

## CONTENIDO DE AZADIRACTINA A EN SEMILLAS DE NIM (*Azadirachta indica* A. JUSS) COLECTADAS EN SINALOA, MÉXICO

### AZADIRACTIN A CONTENT IN NEEM SEEDS (*Azadirachta indica* A. JUSS) COLLECTED IN SINALOA, MÉXICO

Miguel A. Angulo-Escalante<sup>1\*</sup>, Alfonso A. Gardea-Béjar<sup>2</sup>, Rosabel Vélez de la Rocha<sup>1</sup>, Raymundo S. García-Estrada<sup>1</sup>, Armando Carrillo-Fasio<sup>1</sup>, Cristóbal Cháidez-Quiroz<sup>1</sup> y Jesús I. Partida-López<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán. Km. 5.5 Carretera a Eldorado. Apartado Postal 32-A. C.P 80129, Culiacán, Sin. México. Tel. (667) 760-5536. Fax (667) 760-5537. Correo electrónico: mangulo@victoria.ciad.mx <sup>2</sup>Unidad Cuauhtémoc. Río Conchos s/n, Parque Industrial, Cuauhtémoc, Chih. C.P. 31570. Tel. y Fax: 01 (625) 581-2920. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Blvd. de las Américas y Universitarios. C.P. 80000, Culiacán, Sin. México. Tel. y Fax: 01 (667) 713-7860.

\* Autor para correspondencia

#### RESUMEN

Se evaluó el contenido de azadiractina A en semillas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) cosechadas en 2002 de árboles plantados en Sinaloa. Los frutos fueron colectados directamente de los árboles y procesados en el Laboratorio de Toxicología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán. La azadiractina A se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa, provisto con un detector UV-VIS a 217 nm. Se observaron diferencias significativas en el contenido de azadiractina A entre los genotipos de diferentes orígenes, atribuibles a variaciones genéticas. Los resultados indican que en Sinaloa los árboles provenientes de Filipinas mostraron mayor contenido de azadiractina A en sus semillas con una concentración media de 2895 µg g<sup>-1</sup>, comparada con 1994 µg g<sup>-1</sup> en semillas de árboles originarios de Haití. El estado de madurez de los frutos al momento de cosecharse es determinante para obtener mayores niveles de azadiractina A, ya que al avanzar la madurez del fruto de verde-amarillo a amarillo, hubo una reducción del 35 % en el contenido de azadiractina.

**Palabras clave:** *Azadirachta indica*, azadiractina A, variación genética, semillas de nim.

#### SUMMARY

Azadirachtin content in neem seeds (*Azadirachta indica* A. Juss) was evaluated in 2002 from trees planted in Sinaloa, México. Fruits were collected directly from trees and processed in the Toxicology Laboratory at the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Campus Culiacán. Azadirachtin A content was quantified by reverse phase high resolution liquid chromatography using a UV-VIS detector at 217 nm. Significant differences in azadirachtin A content were found among genotypes from Filipinas and Haiti, probably due to natural genetic variation. Seeds from trees introduced from the Philippines had a mean azadirachtin A content of 2895 µg g<sup>-1</sup>, as

compared to 1994 µg g<sup>-1</sup> in trees introduced from Haiti. Fruit maturity stage at harvest determines azadirachtin A content, since yellow fruits had 35 % less azadirachtin than green-yellow fruits.

**Index word:** *Azadirachta indica*, azadirachtin A, genetic variation, neem seeds.

#### INTRODUCCIÓN

El árbol del nim o margosa (*Azadirachta indica* A. Juss) pertenece a la familia Meliaceae y es nativo de India. Se encuentra ampliamente distribuido en el Sur y Sureste de Asia y en la mayor parte de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Benge, 1989). Este árbol es conocido por sus propiedades medicinales en humanos (Kausik *et al.*, 2002) y por su uso en control de plagas en cultivos agrícolas (Koul *et al.*, 1990). Los extractos obtenidos de su semilla contienen diversos agentes bioactivos contra hongos (Govindachary *et al.*, 1998) e insectos; el más potente es el norriterpenoide conocido como azadiractina (Mordue y Blackwell, 1993). Se ha demostrado la presencia de isómeros nuevos de azadiractina (Govindachari *et al.*, 1991), de los cuales azadiractina A (Figura 1) es el metabolito más importante, por su actividad insecticida y cantidad presente en las semillas de nim (Rembold, 1989; Jones *et al.*, 1989).

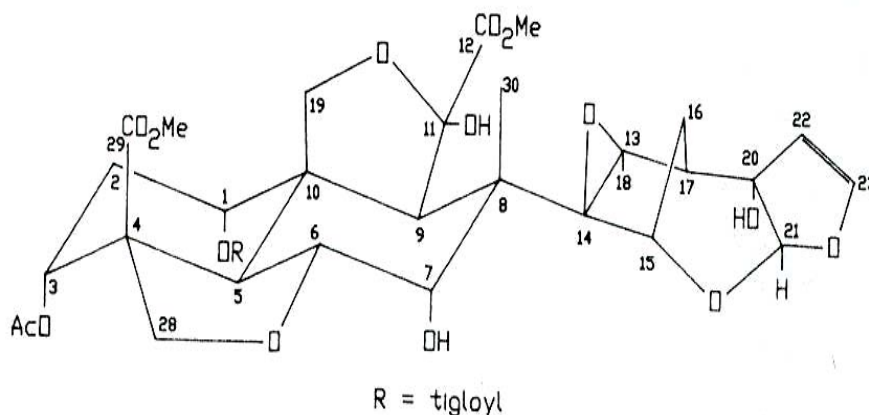


Figura 1. Estructura química de la azadiractina A (Rembold, 1989).

Este limonoide interfiere en el proceso normal de la metamorfosis de insectos, reduce la fecundidad, el crecimiento, la ovipostura y la alimentación de los insectos (Schmutterer, 1990). La azadiractina se presenta en cualquier parte anatómica del árbol; sin embargo, la concentración más alta se obtiene de las semillas (Dai *et al.*, 2001).

El contenido de azadiractina en semillas obtenidas de árboles de nim a nivel mundial o dentro de un mismo país es variable. Por ejemplo, Ermel *et al.* (1984) evaluaron la cantidad de azadiractina en semillas de árboles localizados en diferentes regiones de India, Togo, Sudán y Nigeria; observaron que los niveles de este limonoide varían de 1000 a 6000  $\mu\text{g g}^{-1}$  y sugirieron que estas diferencias se deben a condiciones ambientales locales como humedad relativa, precipitación o temperatura. Kumar y Parmar (1997) también estudiaron el contenido de azadiractina de algunos ecotipos de la India y sugirieron que las causas de la variación en el contenido de azadiractina se deben a diferencias en las condiciones climatológicas donde se localizan los cultivos de nim. Sin embargo, Sidhu *et al.* (2003) observaron en India que los árboles de un mismo origen, cultivados bajo las mismas condiciones de suelo y clima, poseen diferencias significativas en la capacidad de producción de azadiractina, por lo que sugieren que la diversidad genética en plantas de un mismo origen es determinante para la producción de azadiractina y no los factores climáticos.

La introducción del árbol del nim en el noroeste de México se inició en la década de los noventa a partir de

dos orígenes. El primer grupo se plantó en Los Mochis, Sinaloa y se propagó en la parte centro y norte del estado de Sinaloa. El otro grupo fue introducido a Todos Santos, Baja California Sur y su propagación se extendió hasta el centro de Sinaloa.

Debido a que la azadiractina A es el componente activo del nim que se utiliza para determinar la calidad de la materia prima para formular plaguicidas, el objetivo de este estudio fue determinar si existen diferencias en el contenido de azadiractina A en las semillas de árboles introducidos en el noroeste de México a partir de los dos sitios de origen mencionados, así como en frutos de diferente estado de maduración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de frutos y preparación de semillas de nim

Los muestreos de frutos de nim se realizaron en agosto de 2002 en dos áreas geográficas del estado de Sinaloa. En el Centro del estado en el municipio de Culiacán se muestrearon árboles en la plazuela Rosales -a orilla del río Tamazula- y en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), también en el municipio de Angostura en el Rancho El Cachorón. En el Norte del estado las muestras se tomaron en Guasave en Juan José Ríos, así como en el municipio de Ahome, en Los Mochis y en el Rancho Camayeca (Figura 2). Se colectaron tres muestras de un kilogramo de fruto maduro (color amarillo), directamente de las ramas de los árboles seleccionados al azar en cada plantación.

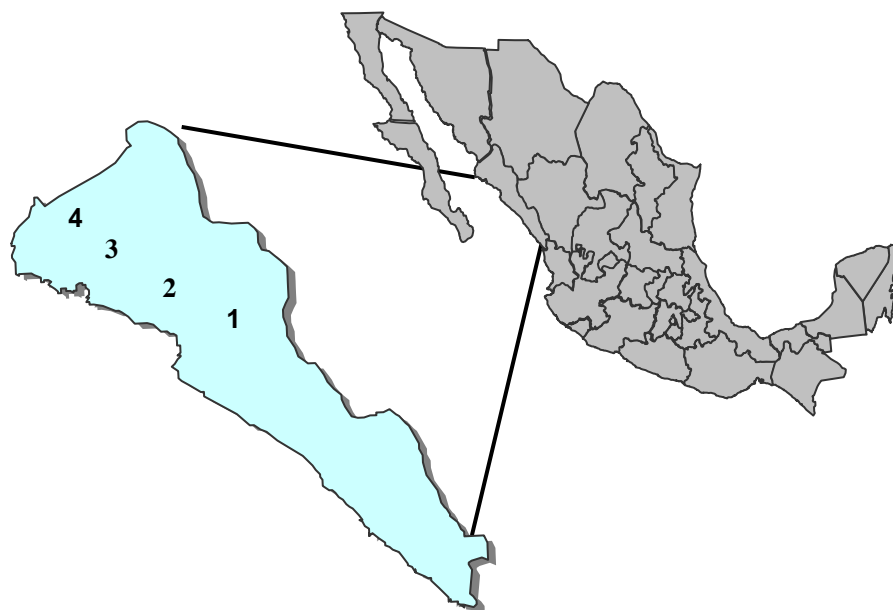


Figura 2. Sitios de muestreo de semillas de árboles de nim plantados en el centro del estado de Sinaloa; Culiacán (1) y Angostura (2); y en el norte, Guasave (3) y Ahome (4).

Para la evaluación del efecto del grado de madurez en la cantidad de azadiractina de las semillas se utilizaron muestras de árboles de Juan José Ríos. Se tomaron tres muestras de un kilogramo de frutos en dos estados de madurez, verde-amarillo y amarillo. En el laboratorio los frutos fueron despulpados, lavados manualmente y las semillas se secaron directamente al sol por 4 h y bajo sombra durante 15 d. Finalmente, las semillas sin testas fueron almacenadas a 5 °C.

#### Molienda y extracción de azadiractina A

Se molieron 5 g de semillas de nim en una licuadora comercial. Se pesó un gramo de semilla y se colocó en tubo de plástico de 50 mL. Posteriormente se adicionaron 50 mL de metanol y se agitó por 10 min en un vórtex a su máxima capacidad. Enseguida, la muestra se centrifugó a 4960 g por 10 min y de la fase acuosa se filtraron 5 mL a través de una membrana acrodisc de 0.45 micras de poro. Este filtrado se colocó en viales de 1 mL y el automuestreador inyectó 20 mL por muestra al sistema cromatográfico (Kaushik, 2002).

#### Determinación de azadiractina del aceite de nim

La determinación de azadiractina A se obtuvo utilizando la metodología desarrollada por Kaushik (2002). Se uti-

lizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución equipado con un automuestreador marca Varian Prostar modelo 410, un sistema de bombeo de solventes marca Varian Prostar modelo 240, un detector Varian UV-VIS modelo Prostar 310 y un sistema integrador de datos Varian Prostar Work Station versión 5.5, una columna Waters de 150 x 3.9 mm empacada con Novopack C-18 de tamaño de partícula 4 Mn. La fase móvil consistió en agua-acetonitrilo (60:40) a un flujo de 1 mL·min<sup>-1</sup> por 30 min. La detección de azadiractina se llevó a cabo por absorbancia a una longitud de onda de 217 nm. Todos los análisis se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El pico correspondiente a la azadiractina se detectó a los 5.3 minutos y fue validado con un estándar certificado (Sigma-Aldrich, St. Louis MS.) con pureza de 95 %.

#### Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos. Los factores evaluados fueron: origen del germoplasma con dos niveles (Filipinas y Haití) y localización del germoplasma, ya fuese en el Centro o en el Norte de Sinaloa. El número de repeticiones fue variable y por cada muestra se hicieron cuantificaciones de azadiractina por triplicado. A falta de interacción, las medias de los efectos principales significativos se separaron por la prueba de Tukey ( $P \leq 0.5$ ). Por

otra parte, el efecto del grado de madurez de los frutos se experimentó sólo con los árboles de Los Mochis, en el cual se consideraron dos estados de madurez, verde-amarillo y amarillo. El diseño experimental también se hizo completamente al azar y la separación de medias por Tuckey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han utilizado diversos métodos cromatográficos para determinar el contenido de azadiractina en semillas, aceite y formulaciones a partir de semillas de nim. Ermel *et al.* (1984) utilizaron la cromatografía de capa fina en extractos de semillas de nim, Johnson y Morgan (1997) y Ambrosino *et al.* (1999) reportaron el uso de la cromatografía de fluido supercrítico para la determinación, tanto cualitativa como cuantitativa de azadiractina en extractos crudos de semillas de nim; debido a que estas técnicas no requieren de una limpieza de las muestras, no se pueden utilizar como métodos de rutina para la determinación de azadiractina.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es ampliamente utilizada para la determinación de azadiractina en semilla, aceite y productos derivados del nim y sólo di-

fiere en los métodos de extracción o limpieza de la muestra. La extracción de fase sólida se ha utilizado para la extracción de los limonoides en cultivos de tejidos y se puede utilizar para el análisis de azadiractina en semillas de nim (Jarvis y Morgan, 2000). Recientemente, Sharma *et al.* (2003) utilizaron la extracción metanólica de azadiractinas A, B y H a partir de semillas de nim previamente desengrasadas para la posterior purificación de los limonoides. En el presente estudio se determinó el contenido de azadiractina con la metodología reportada por Kaushik (2002) y con metanol como solvente de extracción de la azadiractina A. Ese método es económico y accesible para ser establecido para el control de calidad del aceite de semillas de nim.

En la Figura 3 se presentan los cromatogramas: Fase móvil (a), concentración conocida de azadiractina A (b) y una muestra procesada de semilla de nim (c). El cromatograma correspondiente a la inyección de una concentración conocida mostró un pico con un tiempo de retención 5.3 min. Este pico puede también ser claramente distinguido en muestras de semillas de nim a las que se les determinó el contenido de azadiractina A, donde el tiempo de retención de este limonoide fue de 5.3 min., igual al cromatograma con estándar.

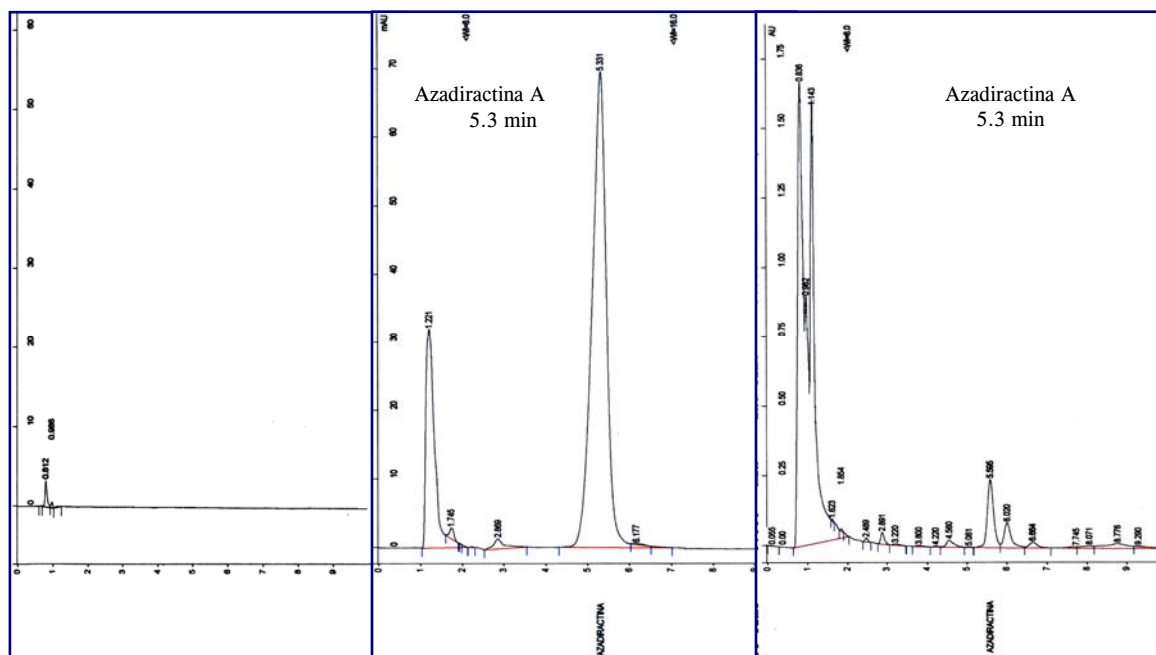


Figura 3. Cromatogramas de líquidos de alta resolución para la determinación de azadiractina A en semillas de nim. a. Fase móvil; b. Estándar de azadiractina A; c. Muestra de semilla de nim.

El análisis estadístico indicó que no hubo una interacción significativa entre el origen del germoplasma y la influencia del ambiente en el cual se desarrollan las plantas. Esto significa que la cantidad de azadiractina A no está condicionada por la interacción de estos dos factores, sino por los efectos principales, mismos que se presentan a continuación.

### Efecto del sitio en que se encuentra el Germoplasma

No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes sitios localizados en el norte y centro de Sinaloa, con medias de 2463 y 2233  $\mu\text{g g}^{-1}$  de azadiractina A en semilla, respectivamente (Figura 4). Esto contrasta en lo reportado por Ermel *et al.* (1987), quienes reportaron una alta variabilidad en el contenido de azadiractina entre muestras de varias regiones geográficas del mundo, y sugieren que dichas diferencias podrían deberse a condiciones ambiental en humedad, precipitación y temperatura. Kumar y Parmar (1997) también evaluaron ecotipos presentes en India y observaron grandes variaciones en el contenido de este limonoide, por lo que igualmente sugirieron que la variación se debe a la intensidad de las precipitaciones pluviales, a las sequías extremas y a la humedad relativa en los diferentes ambientes. En los datos de Sinaloa resultó evidente una alta variabilidad entre las diferentes poblaciones muestreadas, que indican que no hay diferencias significativas dentro de los ambientes evaluados, que se requiere de un tamaño de muestra más elevado, o que no existieron diferencias ambientales importantes entre los sitios muestreados.

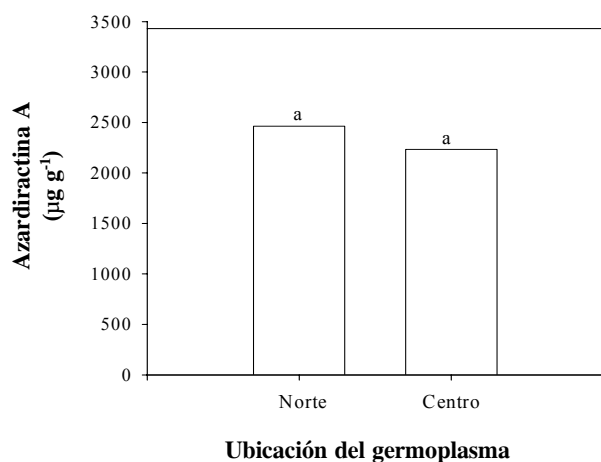


Figura 4. Contenido de azadiractina A en árboles de nim plantados en dos regiones del estado de Sinaloa en México.

### Efecto del origen del germoplasma

El análisis estadístico indicó una alta significancia ( $P < 0.0001$ ) para origen de los árboles como efecto principal.

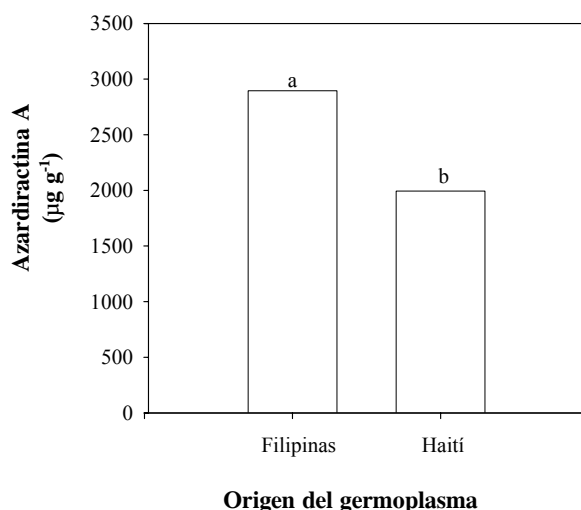


Figura 5. Comparación de medias de contenido de azadiractina A en semillas de árboles de nim presentes en Sinaloa originarios de Haití y Filipinas.

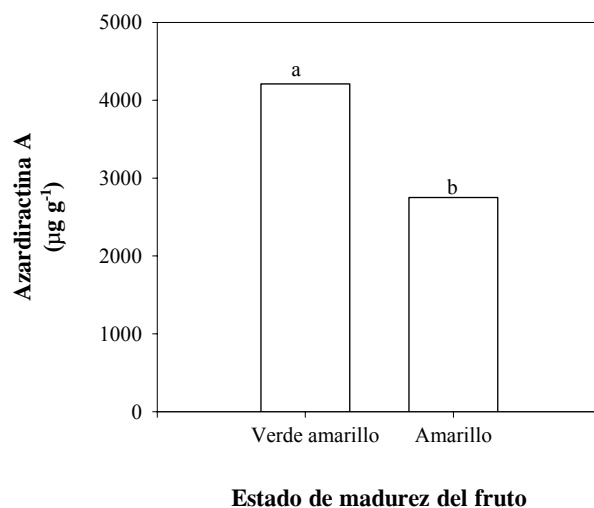


Figura 6. Comparación de medias en el contenido de azadiractina A en semillas de nim colectados en estado verde-maduro y maduro

Los árboles originarios de Filipinas produjeron mayor cantidad de azadiractina, con una media de 2895  $\mu\text{g g}^{-1}$  de semilla, mientras que los árboles originarios de Haití rindieron sólo 1994  $\mu\text{g g}^{-1}$ . En un estudio similar; Sidhu *et al.*

(2003) evaluaron la variabilidad en el contenido de azadiractina A en semillas de nim de árboles originados en diferentes sitios de India; sus resultados sugieren que existen variaciones entre individuos de una misma región, por lo que los factores climáticos no son determinantes para que un ecotipo de nim muestre un alto contenido de azadiractina. Estos autores sugieren que la variabilidad genética puede afectar el nivel de producción de azadiractina. Los resultados obtenidos en Sinaloa muestran que las diferencias en la producción de azadiractina A en una región entre germoplasma de diferente origen, se debe a la variación genética intrínseca, ya que los árboles se encontraban en un mismo sitio y con condiciones muy similares de suelo, clima y agua.

### Efecto de la madurez del fruto

Se determinó que a medida que los frutos maduran, disminuye el contenido de azadiractina A en las semillas. El contenido promedio de azadiractina en semillas de nim de frutos verde-amarillos fue de 4210 Sidhu *et al.* (2003), mientras que en semillas de frutos amarillos, más maduros, el contenido fue de 2750  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Shirish *et al.* (1995) también encontraron que los niveles de azadiractina son más altos en semilla de nim de frutos verde-amarillo que de frutos amarillos, mientras que Ramos *et al.* (2004) reportaron disminuciones significativas después de la madurez fisiológica del fruto.

### CONCLUSIONES

La concentración de azadiractina A en semillas de nim en Sinaloa está determinada por el genotipo, mientras que el ambiente no ejerce un efecto significativo. En Sinaloa los árboles de nim provenientes de Filipinas tienen semillas con mayores concentraciones. No obstante tanto los árboles provenientes de Filipinas como los de Haití producen cantidades de azadiractina suficiente para ser utilizadas como materia prima para la producción de plaguicidas. Por otra parte, el estado de madurez más apto para la colecta de frutos de nim es cuando están cambiando de color verde a amarillo, debido a su alto contenido de azadiractina A en sus semillas.

### AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología y a Fundación Produce, Sinaloa por el financiamiento recibido para la realización de los estudios.

### BIBLIOGRAFÍA

Ambrosino P, R Fresa, V Fogliano, S M Monti, A Ritieni (1999) Extraction of azadirachtin A from neem seed kernels by supercritical

fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. *J. Agric. Food Chem.* 47:5252-5256.

- Benge M D (1989) The tree and its characteristics, cultivation and propagation of the neem tree. *In: Focus on Phytochemical Pesticides*; M Jacobson (ed.). CRC, Boca Raton, Florida. pp:1-17.
- Dai J, V A Yaylayan, G S Vijaya-Raghavan, J R Pare, Z Liu (2001) Multivariate calibration for determination of total azadirachtin-related limonoids and simple terpenoids in neem extracts using vanillin assay. *J. Agric. Food Chem.* 49:1169-1174.
- Ermel K, E Pahlich, H Schmutterer (1987) Azadirachtin content of neem seed kernels from different geographical locations and its dependence on temperature, relative humidity and light. *In: Natural Pesticides from the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and Other Tropical Plants*; Proc. Third International Neem Conf. Nairobi, 1986. H Schmutterer K R S Ascher (eds). German Agency for Technical Cooperation. Eschborn, Germany. pp:171-184.
- Ermel K, E Pahlich, H Schmutterer (1984) Comparison of the azadirachtin content of neem seeds from ecotypes of Asian and African origin. *In: Natural Pesticides from the Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss) and Other Tropical Plants*. Proc. Snd International Neem Conference. Rauschholzhausen, Federal Republic of Germany, 1983. H Schmutterer K R S. Ascher (eds). German Agency for Technical Cooperation Eschborn, Germany. pp:91-94.
- Govindachari T R, G Suresh, G G B Banumathy, S Masilamani (1998) Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica* 26:1-8.
- Govindachari TR, G Sandhya, SP Gandesh-Raj (1991). Isolation of novel azadirachtin H and I by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 31:303-305.
- Jarvis A P, E D Morgan (2000) Analysis of small samples of limonoids of neem (*Azadirachta indica*) using solid phase extraction from tissue culture. *Phytochem. Anal.* 11:184-189.
- Johnson S, E D Morgan (1997). Comparison of chromatographic systems for triterpenoid from neem (*Azadirachta indica*) seeds. *J. Chromatography.* A761:53-63.
- Jones S P, S V Ley, E D Morgan, D Santafianos (1989) The chemistry of neem tree. *In: Focus on Phytochemical Pesticides*. M Jacobson (ed). CRC, Boca Raton, Florida. pp:19-45.
- Kausik B, I Chattopadhyay, RK Banerjee, U Bandyopadhyay (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Sci.* 82:1336-1342.
- Kaushik N (2002) Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Anal. Bioanal. Chem.* 374:1199-204.
- Koul O, M B Isman, C M Ketkar (1990) Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. *Can. J. Bot.* 68:1-11.
- Kumar J, B S Parmar (1997) Neem oil content and its key chemical constituents in relation to agro-ecological factors and regions of India. *Pesticide Res. J.* 9:216-225.
- Mordue A J, A Blackell (1993) Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* 39:903-924.
- Ramos C A, V A González, M Soto, E M Engleman, D A Rodríguez (2004) Variación en contenido de azadiractina en frutos de margaosa durante su desarrollo. *Rev. Fitotec. Mex.* 27 (Número Especial 1):81-85.
- Rembold H (1989) Isomeric azadirachtins and their mode of action. *In: Focus on Phytochemical Pesticides* M Jacobson (ed). CRC, Boca Raton, Florida. pp:47-67.
- Schmutterer H (1990) Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Appl. Rev. Entomol.* 35:271-297.
- Sharma V, S Walia, J Kumar, M G Nair, 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.* 51:3966-3972.

**Shirish R Y, R Thejavathi, B Ravindranath (1995)** Variation of azadirachtin content during growth and storage of neem (*Azadirachta indica*) seeds. J. Agric. Food Chem. 43:2517-2519.

**Sidhu O P, V Kumar, H M Bel (2003)** Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect Azadirachtin content. J. Agric. Food Chem. 51:910-915.