico s/n, Conkal C.P. 97345, Yucatán, México

<http://orcid.org/0000-0002-8407-4247>

<sup>1b</sup> Tecnológico Nacional de México/I.T. Conkal, Avenida Tecnológico s/n, Conkal C.P. 97345, Yucatán, México

<http://orcid.org/0000-0003-0245-3305>

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, Carretera a Delta s/n C.P. 21705, Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México

<https://orcid.org/0000-0002-8888-5688>

<sup>3a</sup> Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez and Normal s/n., C.P. 21280, Mexicali, Baja California, México

<https://orcid.org/0000-0002-6788-7545>

<sup>3b</sup> Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Blvd. Benito Juárez and Normal s/n., C.P. 21280, Mexicali, Baja California, México

<https://orcid.org/0000-0002-7372-1496>

<sup>4</sup> Facultad de Medicina y Nutrición de la Universidad Autónoma de Baja California Humberto Torres Sanginés s/n, Centro Cívico; C.P. 21000 Mexicali, Baja California, México

<https://orcid.org/0000-0003-0271-7294>

\* Autor para correspondencia: [vianey.mendez.trujillo@uabc.edu.mx](mailto:vianey.mendez.trujillo@uabc.edu.mx)

### RESUMEN

La presencia de insectos plagas, como el gorgojo rojo (*Tribolium castaneum*) y piojo harinoso (*Phenacoccus solenopsis*), representa una amenaza significativa para diversos cultivos y cereales almacenados. Entre las alternativas de manejo está el uso de nanopartículas (NPs) obtenidas de componentes de plantas, las cuales no tienden a causar daños al ecosistema como los agroquímicos. El objetivo del presente estudio fue obtener fito-nanopartículas bimetalicas (Zn/Cu-NPs) y trimetalicas (Zn/Cu/Mn-NPs) usando extracto acuoso de hojas de neem (*Azadirachta indica*), realizar su caracterización fisicoquímica y evaluar su actividad insecticida contra gorgojo rojo (*Tribolium castaneum*) y piojo harinoso (*Phenacoccus solenopsis*). Los resultados mostraron que Zn/Cu-NPs y Zn/Cu/Mn-NPs presentaron alto efecto sobre la mortalidad y la viabilidad celular para ambos insectos, siendo *T. castaneum* más sensible que *P. solenopsis* a las 96 h de la aplicación, reflejándose de igual manera en la viabilidad celular. Con respecto a la caracterización fisicoquímica, Zn/Cu-NPs y Zn/Cu/Mn-NPs presentaron tamaños de 255 y 631 nm, con un potencial Z de 20,0 y 28,4 mV, respectivamente. Los valores de EDX mostraron la presencia de zinc (1,65%) en Zn/Cu-NPs y la

presencia de zinc (1,70%) y cobre (2,76%) en Zn/Cu-NPs. Este estudio sugiere que las NPs bimetálicas y trimetálicas de *A. indica* tienen altas propiedades insecticidas en *T. castaneum* y *P. solenopsis*. Sin embargo, es necesaria información adicional para determinar la participación de los fitoquímicos presentes en la síntesis de NPs, así como su mecanismo de acción sobre los insectos.

**Palabras clave:** Fitonanopartículas, síntesis verde, extracto vegetal, control de plagas, nanotecnología.

## ABSTRACT

The presence of insect pests, such as the red weevil (*Tribolium castaneum*) and mealybug (*Phenacoccus solenopsis*), poses a significant threat to various crops and stored grains. Among the available management alternatives is the use of nanoparticles (NPs) derived from plant components, which tend not to cause damage to the ecosystem like agrochemicals do. The objective of this study was to obtain bi- (Zn/Cu-NPs) and tri-metallic (Zn/Cu/Mn-NPs) phyto-nanoparticles from the aqueous leaf extract of neem (*Azadirachta indica*), to carry out their physicochemical characterization, and to evaluate their insecticidal activity against red weevil (*Tribolium castaneum*) and mealybug (*P. solenopsis*). The results showed that Zn/Cu-NPs and Zn/Cu/Mn-NPs had a high effect on mortality and cell viability for both insects, being *T. castaneum* more sensitive than *P. solenopsis* at 96 h after application, also reflected in cell viability. Regarding physicochemical characterization, Zn/Cu-NPs and Zn/Cu/Mn-NPs presented sizes of 255 and 631 nm, with a Z potential of 20.0 and 28.4 mV, respectively. The EDX analysis showed the presence of zinc (1.65%) in Zn/Cu-NPs and the presence of zinc (1.70%) and copper (2.76%) in Zn/Cu-NPs. This study suggests that bi- and trimetallic NPs from *A. indica* have strong insecticidal properties against *T. castaneum* and *P. solenopsis*. However, additional information is needed to determine the role of the phytochemicals present in NP synthesis and their mechanism of action on insects.

**Keywords:** Phytanoparticles, green synthesis, plant extract, pest control, nanotechnology.

## INTRODUCCIÓN

*Azadirachta indica*, conocida localmente como neem, se encuentra principalmente en regiones tropicales de África e India y actualmente está distribuida en todo el mundo (Fordjour et al., 2023). Durante miles de años, el neem ha sido reconocido por su amplia gama de propiedades beneficiosas, incluidas las de la agricultura para el control de plagas y enfermedades (Wylie y Merrell, 2022). El neem contiene más de 300 compuestos únicos, dentro de los cuales, la azadiractina, la gedunina y la nimbolida tienen una amplia actividad biológica (Nagini et al., 2021). Los extractos acuosos de *A. indica* tienen importantes propiedades para la protección de los cultivos. Los extractos a base de semillas son tóxicos contra una gran variedad de insectos fitófagos como *Sahlbergella singularis*, *Tribolium castaneum*, *Schistocerca gregaria* y *Spodoptera frugiperda* (Akbar et al., 2023; Azhari et al., 2019; Sisay et al., 2019; Mboussi et al., 2018), de igual, estos efectos tóxicos se han podido observar con la disminución de la infestación de plagas como *Helicoverpa armigera*, *Phyllotreta cruciferae*, *Diabrotica undecimpunctata* y *Monolepta* spp. (Fite et al., 2020; Odewole et al., 2020). En contraste con estos trabajos, los estudios con extractos foliares son limitados, encontrando alta

toxicidad en *Aulacuspis tubercularis*, *Spodoptera frugiperda* y en plagas de granos almacenados como *Nodostoma subcostatum* (Phambala et al., 2020; Sarna et al., 2019). La actividad de los extractos foliares de *A. indica* puede ser atribuido a flavonoides, alcaloides, compuestos aromáticos, fenoles, taninos y terpenoides los cuales son los metabolitos predominantes en hojas (Venmathi Maran et al., 2021; Ejeta et al., 2021).

La síntesis verde de nanopartículas (NPs) es un proceso mediante el cual los fitoquímicos de extractos vegetales se combina con iones metálicos, estos metabolitos actúan tanto como agentes reductores, promoviendo la formación de las nanopartículas, como agentes estabilizadores, evitando la degradación temprana y extendiendo la duración de sus efectos (Vijayaram et al., 2023; Castillo-Henríquez et al., 2020), asimismo, mediante el uso de NPs multimetálicas (dos o más metales) es posible obtener mayor actividad biológica en comparación con la monometálica (Skłodowski et al., 2023), siendo una alternativa para aumentar la eficacia de los extractos botánicos contra las plagas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad insecticida de nanopartículas bi y trimetálicas, sintetizadas a partir de extracto foliar acuoso de *Azadirachta indica* contra *Tribolium castaneum* y *Phenacoccus solenopsis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación del extracto acuoso

Se recolectaron hojas sanas de *A. indica* en Conkal, Yucatán, México. Las muestras se secaron en estufa durante 6 días a 60 °C y posteriormente se molieron en un molino de laboratorio Wiley Thomas Scientific 4. El extracto acuoso se preparó utilizando 30 g de hojas secas en 300 mL de agua destilada, calentado a 50 °C durante 20 min y se dejó en agitación durante 24 h a 28 °C. Luego, el extracto se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min para eliminar impurezas y obtener una solución transparente. Esta solución se almacenó a 4 °C hasta su uso.

### Biosíntesis de nanopartículas bi y trimetálicas

Para la síntesis de la nanopartícula bimetalítica (Zn/Cu-NPs) y trimetalítica (Zn/Cu/Mn-NPs), una alícuota de 10 mL del extracto acuoso de *A. indica* se mezcló en un matraz Erlenmeyer de 100 mL que contenía 50 mL de una solución 10 mM de sulfato de cobre/sulfato de zinc (1:1) y sulfato de cobre/sulfato de zinc/sulfato de manganeso (1:1:1), respectivamente. Posteriormente, se calentó a 60 °C durante 30 min. La biorreducción de metales y la formación de NPs se determinaron visualmente observando el cambio de color del extracto acuoso.

### Efecto insecticida de las nanopartículas bi y trimetálicas

Para la evaluación de la actividad insecticida de las NPs, se recolectaron hembras adultas de *P. solenopsis* provenientes de una plantación de chile habanero (*Capsicum chinense*) infestado en el Valle de Mexicali, Baja California. Se recolectaron adultos de *T. castaneum* de una colonia mantenida en salvado de trigo en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California (ICA-UABC). Ambas especies de insectos fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología del ICA-UABC, y colocadas en cajas Petri (60 x 15 mm) para realizar los bioensayos. Las placas Petri que contenían los insectos fueron rociadas manualmente con 2 mL de una solución que contenía las fito-nanopartículas, las soluciones con iones metálicos (individuales o combinados), agua destilada (control), y extracto de la planta, utilizando un atomizador manual de 10 mL (Varienvases, México). La unidad experimental consistió en una caja de Petri que contenía 10 y 5 individuos adultos para *P. solenopsis* y *T. castaneum*, respectivamente. Todas las cajas de Petri se colocaron en una sala de crecimiento a  $27 \pm 3$  °C y 16 h de luz. El número de supervivientes de *P. solenopsis* y *T. castaneum* se informó hasta 96 horas después de

la aplicación inicial. La mortalidad de los insectos se determinó basándose en la respuesta muscular de los insectos a un pequeño pinchazo con una aguja.

### Determinación de daño tisular en los insectos

El daño tisular como una medida de daño en *T. castaneum* y *P. solenopsis* tratadas con fito-nanopartículas, con soluciones de iones metálicos (individuales o combinados), solo extracto de *A. indica* y agua destilada (control), se evaluó mediante un ensayo espectrofotométrico, utilizando tinción con azul de Evans. Los insectos de cada tratamiento se tiñeron con una solución acuosa de azul de Evans al 0,25% durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, los insectos se lavaron con agua destilada durante 10 min para eliminar el exceso y el tinte no unido. El azul de Evans atrapado en los insectos se eliminó usando etanol al 50% con una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% a 60 °C durante 30 min y se cuantificó la absorbancia mediante espectrofotometría a 600 nm.

### Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas bi y trimetálicas

El tamaño, la forma y la composición elemental de Cu/Zn-NPs y Cu/Zn/Mn-NPs se llevaron a cabo mediante microscopía electrónica de barrido-espectros de dispersión de energía (SEM-EDS) en un JEOL-6010LA (MA, UE). Se realizaron mediciones en el espectro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR), para identificar las moléculas en extractos de *A. indica* responsables de reducir y estabilizar la formación de las NPs, utilizando la técnica de pellets de KBr en un espectrómetro FTIR modelo Bruker IFS 66V en la región 4.000–400 cm<sup>-1</sup>. La dispersión dinámica de la luz (DLS) de Cu/Zn-NPs se realizó utilizando un instrumento Nanotrac Wave II (Microtrac) y se analizó mediante el software operativo Microtrac FLEX.

### Diseño y Análisis estadístico

Para *P. solenopsis* y *T. castaneum* se utilizó un diseño completamente al azar con tres y cinco repeticiones, respectivamente, y los datos recopilados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software Statistica versión 9.0.3.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Actividad insecticida

Los resultados de la actividad insecticida mostraron que únicamente, las aplicaciones de las NPs tuvieron efectos significativos sobre la mortalidad de ambos insectos, siendo *T. castaneum*

más sensible que *P. solenopsis*. En el caso de los tratamientos que solo emplearon el extracto, agua no mostraron cambios significativos ( $p < 0,05$ ) en la mortalidad de los insectos. Similares resultados se observaron con las soluciones de metales donde su efecto fue menor del 40% de mortalidad (Fig. 1). No obstante, la aplicación de Cu/Zn-NPs y Cu/Zn/Mn-NPs en *T. castaneum*, mostró mortalidades de 86 y 83%, respectivamente, después de 96 h de la aplicación, siendo significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) con respecto a los otros tratamientos empleados (Fig. 1). A su vez, se observó que la combinación de los metales Cu/Zn/Mn, no evidenció un efecto significativo en la mortalidad del insecto; esto puede ser consecuencia de la incorporación del Mn, el cual actuó como protector de la integridad celular. Esto también puede ser generado porque el Mn actúa como cofactor de la superóxido dismutasa de manganeso o mediante la formación de antioxidantes no proteínicos de manganeso, reduciendo el daño oxidativo por el Cu y Zn (Aguirre y Cullotta, 2012). Por otra parte, el extracto puro causó 26% de mortalidad (Fig. 1A). En *P. solenopsis*, se observaron que los tratamientos de Cu/Zn-NPs y Cu/Zn/Mn-NPs presentaron mayor mortalidad significativa estadísticamente ( $p < 0,05$ ) con 44%, respectivamente después de 96 h de la aplicación

con respecto a los otros tratamientos que no mostraron cambios significativos (Fig. 1B). Este resultado se puede deber a la capa cerosa que cubre el cuerpo de *P. solenopsis*, lo cual impide la penetración de compuestos al cuerpo del insecto (Ulusoy et al., 2022). Los efectos insecticidas de NPs contra *T. castaneum*, ya han sido reportados en otros estudios, principalmente usando NPs monometálicas de plata y zinc, por ejemplo; NPs sintetizadas a partir de extractos foliares acuosos de *Eriobotrya japonica*, *Amaryllis vittata* y *Daphne mucronata* causaron una mortalidad de 30-90% (Hamdy et al., 2023; Asad et al., 2022; Asma et al., 2018). Por otra parte, existe solo una publicación que utilizó NPs bimetálicas y trimetálicas, cuyos resultados generaron una mortalidad entre 43 y 80% a partir de extracto foliar acuoso de *C. chinense* (Alfaro-Corres et al., 2023). Para *P. solenopsis*, trabajos usando NPs de cobre han encontrado mortalidades de entre 14 y 28% usando extractos foliares acuosos de *Prosopis juliflora*, *Pluchea sericea* y *C. chinense* (Alfaro-Corres et al., 2023; León-Jimenez et al., 2019), mientras que usando NPs bi y trimetálicas se han encontrado mortalidades de entre 12 y 65%, usando extractos acuosos de *Crotalaria longirostrata*, *P. juliflora* y *C. chinense* (Alfaro-Corres et al., 2023; Mendez-Trujillo et al., 2022, 2019). La actividad insecticida de las NPs bi

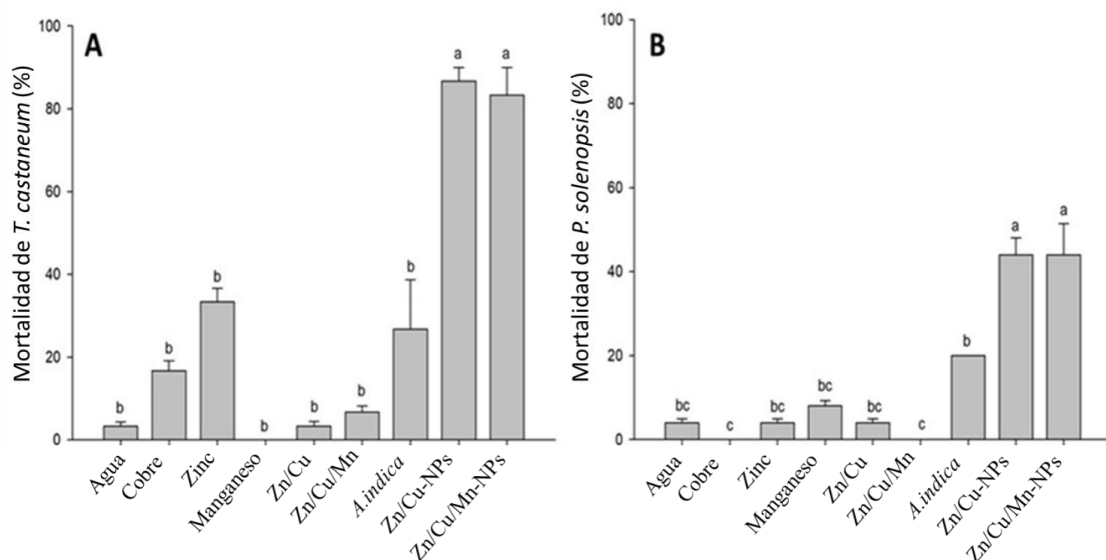


Fig. 1. Porcentaje de mortalidad de A) *T. castaneum* y B) *P. solenopsis* causada por fito-nanopartículas de Zn/Cu y Zn/Cu/Mn sintetizadas a partir de extracto foliar de *A. indica* después de 96 h de la aplicación. Las barras son medias  $\pm$  Error estándar. Letras diferentes encima de las barras indican diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ).

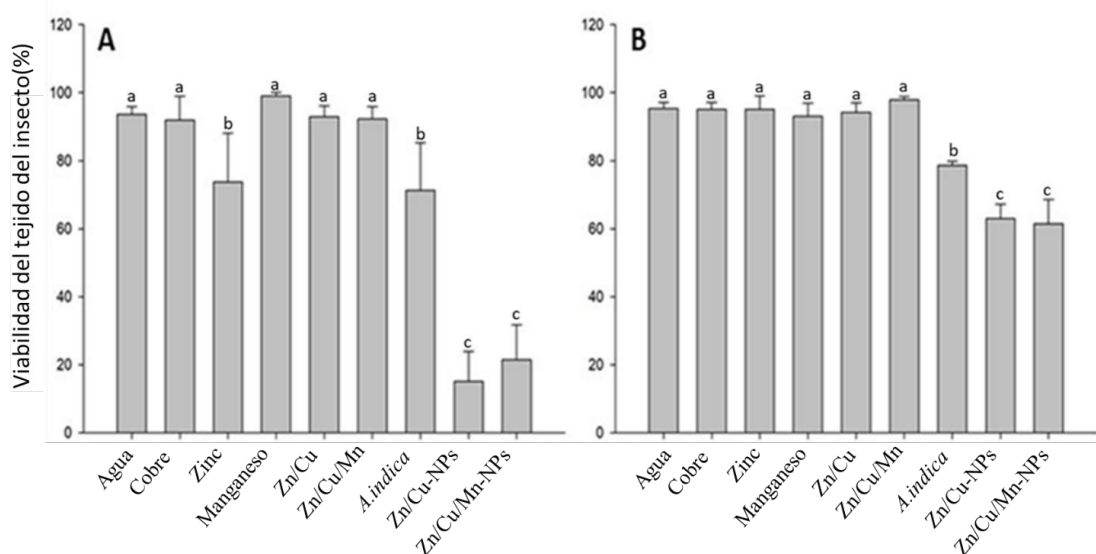
Fig. 1. Mortality percentage of A) *T. castaneum* and B) *P. solenopsis* caused by Zn/Cu and Zn/Cu/Mn nanoparticles synthesized from *A. indica* leaf extract after 96 h of application. Bars are means  $\pm$  standard error. Different letters above the bars indicate statistically significant differences ( $p < 0,05$ ).

y trimetálicas en *T. castaneum* y *P. solenopsis* fue significativamente mayor que su extracto puro (Figs. 1A y 1B), esto se puede deber al efecto sinérgico entre el extracto puro de *A. indica* y los iones metálicos usados en la síntesis. Como se mencionó anteriormente, los fitoquímicos y los iones metálicos presentes en la NPs pueden liberarse de manera lenta, aumentando su eficacia en el control de plagas durante períodos más largos (Castillo-Henríquez et al., 2020). En este sentido, se ha reportado que en comparación con las NPs monometálicas, los compuestos multimetálicos exhiben propiedades mejoradas, debido a los diversos efectos sinérgicos entre sus componentes individuales; sin embargo, hasta el momento existen pocos trabajos sobre la actividad biológica de las NPs multimetálicas, especialmente en NPs trimetálicas (Basavegowda y Baek, 2021; Ali et al., 2020).

### **Daño tisular de las nanopartículas en los insectos**

Los resultados indican que la aplicación de NPs causa una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en la viabilidad tisular de los insectos, siendo *T. castaneum* más sensible que *P. solenopsis* (Fig. 2). Para *T. castaneum*, con la aplicación de las Cu/Zn-NPs y Cu/Zn/Mn-NPs se observaron los

valores más bajos de viabilidad tisular con 15 y 21%, respectivamente. El extracto puro presentó 71% en mortalidad (Fig. 2A). En *P. solenopsis*, los valores significativamente más bajos de viabilidad tisular se observaron en Cu/Zn-NPs y Cu/Zn/Mn-NPs con 63 y 61%, respectivamente, mientras que el extracto puro presentó 78% de viabilidad (Fig. 2B). La reducción del porcentaje de daño en los insectos por acción de Zn/Cu-NPs y Zn/Cu/Mn-NPs sugieren que estas NPs inducen cambios en la membrana, así como en los componentes celulares de los insectos provocado por la posible inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS). La reducción de la viabilidad tisular por acción de NPs ha sido reportada por otros autores, encontrando una disminución del 30-55% mediante NPs mono y bimetalicas usando extracto de *P. juliflora*, *P. sericea* y *C. longirostrata* (León-Jiménez et al., 2019; Méndez-Trujillo et al., 2022, 2019). Por otra parte, el aumento en los niveles de ROS por la inducción de NPs se ha observado en *Oecophylla smaragdina*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster* y *Galleria mellonella* (Belal y Gad, 2023; Tuncsoy y Mese, 2021; Mao et al., 2018). Sin embargo, se necesitan más estudios sobre la toxicidad de NPs para comprender sus mecanismos de acción en los insectos (Anusri et al., 2019).



**Fig. 2.** Porcentaje de viabilidad tisular de insectos: A) *T. castaneum* y B) *P. solenopsis* causada por fito-nanopartículas de Zn/Cu y Zn/Cu/Mn sintetizadas a partir de extracto foliar de *A. indica* después de 96 h de la aplicación. Las barras son medias  $\pm$  Error estándar. Letras diferentes encima de las barras indican diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** Percentage of tissular viability of insects: A) *T. castaneum* and B) *P. solenopsis* caused by Zn/Cu and Zn/Cu/Mn phyto-nanoparticles synthesized from *A. indica* leaf extract after 96 h of application. Bars are means  $\pm$  standard error. Different letters above the bars indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).



### Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas bi y trimetálicas

El potencial Z es un método que determina la homogeneidad y la estabilidad en solución coloidal de las NPs mediante su carga superficial (Mendez-Trujillo et al., 2022). En este sentido, el análisis de dispersión dinámica de la luz DLS mostró potenciales Z de 28,4 mV para Zn/Cu-NPs y 20 mV para Zn/Cu/Mn-NPs (Fig. 3), lo cual nos indica que el potencial Z de las NP presentó una estabilidad limitada para Zn/Cu/Mn-NP y estable para Zn/Cu-NPs, ya que NPs, con valores superior a +30 mV o más negativo que -30 mV, suelen considerarse estables, debido a que existe cierto grado de repulsión entre ellas, evitando su agregación (Szczyglewska et al., 2023). La baja estabilidad de las Zn/Cu/Mn-NPs, se confirmó en la formación de agregados medidos por DLS, donde se registraron tres grandes grupos de diferentes tamaños de partículas dentro del rango de 18,3 a 1.536 nm (Fig. 3B). Caso contrario ocurrió para Zn/Cu-NPs, donde se registraron dos grupos partículas con un tamaño de 58 a 453 nm, teniendo un tamaño medio de partícula de 67 nm (Fig. 3A). Lo anterior muestra que el uso de Cu, Zn y Mn, en contacto con los fitoquímicos presentes en *A. indica*, generan partículas que tienden a formar complejos metálicos, resultado de una baja estabilidad formando complejos de mayor tamaño, en comparación con el uso de dos metales (Crawley et al., 2022).

Los datos del análisis FT-IR muestran el papel de las sustancias orgánicas en el extracto de *A.*

*indica* presentes en la reducción y estabilización de las NPs bi y trimetálicas sintetizadas. Los espectros FT-IR de las NPs oscilaron entre 600 y 4.000  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 4). El espectro infrarrojo del extracto puro de hoja de *A. indica* reveló bandas en 3747,7, 3276,17, 2922,8, 2849,6, 1603,66, 1411,35, 1070,99 y 614,44  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponden a alcoholes libres, estiramiento O-H (alcoholes/fenoles), estiramiento C-H (alcanos), estiramiento C=C (alquenos), Estiramiento C=C (anillos aromáticos), estiramiento C-N y flexión C-H (Fig. 4); estos pueden desempeñar un papel importante en la reducción y estabilización de las NPs. De acuerdo con estudios previos de extractos foliares de *A. indica*, se han encontrado la presencia de saponinas, taninos, flavonoides, esteroides y triterpenos (Ahmed et al., 2023), siendo los componentes mayoritarios en extracto foliar acuoso tales como ácido propanoico, 2-metil-éster butílico, mequinol, 1,4-butanediamina y cyclopentasiloxane, decamethyl (Hussain et al., 2023). Los picos observados en Zn/Cu-NPs de *A. indica*, indica que estos fueron parecidos a los observados en el extracto acuoso, pero sin la presencia de las bandas 2849,6 y 614,44  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a las estructuras de C-H y C-H, respectivamente. Para Zn/Cu/Mn-NPs, el espectro infrarrojo fue parecido a su extracto, pero con la ausencia de la banda a 614,44  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a flexiones C-H.

El análisis del SEM mostró que Zn/Cu-NPs tenían forma esférica con tamaños que oscilaban de 400 nm, 1.000 y 2.000 nm, mientras que Zn/

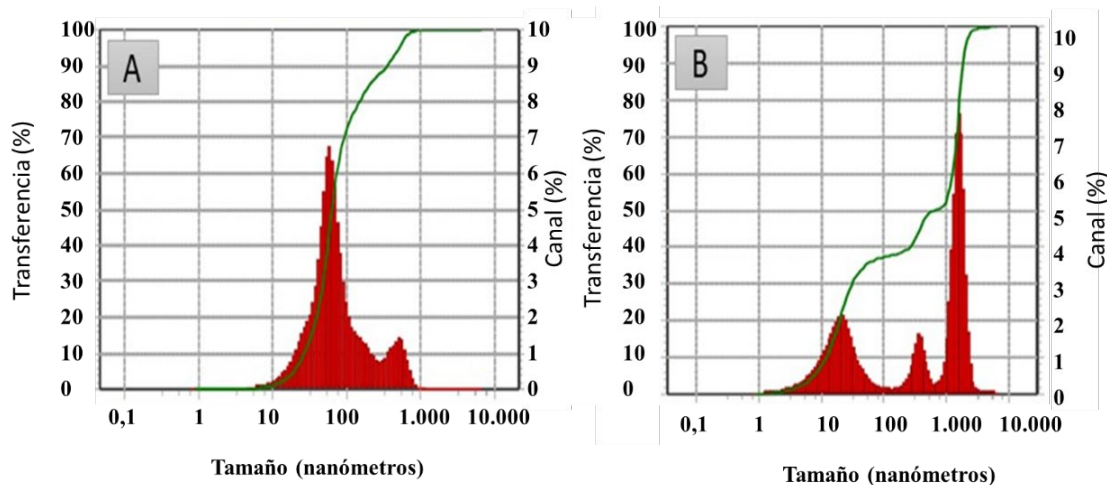


Fig. 3. Distribución del tamaño de partícula en solución coloidal y potencial Z, utilizando dispersión dinámica de luz (DLS) en A) Zn/Cu-NPs y B) Zn/Cu/Mn-NPs.

Fig. 3. Particle size distribution in colloidal solution and Z potential using dynamic light scattering (DLS) in A) Zn/Cu-NPs and B) Zn/Cu/Mn-NPs.

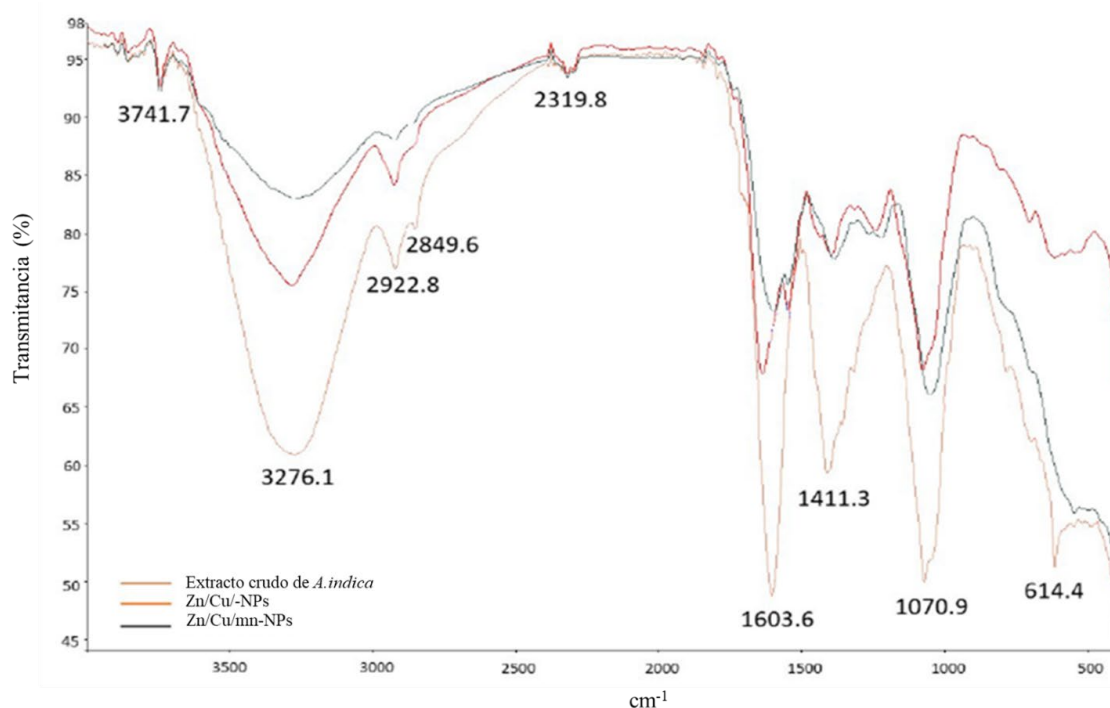


Fig. 4. Espectros infrarrojos (TF-IR) del extracto crudo de hoja de *A. indica* y fito-nanopartículas de Zn/Cu y Zn/Cu/Mn sintetizados a partir de *A. indica*.

Fig. 4. Infrared spectra (TF-IR) of crude leaf extract of *A. indica* and Zn/Cu and Zn/Cu/Mn phyto-nanoparticles synthesized from *A. indica*.

Cu/Mn-NPs tenían formas irregulares con tamaños que oscilaban los 4.000 nm (Fig. 5). El tamaño de las NPs en SEM indica que se tuvieron moléculas de gran tamaño, lo que puede ser resultado de la formación de agregaciones derivadas de sus propiedades fisicoquímicas, lo cual contrasta con resultados de autores donde se emplean extractos de *A. indica* en presencia de un solo metal el que genera partículas más estables con tamaño promedio de 33 a 100 nm con forma esférica (Chinnasamy et al., 2021; Lakkim et al., 2020). Sin embargo, los resultados de la presente investigación son semejantes a otras NPs bimetálicas a base de *C. chinese*, *P. juliflora* y *C. longirostrata*, con tamaños de 41a a 1.900 nm (Alfaro-Corres et al., 2023; Mendez-Trujillo et al., 2022, 2019), por consiguiente correspondería al primer reporte sobre la síntesis de NPs bi y trimetálicas a base de *A. indica* que se obtienen, pero más que nanopartículas se estaría relacionando de la formación de agregados metálicos, dado el tamaño obtenido en el presente estudio.

Por otro lado, el análisis de EDX de ambas nano partículas di y tri-metalicas de *A. indica*

confirmó la presencia de iones Zn en ambas nanopartículas, pero no se detectó la presencia de cobre y manganeso en Zn/Cu-NPs y Zn/Cu/Mn-NPs, respectivamente (Fig. 6A y Fig 6B). Así mismo se identificaron otros elementos orgánicos como Si, C, O y P, derivado de la base empleada para el análisis de la muestra y el contenido mineral propio de la muestra de la planta. Esto podría atribuirse a la formación de nanoestructuras, dentro de las cuales se pueden encontrar el tipo “núcleo-cascara” (core-shell), en donde uno de los metales estabiliza la capa interna como nucleó, mientras que los otros metales se depositan directamente sobre ella (Ali et al., 2020). No obstante, estudios adicionales como TEM serían necesarios para dilucidar las interacciones atómicas entre los iones y los fitoquímicos que participan en la formación de las NPs (Mustapha et al., 2023).

## CONCLUSIONES

La aplicación de las nanopartículas de Cu/Zn y Cu/Zn/Mn obtenidas de *A. indica* presentaron efectos significativos sobre la mortalidad de

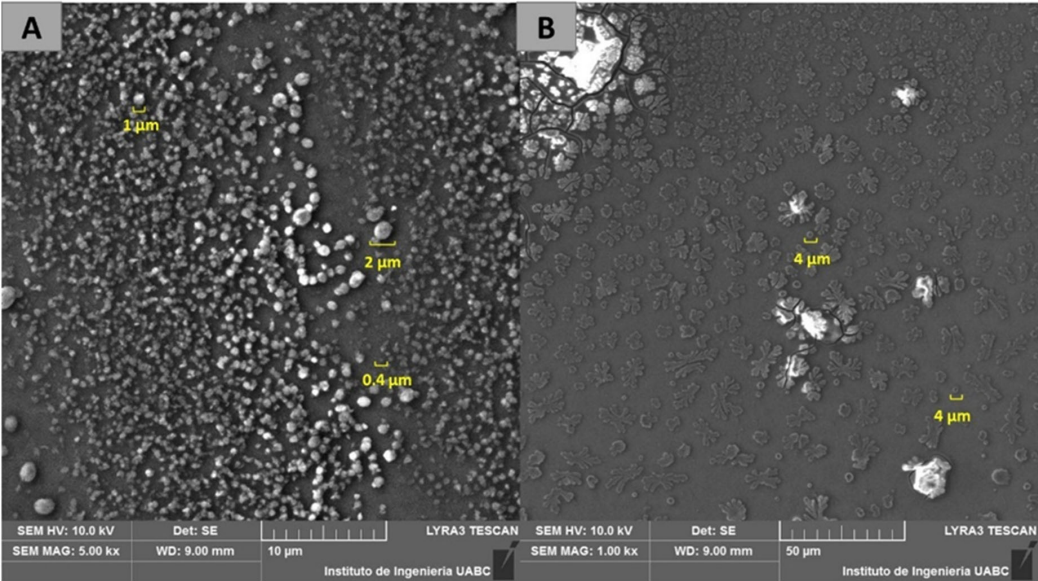


Fig. 5. Microscopía electrónica de barrido de fito-nanopartículas de A) Zn/Cu y B) Zn/Cu/Mn sintetizados a partir de *A. indica*.  
Fig. 5. Scanning electron microscopy of A) Zn/Cu and B) Zn/Cu/Mn phyto-nanoparticles synthesized from *A. indica*.

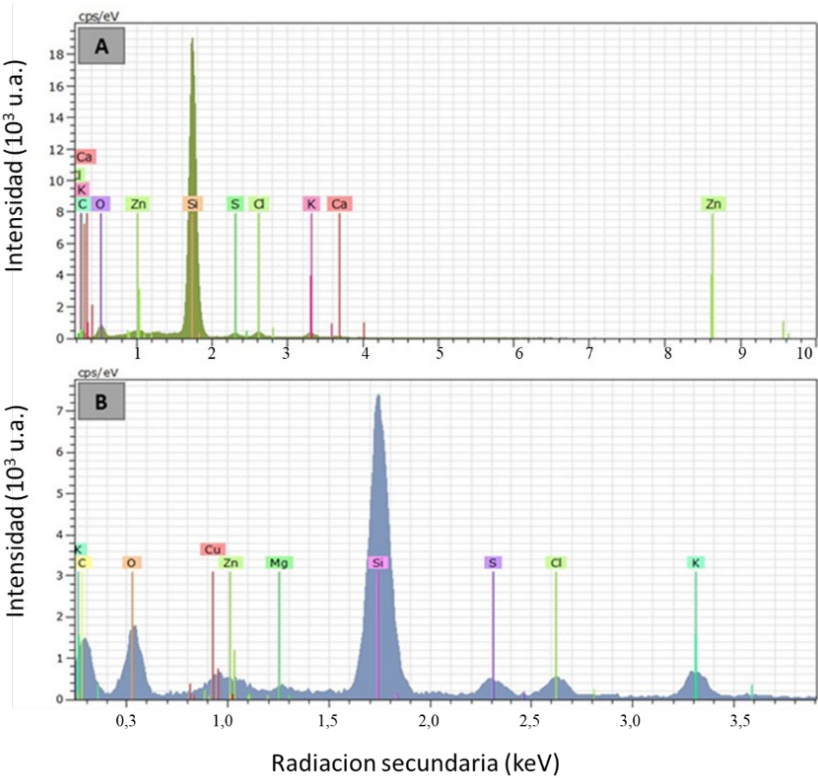


Fig. 6. Composición química mediante espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS) de fito-nanopartículas de A) Zn/Cu y B) Zn/Cu/Mn sintetizados a partir de *A. indica*.  
Fig. 6. Chemical composition by energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) of A) Zn/Cu and B) Zn/Cu/Mn phyto-nanoparticles synthesized from *A. indica*.



*T. castaneum* y *P. solenopsis* en condiciones de laboratorio. El análisis DLS y SEM mostró que las nanopartículas de Zn/Cu y Zn/Cu/Mn presentaron una forma esférica e irregular. potencial Z de cada una mostraron valores positivos entre 28.4 y 20 Mv, indicando una mayor estabilidad en las nanopartículas bimetalicas.

Se requieren futuros estudios para evaluar el efecto biológico en condiciones de campo y el grado de toxicidad, para dilucidar su posible empleo como una estrategia complementaria en el control de insectos plagas de cultivo de relevancia agroalimentaria.

## AGRADECIMENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California por el apoyo recibido en la caracterización de las fito-nanopartículas y al Tecnológico de México Campus Conkal por el espacio otorgado para la realización de pruebas de invernadero y laboratorio.

## Contribución de autores

Participación activa en la revisión bibliográfica: Arnoldo Alfaro-Corres, Ernesto Beltran-Partida, Esaú Ruiz-Sánchez.

Participación activa en el desarrollo de la metodología: Daniel Gonzalez-Mendoza, Benjamin Valdez-Salas, Vianey Mendez-Trujillo.

Participación en la discusión de los resultados: Arnoldo Alfaro-Corres, Vianey Mendez Trujillo, Daniel Gonzalez-Mendoza, Benjamin Valdez-Salas.

Revisión y aprobación de la versión final del artículo: Daniel Gonzalez-Mendoza, Benjamin Valdez-Salas, Vianey Mendez-Trujillo.

## LITERATURA CITADA

Ahmed, R.M., A. Khalid, S. Mohan, S. Yagi, H. A. Saad, N. K. Bayoumi, A. Ali, K. A. El-Sharkawy, H. A., Alhazmi, M., Albratty, S.A., Javed, S., Sultana, and A.M. Meraya .2023. GC-MS phytochemical profiling, antidiabetic, and antioxidant activities of *Khaya senegalensis* stem bark and *Azadirachta indica* leave extracts in rats. *Journal of Spectroscopy* 3052595. <https://doi.org/10.1155/2023/3052595>

Akbar, R., S. Zaman, G. Khan, R. Bibi, N. Rafiq, B. Faheem, A. Ali, S. Ali, M. Zaman, M. Fawad, A. Usman, N. Ahmad, and J. Sun. 2025. Comparative Study of Aqueous Plant Extracts and Deltamethrin against Red Flour Beetles, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Polish Journal of Environmental Studies* 20: 1-14. <https://doi.org/10.15244/pjoes/203049>

Alfaro-Corres, A.E., D. González-Mendoza, E. Ruiz-Sánchez, C. Ail-Catzin, B. Valdez-Salas, F. Gutierrez-Miceli, A. Reyes-Ramirez, and J. Fils-Pierre .2023. Insecticidal Activity and Physicochemical Characterization of Nanoparticles from Foliar Extract of *Capsicum chinense*. *Journal of Renewable Materials* 11(11): 3933–3943. <https://doi.org/10.32604/jrm.2023.031129>

Ali, S., A. S. Sharma, W. Ahmad, M. Zareef, M. M. Hassan, A. Viswadevarayalu, T. Jiao, H. Li, and Q. Chen. 2020. Noble metals based bimetallic and trimetallic nanoparticles: Controlled synthesis, antimicrobial and anticancer applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 51(5): 1–28. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1743964>

Asad, S., N. Anwar, M. Shah, Z. Anwar, M. Arif, M. Rauf, K. Ali, M. Shah, W. Murad, G. M. Albadrani, A. E. Altyar and M. M. Abdel-Daim. 2022. Biological synthesis of silver nanoparticles by *Amaryllis vittata* (L.) Herit: From antimicrobial to biomedical applications. *Materials* 15(16): 5478. <https://doi.org/10.3390/ma15165478>.

Aguirre, J. D. and V. C Culotta. 2012. Battles with iron: manganese in oxidative stress protection. *The Journal of Biological Chemistry* 287(17): 13541–13548. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.312181>

Anusri, C.C S. A., C. Levna, A. PM and D. Lekha .2019. MoS2 nanoparticles induce behavioral alteration and oxidative stress mediated cellular toxicity in the social insect *Oecophylla smaragdina* (Asian weaver ant). *Journal of Hazardous Materials* 385: 121624. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121624>.

Asma, S., L. Ghosia, A. Kafeel, T. K Ali and M. Malik. 2018. *Daphne mucronata*-mediated phytosynthesis of silver nanoparticles and their novel biological applications, compatibility and toxicity studies. *Green Chemistry Letters and Reviews* 11:3: 318-333. <https://doi.org/10.1080/17518253.2018.1502365>.

- Azhari, O.A., N.E.H.E.A. Magzoub, E.S.A.I. Abd and M.A.H. Ahmed. 2019. Evaluation of the systemic action of neem (*Azadirachta indica* A. juss) seed products against the desert locust immature *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). African Journal of Agricultural Research 14(32): 1472–1486. <https://doi.org/10.5897/ajar2019.14192>.
- Basavegowda, N. and K. H. Baek. 2021. Multimetallic nanoparticles as alternative antimicrobial agents: challenges and perspectives. Molecules 26(4): 912. <https://doi.org/10.3390/molecules26040912>.
- Belal, R., and A. Gad. 2023. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress, genotoxicity, and apoptosis in the hemocytes of *Bombyx mori* larvae. Scientific reports 13: 3520. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30444-y>.
- Castillo-Henríquez, L., K. Alfaro-Aguilar, J. Ugalde-Álvarez, L. Vega-Fernández, G. Montes de Oca-Vásquez, and J.R. Vega-Baudrit. 2020. Green synthesis of gold and silver nanoparticles from plant extracts and their possible applications as antimicrobial agents in the agricultural area. Nanomaterials 10(9): 1763. <https://doi.org/10.3390/nano10091763>.
- Chinnasamy, G., S. Chandrasekharan, T.W. Koh, and S. Bhatnagar. 2021. Synthesis, characterization, antibacterial and wound healing efficacy of silver nanoparticles from *Azadirachta indica*. Frontiers in Microbiology 12: 611560. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.611560>.
- Crawley, J. W. M., I. E. Gow, N. Lawes, I. Kowalec, L. Kabalan, C. R. A. Catlow, A. J. Logsdail, S. H. Taylor, N. F. Dummer, and G. J. Hutchings. 2022. Heterogeneous trimetallic nanoparticles as catalysts. Chemical Reviews 122(6): 6795–6849. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00493>.
- Ejeta, D., A. Asme, and A. Asefa. 2021. Insecticidal effect of ethnobotanical plant extracts against *Anopheles arabiensis* under laboratory conditions. Malaria Journal 20(1):466. <https://doi.org/10.1186/s12936-021-04004-6>.
- Fite, T., T. Tefera, M. Negeri, and T. Damte. 2020. Effect of *Azadirachta indica* and *Milletia ferruginea* extracts against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) infestation management in chickpea. Cogent Food & Agriculture 6(1): 1712145. <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1712145>.
- Fordjour, F. A., P. Osei-Poku, A. K. A. Genfi, K. G. Ainooson, K. Amponsah, P. K. Arthur, G. R. Stephenson, A. Kwarteng. 2023. Use of medicinal plants as a remedy against lymphatic filariasis: Current status and future prospect. Health Science Reports 6(5), e1295. <https://doi.org/10.1002/hsr.1295>.
- Hamdy, E., A. A. Al-Askar, H. El-Gendi, W.M. Khamis, S.I. Behiry, F. Valentini, K. A. Abd-Elsalam, and Abdelkhalek, A. 2023. Zinc oxide nanoparticles biosynthesized by *Eriobotrya japonica* leaf extract: characterization, insecticidal and antibacterial properties. Plants 12(15): 2826. <https://doi.org/10.3390/plants12152826>.
- Hussain, S., W. Javed, A. Tajammal, M. Khalid, N. Rasool, M. Riaz, M. Shahid, I. Ahmad, R. Muhammad and S.A.A. Shah. 2023. Synergistic antibacterial screening of *Cymbopogon citratus* and *Azadirachta indica*: Phytochemical profiling and antioxidant and hemolytic activities. ACS Omega 8(19): 16600–16611. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06785>.
- Lakkim, V., M.C. Reddy, R.R. Pallavali, K.R. Reddy, C.V. Reddy, B.A. Inamuddin, A. L. Bilgrami, and D. Lomada. 2020. Green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial activity against multidrug-resistant bacteria and wound healing efficacy using a murine model. Antibiotics 9(12): 902. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9120902>.
- León-Jimenez, E., B. Valdéz-Salas, D. González-Mendoza and O. Tzintzun-Camacho. 2019. Synthesis and insecticide activity of Cu-nanoparticles from *Prosopis juliflora* (Sw) DC and *Pluchea sericea* (Nutt.) on *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae). Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 78(2): 12-21.
- Mao, B. H., Z. Y. Chen, Y. J. Wang, and S. J. Yan. 2018. Silver nanoparticles have lethal and sublethal adverse effects on development and longevity by inducing ROS-mediated stress responses. Scientific Reports 8(1): 2445. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20728-z>.
- Mboussi, S.B., Z. Ambang, S. Kakam, and L.B. Beilhe .2018. Control of cocoa mirids using aqueous extracts of *Thevetia peruviana* and *Azadirachta indica*. Cogent Food & Agriculture 4(1):1430470. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1430470>.

- Mendez-Trujillo, V., B. Valdez-Salas, M. Carrillo-Beltran, M.A. Curiel-Alvarez, E. Beltran-Partida, A. Alfaro-Corres, E. Ruiz-Sanchez, G. Bautista-Trujillo, O. Tzintzun-Camacho, C. Ceceña-Duran, C. Ail-Catzin, and D. Gonzalez-Mendoza. 2022. Insecticidal effect of green bimetallic nanoparticles from *Crotalaria Longirostrata* on cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis*. *Journal of Renewable Materials* 10(10): 2543-2552. <https://doi.org/10.32604/jrm.2022.020965>
- Mendez-Trujillo, V., B. Valdez-Salas, M. Carrillo-Beltran, M. A. Curiel-Alvarez, O. Tzintzun-Camacho, C. Ceceña-Duran, and D. Gonzalez-Mendoza. 2019. Green synthesis of bimetallic nanoparticles from *Prosopis juliflora* (Sw) DC., and its effect against cotton mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 88(3): 269–275. <https://doi.org/10.32604/phyton.2019.07316>
- Mustapha, T., N.R. Ithnin, H. Othman, Z. Abu Hasan, and N. Misni. 2023. Bio-fabrication of silver nanoparticles using *Citrus aurantifolia* fruit peel extract (CAFPE) and the role of plant extract in the synthesis. *Plants* 12(8):1648. <https://doi.org/10.3390/plants12081648>.
- Nagini, S., R. Nivetha, M. Palrasu, and R. Mishra. 2021. Nimbolide, a neem limonoid, is a promising candidate for the anticancer drug arsenal. *Journal of Medicinal Chemistry* 64(7): 3560–3577. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02239>
- Odewole, A.F., T.A. Adebayo, S.A. Babarinde and G.S. Awolokun. 2020. Insecticidal activity of aqueous indigenous plant extracts against insect pest associated with cucumber (*Cucumis sativa* L.) in Southern Guinea Savannah Zone of Nigeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 53(5-6): 230-246. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1741854>.
- Phambala, K., Y. Tembo, T. Kasambala, V.H. Kabambe, P.C. Stevenson, and S.R. Belmain. 2020. Bioactivity of common pesticidal plants on fall armyworm larvae (*Spodoptera frugiperda*). *Plants* 9(1): 112. <https://doi.org/10.3390/plants9010112>
- Sarna, D., G. Kashyap, and I. Gogoi. 2019. Bioassay of some aqueous plant extracts against leaf and fruit scarring beetle, *Nodostoma subcostatum* (Jacoby). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 7(1): 1661-1663.
- Skłodowski, K., S.J. Chmielewska-Deptuła, E. Piktel, P. Wolak, T. Wollny, and R. Bucki. 2023. Metallic nanosystems in the development of antimicrobial strategies with high antimicrobial activity and high biocompatibility. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3): 2104. <https://doi.org/10.3390/ijms24032104>
- Szczyglewska, P., A. Feliczak-Guzik, and I. Nowak. 2023. Nanotechnology-General aspects: A chemical reduction approach to the synthesis of nanoparticles. *Molecules* 28(13): 4932. <https://doi.org/10.3390/molecules28134932>
- Tuncsoy, B., and Y. Mese. 2021. Influence of titanium dioxide nanoparticles on bioaccumulation, antioxidant defense and immune system of *Galleria mellonella* L. *Environmental Science and Pollution Research* 28(28): 38007–38015. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13409-4>
- Ulusoy, S., D. Kahya, M.G. Bilgin and A. Apalak. 2022. The effectiveness of wax secretion on chemical control in some mealybug species. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 25(3): 101954. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2022.101954>
- Venmathi Maran, B. A., D. Josmeh, J.K. Tan, Y.S. Yong and M.D. Shah. 2021. Efficacy of the aqueous extract of *Azadirachta indica* against the marine parasitic leech and its phytochemical profiling. *Molecules* 26(7): 1908. <https://doi.org/10.3390/molecules26071908>
- Vijayaram, S., H. Razafindralambo, Y.Z. Sun, S. Vasantharaj, H. Ghafarifarsani, S.H. Hoseinifar, and M. Raeeszadeh. 2023. Applications of green synthesized metal nanoparticles - a Review. *Biological Trace Element Research* 202: 360-386. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03645-9>
- Wylie, M. R., and D.S. Merrell. 2022. The antimicrobial potential of the neem tree *Azadirachta indica*. *Frontiers in Pharmacology* 13: 891535. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.891535>

