

EXTRACCIÓN Y ESTABILIDAD DE LA AZADIRACTINA A EN EXTRACTOS DE NEEM (*Azadirachta indica*) OBTENIDOS CON ENZIMAS Y DISOLVENTES

EXTRACTION AND STABILITY OF AZADIRACHTIN A IN NEEM (*Azadirachta indica*) EXTRACTS OBTAINED WITH ENZYMES AND SOLVENTS

Arfaxad Aguilar-Acosta, Argel Flores-Primo*, David I. Martínez-Herrera, Violeta T. Pardío-Sedas, Karla M. López-Hernández, Sóstenes R. Rodríguez-Dehaibes, Elissa Chávez-Hernández

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Miguel A. de Quevedo S/N, 91710, Veracruz, Veracruz, México. (mopri02@yahoo.com.mx).

RESUMEN

La semilla del neem (*Azadirachta indica*) contiene triterpenoides con actividad acaricida y repelente a plagas del sector agropecuario. La concentración de los compuestos en el aceite de neem depende del método de extracción. La hipótesis fue que el uso de enzimas y disolventes aumenta la liberación de azadiractina A (AzaA) de la semilla del neem, y su concentración permanece estable en los extractos durante su almacenamiento a temperaturas diferentes. El objetivo fue determinar el efecto de la maceración con hexano de extractos de neem preparados con Crystalzyme® PLMX, Crystalzyme® Cran, Crystalzyme® 100XL, y Cellulase 17600L sobre la extracción de (AzaA) y su estabilidad en almacenamiento. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones. La unidad experimental fue la semilla del neem recolectada de una plantación en Jamapa, Veracruz, México. La constante de velocidad de pérdida (k) de AzaA en almacenamiento se determinó mediante una ecuación de primer orden. Los datos se analizaron con ANDEVA y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). La concentración mayor de AzaA (2.73 g L^{-1}) se obtuvo con CPLMX en la hidrólisis y 24 h de maceración con hexano, con mayor proporción de la fracción acuosa (2.67 g L^{-1}) que la fracción hexánica (0.06 g L^{-1}). Las concentraciones de AzaA extraídas con el uso de enzimas y hexano fueron similares a las obtenidas por ultrasonido, prensado mecánico y extrusión metanólica. La pérdida de AzaA en los extractos enzimáticos aumentó con el incremento de la temperatura de almacenamiento, ya que no se detectó en los extractos enzimáticos después de 7 y 28 d de almacenamiento a 50 y 30 °C, respectivamente. La concentración de AzaA (20%) se mantuvo constante 28 d después de almacenamiento a 5 °C y presentó la k menor entre los extractos enzimáticos.

ABSTRACT

Neem seed (*Azadirachta indica*) contains triterpenoids with acaricidal and pest repellent activity in the agricultural sector. The concentration of the compounds in neem oil depends on the method of extraction. The hypothesis in this study was that the use of enzymes and solvents increases the release of Azadirachtin A (AzaA) from the neem seed, and its concentration remains stable in the extracts during storage at different temperatures. The objective was to determine the effect of hexane maceration of neem extracts prepared with Crystalzyme® PLMX, Crystalzyme® Cran, Crystalzyme® 100XL, and Cellulase 17600L on the extraction of azadirachtin A (AzaA) and its storage stability. The experimental design was completely randomized with three repetitions. The experimental unit was the neem seed collected from a plantation in Jamapa, Veracruz, Mexico. The loss rate constant (k) of AzaA in storage was determined by a first order equation. Data were analyzed with ANDEVA and the Tukey mean comparison test ($p \leq 0.05$). The highest concentration of AzaA (2.73 g L^{-1}) was obtained with CPLMX in hydrolysis and 24 h of maceration with hexane, with a greater proportion of the aqueous fraction (2.67 g L^{-1}) than the hexane fraction (0.06 g L^{-1}). The concentrations of AzaA extracted with the use of enzymes and hexane were similar to those obtained by ultrasound, mechanical pressing and methanolic extrusion. The loss of AzaA in the enzyme extracts increased with the increase in storage temperature, since it was not detected in the enzyme extracts after 7 and 28 d of storage at 50 and 30 °C, respectively. The concentration of AzaA (20%) remained constant 28 d after storage at 5 °C and showed the lowest k among the enzyme extracts.

Key words: neem, *Azadirachta indica*, storage, enzyme extracts, hexane, azadirachtin A.

* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2018. Aprobado: octubre, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 89-100. 2020.

Palabras clave: neem, *Azadirachta indica*, almacenamiento, extractos enzimáticos, hexano, azadiractina A.

INTRODUCCIÓN

Los aceites de plantas están entre las sustancias más empleadas para el control biológico de plagas en el sector pecuario y agrícola (Zoubiri y Baaliouamer, 2014). En México, el árbol de neem (*Azadirachta indica*) se usa para el control natural de especies plagas por su contenido de triterpenoides, entre los cuales destaca la azadiractina (Aza) (Morgan 2009; Giglioti *et al.*, 2011). Aza y sus análogos naturales son los más activos biológicamente en la semilla del neem, y el isómero A (AzaA) es el más abundante (Soni *et al.* 2012). El neem es uno de los bioplaguicidas más estudiados por sus efectos tóxicos para las plagas, constituye una alternativa potencial como sustituto de plaguicidas sintéticos utilizados para el control de artrópodos plaga (Denardi *et al.*, 2011; Giglioti *et al.*, 2011).

La aplicación de AzaA en insectos inhibe las hormonas 20-hydroxyecdysone y a los juveniles, afecta su capacidad de ovoposición en etapa madura y de eclosión en el estado larvario, y bloquea la síntesis de quitina, con lo cual impide a los insectos realizar las mudas necesarias para la siguiente etapa de desarrollo (Giglioti *et al.*, 2011). El cotiledón (semilla) presenta la mayor concentración de AzaA con 83% en comparación con otras partes del fruto como el endospermo, cubierta seminal o cuerpo del fruto (Ramos *et al.*, 2004) y en otras regiones del árbol como corteza, hoja, raíz y tallo (Morgan, 2009). La AzaA se considera un referente de la actividad insecticida de los productos derivados del aceite del neem.

Metodologías propuestas para la obtención del aceite permiten mantener sus propiedades y mejorar el rendimiento en la extracción de AzaA (Azmir *et al.*, 2013). Los métodos de extracción incluyen maceración, extrusión en frío con prensa mecánica y percolación, con el uso de agua y distintos disolventes orgánicos (Esparza-Díaz *et al.*, 2010; Boursier *et al.*, 2011), así como disolventes calientes presurizados, equipo de extracción supercrítica y ultrasonido (Jadeja *et al.*, 2011; Ismadji *et al.*, 2012; De Paula *et al.*, 2016).

Factores como el manejo de la semilla, la exposición a la luz, el almacenamiento, el secado y el método de extracción afectan la concentración de AzaA

INTRODUCTION

Plant oils are among the most commonly used substances for the biological control of pests in the livestock and agricultural sector (Zoubiri and Baaliouamer, 2014). In Mexico, the neem tree (*Azadirachta indica*) is used for the natural control of pest species due to its triterpenoid content, among which azadirachtin (Aza) stands out (Giglioti *et al.*, 2011).

Aza and its natural analogs are the most biologically active in the neem seed, and the A (AzaA) isomer is the most abundant (Soni *et al.* 2012). Neem is one of the most studied biopesticides for its toxic effects on pests, which provides a potential alternative as a substitute for synthetic pesticides used to control pest arthropods (Denardi *et al.*, 2011; Giglioti *et al.*, 2011).

The application of AzaA in insects inhibits the hormones 20-hydroxyecdysone and juvenile, affects their capacity for oviposition in the mature stage and hatching in the larval state, and blocks the synthesis of chitin, which prevents insects from making the necessary molts for the next stage of development (Giglioti *et al.*, 2011). The cotyledon (seed) has the highest concentration of AzaA with 83% compared to other parts of the fruit such as the endosperm, seminal cover or body of the fruit (Ramos *et al.*, 2004) and in other parts of the tree such as bark, leaf, root and stem (Fernandes *et al.*, 2019). AzaA is considered a benchmark for the insecticidal activity of products derived from neem oil.

The methodologies proposed to obtain the oil allow maintaining its properties and improving the extraction performance of AzaA (Azmir *et al.*, 2013). Extraction methods include maceration, cold extrusion with mechanical press and percolation, with the use of water and various organic solvents (Esparza-Díaz *et al.*, 2010; *et al.*, 2011), as well as hot pressurized solvents, equipment of supercritical extraction, and ultrasound (Jadeja *et al.*, 2011; Ismadji *et al.*, 2012; De Paula *et al.*, 2016).

Factors such as seed management, light exposure, storage, drying, and extraction method affect the concentration of AzaA (Gahukar, 2014). Esparza-Díaz *et al.* (2010) mentioned that the concentration of AzaA decreases in neem extracts stored at 30 °C; although Jadeja *et al.* (2011) stated that AzaA is stable up to temperatures of 50 °C.

(Gahukar, 2014). Esparza-Díaz *et al.* (2010) mencionaron que la concentración de AzaA disminuye en los extractos de neem almacenados a 30 °C; aunque Jadeja *et al.* (2011) afirmaron que la AzaA es estable hasta temperaturas de 50 °C.

La pared celular de la semilla es otro factor que condiciona la extracción de los terpenoides activos del neem (Jadeja *et al.*, 2011). Pardío *et al.* (2018) mencionaron que las celulasas o preparados con actividad enzimática múltiple (celulasas, hemicelulasas y pectinasas) aumentan la extracción de metabolitos de interés desde fuentes vegetales por su capacidad de hidrolizar las estructuras de la pared celular.

La hipótesis de este estudio fue que el uso de enzimas con disolventes orgánicos, como el hexano, aumenta la liberación de AzaA de la semilla del neem, y su concentración permanece estable en los extractos durante su almacenamiento a diferentes temperaturas. El objetivo fue determinar el efecto de la maceración con hexano de extractos de neem preparados con el uso de mezclas enzimáticas sobre la estabilidad en almacenamiento de la AzaA extraída.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de neem se extrajeron de frutos con 110 d de desarrollo post-floración obtenidos de árboles con 15 años de edad ubicados en el rancho El Naranjal en el municipio de Jamapa, Veracruz (18° 59' 40.2" N; 96° 15' 11.5" O) a una altitud de 57 m, suelo tipo luvisol, clima cálido-seco-regular, temperatura promedio de 25 °C y una precipitación pluvial media anual de 1108 mm.

Los preparados enzimáticos Crystalzyme® PLMX (CPLMX) [pectinasas (EC 3.2.1.15), celulasas (EC 3.2.1.4), hemicelulasa (no reportada), arabinasa (EC 3.2.1.99)]; Crystalzyme® Cran (CCran) [pectinasa (E.C.3.2.1.15)]; Crystalzyme® 100XL (C100XL) [pectinasa (EC 3.2.1.15), arabinasa (EC 3.2.1.99)]; Cellulase 17600L (CEL) [endo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glucanasa (E.C.3.2.1.91), β -1,4-glucosidasa (EC 3.2.1.21)] se obtuvieron en Valley Research, Inc. (South Bend, Indiana, EUA). Las unidades de actividad enzimática se determinaron mediante la técnica de unidades de papel filtro (UPF mL⁻¹) propuesta por Eveleigh *et al.* (2009).

Extracción de neem asistida por enzimas y maceración con hexano

Las semillas se almacenaron por 24 h en congelación a -20 °C antes de usarlas. El contenido de humedad en las semillas fue de 67.8%. Cuatro extractos de neem se elaboraron; uno con cada preparado enzimático.

The cell wall of the seed is another factor that conditions the extraction of active neem terpenoids (Jadeja *et al.*, 2011). Pardío *et al.* (2018) mentioned that cellulases or preparations with multiple enzymatic activity (cellulases, hemicellulases and pectinases) increase the extraction of metabolites of interest from plant sources due to their ability to hydrolyze cell wall structures.

Hypothesis in our study was that the use of enzymes with organic solvents, such as hexane, increases the release of AzaA from the neem seed, and its concentration remains stable in the extracts during storage at different temperatures. The objective was to determine the effect of hexane maceration of neem extracts prepared with the use of enzymatic mixtures on the storage stability of the extracted AzaA.

MATERIALS AND METHODS

Neem seeds were extracted from fruits with 110 d of post-flowering development obtained from trees with 15 years of age located in the El Naranjal ranch, in the municipality of Jamapa, Veracruz (18° 59' 40.2" N; 96° 15' 11.5" W) at an altitude of 57 m, luvisol soil, warm-dry-regular climate, average temperature of 25 °C, and an average annual rainfall of 1108 mm.

Enzymatic preparations Crystalzyme® PLMX (CPLMX) [pectinases (EC 3.2.1.15), cellulases (EC 3.2.1.4), hemicellulase (not reported), arabinase (EC 3.2.1.99)]; Crystalzyme® Cran (CCran) [pectinase (E.C.3.2.1.15)]; Crystalzyme® 100XL (C100XL) [pectinase (EC 3.2.1.15), arabinase (EC 3.2.1.99)]; Cellulase 17600L (CEL) [endo- β -1,4-glucanase (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glucanase (E.C.3.2.1.91), β -1,4-glucosidase (EC 3.2.1.21)] were obtained from Valley Research, Inc. (South Bend, Indiana, USA). Enzymatic activity units were determined using the filter paper unit technique (UPF mL⁻¹) proposed by Eveleigh *et al.* (2009).

Enzyme-assisted neem extraction and maceration with hexane

The seeds were stored for 24 h in freezing at -20 °C before use. The moisture content in the seeds was 67.8%. Four extracts of neem were made; one with each enzyme preparation.

Fresh seeds (35.4 g) were homogenized with phosphate buffer at pH 5.0 to undergo hydrolysis with CCran and pH 4.5 for CPLMX, C100XL and CEL in a 1:10 ratio (dry base seed: phosphate buffer). Then 4.76, 6.96, 5.3 and 5.60 UPF g⁻¹ seed (dry base) were added for CCran, CPLMX, C100XL and CEL, respectively. The reaction was carried out for 18 h, 45 °C with CPLMX and at 50 °C with the other extracts.

Semillas frescas (35.4 g) se homogenizaron con amortiguador fosfato a pH 5.0 para someterlas a hidrólisis con CCran y pH 4.5 para CPLMX, C100XL y CEL en una relación 1:10 (semilla base seca: amortiguador fosfato). Luego se adicionaron 4.76, 6.96, 5.3 y 5.60 UPF g⁻¹ de semilla (base seca) para CCran, CPLMX, C100XL y CEL, respectivamente. La reacción se realizó durante 18 h, 45 °C con CPLMX y a 50 °C con los otros extractos.

Al finalizar la hidrólisis se adicionó hexano en una relación 1:1 (v:v), se tomaron 10 mL de muestra a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 y 72 h. Las muestras se centrifugaron a 3500 g por 30 min, se separaron los sólidos de las fracciones hexánicas y acuosas, y de esta última se analizaron las concentraciones de AzaA por un equipo HPLC modelo 1525 marca Waters (Milford, Massachusetts, EUA). La fracción oleosa se almacenó en refrigeración para su posterior análisis.

Determinación de componentes acaricidas

El análisis de los componentes acaricidas se realizó por HPLC (Kaushik, 2002) y el equipo incluyó bombas binarias (Waters 1525) y un detector de fotodiodos (Waters 2996). La separación analítica se realizó en una Columna NovaPak C18 de 4 µm (3.9 x 150 mm). Las muestras extraídas se centrifugaron y diluyeron 1:1 en acetonitrilo (HPLC) y se filtraron a través de acrodiscos de 0.22 µm (Millipore) y se inyectaron 20 µL. La velocidad de flujo se estableció en 1 mL min⁻¹, la fase móvil acetonitrilo: agua (40:60), el tiempo de retención de AzaA fue de 3.1 min y las muestras se leyeron a 217 nm.

Almacenamiento de los extractos

El efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad de la AzaA se determinó mediante la elaboración de dos extractos enzimáticos de neem, para cada preparado enzimático (CCran, CPLMX, C100XL y CEL) en matraces con tapón de rosca, sin maceración con hexano y se almacenaron sin luz a 5, 30 y 50 °C.

Las temperaturas de 30 (Esparza-Díaz *et al.*, 2010) y 50 °C (Jadeja *et al.*, 2011) se han registrado como óptimas para la extracción de AzaA, y coinciden con las temperaturas usadas en nuestro estudio para la fase de hidrólisis enzimática y maceración con hexano. Los 5 °C se usaron como referencia de temperaturas de refrigeración. En los días 0, 7, 14, 21 y 28 se tomó 1 mL de muestra y se cuantificó la concentración de AzaA por HPLC. La estabilidad de la AzaA se evaluó durante 28 d, ya que la vida media de la AzaA en solventes orgánicos y acuosos es de 24 d a pH 7.0 y 20 °C (Jarvis *et al.*, 1998).

At the end of the hydrolysis, hexane was added in a 1:1 ratio (v:v), 10 mL of sample were taken at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 and 72 h. The samples were centrifuged at 3500 g for 30 min; the solids were separated from the hexane and aqueous fractions, and from the latter the AzaA concentrations were analyzed with an HPLC model 1525, Waters brand (Milford, Massachusetts, USA). The oil fraction was stored in refrigeration for further analysis.

Determination of acaricidal components

Analysis of the acaricidal components was performed by using HPLC (Kaushik, 2002) and the equipment included binary pumps (Waters 1525) and a photodiode detector (Waters 2996). The analytical separation was performed on a 4 µm NovaPak C18 column (3.9 x 150 mm). The extracted samples were centrifuged and diluted 1:1 in acetonitrile (HPLC) and filtered through 0.22 µm acrodisk (Millipore), and 20 µL were injected. The flow rate was set at 1 mL min⁻¹, acetonitrile mobile phase: water (40:60), AzaA retention time was 3.1 min, and the samples were read at 217 nm.

Extract storage

The effect of storage temperature on the stability of AzaA was determined by the preparation of two enzymatic extracts of neem, for each enzyme preparation (CCran, CPLMX, C100XL and CEL) in flasks with screw cap, without maceration with hexane and stored without light at 5, 30 and 50 °C.

The temperatures of 30 (Esparza-Díaz *et al.*, 2010) and 50 °C (Jadeja *et al.*, 2011) were recorded as optimal for the extraction of AzaA and coincided with the temperatures used in our study for the phase of enzymatic hydrolysis and maceration with hexane. The 5 °C was used as a reference for cooling temperatures. On days 0, 7, 14, 21 and 28, 1 mL of sample was taken and the concentration of AzaA was quantified using HPLC. The stability of AzaA was evaluated for 28 d since the average life of AzaA in organic and aqueous solvents is 24 d at pH 7.0 and 20 °C (Jarvis *et al.*, 1998).

Design and statistical analysis

The experimental design was completely randomized with three replications for the five treatments evaluated: four enzymatic (CPLMX, CEL, CCran, and C100XL), and an enzyme-free treatment.

The statistical differences in the results of the release kinetics of AzaA during maceration with hexane and the loss rate constant

Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones para los cinco tratamientos evaluados: cuatro enzimáticos (CPLMX, CEL, CCran y C100XL) y un tratamiento sin enzima.

Las diferencias estadísticas de los resultados de la cinética de liberación de AzaA durante la maceración con hexano y la constante de velocidad de pérdida (k) de AzaA en el almacenamiento se analizaron por ANDEVA y pruebas de separación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Para la cuantificación de la constante de pérdida de AzaA durante el almacenamiento se utilizó la ecuación de primer orden:

$$Y_i = Y_0 (1 - e^{-kt})$$

donde Y_i es la concentración de AzaA en g L^{-1} de extracto; Y_0 es la concentración inicial de AzaA, y k es la constante de velocidad de pérdida de AzaA en el tiempo (t).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones óptimas de cada preparado enzimático se establecieron en función de la hidrólisis de las estructuras celulósicas de la semilla de neem. Para la hidrólisis enzimática se usó semilla de neem fresca con 24 h de almacenamiento a -20°C , para disminuir los factores que pudieran condicionar la pérdida de componentes acaricidas antes del proceso de extracción.

La reacción se realizó por 18 h en las condiciones óptimas de cada uno de los preparados enzimáticos CPLMX (pH 4.5 y 45°C), C100XL (pH 4.5 y 50°C) CCran (pH 5.0 y 50°C) y CEL (pH 4.5 y 50°C), y posteriormente se adicionó hexano en proporción 1:1 (v:v). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (30°C) durante la maceración.

Cinética del efecto de la maceración con hexano sobre la liberación de AzaA

El extracto de neem obtenido con CPLMX presentó la concentración máxima de AzaA ($p \leq 0.05$) 2.67 g L^{-1} en la fracción acuosa a las 24 h de maceración con hexano (Figura 1). La cantidad de AzaA extraída fue superior a la referida en otros estudios en los que se utilizó extrusión simple y Soxhlet con hexano como métodos de extracción, y fue similar a la obtenida con extrusión metanólica, prensado

(k) of AzaA in storage were analyzed by ANDEVA and Tukey means separation tests ($p \leq 0.05$).

For the quantification of the AzaA loss constant during storage, the first order equation was used:

$$Y_i = Y_0 (1 - e^{-kt})$$

where Y_i is the concentration of AzaA in g L^{-1} extract; Y_0 is the initial concentration of AzaA, and k is the loss rate constant of AzaA in time (t).

RESULTS AND DISCUSSION

The optimal conditions of each enzyme preparation were established based on the hydrolysis of the cellulosic structures of the neem seed. For enzymatic hydrolysis, fresh neem seeds were used with 24 h of storage at -20°C , to reduce the factors that could condition the loss of acaricidal components before the extraction process.

The reaction was carried out for 18 h under optimal conditions of each of the enzyme preparations CPLMX (pH 4.5 and 45°C), C100XL (pH 4.5 and 50°C) CCran (pH 5.0 and 50°C), and CEL (pH 4.5 and 50°C), and subsequently hexane was added in a 1:1 ratio (v:v). The samples were kept at room temperature (30°C) during maceration.

Kinetics of the effect of maceration with hexane on the AzaA release

The neem extract obtained with CPLMX showed the maximum concentration of AzaA ($p \leq 0.05$) 2.67 g L^{-1} in the aqueous fraction at 24 h of maceration with hexane (Figure 1). The amount of AzaA extracted was higher than that reported in other studies in which simple extrusion and Soxhlet with hexane were used as extraction methods, and was similar to that obtained with methanolic extrusion, mechanical pressing and ultrasound (Esparza-Díaz *et al.*, 2010; González-Gómez *et al.*, 2012; De Paula *et al.*, 2016).

No statistically significant differences ($p > 0.05$) were found in the concentration of AzaA obtained at 24 and 72 h of maceration with hexane, therefore 24 h is the ideal time to obtain the highest concentration of AzaA.

The release of AzaA in the extract with CEL showed a negative trend during the first 8 h of

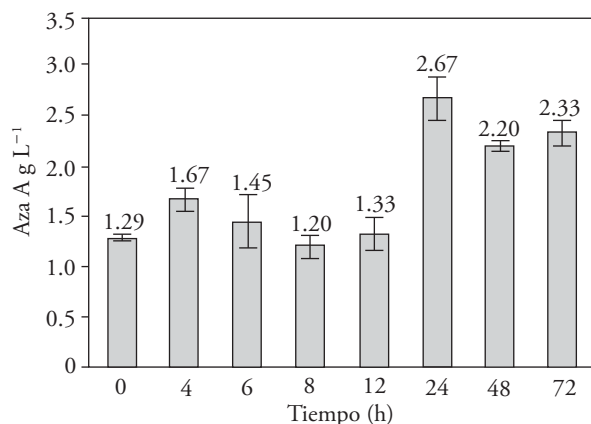


Figura 1. Cinética del efecto de la maceración con hexano del extracto de neem obtenido con CPLMX sobre la liberación de AzaA.

Figure 1. Kinetics of the effect of hexane maceration of the neem extract obtained with CPLMX on the release of AzaA.

mecánico y ultrasonido (Esparza-Díaz *et al.*, 2010; González-Gómez *et al.*, 2012; De Paula *et al.*, 2016).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en la concentración de AzaA obtenida a las 24 y 72 h de maceración con hexano, por lo tanto 24 h es el tiempo ideal para obtener la concentración mayor de AzaA.

La liberación de AzaA en el extracto con CEL presentó una tendencia negativa durante las primeras 8 h de maceración, ya que disminuyó 48% la concentración de AzaA respecto a la inicial, mientras que al final de la maceración se tuvo una concentración de AzaA sin diferencias ($p > 0.05$) estadísticas con la obtenida en el tiempo 0 (Figura 2).

Esparza-Díaz *et al.* (2010) mencionaron que las temperaturas superiores a 30 °C provocan la pérdida de AzaA durante el almacenamiento. Según Boursier *et al.* (2011), la AzaA es una molécula termolábil y fotosensible que puede degradarse en el tiempo. Este fenómeno podría explicar la disminución en la concentración de AzaA durante la maceración con hexano a 30 °C y la variabilidad en su concentración en toda la cinética.

Las concentraciones de AzaA durante la maceración de los extractos de neem obtenidos con C100XL y CCran no presentaron diferencias significativas para los tiempos evaluados (Figuras 3 y 4).

La concentración de AzaA se cuantificó en la fracción hexánica a 24 h de maceración por la técnica

maceración since the concentration of AzaA with respect to the initial one decreased by 48%, while at the end of the maceration there was a concentration of AzaA not statistically different ($p > 0.05$) from that obtained at time 0 (Figure 2).

Esparza-Díaz *et al.* (2010) mentioned that temperatures above 30 °C cause the loss of AzaA during storage. According to Boursier *et al.* (2011), AzaA is a thermolabile and photosensitive molecule that can degrade over time. This phenomenon could explain the decrease in the concentration of AzaA during maceration with hexane at 30 °C, and the variability in its concentration throughout the kinetics.

The concentrations of AzaA during the maceration of the neem extracts obtained with C100XL and CCran did not show significant differences for the times evaluated (Figure 3 and 4).

The concentration of AzaA was quantified in the hexane fraction at 24 h of maceration by the HPLC technique (Figure 5). The extracts obtained with CCran had the highest concentration of AzaA in the hexane fraction with 0.54 g L⁻¹. These results indicate that the highest proportion of AzaA occurs in the aqueous fraction.

The AzaA concentrations obtained with the two fractions were 2.73, 1.82, 1.37, and 1.26 for CPLMX, C100XL, CCran, and CEL, respectively.

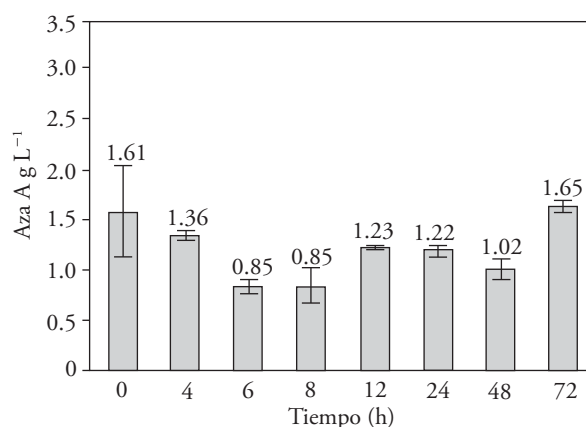


Figura 2. Cinética del efecto de la maceración con hexano del extracto de neem obtenido con CEL sobre la liberación de AzaA.

Figure 2. Kinetics of the effect of hexane maceration of the neem extract obtained with CEL on the release of AzaA.

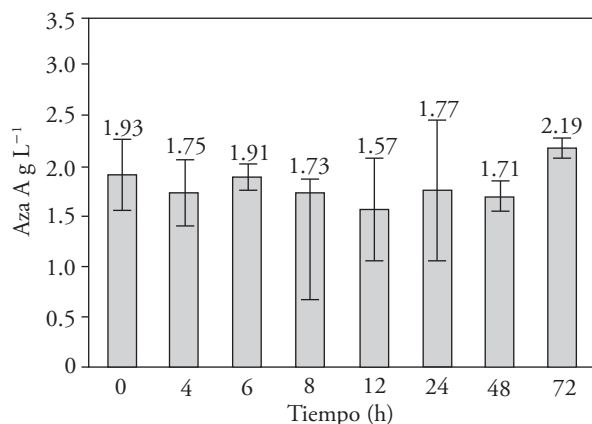


Figura 3. Cinética del efecto de la maceración con hexano del extracto de neem obtenido con C-100XL sobre la liberación de AzaA.

Figure 3. Kinetics of the effect of hexane maceration of the neem extract obtained with C-100XL on the release of AzaA.

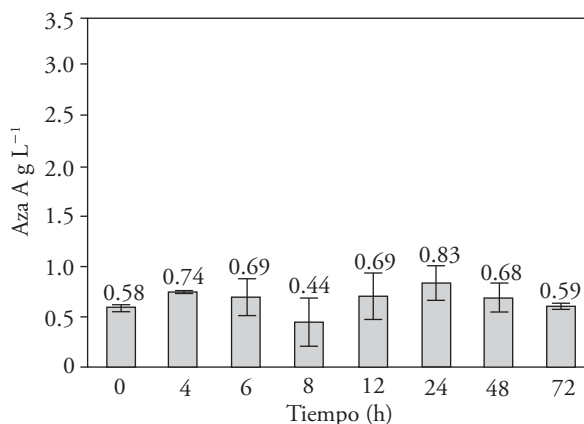


Figura 4. Cinética del efecto de la maceración con hexano del extracto de neem obtenido con CCran sobre la liberación de AzaA.

Figure 4. Kinetics of the effect of hexane maceration of the neem extract obtained with CCran on the release of AzaA.

de HPLC (Figura 5). Los extractos obtenidos con CCran presentaron la mayor concentración de AzaA en la fracción hexánica con 0.54 g L^{-1} . Estos resultados indican que la mayor proporción de AzaA se presenta en la fracción acuosa. Las concentraciones de AzaA obtenidas con las dos fracciones fueron 2.73, 1.82, 1.37 y 1.26 g L^{-1} para CPLMX, C100XL, CCran, y CEL, respectivamente.

El tratamiento testigo sin enzimas se evaluó después de 24 h de maceración con hexano y la concentración de AzaA fue de 0.18 g L^{-1} y 0.06 g L^{-1} en la fracción acuosa y hexánica, respectivamente. Esto confirma que el uso de los preparados enzimáticos de este estudio aumentó la extracción de AzaA a partir de la semilla del neem en comparación con el tratamiento sin enzimas.

La combinación de actividades de pectinasas, celulasas, hemicelulasas y arabinasas presentes en el preparado enzimático CPLMX promovió una liberación mayor de la AzaA, y aumentó su concentración en el extracto.

Estabilidad de la AzaA en almacenamiento

Para determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la degradación de AzaA se elaboraron ocho extractos de neem, dos para cada enzima, sin maceración con hexano. La concentración de AzaA no se detectó después de 7 d de almacenamiento

The control treatment without enzymes was evaluated after 24 h of maceration with hexane and the concentration of AzaA was 0.18 and 0.06 g L^{-1} in the aqueous and hexane fraction, respectively. This confirms that the use of the enzyme preparations of this study increased the extraction of AzaA from the neem seed compared to the enzyme-free treatment.

The combination of pectinases, cellulases, hemicellulases and arabinases activities present in the CPLMX enzyme preparation promoted a greater release of AzaA and increased its concentration in the extract.

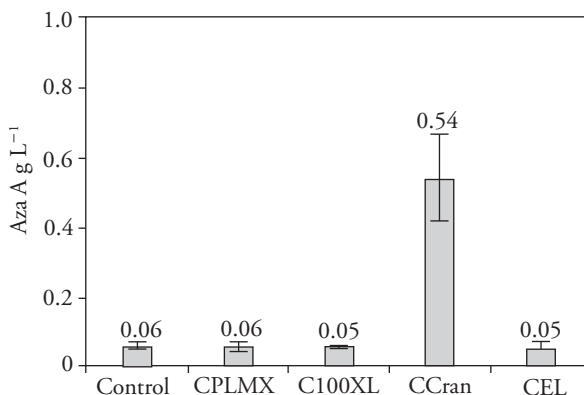


Figura 5. Concentración de AzaA en la fracción hexánica.
Figure 5. Concentration of AzaA in the hexane fraction.

a 50 °C en los extractos elaborados con CPLMX, C100XL y CEL. El extracto con CCran mantuvo 2.28% de la concentración de AzaA. En ninguno de los extractos se pudo identificar la AzaA a partir del día 14 de almacenamiento (Figura 6).

Para establecer las diferencias en la pérdida de AzaA en el almacenamiento se usó la fórmula empírica de primer orden (Ecuación 1) para calcular la constante de velocidad de pérdida de AzaA (k). No hubo diferencias significativas en k para los extractos elaborados con CPLMX, C100XL, CCran, y CEL almacenados a 50 °C, cuyos valores fueron $1.299 (\pm 0.556)$, $1.593 (\pm 1.349)$, $0.922 (\pm 0.017)$ y $1.555 (\pm 0.086)$ g AzaA L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

Los extractos de neem elaborados con CEL y C100XL almacenados a 30 °C mantuvieron el 18 y 22% de la concentración inicial de AzaA después de 21 d de almacenamiento, pero no se pudo detectar este triterpenoide a partir al día 28 de almacenamiento. Los valores de k de los extractos con CEL y C100XL fueron $0.071 (\pm 0.004)$ y $0.049 (\pm 0.011)$ g AzaA L⁻¹ día⁻¹, los cuales fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) a los extractos elaborados con CPLMX y CCran, con $0.248 (\pm 0.076)$ y $0.210 (\pm 0.007)$ g AzaA L⁻¹ día⁻¹.

No se detectaron diferencias significativas en la concentración residual de AzaA ($p < 0.05$) para los

Stability of the AzaA in storage

In order to determine the effect of storage temperature on the degradation of AzaA, eight neem extracts were made, two for each enzyme, without maceration with hexane. The concentration of AzaA was not detected after 7 d of storage at 50 °C in extracts made with CPLMX, C100XL, and CEL. CCran extract kept 2.28% AzaA concentration. None of the extracts presented AzaA from day 14 of storage (Figure 6).

In order to establish the differences in the loss of AzaA in storage, we used the first-order empirical formula (Equation 1) to calculate the AzaA loss rate constant (k). There were no significant differences in k for extracts made with CPLMX, C100XL, CCran, and CEL stored at 50 °C, whose values were $1.299 (\pm 0.556)$, $1.593 (\pm 1.349)$, $0.922 (\pm 0.017)$, and $1.555 (\pm 0.086)$ g AzaA L⁻¹ d⁻¹, respectively.

Neem extracts made with CEL and C100XL stored at 30 °C maintained 18 and 22% of the initial concentration of AzaA after 21 d of storage, but this triterpenoid could not be detected from day 28 of storage. The k values of the extracts with CEL and C100XL were $0.071 (\pm 0.004)$ and $0.049 (\pm 0.011)$ g AzaA L⁻¹ day⁻¹, which were significantly different ($p \leq 0.05$) to the extracts made with CPLMX and

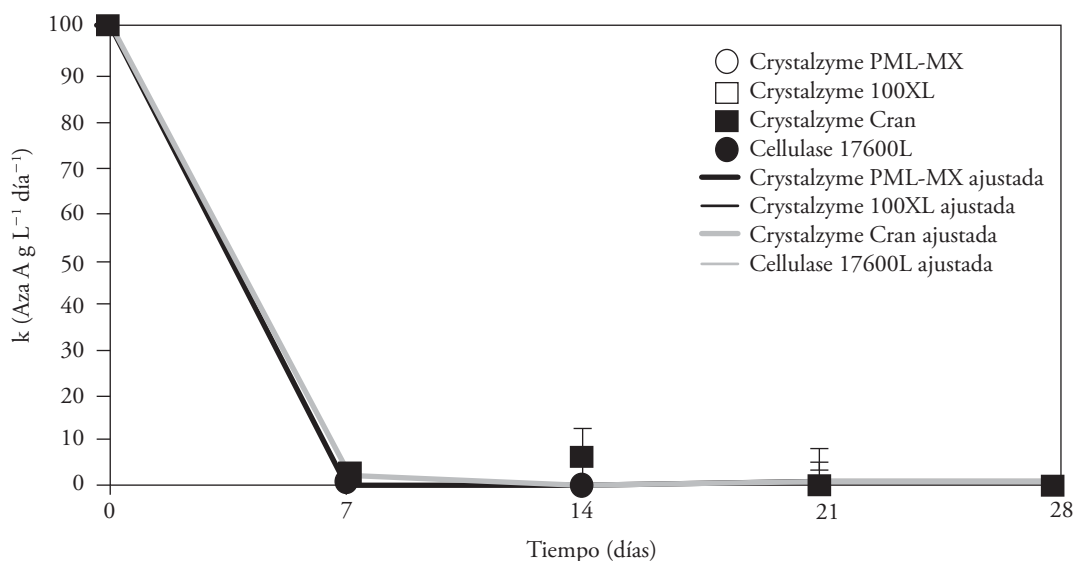


Figura 6. Cinética de pérdida de AzaA en extractos de neem almacenados a 50 °C.

Figure 6. Kinetics of AzaA loss in neem extracts stored at 50 °C.

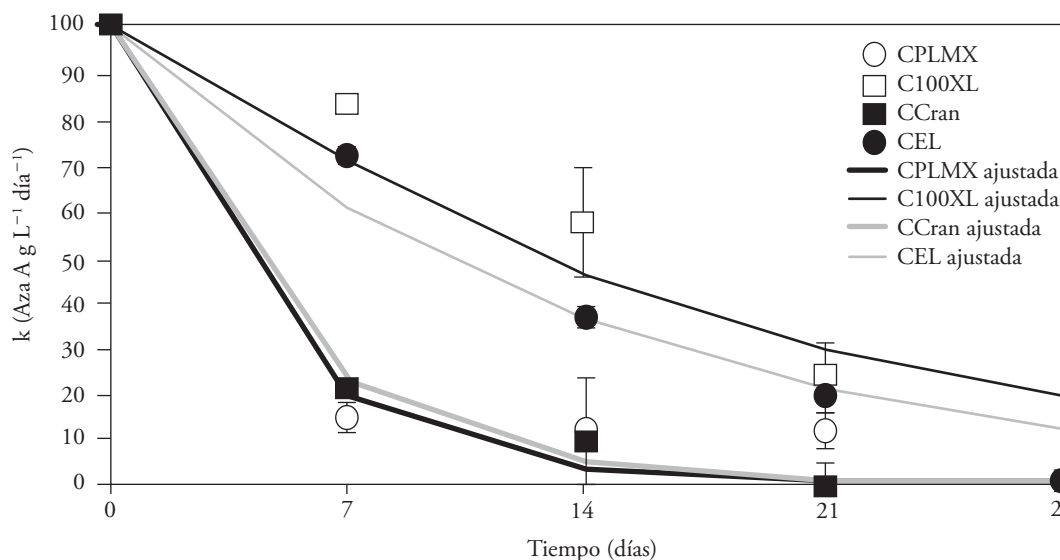


Figura 7. Cinética de pérdida de AzaA en extractos de neem almacenados a 30 °C.

Figure 7. Kinetics of AzaA loss in neem extracts stored at 30 °C.

cuatro extractos almacenados a 5 °C, a pesar de que los valores de k disminuyeron en los extractos enzimáticos: $0.089 (\pm 0.021)$, $0.072 (\pm 0.016)$, $0.091 (\pm 0.006)$ y $0.047 (\pm 0.002)$ g AzaA L⁻¹ d⁻¹ para los extractos obtenidos con CPLMX, C100XL, CCran y CEL, respectivamente.

El almacenamiento a 5 °C fue el más adecuado en nuestro estudio (Figura 8). Gahukar (2014) mencionó que el rendimiento en la obtención del aceite de neem y su efectividad acaricida disminuyen en función de las condiciones de almacenamiento de la semilla por influencia de tiempo, humedad relativa y temperatura de almacenamiento. Tofel *et al.* (2016) señalaron que existe una tendencia marcada de la AzaA a degradarse con el tiempo al aplicarla en granos de maíz, ya que la efectividad insecticida del aceite de neem disminuye en el tiempo de manera similar a la degradación de AzaA.

Nuestro estudio confirma que el aumento de la temperatura de almacenamiento favorece la pérdida o degradación de AzaA en los extractos. Esta información coincide con lo mencionado por Esparza-Díaz *et al.* (2010), que temperaturas superiores a 30 °C promueven la degradación de AzaA, y por lo tanto la disminución de su actividad insecticida.

Los resultados de estabilidad de AzaA podrían indicar un posible efecto sinérgico entre la temperatura de 45 °C empleada en la hidrólisis de la semilla con

CCran, $0.248 (\pm 0.076)$ and $0.210 (\pm 0.007)$ g AzaA L⁻¹ day⁻¹.

No significant differences were detected in the residual concentration of AzaA ($p < 0.05$) for the four extracts stored at 5 °C, although the values of k decreased in the enzyme extracts: $0.089 (\pm 0.021)$, $0.072 (\pm 0.016)$, $0.091 (\pm 0.006)$, and $0.047 (\pm 0.002)$ g AzaA L⁻¹ d⁻¹ for extracts obtained with CPLMX, C100XL, CCran, and CEL, respectively.

Storage at 5 °C was the most appropriate in our study (Figure 8). Gahukar (2014) mentioned that the yield in obtaining neem oil and its acaricidal effectiveness decreased depending on the storage conditions of the seed due to the influence of time, relative humidity and storage temperature. Tofel *et al.* (2016) pointed out that there is a marked tendency of AzaA to degrade over time when applied to corn kernels since the insecticidal effectiveness of neem oil decreases over time similar to the degradation of AzaA.

Our study confirms that the increase in storage temperature favors the loss or degradation of AzaA in the extracts. This information coincides with what Esparza-Díaz *et al.* (2010) said about temperatures above 30 °C: they promote the degradation of AzaA, and therefore the decrease of its insecticidal activity.

The AzaA stability results could indicate a possible synergistic effect between the temperature

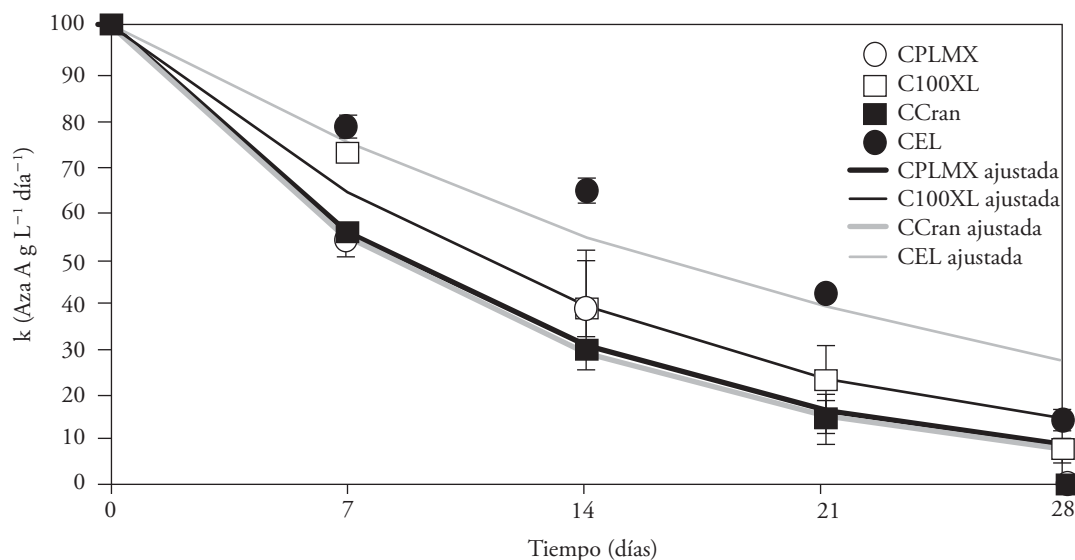


Figura 8. Cinética de pérdida de AzaA en extractos de neem almacenados a 5 °C.

Figure 8. Kinetics of AzaA loss in neem extracts stored at 5 °C.

CPLMX y su actividad enzimática, para que se obtuviera la mayor concentración de AzaA, a diferencia de las actividades enzimáticas y los 50 °C empleados con C100XL, CCran y CEL.

El extracto enzimático elaborado con CEL mantuvo el porcentaje mayor de AzaA en el almacenamiento a 5 °C con 77.12, 63.04, 40.58 y 13.19% de la concentración inicial, al día 7, 14, 21 y 28, respectivamente. Esta temperatura resultó más adecuada para el almacenamiento de los extractos enzimáticos de neem, bajo las condiciones ensayadas.

La quiralidad y los enlaces de hidrógenos internos de la molécula de AzaA le confieren sensibilidad a la luz y temperatura, así como estabilidad en condiciones ligeramente ácidas en comparación con las alcalinas (Fernandes *et al.*, 2019). Ello puede significar que la pérdida de AzaA en el almacenamiento se debió a un efecto combinado del pH de los extractos con la temperatura de almacenamiento.

El uso de hexano en la maceración de los extractos enzimáticos de neem aumentó la extracción de AzaA ~ 3 %. El rendimiento bajo de AzaA en la fracción oleosa y la proporción mayor (~ 97 %) de AzaA presente en la fracción acuosa, permite concluir que la maceración con hexano no proporcionó una ventaja que justifique su uso en la elaboración de extractos de neem. Aunque el hexano es un disolvente orgánico utilizado ampliamente en la extracción de

of 45 °C used in the hydrolysis of the seed with CPLMX and its enzymatic activity to obtain the highest concentration of AzaA, unlike the enzymatic activities and 50 °C used with C100XL, CCran, and CEL.

The enzyme extract made with CEL maintained the highest percentage of AzaA in storage at 5 °C with 77.12, 63.04, 40.58, and 13.19% of the initial concentration, at day 7, 14, 21 and 28, respectively. This temperature was more suitable for the storage of the neem enzymatic extracts, under the conditions tested.

The chirality and internal hydrogen bonds of the AzaA molecule make it sensitive to light and temperature, as well as stable under slightly acidic conditions compared to alkaline ones (Fernandes *et al.*, 2019). This could mean that the loss of AzaA in storage was due to a combined effect of the pH of the extracts with the storage temperature.

The use of hexane in the maceration of neem enzymatic extracts increased the extraction of AzaA ~ 3%. The low yield of AzaA in the oil fraction and its greater proportion (~ 97%) in the aqueous fraction allow us to conclude that maceration with hexane was no advantage to justify its use in the preparation of neem extracts. Although hexane is an organic solvent widely used in the extraction of edible oils, current trends are aimed at the development of organic

aceites comestibles, las tendencias actuales se dirigen al desarrollo de la agricultura orgánica y a evitar el uso de fertilizantes y plaguicidas químicos (FAO, 2018).

CONCLUSIONES

La extracción con enzimas y hexano permitió obtener extractos de neem con concentraciones de Azadiractina A (AzaA) similares a las documentadas por otros autores al usar ultrasonido, prensado mecánico y extrusión metanólica.

La velocidad de degradación del triterpeno AzaA aumentó con el incremento de la temperatura de almacenamiento de los extractos de neem. La temperatura de refrigeración mantuvo la proporción mayor de Azadiractina A durante 28 d de almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Educación Superior Universitaria (DGESU/SEP) con el proyecto PRODEP con numero de oficio DSA/103.5/14/7147, por el financiamiento de la investigación.

LITERATURA CITADA

- Azmir, J., I. S. M. Zaidul, M. N. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, and A. K. M. Omar. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *J. Food Eng.* 117: 426-436.
- Boursier, C. M., D. Bosco, A. Coulibaly, and M. Negre. 2011. Are traditional neem extract preparations as efficient as a commercial formulation of azadirachtin A? *Crop Protection* 30: 318-322.
- Denardi, S. E., G. H. Bechara, P. R. Oliveira, and M. I. Camargo. 2011. Inhibitory action of neem aqueous extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Microsc. Res. Tech.* 74: 889-899.
- De Paula, J. A. M., L. F. Brito, K. L. F. N. Caetano, M. C. De Moraes Rodrigues, L. L. Borges, and E. C. Da Conceição. 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.
- Esparza-Díaz, G., J. López-Collado, J. A. Villanueva-Jiménez, F. Osorio-Acosta, G. Otero-Colina, y E. Camacho-Díaz. 2010. Concentración de azadiractina, efectividad insecticida y fitotoxicidad de cuatro extractos de *Azadirachta indica* A. Juss. *Agrociencia* 44: 821-833.
- Eveleigh, D. E., M. Mandels, R. Andreotti, and C. Roche. 2009. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 2: 1-8.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). *Agricultura Orgánica: Preguntas frecuentes* sobre agricultura orgánica. <http://www.fao.org/organicag/oa-faq/es/> (Consulta: septiembre 2018).
- Fernandes, S., L. Barreiros, R. F. Oliveira, A. Cruz, C. Prudêncio, A. I. Oliveira, C. Pinho, N. Santos, and J. Morgado. 2019. Chemistry, bioactivities, extraction and analysis of azadirachtin: State-of-the-art. *Fitoterapia* 134: 141-150.
- Gahukar, R. T. 2014. Factors affecting content and bioefficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) phytochemicals used in agricultural pest control: A review. *Crop Prot.* 62: 93-99.
- Gigliotti, R., M. R. Forim, H. N. Oliveira, A. C. S. Chagas, J. Ferrézini, L. G. Brito, T. O. R. S. Falcowski, L. G. Albuquerque, and M. C. S. Oliveira. 2011. *In vitro* acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* 181: 309-315.
- González-Gómez, R., G. Otero-Colina, J. A. Villanueva-Jiménez, C. B. Peña-Valdivia, and J. A. Santizo-Rincón. 2012. Repellency of the oily extract of neem seeds (*Azadirachta indica*) against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Exp. Appl. Acarol.* 56: 261-270.
- Ismadji, S., A. Kurniawan, Y. H. Ju, F. E. Soetaredjo, A. Ayucitra, and L. K. Ong. 2012. Solubility of azadirachtin and several triterpenoid compounds extracted from neem seed kernel in supercritical CO₂. *Fluid Phase Equilib.* 336: 9-15.
- Jadeja, G. C., R. C. Maheshwari, and S. N. Naik. 2011. Extraction of natural insecticide azadirachtin from neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernels using pressurized hot solvent. *J. Supercrit. Fluid* 56: 253-258.
- Jarvis, A. P., S. Johnson and E. D. Morgan. 1998. Stability of the natural insecticide azadirachtin in aqueous and organic solvents. *Pestic. Sci.* 53: 217-222.
- 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.

CONCLUSIONS

Extraction with enzymes and hexane allowed to obtain neem extracts with concentrations of Azadirachtin A (AzaA) similar to those reported by other authors by using ultrasound, mechanical pressing and methanolic extrusion.

The degradation rate of AzaA triterpene increased with the increase in the storage temperature of neem extracts. The cooling temperature maintained the highest proportion of Azadirachtin A during 28 d of storage.

—End of the English version—



- Pardío, V. T., A. Flores, K. M. López, D. I. Martínez, O. Márquez, and K. N. Waliszewski. 2018. Effect of endogenous and exogenous enzymatic treatment of green vanilla beans on extraction of vanillin and main aromatic compounds. *J. Food Sci. Technol.* 55: 2059-2067.
- Ramos, C. A. B., V. González H., M. Soto H., E. M. Engleman, y A. A. Rodríguez. 2004. Variación en contenido de azadiractina en frutos de margosa durante su desarrollo. *Rev. Fitotec. Mex.* 27: 81-85.
- Soni, H., K. Mishra, S. Sharma, and A. K. Singhai. 2012. Characterization of Azadirachtin from ethanolic extract of leaves of *Azadirachta indica*. *J. Pharm. Res.* 5: 199-201.
- Tofel, K. H., E. N. Nukenine, M. Sätthler, and C. Adler. 2016. Degradation of azadirachtin A on treated maize and cowpea and the persistence of *Azadirachta indica* seed oil on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus zeamais*. *J. Stored Prod. Res.* 69: 2017-212.
- Zoubiri, S., and A. Baaliouamer. 2014. Potentiality of plants as source of insecticide principles. *J. Saudi Chem. Soc.* 18: 925-938.