

CONCENTRACIÓN DE AZADIRACTINA, EFECTIVIDAD INSECTICIDA Y FITOTOXICIDAD DE CUATRO EXTRACTOS DE *Azadirachta indica* A. JUSS.

AZADIRACHTIN CONCENTRATION, INSECTICIDE EFFICACY AND PHYTOTOXICITY OF FOUR NEEM *Azadirachta indica* A. JUSS. EXTRACTS

Gabriela Esparza-Díaz¹, José López-Collado¹, Juan A. Villanueva-Jiménez^{1*}, Francisco Osorio-Acosta¹, Gabriel Otero-Colina², Eloy Camacho-Díaz³

¹Agroecosistemas Tropicales, Campus Veracruz. Colegio de Postgraduados. Km. 88.5. Carretera Xalapa-Veracruz, 91690, Municipio. Manlio F. Altamirano, Veracruz, Veracruz. México. (javj@colpos.mx). ²Fitosanidad. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ³Laboratorio de Alta Tecnología de Orizaba S. C. Norte 32, Núm. 5, Colonia Centro. 94300. Orizaba, Veracruz. México.

RESUMEN

La preparación de bioinsecticidas efectivos a base de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) requiere extraer y concentrar sus activos, debido a que no se encuentran en altas cantidades de forma natural. Para ello se compararon los extractos de neem por extrusión simple, extrusión metanólica en frío (metanólico), Soxhlet-hexano (hexánico) y acuosa (acuoso) en cuanto a la concentración de azadiractina (AZA) y su efectividad insecticida sobre *Aphis gossypii* Glover, así como posibles efectos tóxicos sobre *Ixora coccinea* L. El diseño experimental fue completamente al azar, se realizó un análisis de varianza con los datos y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los análisis de los extractos por HPLC mostraron concentraciones significativamente diferentes de 2478, 565, 422 y 150 ppm de AZA en el extracto metanólico, hexánico, oleoso y acuoso. El bioensayo para determinar el efecto insecticida y la fitotoxicidad de los extractos consistió en exponer 10 ninfas de *A. gossypii* a hojas de *I. coccinea* tratadas con cada extracto a dosis de 0.01, 0.1 y 0.2 mg de AZA en 5 cm², y un testigo con agua, con tres repeticiones. La mortalidad se midió a 24, 48 y 72 h. Sólo el extracto oleoso produjo lesiones en 35 % del área foliar tratada con daño medio y nivel 5 de fitotoxicidad en *I. coccinea*. Se encontraron diferencias significativas en la mortalidad de *A. gossypii* por tipo de extracto, tiempo y dosis, así como en las interacciones dosis tiempo y dosis tipo de extracto. El extracto con el mayor potencial insecticida fue el metanólico (0.2 mg AZA), con 100 % de mortalidad a 48 y 72 h ($p \leq 0.0001$). La aplicación simultánea del metanol en extrusión extrae más AZA de la semilla de *A. indica*, lo cual promueve una mayor actividad insecticida.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.
Recibido: Enero, 2010. Aprobado: Septiembre, 2010.
Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 44: 821-833. 2010.

ABSTRACT

The preparation of effective neem-based bioinsecticides (*Azadirachta indica* A. Juss.) requires the extraction and concentration of its active ingredients, given that they are not found in large quantities in a natural form. Simple cold press, methanolic cold press (methanolic), Soxhlet-hexane (hexanic) and aqueous (aqueous) neem extracts were compared with respect to the concentration of azadirachtin (AZA) and its insecticidal effectiveness against *Aphis gossypii* Glover, as well as possible toxic effects on *Ixora coccinea* L. The experimental design was completely randomized. An analysis of variance was made with the data and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). Analyses of extracts by HPLC showed significantly different concentrations (2478, 565, 422 and 150 ppm) of AZA in the methanolic, hexanic, oily and aqueous extracts. The bioassay to determine the insecticidal effect and the phytotoxicity of the extracts consisted of exposing 10 nymphs of *A. gossypii* to leaves of *I. coccinea* treated with each extract to doses of 0.01, 0.1 and 0.2 mg f AZA in 5 cm², and a control with water, with three replicates. Mortality was measured at 24, 48 and 72 h. Only the oily extract produced lesions in 35 % of the treated leaf area with moderate damage and level 5 phytotoxicity in *I. coccinea*. Significant differences were found in the mortality of *A. gossypii* per type of extract, time and dose, as well as in the interactions dose time and dose type of extract. The extract with the highest insecticide potential was the methanolic (0.2 mg AZA), with 100 % mortality at 48 and 72 h ($p \leq 0.0001$). The simultaneous application of methanol and cold press extracts more AZA from the seed of *A. indica*, promoting a higher insecticidal activity.

Key words: methanolic extract, neem, tetranortriterpenoid.

Palabras clave: extracto metanólico, neem, tetranortriterpenoide.

INTRODUCCIÓN

El árbol del neem *Azadirachta indica* A. Juss. contiene diversos componentes con actividad insecticida, de los cuales el más importante es la azadiractina (AZA), un tetranortriterpenoide natural (NIIR Board, 2004). Sin embargo, la concentración de los compuestos bioactivos del neem no es alta en las diferentes partes de la planta. La preparación de bioinsecticidas efectivos a base de neem requiere que el proceso de extracción separe e incremente el contenido de AZA y otros componentes relacionados con la actividad insecticida de los extractos. Para la extracción de AZA se han propuesto varios métodos y destacan aquellos que usan como solvente al etanol (Larson, 1985), hexano, acetona, acetato de etilo y metanol (Koul y Wahab, 2004). También se ha evaluado el uso de isopropanol con evaporación al vacío (Moorty y Kumar, 2004) o gases licuados (D'Andrea *et al.*, 1994).

Los extractos comerciales de la semilla de *A. indica* se valoran primordialmente por el contenido de AZA en sus formas estructurales (Sharma *et al.*, 2003), pero rara vez por los terpenoides que ejercen efectos aditivos a la acción insecticida (Siddiqui *et al.*, 2002). Adicionalmente, los aceites contenidos en los extractos de neem les confieren propiedades penetrantes y de sinergia con la AZA y otros componentes (Stark y Walter, 1995).

El efecto de la AZA depende de su dosis y de la especie plaga a controlar, ya que puede reducir la alimentación, supervivencia, viabilidad de ninfas, progenie, e incluso puede producir toxicidad aguda. Aunque la AZA se ha usado para controlar áfidos, se requieren concentraciones mayores a 100 ppm para inducir un efecto primario antialimentario (Nisbet *et al.*, 1993), el cual se puede deber a su escasa movilidad en el floema (Schmutterer, 1985). Además de una disminución en la alimentación, los sustratos impregnados con AZA pueden reducir la supervivencia de *Macrosiphum rosae* L. y *Macrosiphoniella sanbornii* Gillette (Koul, 1999). Según Nisbet *et al.* (1994), se reduce la cantidad de ninfas viables producidas por adultos ápteros con una dieta con 25 ppm de AZA durante 24 a 52 h. Incluso, Lowery e Isman (1996) indican que las aplicaciones de 1 % de aceite

INTRODUCTION

The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss. contains diverse components with insecticidal activity, of which the most important is azadirachtin (AZA), a natural tetranortriterpenoid (NIIR Board, 2004). However, no high concentrations of the bioactive components of neem can be found in the different parts of the plant. The preparation of effective neem-based bioinsecticides requires for the extraction process to separate and increment the content of AZA and other components related to the insecticidal activity of the extracts. Various methods have been proposed for the extraction of AZA, most outstanding of which are those that use ethanol (Larson, 1985), hexane, acetone, ethyl acetate and methanol as solvent (Koul and Wahab, 2004). The use of isopropanol has also been evaluated with vacuum evaporation (Moorty and Kumar, 2004) or liquid gases (D'Andrea *et al.*, 1994).

The commercial extracts of the seed of *A. indica* are valued primarily for the content of AZA in its structural forms (Sharma *et al.*, 2003), but rarely for the terpenoids that exert additive effects to the insecticidal action (Siddiqui *et al.*, 2002). Additionally, oils contained in the neem extracts, confer them penetrating properties and synergy with the AZA and other components (Stark and Walter, 1995).

The effect of AZA depends on its dose and on the pest species to be controlled, given that it can reduce the feeding, survival, viability of nymphs, progeny, and can even produce acute toxicity. Although AZA has been used to control aphids, concentrations higher than 100 ppm are required to induce a primary antifeeding effect (Nisbet *et al.*, 1993), which may be due to their scant mobility in the phloem (Schmutterer, 1985). In addition to a decrease in feeding, the substrates impregnated with AZA can reduce survival of *Macrosiphum rosae* L. and *Macrosiphoniella sanbornii* Gillette (Koul, 1999). According to Nisbet *et al.* (1994), the amount of viable nymphs produced by apterous adults is reduced with a diet with 25 ppm of AZA during 24 to 52 h. In addition, Lowery and Isman (1996) indicate that the applications of 1 % of oil of *A. indica* reduced the progenies of *Myzuz persicae* Sulzer by 82 % and that of *Nasonovia ribisnigri* Mosley by

de *A. indica* redujeron la progenie de *Myzus persicae* Sulzer en 82 % y la de *Nasonovia ribisnigri* Mosley en 66 %. El extracto acuoso de semilla de *A. indica* provoca mortalidad de *Aphis nerii* Boyer, aunque no logra prevenir que éste transmita el virus de la mancha anular del papayo (Hernández-Castro *et al.*, 2005).

El pulgón del melón (*Aphis gossypii* Glover) es una plaga que ataca numerosos cultivos, entre ellos plantas ornamentales del género *Ixora* (Rubiaceae) (Imenes *et al.*, 2002), y se presenta comunmente sobre arbustos de *Ixora coccinea* L. Esta planta es importante para la industria de jardinería y floristería, y representa un recurso para las aves silvestres (Pérez-Rivera, 2000). Aunque *I. coccinea* es un hospedero habitual para *A. gossypii* en la zona Centro de Veracruz, no hay estudios sobre su control en esta planta y el manejo de este áfido en otros cultivos se ha basado en insecticidas químicos convencionales. Para el control de *A. gossypii* se buscan productos menos agresivos al ambiente, incluyendo a la AZA obtenida por diferentes procesos, por lo que se han probado los extractos de neem (Dos Santos *et al.*, 2004). Khalequzzaman y Nahar (2008) señalan una CL_{50} de $0.34 \mu\text{g cm}^{-2}$ de AZA para *A. gossypii*, mientras que el NIIR Board (2004) presenta una CL_{50} de 10 ppm de AZA para el extracto etanólico de neem en campo, contra esta especie. Según Dos Santos *et al.* (2004), la supervivencia y la fecundidad de ninfas del pulgón del melón se reducen con el extracto acuoso de semillas de neem. Así, la mortalidad de este áfido puede estar relacionada con la dosis de AZA e incluso con el tipo de extracto de la semilla de neem.

Los objetivos de esta investigación fueron: 1) comparar la concentración de azadiractina en los extractos oleoso, acuoso, metanólico y hexánico de semillas de *A. indica* A. Juss.; 2) evaluar su efectividad insecticida sobre *A. gossypii* Glover y su efecto fitotóxico en la planta ornamental *I. coccinea* L.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semilla de neem

En el presente estudio se usó semilla de *A. indica* de la cosecha 2004 de una plantación de árboles de 13 años, ubicada en el Campus Veracruz del Colegio de Postgraduados, en el Municipio de Manlio F. Altamirano, Veracruz, México ($19^{\circ} 11.658' \text{ N}$ y $96^{\circ} 20.069' \text{ O}$), 27 m de altitud y clima cálido subhúmedo Aw_s(w)(e). Todos los extractos se obtuvieron de 20 kg de semilla

66 %. The aqueous extract of *A. indica* seed provokes mortality of *Aphis nerii* Boyer, although it does not prevent it from transmitting the papaya ring spot virus (Hernández-Castro *et al.*, 2005).

The melon aphid (*Aphis gossypii* Glover) is a pest that attacks numerous crops, including ornamental plants of the genus *Ixora* (Rubiaceae) (Imenes *et al.*, 2002), and commonly appears on shrubs of *Ixora coccinea* L. This plant is important for the gardening and floristry industry, and represents a resource for wild birds (Pérez-Rivera, 2000). Although *I. coccinea* is a habitual host for *A. gossypii* in the Central zone of Veracruz, there are no studies of its control in this plant and the management of this aphid in other crops has been based on conventional chemical insecticides. For the control of *A. gossypii*, products that are less aggressive to the environment are sought, including the AZA obtained by different processes, for which neem extracts have been tested (Dos Santos *et al.*, 2004). Khalequzzaman and Nahar (2008) indicate a CL_{50} of $0.34 \mu\text{g cm}^{-2}$ of AZA for *A. gossypii*, whereas the NIIR Board (2004) presents a CL_{50} of 10 ppm of AZA for the ethanolic extract of neem in the field, against this species. According to Dos Santos *et al.* (2004), the survival and fertility of nymphs of the melon aphid are reduced with the aqueous extract of neem seeds. Thus, the mortality of this aphid may be related to the dose of AZA and even to the type of extract of the neem seed.

The objectives of this investigation were: 1) to compare the concentration of azadirachtin in the oily, aqueous, methanolic and hexanic extracts of seeds of *A. indica* A. Juss.; 2) to evaluate its insecticidal effectiveness on *A. gossypii* Glover and its phytotoxic effect in the ornamental plant *I. coccinea* L.

MATERIALS AND METHODS

Neem seed

The seed of *A. indica* was used from the 2004 harvest of a 13 year old tree plantation, located at the Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz in the municipality of Manlio. F. Altamirano, Veracruz, Mexico ($19^{\circ} 11.658' \text{ N}$ and $96^{\circ} 20.069' \text{ W}$), 27 m altitude and Aw_s (w) (e) warm sub-humid climate. All of the extracts were obtained from 20 kg of neem seed with endocarp, previously de-pulped, dried and ground (from here on, seed-endocarp or seed). An analysis in triplicate was made of the AZA content of a sample comprised of 1.0 kg of the seed-endocarp,

de neem con endocarpio, previamente despulpada, seca y molida (en lo sucesivo, semilla-endocarpio o semilla). Se realizó un análisis por triplicado del contenido de AZA de una muestra compuesta de 1.0 kg de semilla endocarpio, con endocarpio, de la misma cosecha destinada a las extracciones; la semilla se trató con metanol y se usó la metodología HPLC (Schneider y Ermel, 1987) con el sistema modular Perkin Elmer certificado por ISO-9000. El contenido de AZA en la semilla-endocarpio fue un valor de referencia para comparar los extractos.

Extractos de neem

Los solventes usados para elaborar los extractos fueron alcohol metílico (metanol 99.96 %) y hexano (n-hexano, p.e.b. @ 55-63 °C), ambos de grado industrial, y agua destilada. El extracto de neem por extrusión simple se obtuvo con un equipo piloto de diseño vertical, que consiste en un cilindro de acero inoxidable con capacidad para 1 kg de semilla-endocarpio, con un sistema hidráulico manual (presión de 20 kg cm⁻²); el cilindro tiene un orificio de salida y un recolector del extracto oleoso. Para extraer por extrusión con metanol en frío, la muestra de 1 kg de semilla-endocarpio de *A. indica* se sumergió 30 min en 0.15 L de metanol y se efectuó la extracción por extrusión descrito para el extracto metanólico.

La extracción con el método Soxhlet-hexano se efectuó con 0.5 L de hexano, de acuerdo al procedimiento 936.15 de la AOAC (1990). Hubo cuatro ciclos de contacto entre el solvente y la semilla-endocarpio de *A. indica*, se evitó la caída del solvente y se retiró el matraz con la solución. Al final se evaporó el solvente para obtener el extracto hexánico.

Para la extracción acuosa se humedeció 1 kg de semilla-endocarpio de *A. indica* en 1.76 L de agua por 24 h. La suspensión cruda se filtró con malla metálica de 2 mm Ø, seguida de papel filtro rápido Whatman 41® y se obtuvo el extracto acuoso.

El porcentaje en peso (*EO*) de la cantidad de extracto obtenido (*WE*; g) para la cantidad de semilla procesada (*WS*; g) se calculó como rendimiento con la ecuación (1) (Happel y Jordan, 1981):

$$EO(\%) = \left(\frac{WE \cdot 100}{WS} \right) \quad (1)$$

Se obtuvieron tres extracciones a temperatura ambiente en el laboratorio para cada disolvente.

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. Los datos del porcentaje de *EO* fueron examinados, previa transformación ln, con análisis de varianza (ANDEVA) y una separación de medias con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los valores de *EO* presentados son los datos no transformados.

La concentración de AZA en cada extracto se determinó para comparar la eficiencia de extracción, en el Laboratorio de

from the same harvest destined for the extractions; the seed was treated with methanol and the HPLC methodology (Schneider and Ermel, 1987) with the Perkin Elmer modular system certified by ISO-9000. The AZA content in the seed-endocarp was a reference value for comparing the extracts.

Neem extracts

Solvents used to make the extracts were methyl alcohol (methanol 99.96 %) and hexane (n-hexane, p.e.b. @ 55-63 °C), both of industrial grade, and distilled water. The neem extract by simple cold press was obtained with a vertical design pilot equipment, consisting of a stainless steel cylinder with capacity for 1 kg of seed-endocarp, with a manual hydraulic system (pressure of 20 kg cm⁻²); the cylinder has an exit orifice and a collector of the oily extract. To extract by cold press with methanol, the sample of 1 kg of seed-endocarp of *A. indica* was submerged for 30 min in 0.15 L of methanol and the cold press extraction described for the methanolic extract was made.

The extraction with the Soxhlet-hexane method was made with 0.5 L of hexane, according to the procedure 936.15 of the AOAC (1990). There were four cycles of contact between the solvent and the seed-endocarp of *A. indica*, the falling of the solvent was prevented and the flask with the solution was removed. At the end the solvent was evaporated to obtain the hexanic extract.

For the aqueous extraction, 1 kg of seed-endocarp of *A. indica* was moistened in 1.76 L of water for 24 h. The crude suspension was filtered with metallic mesh of 2 mm Ø, and then with Whatman rapid filter paper 41®, and the aqueous extract was obtained.

The percentage in weight (*EO*) of the amount of extract obtained (*WE*; g) for the amount of seed processed (*WS*; g) was calculated as yield with equation (1) (Happel and Jordan, 1981):

$$EO(\%) = \left(\frac{WE \cdot 100}{WS} \right) \quad (1)$$

Three extractions were obtained at room temperature in the laboratory for each dissolvent.

The experimental design was completely randomized with three replicates. After ln transformation, data on percentage of *EO* were examined with analysis of variance (ANOVA) and a separation of means with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The values of *EO* presented are the untransformed data.

The AZA concentration in each extract was determined to compare the extraction efficiency, in the Laboratorio de Alta Tecnología de Orizaba, Universidad Veracruzana (Orizaba, México). The conditions of the chromatography run for the methanolic solutions of AZA were as follows: column 125 mm x

Alta Tecnología de Orizaba, Universidad Veracruzana (Orizaba, México). Las condiciones de corrida en cromatografía para las soluciones metanólicas de AZA fueron: columna 125 mm × 4 mm; tasa de flujo: F 2 mL min⁻¹; detector: UV-VIS; longitud de onda: λ 214 nm; volumen de muestra: 20 μ L; fase móvil: acetonitrilo, H₂O; tiempo de retención relativo tR : 2.504 min. Como estándar se usó azadiractina al 95 % (Sigma®) (C₃₅H₄₄O₁₆; w.m. 720.72). Se determinó la concentración de AZA (ppm) en tres muestras de cada extracto. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. Para conocer el efecto del proceso de extracción se comparó su relación con la concentración estandarizada (ppm) de AZA mediante ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Las concentraciones de AZA en la semilla-endocarpio (AZAS) y en los extractos (AZAE) sirvieron para calcular el porcentaje de AZA extraída como rendimiento (p/p; AZAR), presente en la cantidad de extracto (WE, g) por cada 100 g de semilla-endocarpio (WS), con la ecuación (2) (Happel y Jordan, 1981):

$$AZAR(\%) = \left(\frac{WE \cdot AZAE \cdot 100}{WS \cdot AZAS} \right) \quad (2)$$

El porcentaje de AZA extraída (AZAR) en los procesos fue cuantificado por triplicado para cada extracto y examinado, previa transformación ln, mediante ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los valores de AZAR presentados son los datos no transformados.

Bioensayos de extractos de neem sobre *A. gossypii*

El pie de cría de *A. gossypii* Glover se obtuvo de brotes de *I. coccinea* en Tolome, estado de Veracruz, México. Plantas adicionales de esta especie se cultivaron en macetas de 2 L en una casa sombra libre de plaguicidas, se regaron periódicamente y se agregaron ácidos fúlvicos QF® para mantener su vigor. Se depositaron 30 ejemplares no parasitados de *A. gossypii* en tres jaulas de 1.0 m³ cubiertas de malla antiáfidos, en tres plantas de *I. coccinea*, las que se sustituyeron por plantas sanas según fue requerido. Los ensayos se realizaron cuando la cría contaba con 20 a 25 generaciones del áfido.

Hojas de *I. coccinea* con pecíolo se desinfectaron en una solución 0.035 % de hipoclorito de sodio y lavadas con agua destilada. El pecíolo de cada hoja fue introducido en tubo de ensaye con 10 mL de solución nutritiva Murashige y Skoog (Sigma® MS5524); la boca del tubo se selló con Parafilm® para evitar la evaporación de la solución nutritiva. La evaluación se realizó a 24.8 ± 0.7 °C, HR de 70 ± 6 % y fotoperiodo de 12: 12 h luz: oscuridad.

Los extractos se aplicaron con micropipeta en 5 cm² de hojas de *I. coccinea*, en dosis equivalentes a 0.01, 0.02 y 0.2 mg de

4 mm; flow rate: F 2 mL min⁻¹; detector: UV-VIS; wave length: 214 nm; sample volume: 20 μ L; mobile phase: acetonitril, H₂O; relative retention time tR : 2.504 min. As standard, azadirachtin was used at 95 % (Sigma®) (C₃₅H₄₄O₁₆; w.m. 720.72). The concentration of AZA (ppm) was determined in three samples of each extract. The experimental design was completely randomized with three replicates. To know the effect of the extraction process, its relationship with the standardized concentration (ppm) of AZA was compared by means of ANOVA and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

The concentrations of AZA in the seed-endocarp (AZAS) and in the extracts (AZAE) served to calculate the percentage of AZA extracted as yield (p/p; AZAR), present in the amount of extract (WE, g) for each 100 g of seed-endocarp (WS), with equation (2) (Happel and Jordan, 1981):

$$AZAR(\%) = \left(\frac{WE \cdot AZAE \cdot 100}{WS \cdot AZAS} \right) \quad (2)$$

The percentage of AZA extracted (AZAR) in the processes was quantified by triplicate for each extract and examined, after ln transformation, by means of ANOVA and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The values of AZAR presented are the untransformed data.

Bioassays of neem extracts on *A. gossypii*

The breeding stock of *A. gossypii* Glover was obtained from shoots of *I. coccinea* in Tolome, state of Veracruz, Mexico. Additional plants of this species were cultivated in pots of 2 L in a shade house free of pesticides. They were watered regularly and fulvic QF® acids were added to maintain their vigor. Thirty non-infected individuals of *A. gossypii* were deposited in three cages of 1.0 m³ covered with anti-aphid mesh in three plants of *I. coccinea*, which were substituted by healthy plants as required. The assays were made when the aphids were reared for 20 to 25 generations.

Petiolated leaves of *I. coccinea* were disinfected in a solution of 0.035 % sodium hypochlorite and washed with distilled water. The petiole of each leaf was introduced in a test tube with 10 mL of Murashige and Skoog nutritive solution (Sigma® MS5524); the mouth of the tube was sealed with Parafilm® to prevent evaporation of the nutritive solution. The evaluation was made at 24.8 ± 0.7 °C, HR of 70 ± 6 % and photoperiod of 12:12 h light:darkness.

The extracts were applied with micropipette in 5 cm² of leaves of *I. coccinea*, in doses equivalent to 0.01, 0.02, and 0.2 mg of AZA. In the methanolic extract diethylenglicol was used as inactive excipient in a 1:4 ratio, to obtain the equivalent dose of AZA after drying. One hour after applying the extract, 10

AZA. En el extracto metanólico se usó dietilenglicol como excipiente inactivo en relación 1:4, para lograr la dosis equivalente de AZA después del secado. Una hora después de aplicar el extracto se colocaron 10 ninfas de tercer ínstar de *A. gossypii* sobre la hoja tratada en una caja-clip (Villanueva-Jiménez *et al.*, 1992). Este proceso se repitió cinco veces para cada dosis en los cuatro extractos. Como testigo se usaron hojas tratadas con agua destilada. Un áfido se consideró muerto cuando perdió la capacidad para moverse a las 24, 48 y 72 h de exposición al insecticida. Este experimento tuvo un diseño factorial con cuatro tipos de extracto, tres dosis de AZA y tres tiempos de exposición, con la mortalidad de *A. gossypii* como variable respuesta. El análisis estadístico se realizó mediante el procedimiento GLM (SAS Institute Inc., 1999); las comparaciones de medias se realizaron con contrastes no ortogonales ($p \leq 0.05$).

Fitotoxicidad de extractos de neem

En el mismo bioensayo se evaluó la fitotoxicidad al cultivo de *I. coccinea* a las 72 h mediante la escala de daños de la EWRS (Cuadro 1) (Silva Flores *et al.*, 2005). Primero se identificó al daño como necrosis foliar y luego se usó la metodología adaptada de Nieto *et al.* (2001) para determinar la relación del área necrosada en 5 cm². La superficie poligonal del daño se determinó en el programa UTHSCSA Image Tool® 3.00. Se realizó estadística descriptiva para el porcentaje de área dañada; no fue necesario usar análisis estadístico debido a que sólo se presentó fitotoxicidad en uno de los extractos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de azadiractina en la semilla de neem

La semilla con endocarpio presentó una concentración promedio de 1820 ppm de AZA, valor que está dentro del intervalo de 430 a 3830 ppm de AZA, obtenido en semilla de la región Andhra Pradesh en la India (Pattnaik *et al.*, 2006), incluso mayor a la encontrada en 12 estados del mismo país (200 a 1600 ppm) (Kaushik *et al.*, 2007), pero menor a la de algunas zonas de Tailandia (3430 ppm) donde la semilla se usa para proceso industrial (Sanguanpong, 2003). De acuerdo con lo anterior, la concentración de AZA de la semilla proveniente del lote de Veracruz es adecuada para uso industrial como bioinsecticida.

Concentración de AZA en los extractos de neem

La mayor concentración de AZA en los extractos de neem ($p \leq 0.0001$) se obtuvo con el extracto

third instar nymphs of *A. gossypii* were placed on the treated leaf in a clip-box (Villanueva-Jiménez *et al.*, 1992). This process was repeated five times for each dose in the four extracts. As control, four leaves treated with distilled water were used. An aphid was considered dead when it lost its capacity to move at 24, 48 and 72 h of exposure to the insecticide. This experiment was set in a factorial design with four types of extracts, three doses of AZA and three exposure times, with the mortality of *A. gossypii* as response variable. The statistical analysis was made with the GLM procedure (SAS Institute Inc., 1999); means comparisons were made with non orthogonal contrasts ($p \leq 0.05$).

Phytotoxicity of neem extracts

In the same bioassay, an evaluation of neem phytotoxicity to *I. coccinea* crop was made at 72 h using the damage scale of the EWRS (Table 1) (Silva Flores *et al.*, 2005). First the damage was identified as foliar necrosis and then the methodology adapted from Nieto *et al.* (2001) was used to determine the ratio of the necrotic area in 5 cm². The polygonal surface of the damage was determined in the program UTHSCSA Image Tool® 3.00. Descriptive statistical analysis was made for the percentage of the damaged area; it was not necessary to use statistical analysis due to the fact that phytotoxicity appeared in only one of the extracts.

RESULTS AND DISCUSSION

Concentration of azadirachtin in the neem seed

The seed with endocarp presented an average concentration of 1820 ppm of AZA, value that is

Cuadro 1. Escala para la evaluación de fitotoxicidad de extractos de semilla de *Azadirachta indica* sobre *Ixora coccinea*, modificada de la propuesta por la European Weed Research Society.

Table 1. Scale for the evaluation of phytotoxicity caused by *Azadirachta indica* seed extracts on *Ixora coccinea*, modified from the proposal by the European Weed Research Society.

| Valor puntual | Efecto sobre el cultivo | Fitotoxicidad al cultivo (%) |
|---------------|-------------------------|------------------------------|
| 1 | Sin efecto | 0 - 0.9 |
| 2 | Daños muy ligeros | 1.0 - 3.4 |
| 3 | Daños ligeros | 3.5 - 6.9 |
| 4 | Daños menores | 7.0 - 12.4 |
| 5 | Daños medios | 12.5 - 19.9 |
| 6 | Daños elevados | 20.0 - 29.9 |
| 7 | Daños muy elevados | 30.0 - 49.9 |
| 8 | Daños severos | 50.0 - 99.9 |
| 9 | Muerte completa | 100 |

metanólico (2478 ppm), respecto a los otros extractos (Cuadro 2) los cuales presentaron valores similares de AZA ($p > 0.05$). El proceso de extrusión con metanol produjo un porcentaje de extracto significativamente menor al obtenido por Soxhlet-hexano o la extracción acuosa ($p \leq 0.0001$), pero el porcentaje de AZA extraída fue tan alto como el de ambos extractos ($p > 0.05$) (Cuadro 2). Este proceso promueve la extracción de la AZA contenida en semilla-endocarpio mediante la interacción de los grupos hidroxilos presentes en AZA y en metanol (Schroeder y Nakanishi, 1987).

El equipo piloto de extracción para la extrusión con metanol logró concentrar 1.4 veces la AZA contenida en la semilla-endocarpio, mayor al desempeño de un equipo desarrollado en Tailandia para extracción metanólica (RIT-pilot), con 3430 ppm de AZA en el extracto a partir de 5200 ppm de AZA en la semilla (Sanguanpong, 2003). En la mayoría de los casos, los extractos comerciales de neem sólo contienen 0.3 % de AZA (Ramesh y Balasubramanian, 1999). Así, la aplicación simultánea del solvente metanol y la extrusión permite extraer más AZA de la semilla de *A. indica*. Hasta ahora ambos procesos se habían usado por separado, dejando a la AZA sin otras moléculas que potencialmente aumentan la actividad insecticida.

Efecto insecticida de extractos de neem sobre *A. gossypii*

La mortalidad de *A. gossypii* en el bioensayo (Figura 1) no fue afectada significativamente por la interacción extracto dosis tiempo ($p = 0.74$) ni la

within the interval of 430 to 3830 ppm of AZA, obtained in seed of the Andhra Pradesh region in India (Pattnaik *et al.*, 2006), even higher than what was found in 12 states of the same country (200 to 160) (Kaushik *et al.*, 2007), but lower than that of some zones of Thailand (3430 ppm) where the seed is used for industrial process (Sanguanpong, 2003). According to the above, the concentration of AZA in the seed from the Veracruz lot is adequate for industrial use as bio-insecticide.

AZA concentration in the neem extracts

The highest concentration of AZA in the neem extracts ($p \leq 0.0001$) was obtained with the methanolic extract (2478 ppm), with respect to the other extracts (Table 2) which presented similar AZA values ($p > 0.05$). The cold press with methanol process produced a percentage of extract significantly lower than that obtained by Soxhlet-hexane or the aqueous extraction ($p \leq 0.0001$), but the percentage of AZA extracted was as high as that of both extracts ($p > 0.05$) (Table 2). This process promotes the extraction of AZA contained in seed-endocarp by means of the interaction of the hydroxyl groups present in AZA and in methanol (Schroeder and Nakanishi, 1987).

The pilot extraction equipment for cold press with methanol concentrated 1.4 times the AZA contained in the seed-endocarp, higher than the performance of an equipment developed in Thailand for methanolic extraction (RIT-pilot), with 3430 ppm of AZA in the extract from 5200 ppm of AZA in the seed (Sanguanpong, 2003). In most of the cases, the commercial neem extracts only contain 0.3 % of

Cuadro 2. Porcentaje promedio (\pm EE) de extracto obtenido (EO), concentración promedio de azadiractina [AZA] y porcentaje de azadiractina extraída presente en cada extracto (AZAR) obtenido por extrusión simple, con metanol, extracción Soxhlet con hexano y acuosa.

Table 2. Mean percentage (\pm SE) of extract obtained (EO), mean concentration of azadirachtin (AZA) and percentage of extracted azadirachtin present in each extract (AZAR) obtained by simple cold press, cold press with methanol, Soxhlet extraction with hexane and aqueous extraction.

| Proceso de extracción | EO (% g g ⁻¹) | [AZA] (ppm) | AZAR (% g g ⁻¹) |
|---------------------------|---------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Extrusión con metanol | 3.20 \pm 0.75 c | 2478 \pm 81.7 a | 4.35 \pm 0.99 a |
| Extrusión simple (oleoso) | 0.77 \pm 0.49 d | 422 \pm 68.5 b | 0.20 \pm 0.17 b |
| Soxhlet-hexano | 24.06 \pm 1.79 b | 565 \pm 145.5 b | 7.39 \pm 1.82 a |
| Acuosa | 83.45 \pm 6.67 a | 150 \pm 52.0 b | 6.66 \pm 2.01 a |

a,b,c,d: Valores con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ Values with different letter in a column are significantly different ($p \leq 0.05$).

interacción extracto tiempo ($p=0.051$). Las interacciones dosis tiempo ($p\leq 0.0001$) y dosis extracto ($p\leq 0.0001$) fueron significativas. En cuanto a los efectos principales, el tiempo de observación ($p\leq 0.0001$), el tipo de extracto ($p\leq 0.0001$) y la dosis de AZA ($p\leq 0.0001$) tuvieron efectos significativos en la mortalidad. Sin embargo, debido a las interacciones significativas encontradas, fue necesario analizar los efectos simples para cada interacción.

La interacción dosis tiempo se explica por la prevista escasa mortalidad en el testigo (0.0 mg AZA) durante los tres periodos de observación, mientras que en las demás dosis la mortalidad aumenta con el tiempo (Cuadro 3). La mortalidad de *A. gossypii* se incrementa tanto al aumentar la dosis como el tiempo, excepto en la dosis más alta del extracto metanólico donde su mortalidad máxima se alcanza desde

AZA (Ramesh and Balasubramanian, 1999). Thus, the simultaneous application of the solvent methanol and the cold press makes it possible to extract more AZA from the seed of *A. indica*. Until now both processes had been used separately, leaving the AZA without other molecules that potentially increase the insecticidal activity.

Insecticidal effect of neem extracts on *A. gossypii*

The mortality of *A. gossypii* in the bioassay (Figure 1) was not significantly affected by the interaction extract dose time ($p=0.74$), nor the extract time interaction ($p=0.051$). The interactions dose time ($p\leq 0.0001$) and dose extract ($p\leq 0.0001$) were significant. With respect to the principal effects, the observation time ($p\leq 0.0001$) type of extract

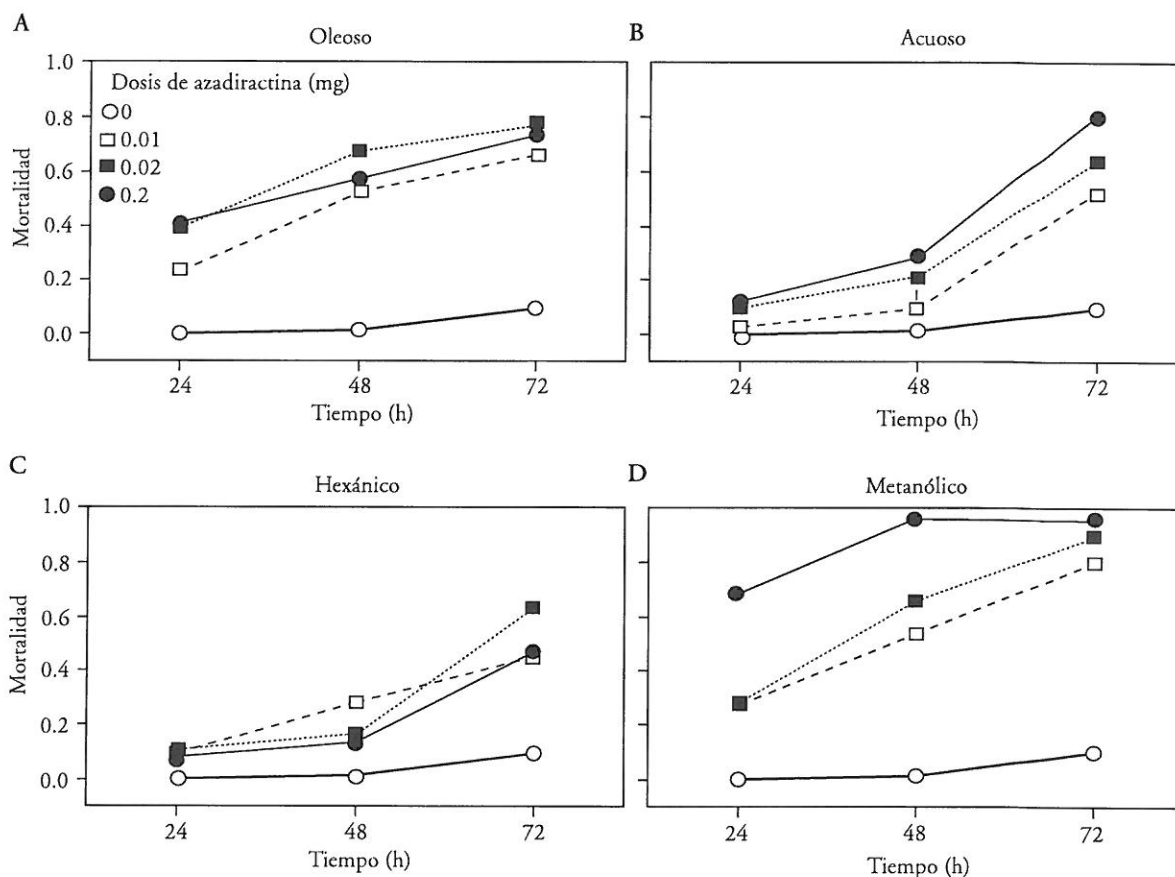


Figura 1. Proporción promedio de la mortalidad de *Aphis gossypii* Glover de la triple interacción de la dosis de azadirachtina (AZA), diferentes extractos (A: oleoso, B: acuoso, C: hexánico y D: metanólico) de semilla-endocarpio de *Azadirachta indica* A. Juss. y tres tiempos de observación.

Figure 1. Mean proportion of mortality of *Aphis gossypii* Glover from the triple interaction of the dose of azadirachtin (AZA), different extracts (A: oily, B: aqueous, C: hexanic and D: methanolic) of seed-endocarp of *Azadirachta indica* A. Juss. and three observation times.

las 48 h, lo cual posiblemente se debe a que la dosis alta de AZA pudo haber entrado al sitio activo más rápidamente gracias al solvente, pudiendo perturbar el desarrollo del pulgón del melón desde un día antes. Además, el efecto antialimentario se ha registrado en varias especies de insectos, lo que significa un deterioro en la alimentación primaria y secundaria del insecto, con el aumento de su mortalidad (Koul y Wahab, 2004).

Aunque los áfidos son menos susceptibles al efecto antialimentario primario por la AZA, el efecto fisiológico ocurre y se manifiesta con una reducción de la reingesta (efecto antialimentario secundario) (Nisbet *et al.*, 1993; Koul y Wahab, 2004). En el presente estudio se observó que la mortalidad de *A. gossypii* aumentó con el tiempo y con la cantidad de AZA. La mortalidad se incrementó con la dosis en todos los tiempos de observación, con los valores más altos de mortalidad promedio (74 y 75 %) a las 72 h, con 0.02 y 0.2 mg de AZA (Cuadro 3).

En la interacción significativa dosis extracto, la mortalidad ocasionada por los extractos metanólico y acuoso también se aumenta con la dosis, aunque no fue así en los extractos hexánico y oleoso cuyo efecto decayó en la mayor dosis (Cuadro 4). En el extracto hexánico hubo una baja mortalidad con un valor promedio (31 %) en la dosis intermedia (0.02 mg AZA) y mayor (61 %) para el extracto oleoso. Con la dosis más alta (0.2 mg AZA) todos los extractos mostraron valores de mortalidad significativamente diferentes, con 88 % para el metanólico, seguido por el oleoso, acuoso y hexánico. Con las dosis de 0.01 y 0.02 mg de AZA se observaron dos grupos: con alta mortalidad el oleoso y metanólico, y con baja el acuoso y hexánico.

($p < 0.0001$) and the dose of AZA ($p \leq 0.0001$) had significant effects on mortality. However, due to the significant interactions found, it was necessary to analyze the simple effects for each interaction.

The interaction dose time is explained by the foreseen scant mortality in the control (0.0 mg AZA) during the three observation periods, whereas in the other doses the mortality increases with time (Table 3). The mortality of *A. gossypii* increases as much as by increasing the dose and the time, except in the highest dose of the methanolic extract, where its maximum mortality is reached from 48 h, which is possibly due to the fact that the highest dose of AZA could have entered the active site more rapidly thanks to the solvent, being able to perturb the development of the melon aphid since one day before. Furthermore, the antifeeding effect has been registered in various species of insects, which means a decline in the primary and secondary feeding of the insect, with the increase of its mortality (Koul and Wahab, 2004).

Although the aphids are less susceptible to the primary antifeeding effect from the AZA, the physiological effect occurs and is manifested with a reduction of the re-ingest (secondary antifeeding effect) (Nisbet *et al.*, 1993; Koul and Wahab, 2004). In the present study it was observed that the mortality of *A. gossypii* increased with time and with the amount of AZA. Mortality was increased with dose in all of the observation times, with the highest average mortality values (74 and 75 %) at 72 h, with 0.02 and 0.2 mg of AZA (Table 3).

In the significant interaction dose extract, the mortality caused by the methanolic and aqueous extracts also increased with the dose, although

Cuadro 3. Mortalidad promedio (\pm error estándar) de todos los extractos de neem sobre *Aphis gossypii* Glover para cuatro dosis de AZA y tres tiempos de exposición (interacción dosis tiempo).

Table 3. Mean mortality (\pm standard error) of all of the neem extracts against *Aphis gossypii* Glover for four doses of AZA and three exposure times (interaction dose time).

| Tiempo (h) | Dosis de azadiractina (mg) | | | |
|------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | 0.01 | 0.02 | 0.2 |
| 24 | 0.00 \pm 0.00 a | 0.16 \pm 0.04 c | 0.22 \pm 0.05 c | 0.33 \pm 0.07 c |
| 48 | 0.02 \pm 0.01 a | 0.36 \pm 0.07 b | 0.43 \pm 0.08 b | 0.49 \pm 0.08 b |
| 72 | 0.09 \pm 0.03 a | 0.61 \pm 0.06 a | 0.74 \pm 0.05 a | 0.75 \pm 0.05 a |
| | p=0.26 | p \leq 0.0001 | p \leq 0.0001 | p \leq 0.0001 |

a,b, c: Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ Means with different letters in a column are significantly different ($p \leq 0.05$).

Cuadro 4. Mortalidad promedio (\pm error estándar) de todos los tiempos de exposición sobre *Aphis gossypii* Glover para cuatro dosis de AZA y cuatro tipos de extractos de semilla con endocarpio de *Azadirachta indica* A. Juss. (interacción dosis extracto).

Table 4. Mean mortality (\pm standard error) of all the exposure times on *Aphis gossypii* Glover for four doses of AZA and four types of extracts of seed-endocarp of *Azadirachta indica* A. Juss. (interaction dose extract).

| Tipo de extracto | Dosis de azadiractina (mg) | | | |
|------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 0 | 0.01 | 0.02 | 0.2 |
| Oleoso | 0.04 \pm 0.03 a | 0.48 \pm 0.09 a | 0.61 \pm 0.09 a | 0.57 \pm 0.07 b |
| Acuoso | 0.04 \pm 0.03 a | 0.22 \pm 0.06 b | 0.32 \pm 0.07 b | 0.41 \pm 0.08 c |
| Hexánico | 0.04 \pm 0.03 a | 0.28 \pm 0.06 b | 0.31 \pm 0.08 b | 0.23 \pm 0.06 d |
| Metanólico | 0.04 \pm 0.03 a | 0.54 \pm 0.09 a | 0.61 \pm 0.09 a | 0.88 \pm 0.05 a |
| | p=1.0 | p \leq 0.0001 | p \leq 0.0001 | p \leq 0.0001 |

a,b,c,d: Medias con diferente letra en una columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) ♦ a, b, c, d: Means with different letter are significantly different ($p \leq 0.05$).

La mortalidad ocasionada por el extracto oleoso no se puede considerar satisfactoria para plaguicidas comerciales; quizás por eso el NIIR Board (2004) lo señala como inactivo en el pulgón del melón a pesar de tener una proporción importante de AZA. Con la extrusión simple el extracto oleoso tuvo 422 ppm de AZA, una concentración mayor a la lograda por extractos oleosos derivados de procesos por bipartición vía solvente, como el aceite comercial de neem TB 184® (lote: 3027), que al ser analizado de forma paralela en este estudio presentó únicamente 160 ppm de AZA. Quizás se deba a que durante los procesos de extracción que inician con el exprimido de la semilla (Lidert *et al.*, 1995; Sanguanpong, 2003), la AZA arrastrada no se recupera posteriormente.

La mortalidad más alta promedio de los tres tiempos de observación (88 %) se presentó en la dosis mayor de AZA (0.2 mg) del extracto metanólico, la cual fue significativamente diferente de los demás extractos. La mortalidad por cada tiempo de observación (Figura 1D) es cercana a 100 % desde las 48 h y significativamente diferente ($p \leq 0.0001$) al resto de los extractos; lo mismo ocurre a las 72 h ($p \leq 0.004$). La mayor mortalidad del extracto metanólico puede atribuirse a su alto contenido de AZA, además, este extracto contiene a los ácidos palmítico, esteárico, oleico y linoleico (Kaushik y Vir, 2000) producto de la extrusión de la semilla, componentes oleosos que, conjuntamente con el metanol, podrían extraer otros activos importantes de la semilla y del endocarpio, como nimbina, salanina, nimbidina y otros limonoides (Bahena-Juárez y García-Chávez, 2007). Dichos

this did not occur in the hexanic and oily extracts whose effect decreased in the highest dose (Table 4). In hexanic extract there was low mortality with an average value (31 %) in the intermediate dose (0.02 mg AZA) and high (61 %) for the oily extract. With the highest dose (0.2 mg AZA), all of the extracts showed significantly different mortality values, with 88 % for the methanolic, followed by the oily, aqueous and hexanic extracts. With the dose of 0.01 and 0.02 mg of AZA, two groups were observed: with high mortality in the oily and methanolic extracts, and low in the aqueous and hexanic extracts.

The mortality caused by the oily extract cannot be considered satisfactory for commercial pesticides; perhaps for this reason the NIIR Board (2004) designates it as inactive in the melon aphid despite having an important proportion of AZA. With the simple cold press the oily extract had 422 ppm of AZA, a concentration higher than that obtained by oily extracts derived by bipartition process via solvent, such as the commercial neem oil TB 184® (lot: 3027), which upon parallel analysis in this study presented only 160 ppm of AZA. Perhaps this is due to the fact that during the extraction processes that begin with the pressing of the seed (Lidert *et al.*, 1995; Sanguanpong, 2003), the carried AZA is not recovered afterwards.

The highest average mortality of the three observation times (88 %) appeared in the highest dose of AZA (0.2 mg) of the methanolic extract, which was significantly different from the other extracts. The mortality for each observation time (Figure 1D)

compuestos oleosos también pudieron fungir como agentes penetrantes que mejoran el desempeño insecticida (Stark y Walter, 1995).

Aunque *A. gossypii* fue expuesto a las mismas dosis de AZA hubo diferencias significativas en la mortalidad entre extractos, lo cual fue observado por Gauvin *et al.* (2003) y Kumar *et al.* (2003), quienes señalan que no hay una relación proporcional entre la cantidad de AZA y el efecto insecticida. Estas diferencias en la mortalidad en *A. gossypii* podrían resultar de la presencia en diferentes concentraciones de compuestos bioactivos de la semilla y el endocarpio, como salanina, nimbina (Mitchell *et al.*, 1997) y azadiractol (Malathi *et al.*, 2002), que pueden modificar el efecto insecticida. Además, los ácidos grasos de la semilla pueden actuar en sinergia con la AZA (Kurose y Yatagai, 2005) en la mortalidad de *A. gossypii*. Este punto de vista ha redirigido la investigación e industrialización de la AZA hacia el aprovechamiento integral del extracto de neem con la inclusión de salanina, nimbina y otros compuestos de la fracción oleosa de la semilla. Por lo anterior, se comparte la opinión de Gauvin *et al.* (2003), quienes enfatizan la importancia de evaluar la actividad insecticida de cada extracto de neem considerado como un complejo de ingredientes activos, lo que supera la visión de considerar únicamente al contenido de AZA.

El proceso de extrusión en frío con metanol produce un extracto con mayor contenido de AZA y mayor efecto insecticida, prometedor para su escalamiento industrial. El efecto insecticida de los extractos oleoso, acuoso y metanólico sobre *A. gossypii* concuerda con resultados de ensayos realizados por Dos Santos *et al.* (2004) y NIIR Board (2004). Los extractos oleoso y acuoso sólo causaron una moderada mortalidad en *A. gossypii*, lo que junto con su baja concentración de AZA podría limitar su utilización industrial.

Efecto fitotóxico de los extractos de neem en *Ixora coccinea*

Los extractos acuoso, metanólico y hexánico se calificaron como sin efecto fitotóxico al no presentar daños en las hojas a las 72 h. El extracto oleoso fue el único que produjo lesión de 35 % \pm 0.63 en la hoja de *I. coccinea*. El daño ocasionado fue una necrosis de forma irregular en la hoja y equivalente al nivel 5 de fitotoxicidad, lo cual se considera una limitante para su uso como bioinsecticida.

is close to 100 % after 48 h and significantly different ($p \leq 0.0001$) from the rest of the extracts; the same occurs at 72 h ($p \leq 0.004$). The highest mortality of the methanolic extract can be attributed to its high AZA content; furthermore, this extract contains palmitic, stearic, oleic and linoleic acids (Kaushik and Vir, 2000), product of the extrusion of the seed, oily components which along with methanol, could extract other important actives of the seed and of the endocarp, such as nimbin, salannin, nimbidin and other limonoids (Bahena-Juárez and García-Chávez, 2007). These oily compounds can also act as penetrating agents that improve the insecticidal activity (Stark and Walter, 1995).

Although *A. gossypii* was exposed to the same doses of AZA, there were significant differences in the mortality among extracts, which was observed by Gauvin *et al.* (2003) and Kumar *et al.* (2003), who point out that there is not a proportional relationship between the amount of AZA and the insecticidal effect. These differences of mortality in *A. gossypii* could result from the presence in different concentrations of bioactive compounds of the seed and the endocarp, such as salannin, nimbin (Mitchell *et al.*, 1997) and azadirachtol (Malathi *et al.*, 2002), that can modify the insecticidal effect. In addition, the fatty acids of the seed can act in synergy with the AZA (Kurose and Yatagai, 2005) in the mortality of *A. gossypii*. This viewpoint has redirected the investigation and industrialization of AZA toward the integral use of the neem extract with the inclusion of salannin, nimbin and other compounds of the oily fraction of the seed. Therefore, we share the opinion of Gauvin *et al.* (2003), who emphasize the importance of evaluating the insecticidal activity of each neem extract considered as a complex of active ingredients, which surpasses the vision of considering only the AZA content.

The cold press with methanol process produces an extract with a higher AZA content and stronger insecticidal effect, which is promising for industrial purposes. The insecticidal effect of the oily, aqueous and methanolic extracts on *A. gossypii* agrees with results of assays made by Dos Santos *et al.* (2004) and NIIR Board (2004). The oily and aqueous extracts only caused moderate mortality in *A. gossypii*, which along with their low AZA concentration could limit their industrial use.

CONCLUSIONES

El proceso de extracción en frío con metanol de la semilla molida con endocarpio de *Azadirachta indica* A. Juss., concentró más azadiractina que los otros procesos. Además produjo el mayor efecto insecticida en *Aphis gossypii* Glover, sin causar fitotoxicidad asociada en *Ixora coccinea* L.

El extracto oleoso de *A. indica* produjo una mortalidad menor que el extracto metanólico y ocasionó un efecto fitotóxico en hojas de *I. coccinea*. Tanto el extracto acuoso como el hexánico contuvieron menos azadiractina que el extracto metanólico y su actividad insecticida fue menor.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, del Colegio de Postgraduados, y de los investigadores Héctor Debernardi De la Vequia, Rebeca Peña Martínez y Juan Villanueva Barradas†.

LITERATURA CITADA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. 963.15-Fat in cacao products. In: Helrich, K. (ed). Soxhlet Extraction Method Final Action 1973. Office International du Cacao et du Chocolat-AOAC Method. Official Methods of Analysis 2: 770-771.
- Bahena-Juárez, F., y A. García-Chávez. 2007. Compuestos activos mayoritarios de chilcuage y nim, dos alternativas para el manejo de plagas en una agricultura sostenible. In: López O., J. F., A. Aragón G., C. Rodríguez H., y M. Vázquez G. (eds). Agricultura Sostenible - Sustancias Naturales contra Plagas. Vol. 3. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México. pp: 24-31.
- D'Andrea, A., D. Ferri, O. Maccioni, S. A. Van der Esch, and F. Vitali. 1994. Applications of SFE technology to the extraction of active substances from *Azadirachta indica* A. Juss. seeds. In: Kleeburg, H. (ed). Practice Oriented Results on the Use and Production of Neem-Ingredients and Pheromones. Druck und Graphic, Giessen, Germany. pp: 115-123.
- Dos Santos, T. M., N. P. Costa, A. L. Torres, and A. L. B. Junior. 2004. Effect of neem extract on the cotton aphid. Pesquisa Agropecuaria Bras. 39(11): 1071-1076.
- Gauvin, M. J., A. Bélanger, R. Nébié, et G. Boivin. 2003. *Azadirachta indica* A. Juss.: l'azadirachtine est-elle le seul ingrédient actif? Phytoprotection 84(2): 115-119.
- Hernández-Castro, E., V. Utrera L., J. A. Villanueva-Jiménez, D. A. Rodríguez-Lagunes, y M. M. Ojeda-Ramírez. 2005. Extractos de neem en el comportamiento de *Aphis nerii* Boyer y la transmisión del virus de la mancha anular del papayo. J. Agr. U. Puerto Rico 89(1-2): 75-84.

Phytotoxic effect of neem extracts in *Ixora coccinea*

The aqueous, methanolic and hexanic extracts were qualified as without phytotoxic effect after no damage appeared in leaves at 72 h. The oily extract was the only one that produced lesions on 35 % \pm 0.63 of the leaf of *I. coccinea*. The damage caused was a necrosis of irregular shape in the leaf, equivalent to level 5 toxicity, which is considered a limitation for its use as a bioinsecticide.

CONCLUSIONS

The cold press extraction process with methanol of the ground seed-endocarp of *Azadirachta indica* A. Juss., concentrated more azadirachtin than the other processes. Furthermore, it produced the highest insecticidal effect in *Aphis gossypii* Glover, without causing associated phytotoxicity in *Ixora coccinea* L.

The oily extract of *A. indica* produced a lower mortality than the methanolic extract and caused a phytotoxic effect in leaves of *I. coccinea*. Both the aqueous and the hexanic extract contained less azadirachtin than the methanolic extract, and their insecticidal activity was lower.

—End of the English version—

---*---

- Imenes, S. D. L., E. C. Bergmann, A. L. B. G. Peronti, S. Ide, and J. E. R. Martins. 2002. Aphids (Hemiptera: Aphididae) and their parasitoids (Hymenoptera) on *Ixora* spp. (Rubiaceae) in the States of Bahia and São Paulo, Brazil - formal records of interactions. Arq. Instituto Biol. de São Paulo 69(4): 55-64.
- Kaushik, N., B. G. Singh, U. K. Tomar, S. N. Naik, S. Vir, S. S. Bisla, K. K. Sharma, S. K. Banerjee, and P. Thakkar. 2007. Regional and habitat variability in azadirachtin content of Indian neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Curr. Sci. India 92(10): 1400-1406.
- Kaushik, N., and S. Vir. 2000. Variations in fatty acid composition of neem seeds collected from the Rajasthan state of India. Biochem. Soc. T. 28(6): 880-882.
- Khalequzzaman, M., and J. Nahar. 2008. Relative toxicity of some insecticides and azadirachtin against four crop infesting aphid species. U. J. Zool. Rajshahi U. 27: 31-34.
- Koul, O. 1999. Insect growth regulating and antifeedant effects of neem extracts and azadirachtin on two aphid species of ornamentals plants. J. Bioscience 24(1): 85-90.

- Koul, O., and S. Wahab. 2004. *Neem: Today and in the New Millennium*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 276 p.
- Kumar, A. R. V., H. C. Jayadevi, H. J. Ashoka, and K. Chandrashekhara. 2003. Azadirachtin use efficiency in commercial neem formulations. *Curr. Sci. India* 84(11): 1459-1464.
- Kurose, K., and M. Yatagai. 2005. Components of the essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss., *Azadirachta siamensis* Velt., and *Azadirachta excelsa* (Jack) Jacobs and their comparison. *J. Wood Sci.* 51(2): 185-188.
- Larson, R. O. 1985. Stable anti-pest neem seed extract. US Patent 4,556,562.
- Lidert, Z., C. G. Overberger, and J. S. Clovis. 1995. Preparation of high purity neem seed extracts. US Patent 5,420,318.
- Lowery, D. T., and M. B. Isman. 1996. Inhibition of aphid (Homoptera: Aphididae) reproduction by neem seed oil and azadirachtin. *J. Econ. Entomol.* 89(3): 602-607.
- Malathi, R., S. S. Rajan, G. Gopalakrishnan, and G. Suresh. 2002. Azadirachtol, a tetranortriterpenoid from neem kernels. *Acta Crystallogr. C* 58(12): 708-710.
- Mitchell, M. J., S. L. Smith, S. Johnson, and E. D. Morgan. 1997. Effects of the neem tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desacetylbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 35(1-2): 199-209.
- Moorthy, S. R., and A. D. Kumar. 2004. Natural azadirachtin composition. US Patent 6,733,802.
- Nieto, A. D., M. Acosta, M. Valencia, y G. Mena. 2001. Estudios de efectividad biológica de fungicidas. *In: Bautista, N., y O. Díaz (eds). Bases para Realizar Estudios de Efectividad Biológica de Plaguicidas*. Texcoco, México. pp: 111-112.
- NIIR Board. 2004. *Handbook on Neem and Allied Products*. National Institute of Industrial Research. New Delhi, India. 478 p.
- Nisbet, A. J., J. A. T. Woodford, R. H. C. Strang, and J. D. Connolly. 1993. Systemic antifeedant effects of azadirachtin on the peach-potato aphid *Myzus persicae* Sulzer. *Entomol. Exp. Appl.* 68(1): 87-98.
- Nisbet, A. J., J. A. T. Woodford, and R. H. C. Strang. 1994. The effects of azadirachtin-treated diets on the feeding behaviour and fecundity of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* Sulzer. *Entomol. Exp. Appl.* 71(1): 65-72.
- Pattnaik, S. J., N. D. R. Roa, and P. Chary. 2006. Ecomorphometric markers reflect variations in azadirachtin-A content of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) in select regions of Andhra Pradesh, India. *Curr. Sci. India* 91(5): 628-636.
- Pérez-Rivera, R. A. 2000. La cruz de malta (*Ixora coccinea* L.): planta importante para las aves urbanas de Puerto Rico. *El Pitirre* 13(1): 23-24.
- Ramesh, A., and M. Balasubramanian. 1999. Rapid preconcentration method for the determination of azadirachtin-A and -B, nimbin and salannin in neem oil samples by using graphitised carbon solid phase extraction. *Analyst* 124: 19-21.
- Sanguanpong, U. 2003. A case study of RIT-pilot plant for Thai neem-based extract processing: from research in BRD to small-scale industrial production in Thailand. *J. Agric. Rural Develop. Tropics and Subtropics Suppl.* 80: 168-179.
- SAS Institute Inc. 1999. The logistic procedure. Chapter 39. *In: SAS OnlineDoc™ Version 8*. SAS Institute. Cary, North Carolina. 2042 p.
- Schmutterer, H. 1985. Which insect pests can be controlled by application of neem seed kernel extracts under field conditions? *Z. Angew. Entomol.* 100: 468-475.
- Schneider, B. H., and K. Ermel. 1987. Quantitative determination of azadirachtin from neem seeds using high performance liquid chromatography. *In: Proc. 3rd Int. Neem Conf. Nairobi, Kenya*. pp: 161-170.
- Schroeder, R. D., and K. Nakanishi. 1987. A simplified isolation procedure for azadirachtin. *J. Nat. Prod.* 50(2): 241-244.
- Sharma, V., S. Walia, J. Kumar, M. G. Nair, and B. S. Parmar. 2003. An efficient method for the purification and characterization of nematocidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. *J. Agric. Food Chem.* 51(14): 3966-3972.
- Siddiqui, B. S., F. Afshan, S. Faizi, S. N. H. Naqvi, and R. M. Tariq. 2002. Two new triterpenoids from *Azadirachta indica* A. Juss. and their insecticidal activity. *J. Nat. Prod.* 65(8): 1216-1218.
- Silva Flores, M. A., J. C. Rodríguez Maciel, O. Díaz Gómez, y N. Bautista Martínez. 2005. Efectividad biológica de un derivado de ácido graso para el control de *Macrosiphum rosae* L. (Homoptera: Aphididae) y *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Agrociencia* 39(3): 319-325.
- Stark, J. D., and J. F. Walter. 1995. Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 43(2): 507-512.
- Villanueva-Jiménez, J. A., H. Sánchez A., A. Lagunes T., F. Romero R., y R. Rodríguez M. 1992. DL₅₀ y proporción de resistencia a insecticidas en *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphidae), en dos zonas chileras de México. *Agrociencia serie Protección Vegetal* 3(1): 69-77.