

Extractos fermentados de hojas de *Azadirachta indica* A. Juss para el combate de insectos plaga

Effects of fermented Azadirachta indica A. JUSS leaves extracts on insect control

LILIANA CAROLINA CÓRDOVA-ALBORES¹, RODOLFO TORRES DE LOS SANTOS¹, MARÍA DE LOURDES ADRIANO-ANAYA¹, RODOLFO FLORES-GARCÍA² Y MIGUEL SALVADOR-FIGUEROA^{1*}

¹Centro de Biotecnología. Universidad Autónoma de Chiapas. Carretera a Puerto Madero Km 2.0. Tapachula, Chiapas. México. Tel y Fax (962) 6427972

²Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas, Campus IV, Huehuetán, Chiapas, México.

*Autor para correspondencia: Correo-e: msalvad@hotmail.com

RECIBIDO EL 31 DE MARZO DE 2013 / ACEPTADO EL 8 DE MAYO DE 2013

RESUMEN

La actividad insecticida del Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) es efectiva en el control de plagas que afectan cultivos de importancia agroindustrial. Aunque las formulaciones comercialmente disponibles extraen el aceite contenido en las semillas del árbol. En estudios preliminares, extractos crudos de las hojas mostraron capacidad insecticida. Este trabajo evaluó la capacidad insecticida de extractos fermentados de hojas de Neem localizados en Tapachula Chiapas saturadas de estiércol vacuno en proporción 1:4 p:v del rancho "El Manguito" ubicado en el Km. 10 de la carretera Panamericana con la finalidad de potenciar los principios activos de las hojas. Las soluciones de estiércol empleadas (fuente de microbiota exógena) fueron sin diluir, dilución 1:2, dilución 1:4 y sin estiércol. Las mezclas se fermentaron aeróbicamente como anaeróbicamente por 72h con agitación de 200 rpm y a 28°C. Antes y después de la fermentación, se determinó pH, conductividad eléctrica, sólidos solubles y presencia de terpenoides. Los extractos se aplicaron a plantas de maíz previa dilución 1:1. Al diluir la fuente de microbiota exógena, la CE y los SS disminuyeron independientemente de la aireación. El pH inicial fue básico pero se tornó más ácido al final al emplear una menor cantidad de inóculo; pero en mezclas no inoculadas el pH final fue básico. Los terpenoides aumentaron en mezclas fermentadas aeróbicamente. Durante la aplicación de los tratamientos la población de insectos se agrupó en 6 órdenes y 15 familias. El mejor tratamiento de fermentación anaeróbica fue la mezcla de hojas con inóculo sin diluir.

Palabras clave: bioinsecticida, neem, fermentación, maíz.

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la agricultura se ha tenido la necesidad de controlar a los insectos. A través del tiempo se han desarrollado métodos para controlar la población de estos organismos y evitar los daños a los cultivos. Hasta hace pocos años el control mediante sustancias químicas sintetizadas en el laboratorio fue el más popular; sin embargo, su inespecificidad y uso discriminado ha provocado la aparición de mecanismos de resistencia en las plagas, problemas de contaminación ambiental, residuos tóxicos en el producto cosechado, aparición de nuevas plagas,

ABSTRACT

The insecticidal activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) is effective in controlling pests that affect important agroindustrial crops. Although the commercially available formulations use the oil extracted from the seeds of the tree, in preliminary studies, crude extracts of the leaves showed insecticidal capacity. This study evaluated the insecticidal capacity of fermented extracts from Neem leaves located in Tapachula, Chiapas, saturated with cattle manure in proportion 1:4 w:v obtained from the ranch "The Little Mango" located on Km 10 of the Panamerican Highway in order to enhance the active principles of the leaves. Manure solutions employed (microbiota exogenous source) were undiluted, dilution 1:2, dilution 1:4 and without manure. The mixtures were fermented aerobically and anaerobically for 72 hours with stirring at 200 rpm and 28 °C. Before and after fermentation, the pH, electrical conductivity, and presence of soluble solids and terpenoids were determined. Extracts were applied to corn plants after dilution 1:1. By diluting the source of exogenous microbiota, the EC and the SS decreased independently from the aeration system. The initial pH was basic but became more acid at the end when using a smaller amount of inoculum; but in not inoculated mixtures, the final pH was basic. The terpenoids increased in aerobically-fermented mixtures. During the application of treatments, the insect population grouped into six orders and 15 families. The best treatment in anaerobic fermentation was the mixture of leaves with undiluted inoculum.

Keywords: bio-insecticide, neem, fermentation, corn.

eliminación de la entomofauna benéfica e intoxicación del operador (Vargas-Arispuro, 2007). Las exigencias de inocuidad en los alimentos para la población exigen el desarrollo de tecnologías sustentables y que no impacten negativamente al ambiente. El control biológico, el cual incluye el uso de microorganismos, hongos, bacterias (Fernández-Larrea, 1999), parasitoides (Aristizábal, Bustillo, Orozco y Chávez, 1998), organismos depredadores (Cano, 2001), feromonas (Andrade, Rodríguez y Oehlschlager, 2000) y extractos vegetales (Guharay, Aguilar, Calderón, Gómez, Mendoza, Monterrey, Monterroso y Staver, 2004), no pretende sustituir a los plaguicidas

químicos, pues es un componente del manejo integrado de plagas (Vargas-Arispuro, 2007).

Las plantas de ajo (*Allium sativum*), cebolla (*Allium cepa*), cola de caballo (*Equisetum arvense*), orégano (*Origanum vulgare*), entre otros, contienen ingredientes activos que se han utilizado para el control de bacterias, hongos e insectos plaga (Chalfoun y Carvalho, 1991; Barros, Oliveira y Maia, 1993; Clemente, Mareggiani, Broussalis, Martino y Ferraro, 2000; Viñuela, Hándel y Vogt, 1996).

En los últimos años se han realizado diversos estudios aplicando extractos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) obtenidos por diferentes técnicas, tales como el extracto acuoso de semillas, aceite crudo por prensado de semillas, extracción de aceite de semillas con solventes, torta de neem que resulta del desecho del prensado de semillas, extracción alcohólica, remojo de hojas. Se han identificado 25 diferentes ingredientes activos, de los cuales al menos nueve afectan el crecimiento y el comportamiento de los insectos (Carballo y Guharay, 2004; Angulo, Gardea, Vélez, García, Carrillo, Cháidez y Partida, 2004). Estos extractos tienen como ventaja ser biodegradables (Iannacone y Montoro, 1999; Iannacone y Reyes, 2001) y no tienen restricciones toxicológicas (Gomero, 2000; Iannacone y Murrugarrá, 2000; Sutherland, Baharally y Permaul, 2002). En el mercado existen formulaciones: AZA Direct® de Gowan Company, Agroneem® de Agro Logistic System, Inc, Amazin 3% EC® de AMVAC Chemical Corporation, Neem Azal T/S®, entre otros, que contienen aceite de neem y que han sido utilizados en la agricultura orgánica, aunque su costo es elevado.

En este sentido, Pérez, Padrón, Soto y Bertsch (1997) utilizaron el extracto crudo de semillas contra *Acanthoscelides obtectus*. Encontraron de 4-7% de infestación en semillas de frijol almacenadas a diferencia del testigo que resultó 100% infestado. Iannacone y Reyes (2001), utilizando el aceite comercial extraído a partir de semillas de neem para el control de *Bemisia tabaci* y *Liriomyza huidobrensis*, encontraron una alta efectividad bioinsecticida contra *Bemisia tabaci*. Pietroseoli, Olavez, Montilla y Campos (1999) emplearon hojas de neem para el control de nemátodos intestina-

les de bovinos y concluyeron que es factible la utilización de dichas hojas como un controlador de endoparásitos de bovinos.

Estos trabajos han demostrado la capacidad bioinsecticida, pero no existen antecedentes de estudios en busca de un sistema potenciador de los principios activos del neem, por lo que consideramos que la biotransformación microbiana pudiera ser un sistema mediante el cual la propiedad plaguicida del extracto de hojas de neem se pudiera potenciar y con ello mejorar la capacidad controladora de insectos plagas del neem.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la biofermentación de macerados acuosos de hojas de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre su capacidad insecticida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los extractos

Material biológico

Se emplearon hojas maduras de árboles de neem localizados en la zona sur de la ciudad de Tapachula, Chiapas, y estiércol fresco de ganado vacuno del rancho “El Manguito”, ubicado en el Km 10 de la carretera Panamericana.

Diseño experimental

Los tratamientos de fermentación fueron establecidos con un diseño factorial, donde los factores fueron la concentración del inóculo y el tipo de fermentación (Cuadro 1), dando un total de 8 tratamientos.

Cuadro 1. Descripción del diseño factorial y los tratamientos utilizados

Concentración de inóculo	Tipo de fermentación	Tratamiento	Designación
1 V:V	Anaerobio	1	TAN1
	Aeróbico	2	TAE1
0.5 V:V	Anaerobio	3	TAN2
	Aeróbico	4	TAE2
0.25 V:V	Anaerobio	5	TAN3
	Aeróbico	6	TAE3
0 V:V	Anaerobio	7	TAN4
	Aeróbico	8	TAE4

Preparación del inóculo

El inóculo microbiano se obtuvo de una suspensión saturada de estiércol. Para ello, en un recipiente limpio (10 L) se colocó agua destilada (8 L) y con agitación constante se agregó el estiércol fresco lentamente hasta obtener una suspensión saturada. Los residuos sólidos se separaron mediante tamizado a través de una malla de 44 μm . El líquido resultante se empleó como fuente de microbiota (inóculo).

Preparación de los extractos de hojas de neem

Se prepararon diferentes diluciones del inóculo, 1:0 (sin diluir), 1:2, 1:4 y 0 (agua destilada, testigo). Posteriormente, a 4 L de cada una de las diluciones se le agregó 1 Kg de hojas frescas de neem. Finalmente, las mezclas se maceraron en una licuadora comercial. Se separaron los sólidos con una malla de 44 μm y el líquido se empleó para el proceso de fermentación.

Condiciones de fermentación

La fermentación aeróbica y anaeróbica se realizó en matraces de 500 mL de volumen nominal. Para la fermentación aeróbica se utilizaron 150 mL del extracto, mientras que para la fermentación anaeróbica se emplearon 450 mL. Las fermentaciones se realizaron en agitación constante (200 rpm) y a 28 °C durante 72 h (Montes-Molina, 2003).

Conductividad eléctrica (CE), sólidos solubles (SS) y pH en los extractos

Los sólidos solubles presentes en los extractos fueron cuantificados por evaporación, a sequedad, del líquido en una estufa a 100 °C. La CE y el pH de las soluciones fue determinado con el empleo de un conductímetro (Hanna®). Las determinaciones se realizaron tanto al inicio como final de la fermentación. Todos los parámetros se midieron por triplicado.

Cromatografía de capa fina (TLC)

Para determinar el efecto del proceso de fermentación sobre la presencia de triterpenos, los componentes de los extractos se sometieron a una separación por TLC, antes y después de la fermentación. Inicialmente, cada extracto se tamizó en una malla de 841 μm y la fase

líquida se centrifugó a 10,000 rpm durante 2.5 minutos. Los sobrenadantes se colocaron en microtubos (1.5 mL) y se concentraron en un speed Vaccum al vacío (Concentrator 5301®) durante 90 minutos a 30 °C. A partir del concentrado, se tomaron 5 μL y se colocaron sobre las placas de TLC (placas Whatman® de aluminio con silicagel de 250 μm de tamaño de partícula) con dimensiones de 5x2 cm. La cromatografía se desarrolló empleando como fase móvil una mezcla de hexano-acetato de etilo (20:80 v/v). Las placas ya corridas se revelaron con solución Lieberman-Burchard, el cual forma un complejo colorido exclusivamente con la estructura básica de los terpenos (Merck, 1972). La presencia de bandas se reveló al colocar las placas sobre una superficie caliente (110 °C) (Vargas, 2007).

Evaluación en campo del efecto insecticida de los fermentados

El efecto insecticida de los diferentes fermentados se analizó en un cultivo de maíz durante el periodo febrero-junio de 2008 en una plantación ubicada en la 2ª Sección de la Cebadilla, municipio de Tapachula, Chiapas (coordenadas 14° 50' 81" Norte; 92° 16' 52" Oeste, 85 msnm). Cada tratamiento se aplicó en parcelas de 125 plantas (cinco surcos por parcela y 25 plantas por surco). Como tratamiento testigo se utilizó el compuesto agroquímico Arrivo® utilizado como controlador de insectos plaga en maíz. Las plantas fueron tratadas por las mañanas para evitar el arrastre por el viento a otras parcelas, por aspersión empleando una bomba de mochila con capacidad para 20 L. Los fermentados se diluyeron 1:1, con agua, previo a su uso y el agroquímico se aplicó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La primera aplicación se realizó a la 3ª semana de emergidas las plantas, y posteriormente se aplicó cada 7 días hasta el llenado de las mazorcas. La aplicación de los tratamientos siguió una distribución en un diseño completamente al azar.

La captura de insectos se realizó empleando trampas tipo Malaise modificadas. Para ello, se empleó un recipiente pintado de color negro con dos aberturas a cada extremo.

Por una de ellas se introdujo la planta y por la segunda se capturaron los insectos voladores o reptadores. Debido a que la mayoría de los insectos se mueven hacia arriba atraídos por la luz solar (Cuadros, 2004), éstos fueron atrapados en bolsas transparentes de polietileno. Las trampas fueron colocadas en los tres surcos centrales entre la semana 2 y la semana 6 después de emergidas las plantas. Los insectos capturados se cuantificaron, se conservaron en alcohol al 70% y su identificación se realizó a nivel de familia con el empleo de claves taxonómicas.

Análisis de resultados

Los resultados de CE, pH y SS se realizaron mediante análisis de varianza (ANAVA), y donde existieron diferencias significativas se realizó comparación de medias por el método de Tukey ($\alpha = 0.05$) empleando el programa InfoStat Pro ver 2008. La similitud entre las poblaciones de insectos se analizó mediante el procedimiento de agrupamiento del promedio de grupos de Bray-Curtis, empleando el programa BioDiversity Pro (1997).

RESULTADOS

Características fisicoquímicas

El Cuadro 2 muestra los valores promedio de las variables fisicoquímicas pH, conductividad eléctrica (CE) y sólidos suspendidos (SS), medidas al inicio y al final del proceso de fermentación de los extractos acuosos de hojas de neem de este estudio. Al inicio del proceso de fermentación, el valor de las variables en los tratamientos au-

mentó conforme se incrementó el tamaño del inóculo. Sin embargo, al final de la fermentación esta tendencia únicamente se mantuvo para las variables CE y SS. Respecto a la variable pH, los tratamientos 1 y 2 (aerobiosis) mostraron valores básicos similares con los tratamientos no inoculados 7 y 8 al inicio de la fermentación. En tanto que el resto de tratamientos mostraron valores ácidos de pH. Por su parte, la CE y los SS mostraron similar comportamiento entre ellos, es decir, incrementaron su valor conforme se incrementó el tamaño de inóculo (17.97 y 15.05 veces, respectivamente); de igual modo, el proceso de fermentación favoreció el aumento de los valores de estas variables (12.52 y 1.85 veces para CE en los tratamientos sin inocular y con la mayor cantidad de inóculo, respectivamente; 12.22 y 2.09 veces para SS en los tratamientos sin inocular y con la mayor cantidad de inóculo, respectivamente); por lo que se estableció una correlación directa entre ambas variables. La ecuación que describió tal comportamiento fue $y = 0.4545X + 0.2368$, con un coeficiente (r) de 0.9704. La correlación observada entre la CE y los SS no se encontró entre CE y pH ($r = 0.2111$) ni entre SS y pH ($r = 0.1154$).

Se realizó un análisis bidimensional de las variables estudiadas (Figura 1) y se encontró que las variables pH y CE estuvieron principalmente influenciadas por el proceso de fermentación (aerobiosis o anaerobiosis). Por otro lado, las variables SS y CE variaron respecto a la concentración de inóculo añadido.

Así mismo, el análisis de la varianza de los valores de las variables dependientes estudiadas, permitió observar que, con excepción de la

Cuadro 2. Valores de pH, CE y SS de los diferentes tratamientos

Tratamiento	Condición	pH		Conductividad eléctrica		Sólidos suspendidos	
		Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
1	Aeróbico	8.10 bc	8.36 a	8.11 e	14.89 a	3.51 e	7.44 a
2	Anaeróbico	8.08 bc	7.27 g	8.05 e	13.91 b	3.41 e	6.96 b
3	Aeróbico	7.79 ef	7.63 f	4.30 h	10.02 c	1.94 gh	5.00 c
4	Anaeróbico	7.96 cd	6.30 i	3.96 i	9.14 d	2.07 g	4.73 c
5	Aeróbico	7.80 de	7.41 g	2.47 j	7.19 f	1.65 h	4.16 d
6	Anaeróbico	7.79 def	5.48 j	2.50 j	9.11 d	1.26 i	3.64 e
7	Aeróbico	7.09 h	8.24 ab	0.32 l	5.54 g	0.22j	2.77 f
8	Anaeróbico	7.06 h	8.21 ab	0.57 k	5.71 g	0.24j	2.85 f

Promedio de tres repeticiones. Letras distintas entre variables indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

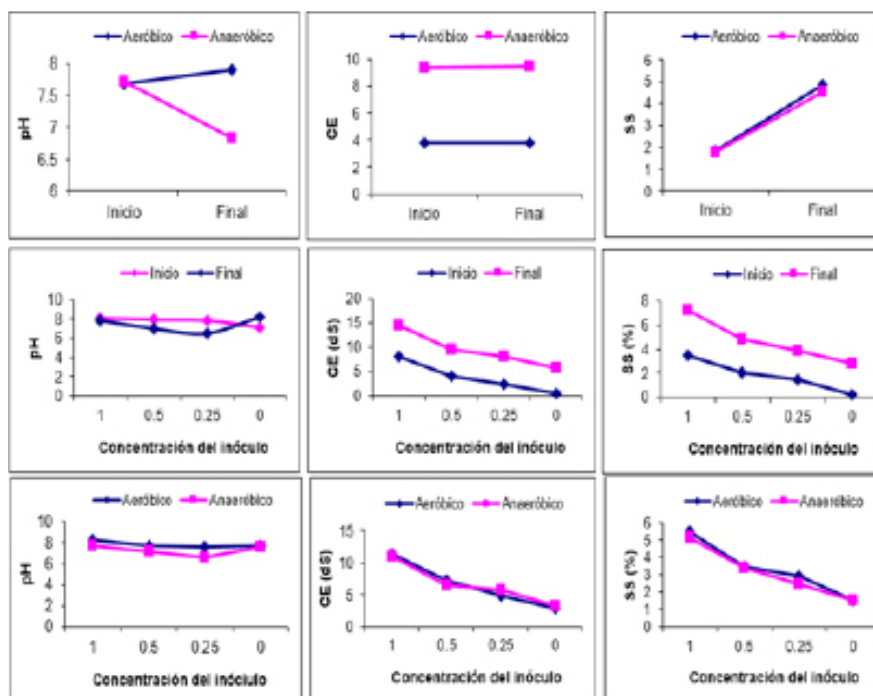


Figura 1. Análisis bidimensional del pH, CE y SS de los diferentes tratamientos.

influencia de la condición de fermentación (aeróbico o anaeróbico) sobre la CE y de la interacción tratamiento-condición-tiempo sobre los SS, las diferencias observadas en los tratamientos fueron altamente significativas (Cuadro 3).

La cromatografía de capa fina (TLC), antes del proceso de fermentación, no reveló diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2). Cada placa cromatográfica revelada mostró la presencia de tres bandas definidas para cada tratamiento, aunque con diferentes RF (datos no mostrados).

El análisis cromatográfico de los diferentes tratamientos, posterior a la fermentación, reveló cambios cuantitativos respecto a la presencia de compuestos triterpenoides (Figura 3). Todos los tratamientos fermentados aeróbicamente mostraron un aumento en el número de bandas cromatográficas, de 3 a 5 bandas. En el caso de los tratamientos fermentados anaeróbicamente, únicamente el tratamiento con la mayor cantidad de inóculo (TAN1) presentó una banda extra, de 3 a 4 bandas.

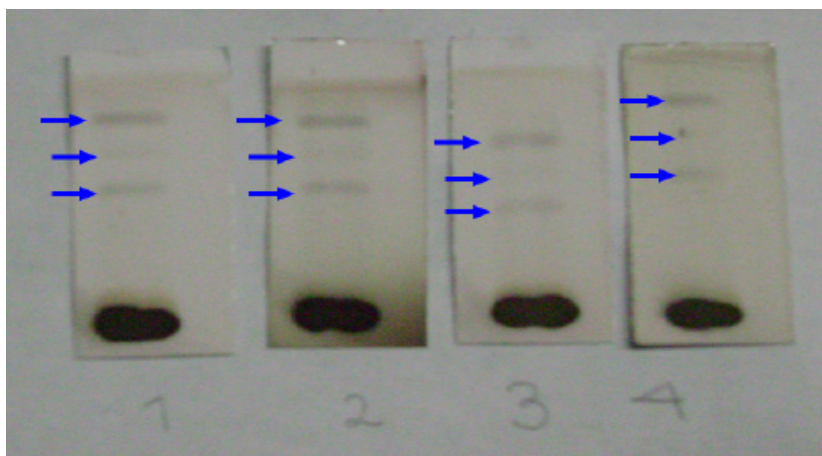


Figura 2. TLC de las mezclas iniciales de los diferentes tratamientos empleados en este estudio. Las flechas indican la presencia de los compuestos triterpenoides. TAE = tratamiento sometido a fermentación aeróbica. TAN = tratamiento sometido a fermentación anaeróbica. 1, 2, 3 y 4 = número de tratamiento.

Cuadro 3. Análisis de la varianza de los valores iniciales y finales del pH, CE y SS en los diferentes tratamientos

pH					
Fuente de variación	SC	gl	CM	F	Valor de p
Tratamiento	4.46	3	1.49	463.69	<0.0001
Condición	3.41	1	3.41	1063.90	<0.0001
Tiempo (inicio y final)	1.43	1	1.43	445.18	<0.0001
Tratamiento * Condición	1.33	3	0.44	138.50	<0.0001
Tratamiento * Tiempo	10.75	3	3.58	1116.77	<0.0001
Condición * Tiempo	3.82	1	3.82	1190.46	<0.0001
Tratamiento * Condición * Tiempo	1.53	3	0.51	158.65	<0.0001
Error	0.10	32	3.2 E-03		
Total	26.84	47			

CE					
Fuente de variación	SC	gl	CM	F	Valor de p
Tratamiento	430.97	3	143.66	31601.91	<0.0001
Condición	2.0 E-03	1	2.0 E-03	0.44	0.5117
Tiempo	357.69	1	357.69	84405.15	<0.0001
Tratamiento * Condición	4.91	3	1.64	359.73	<0.0001
Tratamiento * Tiempo	2.12	3	0.71	155.56	<0.0001
Condición * Tiempo	0.62	1	0.62	5.25	0.0287
Tratamiento * Condición * Tiempo	3.51	3	1.17	257.10	<0.0001
Error	0.15	32	4.5 E-03		
Total	825.37	47			

SS					
Fuente de variación	SC	gl	CM	F	Valor de p
Tratamiento	92.16	3	30.72	2309.02	<0.0001
Condición	0.45	1	0.45	33.87	<0.0001
Tiempo	102.36	1	101.36	7620.71	<0.0001
Tratamiento * Condición	0.46	3	0.15	11.50	<0.0001
Tratamiento * Tiempo	3.04	3	1.01	76.24	<0.0001
Condición * Tiempo	0.13	1	0.13	10.03	0.0034
Tratamiento * Condición * Tiempo	0.11	3	0.04	2.80	0.0555
Error	0.43	32	0.01		
Total	198.13	47			

Efecto del extracto fermentado de hojas de neem en las poblaciones de insectos en el cultivo de maíz

La población de insectos evaluados en el cultivo de maíz tratado con los distintos extractos fermentados de neem estuvo constituida por individuos de 15 familias: *Aleyrodidae*, *Brachonidae*, *Carabidae*, *Cicadellidae*, *Chrysomelidae*, *Coccinellidae*, *Culicidae*, *Formicidae*, *Lampiridae*, *Membracidae*, *Pentatomidae*, *Syrphidae*, *Thripidae*, *Ichneumonidae* y *Vespidae*, y seis órdenes: Co-

leóptera, Díptera, Hemíptera, Homóptera, Himenóptera y Tisanóptera.

El comportamiento inicial y final de la población de insectos se muestra en las Figuras 4-12. Al inicio de los tratamientos, en 67% de las parcelas la familia *Chrysomelidae* fue la más representada.

Al final del estudio, en todos los tratamientos se observó una disminución en el número de individuos de todas las familias, incluyendo al testigo agroquímico. El análisis de los polígonos de distribución (Figuras 4-12) mostró que el

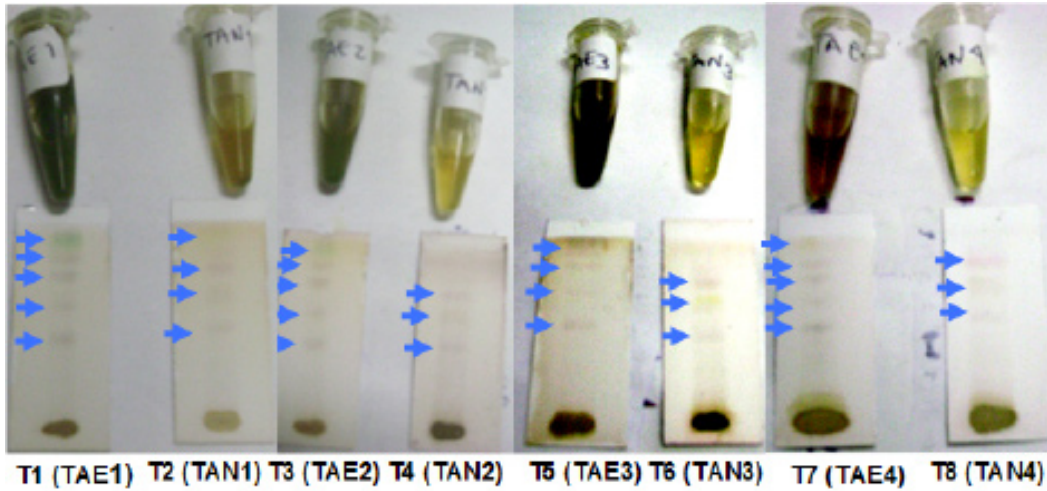


Figura 3. TLC de los diferentes tratamientos después del proceso de fermentación. Las flechas indican la presencia de compuestos triterpenoides. TAE = tratamiento sometido a fermentación aeróbica. TAN = tratamiento sometido a fermentación anaeróbica. 1, 2, 3 y 4. = número de tratamiento.

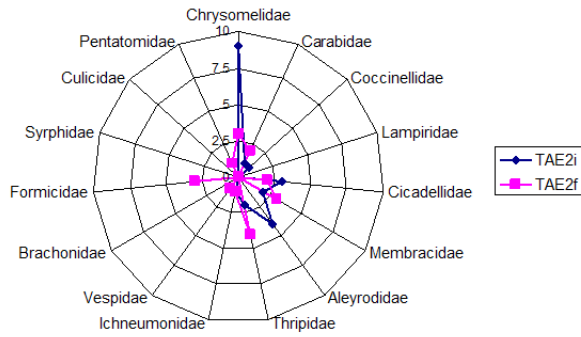


Figura 4. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el fermentado aeróbico de hojas de neem del tratamiento 2.

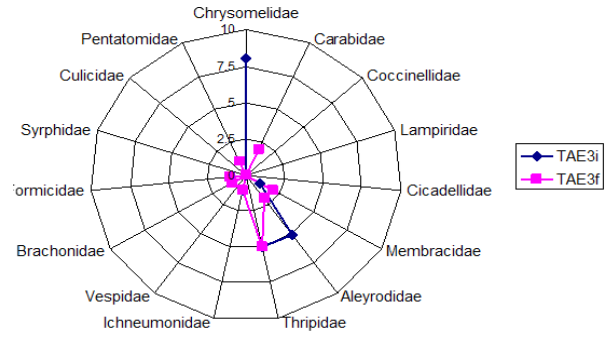


Figura 6. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el fermentado aeróbico de hojas de neem del tratamiento 6.

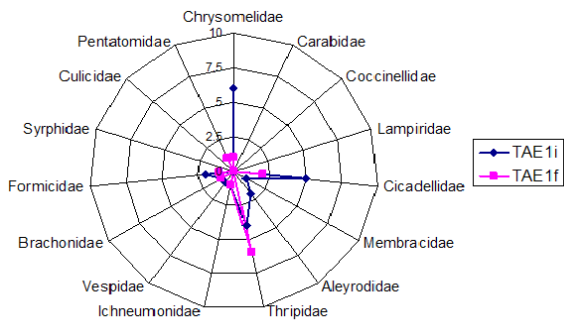


Figura 5. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el fermentado aeróbico de hojas de neem del tratamiento 4.

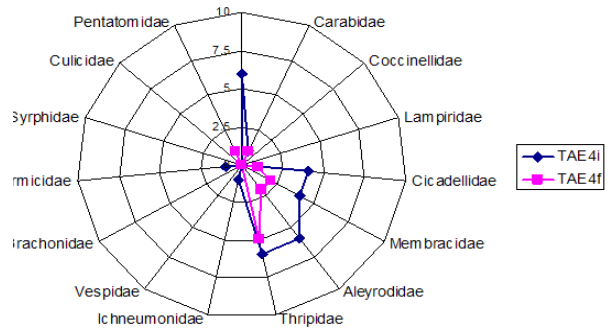


Figura 7. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el fermentado aeróbico de hojas de neem del tratamiento 8.

tratamiento que mejor controló la población de insectos presentes en las parcelas de maíz fue el fermentado anaeróbico con la mayor concentración de inóculo (TAN1). El control de insectos ejercido por este tratamiento fue, incluso, mejor que el realizado por el testigo agroquímico.

Se realizó un dendrograma de similitud (Figura 13) que muestra la variación poblacional al inicio y final de la fermentación. Se observaron dos ramas principales, correspondientes al inicio y término de los tratamientos, con 46.5% de similitud. Al inicio

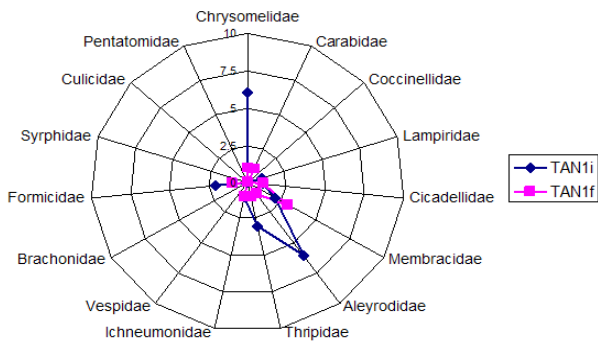


Figura 8. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el fermentado anaeróbico de hojas de neem del tratamiento 1.

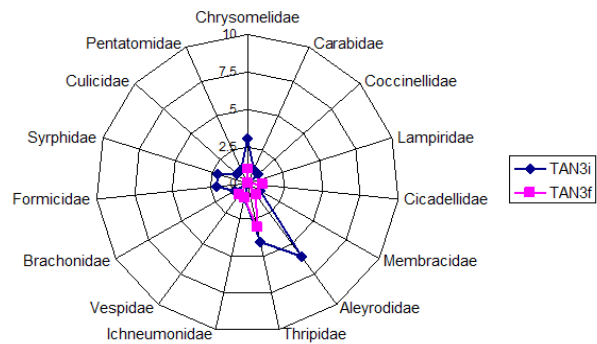


Figura 10. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el fermentado anaeróbico de hojas de neem del tratamiento 5.

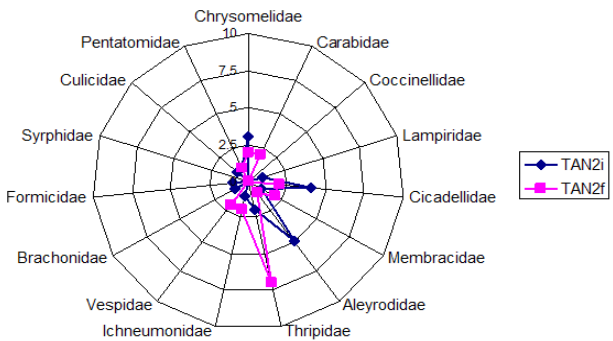


Figura 9. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el fermentado anaeróbico de hojas de neem del tratamiento 3.

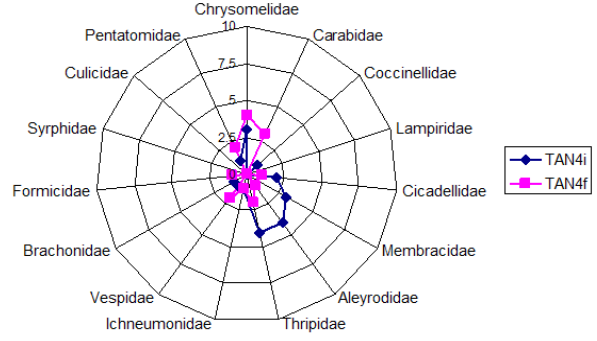


Figura 11. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el fermentado anaeróbico de hojas de neem del tratamiento 7.

de los tratamientos todas las parcelas compartieron 57% de similitud, en tanto que al final la similitud se redujo a 51.9%. Por otro lado, al inicio de la aplicación de los diferentes tratamientos la mayor similitud en la población de insectos se encontró en las parcelas donde se empleó el agroquímico (TQ) y el fermentado TAN1, mientras que al finalizar los tratamientos dicho parámetro se encontró en las parcelas tratadas con los fermentados TAE3 y TAE4. Así mismo, se observó que el diferencial de similitud entre el tratamiento TQ y el tratamiento TAN1, al inicio y final de la prueba, fue mayor para el último ($\Delta = 30.9$) que para el primero ($\Delta = 24.9$); por lo que el tratamiento TAN1 controló con mayor eficiencia a la población de insectos presentes en el maíz.

DISCUSIÓN

Aunque la capacidad controladora de poblaciones de insectos del aceite de semillas de neem está ampliamente demostrada, escasos

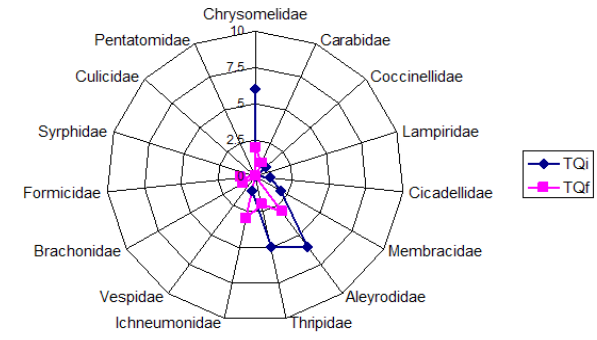


Figura 12. Polígono comparativo de la población de insectos, inicial y final, encontrados en las plantas de maíz tratadas con el agroquímico.

son los trabajos que exploran el empleo de las hojas de este árbol con el mismo fin. Montes-Molina (2003) empleó extractos autofermentados (microbiota endógena) de hojas de neem, demostrando que son capaces de controlar la población de gusano cogollero del maíz. La autofermentación realizada por Montes-Molina (2003) no fue controlada y los cambios en las propiedades fisicoquímicas de dichos extractos no fueron cuantificados.

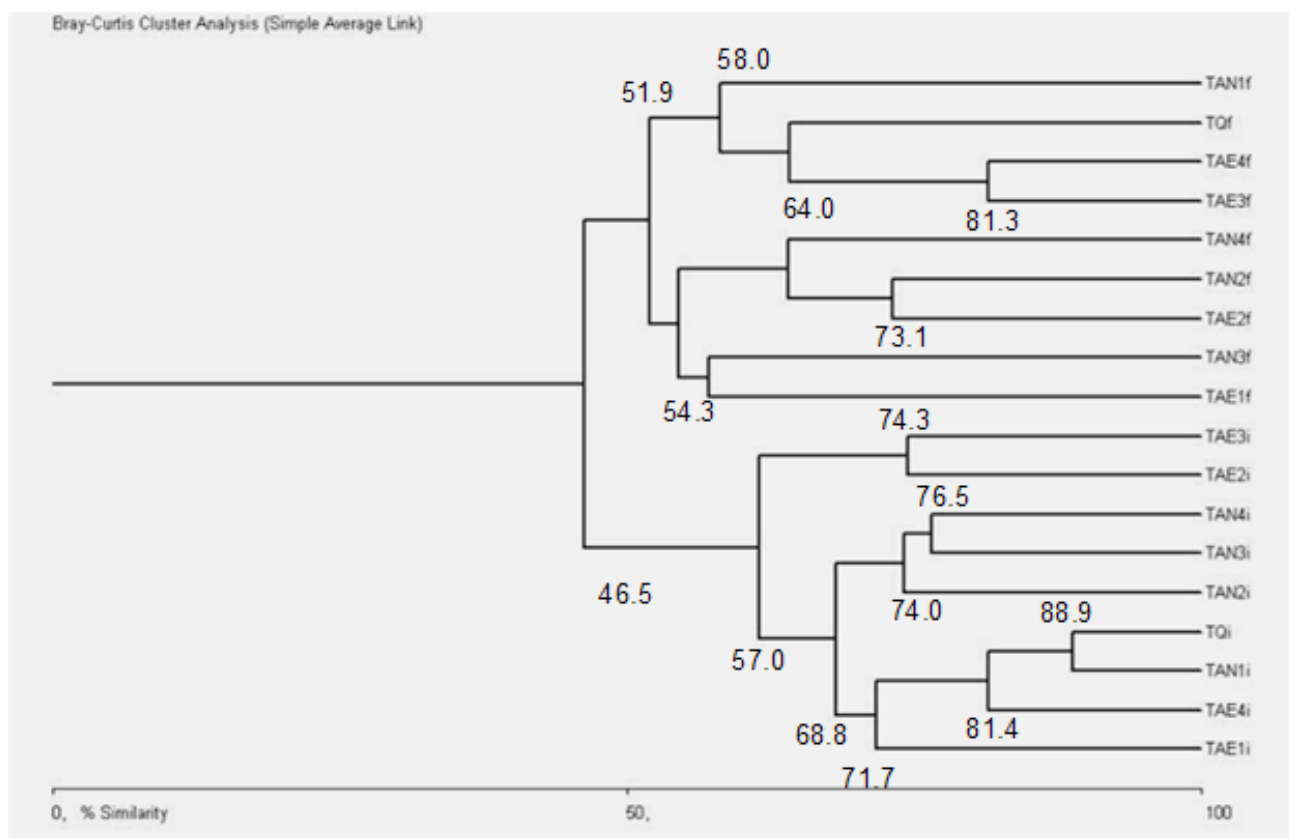


Figura 13. Dendrograma de similitud realizado según el método de similitud de Bray-Curtis mediante el agrupamiento promedio.

En el presente trabajo se demostró que, dependiendo del tipo de fermentación (aeróbica o anaeróbica) y con el empleo de inóculo exógeno, las propiedades fisicoquímicas de los extractos pueden modificarse. La actividad de la microbiota exógena potenció la actividad de los extractos de hojas de neem y permitió liberar más compuestos electroactivos (medidos por la CE), modificar el patrón de pH de la solución y a tener mayor cantidad de SS. De lo anterior se deduce que el tipo de microorganismo(s) empleado(s) influye fuertemente en las características de la solución. Dado que el inóculo exógeno empleado fue una comunidad de microorganismos no cuantificados y no cualificados, se requiere realizar trabajos con inóculos puros para determinar si el consorcio, o uno de sus componentes, fue responsable de los cambios físicos observados.

Desde la perspectiva de la composición química del extracto de hojas de neem, la microbiota exógena fue capaz de modificarla. Es necesario realizar experimentos espectrofotométricos para comprobar si las diferencias entre el RF y el número de bandas corresponde a modificaciones realizadas por la microbiota exógena sobre las bandas cromatográficas triterpenoides iniciales, o si éstos fueron liberados de los fragmentos de hojas por la actividad hidrolítica de dicha microbiota. Además, habrá que realizar estudios cuantitativos que permitan verificar si hay cambios en la concentración de los triterpenos iniciales.

Cabe mencionar que cada una de las bandas obtenidas en la TLC pueden estar formadas por uno o más compuestos que tienen la misma afinidad por la fase móvil y el mismo coeficiente de retención por la fase estacionaria, pero su esqueleto carbonado puede ser diferente entre ellos, recordando que el revelado de las bandas se genera por la interacción del grupo funcional con el agente revelador, en este caso, estructura primaria de los terpenos (Reactivo de Lieberman-Burchard). Es recomendable una extracción de las bandas y posterior separación por otras estrategias cromatográficas.

Los extractos inicial y final mostraron diferencias en coloración y turbidez, siendo el estado inicial café opaco y el estado final verde claro transparente. La variación está directamente relacionada con el proceso de fermentación (aerobio-anaerobio, respectivamente), y es probable que el tipo de fermentación influya en el número y estructura de los componentes para cada banda.

Aunque el cambio observado en la población de insectos, en los tratamientos empleados en este trabajo, pudiera ser resultante del estado fenológico del maíz (Ruiz-Montoya y Castro Ramírez, 2005), el manejo agronómico (Silva-Aparicio et al., 2003) y el ambiente (Murua y Virla, 2004), las diferencias encontradas (Figuras 4 a 12) son un indicativo de que la fermentación diferencial de los extractos influyó en la capacidad de combate. En este sentido, habrá que investigar si los cambios cualitativos observados en los fermentados influyeron para mejorar la capacidad de repeler, disuadir o matar a los insectos. Se ha reportado que la azaridactina (el principio activo presente en el aceite de semillas de neem, de naturaleza triterpénica) es capaz de controlar a insectos de los órdenes Lepidóptera, Homeóptera, Coleóptera, Díptera, Hemíptera, Himenóptera y Tisanóptera (Ramos et al., 2004), órdenes que estuvieron presentes en las parcelas ensayadas. Por lo anterior, es posible que el grado de combate observado en los distintos fermentados pudiera deberse a un incremento en la concentración del principio activo; sin embargo, no se puede descartar el hecho de que el proceso de fermentación hubiera inducido cambios en la estructura de los componentes de los extractos, lo que explicaría la aparición de las tres bandas cromatográficas en los diferentes tratamientos pero con un RF diferencial.

Otro punto importante de destacar es el hecho de que la fermentación anaeróbica fue cualitativamente mejor que la fermentación aeróbica. Esta diferencia se debe al desarrollo diferencial de la población microbiana.

Finalmente, con el empleo del análisis de poblaciones fue posible demostrar que el empleo de los extractos fermentados modificaron la población de insectos presentes en el cultivo de maíz.

CONCLUSIÓN

La fermentación aeróbica o anaeróbica mejoró la capacidad de control de insectos de los extractos de las hojas de neem.

Perspectivas

Una vez aislados los componentes de cada banda cromatográfica, sería interesante realizar un análisis espectrofotométrico de cada una de las bandas cromatográficas por la técnica de espectrometría de masas, espectrometría IR y resonancia magnética nuclear para definir la estructura molecular del (los) componente(s) para cada banda, previa purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

BIBLIOGRAFÍA

- Andrade, R.; Rodriguez, C.; Oehlschlager, A.C. 2000. Optimization of a pheromone lure for *Spodoptera frugiperda* in Central America. *Brazilian Journal of Chemistry*. 11:609-613.
- Angulo, E.M.; Gardea, B.A.; Vélez, R.; García, E.R.; Carrillo, F.A.; Cháidez, Q.C. y Partida, L.J. 2004. Contenido de Azadiractina en semillas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27(4):305-311.
- Aristizábal, L.F.; Bustillo, A.E.; Orozco, J. y Chávez, B. 1998. Efecto del parasitoide *Cephalonomia stephanoderis* (Hymenoptera: *Bethylidae*) sobre las poblaciones de *Hypotenemus hampei* (Coleoptera: *Scolytidae*) durante y después de la cosecha. *Revista Colombiana de Entomología*. 24(3/4):149-155.
- Barros, S.T.; Oliveira N.T. y Maia, L.C. 1993. Efeito do estrato de bulbo de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinacao de conidios de alguns fungos fitopatogénicos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia, v.18 (Suplemento) agosto. 302 pp.
- BioDiversity 1997 NHM & SAMS. Software libre.
- Cano, E. 2001. Cría masiva de *Trichogramma pretiosum*, *Sitotroga cerealella* y *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica). 60: 93-96.
- Carballo, M. y Guharay, F. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. 1ª ed. Managua: CATIE. 138-158 pp.
- Chalfoun, S.M. y Carvalho, V.D. 1991. Controle de fungos patogénicos a través de extratos vegetais (Bulbos de alho e folhas de alho e cebola) *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia. 16 /2/6, 30 pp.
- Clemente, S.; Mareggiani, G.; Broussalis, A.; Martino, V. y Ferraro, G. 2000. Actividad de extractos crudos de plantas aromáticas sobre la supervivencia y desarrollo de *Tribolium castaneum*. *Cátedra Terapéutica Vegetal. Cátedra Zoología Agrícola. Facultad de Agronomía. UBA*.
- Cuadros Fernández, L.A. 2004. Diagnóstico y evaluación de plagas insectiles y otros. *Dirección general de sanidad vegetal, Dirección de vigilancia fitosanitaria. Perú*. 1-20 pp.
- Fernandez-Larrea, O. 1999. Review of BT production and use in Cuba. *Biocontrol News and Information* 20(1): 47-49.
- Gomero, L.O. 2000. Plantas con potencial biocida. *Metodologías y experiencias para su desarrollo. Red de acción en alternativas al uso de agroquímicos. Lima, Perú*. 131-134 pp.
- Guharay, F.; Aguilar, A.; Calderón, M.; Gómez, D.; Mendoza, R.; Monterrey, J.; Monterroso, D. y Staver, Ch. 2004. *Conceptos básicos MIP, Chaput Pascal, 1ª ed. Managua: CATIE, 84 pp.*

- Iannancone, J.A.; Montoro, I. 1999. Empleo de poblaciones de colémbolos como bioindicadores del efecto de plaguicidas en el cultivo de tomate en Ica, Perú. *Revista Peruana Entomol.* 41: 103-110.
- Iannancone, J.A. y Murrugarra, Y. 2000. Fluctuación poblacional del predador *Metacanthus tenellus* Stal (Heteroptera: *Berytidae*) por los insecticidas botánicos Rotenona y Neem en el cultivo de Tomate en el Perú. *Rev. Col. Entomol.* 26:89-97.
- Iannancone, J. y Reyes, M. 2001. Efecto de la rotenona y Neem sobre *Bemisia tabaci* Genadius (Homóptera: *Aleyrodidae*) y *Liriomyza huidobrensis* Blanchard (Diptera: *Agromyzidae*) plagas del tomate en el Perú. *Agronomía Tropical* 51(1):65-79.
- Iannancone, J. y Lamas, G. 2003. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidóptera: *Gelechiidae*) en el Perú. *Entomotrópica* 18(2):95-105.
- Merck, 1972. "Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel", Editorial Merck, Darmstadt, Alemania, 18.
- Montes Molina, J.A. 2003. Efecto del extracto de Neem (*Azadirachta indica*) sobre el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) del maíz (*Zea mays* L.). Tesis para obtener el grado de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias Químicas, UNACH, Tapachula, Chiapas México. 104 pp.
- Murua, M.G. y Virla E.G. 2004. Presencia invernal de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: *Noctuidae*) en el área maicera de la provincia de Tucumán, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata.* 105 (2): 46-52.
- Pérez, G.; Padrón, R.; Soto, R. y Bertsch, F. 1997. Efecto de tres plaguicidas naturales derivados del Neem sobre el combate de plagas en col y maíz en el campo y en *Vigna unguiculata* en almacenamiento. *Agronomía Costarricense* 21(2):259-266.
- Pietrosemoli, S.; Olavez, R.; Montilla, T. y Campos, Z. 1999. Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de nemátodos gastrointestinales de bovinos a pastoreo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 16 (Sup. 1): 220-225.
- Ramos, C.; González, V.; Soto, M.; Eglénman, M. y Rodríguez, D. 2004. Variación del contenido de azaridactina en frutos de marga durante su desarrollo. *Fitotecnia Mexicana.* 27: 81-85.
- Ruiz-Montoya, L. y Castro-Ramírez, A. 2005. Riqueza y distribución de grupos funcionales de insectos en parcelas de maíz en Los Altos de Chiapas. En: González-Espinosa M., Ramírez-Marcial N. y Ruiz-Montoya L. *Diversidad Biológica en Chiapas.* Plaza y Valdés. 441-473.
- Silva-Aparicio, M.; Castro-Ramírez, A.; León-Cortés, J. e Ishike-Ishihara, M. 2003. Entomofauna asociada a maíz de temporal con diferentes manejos de malezas en Chiapas, México. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica).* 70: 65-73.
- Sutherland, J.P.; Baharally, V. y Permaul, D. 2002. Use of botanical insecticide, Neem to control the small rice stinkbug *Oebalus poecilus* (Hemiptera: *Pentatomidae*) in Guyana. *Entomotropica* 17: 97-101.
- Vargas-Arispuro, I. 2007. Aislamiento y evaluación biológica de biopesticidas derivados de plantas para la protección de cultivos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Viñuela, E.; U. Hándel y H. Vogt. 1996: Evaluación en campo de los efectos secundarios de dos plaguicidas de origen botánico, una piretrina natural y un extracto de neem, sobre *Chrysoperla carnea* Steph. (Neuroptera: *Chrysopidae*). *Bol. San. Veg. Plagas*, 22, (1): 97-106.