

Actividad coleopterida de un extracto enzimático de Neem (*Azadirachta indica*) sobre *Aethina tumida*

Coleopterical activity of an enzymatic extract of Neem (*Azadirachta indica*) on *Aethina tumida*

Rodríguez-Dehaibes, S.¹ , Flores-Primo, A.¹ , Domínguez-Rincón, R.¹ ,
León-García, E.¹ , Ramírez-Elvira, K.² , López-Aguirre, S.¹ .

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Miguel Ángel de Quevedo S/N esq Yáñez, Col. Unidad Veracruzana, 91710 Veracruz, Ver. México.

² Universidad del Valle de México, Campus Boca del Río. Av. Urano esq. Av. Progreso, Frac. Jardines de Mocambo, 94299 Boca del Río, Ver. México.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Rodríguez-Dehaibes, S., Flores-Primo, A., Domínguez-Rincón, R., León-García, E., Ramírez-Elvira, K., López-Aguirre, S. (2023). Coleopterical activity of an enzymatic extract of Neem (*Azadirachta indica*) on *Aethina tumida*. *Revista Bio Ciencias*, 10, e1493. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1493>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: July 12th 2023.

Accepted/Aceptado: October 13th 2023.

Available on line/Publicado: October 19th 2023.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener extractos enzimáticos de semillas de neem verdes, secas y congeladas y evaluar el efecto coleopterida sobre *Aethina tumida* en etapa larvaria. En la primera fase, se evaluó el efecto de la congelación (-20 °C) y deshidratación (50 °C) de la semilla verde sobre la liberación de azadiractina A. Posteriormente, se realizó la extracción enzimática empleando el preparado Crystalzyme® PLMX, seguida de una extracción alcohólica al 80 % (v v-1). El extracto alcohólico se rotoevaporó y se evaluó su actividad coleopterida sobre larvas y adultos de *Aethina tumida* utilizando la Torre de Burgerjon con concentraciones de 0, 0.05, 0.5, 50 y 500 ppm de azadiractina A. Los resultados indicaron que no existe diferencia estadística significativa en la concentración de azadiractina A al deshidratar o congelar las semillas de neem, asimismo, los extractos con 500 pmm de azadiractina A promovieron 100 % de mortalidad de larvas a las 48 h, las LC50 y LC90 calculadas fueron de 0.58 y 77.67 ppm respectivamente. De acuerdo con estos resultados, se concluye que los extractos enzimáticos de semillas de neem es una alternativa viable para el control biológico de *Aethina tumida* en etapa larvaria.

PALABRAS CLAVE: Azadiractina A, Bioinsecticida, Concentración letal media, Etapa larvaria, Terpenoides.

*Corresponding Author:

Argel Flores Primo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Miguel Ángel de Quevedo S/N, Col. Unidad Veracruzana, 91710 Veracruz, Ver. México. Teléfono: (229) 9344053. E-mail: argflores@uv.mx

ABSTRACT

This work aimed to obtain enzymatic extracts from green, dried, and frozen neem seeds and to evaluate the coleopterical effect on *Aethina tumida* in the larval stage. In the first phase, the effect of freezing ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) and dehydration ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$) of the green seed on the release of azadirachtin A was evaluated. Subsequently, the enzymatic extraction was carried out using the Crystalzyme[®] PLMX preparation, followed by an 80 % alcohol extraction (v v-1). The alcoholic extract was roto evaporated and its coleopterical activity on *Aethina tumida* larvae and adults was evaluated using the Burgerjon Tower with concentrations of 0, 0.05, 0.5, 50, and 500 ppm of azadirachtin A. The results indicated that there is no statistically significant difference in the concentration of azadirachtin A when dehydrating or freezing the neem seeds, likewise, the extracts with 500 ppm of azadirachtin A promoted 100 % mortality of larvae at 48 h, the LC50 and LC90 calculated were 0.58 and 77.67 ppm, respectively. According to these results, it is concluded that the enzymatic extracts of neem seeds are a viable alternative for the biological control of *Aethina tumida* in the larval stage.

KEY WORDS : Azadirachtin A, Bioinsecticide, Median lethal concentration, Larval stage, Terpenoids.

Introducción

Las abejas son susceptibles de ser afectadas por diversas enfermedades, parásitos y plagas, que generan efecto nocivo en el desarrollo y productividad de sus colonias. Actualmente, una de las plagas con mayor importancia en México es *Aethina tumida* conocido como “pequeño escarabajo de la colmena”, un parásito originario de las regiones tropicales y subtropicales situadas al sur del Sahara Africano que pueden provocar dispersión de las abejas (abandono de la colmena), fermentación de la miel y formación de espuma con olor característico de naranjas al pudrirse (Ellis *et al.*, 2003). El método de control más usado es aplicando plaguicidas sintéticos, sin embargo, se ha demostrado que estos productos generan cambios genotípicos y fenotípicos en las plagas, promueven su adaptabilidad, requieren mayores dosis para controlarla, y generan resistencia (Borges *et al.*, 2005), por lo que se requiere explorar el uso de bioplaguicidas que sean efectivos y no contaminen el ambiente. El neem es uno de los bioplaguicidas más estudiados por sus efectos tóxicos para las plagas y constituye una alternativa potencial como sustituto de plaguicidas sintéticos debido a sus componentes con actividad insecticida y anti-alimentaria (Denardi *et al.*, 2011; Giglioti *et al.*, 2011) entre los que destaca la azadiractina A (AzaA) (Soni *et al.*, 2012). Sin embargo, un problema frecuente para la obtención de estos metabolitos es la variabilidad en su extracción en dependencia del método utilizado y su estabilidad en condiciones de almacenamiento (Aguilar-Acosta *et al.*, 2020). Uno de los métodos alternativos empleados en la industria para mejorar la extracción de metabolitos de interés a partir de fuentes vegetales

son las enzimas celulolíticas como Crystalzyme® PLMX que fue utilizada por Pardío *et al.* (2018) para aumentar la extracción de vainillina en extractos de vaina verde de vainilla y por Aguilar-Acosta *et al.* (2020) para obtener extractos de neem con mayor concentración de AzaA. Estos complejos enzimáticos hidrolizan las estructuras celulolíticas de las plantas y permiten extraer en mayor proporción los metabolitos de interés debido a la combinación de actividades enzimáticas que presentan (celulasas, pectinasas, hemicelulasas y arabinasas). El objetivo de este trabajo fue obtener extractos enzimáticos de semillas de neem verdes, secas y congeladas, cuantificar la concentración de AzaA extraída y evaluar el efecto coleopterida sobre *Aethina tumida* en etapa larvaria.

Material y Métodos

Colecta y tratamiento de las semillas

Se colectaron semillas de neem (*Azadiracta indica*) de frutos con 110 días posteriores a la floración, en arboles de al menos 15 años de edad, establecidos en el rancho El Naranjal, municipio de Jamapa, Veracruz ubicado en las coordenadas 18° 59' 40.2" N; 96° 15' 11.5" W, altitud de 57 msnm. Las semillas se colectaron de acuerdo al color verde-amarillento (característicos de frutos maduros), se mezclaron y se dividieron aleatoriamente en tres grupos, cada grupo se subdividió en 4 submuestras. Un grupo de semillas se congelaron a -20°C , otro grupo se sometió a deshidratación lenta en estufa de aire forzado a 50°C hasta peso constante y el tercer grupo se sometió directamente a extracción enzimática.

Extracción de azadiractina A

Para esta fase se utilizó el preparado enzimático Crystalzyme® PLMX (CPL-MX) (Valley Research Inc. Fresno, California EE. UU.) [pectinasas (EC 3.2.1.15), celulasas (EC 3.2.1.4), hemicelulasa (no reportada), arabinasa (EC 3.2.1.99)] con actividad enzimática de 5.94 FPU/mL, determinada mediante la técnica de unidades de papel filtro propuesta por Eveleigh *et al.* (2009). Se evaluaron 0.59, 1.78, 2.97 y 5.94 FPU de enzima g^{-1} de semilla (base seca), para determinar la concentración de enzima óptima en función de la hidrólisis de las estructuras celulósicas de la semilla del neem Aguilar-Acosta *et al.* (2020). Para la extracción de AzaA se homogenizaron 35 g de semilla de cada submuestra con amortiguador fosfato (pH 5.0) y se sometieron a hidrólisis con CPL-MX, relación 1:10 (semilla base seca: amortiguador fosfato) durante 18 h, a 40°C . Al término de la hidrólisis enzimática, se realizó una maceración alcohólica durante 48 h (relación 80 % v v⁻¹). El extracto alcohólico se rotoevaporó y se almacenó para la cuantificación de AzaA. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Cuantificación de AzaA

La concentración de AzaA se realizó con HPLC (Waters 525 Milford, Massachusetts, EUA) siguiendo la técnica descrita por Kaushik (2002), usando detector de fotodiodos (Waters 2996), columna NovaPak C18 de 4 mm (3.9 x 150 mm) y estándar AzaA (Sigma Aldrich®, Darmstadt, Germany). Las muestras extraídas se centrifugaron y diluyeron 1:1 en acetonitrilo grado HPLC y

se filtraron a través de acrodiscos de 0.22 μm (Millipore), se inyectaron 20 mL con velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹, usando como fase móvil acetonitrilo: agua (40:60). El tiempo de retención de AzaA fue de 3.1 min y la concentración se leyó a 217 nm.

Actividad Coleopterica del Extracto Enzimático de Neem

Obtención de las larvas

Escarabajos de *Aethina tumida* se recolectaron de apiarios de la zona sur del estado de Veracruz, se colocaron en recipientes de plástico con tapa hermética a los que se les adaptó un respiradero cubierto con malla y se trasladaron al laboratorio bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana. A los recipientes se les introdujo una porción de colmena con miel y polen como alimento para evitar muerte por inanición y se resguardaron en hieleras con gel frío para mantener la temperatura a 25 °C. En el laboratorio, los escarabajos se mantuvieron a 25 °C hasta que ovopositaron. Las larvas que eclosionaron se alimentaron con mezcla de polen y miel durante 1 semana. Se colocaron 5 larvas en cajas Petri de 14 mm de diámetro (10 cajas por tratamiento) con un orificio de 2 a 3 cm en la tapa superior (sellada con malla-tela) para permitir la aireación, se adicionó una mezcla de miel y polen como alimento y un algodón humectado con agua destilada para mantenimiento de la humedad interna y se almacenaron a 28-30 °C por 24 h. Una vez pasado el tiempo, se identificó el porcentaje de mortalidad de larvas y escarabajos para determinar el efecto del almacenamiento.

Aplicación del extracto

A partir de los extractos evaluados con diferentes unidades de actividad enzimática, se seleccionará el que tenga la mayor concentración de AzaA y a partir de ese extracto se realizarán diluciones con agua destilada hasta obtener concentraciones de 0.05, 0.5, 5.0, 50 y 500 ppm de AzaA. Para el tratamiento testigo (0 ppm) se empleó agua destilada (González-Gómez *et al.*, 2006). Los extractos se aplicaron con una torre de Burgerjon que simula la aplicación de pesticidas en el campo. La cantidad de producto que se empleó para aspersión por unidad de área fue de 1-2 mg/cm² aplicando 15 mL de las soluciones a una presión de 0.703 kg/cm², dejando reposar 1 minuto para promover la sedimentación de las gotas sobre las larvas (Rodríguez *et al.*, 2005).

Determinación de la actividad coleopterica

Concluida la aplicación de los extractos, las larvas se trasladaron a cajas Petri (8 cm Ø) con tapas adaptadas con un agujero en el centro (4.5 cm Ø) cubierto con una malla fina, se les depositó sustrato de mantenimiento (polen y miel) y se incubaron a 32 °C y 70 % de humedad relativa. La evaluación de la mortalidad se realizó a las 24 y 48 h (Rodríguez *et al.*, 2005; González-Gómez *et al.*, 2006), con los datos obtenidos se determinaron las concentraciones letales 50 (LC50) y 90 (LC90).

Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar. Para el proceso de extracción enzimática, se usaron 3 tratamientos (semilla fresca, seca y congelada), 6 réplicas (submuestras) y 3 repeticiones por réplica ($n = 54$). Para la actividad coleopterica se utilizaron 5 concentraciones (0, 0.05, 0.5, 50 y 500 ppm de AzaA) con 10 repeticiones (caja de Petri) por tratamiento ($n = 50$). El porcentaje de larvas muertas se transformó a arco seno. Los datos de mortalidad se compararon entre grupos por medio de ANDEVA y la comparación de medias se realizó con prueba de Tukey ($p < 0.05$) usando el programa estadístico SAS (2022). Para determinar la LC50 y LC90, se utilizó el método estadístico PC Probit (González-Gómez *et al.*, 2006).

Resultados y Discusión

En la primera parte del estudio se evaluaron diferentes unidades de actividad de CPL-MX y se demostró que utilizar 1 mL (5.94 FPU/mL) por gramo de semilla neem (base seca), promovió la mayor concentración y velocidad de liberación de azúcares reductores derivados de la hidrólisis de las estructuras celulósicas de la semilla del neem (Tabla 1). A partir de la siguiente fase se utilizó esta concentración de enzima para hidrolizar la semilla de neem previo a la maceración alcohólica.

Tabla 1. Evaluación de la concentración de enzima sobre la hidrólisis de la semilla del neem.

Enzima	Volumen (mL)	Actividad (FPU mL ⁻¹)	k (h ⁻¹)	RS (mg mL ⁻¹)
CPL-MX	0.1	0.59	0.47 ± 0.03 ^a	4.15 ± 0.20 ^a
	0.3	1.78	0.64 ± 0.05 ^b	4.85 ± 0.11 ^b
	0.5	2.97	1.15 ± 0.07 ^c	4.47 ± 0.09 ^c
	1.0	5.94	1.43 ± 0.68 ^d	4.49 ± 0.32 ^{abc}

FPU: Unidades de Papel Filtro; k : constante de velocidad de liberación de azúcares reductores; RS: azúcares reductores en equilibrio. Valores con literales distintas entre filas son diferentes significativamente ($p < 0.05$).

En la Figura 1 se observan las concentraciones de AzaA obtenidas posterior a la maceración alcohólica. La concentración de AzaA fue mayor estadísticamente ($p < 0.05$) en los extractos obtenidos de las semillas secas tratadas con el preparado enzimático CPL-MX. Este extracto fue elegido para evaluar la actividad coleopterica sobre las larvas de *Aethina tumida*.

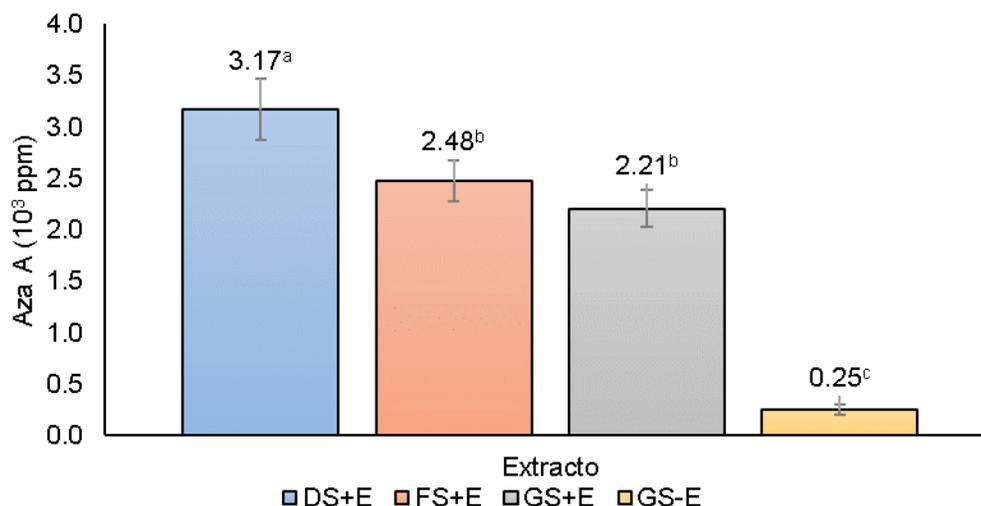


Figura 1.- Concentración de Azadiractina A en extractos de semilla de Neem.

DS+E: Semilla seca con el preparado enzimático; FS+E: Semilla congelada con el preparado enzimático; GS+E: Semilla verde con el preparado enzimático; GS-E: Semilla verde sin el preparado enzimático. ^{a,b}Literales diferentes en columna, indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

A las 48 horas de la aplicación de 0.5 ppm de AzaA, extraída de la semilla seca con CPL-MX, se observó mortandad del 50 % de las larvas, las LC estimadas fueron LC₅₀: 0.58 ppm y LC₉₀: 77.67 (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración letal estimada de AzaA para larvas de *Aethina tumida*

AzaA (ppm)	Log ppm	Proporción de larvas muertas	Proporción corregida	Probit
0		0.2	0.0	
0.05	-1.30103	0.4	0.25	4.326
0.5	-0.30103	0.6	0.50	5.00
50	1.69897	0.9	0.88	6.150
500	2.69897	1.0	1.0	
Pendiente	Intercepto	Valor de T	LC ₅₀	LC ₉₀
0.6035	5.1391	5	0.5881	
0.6035	5.1391	6.28		77.67

Las concentraciones letales encontradas en este ensayo están dentro de los rangos reportados con actividad insecticida, Izadi *et al.* (2012) reportan dosis de 0.22 ppm para la LC50 en el control de *Agonoscena pistaciae*, Ghazawi *et al.* (2007) encontró que la LD50 en *Heteracris littoralis* se alcanzó con la aplicación de 101.2 ppm, ambos casos en etapa larvaria. La actividad coleptoricida de AzaA sobre las larvas podría deberse diversos efectos, es antagonista de la hormona 20-hidroxiecdisona y la hormona juvenil (JH), modifica o suprime los títulos de hemolinfa ecdisteroide y JH; inhibe la secreción de la hormona peptídica morfogenética y alatotropinas del complejo corpus cardiacum causando pupación reducida, malformación o falla en la emergencia de adultos (Mordue & Blackwell, 1993; Bezzar-Bendjazia *et al.*, 2017). En su estructura contiene un acetato, un éster tiglato, dos ésteres metílicos, un alcohol secundario y terciario, un epoxi, un éter vinílico, que forma parte de un acetal y un hemiaetal (Ley *et al.*, 1993), esta complejidad de grupos funcionales actúan sobre la regulación del crecimiento de los insectos y los mecanismos biosintéticos de la célula, alterando diversas vías metabólicas necesarias para el crecimiento y desarrollo, en insectos adultos afecta el desarrollo de la cutícula y la ecdisis (Mordue *et al.*, 2010). Otra ventaja del uso de los extractos de AzaA obtenida del Neem, es que los insectos difícilmente generan resistencia (Mordue *et al.*, 2010) lo que hace que sea un método de control biológico eficaz. Feng y Isman (1995) reportan que en el áfido de la papa del durazno (*Myzus persicae*) fue hasta la generación 40 después de iniciar la aplicación de AzaA purificada cuando encontraron resistencia, sin embargo, cuando se aplicó en forma de extracto obtenido de la semilla de neem, la resistencia no ocurrió.

Conclusiones

El uso de AzaA obtenida por extracción enzimática con Crystalzyme® PLMX de semillas deshidratadas de neem es una alternativa viable y eficiente para el control biológico de *Aethina tumida* en etapa larvaria.

Contribución de los autores

Conceptualización del trabajo, AFP; desarrollo de la metodología, SRDR, RDR, ELG, KRE; validación experimental, SRRD, RDR, ELG, KRE; análisis de resultados, AFP, SLA.; Manejo de datos, AFP, SLA; escritura y preparación del manuscrito, AFP, SLA; redacción, revisión y edición, SRDR.

“Todos los autores de este manuscrito han leído y aceptado la versión publicada del mismo.”

Financiamiento

Esta investigación fue financiada con fondos del Premio a la investigación interdisciplinaria en torno al Plan de reestructuración estratégica del CONACYT (2018-2024) otorgado por la Universidad Veracruzana, con el proyecto “Evaluación coleopterocida y repelente de extractos

enzimáticos de neem sobre el escarabajo *Aethina tumida*, como alternativa de solución al colapso de colonias en la apicultura”.

Declaraciones éticas

Las publicaciones presentadas deben surgir de investigaciones responsables y éticas y cumplir con los códigos de investigación y la legislación pertinente. Por favor agregar la Declaración de la Junta de Revisión Institucional y el número de aprobación, si es relevante para su estudio. Puede optar por excluir esta declaración si el estudio no requiere aprobación ética. Tenga en cuenta que la Revista Bio Ciencias podrá solicitarle más información. Hacer la declaración ética.

Declaración de consentimiento informado

Si la investigación realizada empleó humanos deberá agregar: “Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos involucrados en el estudio”. O “Se renunció al consentimiento del paciente debido a una RAZÓN (proporcione una justificación detallada)”.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana por las facilidades otorgadas.

Conflicto de interés

“Los autores declaran no tener conflicto de interés”

Referencias

- Aguilar-Acosta, A., Flores-Primo, A., Martínez-Herrera, D. I., Pardío-Sedas, V. T., López-Hernández, K. M., Rodríguez-Dehaibes, S. R., & Chávez-Hernández, E. (2020). Extraction and stability of azadirachtin A in neem (*Azadirachta indica*) extracts obtained with enzymes and solvents. *Agrociencia*, 54(1), 89-100. <https://agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1884/1881>
- Bezzar-Bendjazia, R., Kilani-Morakchi, S., Maroua, F., & Aribi, N. (2017). Azadirachtin induces larval avoidance and antifeeding by disruption of food intake and digestive enzymes in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.08.006>
- Borges, L. M. F., Ferri, P. H., Silva, W. C., Silva, W. J., Melo, L. S., Souza, L. A. D., Soares, S. F., Faria, K. A., Gomes, N. A., Mori, A., & Silva, N. F. (2005). Ação do extrato hexânico de

- frutos maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae) em bezerros infestados artificialmente. *Revista de Patologia Tropical/ Journal of Tropical Pathology*, 34(1), 53-59. <https://doi.org/10.5216/rpt.v34i1.2137>
- Denardi, S. E., Bechara, G. B., Oliveira, P. R., & Camargo, M. I. (2011). Inhibitory action of neem aqueous extract (*Azadirachta indica* A. Juss) on the vitellogenesis of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks. *Microscopy Research & Technique*, 74(10), 889-899. <https://doi.org/10.1002/jemt.20973>
- Ellis, J. D., Hepburn, R., Delaplane, K. S., Neumann, P., & Elzen, P. (2003). The effects of adult small hive beetles, *Aethina tumida* (Coleoptera: Nitidulidae), on nests and flight activity of Cape and European honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 34(4), 399-408. <https://doi.org/10.1051/apido:2003038>
- Eveleigh, D. E., Mandels, M., Andreotti, R., & Roche, C. (2009). Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2, 21. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-21>
- Feng, R., & Isman, M. B. (1995). Selection for resistance to azadirachtin in the green peach aphid *Myzus persicae*. *Experientia*, 51, 831–833. <https://doi.org/10.1007/BF01922438>
- Ghazawi, N. A., El-Shranoubi, E. D., El-Shazly, M. M., & Abdel, K. M. (2007). Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb (*Orthoptera: Acrididae*). *Journal of Orthoptera Research*, 16(1), 57–65. [https://doi.org/10.1665/1082-6467\(2007\)16\[57:EOAOMR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1665/1082-6467(2007)16[57:EOAOMR]2.0.CO;2)
- Giglioti, R., Formin, M. R., Oliveira, H. N., Chagas, A. C. S., Ferrezini, J., Brito, L. G., Falcoski, T. O. R. S., Albuquerque, L. G., & Oliveira, M. C. S. (2011). *In vitro* acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 181(2-4), 309-315. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.053>
- González-Gómez, R., Otero-Colina, G., Villanueva-Jiménez, J. A., Pérez-Amaro, J. A., & Soto-Hernández, R. M. (2006). Toxicidad y repelencia de *Azadirachta indica* contra *Varroa destructor* (acari: varroidae). *Agrociencia*, 40(6), 741-751. <http://valoragregado.org/ojsagrociencia/index.php/agrociencia/article/view/505/505>
- Izadi, H., Sarnevesht, M., Sadeghi, R., Mahdian, K., & Jalai, M. A. (2012). Toxic effects of pyriproxyfen, neemarin, acetamiprid and *Ferula assafoetida* essential oil on the common pistachio psylla, *Agonoscyta pistaciae*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(18), 2236–2242. <https://doi.org/10.1080/03235408.2012.724973>
- Kaushik, N. (2002). Determination of azadirachtin and fatty acid methyl esters of *Azadirachta indica* seeds by HPLC and GLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374(7-8), 1199-1204. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1638-7>
- Ley, S. V., Denholm, A. A., & Wood, A. (1993). The chemistry of azadirachtin. *Natural Product Reports*, 10(2), 109–157. <https://doi.org/10.1039/NP9931000109>
- Mordue, A. J., Morgan, E. D., & Nisbet, A. J. (2010). Azadirachtin, a natural product in insect control, in *Insect Control: Biological and synthetic agents*, eds L. I. Gilbert and S. S. Gill. Elsevier, Academic. 185–203. <https://books.google.com.mx/books?id=nd2euFHjQyQC>
- Mordue, A. J., & Blackwell, A. (1993). Azadirachtin: an update. *Journal of Insect Physiology*, 39(11), 903–924. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(93\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0022-1910(93)90001-8)
- Pardío, V. T., Flores, A., López, K. M., Martínez, D. I., Márquez, O., & Waliszewski, K. N. (2018).

- Effect of endogenous and exogenous enzymatic treatment of green vanilla beans on extraction of vanillin and main aromatic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6): 2059-2067. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3120-3>
- Rodríguez, S. R., Otero, G., Pardío, V., & Villanueva, J. A. (2005). Resistance to amitraz and flumethrin in *Varroa destructor* populations from Veracruz, Mexico. *Journal of Apicultural Research*, 44(3): 124-125. <https://doi.org/10.1080/00218839.2005.11101162>
- Statistical Analysis System on Demand for Academics. Statistics Software [SAS]. (2022). SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA. https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html
- Soni, H., Mishra, K., Sharma, S., & Singhai, A. K. (2012). Characterization of azadirachtin from ethanolic extract of leaves of *Azadirachta indica*. *Journal of Pharmacy Research*, 5(1): 199-201. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:92127107>