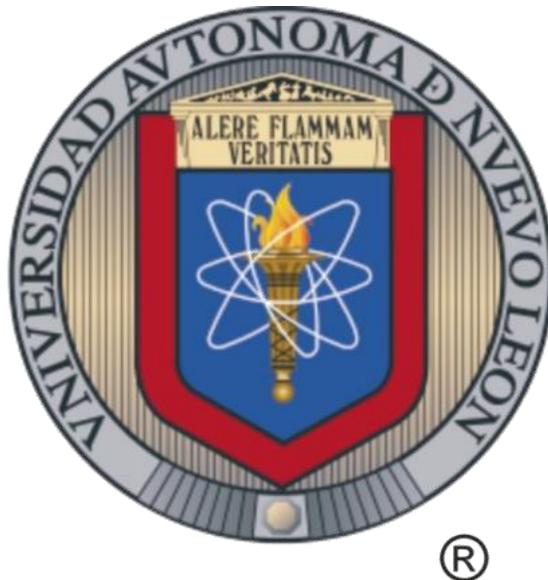


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EXTRACTOS DE NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss.) PARA EL CONTROL DE
MOSCA BLANCA (*Bemisia tabaci* Genn.) EN EL CULTIVO DE TOMATE**

PRESENTA

AARÓN CRUZ HERRERA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

DICIEMBRE, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EXTRACTOS DE NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss.) PARA EL CONTROL DE
MOSCA BLANCA (*Bemisia tabaci* Genn.) EN EL CULTIVO DE TOMATE**

PRESENTA

AARÓN CRUZ HERRERA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

DICIEMBRE, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**EXTRACTOS DE NEEM (*Azadirachta indica* A. Juss.) PARA EL CONTROL DE
MOSCA BLANCA (*Bemisia tabaci* Genn.) EN EL CULTIVO DE TOMATE**

PRESENTA

AARÓN CRUZ HERRERA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

DICIEMBRE, 2018

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

Ph. D. Emilio Olivares Sáenz
Director de Tesis

Ph. D. Rigoberto E. Vázquez Alvarado
Co-Director

Dra. Juana Aranda Ruiz
Asesor

Subdirector de Estudios de Posgrado
Ph. D. Juan Antonio Vidales Contreras

DEDICATORIA

A mis padres, Silvia Cruz y Gaudencio Castro, quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional.

A mis hermanos Isahí, Juan, Nohemí y Samuel, por ser inspiración de esfuerzo y lealtad.

A mis amigos del alma Andrea, Evelyn, Zayda, Uziel e Israel.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y salud que me da y por estar a mi lado en cada momento.

A mi asesor Ph. D. Emilio Olivares Saéñz por su alto profesionalismo y compromiso con la agricultura, por ser paciente conmigo y con toda mi generación, por mantener vivo el espíritu de la enseñanza a tiempo y a destiempo.

Al Ph. D. Rigoberto E. Vázquez Alvarado por ser puntual en sus correcciones y por ser el ejemplo de la humildad y servicio, dentro y fuera de las aulas.

A la Dra. Juana Aranda Ruiz, por ser aliento, no solo para mí, sino para muchos alumnos en las distintas carreras del Campus de Ciencias Agropecuarias.

Al CONACYT por darme la oportunidad de cursar un posgrado de alta calidad.

A la Facultad de Agronomía y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por abrirme las puertas y arrojarme en este periodo de aprendizaje.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	VII
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis	3
1.2. Objetivo	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i> Genn.).....	4
2.1.1. Taxonomía.....	4
2.1.2. Ciclo de vida	5
2.1.3. Ecología y comportamiento	6
2.1.4. Historia e importancia	7
2.1.5. Perspectiva agronómica	7
2.1.6. Daños	9
2.2. Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.) como Plaguicida	10

2.2.1. Neem en la agricultura.....	12
2.3. Producción de Tomate Bajo Invernadero en Nuevo León.....	13
2.4. Método de Extracción Soxhlet.....	14
2.5. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) para la identificación de compuestos químicos.	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Localización del Experimento.....	16
3.2. Cosecha de Neem en el Campus Marín, N. L de la Facultad de Agronomía, UANL.	17
3.3. Elaboración y Análisis de Extractos de Neem	18
3.3.1. Extracción acuosa de Neem	18
3.3.2. Extracción de Neem asistida por ultrasonido.....	19
3.3.3. Extracción de Aceite de Neem mediante Equipo Soxhlet.....	21
3.4. Material Vegetal	24
3.5. Producción de Plántula	25
3.6. Establecimiento del cultivo	26
3.7. Tratamientos	28
3.8. Variables Evaluadas.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32

4.1. Resultados de HPLC para Extractos de Neem	32
4.2. Mortalidad de adultos de <i>Bemisia tabaci</i> Genn.	37
5. CONCLUSIONES	41
6. BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Volúmenes de aceite de Neem obtenidos a partir del Equipo de Ultrasonido.....	20
2 Volúmenes de aceite de Neem obtenidos mediante el Equipo Soxhlet.....	22
3 Determinación de azadiractina mediante HPLC.....	33
4 Comparación de medias de tratamientos en conteos de adultos muertos.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Invernadero del Centro de Agricultura Protegida, FA – UANL.....	16
2 Frutos y semillas de Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss.) cosecha 2015.....	17
3 Equipo de Rotaevaporación Modelo VV2000-OB CAFRAMO.....	23
4 Plantas de tomate cherry en charola de poliestireno.....	25
5 Establecimiento de plantas de tomate tipo cherry.....	26
6 Vista superior de la planta cubierta con Jaula Entomológica.....	27
7 Distribución de tratamientos bajo invernadero.....	28
8 Conteo de adultos muertos después de los tratamientos.....	29
9 Cromatograma del estándar de Azadiractina con su amplitud de onda y expresión en tiempo.....	34
10 Cromatograma del extracto foliar de neem en función de su amplitud de onda y tiempo de exposición de la muestra en HPLC.....	34
11 Cromatograma del extracto de semilla de neem en función de su amplitud de onda y tiempo de exposición de la muestra en HPLC.....	35
12 Curva de Calibración de Azadiractina	35
13 Gráfica de adultos muertos totales por tratamiento.....	38
14 Gráfica del comportamiento de los tratamientos durante el experimento	40

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de Agricultura Protegida de la Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicado en el Campus de Ciencias Agropecuarias en el Municipio de Escobedo del Estado de Nuevo León con el objetivo de evaluar el efecto insecticida de extractos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) sobre adultos de mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) en el cultivo de tomate en invernadero. El experimento consistió en el establecimiento de cuatro tratamientos (T1, testigo; T2, extracto de semilla de neem; T3, extracto foliar de neem; T4, Sivanto prime) para el control de adultos de mosca blanca, en plantas de tomate tipo cherry. Los insectos se introdujeron de manera asistida en una jaula entomológica por cada planta. De acuerdo a un diseño completamente al azar, cada tratamiento tuvo cinco repeticiones, evaluando la mortalidad de mosca blanca. Las diferencias en porcentaje de mortalidad entre los tratamientos se estudiaron con un ANVA y una comparación de medias (Tukey); el ANVA indicó diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0.05$). Los resultados demostraron el efecto insecticida de los tratamientos sobre *B. tabaci* en el siguiente orden: T4 (Sivanto prime), T2 (Extracto de Semilla de neem), T3 (Extracto foliar de neem) y T1 (Testigo).

Palabras claves: Efecto insecticida, invernadero, jaulas entomológicas.

ABSTRACT

This work was developed at the Facultad de Agronomía of the Universidad Autónoma de Nuevo León, in order to evaluate the insecticidal effect of neem extracts on adults of *B. tabaci* in tomato crop cherry type under greenhouse conditions. Four treatments were evaluated (T1 control, T2 neem seed extract, T3 neem leaf extract and T4 Sivanto prime) for control of *B. Tabaci* adults. Treatments were assigned according to a completely randomized design with five replications, using an entomological cage with a tomato plant as experimental unit. Data of adult mortality were taken in each cage. The analysis of variance for mortality indicated a significant difference between treatments. The results showed adulticide effect of *B. tabaci* in the following order: T4 (Sivanto prime), T2 (neem seed extract), T3 (neem leaf extract) and T1 (control).

Key words: Insecticidal effect, greenhouse, entomological cages.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la década de 1960, el uso de plaguicidas sintéticos ha jugado un papel importante en el aumento de la producción agrícola en el mundo. El aumento en el uso de pesticidas tiene el potencial de afectar negativamente a los agricultores, los consumidores y el medio ambiente. Además, la demanda de los consumidores de productos agrícolas sin buen manejo, alienta a los agricultores a utilizar mayores insecticidas sintéticos (Silva *et al.*, 2013).

La implementación de agroquímicos ha sido múltiple y variado en la agricultura, consumiendo el 85% de la producción mundial (Ramírez y Lacasaña, 2001). En convenios internacionales, como el de Estocolmo, celebrado en el año 2001, se ha buscado eliminar o restringir los agentes contaminantes persistentes, como los organoclorados, denominados de interés prioritario y urgente. Por lo anterior, es necesario desarrollar herramientas agroecológicas capaces de controlar plagas y enfermedades en las plantas, sin ocasionar mayores problemas en un futuro a corto, mediano y largo plazo. Una alternativa viable y factible, es el uso de extractos de origen vegetal o también conocidos como biorracionales, los cuales cuentan con efectos plaguicidas hacia insectos fitófagos, que son enemigos naturales en los sistemas de cultivo en la producción agrícola mundial (Rausell *et al.*, 2000).

Diferentes aceites esenciales y extractos de plantas han sido reconocidos como excelentes ovicidas de la familia *Culicidae* (Govindarajan *et al.*, 2011), larvicidas (Amer y Mehlhorn, 2006), adulticidas (Govindarajan y Sivakumar, 2012), inhibidores de crecimiento y/o reproducción (Rajkumar y Jebanesan, 2005), repelentes de adultos (Amer y Mehlhorn, 2006) y supresores de oviposición (Elango *et al.*, 2009). El uso de extractos vegetales y aceites esenciales para el MIP (Manejo Integral de Plagas) representan una de las alternativas más prometedoras para explorar nuevas soluciones ecológicas contra insectos plaga en los diferentes sistemas de producción de hortalizas.

Productos y subproductos del árbol de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), se han implementado con frecuencia, como alternativa a los plaguicidas sintéticos, debido a su acción insecticida, antialimentarios del insecto y los efectos reguladores del crecimiento. Por otra parte, las nuevas formulaciones de materiales ecológicos se desarrollan continuamente y por lo tanto, tienen que ser evaluados para conocer con certeza su eficacia y persistencia en el control de plagas.

El poder insecticida de la azadiractina se ha confirmado en 500 especies de insectos plaga y su baja toxicidad en campo para vertebrados e insectos benéficos (parasitoides, abejas y depredadores) ha sido remarcada (Morgan, 2009), esto ha permitido considerar al árbol de neem, como un elemento indispensable en el aporte de efectos insecticidas en las nuevas formulaciones agroecológicas a nivel mundial.

1.1. Hipótesis

Los extractos de neem, tienen efecto insecticida en adultos de mosca blanca en el cultivo de tomate, por lo tanto son una alternativa de control viable en invernadero, que puede sustituir el uso de agroquímicos.

1.2. Objetivo

Evaluar el efecto insecticida de los extractos de neem sobre adultos de mosca blanca en el cultivo de tomate de invernadero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.)

2.1.1. Taxonomía

Bemisia tabaci Genn. fue clasificada taxonómicamente por Gennadius en 1889 y posteriormente fue descrita por vez primera en España como plaga ocasional en algunos cultivos hortícolas (Gómez, 1943). La clasificación entomológica se describe a continuación:

Tipo: Insecto

Nombre Científico: *Bemisia tabaci*

Reino: Animalia

División: Artrópoda

Clase: Insecta

Orden: Hemíptera

Familia: Aleyrodidae

Género: *Bemisia*

Especie: *tabaci*

Nombres comunes: Mosca blanca

2.1.2. Ciclo de vida

La mosca blanca se caracteriza por tener una metamorfosis incompleta, pasando por tres etapas: huevo, cuatro estadios ninfales y adulto. El ciclo de vida de *Bemisia tabaci* está muy influenciado por factores abióticos como la temperatura, la humedad relativa y el fotoperíodo, así como las características de su hospedante, por lo que la literatura al respecto es muy variable. Los huevos de *Bemisia tabaci*, son colocados individualmente o en grupos en el envés de las hojas. La eclosión puede presentarse entre 5-10 días después (Ulloa, 2005).

La fecundidad es de 100 a 300 huevos y varía dependiendo de las condiciones ambientales. La ninfa presenta cuatro estadios (3-6, 3, 2 y 2-4 días de duración respectivamente), de los cuales solo es móvil el primero; se alimentan únicamente en el envés de las hojas.

El adulto mide 1-2 mm de longitud y es blanco. El ciclo de vida bajo condiciones óptimas (en el trópico) generalmente dura menos de tres semanas y es afectado por las condiciones ambientales (temperatura y precipitación), además del tipo de hospedante.

Los adultos de la estación seca tienen una longevidad de 10-15 días, siendo las hembras las que generalmente viven más tiempo. La proporción de sexo generalmente es 1:1, aunque las hembras infantilizadas colocan huevos de los cuales eclosionan solamente machos (Ulloa, 2005).

2.1.3. Ecología y comportamiento

La mosca blanca pertenece a la familia Aleyrodidae, siendo considerada en diversas localidades del mundo desde 1926 hasta 1981 como una plaga esporádica y secundaria; sin embargo, en los últimos años se convirtió en una plaga y vector de algunos virus importantes. Las razones para este cambio de status no han sido determinadas todavía, pero podrían ser: las modificaciones en las prácticas agrícolas, la expansión del monocultivo bajo irrigación, el uso excesivo de pesticidas, la creación de resistencia a los insecticidas y el intercambio mundial de plantas y productos vegetales (Valarezo *et al*, 2008).

El conocimiento de la etología (capacidad de vuelo, horas de actividad, selección de hospedantes y aspectos sensoriales) de *Bemisia tabaci* es un elemento clave para su manejo. *Bemisia tabaci* no es un volador eficiente, y comúnmente se desplaza a menos de 50 cm del suelo (Ulloa, 2005).

En sus poblaciones normalmente coexisten dos morfos o tipos de insectos en relación con la dinámica del vuelo, uno migratorio y otro de vuelos triviales. El desplazamiento del primero, depende principalmente de corrientes de vientos a grandes alturas, las cuales son aprovechadas por el insecto para colonizar campos lejanos, hasta 7 km desde su punto de origen, temprano por la mañana. En cambio, los vuelos cortos son continuos durante el día (Ulloa, 2005).

2.1.4. Historia e importancia

La mosca blanca es originaria del sur de Asia, algunos autores consideran que del medio oriente, específicamente de India y Pakistán, encontrándose distribuida actualmente en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Su hábitat se extiende alrededor del planeta, entre 30° Latitud Norte y los 30° Latitud Sur (Rodríguez y Morales, 2007).

En América latina, la mosca blanca empezó a convertirse en una plaga de importancia económica a partir de la década de los 70's como consecuencia del uso intensivo de algunos agroquímicos que fueron utilizados en campos agrícolas después de la segunda guerra mundial en cultivos comerciales como el algodón (Rodríguez y Morales, 2007).

2.1.5. Perspectiva agronómica

Reconocida por investigadores y agricultores a fines del siglo XIX, la mosca blanca ha sido una limitante en la agricultura mundial desde 1970; inicialmente en cultivos hortícolas bajo invernaderos (Román, 2008). Es un insecto plaga, difícil de controlar, debido a su alta tasa de reproducción y su amplio rango de hospederos, se puede encontrar en algunos cultivos de importancia agrícola como tomate, chile, melón, sandía, pepino, calabaza, frijol, camote y algodón, pero también en algunas malezas de hoja ancha, constituyéndose como una de las plagas de mayor importancia agrícola en los países tropicales y subtropicales (Lastres, 2007). *Bemisia tabaci*

(Homóptera, Aleyrodidae) es mucho más importante como vector de virus de tipo persistente (begomovirus) que como chupador. Sin embargo, la ocurrencia de inóculo de virus en hospederos alternos, el hecho de que el virus puede permanecer en el vector de por vida y la incidencia de virosis en determinadas zonas dictan la pauta sobre su importancia como vector (Lastres, 2007).

El control de esta plaga se ha dificultado ampliamente, debido a que las poblaciones del insecto desarrollan resistencia genética a los insecticidas de manera muy rápida, por lo que los insecticidas se tornan ineficientes en periodos muy cortos. La combinación de diferentes métodos de manejo para controlar la plaga, es la mejor alternativa para un buen control de mosca blanca.

La implementación de cultivos hortícolas bajo invernaderos como el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) surge como una alternativa para la diversificación de cultivos rentables muy necesaria en las zonas agrícolas, sin embargo, los problemas que generan en el ataque de insectos plagas a las cosechas, provocan pérdidas considerables en el rendimiento, es por ello indispensable considerar alternativas ecológicas para el control de insectos perjudiciales de los cultivos agrícolas como la mosca blanca (Bolaños, 1998).

2.1.6. Daños

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un cultivo altamente susceptible al ataque de insectos y enfermedades. Una de las plagas que más daño causa actualmente al tomate es la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.).

Los métodos de control existentes no han podido combatir eficientemente la mosca blanca, por lo que se están investigando alternativas para controlar esta plaga. La mosca blanca aparece en el cultivo de tomate en la época seca, especialmente en las siembras bajo riego. Es un transmisor importante de virus en tomate y muchos cultivos.

Las moscas blancas, en especial *B. tabaci* se caracteriza por causar dos tipos de daños, los cuales se describen a continuación:

Daños directos: Al insertar el estilete en el tejido vegetal, succionar la sabia e inyectar sustancias fitotóxicas a la planta; pero también por la transmisión de Geminivirus causante de la virosis, el cual es capaz de devastar por completo una área determinada de cultivo, donde las etapas más críticas son las primeras semanas después de la germinación. *Bemisia tabaci*, es sin duda la especie de mayor importancia entre las moscas blancas porque ataca más de 200 cultivos; transmite más de 150 virus (Geminivirus) y tiene la capacidad de desarrollar biotipos muy agresivos, capaces de producir grandes pérdidas económicas al reducir los rendimientos, afectar la calidad de la cosecha y aumentar los costos de producción (Jiménez *et al.*, 2011).

Daños indirectos: Dentro de los daños indirectos están la producción de fumagina y principalmente la transmisión de virus del género BGMV. La fumagina se refiere a

excreciones azucaradas (melaza) sobre las cuales se desarrollan hongos de micelio negro pertenecientes a varios géneros, incluyendo especies de *Cladosporium* y *Capnodium*. La fumagina interfiere con el proceso fotosintético de las plantas repercutiendo negativamente sobre el rendimiento (Morales *et al.*, 2006).

2.2. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) como Plaguicida

Estudios en laboratorio e invernadero en algodón demostraron que extractos acuosos de semillas de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) causaron una disminución en la oviposición y en la viabilidad de los huevos de mosca blanca; además se prolongó el período ninfa 1 y hubo repelencia de adultos (Coudriet *et al.*, 1985).

Morales *et al.*, (2006), señalan que el árbol de neem es originario del sudeste asiático cuyas hojas y semillas se utilizan para control de plagas. El extracto de neem actúa como inhibidor del desarrollo. Todas las partes del árbol de neem contienen químicos naturales que se utilizan como insecticida, sin embargo, es la semilla la que contiene mayor cantidad fitoquímicos que se extraen para fabricar insecticidas, Fernández, (2009). El efecto insecticida lo da una sustancia que se llama azadiractina que inhibe la alimentación del insecto y no deja desarrollar su estado larvario, interrumpiendo la ecdisis.

Mecanismo de acción:

- Inhibe la acción de la colinesterasa, ataca al sistema nervioso central del insecto.
- Inhibe el proceso ya que bloquea la información del tritocerebro al aparato bucal.
- Inhibe a la hormona de la ecdisis por lo cual impide el crecimiento de los insectos de los estados inmaduros por lo que no se produce la muda.

Pérez (2002), manifiesta que el neem contiene ciertas sustancias que lo hacen actuar como si fuera una cortisona, alterando el comportamiento, o los procesos vitales de los insectos. Uno de los efectos más importantes de la azadiractina es que interfiere en la metamorfosis de los insectos, evitando que se desarrollen en crisálidas, y por tanto, mueren sin producir una nueva generación. En los insectos inmaduros inhiben la formación de la quitina. La azadiractina interfiere, en la reproducción en estado adulto, otra sustancia que contiene el neem es la salanina, cuyo mecanismo de acción es de ser repelente.

La mosca blanca tiene la capacidad de adquirir resistencia a los insecticidas rápidamente debido a la dinámica de su reproducción y variabilidad genética, por lo que se debe hacer un uso adecuado de los productos químicos para evitar estos problemas, siguiendo las dosis recomendadas por los investigadores, haciendo una correcta rotación de materiales, tomando en cuenta el modo y sitio de acción de cada producto.

A pesar de que muchos isómeros de azadirachtina, Aza-A hasta Aza-K, han sido reportados en la literatura, azadirachtina-A es la forma más importante y es utilizada como un estándar para la expresión de la actividad de los extractos de neem y sus formulaciones (Kaushik, 2002).

2.2.1. Neem en la agricultura

En los EE.UU., los estudios realizados por la Academia Nacional de Ciencias, el Consejo de Defensa de los Recursos Naturales, y otros, concluyeron que los agricultores podrían sustituir hasta el 50% de sus plaguicidas con alternativas no tóxicas y de venta directa y no controlada sin afectar el rendimiento del cultivo (Chaudhry, 1993).

Actualmente, la tendencia de incrementar gradualmente las leyes y reglamentaciones para el registro de insecticidas nuevos está propiciando una reducción en el mercado de dichos materiales, por lo que se requiere analizar e implementar medios más inocuos y ecológicos para el combate de las enfermedades y plagas.

Actualmente, los productos a base de neem, comercializados, tienen un uso amplio en la horticultura pero encierran además un gran potencial para su uso comercial en el cultivo de tomate. Los extractos a base de neem son inocuos para

aves, mamíferos e insectos beneficiosos. La azadiractina contenida en los extractos de neem, tiene la capacidad de afectar a más de 200 tipos de plagas de insectos, así como también algunas especies de ácaros y de nemátodos.

2.3. Producción de Tomate Bajo Invernadero en Nuevo León

La producción de cultivos hortícolas en México ha cambiado en las últimas décadas, debido a que la tendencia marca un incremento en la producción en invernaderos y casas sombras comparada con la que se realiza en campo abierto, principalmente en los cultivos de tomate, pimiento y pepino. Los cultivos que se producen bajo agricultura protegida son de mayor calidad que los que se producen en campo abierto, por lo que la mayor calidad en los productos ha incrementado las exportaciones, principalmente a Estados Unidos y Canadá. Estas exportaciones han contribuido a que el sector agroalimentario sea la tercera actividad de mayor exportación en México. La actividad agrícola en invernadero se ha incrementado considerablemente en las últimas dos décadas, de tal manera que actualmente México ocupa el séptimo lugar en cuanto a superficie de agricultura protegida.

En el Estado de Nuevo León, también se ha incrementado la actividad hortícola bajo condiciones protegidas, principalmente en el Sur del Estado en los municipios de Aramberri y Galeana en donde se instalaron dos tecnoparques con 30 y 40 has en cada uno de ellos, además en esos municipios se han instalado invernaderos de alta tecnología como son Green Valley, Invernaderos La Fortuna e Invernaderos Valle Alto. Estas unidades de agricultura protegida han generado una

gran cantidad de mano de obra, lo que ha mejorado las condiciones socioeconómicas de una de las zonas más deprimidas económicamente en el Estado de Nuevo León.

2.4. Método de Extracción Soxhlet.

La extracción Soxhlet, es una herramienta muy utilizada con fines de preparación, en el cual el analito es concentrado en una matriz la cual puede estar mezclada o separada de sustancias interferentes particulares. Extracción con solventes de muestras sólidas, comúnmente conocidas como extracción solidolíquido (también conocidos como lixiviación en una terminología más correcta de fisicoquímica).

En el método Soxhlet convencional, la muestra es colocada en un porta dedal y durante la operación es gradualmente llenado con solvente nuevo condensado desde un matraz de destilación. Cuando el líquido alcanza un nivel de sobre flujo, un sifón aspira el contenido total de la porta dedal y lo descarga de nuevo en el matraz de destilación. Esta operación es repetida hasta que se completa la extracción (De Castro y Ayuso, 2000).

2.5. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) para la identificación de compuestos químicos.

HPLC es una técnica utilizada en el análisis químico para separar, identificar y cuantificar cada componente en una mezcla. Se basa en el bombeo de un solvente líquido presurizado que contiene la mezcla a través de una columna llena con un material adsorbente sólido. Cada componente en la muestra interacciona ligeramente diferente con el material adsorbente, causando diferentes rangos de flujo para los diferentes componentes y permite la separación de los componentes a medida que fluyen hacia afuera de la columna (Karger, 1997).

La cromatografía puede ser descrita como un proceso de transferencia de masa el cual implica adsorción. El esquema de un instrumento HPLC típicamente incluye un desgasificador, muestreador, bombas y un detector. El muestreador lleva la mezcla de muestra dentro de la corriente de fase móvil la cual la lleva hacia dentro de la columna. La bomba entrega el flujo deseado, así como la composición deseada, de la fase móvil a través de la columna. El detector genera una señal proporcional a la cantidad del componente de la muestra emergiendo desde la columna, por lo tanto, permite el análisis cuantitativo de los componentes de la muestra. Un microprocesador digital y un software de control permiten el funcionamiento del instrumento HPLC y proporcionan datos para el análisis (Xiang *et al.*, 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del Experimento

La investigación fue realizada en un invernadero de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Campus Ciencias Agropecuarias, ubicada en General Escobedo, N. L. Este municipio se localiza en las coordenadas geográficas de 25° 47' 5.98" L. N. y 100° 17' 12.12" L. O., a una altura de 481 msnm. El clima de Escobedo es Bs, temperatura de 18° C – 24°C y una precipitación de 300 a 600 mm (Figura 1).



Figura 1. Invernadero del Centro de Agricultura Protegida, FA – UANL.

3.2. Cosecha de Neem en el Campus Marín, N. L de la Facultad de Agronomía, UANL.

La cosecha de frutos de neem se realizó en el mes de agosto del año 2015 en el Campus Marín de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Figura 2), localizado a 25° 51'31" N, 100° 01'20" O, con una altitud de 403 msnm. El clima en la región es extremoso, con régimen de lluvias en agosto y septiembre; la precipitación media anual es de 528 mm; los meses más calurosos son julio y agosto; la temperatura media anual es de 22 °C; la temperatura máxima es de 40 °C y la mínima es de 4 °C (CONAGUA, 2015).



Figura 2. Frutos (derecha) y semillas (izquierda) de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), cosecha 2015.

3.3. Elaboración y Análisis de Extractos de Neem

En éste trabajo se implementaron dos metodologías diferentes para extraer aceite de neem a partir de semillas. El primer método fue asistido por ultrasonido y el segundo fue el Método Soxhlet, para la extracción de aceite de neem. También se elaboró un extracto acuoso de hojas frescas de neem.

3.3.1. Extracción acuosa de Neem

Para la realización de este proceso se recolectaron las hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), los foliolos fueron separados del raquis de la hoja manualmente y se pesaron 100 g del material fresco.

La extracción se llevó a cabo mediante un método solido-líquido manteniendo una relación de 1:8 (p/v) de hoja y agua destilada, respectivamente. En un recipiente se colocó el agua y se mantuvo en una plancha de calentamiento hasta llegar a una temperatura de 95°C y posteriormente se sumergieron las hojas verdes de neem por un lapso de 5 min. La extracción fue filtrada a través de papel filtro Whatman número 1, y posteriormente se depositó en un frasco de vidrio ámbar y se almacenó en refrigeración hasta su utilización.

3.3.2. Extracción de Neem asistida por ultrasonido

Para la extracción por ultrasonido se implementó la metodología descrita por Marciano de Paula *et al.* (2015). El proceso inició con la limpieza de la semilla de neem, posteriormente las semillas se colocaron en una charola dentro de una estufa de secado a una temperatura de 55°C por un lapso de 24 h. Se tomaron muestras de 40 g de almendra de semilla de neem y se molieron manualmente con ayuda de un mortero.

La semilla molida fue colocada en un matraz Erlenmeyer con 200 mL de etanol al 96 % y fue colocado en un baño ultrasónico Aquasonic de VWR Scientifics Products (40 kHz) equipado con control digital de tiempo y temperatura, en donde se aplicaron 35 khz y una temperatura de 28°C por un lapso de 2 h. Posteriormente la muestra fue filtrada utilizando papel Whatman número 1.

La recuperación del aceite se llevó a cabo en un rotaevaporador modelo VV2000-OB de la marca Caframo, utilizando vacío, se colocó la muestra en un matraz el cual se puso en contacto con agua a temperatura de 78 °C y a 30 rpm, se encendió la bomba de vacío y se dejó que el proceso se llevara a cabo por 1 h. El aceite fue recuperado con una pipeta y depositado en un vial Eppendorf. Para estandarizar la prueba se realizaron diez corridas, en donde se promediaron las cantidades de extracto final (Cuadro 1).

Para el cálculo final de los rendimientos en dicho trabajo se implementó la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = (M2/M1) * 100$$

En donde:

M2 = Masa final

M1 = Masa inicial

Cuadro 1. Volúmenes de aceite de neem obtenidos a partir del Equipo de Ultrasonido

Proceso de Extracción, Marciano de Paula <i>et al.</i> (2015)					Lectura de Ultrasonido	
Muestra	Neem (g) M1	Etanol (mL)	Sobrante Sólido (g)	Sobrante Líquido (mL)	Volumen (mL) M2	Cantidad de aceite (mL)
1	40	200	37.3	136	1.40	3.5
2	40	200	37.9	132	1.30	3.25
3	40	200	39.5	134	1.40	3.5
4	40	200	39.4	132	1.50	3.75
5	40	200	38.4	135	1.20	3
6	40	200	38.7	130	1.10	2.75
7	40	200	38.9	134	1.20	3
8	40	200	37.4	134	1.40	3.5
9	40	200	38.9	133	1.40	3.5
10	40	200	39.1	136	1.30	3.25

3.3.3. Extracción de Aceite de Neem mediante Equipo Soxhlet

Para la extracción de aceite de semilla de neem se utilizó etanol como solvente orgánico y un equipo Soxhlet marca Kimax Usa (Whatman) siguiendo el procedimiento de acuerdo a lo señalado por Romero y Vargas (2005).

El proceso inició con la limpieza de la semilla de neem, se procedió a retirar las cubiertas de la semilla hasta que quedó la almendra limpia; se colocaron en una charola dentro de una estufa de secado a una temperatura de 55°C por un lapso de 24 h. Se tomaron muestras de 10 g de semilla seca se trituraron en un mortero hasta obtener una harina. La muestra se colocó en dedales de celulosa para continuar con el proceso. Se armó el equipo de extracción Soxhlet y se colocó el dedal.

Se colocaron 250 ml de Alcohol etílico absoluto (solvente) en un matraz bola, este se incorporó al equipo Soxhlet, y se llevó a cabo la recirculación del solvente, mediante el calor proporcionado por una plancha de calentamiento de la marca Cimarec, manteniendo una temperatura de ebullición de 78°C.

La extracción se llevó a cabo por un lapso de 2 h y finalmente se recolectó la muestra y se puso en refrigeración hasta la posterior evaporación del solvente. Para la evaporación del solvente se utilizó un rotaevaporador modelo VV2000-OB de la marca Caframo (Figura 3); La muestra se colocó en un matraz el cual se puso en contacto con agua a temperatura de 78 °C y se puso a girar a 30 rpm, se encendió la bomba de vacío y se dejó que el proceso se llevara a cabo por un lapso de 1 h.

El aceite fue recuperado del matraz utilizando una pipeta, se depositó en un vial Eppendorf, se midió y pesó el aceite y se llevó a refrigeración hasta su aplicación. Posteriormente se tomó lectura de los volúmenes arrojados (Cuadro 2).

Para el cálculo final de los rendimientos en dicho trabajo se implementó la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = (M2/M1) * 100$$

En donde:

M2 = Masa final

M1 = Masa inicial

Cuadro 2. Volúmenes de aceite de neem obtenido mediante el Equipo Soxhlet

Proceso de Extracción, Romero y Vargas (2005)					Resultado Soxhlet
Muestra	Neem (g) M1	Etanol (mL)	Sobrante Sólido (g)	Sobrante Líquido (mL)	Volumen (mL) M2
1	10	250	7.9	230	2.3
2	10	250	7.8	236	2.4
3	10	250	8.3	232	2.3
4	10	250	8.3	230	2.6
5	10	250	8.9	232	2.9
6	10	250	9.4	236	2.8
7	10	250	9.4	234	2.7
8	10	250	9.3	233	2.3
9	10	250	8.7	235	2.2
10	10	250	7.8	236	2.9



Figura 3. Equipo de rotaevaporación Modelo VV2000-OB CAFRAMO

3.3.4 Análisis de Extractos mediante HPLC

Las muestras se trabajaron en el Laboratorio de Macroalgas del Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicado en Ensenada, B. C.

Las muestras del extracto de hoja y semilla de neem se sometieron al análisis de azadiractina utilizando un equipo de HPLC. Ambas muestras se colocaron en refrigeración y protegidas de la luz hasta el momento de su análisis. Para la identificación del compuesto, se utilizó un estándar de azadiractina marca Sigma-Aldrich. El agua, acetonitrilo y metanol, todos grado HPLC (Fermont) fueron filtrados a través de filtros de fibra de vidrio de 0.45 μm . La solución estándar de azadiractina

(1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se preparó disolviendo 5 mg del compuesto en 5 mL de metanol grado HPLC. La curva de calibración se preparó haciendo diluciones en un rango de los 0 a 100 mg L^{-1} y fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y protegidos de la luz en viales ambar.

Para el análisis de las muestras se siguió el método propuesto por Kaushik (2002). La separación de los compuestos se realizó en un cromatógrafo (HPLC) Alinet 1200 series, equipado con un auto-muestreador, bomba cuaternaria, capacidad de regular la temperatura de la columna (30°C), un detector de arreglo de diodos (214 nm) y una columna Agilent Eclipse C18 de 250 X 4.3 mm para la separación de los compuestos. Se inyectaron 100 μL de muestra. La fase móvil fue una mezcla de agua 70% y acetonitrilo 30% con un flujo de 1 mL min^{-1} . El tiempo de análisis fue de 30 minutos, garantizando la separación de los compuestos.

3.4. Material Vegetal

Para éste experimento se implementó el híbrido Sweet Hearts de SAKATA, debido a que es un tomate tipo uva líder, es de color rojo brillante, tiene un sabor excelente, vida útil y resistencia al agrietamiento, lo cual ha sido del gusto de los agricultores de la región Norte de la República Mexicana. Es una planta indeterminada que tiene buen vigor y produce rendimientos iniciales impresionantes con conjuntos continuos y grupos completos de frutos muy firmes de excelente calidad. Sweet Hearts se adapta bien a campo abierto y a la agricultura protegida.

3.5.. Producción de Plántula

La producción de plántula de tomate tipo cherry, se realizó en el Campo Experimental del Centro de Agricultura Protegida (CAP) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicado en la carretera a Laredo, ex Hacienda el Canadá, Escobedo, Nuevo León, México (Figura 4).



Figura 4. Plantas de tomate cherry en charola de poliestireno

La siembra se realizó el día 17 de marzo del 2016 en una charola de poliestireno de 200 cavidades, utilizando turba de musgo (peat moss) de COSMO-PEAT como sustrato de germinación y las plántulas se mantuvieron bajo humedad adecuada por un periodo de 40 días antes de su trasplante.

3.6. Establecimiento del cultivo

El trasplante se realizó en un surco, con una distancia entre plantas de 0.5 m, en un invernadero israelí tipo sierra el día 26 de abril, aplicando al cepellón, bajo inmersión, una solución antifúngica a base de Propamocarb clorhidrato: Propil 3-(dimetilamino) propilcarbamato-hidrocloruro al 64% (PREVICUR N) del laboratorio BAYER y Carbendazim: Metilbenzimidazol-2-ilcarbamato al 43% (CARBENDASAL 500 F) de QUIMICA LUCAVA. Las plántulas se trasplantaron en suelo y se aplicaron las prácticas culturales tradicionales para tomate en invernadero (Figura 5).



Figura 5. Establecimiento de plantas de tomate tipo cherry.

3.7 Establecimiento de Jaulas Entomológicas

Para el experimento se construyeron jaulas entomológicas de 0.18 m³ elaboradas a base de madera, cubiertas con malla antiáfidos de forma tensada para evitar la infestación de insectos ajenos al experimento y además para contener el número exacto de moscas introducidas (Figura 6).



Figura 6. Vista superior de la planta cubierta con Jaula Entomológica

3.7. Tratamientos

El experimento se estableció con cuatro tratamientos: T1, Testigo, T2, Extracto de semilla de neem, T3, Extracto foliar de neem, T4, Sivanto Prime (Flupyradifurone), con cinco repeticiones cada uno, los cuales fueron asignados completamente al azar a las jaulas entomológicas, las cuales fueron infestadas con 500 adultos de mosca blanca (Figura 7).



Figura 7.- Distribución de tratamientos bajo invernadero

3.8. Variables Evaluadas

Las variables que se midieron fueron número de adultos muertos en piso, número de adultos muertos en tallo, número de adultos muertos en hojas basales (1-5), número de adultos muertos en hojas apicales (6-10) y número de adultos muertos en jaula (Figura 8).



Figura 8. Conteo de adultos muertos después de los tratamientos

Los tratamientos fueron aplicados con ayuda de un aspersor manual previamente calibrado, en una sola aplicación y se monitoreó diariamente durante siete días y al día séptimo se hizo el conteo total. Los datos del número de moscas muertas en cada una de las posiciones de la planta, en el piso y en la jaula fueron transformado utilizando la raíz cuadrada del número. Posteriormente se realizó un análisis de varianza con el modelo del diseño completamente al azar y en los casos

en donde se encontró diferencia significativa, las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el Software SPSS Statistic.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de HPLC para Extractos de Neem

El contenido de azadiractina en semillas de neem se ha determinado utilizando diversos métodos. Algunos investigadores como Ermel *et al.* (1984), utilizaron la cromatografía de capa fina en extractos de semillas de neem, Johnson y Morgan (1997), así como, Ambrosino *et al.* (1999), han reportado el uso de la cromatografía de fluido supercrítico para la determinación (cualitativa y cuantitativa) de azadiractina en extractos crudos de semillas de neem; una vez que éstos procedimientos técnicos no son libres de impurezas en las muestras, no se pueden considerar útiles como metodologías rutinarias para la determinación de AZA.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es ampliamente utilizada para la determinación de azadiractina en semilla, aceite y productos derivados del neem. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Determinación de azadiractina en extractos foliares y de semilla de neem.

Muestra	Concentración final (mg L⁻¹) del extracto	Concentración expresado en %
Extracto Foliar de Neem	ND	ND
Extracto de Semilla de Neem	19961.2	1.99

ND (No Detectado)

El contenido de Azadiractina en el presente trabajo fue de una concentración de 1.99 % en el aceite de neem, mostrando una concentración superior, tomando como referencia 0.27% y 0.91% de concentración por parte de Zhang, *et. al.* (1989) de diferentes semillas de neem.

Sharma *et al.* (2003), utilizaron la extracción metanólica de azadiractina a partir de semillas de neem previamente desengrasadas para la posterior purificación de los limonoides. En la presente investigación se determinó el contenido de azadiractina con la metodología reportada por Kaushik (2002) y se determinaron los correspondientes cromatogramas a cada muestra (Figuras 9, 10 y 11).

Los extractos de neem fueron analizados para determinar el contenido de azadiractina utilizando un equipo HPLC, De Paula *et al.* (2016). Para tal propósito se

realizó una curva de calibración utilizando el estándar de azadiractina marca Sigma-Aldrich. En las siguientes figuras se muestran los cromatogramas correspondientes a cada muestra procesada mediante HPLC:

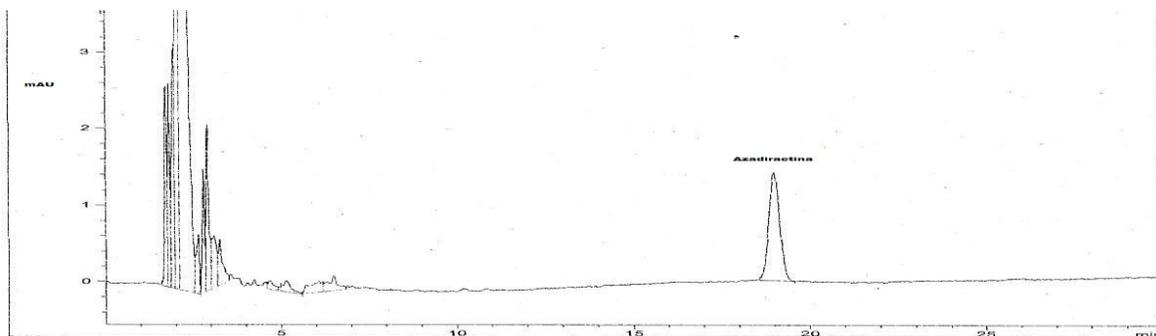


Figura 9. Cromatograma de una muestra estándar AZA, la señal de respuesta muestra un pico a los 20 minutos de exposición.

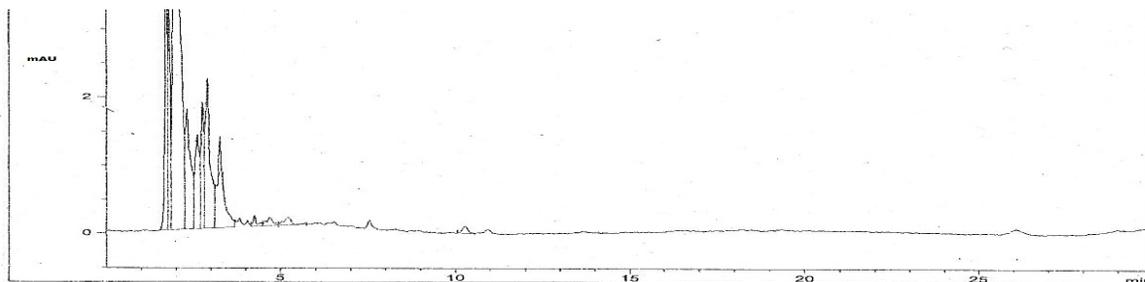


Figura 10. Cromatograma del extracto foliar de neem en función de su amplitud de onda y tiempo de exposición de la muestra en HPLC.

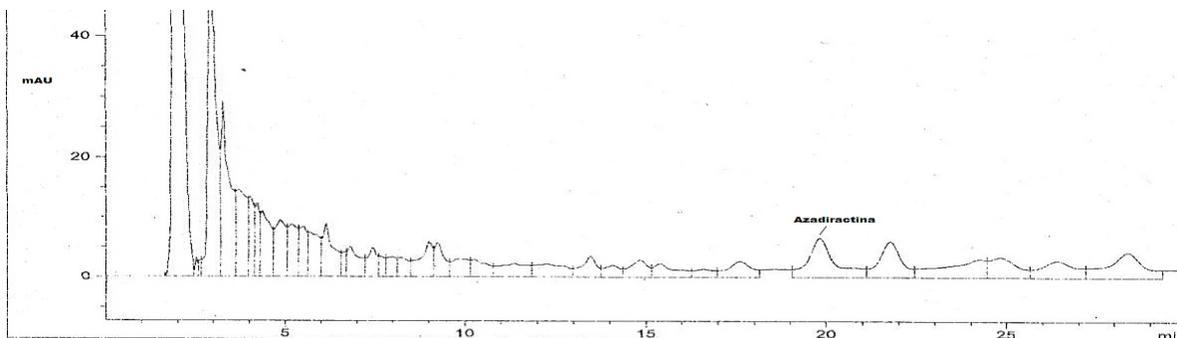


Figura 11. Cromatograma del extracto de semilla de neem en función de su amplitud de onda y tiempo de exposición de la muestra en HPLC.

Las áreas de la curva obtenida con el HPLC resultaron lineales respecto al contenido de AZA (Figura 12).

A continuación se presenta la gráfica correspondiente a la curva de calibración:

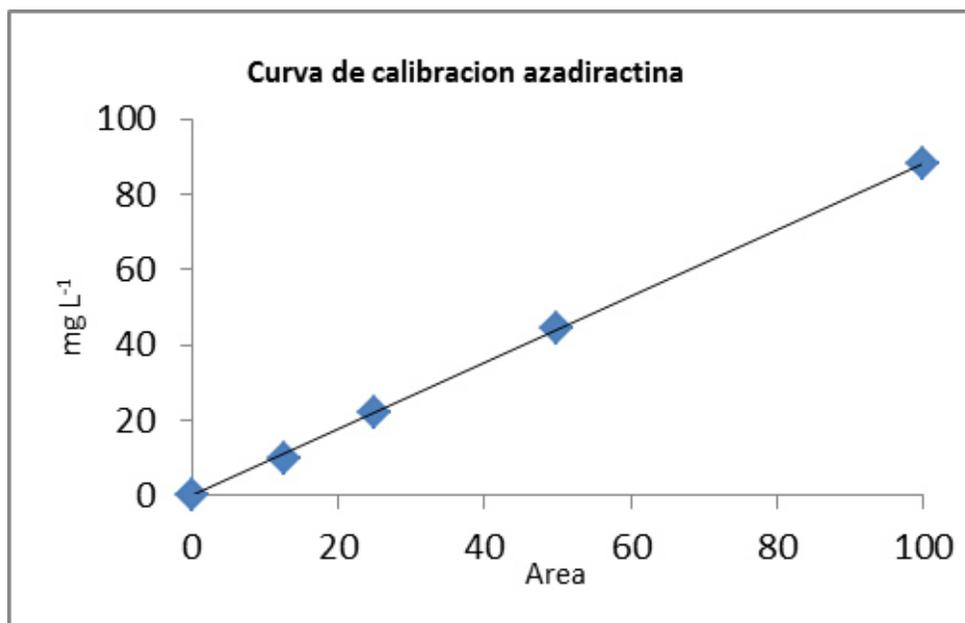


Figura 12. Curva de Calibración de Azadiractina

La concentración de los compuestos bioactivos del neem no son uniformes en las diferentes partes de la planta, por lo tanto, éste punto deberá ser considerado al momento de realizar extracciones para referenciar el nivel de AZA en cada una de las partes del árbol de neem.

Para la extracción de AZA se deberá considerar varios métodos y destacar aquellos que usan como solvente al etanol (Larson, 1985) debido a su composición orgánica y su efecto biodegradable.

Los extractos comerciales de la semilla de *A. indica* se valoran primordialmente por el contenido de AZA en sus formas estructurales (Sharma *et al.*, 2003), pero rara vez por los terpenoides que ejercen efectos aditivos a la acción insecticida (Siddiqui *et al.*, 2002). Adicionalmente, los aceites contenidos en los extractos de neem les confieren propiedades penetrantes y de sinergia con la AZA y otros componentes (Stark y Walter, 1995).

La preparación de bioinsecticidas efectivos a base de neem requiere que el proceso de extracción separe e incremente el contenido de AZA y otros componentes relacionados con la actividad insecticida de los extractos.

4.2. Mortalidad de adultos de *Bemisia tabaci* Genn.

Los análisis de varianza para los conteos de moscas blancas muertas al final del experimento resultaron con diferencia significativa para el número de moscas encontradas en el piso, tallo, hojas basales, hojas apicales, jaula y el total, La comparación de medias para el número de adultos encontradas en el suelo resultó con diferencias altamente significativas ($p=0.000$) entre los tratamientos. En el análisis de comparación de medias se encontró que el tratamiento comercial Sivanto Prime (Flupyradifurone) resultó con el mayor número de moscas muertas en el piso, la jaula y en el total de moscas muertas. El tratamiento que le siguió en efectividad fue el de extracción de semilla, el cual resultó con el mayor número de moscas muertas en el tallo, hojas basales y hojas apicales, ocupando el segundo lugar en la efectividad de muertes totales. El tratamiento de extracción de hojas ocupó el tercer lugar de efectividad, superando en la mayoría de los casos al tratamiento testigo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de medias de tratamientos en conteos de adultos muertos. El número de moscas muertas fue transformado utilizando la raíz cuadrada del número.

Tratamientos	Piso	Tallo	Hojas Basales	Hojas Apicales	Jaula	Total muertas
Testigo	1.802 d	1.283 c	1.952 c	1.083 c	1.000 d	3.060 d
Ext. semilla neem	11.586 b	7.035 a	9.439 a	7.141 a	4.229 b	18.550 b
Ext. foliar neem	8.264 c	3.367 b	4.987 b	2.838 c	2.469 c	10.900 c
Sivanto Prime	18.133 a	3.813 b	5.290 b	5.097 b	5.795 a	20.880 a

Los resultados obtenidos muestran el efecto de derribe del tratamiento 4 (Sivanto Prime) sobre los adultos de mosca blanca tratados. En el conteo posterior a la aplicación de los tratamientos, se obtuvo una mortalidad elevada y notoria del tratamiento comercial sobre los demás tratamientos. También se nota una mortalidad de comportamiento uniforme en la cantidad de individuos muertos en el tratamiento 2 (Extracto de semilla) durante los 7 días del conteo de adultos muertos de *B. tabaci* (Figura 13). Respecto a la dinámica de la incidencia de muerte por el efecto de los tratamientos (Figura 14), se encontró que el tratamiento químico tuvo un efecto inmediato sobre los insectos, mientras que el tratamiento de extracto de semilla tuvo un efecto más retardado, debido a que un número significativo de moscas fueron encontradas muertas hasta siete días después de la aplicación.

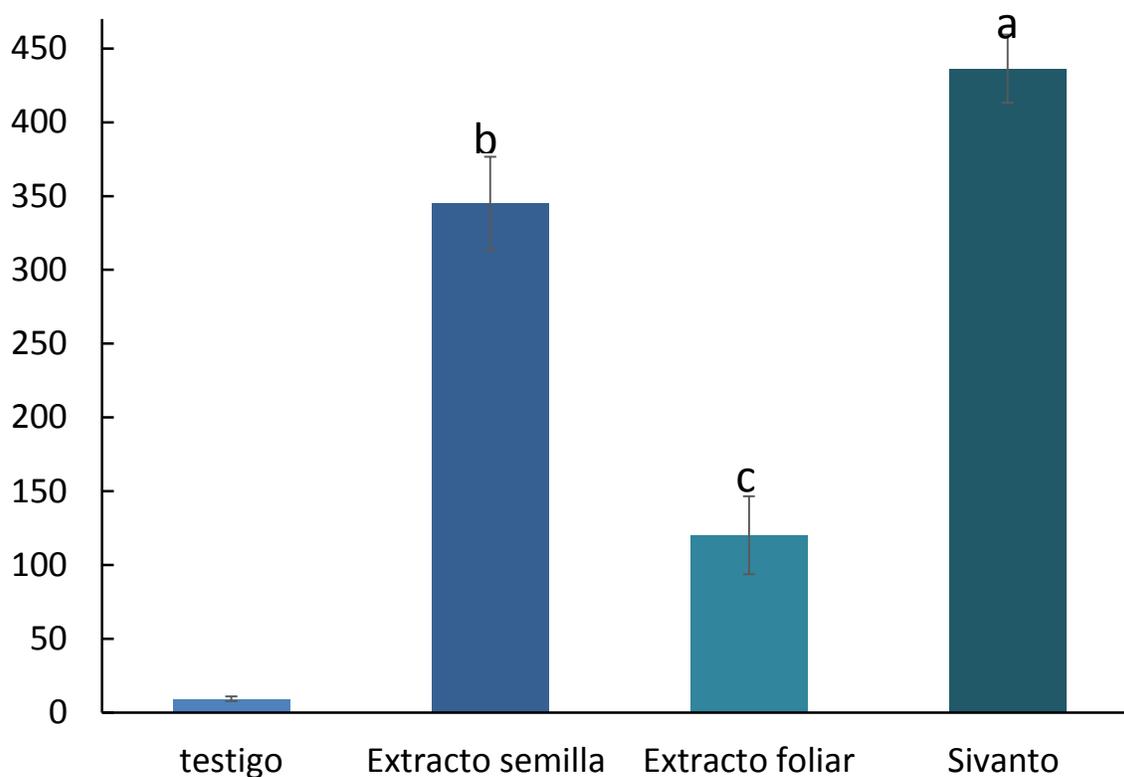


Figura 13.- Gráfica de adultos muertos totales por tratamiento

El efecto agresivo que mostró el tratamiento de semilla de neem en la presente investigación coincide con lo mencionado por Dai *et al.* (2001), donde refiere que la azadiractina se presenta en cualquier parte anatómica del árbol; sin embargo, la concentración más alta se obtiene de las semillas, siendo éstas las más recomendadas para extraer el limonoide AZA implicado en el control de insectos como la mosca blanca.

Los resultados arrojados en éste experimento sobre la muerte de insectos corroboran lo referido por Schmuttere, H. (1990) en donde propone que la azadiractina interfiere en el proceso normal de la metamorfosis de insectos, reduce la fecundidad, el crecimiento, la ovipostura y la alimentación de los insectos y por ende la muerte. Lo anterior se observó en el presente experimento en el periodo que se evaluó la cantidad de adultos de mosca blanca muertos en los tratamientos (Figura 14). También se observó que el extracto de semilla de neem tiene un efecto insecticida lento en los días posteriores a su aplicación.

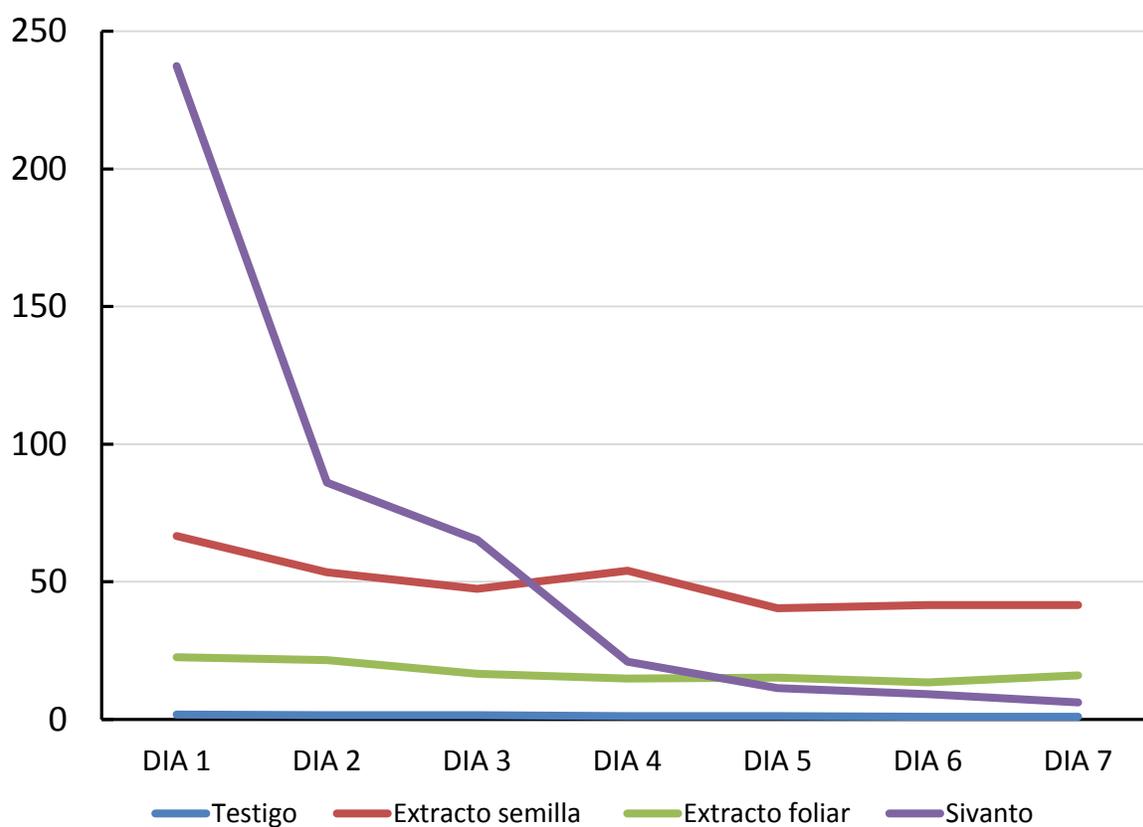


Figura 14. Gráfica del comportamiento de los tratamientos durante los siete días de muestreo. Se observa la cantidad de adultos muertos en el transcurso de los días posteriores a la aplicación de los tratamientos.

5. CONCLUSIONES

Los extractos de neem son una herramienta viable para el control de mosca blanca en los invernaderos del Estado de Nuevo León y representan una alternativa ecológica para la producción de tomate.

Es factible considerar el uso de extractos de neem para la implementación de un Manejo Integrado de Plagas, en combinación con algunos agroquímicos de bajo impacto ambiental.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ambrosino P, R Fresa, V Fogliano, S M Monti and A Ritieni. 1999. Extraction of azadirachtin from neem seed kernels by supercritical fluid and its evaluation by HPLC and LC/MS. *J. Agric. Food Chem.* 47:5252-5256.
- Amer, A., and Mehlhorn, H. 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology research*, 99(4), 466-472.
- Bolaños, A. 1998. Introducción a la Olericultura. San José, Costa Rica. Editorial EUNED. p. 87-90.
- CONAGUA. 2015. <http://www.conagua.gob.mx>, consulta realizada el 20 de septiembre del año 2016.
- Coudriet, D. L., N. Prabhaker and D. E. Meyerdrick. 1985. Sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae): Effects of neem - seed extract on oviposition and immature stages. *Environmental Entomology* 14:77&779.
- Dai J, V A Yaylayan, G S Vijaya-Raghavan, J R Pare and 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.

- De Castro, M. L., and Ayuso, L. G. 2000. Soxhlet extraction. *Environmental Applications*, 2701-5.
- De Paula, J. A. M., Brito, L. F., Caetano, K. L. F. N., de Moraes Rodrigues, M. C., Borges, L. L., and da Conceição, E. C. 2016. Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss.(Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method. *Talanta*,149, 77-84.
- Elango, G., Bagavan, A., Kamaraj, C., Zahir, A. A., and Rahuman, A. A. 2009. Oviposition-deterrent, ovicidal, and repellent activities of indigenous plant extracts against *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, 105(6), 1567-1576.
- 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.
- Fernández, P. 2009. Bioinsecticidas en la producción de hortalizas y frutas. Ecuador. Recuperado el 28 de Marzo de 2015, de <http://es.slideshare.net/cephasx/bioinsecticidas?related=2>
- Gómez, J., 1943: Contribución al conocimiento de los Aleyródidos de España. (Hem. Homoptera). 19: 173-209.

- Govindarajan, M., and Sivakumar, R. 2012. Adulticidal and repellent properties of indigenous plant extracts against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, 110(5), 1607-1620.
- Govindarajan, M., Mathivanan, T., Elumalai, K., Krishnappa, K., and Anandan, A. 2011. Ovicidal and repellent activities of botanical extracts against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(1), 43-48.
- Jiménez E., Chavarría A. and Rizo Á. 2011. Manejo de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius.) y Geminivirus en Semilleros. *La calera*, 6.
- Johnson S, and Morgan. 1997. Comparison of chromatographic systems for triterpenoid from neem (*Azadirachta indica*) seeds. *J. Chromatography*. A761:53-63.
- Karger, B. L. 1997. "HPLC: Early and Recent Perspectives". *Journal of Chemical Education*. 74: 45.
- Kaushik, N. 2002. Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Anal Bioanal Chem*, 374 :1199–1204.
- Larson, R. O. 1985. Stable anti-pest neem seed extract. US Patent 4:556,562.
- Lastres, L., Argüello, H. Rueda, A. and Rivera, M. 2007. Guía para el reconocimiento y manejo de virosis en cultivos hortícolas. Programa de Manejo Integrado de Plagas en América Central (PROMIPAC-ZAMORANO-CONSUDE). Vectores y hospederos alternos de virus y su

infección. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. P. 48-69.

Marciano de Paula, Joelma Abadia; Ferreira Brito, Lucas; Ferreira Neves Caetano, Karen Lorena; De Moraes Rodrigues, Mariana Cristina; Luiz Borges, Leonardo y Cardoso da Conceição, Edemilson. 2015. Ultrasound-assisted extraction of azadirachtin from dried entire fruits of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) and its determination by a validated HPLC-PDA method. Brazil.

Morales, F., Cardona, C., Bueno, J. and Rodríguez, I. 2006. Proyecto Tropical de mosca blanca. Manejo Integrado de Enfermedades de Plantas Causadas por Virus Transmitidos por Moscas Blancas. Recuperado el 31 de marzo de 2015, de http://r4d.dfid.gov.uk/PDF/Outputs/CropProtection/R8041_FTR_Coordination_Anex_05.pdf

Morgan, E.D., 2009. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17: 4096–4105.

Pérez. 2002. Recuperado el 31 de marzo de 2015, de www.virtualcenter.org/es

Chaudhry, M. 1993. Alternativas a los insecticidas, Jefe de la Sección de Información Técnica Comité Consultivo Internacional del Algodón de los estados Unidos.

Rajkumar, S., and Jebanesan, A. 2005. Scientific Note Oviposition deterrent and skin repellent activities of *Solanum trilobatum* leaf extract against the malarial vector *Anopheles stephensi*. *Journal of Insect Science*, 5(1), 15.

- Ramírez, J. A., y Lacasaña, M. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67-75.
- Rausell, C., Martínez-Ramírez, A. C., García-Robles, I., and Real, M. D. 2000. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Applied and environmental microbiology*, 66(4), 1553.
- Rodríguez, S. y Morales, B. 2007. Evaluación de Alternativas de Protección Física. Recuperado el 08 de julio de 2015, de <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnh01r696e.pdf>
- Román, E., 2008. Mosca Blanca. Colombia (FFA) Fondo de Fomento Algodonero.
- Romero, C., y Vargas, M. 2005. Extracción del aceite de la semilla de neem (*Azadirachta indica*). *Ciencia*, 13(4).
- Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta indica*.
- Sharma, V, S. Walia, J. Kumar, M. G. Nair, and 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(14): 3966–3972.
- Siddiqui, B. S., F. Afshan, S. Faizi, S. N. H. Naqvi, and R. M. Tariq. 2002. Two new triterpenoids from *Azadirachta indica* A. Juss. and their insecticidal activity. *J. Nat. Prod.* 65(8): 1216–1218.

- Silva, M. A, G. C. D. Bezerra-Silva, J. D. Vendramim, T. Mastrangelo, and M. R. Forim. 2013. Neem Derivatives are not Effective as Toxic Bait for Tephritid Fruit Flies.
- Stark, J. D., and J. F. Walter. 1995. Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 43(2): 507–512.
- Ulloa, J. A. 2005. Evaluación de Productos Sintéticos y Bioplaguicidas. Recuperado el 25 de Septiembre de 2015, de <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0536E/A0536E.PDF>
- Valarezo O., Cañarte E., Navarrete B., Guerrero J., y Arias B. 2008. Diagnóstico de la “mosca blanca” en Ecuador. *La granja*, 13.
- Xiang, Y.; Liu Y.; and Lee M.L. 2006. "Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature". *Journal of Chromatography A.* 1104 (1–2): 198–202.
- Zhang Ye-Guang, Chiu Shin-Foon, Lin Guanya, and Cai Dezhi, 1989. Preliminary report of neem tree introduction and cultivation in China.