

BIOLOGIA Y ECOLOGIA DEL ARBOL DE NIM (Azadirachta indica A. Juss.) EXTRACCION, MEDICION, TOXICIDAD Y POTENCIAL DE CREAR RESISTENCIA.

*A.K. Gruber**

INTRODUCCION

El árbol Nim (Azadirachta indica A. Juss. syn. Antelaea azadirachta) se ha hecho famoso en los últimos años por su uso como fuente de insecticidas botánicos dentro de un concepto de agricultura ecológica. Los componentes activos son triterpenoides; el tetranortriterpenoide azadirachtina es la sustancia insecticida principal. El árbol de Nim llena casi todos los requisitos para ser tomado en cuenta ecológica y económicamente como un insecticida botánico.

En este trabajo se presenta la experiencia de seis años de cultivar el árbol en Nicaragua y algunos resultados de las investigaciones que se han realizado.

ESTUDIOS SOBRE BIOLOGIA Y ECOLOGIA DE LA ESPECIE

Crecimiento vegetativo y generativo:

En base a observaciones hechas durante cinco años seguidos se describe el ciclo anual de crecimiento vegetativo y generativo del árbol adulto, que se inician con la **fase 1a** de echar hojas nuevas y flores a partir del mes de febrero, con fechas variadas según el clima de la región. Seguidamente, se presenta la **fase 1b** de crecimiento vegetativo en condiciones óptimas de lluvia a partir de mayo. Sigue la **fase 2** de desarrollo y crecimiento del fruto de abril hasta junio, y la **fase 3** de maduración del fruto (y cosecha) a partir del mes de junio, con fechas variadas según

* Proyecto Nim - CIEETS, Managua, Nicaragua.

el clima de la región. Durante esta fase 3 se realiza también la formación de botones florales para el siguiente ciclo. El ciclo anual termina con la fase 4a de descanso de botones de las yemas y determinación de flores. La fase 4b es de descanso prolongado por la sequía, con un sellado de las yemas y un botado de partes de follaje según "stress" por falta de agua.

Amplitud Ecológica

La amplitud ecológica se determinó como ancha para la sobrevivencia de la especie Azadirachta indica en lo que es textura de suelo, precipitación anual, luz, nutrientes y altura sobre el nivel del mar. Sin embargo, se estrecha considerablemente cuando se aspira a una buena fructificación.

Las condiciones óptimas para la fructificación son: Suelos franco arenosos hasta franco arcillosos con buen drenaje, precipitación anual de 800 a 1800 mm, altura sobre el nivel del mar de 0 hasta 600 m y espaciamiento de siembra de 7 X 7 m hasta 10 x 10 m, pH del suelo entre 6.5 y 7.5, contenidos promedios de nutrientes con una C.I.C. de aproximadamente 40 mval/100g de suelo.

Plagas que Afectan la Especie

En Nicaragua se han observado cuatro plagas en Azadirachta indica:

- Escama blanca (Pinnaspis strachani), que puede defoliar ramas y hasta árboles enteros.
- Escarabajo (Espitragus sallei), que se alimenta de la corteza tierna, y yemas nuevas, lo que provoca un secamiento y en seguida una ramificación aumentada y anormal.
- Especies de chapulín (p.e. Melanoplus spp.) que se alimentan de los botones sellados y hojas tiernas. Las hojas desarrolladas no son atacadas por su alto contenido de terpenoides amargos.
- Especies de zompopos (Atta spp. y Acromyrmex spp.) que cortan las hojuelas para alimentar a sus cultivos de hongos subterráneos.

En otros países se han reportado otras plagas de Azadirachta indica.

Fructificación

La fructificación de *Azadirachta indica* se investigó en 47 árboles escogidos al azar durante cuatro años seguidos en cinco sitios de Nicaragua. Los árboles tenían la misma edad y la misma procedencia. La determinación del rendimiento de frutos por árbol se realizó cosechando completamente cada árbol marcado con el resultado de un promedio de 19.2 kg por árbol en las 5 plantaciones que nunca recibieron un cuidado específico. La diferencia entre los sitios se debe al contenido de humedad en el suelo durante la estación seca.

Extracción de aceite y triterpenoides

La toma de las muestras para la extracción de aceite y sustancias insecticidas (terpenoides) se realizó de frutos maduros y sazones, no encontrándose diferencias significativas entre ambos estados de madurez en el contenido de aceite y azadirachtina, terpenoide principal en la semilla de Nim para control de plagas.

La preparación de las muestras se hizo a mano con secado definido y controlado para evitar degradación de azadirachtina y contaminación de hongos.

La extracción se realizó en dos pasos en soxhlets de 100 ml durante 24 y 21 horas respectivamente. El aceite se extrajo con petrolbencina y los terpenoides con metanol.

El rendimiento en la extracción fue de 95% para el aceite en 9 horas y del extracto metanólico (azadirachtina), en 12 horas.

El contenido promedio de aceite en la semilla de Nim se determinó en 417 mg/g de semilla secada al aire (más 1 h a 50 °C en el horno). No se encontraron diferencias significativas para el contenido de aceite y azadirachtina según la edad y sitio de ubicación de la planta. El contenido de azadirachtina en el extracto metanólico fue de 181 mg/g de semilla. Tampoco hubo diferencias para los sitios muestreados.

Medición de Azadirachtina

Azadirachtina se cuantificó en los extractos metanólicos por medio de cromatografía de alta presión (HPLC) con columna de fase inversa, sustancia de referencia azadirachtina de pureza de más de 96%, estándar interno de acetato etílico y tiempo de retención de 5.8 a 6.2

min. Se encontró un promedio de 4.2 mg/g de semilla, habiendo diferencias significativas entre los sitios. La investigación se amplió durante un año (1988) para cubrir 21 sitios con árboles de diferentes edades con el objetivo de confirmar estos resultados. El promedio obtenido fue de aproximadamente 4 mg/g de semilla y se encontraron diferencias significativas entre los sitios.

Los datos de fructificación, rendimiento de aceite, extracto metanólico y contenido de azadirachtina se sometieron a cálculos de regresión. No hubo ninguna correlación entre los primeros tres rendimientos en la fructificación y en el contenido de azadirachtina. El contenido de azadirachtina tampoco está relacionado con la edad de los árboles (hasta 11 años). El contenido promedio alto que se determinó en Nicaragua se debe probablemente al procesamiento cuidadoso del fruto y de la semilla. En otros países se han reportado contenidos entre 1.2 y 6.2 mg/g de semilla, la mayoría menores que 3 mg/g semilla.

Modo de Actuar de Azadirachtina

En muchos bio-ensayos realizados se demostró que azadirachtina es la sustancia insecticida principal dentro del conjunto de terpenoides que contiene la semilla de Nim. En la hoja todavía no se ha comprobado azadirachtina.

Aunque la molécula blanco, de azadirachtina en el cuerpo del insecto todavía no está localizada, la hipótesis de su modo de acción se formula actualmente así: Azadirachtina interviene en el sistema hormonal a un nivel alto en el cerebro del insecto y de las corpora allata y cardíaca. De esta forma se disminuye la síntesis y versión de la hormona reguladora PTTH (prothoracicotropic hormone) que estimula la síntesis y versión de los ecdysteroides morfogenéticos. El efecto sobre la metamorfosis de las larvas se presenta en forma escalonada, desde la primera desactivación hasta daños graves en los cuerpos o muerte durante estados larvales y pupales. Sobre los adultos se observó un efecto de reducción de fecundidad por disturbio de los ciclos gonadotróficos.

Eficacia de las Sustancias de Nim en el Campo

Las concentraciones eficientes de azadirachtina en bio-ensayos se determinaron de 1 hasta 10 ppm; las variaciones son debidas a la sensibilidad específica de las especies.

En los campos se aplicaron diferentes tipos de extractos. Extractos acuosos de la semilla o torta mostraron buen efecto a concentracio-

nes de 15 a 25 g/l de agua, correspondiendo aproximadamente de 60 a 100 ppm de azadirachtina en el líquido de fumigación. Se controló un amplio espectro de plagas, sobre todo, masticadores de la hoja u otras partes de la planta.

Extractos metanólicos y etanólicos o de otro solvente formulados, se mostraron eficaces a concentraciones de azadirachtina de entre 25 y 70 ppm. Concentraciones más altas implicaban muchas veces fitotoxicidad. El aceite formulado se aplicó a una concentración de 0.3 a 0.5% del aceite en la emulsificación de fumigación como repelente de mosca blanca (Bemisia tabaci). También se observaron insectos muertos por asfixia o penetración de azadirachtina a través de la cutícula tierna de las ninfas. La diferencia entre extractos acuosos y alcohólicos en azadirachtina se debe posiblemente a diferentes contenidos de los demás terpenoides por ejemplo Salanina, que pueden tener efectos frenantes al de azadirachtina.

En Nicaragua se comprobó la eficacia de extractos acuosos y etanólicos en cultivos de maíz, frijol, soya, tomate, repollo y melón repetidamente. Las plagas principales de repollo, Plutella xylostella y Lipaphis erysimi se controlaron con alta mortalidad de larvas y ninfas y una reducción considerable de la oviposición de la plutella, efecto que se debe posiblemente al cambio de color de la hoja del repollo después de aplicaciones con extractos de Nim.

Las plagas principales del tomate Keiferia lycopersicella y Helicoverpa zea se controlaron satisfactoriamente con extractos acuosos y etanólicos formulados. Contra Bemisia tabaci los extractos acuosos o etanólicos no son efectivos, pero con el aceite formulado se logró bajar la incidencia de mosca blanca en el campo, actuando en este caso los nimbines como sustancias repelentes y el mismo aceite asfixiando al insecto.

Las plagas del melón Diaphania nitidalis y D. hyalinata, Acalymma spp. y Diabrotica spp., Aphis gossypii y Bemisia tabaci se controlaron de la misma forma con fumigaciones intercaladas de extractos acuosos y aceite formulado.

Las plagas principales de maíz y frijol se controlaron satisfactoriamente con extractos acuosos de la semilla molida, que es el producto más adecuado para los pequeños productores de granos básicos por su precio más favorable y la preparación fácil y sin peligro para el campesino y su familia.

Aptitud del Arbol de Nim y los Terpenoides para Productos de Protección Vegetal

Revisando la historia de la búsqueda de plantas aptas para suministrar sustancias activas para control de plagas, se observó que la sola eficiencia contra insectos, aunque es un requisito básico no es suficiente; tampoco tiene un efecto meramente repelente. Varias plantas promisorias se han descartado después de muchos años de investigación, como por ejemplo, las especies del género Derris conteniendo rotenona.

Por lo tanto, antes de empezar con el Proyecto Nim en Nicaragua se elaboró una lista con las características que debe tener una planta para realmente servir como fuente de productos insecticidas compatibles con la salud del hombre y del ecosistema.

Criterios para Escoger una Planta como Fuente de Insecticida

1. Las sustancias deben ser eficientes contra un amplio espectro de plagas en concentraciones bajas.
2. Las sustancias activas no deben ser tóxicas para mamíferos y el ecosistema.
3. Las sustancias no deben crear resistencia en insectos plagas.
4. Las sustancias deben ser localizadas en partes accesibles y renovables de la planta (flor, fruto, semilla, látex, etc.).
5. Las sustancias deben estar concentradas en la planta en niveles económicamente interesantes.
6. Las sustancias deben ser estables en el material vegetal almacenado y en productos, así como persistentes durante 6 - 8 días en el campo.
7. La producción (procesamiento del material vegetal, extracción o destilación de las sustancias activas) debe ser técnica y económicamente factible.
8. El cultivo de la planta debe ser fácil y en sitios no restringidos a sólo pocas regiones de la tierra. No debe existir competencia con la producción agrícola de alimentos.

La exigencia básica del punto 1 parece ser satisfactoriamente llenada por el Nim como se pudo mostrar en un sin número de ensayos de campo. Las pruebas toxicológicas llevados a cabo en los Estados Unidos y en Alemania comprueban la no-toxicidad aguda de los extractos acuosos, etanólicos y metanólicos, así como del aceite prensado o extraído. Faltan todavía los resultados de las pruebas de toxicidad crónica para llenar completamente la segunda exigencia básica.

La tercera exigencia no puede ser satisfactoriamente llenada. Teóricamente los insectos pueden desarrollar resistencia con mayor o menor rapidez contra cualquier sustancia dañina que ingieren involuntariamente. *Plutella xylostela* ya es resistente a todos los productos químicos sintéticos conocidos. Tiene también cierta resistencia contra azadirachtina en extractos AZT (con aproximadamente 16% de azadirachtina) durante un bio-ensayo prolongado en el Instituto de la Universidad de Giessen, Alemania, donde actualmente se han estudiado 80 generaciones bajo fuerte presión.

Los puntos 4 y 5 están satisfactoriamente llenados como se demostró con los resultados presentados en esta exposición.

En el punto 6, la fragilidad de azadirachtina en la semilla almacenada y en los productos, así como su breve persistencia en el campo, aunque ventajoso por un lado, está creando problemas técnicos a resolver. Esto se puede lograr disminuyendo los costos adicionales, no aplicando bajo sol, antes de lluvias previsible o agregando sustancias protectoras.

Las exigencias del punto 7 son muy relacionadas a las del punto 6.

La factibilidad técnica y económica todavía no está completamente comprobada. Sin embargo, productos sencillos como extractos acuosos tuvieron buena aceptación y demanda en Nicaragua en la fase de prueba 1991-92. Productos más elaborados equivalentes en estabilidad y presentación a los agroquímicos sintéticos convencionales, tendrán la inconveniencia de salir más caros y sólo accesibles para grandes productores.

En lo que se exige en el punto 8, todavía no se sabe con qué área se podría contar a nivel mundial, aunque será probablemente mucho más grande que lo de *Chrysanthemum cinerariaefolium*.

INVESTIGACIONES FALTANTES

Sobre el cultivo del árbol:

- Condiciones climáticas y edáficas para alto contenido de azadirachtina en la semilla.
- Selección de variedades (diferentes criterios).
- Manejo optimizado de plantaciones y métodos mejorados de cosecha.

Sobre la producción de insecticidas y nematocidas a base de Ním:

- Condiciones óptimas de almacén del material vegetal (semilla, hoja).
- Condiciones de producir y almacenar productos suficientemente estables en azadirachtina sin modificar la molécula.
- Ensayos de toxicología crónica.

Sobre la aplicación de productos en campos, invernaderos etc.:

- Conceptos agro-ecológicos que incorporen las sustancias de Ním como una piedra del mosaico y no como un sustituto de los agroquímicos.