

VARIACIÓN EN CONTENIDO DE AZADIRACTINA EN FRUTOS DE MARGOSA DURANTE SU DESARROLLO

VARIATION IN AZADIRACTINE CONTENT IN NEEM FRUITS DURING DEVELOPMENT

Carlos A. Ramos B.¹, Víctor A. González H.^{1*},
Marcos Soto H.², E. Mark Engleman² y
Daniel A. Rodríguez L.³

¹Programa en Fisiología Vegetal, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad; ²Programa en Botánica, Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carr. México- Texcoco. C.P. 56230. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Correo electrónico: vagh@colpos.mx ³Campus Córdoba, Colegio de Postgraduados. Carr. Fed. Córdoba-Veracruz, Km. 348. C.P. 94500. Córdoba, Ver.

* Autor para correspondencia

RESUMEN

La azadiractina es un triterpenoide con propiedades insecticidas, que es producida por el árbol de margosa (*Azadirachta indica* A. Juss.). En este trabajo se determinó el contenido de este metabolito en frutos completos de diferentes estados de desarrollo y en diferentes tejidos del fruto (embrión, endospermo, cubierta seminal y cuerpo del fruto). En Córdoba, Veracruz, México, la concentración de azadiractina aumentó con el desarrollo del fruto, en la mayoría de ellos hasta alcanzar su máximo en la madurez fisiológica, a los 127 d después de floración (equivalentes a 1040 unidades calor), con valores de 2.8 mg g⁻¹ materia seca en fruto completo y de 5.88 mg g⁻¹ materia seca en embrión. El tejido del fruto con mayor contenido de azadiractina fue el embrión, con 83 % del total.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, azadiractina, desarrollo del fruto.

SUMMARY

Azadirachtine is a triterpenoid with pesticide properties which is produced by neem trees (*Azadirachta indica* A. Juss.). In this research the azadirachtine content in whole fruits and in its different tissues (embryo, endosperm, flesh and seed cover) was evaluated across fruit development. It was found that azadirachtine concentration increased during fruit development until maximum values were reached (2.8 mg g⁻¹ dm in whole fruits and 5.88 mg g⁻¹ dm in embryos) at physiological maturity in most cases. Fruit physiological maturity occurred 127 days after blooming, equivalent to 1040 heat units. Embryo was the fruit tissue with the highest azadirachtine content, with 83 % of the total.

Index words: *Azadirachta indica*, azadiractina, fruit development.

Recibido: 15 de Mayo del 2004.

Aceptado: 13 de Agosto del 2004.

INTRODUCCIÓN

La margosa o neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) es un árbol originario de la India, que se ha extendido en Asia, África, Sudamérica, Centroamérica y el Caribe. Se cultiva principalmente para la extracción de azadiractina, un metabolito natural efectivo como insecticida, acaricida, nematocida, fungicida y bactericida, cuya mayor concentración se encuentra en las semillas (Gera *et al.*, 1998; National Research Council, 1992). En la India se le conoce también como la farmacia del pueblo, debido a que sus hojas preparadas en infusión son una medicina de uso popular para el alivio de malestares estomacales, inflamaciones y malaria (Rawat, 1995). En México y en América Latina su principal utilización es en el control de plagas agrícolas.

La actividad insecticida de la azadiractina (C₅₅H₄₄O₁₆), en dosis 100 µg g⁻¹, inhibe la oviposición y el proceso de metamorfosis, y presenta efectos antialimentarios en lepidópteros, homópteros, coleópteros, dípteros, hemípteros, himenópteros y tisanópteros (Morgan y Thornton, 1973; Thomson, 1994). Ello se debe a que su estructura es similar a la hormona de insectos llamada "ecdisona", la cual controla la metamorfosis en el paso de larva a pupa y adulto. Además, su principal ventaja radica en ser de baja toxicidad para mamíferos (Gershenson y Croteau, 1991).

La concentración de azadiractina en las semillas de margosa puede variar entre árboles individuales de 4 a 9 mg g⁻¹ de semilla (National Research Council, 1992), ya sea por causas genéticas, ambientales o por la interacción entre ambas. La concentración también varía con la etapa fenológica, pues según Johnson *et al.* (1996), la mayor se presenta a los 127 d después de la floración, cuando el fruto está en la etapa "verde sazón", y luego decrece incluso durante el almacenamiento. Otros factores que influyen son la humedad relativa y temperatura (Ermel *et al.*, 1987), así como el manejo de la semilla, la exposición a la luz, el almacenamiento, el secado, el método de extracción (Schmutterer y Zebitz, 1984).

En México existen varias plantaciones de margosa, como la del Campus Córdoba, del Colegio de Postgraduados, de la cual se hacen extracciones para uso agrícola, sin conocer la concentración y la etapa fenológica más conveniente para la colecta del fruto. Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó la concentración de azadiractina tanto en frutos completos como en sus diferentes tejidos, a través de diferentes etapas fenológicas, lo que podría servir para la elección de la fecha adecuada de cosecha y obtener los mejores rendimientos de este metabolito.

MATERIALES Y MÉTODOS

El huerto de margosa estudiado pertenece al Campus Córdoba del Colegio de Postgraduados, ubicado en Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, a 18° 50' LN y 96° 55' LW, y una altitud de 660 m. Su clima es del tipo Am, cálido-húmedo con lluvias en verano (García, 1981). El suelo es de textura arcillosa, moderadamente ácido, rico en materia orgánica en la capa de 0 a 20 cm; en temporada de lluvias el manto freático se eleva y puede afectar el desarrollo del árbol (Rodríguez, Com. pers.)¹.

Desarrollo fenológico y colecta de material vegetal

Para el estudio fenológico y análisis de azadiractina, cada dos semanas (a partir de la floración, en abril 15 del 2001) y hasta finales de octubre, se colectaron brotes terminales de dos ramas marcadas por árbol, ubicadas en puntos opuestos, de 10 árboles de la variedad "Nacional" de ocho años de edad. Las características fenológicas registradas, con sus respectivas fechas de ocurrencia, fueron: formación de yemas foliares, diferenciación y desarrollo de yemas florales hasta la antesis, y desarrollo del fruto desde la polinización hasta su madurez fisiológica.

Con los datos de temperatura y precipitación registrados en la Estación Meteorológica del Campus Córdoba se calcularon las unidades calor (UC) acumuladas para alcanzar cada etapa fenológica, conforme al método residual (Ortiz-Solorio, 1987), con la siguiente ecuación:

$$UC = \sum \frac{T_{mín} + T_{máx}}{2} - T_b$$

donde: $T_{mín}$ y $T_{máx}$ son las temperaturas mínima y máxima diarias, y T_b = temperatura base. La T_b se fijó en 15 °C, al considerar que la óptima para margosa es de 21 °C (Parrotta y Chaturvedi, 1994).

Extracción y cuantificación de azadiractina en frutos

Los frutos colectados en cada muestreo se clasificaron en tres tamaños: frutos pequeños (194 a 828 mg/fruto), frutos medianos (267 a 1142 mg/fruto) y frutos grandes (289 a 1275 mg/fruto); la variación en peso en cada tamaño de fruto se debe a la edad, de modo que los menores pesos corresponden a frutos de 31 d y los mayores pesos a

frutos de 127 d de edad. Para la extracción de azadiractina, de cada tamaño de fruto y en cada fecha de muestreo se usó una muestra de 5 g de peso fresco, que correspondió a 25, 19 y 17 frutos de 31 d o 6, 5 y 4 frutos de 127 d de edad, para los tamaños pequeño, mediano y grande, respectivamente. Las muestras de fruto se deshidrataron en un liofilizador Labconco modelo 4.5[®], a -40 °C y 133 x 10⁻³ mbar, por 72 h. De la materia seca y molida se desengrasó 1 g mediante agitación con 20 mL de éter de petróleo por 20 h en un agitador Ika Labortechnik KS 250, a 540 g. El residuo obtenido se sometió nuevamente a agitación por 20 h en 20 mL de metanol puro para la extracción de azadiractina. Se recuperó la fracción líquida mediante decantación, y el disolvente se eliminó mediante un rotavapor BUCHI modelo R-114 a una temperatura de 45 °C y una presión de 80 kPa. El extracto así obtenido se resuspendió en 15 mL de metanol-agua (2:1).

El extracto metanólico-acuoso se extrajo con diclorometano (20 mL, tres cambios); luego se eliminó la fracción acuosa y se recuperó la fracción orgánica, misma que se llevó a evaporación a 40 °C en rotavapor. El residuo se resuspendió en acetonitrilo (3 mL), y luego se filtró en acrodiscos Iso-disc con membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) con poros de 0.2 µm de diámetro (técnica modificada de Johnson *et al.*, 1996).

La cuantificación de azadiractina en los extractos se hizo por triplicado mediante inyección de 20 µL por muestra y por repetición, en un cromatógrafo de líquidos de alta precisión Hewlett-Packard serie 1100, equipado con detector UV Vis y columna Supelcosil LC 18 de 25 cm x 4.6 mm, 5 µm; el eluyente fue una mezcla de acetonitrilo-agua (70:30), a un flujo de 0.5 mL min⁻¹; la lectura se hizo a una longitud de onda de 210 nm y a temperatura ambiente (25 °C ± 1). Los cromatogramas resultantes de las muestras se compararon con una curva de calibración elaborada con una solución estándar de azadiractina (pureza de 99 %), obtenida por dilución de 1 mg del estándar en 2 mL de acetonitrilo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo fenológico

El crecimiento de hojas y flores de la margosa ocurrió en forma simultánea y en un periodo de tres meses, del 15 de febrero con la iniciación floral, al 15 de abril, con la antesis (Cuadro 1). La formación de yemas latentes inició en abril, cuando se suspendió el desarrollo de nuevos primordios foliares, y los ya formados se transforman en brácteas que se sobrepone y secretan una resina que persiste sobre las yemas hasta mediados de febrero del siguiente año.

¹D A Rodríguez (1998) Adaptabilidad del árbol de margosa (*Azadirachta indica* A. Juss.) en la zona centro de Veracruz y su utilidad en el combate de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferr). Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Campus Veracruz, México.

Cuadro 1. Eventos fenológicos en el árbol de margosa, en Córdoba, Ver. 2001.

Núm	Evento fenológico	Descripción	Fecha de inicio	Unidades calor acumuladas
1	Ruptura del letargo e inicio de diferenciación foliar	Ruptura de la cubierta de resina que cubre las yemas, debido al crecimiento de los primordios foliares de forma lanceolada.	Feb 10	452
2	Iniciación floral	En las axilas de los primordios foliares más desarrollados aparecen yemas florales de forma globular. Continúa la diferenciación foliar.	Feb 16	482
3	Inicio de ramillas de la inflorescencia	Las yemas florales forman el raquis de la inflorescencia, en cuyo extremo se forman los primordios de las ramillas secundarias y terciarias.	Feb 23	515
4	Iniciación de botones florales	Aparición de primordios de botones en las ramas terciarias. La cubierta de resina de la yema desaparece por completo. Los primordios apicales cesan la formación de nuevos primordios de hojas; es decir, en este evento se determina el número total de hojas del brote.	Mar 16	660
5	Antesis	Inicia la apertura de flores y la polinización.	Abr 15	900
6	Inicia abscisión de inflorescencias	Algunas inflorescencias se desprenden y caen del brote, probablemente debido a la competencia por fotoasimilados entre estas estructuras.	May 14	1136
7	Cese del crecimiento e iniciación de yemas latentes. Frutos pequeños	Cesa el crecimiento de flores e inflorescencias. Las hojas dejan de crecer, aún las inmaduras. Las nuevas yemas foliares se cubren de resina. Frutos de 2 mm de diámetro y 4 mm de largo.	Jun 06	1351
8	Frutos medianos	Los frutos miden 7 mm de diámetro y 12 mm de largo.	Jul 13	1675
9	Frutos grandes, verde sazón	Los frutos alcanzan su mayor tamaño, con 10 mm de diámetro y 14 mm de largo. Es el momento de la madurez fisiológica.	Ago 09	1973
10	Frutos maduros	Comienza la senescencia en los frutos. El mesocarpo adquiere una textura suave.	Sep 16	2290
11	Caída de frutos	Los frutos se secan completamente y caen.	Oct 05	2456
12	Abscisión de inflorescencias	Las infrutescencias carentes de frutos, cambian de color verde a amarillo, se desprenden y caen todas.	Oct 14	2540

El desarrollo de los frutos finalizó a mediados de septiembre, y fue seguido de un periodo de abscisión de y de letargo; éste último transcurre de octubre a infrutescencias mediados de febrero. La duración de los diversos periodos fenológicos discrepa con la registrada por otros autores en otras localidades, lo que se atribuye a los requerimientos térmicos de la especie, de manera que cuanto más bajas son las temperaturas más días deberán acumularse para completar los requerimientos de una etapa fenológica.

La floración requirió 900 UC; dado que con este evento se inicia también la polinización y que la madurez fisiológica de los frutos requirió 1940 UC, la formación de los frutos en Córdoba se logró con 115 d y 1040 UC. En la Figura 1 se ilustran algunos estados del desarrollo del fruto y de los tejidos que lo constituyen.

El desarrollo de las inflorescencias es acrópeto, porque las estructuras de la base (botones, flores o frutos) se desarrollan antes que las del ápice, lo que origina variabilidad en el tamaño de los frutos, en cualquier fecha de muestreo.

Contenido de azadiractina en frutos

En los árboles de ocho años de Córdoba, Ver., el contenido de azadiractina varió con el estado de desarrollo (edad) de los frutos y con su tamaño (Figura 2). En los frutos pequeños y grandes dicho contenido aumentó conforme avanzó el desarrollo del fruto, hasta alcanzar su máximo valor (2.8 mg g⁻¹ de materia seca) a los 127 d después de la antesis, cuando también alcanzó su mayor

tamaño. En cambio, en los frutos medianos el máximo contenido ocurrió a los 66 d, cuando los frutos aún estaban a la mitad de su crecimiento; se desconoce la causa de la diferente cinética de acumulación de azadiractina observada en frutos medianos, pero es similar a la registrada por Gersherzon y Croteau (1991) en tejidos que sostienen al fruto. Después del valor máximo, en todos los tamaños de fruto la concentración de ese terpenoide disminuyó rápidamente, pues bajó a sólo la mitad o menos del máximo en apenas 20 d. Estos resultados señalan la conveniencia de hacer la extracción de azadiractina en cuanto el fruto llega a la madurez fisiológica.

En embriones obtenidos de frutos maduros de 128 d de edad, Johnson *et al.* (1996) encontraron un contenido máximo elevado (10.4 mg g⁻¹ de azadiractina) en árboles de 15 a 22 años plantados en regiones áridas de Sri Lanka. Según el Consejo Nacional de Investigación (National Research Council, 1992), el contenido promedio en semillas es de 4 mg g⁻¹, mientras que Ermel *et al.* (1984) indican que el contenido de azadiractina varía desde 1.5 hasta 5.2 mg g⁻¹, en semillas de diferentes localidades de Burma y Togo (con lluvias de 780 a 1011 mm anuales) y de la India y Sudán con localidades aún más lluviosas. En Córdoba la precipitación anual fue de 1592 mm, en comparación con esos sitios. La diferencia en concentraciones de azadiractina entre las distintas localidades puede deberse a la variación en la edad de los árboles y a factores genéticos y ambientales.

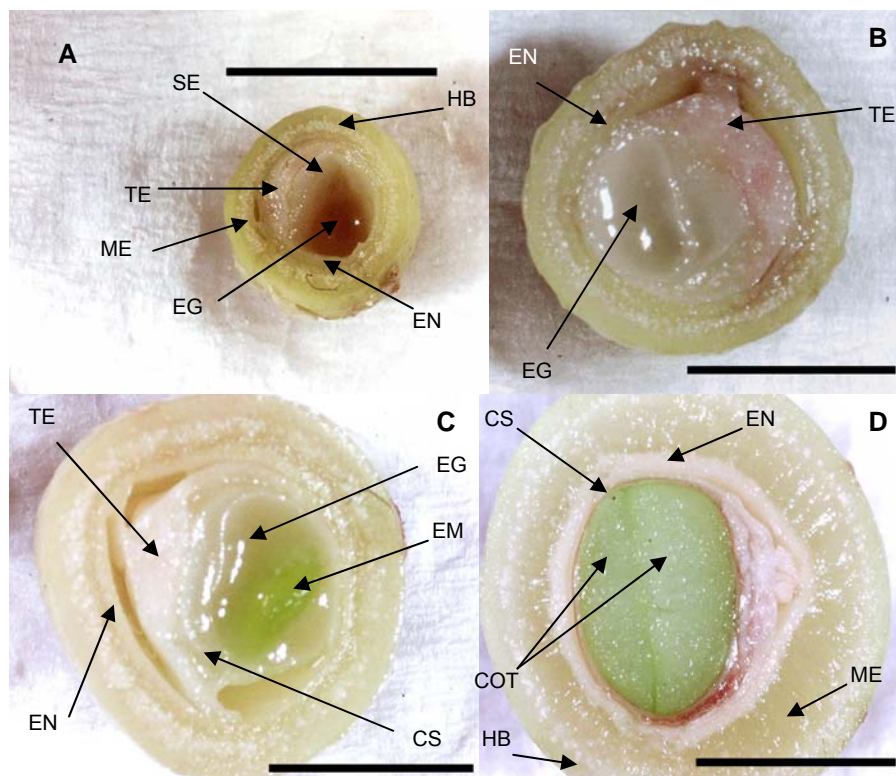


Figura 1. Frutos de margosa. A. A los 52 días. B. A los 66 días. C. A los 80 días. D. A los 98 días después de floración. SE = Saco embrionario; EG = Endospermo gelatinoso; HB = Hilos blancos; ME = Mesocarpio; CS = Cubierta seminal; EN = Endocarpio; COT = Cotiledones; EM = Embrión; y TE = Tegumentos. Las barras negras representan 5 mm.

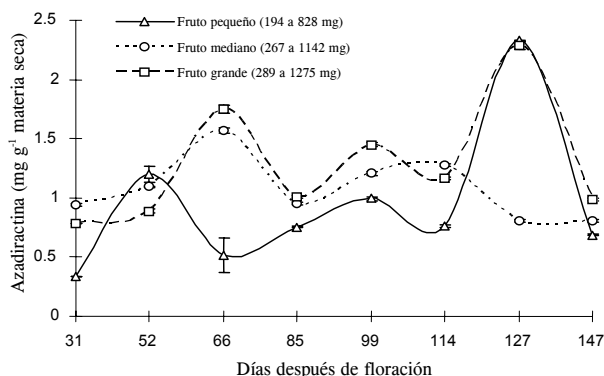


Figura 2. Contenido de Azadiractina en frutos de margosa de tres tamaños, a través de su desarrollo fenológico, en Córdoba, Ver. Las barras verticales representan la desviación estándar (n=3); donde no se aprecian, es porque son de menor magnitud que el símbolo.

Entre los tejidos del fruto, el embrión mostró la mayor concentración de azadiractina (Figura 3). En esta evaluación se corroboró que el contenido de azadiractina aumenta con la edad del fruto hasta lograr el máximo a los 114 d, una semana antes de la madurez fisiológica; esta concentración máxima fue de 5.88 mg g⁻¹, lo cual representa un aumento de 4.8 veces en relación con frutos más jóvenes, de 80 d. Estos resultados son contrarios a los de Gershenzon y Croteau (1991), quienes reportaron que las estructuras jóvenes del fruto superan a las maduras en 2 a 10 veces, en la concentración de azadiractina; sin embargo, estos autores se refieren a tallos y hojas asociados con las estructuras reproductivas, y no a frutos específicamente.

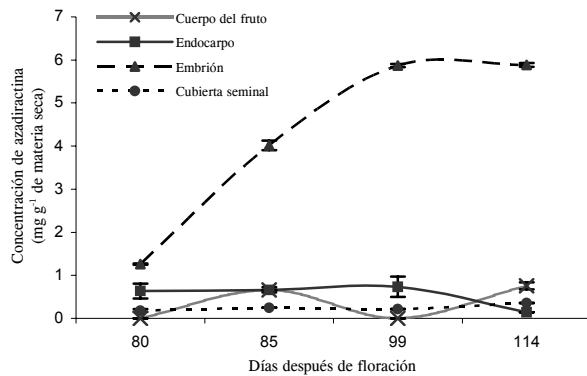


Figura 3. Contenido de azadiractina en los diferentes tejidos del fruto de margosa y en diversas edades, en Córdoba, Ver. Las barras verticales representan la desviación estándar ($n=3$); donde no se aprecian, es porque son de menor magnitud que el símbolo.

CONCLUSIONES

En Córdoba, Ver., la formación de hojas y flores en árboles de margosa es simultánea y dura tres meses (febrero a abril), y requieren 900 unidades calor. La formación de frutos dura cuatro meses, o 1040 unidades calor, y no compete con la formación de hojas y flores. Sigue el periodo de abscisión de inflorescencias y frutos, junto con la latencia de yemas axilares, de octubre a febrero.

Se confirmó que los frutos contienen azadiractina desde etapas fenológicas tempranas de su formación y que en la mayoría de frutos su concentración aumenta con la edad, desde 0.4 mg g^{-1} a los 31 d hasta 2.8 mg g^{-1} a los 127 d después de la floración (madurez fisiológica), en frutos completos, para luego disminuir rápidamente a la mitad en apenas 20 d. Por tanto, conviene hacer su extracción cuando el fruto llega a madurez fisiológica. El embrión es el tejido que contiene más azadiractina (hasta 5.8 mg g^{-1}), con 83 % del total en el fruto. Las máximas concentraciones

registradas en Córdoba, Veracruz son similares a las obtenidas en otras plantaciones de margosa establecidas en climas húmedos, pero inferiores en 50 a 75 % que las máximas obtenidas en climas áridos.

BIBLIOGRAFÍA

- Ermel K, E Pahlich, H Schmutterer (1987) Azadirachtin content of neem kernels from different geographical locations, and its dependence on temperature, relative humidity, and light. *In: Proc. 3rd Int. Neem Conf.*, Nairobi. pp:171-184.
- García E (1988) Modificaciones al Sistema de Clasificación de Köppen. 4a Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 217 p.
- Gera M, N Gera, S L Menna, T Singh (1998) Variation in response in ten provenances of *Azadirachta indica* A. Juss. *The Indian Forester* 124 (9):696-701.
- Gershenzon J, R Croteau (1991) Terpenoids. *In: Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Vol. I: The Chemical Participants. G A Rosenthal, M. R. Bernbaum (eds). Academic Press. San Diego, California. pp:165-209.
- Johnson S, E D Morgan, C N Peiris (1996) Development of the major triterpenoides and oil in the fruit and seeds of Neem (*Azadirachta indica*). *Ann. Bot.* 78:383-388.
- Morgan E D, M D Thornton (1973) Azadirachtin in the fruit of *Melia azedarach*. *Phytochemistry* 12:391-392.
- National Research Council (1992) *Neem: A Tree for Solving Global Problems*. National Academic Press. Washington, D. C. 139 p.
- Ortiz-Solorio C A (1987) *Agroclimatología Cuantitativa, con Aplicación en la República Mexicana*. 3a Ed. Depto. de Suelos, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 327 p.
- Parrota J A, A N Chaturvedi (1994) *Azadirachta indica* A. Juss. *Neem, margosa*. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. New Orleans, LA. 8 p.
- Rawat G S (1995) *Neem (Azadirachta indica) - Nature's Drugstore*. *The Indian Forester* 121:977-1087.
- Schmutterer H, C P W Zebitz (1984) Effect of methanolic extracts from seeds of single neem trees of African and Asian origin, on *Epilachna varivestis* and *Aedes aegypti*. *In: Proc. 2nd Int. Neem Conf.*, Rauischolzhausen, Germany 1983. pp:83-90.
- Thomson W T (1994) *Agricultural Chemical Book. Insecticides I*. Thomson Publications. Revision 1994-95. Fresno, CA. pp:77-78.
- Wink M (1999) Introduction: Biochemistry role and biotechnology of secondary metabolites. *In: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Sheffield Academic Press. London. pp:1-16.