

## DETERMINACIÓN DE LA DL<sub>50</sub> Y TL<sub>50</sub> DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Azadirachta indica* SOBRE *Spodoptera frugiperda*

DETERMINATION OF THE LD<sub>50</sub> AND THE LT<sub>50</sub> ETHANOL'S EXTRACTS OF CELLULAR SUSPENSIONS FROM *Azadirachta indica* OVER *Spodoptera frugiperda*

Paula Andrea Trujillo Ruiz<sup>1</sup>, Leidy Natalia Zapata Restrepo<sup>2</sup>, Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez<sup>3</sup>, Francisco Cristóbal Yepes Rodríguez<sup>4</sup>, Jacqueline Capataz Tafur<sup>5</sup>, Fernando Orozco Sánchez<sup>6</sup>

**Resumen.** La obtención *in vitro* de metabolitos secundarios de neem surge como una alternativa para la posible producción industrial de biocidas. Para la búsqueda de propuestas dirigidas al control de *Spodoptera frugiperda*, se evaluó la eficiencia de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* para determinar la DL<sub>50</sub> y el TL<sub>50</sub> sobre la fase larval del segundo instar (L<sub>2</sub>). Se probaron cuatro concentraciones de los extractos (2.500, 5.000, 10.000 y 30.000 ppm) y el testigo (alcohol 96%) para determinar la mortalidad en el tiempo (0, 12, 18, 25, 40 h). Se determinó una DL<sub>50</sub> a las 12 h de 2.256 ppm (R<sup>2</sup> = 88,54%), a las 18 h de 3.928 ppm (R<sup>2</sup> = 90,3 %), a las 25 h de 2.818 ppm (R<sup>2</sup> = 90,3 %) y a las 40 h de 1.064 ppm (R<sup>2</sup> = 90,3 %). Las dosis de 5.000 ppm, 10.000 ppm y 30.000 ppm, no presentaron diferencia estadística en su acción letal, pero fueron efectivas en el control del insecto.

**Palabras claves:** Cogollero del maíz, metabolitos secundarios, modelos de elección discreta (probit), neem, suspensión celular.

**Abstract.** The production *in vitro* of secondary metabolites from neem arises like an alternative for the possible industrial processing of biocidas. In the search of alternatives for the control of *Spodoptera frugiperda*, were evaluated ethanolic extracts of cellular suspensions from *Azadirachta indica* in order to determine the DL<sub>50</sub> and the TL<sub>50</sub> on the larval state of the second "instar" (L<sub>2</sub>). Four concentrations of the extracts (2.500, 5.000, 10.000, and 30.000 ppm) and the control (alcohol 96%) to determine mortality in the time (0, 12, 18, 25, 40 hours) were compared. It was determined a DL<sub>50</sub> at the 12 hours of 2.256 ppm, (R<sup>2</sup> = 88, 54%), at the 18 hours of 3.928 ppm, (R<sup>2</sup> = 90,30%), at the 25 hours of 2.818 ppm, (R<sup>2</sup> = 90,30%) and at the 40 hours of 1.064 ppm, (R<sup>2</sup> = 90,30%). The doses of 5.000 ppm, 10.000 ppm and 30.000 ppm, didn't present differences statistically significant in their lethal action, but were effective in the insect control.

**Key words:** Cellular suspensions, neem, model of discrete election (probit), secondary metabolites, corn borer.

El maíz (*Zea mays* L.) es un alimento básico en la nutrición humana y animal. El gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith.), es la plaga de mayor importancia económica de esta gramínea (García *et al.*, 2002) y de otros cultivos como sorgo, arroz, caña de azúcar, algodón y pastos (Vélez, 1997). En maíz, ésta plaga ha reducido su rendimiento entre un 35 y 40% (Torres y Cotes, 2005). Además, es una especie polífaga (Sosa, 2003), ampliamente distribuida en América, que puede sobrevivir durante todo el año en áreas tropicales y a medida que las condiciones ambientales se lo permiten, coloniza zonas subtropicales no infestadas (Murua y Virla, 2004).

Las altas infestaciones de esta plaga han hecho que se haga un uso indiscriminado de insecticidas químicos residuales, con dosis de hasta dos y tres veces las indicadas, dejando como consecuencia el desequilibrio biológico y el desarrollo de una resistencia cada vez mayor (García, 1996; Villamizar *et al.*, 2004).

Su manejo ha ocasionado la tolerancia a insecticidas comerciales de los grupos organoclorados, piretroides, carbamatos y clorinados aumentando la frecuencia de individuos (Vergara *et al.*, 2005) o por lo menos la reducción de susceptibilidad del insecto a los productos químicos más utilizados para su

<sup>1</sup> Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <patrujil@unalmed.edu.co>

<sup>2</sup> Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <lnzapato@unalmed.edu.co>

<sup>3</sup> Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ciencias Agronómicas. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <rhoyos@unal.edu.co>

<sup>4</sup> Profesor Asociado. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ciencias Agronómicas. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <fcyepes@unalmed.edu.co>

<sup>5</sup> Ingeniera Química. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. A.A., Medellín, Colombia.

<sup>6</sup> Profesor Asistente. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. A.A. 1779, Medellín, Colombia. <feorozco@unal.edu.co>

Recibido: Marzo 8 de 2008; Aceptado: Septiembre 22 de 2008.

Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín 61(2): 4564-4575. 2008.

control (Zenner de Polonia y Borrero, 1992). Adicionalmente, se podría afectar severamente el ambiente al alterar las poblaciones de enemigos naturales, fauna y flora asociada, así como también posibles problemas de contaminación (Torres y Cotes, 2005), lo que ha hecho necesario que se busquen nuevas alternativas de manejo (Borrero y Zenner de Polonia, 1996). De acuerdo con García *et al.* (1999) para su control, alternativamente, se incursiona con derivados de plantas, que actúan como biocidas.

En la búsqueda de tales alternativas promisorias para el control de esta plaga, se destaca el uso del extractos de hojas y frutos del árbol de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) originario de la India (Gutiérrez *et al.*, 1999). Este árbol ha sido utilizado a lo largo de los años en el mundo con facultades bioinsecticidas (Jacobson *et al.*, 1983). Según Shultz *et al.* (1992), su empleo data desde el año 1900 y a partir de ese entonces se aprovecha para el control de diferentes plagas agrícolas. Además, ante las restricciones sanitarias impuestas por muchos países a los residuos de plaguicidas en productos animales y vegetales se ha hecho imprescindible la búsqueda de otras sustancias, alternativas y métodos para controlar a los insectos (Echeverri *et al.*, s.f).

Los productos derivados del neem son altamente efectivos en su actividad como plaguicida, con efectos específicos en los diferentes estados del crecimiento de los insectos, actuando como antialimentarios y de repelencia ocasionados en los órdenes Coleóptera, Homóptera, Orthóptera, Hemíptera, Lepidóptera, entre otros (Capataz *et al.*, 2002). Las propiedades del neem podrían estar basadas en el parecido que presentan sus componentes con las hormonas, de tal forma que los cuerpos de los insectos absorben los metabolitos del neem como si fueran realmente hormonas bloqueando su sistema endocrino. El comportamiento profundamente arraigado resultante y las aberraciones psicológicas, dejan a los insectos tan confundidos en su cuerpo y cerebro, que no pueden reproducirse y sus poblaciones se reducen (Ramos, 1999). Además, Sidhu (1995) afirma que el especial interés por su uso se debe a la alta biodegradación de sus principios activos, su fácil consecución y por tanto un recurso económico para ser utilizado en planes de Manejo Integrado de Plagas (MIP).

Actualmente existen diferentes técnicas de aplicación del neem, especialmente por extractos obtenidos de semillas. Aunque este árbol se adapta en regiones tropicales como las que presenta Colombia (Jotwani y Srivastana, 1981), sólo una vez al año se producen semillas de neem y una pequeña porción de estas es aprovechable (Prakash y Srivastava, 2005) por lo cual es necesario implementar técnicas de producción a gran escala que brinden altos rendimientos, que conserven la eficiencia y que sean económicamente factibles.

Sabillón y Bustamante (1996) y Iannacone y Murrugara (2001), citados por Iannacone y Montoro (2002) afirman que los productos naturales neem y rotenona son insecticidas botánicos, que no persisten en el ambiente, ni presentan una toxicidad aguda para animales y el hombre en comparación con los plaguicidas químicos convencionales. En Nicaragua Cano y Giadstone (1994) sostienen que en los programas de Manejo Integrado de Plagas del Melón no hubo una merma significativa del parasitismo por *Trichogramma pretiosum*, en el control de los lepidópteros, por lo que estas dos tecnologías pueden combinarse con éxito en un programa de esta envergadura.

El cultivo de células *in vitro* de *A. indica* es un método alternativo para la producción de sus metabolitos secundarios. Según Orozco *et al.* (2002) la producción por éste método es independiente de las variaciones climatológicas y problemas asociados con los cultivos, como los problemas sociales y de la tenencia de la tierra. De acuerdo con Gómez y Villamizar (2000) el logro de un bioplaguicida a base de esta planta, y del crecimiento de sus células en suspensiones celulares, implica el cumplimiento de varias etapas que garanticen la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Las etapas comprenden la extracción de los principios activos, la evaluación de su acción insecticida, su producción masiva, los estudios de preformulación, formulación, determinación de dosis y formas de aplicación, estudios de toxicidad, ensayos de campo, determinación de los mecanismos de biocontrol, estudios de impacto ambiental, caracterización molecular, estudios de mercado y patentamiento, (Gómez y Villamizar, 2000).

Esta investigación se realizó con el objeto de conocer *in vitro*, la eficiencia de los extractos etanólicos de

suspensiones celulares de callos de semilla de neem, determinando la dosis en ppm necesaria para generar mortalidad sobre *S. frugiperda* en su estado L<sub>2</sub>, estableciendo así su dosis letal DL<sub>50</sub> y el tiempo letal de TL<sub>50</sub> en condiciones de laboratorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en los laboratorios de Control Biológico y Crecimiento y Desarrollo Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede de Medellín, con una temperatura de  $22 \pm 2$  °C, humedad relativa de  $70 \pm 10$  %, y fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. Las larvas iniciales para el pie de cría fueron obtenidas de una colonia mantenida por 8 meses en el mismo laboratorio con alimentación natural (hojas tiernas de maíz). La población inicial fue sometida al proceso de hibridación con especímenes obtenidos de un ecosistema de maíz del Valle de Aburrá para mantener la diversidad genética entre la población y evitar la endogamia. Las evaluaciones se realizaron con larvas en segundo instar, de 1,2 mm en promedio.

**Material vegetal.** Las suspensiones celulares fueron suministradas por el laboratorio de Crecimiento y Desarrollo de Plantas. Estas se prepararon con base en la metodología de Capataz (2005), la cual consistió en sembrar las células en medio líquido con las sales básicas MS (Murashige y Skoog, 1962) utilizando  $4,4 \text{ g L}^{-1}$  (SIGMA®, S 6899), con contenido de macro y micro elementos; suplementado con azúcar común al 3%,  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  mio-inositol ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de tiamina,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido nicotínico, glicina  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de piridoxina-HCl;  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido indol butírico (IBA) y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de 6-benzil amino purina (BAP); se ajustó a un pH de 5,8. Como solidificante se utilizó  $1,75 \text{ g L}^{-1}$  de phytigel. El color y apariencia de las suspensiones celulares son de suma importancia. Ellas deben tener un color amarillo crema y pequeños agregados celulares.

**Extractos etanólicos.** Se prepararon con suspensiones celulares provenientes de un cultivo de callos, los cuales a su vez provenían de semillas. Se trabajó con tres suspensiones celulares de nueve días de subcultivo, cada una con 50 ml, las que fueron filtradas en un equipo de filtración. De ellas se obtuvieron 9,75 g de

base fresca de biomasa celular (5 g de base seca). Para la extracción se utilizó etanol al 96%. Los 9,75 g de biomasa fresca fueron extraídos con 10 ml de etanol al 96% a 40 °C y agitación continua durante 30 min y luego filtrada al vacío. Este procedimiento se realizó 3 veces hasta obtener 30 ml de extracto etanólico, al cual se le adicionó 5 g de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) para retirar el exceso de agua, siendo nuevamente filtrado al vacío. Luego los extractos fueron concentrados al vacío hasta sequedad en un rotoevaporador R-3000 Büchi por debajo de 45 °C. Los gramos del pellet obtenido (concentrado de metabolitos secundarios) fueron disueltos nuevamente en el etanol, a una concentración de 30.000 ppm (ppm= mg kg<sup>-1</sup>) y posteriormente se realizaron diluciones a 10.000 ppm, 5.000 ppm y 2.500 ppm. Todos los extractos fueron almacenados a - 4 °C hasta su uso.

**Evaluación de la DL<sub>50</sub> y El TL<sub>50</sub>.** El presente estudio se diseñó, utilizando como parámetro, el trabajo realizado por Negrete (2003) en donde evaluaron extractos etanólicos de semilla de neem, sobre *S. frugiperda* en su estado (L<sub>2</sub>) y se encontraron dosis de mortalidad desde las 2.000 ppm. A partir de ésta referencia se aumentó la dosis a 2.500 ppm, 5.000 ppm, 10.000 ppm y 30.000 ppm (mg/kg), para comprobar la letalidad de las suspensiones celulares de esta planta. Las lecturas del bioensayo se realizaron a las cero (0), 12, 18, 25, y 40 h, registrando el porcentaje de mortalidad y determinando el tiempo al cual murió el 50% de la población (TL<sub>50</sub>) para cada extracto evaluado. Las larvas muertas fueron retiradas con su respectiva caja Petri.

En el análisis estadístico se utilizó un modelo de probabilidad no lineal con especificación de los modelos de elección discreta (Probit) y un modelo estadístico completamente al azar, analizado por el método de medidas repetidas en el tiempo, con un  $\alpha = 0,05$ . Cada tratamiento tuvo 5 repeticiones y cada repetición con cinco unidades experimentales (125 unidades experimentales). Cada unidad experimental comprendió de una caja de Petri de 8,5 cm de diámetro, sellada con papel de vinilpel, las cuales contenían una película de agar para sostener un disco de hoja tierna de maíz "montaña" de 2,25 cm<sup>2</sup>, retirados con un sacabocado metálico. Los discos de hojas fueron sumergidos con diferentes

concentraciones del extracto etanólico por espacio de 5 minutos antes de introducirlos a la caja de Petri y cada disco con su respectiva larva en L<sub>2</sub>. Las larvas utilizadas fueron sometidas a un período de ayuno por 6 h antes de montar el bioensayo, para garantizar el consumo del disco de hoja.

La mortalidad de las larvas se determinó por medio de su observación continua (Borrero y Zenner de Polonia, 1996), y con la ayuda de una aguja debidamente esterilizada, y aceptando lo afirmado por Machado (1991), quien asegura que la inspección ocular no garantiza con certeza el estado de muerte larval de ningún insecto, se realizaron punciones suaves con aguja sobre el cuerpo de la larva. Además, la sintomatología presentada por las larvas afectadas, la apariencia inicial de color café claro y acortamiento del cuerpo, hasta aparentar una sequedad intensa, también fueron los signos indicadores del efecto del tratamiento sobre el descarte de las larvas.

La efectividad del tratamiento se calculó con la fórmula de Abbott (1925).

$$E = \frac{(\%IT - \%ITr)}{\%IT} * 100$$

Donde: E: Efectividad, IT: infestación en el testigo, ITr: Infestación en el tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

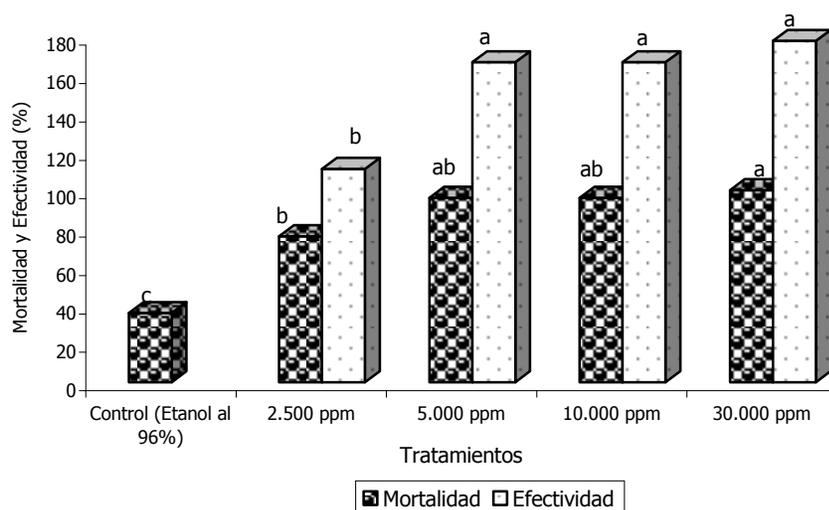
En los ensayos biológicos se utilizaron larvas de segundo instar (L<sub>2</sub>) de *S. frugiperda*, debido a que los primeros estadios de lepidópteros son los más vulnerables a distintos factores bajo condiciones de en campo, (Bosa *et al.*, 2004). Además, la composición estructural y bioquímica (ej, aminoácidos) de la superficie del integumento de las larvas, varía según el estadio larval en el que se encuentren y la proximidad a la muda. Los metabolitos presentes en los extractos de neem en el sistema neuroendocrino de los insectos, controlan

a su vez la síntesis de las hormonas ecdisona y juvenil, (Rembold *et al.*, 1984) citados por Ramos (1999) impidiendo el debido proceso de muda, motivo por el cual en la medida que disminuye el ínstar del insecto evaluado, aumenta la morbilidad de los metabolitos. Las larvas seleccionadas para el bioensayo presentaron un peso promedio entre 5,8–6,3 mg.

El empleo de etanol para la extracción se debió a que este es el proceso más directo para la producción de materias pesticidas en forma más concentradas (Vergara *et al.*, 2005). Correa y Ruge (2004) describen el proceso y afirman acerca de su baja toxicidad y selectividad. Jaramillo (1996) y los informes de la "National Research Council" de 1992 afirman que los metabolitos secundarios del neem son libremente solubles en solventes orgánicos como hidrocarburos, alcoholes y cetonas. Con todo esto Roel (1998) citado por Iannacone y Lamas (2003) ha señalado que la efectividad de un extracto botánico depende de la sustancia orgánica empleada para su extracción.

Estudios anteriores sobre la utilización del neem como insecticida se han enfocado en la extracción de metabolitos secundarios de las semillas, donde se encuentra la mayor concentración de los mismos, (Correa y Ruge, 2004). De igual forma Negrete (2003), entre otros autores, enuncian la inferioridad de la concentración de los metabolitos secundarios, presentes en hojas y tallos comparativamente con los de la semilla.

De acuerdo a la fórmula de Abbott (1925) los tratamientos que presentaron un porcentaje igual o superior al 70 % de eficiencia en la protección del disco de hoja de maíz, con respecto al testigo (Etanol al 96%) con un porcentaje de efectividad del 36 %, fueron los de 2.500 ppm, 5.000 ppm, 10.000 ppm, y 30.000 ppm, a las 40 h de aplicada los tratamientos. El grado de efectividad de cada tratamiento fue de 111.1, 166.7, 166.7 y 177,8% respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Tratamientos y concentraciones de extractos etanólicos de *Azadirachta indica*, empleados para la protección de hojas de maíz atacados por larvas de *Spodoptera frugiperda*. Mortalidad y efectividad, a las 40 horas de observación en laboratorio.

Al determinar la  $DL_{50}$  y la  $DL_{90}$  se observó que los porcentajes de mortalidad menores se alcanzaron cuando se aplicó el control (Etanol al 96%) con un 36 % y una eficiencia según la fórmula de Abbott de cero (0,0 %). Sólo se obtuvieron 9 larvas muertas en

las 40 h (Tabla 1). Esta respuesta confirma que el solvente extractor no es el responsable de la mortalidad larvaria registrada en las demás concentraciones.

**Tabla 1.** Mortalidad acumulada por hora de *Spodoptera frugiperda* (número de individuos muertos) de acuerdo con la concentración del extracto etanólico a partir de suspensiones celulares de azadiractina.

Tratamientos	0 horas	12 horas	18 horas	25 horas	40 horas	Total por tratamiento	Efectividad (%)
Control (Etanol al 96%)	0	7	0	2	0	9	36
2.500 ppm	0	13	0	1	5	19	76
5.000 ppm	0	12	0	2	10	24	96
10.000 ppm	0	14	0	6	4	24	96
30.000 ppm	0	14	11	0	0	25	100

El total de larvas utilizadas por tratamiento en el bioensayo fue = 25 larvas equivalentes al 100%

La mortalidad mayor al 50 % se obtuvo con todas las concentraciones utilizadas. A las 12 h se alcanzó el 52, 48, 56 y 60 % respectivamente, incrementándose al 56, 56, 80 y 100 % a las 18 h de realizado el experimento. Negrete (2003) en sus investigaciones afirma que la dosis de 5.000 ppm fue la responsables del deceso del 70 % de la población larval de *S. frugiperda*, y la de 10.000 ppm de la muerte del 100% de los noctuidos.

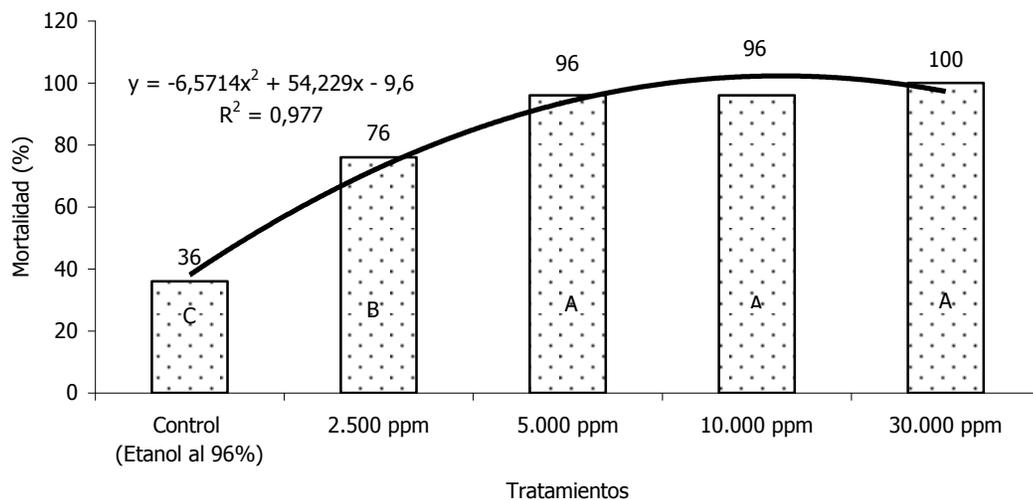
Según Molina (2001), la mortalidad por ingestión ocurre entre 3 y 5 días, Hellpap (1983) asegura que durante los primeros 4 días no hubo diferencia entre los tratamientos y el testigo, estas respuestas sólo comenzaron a notarse a partir del sexto día, pero antes de este tiempo se detiene el proceso de alimentación y por tanto, cesa el daño al cultivo, (Molina, 2001).

Estadísticamente no hubo diferencia significativa entre las dosis de 5.000 ppm, 10.000 ppm y 30.000

ppm a las 40 h, (Figura 1). La dosis de 2.500 ppm presentó una mortalidad del 76% (Tabla 1). También, se observó que a través del tiempo existió una eficiencia progresiva de los tratamientos en el control de los insectos.

Las dosis de 5.000 ppm, 10.000 ppm y 30.000 ppm no presentaron diferencia estadísticamente significativa en la mortalidad presentada a las 25 y 40 h, obteniéndose el 96 y 100 % respectivamente (Figura 2). A estas dosis, probablemente el efecto ya no se consideraría como antialimentario, por el contrario se estima, una acción tóxica en el individuo dado que Simmons *et al.* (1983) proponen que

cuando éstas son altas causan un efecto neurotóxico directo sobre las larvas, mientras que cuando son bajas las concentraciones, desestiman la ingesta, actuando de igual manera a nivel neuronal. Además, Ruiz y Cárdenas (1993) mencionan estudios similares frente a la letalidad del 100% en poblaciones de *Hypothenemus hampei*, a las 20 h, con dosis de 1.000 ppm con extractos de neem en condiciones de laboratorio. Colonia y Gómez (1995) sostienen que los extractos de neem, llantén, pronto alivio y artemisa presentan efectos de mortalidad similares, utilizando larvas de *S. frugiperda* al evaluar las concentraciones de 10.000 y 5.000 ppm a las 24 h.



**Figura 2.** Mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* a las 40 horas de sometidas a la acción de extractos etanólicos de *Azadirachta indica*.

Simmons *et al.* (1983) sugieren que los metabolitos secundarios del neem causan efectos neurofisiológicos a altas concentraciones y el efecto antialimentario es considerado indirecto, porque de manera contraria, se inhibe la señal fagoestimulante causada por una neurona; aunque la investigación se realizó sobre dieta artificial y sobre organismos de mayor estado de desarrollo, encontraron letalidad de las concentraciones de neem, en correlación con la polifagia de las especies evaluadas, y su estado de desarrollo, pues a menor estado de desarrollo, mayor letalidad de las diferentes concentraciones sobre los insectos.

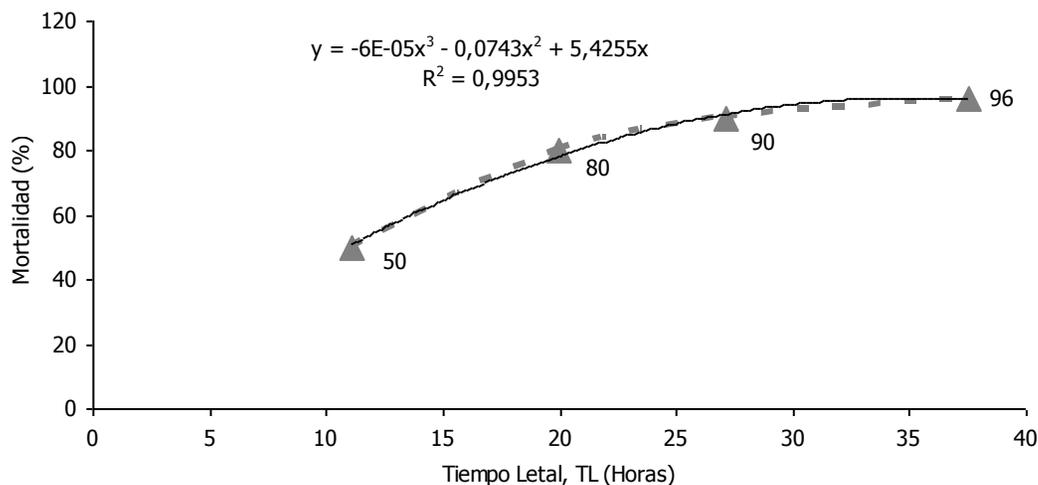
Otros investigadores como Benavides *et al.* (2001) afirman que los compuestos de neem interfieren en diversas fases del desarrollo de los artrópodos debido a que son inhibidores de quitina, algunos producen efectos antialimentarios, y por tanto el efecto de mortalidad inmediata es limitado.

No obstante, también ha quedado probado que algunos efectos reguladores del crecimiento de la azadiractina se entienden por la acción directa de esta sobre la movilidad intestinal en el caso de *Locusta migratoria*. Esto quizás lleva a interferir en el

proceso de la metamorfosis influyendo en sus diferentes etapas, (Ramos, 1999).

Al evaluar el efecto de los metabolitos presentes en los extractos utilizados a las diferentes horas existen diferencias estadísticas en el tiempo de exposición a los tratamientos evaluados, en la mortalidad larval ( $P_v = 0,0004$ ). A 30.000 ppm a las 18 h se tuvo el 100 % de la mortalidad larvaria, a 10.000 ppm y 5.000 ppm a las 40 horas se alcanzó el 96 %, y a 2.500 ppm, a las 40 h se registró el 76 % (Figura 3). A mayor dosis, el tiempo de exposición de las larvas

al efecto de los metabolitos para provocar su muerte fue menor. Esta respuesta, según Ramos, (1999) se debió al efecto residual de los productos del neem, aproximadamente de cinco a siete días. Algunos investigadores afirman que esto parece ser suficiente para obtener un buen control de plagas. Bajo condiciones tropicales y subtropicales de agua permanente, pierden las fuerzas las ninfas y larvas de los insectos, compensándolo con repetidas e intensivas ingesta de alimentos de su hospedero. En tales casos el efecto antialimentario es vencido a las pocas horas, (Ramos, 1999).



**Figura 3.** Efecto de extractos etanólicos de *Azadirachta indica* en el control de larvas de *Spodoptera frugiperda*.

El valor Probit identificado como el  $TL_{50}$  fue de 11,1 h. A sí mismo se determinó el  $TL_{80}$  de 19,9 h, el  $TL_{90}$  de 27,1 h y el  $TL_{96}$  de 37,6 h, ( $P_v = 0,0004$ ), con un coeficiente de determinación ( $R^2$  de 99,53 %) (Figura 3). Los resultados de  $TL_{50}$  coinciden con los encontrados por Colonia y Gómez (1995) donde reportaron efectos letales sobre las larvas después de las 12 h de comenzado el bioensayo. Según Shultz *et al.* (1992) la respuesta de mortalidad de las larvas, se debe sólo al tiempo de acción que duren los metabolitos secundarios del neem.

Desde las 25 horas de establecido el bioensayo las larvas aun vivas comenzaron el proceso de cambio de ínstar larval, por lo que el efecto de mortalidad de larvas en los tratamientos después de estas horas podría estar muy influenciado por la azadirachtina y sus derivados los cuales generarían desordenes

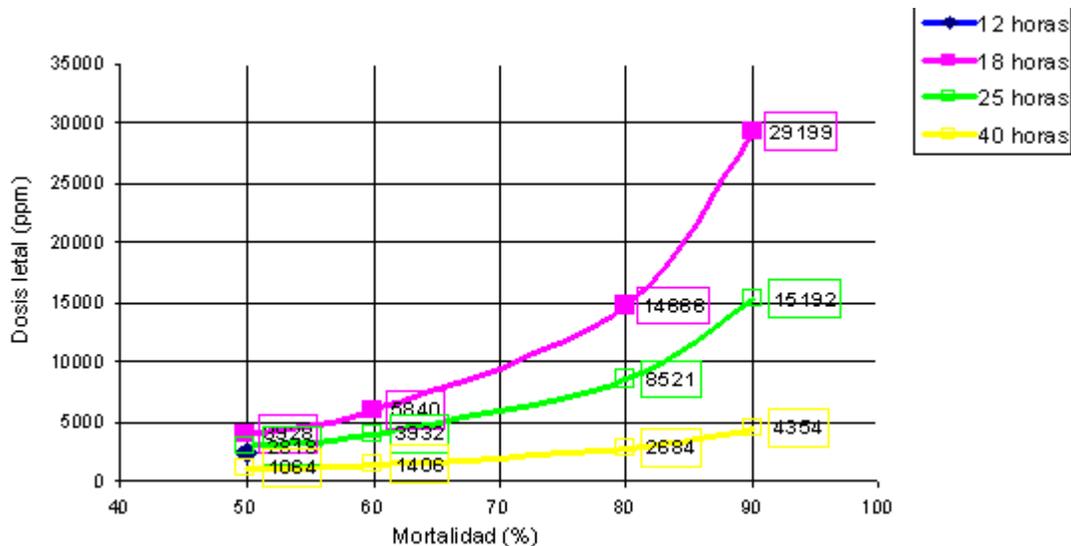
hormonales por la afección de las células neurosecretoras del cerebro, causando inhibición del crecimiento de la cutícula (integumento) (Schmutterer, 1990), porque de acuerdo con Redfern *et al.* (1981) citados por Gutiérrez *et al.* (1999) la azadiractina bloquea los receptores de ecdisonas debido a que sus estructuras químicas son similares, además de afectar la síntesis de la hormona juvenil. Según Kubo y James (1982) citados por Correa y Ruge (2004), *S. frugiperda* reduce el desarrollo de sus estadios en un 95% y mueren por estrangulamiento dentro de sus exoesqueletos con apenas 1 ppm de azadiractina pura.

A todo esto, Hellpap (1983) concluyó que el  $TL_{50}$  y el  $TL_{100}$ , varía de acuerdo con la edad de las larvas, de igual manera encontró una correlación entre el

tiempo de acción y la concentración de azadirachtina purificada de semillas. A su vez él determinó que larvas jóvenes sometidas a concentraciones de 5 ppm de azadirachtina sobrevivían por encima de 33 días, con 10 ppm, 26 días y con 100 ppm hubo una mortalidad total después del día noveno. Correa y Ruge (2004) registran una acción tóxica con 185 ppm de extractos totales, extraídos de semilla sin presencia de testa. Hellpap (1983) halló mortalidades del 100% con 50 ppm azadirachtina pura de extractos de semilla y TL<sub>100</sub> de un día de emergidas con extractos etanólicos, lo cual corrobora la efectividad en poco tiempo de los extractos de neem y la correlación inversa encontrada entre la edad de las larvas y el efecto letal de los extractos, pues a menor edad larval mayor acción letal. Según Ramos (1999), se ha comprobado la efectividad

contra más de 175 especies evaluadas, a dosis de tan sólo 10 ppm de azadirachtina.

El análisis estadístico Probit determinó una DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> a las 12 h de 2.256 ppm y 3.130 ppm con un R<sup>2</sup> = 88,54%. A las 18 h una DL<sub>50</sub> = 3.928 ppm y DL<sub>90</sub> = 29.199 con un R<sup>2</sup> = 90,30%. A las 25 h una DL<sub>50</sub> = 2.818 ppm y DL<sub>90</sub> = 15.192 ppm con un R<sup>2</sup> = 90,30% y a las 40 h una DL<sub>50</sub> = 1.064 ppm y DL<sub>90</sub> = 4.354 ppm con R<sup>2</sup> = 90,30%, (Figura 4). Los estudios realizados por Negrete (2003), identificaron que 2.000 ppm de extractos de semilla de neem fueron insuficientes para causar el 50 % de mortalidad de las larvas de *S. frugiperda*, conclusiones que orientaron el presente trabajo para plantear la propuesta de utilizar las concentraciones anotadas.



**Figura 4.** Dosis de extractos etanólicos de *Azadirachta indica* que causan mortalidad a larvas de *Spodoptera frugiperda* en diferentes horas de observación.

Estos resultados indican que para adelantar proyectos tendientes a un control de la población de la plaga en campo, se podría pensar en aplicaciones con concentraciones bajas en ppm del extracto vegetal en consideración, lo que se traduce en un ahorro de tiempo y dinero en las etapas posteriores de producción masiva y formulación del producto, necesarias para el desarrollo de un bioplaguicida, pretensión posterior del proyecto al cual pertenece esta investigación.

Los valores de DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub>, obtenidos permiten afirmar que los metabolitos presentes exhiben un modo de acción insecticida y además es un recurso promisorio para el control de larvas en condiciones de laboratorio (Tabla 1). Otros autores como Teixeira *et al.* (2003) manifiestan que en evaluaciones sobre las larvas de *S. frugiperda* con las concentraciones de 3.600 a 10.000 mg L<sup>-1</sup>, estas presentaron diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de mortalidad, mostrando eficiencias del 79, 37 y 100 % respectivamente.

Estas respuestas son contrarias a las obtenidas por Allan *et al.* (2002) donde en algunas pruebas sobre *Schistocerca gregaria* en iguales condiciones, no se encontró diferencias de mortalidad a partir de las concentraciones extraídas de los callos. De igual manera, Iannacone y Reyes (2001) en investigaciones realizadas en Perú, tampoco encontraron diferencias de mortalidad poblacional para las larvas y adultos de *Liriomyza huidobrensis* y para los parasitoides *Halticoptera arduine* y *Diglyphus* spp. bajo los insecticidas botánicos basados en neem (Neem -X®), producto comercial de extractos de semilla etanólicos con una concentración de azadirachtina 16-28 mg/L. Tampoco se observó diferencia significativa sobre la mortalidad de las ninfas y huevos de *Metacanthus tenellus* (*Heteroptera Berytidae*) con el mismo producto (Iannacone y Murrugara, 2001).

De acuerdo con la Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas en América Central (RAPAC), para el control de *S. frugiperda* se recomienda el uso de *A. indica*, (CNMIP y RAPAC, 2001-2002). Afirmación que apoya Iannacone y Lamas (2003), asegurando que puede utilizarse en los programas MIP, en interacción con el uso del depredador *Chrysoperla externa* Hagen (Neuroptera: Chrysopidae), en las concentraciones adecuadas. Según Pérez y Vázquez (1999), la importancia de los extractos de neem para la agricultura sostenible y sustentable, consiste en tener sólo una ligera acción de contacto, la sustancia tiene que ser ingerida para que actúe, por lo que su efecto sobre los enemigos naturales es limitado, además la diversidad de sustancias bioactivas que contiene hace que los riesgos de que se desarrolle resistencia sean mínimos. Lo anterior también lo ratifica Gomero (2002), al afirmar que las sustancias derivadas del neem no son tóxicas para los seres humanos y mamíferos en general, ni para las aves, reptiles y peces.

El uso de los extractos de neem no se limita al control de plagas agrícolas. Se ha encontrado que son efectivos en el control de ectoparásitos del ganado vacuno como la garrapata (*Boophilus microplus*) y como vermífugo, en gallinas ponedoras para el control del ácaro (*Megninia gynglimara*) y del piojo aviar (*Menopon gallinae*) lo mismo que para el control de los ácaros de la sarna cunícula y porcina. Piojos, pulgas y otros ectoparásitos de los animales domésticos también se han controlado con

resultados excelentes (Estrada y López, 1998) citados por Pérez y Vázquez (1999).

## CONCLUSIONES

Las concentraciones de 2.500 ppm, 5.000 ppm, 10.000 ppm y 30.000 ppm provenientes de suspensiones celulares de *A. indica* con solvente etanólico, ejercen un efecto letal sobre las larvas de *S. frugiperda* en su estado (L<sub>2</sub>).

Existe una diferencia en el tiempo de acción letal de las concentraciones evaluadas sobre las larvas.

La producción de metabolitos secundarios mediante el uso de cultivos celulares de *A. indica*, ofrece la posibilidad de producir extractos de una manera más controlada y estable.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan agradecimientos muy especiales, por toda la colaboración prestada durante el desarrollo del proyecto y corrección del informe final al profesor Rodrigo Antonio Vergara Ruiz, docente del Departamento de Ciencias Agronómicas de la Universidad Nacional de Colombia, Sede de Medellín.

## BIBLIOGRAFÍA

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economy Entomology* 18: 265-267.

Allan, E.J., J.P. Eswara, A.P. Jarvis, A.J. Mordue, E.D. Mergan and T. Stuchbury. 2002. Induction of hairy root cultures of *Azadirachta indica* A. Juss. and their production of azadiractin and other important insect bioactive metabolites. *Plant Cell Rep.* 21(4): 374-379.

Benavides, E.O., G.M. Hernández, A. Romero, H.A. Castro y J.B. Rodríguez. 2001. Evaluación preliminar de extractos de neem (*Azadirachta indica*), como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida). *Revista Colombiana de Entomología* 27(1-2): 1-8.

Borrero, F.F. y I. Zenner de Polonia. 1996. Metodología de bioensayo para evaluar la

- susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) a formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis ssp. Kurstaki*. Agricultura Tropical 33(3): 43-51.
- Bosa, C.F., D. Chávez, L. Torres, A. París, L. Villamizar y A.M. Cotes. 2004. Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología 30(1): 94.
- Cano, E.V. y S.M. Giadstone. 1994. Efecto del insecticida botánico, Nim-20, sobre el parasitismo por *Trichogramma pretiosum* en huevos de *Helicoverpa zea* en el cultivo del melón. Manejo Integrado de Plagas Costa Rica 33: 23-25.
- Capataz, J.T. 2005. Efecto de elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *Azadirachta indica* y su efecto sobre *Spodoptera sp.* Tesis Magíster en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 80 p.
- Capataz, J.T., F.S. Orozco, R.S. Hoyos y R.R. Vergara. 2002. Efecto de elicitores abióticos sobre la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de *Azadirachta indica* y su efecto sobre *Spodoptera sp.* Proyecto de investigación, convocatoria DIME 2002. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 9 p.
- CNMIP, RAPAC. 2001-2002. Alternativas comprobadas para sustituir a doce plaguicidas incluidos en el acuerdo No. 9 de la XVI reunión de la resscad para su restricción. Comité Nacional de Manejo Integrado de Plagas (CNMIP), Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas en América Central (RAPAC). pp. 19-27. Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA).
- Colonia, M.G y R.G. Gómez. 1995. Evaluación insecticida de cuatro extractos de plantas sobre el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Trabajo de grado: Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 52 p.
- Correa, F.M. y A.M. Ruge. 2004. Obtención de un insecticida de origen botánico a partir del árbol del Neem (*Azadirachta indica*). Trabajo de grado de Ingeniero Químico. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 91 p.
- Echeverri, F., J.C. Marín y F. Torres (s.f.). Insecticidas naturales, realidad y ficción. Universidad de Antioquia. Departamento de Química. Medellín. 100-101 p.
- García, F.R. 1996. Integración de métodos para el manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith). pp. 59-64. En: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Colombiano Agropecuario, División de Sanidad Vegetal-Unidad de Proyectos de Prevención (ed.). Manejo integrado de plagas y enfermedades en maíz y sorgo. Boletín de Sanidad Vegetal No. 13. Palmira.
- García, F.R., M.E. Mosquera, C.A. Vargas y L.A. Rojas, 2002. Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. Revista Colombiana de Entomología 28 (1): 53-54.
- García, F.R., T.A. Mosquera, C.A. Vargas y L. Rojas. 1999. Manejo Integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith). Boletín informativo N° 7. Convenio Corpoica-PRONATTA. Palmira. 18 p.
- Gomero, L.O. 2002. Plantas que protegen a otras plantas: Una alternativa a los cultivos GM resistentes a las plagas. Revista de Agroecología, LEISA. 17(4):17.
- Gutiérrez, S.G., C.H. Rodríguez, D. Bergvinson, A.C. Carballo, J.V. Leyva y A.G. Martínez. 1999. Inhibición del crecimiento de larvas de gusano cogollero con extractos acuosos de neem *Azadirachta indica*. Avances de la investigación. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. 1-2 p.
- Hellpap, C. 1983. Effects of neem kernel extracts on the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. pp. 353-364. En: Memorias. Proc. 2<sup>nd</sup> int. neem Conf. Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants. Rauschholzhausen.

- Iannacone, J. y G. Lamas. 2003. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. *Entomotropica* 18(2): 95-105.
- Iannacone, J.O. y I.Z. Montoro. 2002. Impacto de dos productos botánicos bioinsecticidas (azadiractina y rotenona) sobre la artropofauna capturada con trampas de suelo en le tomate en ICA, Perú. *Revista Colombiana de Entomología* 28 (2): 192, 196.
- Iannacone, J.A. y M.U. Reyes. 2001. Efecto en las poblaciones de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) por los insecticidas botánicos neem y rotenona en el cultivo de tomate en el Perú. *Revista Colombiana de Entomología* 27(3-4): 147-152.
- Iannacone, J.A. y Y.B. Murrugara. 2001. Efecto de las poblaciones del predador *Metacanthus tenellus* (Heteroptera: Berytidae) por los insecticidas botánicos rotenona y neem en el cultivo de tomate en el Perú. *Revista Colombiana de Entomología* 26(3-4): 94-96.
- Jacobson, M., D.J. Stokes, D.J. Warthen, K.D. Redfren, E.R. Webb and L. Telek. 1983. Neem research in the U.S. department of agriculture: an update. 31 p. En: *Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants*.
- Jaramillo, L.F. 1996. Algunas generalidades acerca del neem (*Azadirachta indica* A. Juss) segunda parte. Grupo de Recursos Vegetales Promisorios. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Boletín 3.
- Jotwani, M.G. and K.P. Srivastava. 1981. Neem insecticide of the future. 1: As protectant against stored graun pests. *Pesticides* 15(10): 19-23.
- Machado, D.N. 1991. Biología, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populaces de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificillas. Tese de Doctor em Ciências, Área de concentração: Entomologia. Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 28-53 p.
- Molina, N. 2001. Uso de extractos botánicos en control de plagas y enfermedades. *Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 59: 76-77.
- Murua, M.G. and E.G. Virla. 2004. Presencia Invernal de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el Área Maicera de la Provincia de Tucumán, Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, Argentina* 105 (2): 46-47.
- Nacional Research Council. 1992. *Neem: A tree for solving global problems*. Washington: Nacional Academy Press. 141 p.
- Negrete, F.B. 2003. Uso de insecticidas no convencionales para el manejo integrado de plagas en yuca, maíz y tabaco con productores de economía campesina e indígena en la región del caribe. Programa Regional de Investigación Agrícola. C.I. Turipaná, Cereté.
- Orozco, F.S., R.S. Hoyos y M.Z. Arias. 2002. Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 55(1): 1.474–1.478.
- Pérez, N. y L.L. Vázquez. 1999. Manejo Ecológico de Plagas. pp. 204-207. En: *Transformando el campo cubano*. Centro de Estudios de Agricultura Sostenible (CEAS), Universidad Agraria de La Habana y Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV). 253 p.
- Prakash, G. and A. Srivastava. 2005. Modeling of azadirachtin production by *Azadirachta indica* and its use for feed forward optimization studies. *Biochemical Engineering Journal* 29(1-2): 62-68.
- Ramos, R.S. 1999. Aceite de neem un insecticida ecológico para la agricultura. En: *Revista Zoe Tecnológico*. ESPAÑA. <http://www.portalecologico.com>. 1-9 p.; consulta: noviembre 2006.
- Ruiz, L. y R. Cardenas. 1993. Efecto insecticida en el laboratorio de la azadirachtina sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolitidae). p.142. En: *Memorias. XX Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología*. Cali.

- Schmutterer, H. 1990. Properties and potencial of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachtainindica*. Annual Review Entomology 35:271-297.
- Shultz, E.B., D. Bhatnaga, M. Jacobson, L.R. Metcalf, C.R. Saxena and D. Unanader. 1992. Neem a tree for solving global problems. pp. 39-51. National Academy Press. Washington, D.C. 152 p.
- Sidhu, D.S. 1995. Neem in agroforestry as a source of plant derived chemicals for pest management. The Indian Forester 121(11): 1012-1021.
- Simmons, M.S.J. and W.M. Blaney, 1983. Some neurophysiological of azadirachtin on lepidopterous larvae and their feeding response. 163-180 p. En: Proc. 2<sup>nd</sup> int. Neem Conf. Natural pesticides from the neem tree and other tropical plants. Rauischholzhausen. Eschborn GTZ, 1984.
- Sosa, M.A. 2003. Daño por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz bajo siembra directa en diferentes épocas en el noreste santafesino. Revista *INTA* - Estación Experimental Agropecuaria Reconquista. Santa Fe-Argentina.
- Teixeira, H.P., P.A.Vaina and J.W. Magid, 2003. Activity of neem tree (*Azadirachta indica*) leaves aqueous extract on *Spodoptera frugiperda*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38(3):1-2.
- Torres, L. y A. Cotes. 2005. Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad y actividad biocontroladora de *Nomuraea rileyi* contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología 33(2):133.
- Vélez, R.A. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: bionomía y manejo integrado. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín. 482 p.
- Vergara, R.R., R.S. Hoyos y J.T.Capataz. 2005. Efecto comparativo de dos fuentes de extractos de neem sobre *Spodoptera frugiperda* *In Vitro* y en plantas de campo. pp. 28. En: Memorias. XXXII Congreso de SOCOLEN. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Ibagué.
- Villamizar, L., C. Arriero, C.O. Bosa y A. Cotes. 2004. Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología 30(1): 99-100.
- Zenner De Polonía, I. y F.F. Borrero. 1992. Panorama nacional de susceptibilidad de algunas plagas del algodón a insecticidas. Agricultura Tropical (Colombia). 29(2): 83-95.