

***Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae): modelo biológico para la estandarización de extractos naturales con actividad insecticida (El Neem -*Azadirachta indica*- un caso particular)**

Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae): biological model to define the standardization of natural extracts with activity insecticide (the neem -*Azadirachta indica* - a particular case)

MARIA EUGENIA MORENO¹, SANTIAGO GONZÁLEZ², LILIANA ACEVEDO¹, GLADYS MORALES¹,
MONICA BETANCUR¹, JHON JAIRO LÓPEZ¹, CARLOS ALBERTO PELÁEZ¹ *

Revista Colombiana de Entomología 26(1-2): 51-55 (2000)

Resumen. En el presente artículo se muestra la utilización del modelo biológico *Drosophila melanogaster* para la valoración cuantitativa de extractos de neem (*Azadirachta indica*). Se determinaron, por HPLC, perfiles cromatográficos, encontrándose diferencias altamente significativas en la calidad y cantidad de metabolitos de los extractos etéreo y etanólico de neem y se evaluó el modelo biológico para extractos de diferentes polaridades, resultando una alta correlación entre la inhibición del paso pupa-adulto y el aumento de aquella. Con el mismo modelo biológico se realizó un estudio cinético para dos extractos, hallándose para uno de ellos una estabilidad superior a los seis meses y con las siguientes condiciones de almacenamiento: 20°C, 80% de humedad y baja luminosidad. Finalmente, se empleó el mismo modelo biológico para realizar un estudio comparativo de diferentes presentaciones comerciales de extractos de neem en función de su actividad biológica.

Palabras clave: Modelo Biológico. Insecticida. Neem. *Azadirachta indica*. *Drosophila melanogaster*.

Summary. This paper shows the use of the biological model *Drosophila Melanogaster* on the quantification of the insecticide activity of neem extracts. HPLC profiles were determined for the alcohol and ether fractions. The quality and quantity of the metabolites found in both fractions showed significant differences. Fractions of different polarity were tested with the biological model observing a correlation between the inhibition for the puparium-adult change and the increase in the polarity of the neem fraction. The same biological model was used to study the kinetic for the alcohol and ether fractions of the neem extract. The alcohol extract showed a stability up to 6 months at 20°C, 80% humidity and dark conditions. Finally, the *Drosophila Melanogaster* model was used for a comparative study of the biological activity between different commercial neem extracts.

Key words: Model Biologic. Insecticide. Neem. *Azadirachta indica*. *Drosophila melanogaster*.

Introducción

Las técnicas que involucran conceptos de agricultura sostenible, producción ecológica e insecticidas naturales y botánicos son cada vez más recurrentes por parte de los denominados sistemas tradicionales de la producción agrícola (Programa Flor Verde, Asocolflore - Colombia). En consecuencia, el control de calidad sobre estos últimos insumos es una necesidad cada vez más sentida por este tipo particular de usuarios. Dada la condición de "producto natural" la variabilidad de las concentraciones en los principios activos es muy probablemente la característica más preponderante de este tipo de formulaciones; por lo tanto, la evaluación cuantitativa de dichas formulaciones se constituye en una prioridad incuestionable y se puede realizar bien sea por técnicas instrumentales o a través de

modelos biológicos en términos de su eficacia (Veeresham *et al.* 1998), con miras a incursionar de una manera más rigurosa y competitiva en el actual sistema de producción agrícola para el control de plagas, toda vez que el gran auge de productos naturales con una atribuida actividad insecticida no es condición suficiente de garantía para la calidad y/o estabilidad de los productos.

De esta manera, la implementación y desarrollo de modelos experimentales en la investigación biológica, cuya estructura es suficientemente simple como para poder ser descrita con los recursos conceptuales existentes (Vidart 1983), proporcionan la comprensión de este tipo de problemas que con las especies clásicas no han podido ser esclarecidos, llevando implícito la determinación y manejo de parámetros involucrados en cada línea de interés como reproducción,

fisiología, genética, etología, en aras de que la información generada por un modelo biológico utilizado como herramienta para la evaluación de extractos naturales obligue a pensar acerca de mecanismos que relacionan estructura- actividad (Vidart 1983; Bianchi *et al.* 1978).

Algunos organismos han logrado un perfil biológico de tal magnitud que le han conferido un verdadero status de modelos biológicos. Por ejemplo, a partir de las investigaciones clásicas de Morgan y su escuela, los insectos del orden Diptera, pero particularmente especies del género *Drosophila*, se han convertido en una fuente de selección para diversos estudios, que permiten extrapolar resultados a especies diferentes, toda vez que el proceso de desarrollo es también uniforme, ya que las variaciones específicas sólo

1 Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares GIEM. Universidad de Antioquia. A.A. 1226, Medellín

2 Estudiante Universidad Católica de Oriente. Rionegro. Antioquia.

1* cpelaez@matematicas.udea.edu.co

afectan las fases del ciclo biológico (Bianchi *et al.* 1978).

La especie *Drosophila melanogaster* ha sido un gran aporte, principalmente, para el desarrollo de la genética y recientemente para determinar resistencia o susceptibilidad a insecticidas que presentan distintos modos de acción. Es así que se ha demostrado la existencia de un gen en *D. melanogaster* resistente a insecticidas (JHA) análogos a la hormona juvenil (Ashok *et al.* 1998) y cierto grado de susceptibilidad a Ciromazina que es un insecticida regulador del crecimiento de los insectos (IGR), permitiendo predecir que si se controlaran poblaciones de insectos plaga su resistencia sería mínima (Wilson 1997). Insecticidas organoclorados, cuyo modo de acción es sobre el sistema nervioso, han permitido comprender la resistencia de *D. melanogaster* conferida por receptores GABA (Bloomquist *et al.* 1997; Hosie *et al.* 1995; Stilwell *et al.* 1995) y resistencia a insecticidas organofosforados y piretroides localizada en el gen CYP6A2 del citocromo P450 (Bride *et al.* 1997; Dunkov *et al.* 1997; Dunkov *et al.* 1996).

En el presente artículo se plantea la técnica HPLC como herramienta para una valoración cuantitativa y *Drosophila melanogaster* como modelo, a nivel de laboratorio, que genera respuestas biológicas para el control de procesos de extracción de productos naturales en función de sus modos de acción, control de calidad de formulaciones y eficacia en función del tiempo de estos productos, mediante evaluación de su actividad biológica. De igual manera se consideró en el presente al neem (*A. indica*) como un caso particular, que pese a su gran auge en las últimas décadas no ha tenido gran impacto a nivel de importaciones de formulaciones comerciales ni de producción nacional.

Materiales y Métodos

Colonia de *D. melanogaster* (Cepa Canton). Esta colonia es mantenida en el laboratorio del grupo GIEM del departamento de Química de la Universidad de Antioquia, de acuerdo con la técnica tradicional en laboratorios de Genética (Moreno y Zuleta 1973).

Preparación de los extractos de neem. Las semillas de neem se importaron de República Dominicana y para cada caso, 100g de las semillas secas y molidas, se sometieron a extracción en Soxhlet hasta agotamiento, utilizando éter de petróleo, diclorometano, mezcla diclorometano-éter (1:1), etanol, y metanol. Para poseer un parámetro cuantitativo de los diferentes solventes en el caso del sistema extrayente, se partió de una valoración cuantitativa de la polaridad mediante la siguiente ecuación (Jaramillo 1987):

$$\text{Polaridad} = (V_A \chi_A + V_B \chi_B) / V_T$$

Donde: V = volumen
 χ = polaridad solvente

Al aplicar la fórmula, los extractos evaluados presentaron los siguientes valores numéricos de polaridad: 0, 1.7, 3.4, 5.2 y 6.6. Los diferentes extractos se emulsionaron con tween 80 para equiparar las solubilidades en agua y se evaluó su actividad insecticida mediante pruebas de inhibición del desarrollo de *D. melanogaster* por cuantificación de la relación entre el número de pupas y el número de adultos.

Cromatografía. Para los perfiles cromatográficos se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) marca Gilson con detector de arreglo de diodos (DAD). Columna analítica Waters Spherisorb S50DS2 (4.4 x 150 mm). Fase móvil 22:72 (acetronitrilo: agua) y flujo de 1 mL/min.

Bioensayos. Modelo biológico *D. melanogaster*: eficacia biológica de los extractos de neem de diferentes polaridades. Para la evaluación de los 5 extractos se seleccionaron concentraciones entre 50 y 200 ppm. Volúmenes constantes de la mezcla de extracto-alimento (15ml) se depositaron en viales transparentes; finalmente, éstos se cubrieron con gasa durante 24 horas. En cada vial, se depositaron tres parejas jóvenes de *D. melanogaster* y se dejaron cruzar durante 2 días, al cabo de los cuales se descartaron. A los 6 días, luego de la siembra, se inició el recuento de los estados inmaduros (pupas) hasta el día 13 con intervalos de 3 días y el recuento de los adultos a partir del día 10 y hasta el día 20 aproximadamente con intervalos de 12 horas y descartes posteriores a las lecturas. Al final de la última lectura se asegura el desarrollo de los individuos de la primera generación filial. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento y los resultados de la relación pupa-adulto fueron procesados mediante análisis de regresión con el cual se obtuvo una ecuación para el extracto más promisorio y la DL₅₀ para el mismo, expresada como una inhibición en la emergencia al estado adulto.

El modelo biológico *D. melanogaster*: estabilidad de extractos de neem. Con base en los resultados del numeral anterior, se planteó una metodología que permite estudiar la estabilidad de extractos. Para el presente caso se realizó un estudio cinético que consistió en evaluaciones mensuales por 6 meses de un extracto polar de neem almacenado a 20°C, 80% de humedad relativa y baja luminosidad.

El modelo biológico de *Drosophila melanogaster*: valoración de productos comerciales de neem. Con base en la reproducibilidad observada en el modelo, se evaluaron productos comerciales a una concentración de 2500 ppm, de acuerdo con las dosis recomendadas para campo.

Resultados y Discusión

El primer parámetro comparativo para la valoración de extractos parte del estudio de los rendimientos para la extracción a partir de diferentes solventes orgánicos o mezclas de los mismos. En la tabla 1 se presentan los correspondientes resultados para los diferentes sistemas de extracción de las semillas de neem.

Tabla 1. Rendimiento de los diferentes extractos de neem (*A. indica*)

Polaridad del sistema Extrayente	Rendimiento (% p/p)
0	32.5
1.7	41.7
3.4	24.7
5.2	19.6
6.6	24.1

Al considerar la viabilidad para una extracción comercial, los rendimientos tendrían que ser confrontados con variables como costo de solventes, riesgos de operación y sobre todo valoraciones cuantitativas (a tra-

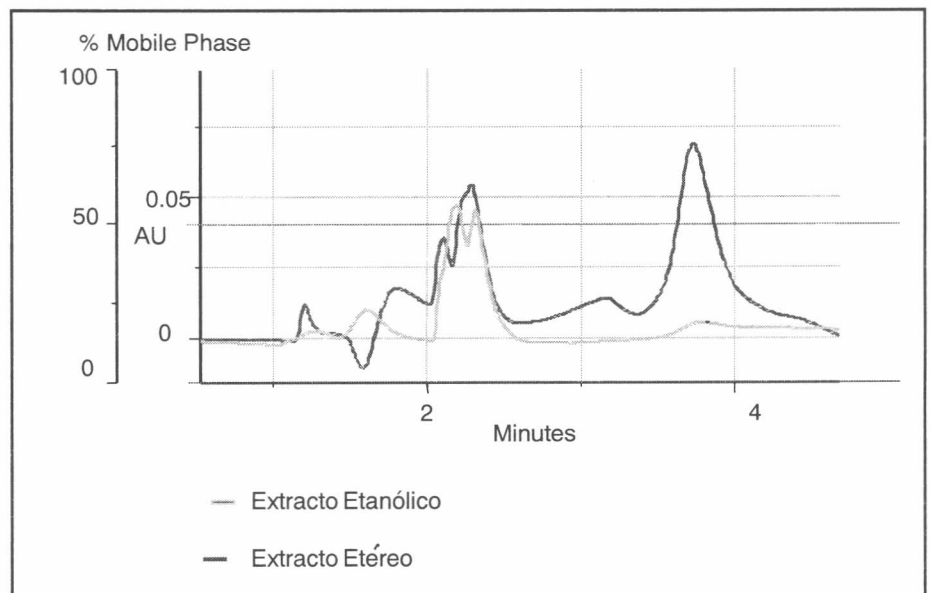


Figura 1. Comparación de perfiles cromatográficos de neem (*A. indica*).

vés de análisis instrumental –cuantificación química– o bien mediante la actividad biológica) que permitan establecer parámetros adecuados para la toma de decisiones con respecto a las condiciones óptimas para las extracciones comerciales, como se describirá en las evaluaciones biológicas.

De esta manera en la figura 1 se presenta la confrontación analítica, a través de dos perfiles cromatográficos tipo HPLC (técnica a partir de la cual se pueden establecer los valores cuantitativos de los principios activos de extractos naturales) de los extractos de neem (etanólico y etéreo). Claramente se aprecia que existen diferencias significativas entre los dos extractos con respecto a calidad y cantidad de metabolitos presentes y que son responsables de las divergencias observadas en la actividad biológica de los extractos como se muestra más adelante.

Si bien analíticamente es el método más adecuado para la evaluación y comparación de extractos, los costos del equipo y sus requerimientos hacen impráctico el método para la mayoría de usuarios. En contraste, la utilización de modelos biológicos está en capacidad de responder el mismo tipo de preguntas e incluso en el caso donde se presentan efectos sinérgicos o antagonistas, los modelos biológicos como *D. melanogaster* puede dar conclusiones más adecuadas.

El modelo biológico *D. melanogaster*: establecimiento de la eficacia biológica de los extractos de neem de diferentes polaridades. La actividad de los extractos está relacionada con el contenido de los principios activos y esta cantidad, a su vez, es una función del sistema extrayente. Bajo esta consideración en la tabla 2 se observan los resultados en términos de la actividad insecticida expresada como la interrupción del ciclo vital de *D. melanogaster*, en la transición pupa-adulto y presentada de una forma ascendente de acuerdo con la polaridad.

Cuando se observa la actividad de los extractos de semillas de neem, (expresada como una inhibición de la emergencia de adultos en el modelo *D. melanogaster* en función de la polaridad), se puede generalizar que los extractos de neem de polaridad 0 o valores cercanos no presentan una acción inhibidora en el paso pupa-adulto, a concentraciones \leq 200 ppm. Tal comportamiento se puede atribuir a que dicha actividad está mediada por compuestos polares como nimbin, salanim, azadirachtina y 6-desacetilnimbin que son los responsables directos de la acción inhibitoria del crecimiento (Jarvis *et al.* 1997; Jaglan *et al.* 1997) al comprometer los niveles hormonales presentes en los estados inmaduros de los insectos (Mitchell *et al.* 1997) evitando que éstos lleguen a su estado adulto.

En la figura 2 se aprecian las diferencias en las respuestas biológicas para los diferentes extractos formulados.

Al considerar el comportamiento de cada tipo de extracto se obtienen las diferentes ecuaciones presentadas en la tabla 3.

Tabla 2. Parámetros evaluados para los extractos de semilla de neem (*A. indica*) sobre el modelo *D. melanogaster*

Polaridad extractos Concentración ($\mu\text{L/L}$)		$\Sigma\text{A}'/\text{P}''$	Parámetros Relación A/P ($\times \pm \alpha$)	Inhibición % ($\times \pm \alpha$)
0	Control	463/463	1.0	0
	100	520/542	0.96 ± 0.06	4.06
	150	476/491	0.97 ± 0.03	3.05
	200	524/571	0.91 ± 0.05	8.23
1.7	Control	253/261	0.97 ± 0.03	0
	100	263/297	0.88 ± 0.03	11.45
	150	209/260	0.80 ± 0.13	19.61
	200	83/296	0.28 ± 0.12	71.90
3.4	Control	359/378	0.95 ± 0.03	0
	100	299/352	0.85 ± 0.04	15.32
	150	202/311	0.66 ± 0.14	35.05
	200	149/332	0.45 ± 0.16	55.15
5.20	Control	303/307	0.98 ± 0.02	0
	100	83/355	0.23 ± 0.15	76.79
	150	19/267	0.07 ± 0.03	92.88
	200	4/230	0.02 ± 0.02	98.26
6.60	Control	516/521	0.99 ± 0.01	0
	100	359/549	0.65 ± 0.02	34.61
	150	110/739	0.15 ± 0.17	85.11
	200	5/592	0.01 ± 0.02	99.15

*A: adultos

**P: pupas

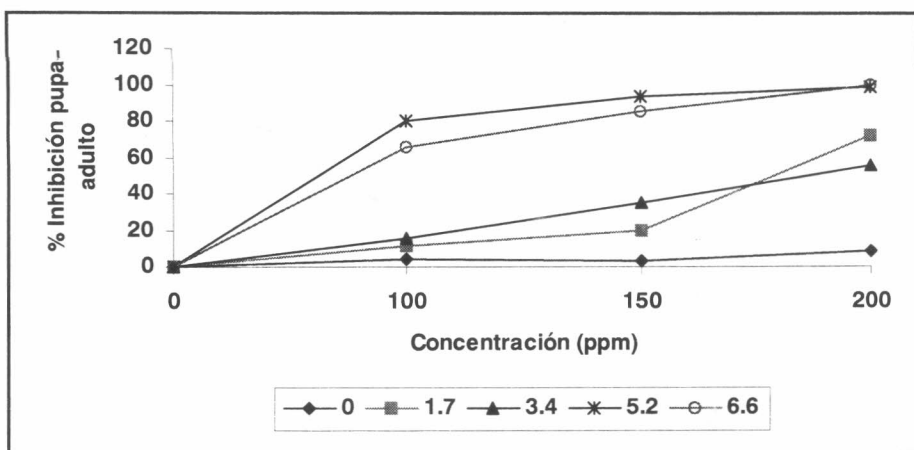


Figura 2. Inhibición en el paso pupa-adulto para el modelo *Drosophila melanogaster* por acción de diferentes extractos de neem (*A. indica*).

Tabla 3. Ecuaciones de regresión y DL_{50} para los diferentes extractos de neem (*A. indica*)

EXTRACTO DE POLARIDAD CERO	
% de Inhibición = $0.0520842 + 0.303429(\text{concentración})^{1/2}$	$DL_{50} = 27097$ ppm
EXTRACTO DE POLARIDAD 1.7	
% de Inhibición = $0.18(\text{concentración})$	$DL_{50} = 277.78$ ppm
EXTRACTO DE POLARIDAD 3.4	
% de Inhibición = $\{0.0751253 + 0.0374352(\text{concentración})\}^2$	$DL_{50} = 188.86$ ppm
EXTRACTO DE POLARIDAD 5.2	
% de Inhibición = $1.39097 + 7.2146(\text{concentración})^{1/2}$	$DL_{50} = 45.39$
EXTRACTO DE POLARIDAD 6.6	
% de Inhibición = $1.06264 + 6.44403(\text{concentración})^{1/2}$	$DL_{50} = 57.67$

Con base en los valores alcanzados para los diferentes extractos y los DL_{50} a partir de los cuales se presentan diferencias altamente significativas, se establece la ecuación de regresión basada en la actividad insecticida y traducida como inhibición del paso pupa-adulto del modelo *D. melanogaster* en función de la polaridad de los extractos de neem.

$$\% \text{ Inhibición} = 38.2 (\text{polaridad})^{1/2}$$

$$r^2 = 97.0\%$$

En consecuencia de la anterior ecuación se puede afirmar que el empleo de extractos de neem de baja polaridad, tales como los aceites, no son promisorios para su uso como insecticida, (pese a su rendimiento en la extracción (Tabla 1) cuyo modo de acción sea la interrupción en el paso pupa adulto y a las concentraciones estudiadas en el presente artículo, dado que se ha determinado que tales aceites ejercen una marcada acción antialimentaria (Dhar *et al.* 1996; Weissling *et al.* 1997)

De otro lado sistemas de extracción de alta polaridad son muy similares en cuanto a la actividad insecticida generada, dada la tendencia a formar una asíntota cuando los porcentajes de mortalidad están cercanos al 100%. Bajo estas circunstancias la determinación del tipo de solvente a utilizar será más una razón económica o de seguridad, de tal manera que para tener un parámetro cuantitativo de la actividad de un extracto polar de neem, en la tabla 4 se presenta el análisis de regresión para un extracto de polaridad 5.2

La ecuación para el modelo *D. melanogaster* corresponde a la forma:

$$\% \text{ de Inhibición} = 7.32 (\text{ppm})^{1/2}$$

A partir de esta ecuación se estimó la DL_{50} para el extracto de polaridad 5.20 obteniéndose una concentración de 46.69 ppm.

En consecuencia, este tipo de extracciones garantizan una marcada actividad insecticida comprometiendo parámetros hormonales en el paso pupa-adulto, que bien puede traducirse en un control de las poblaciones

de plagas en la generación siguiente toda vez que los programas de aplicación de insecticida en los sistemas agrícolas sean manejados rigurosamente.

El modelo de *D. melanogaster*: estabilidad de extractos de neem. Una alternativa para la realización de estudios de estabilidad de extractos naturales en función del tiempo se puede realizar a través del comportamiento biológico del modelo *D. melanogaster*. En la tabla 5 se presenta un estudio cinético a 2500 ppm comparativo para dos extractos de neem formulados en tiempos diferentes

En consecuencia, con los resultados presentados en la tabla 5 se establece que:

- Los productos evaluados el primer día de formulación presentan una actividad óptima.
- Ambos productos conservan una actividad óptima hasta el día 68 de la formulación.
- El comportamiento del "producto 2", con respecto al número de pupas observado, es significativamente diferente a partir del día 68 de formulación. Sin embargo, su actividad insecticida se conserva.

- Para el día 94 el "producto 2" pierde toda actividad insecticida.
- El "producto 1" conserva su actividad inmodificable hasta el día 195.

Con base en los resultados de la prueba anterior se puede establecer que el denominado "producto 1" presenta una vida media de más de 6 meses, mientras que el "producto 2" debe ser aplicado antes de cumplir 2 meses de formulación.

Modelo *D. melanogaster*: valoración de productos comerciales. Son varias las alternativas para emplear el modelo *D. melanogaster* como herramienta para la evaluación de las diferentes presentaciones comerciales de extractos: La primera supone la evaluación del producto a la concentración recomendada por el fabricante y para tal efecto en la figura 3 se presenta la evaluación de tres productos comerciales de neem.

Tal como se desprende de los resultados, solo el "producto 1" presenta una significativa actividad biológica en función de la interrupción en el paso pupa-adulto a las dosis recomendadas.

La segunda alternativa se plantea a partir de la evaluación de un rango de concen-

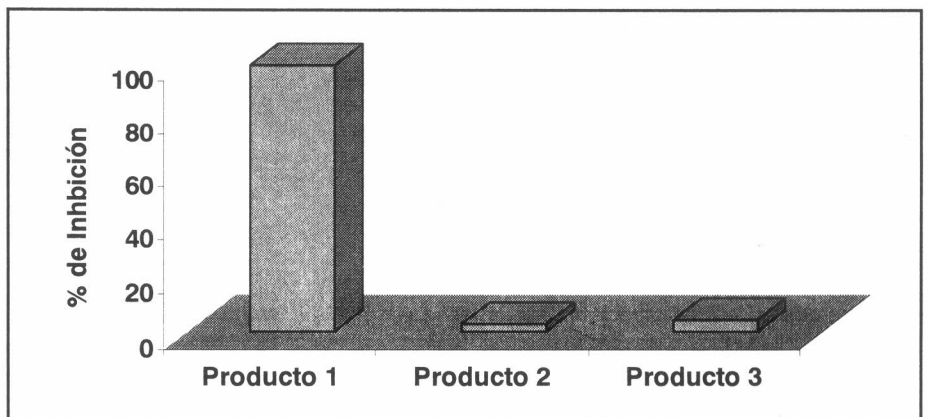


Figura 3. Comparación de la actividad en el paso pupa-adulto sobre *Drosophila melanogaster* de formulados de neem (*A. indica*).

Tabla 4. Modelo de regresión para un extracto de semillas de neem (*A. indica*) de polaridad 5.20 sobre el modelo *D. melanogaster*

Parámetro	Estimado	Error estándar	T estadístico	Valor-P	
Concentración	7.31719	0.193244	37.865	0	
Análisis de Varianza					
Recurso	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrado medio	F-ratio	Valor-P
Modelo	24093.6	1	24093.6	1433.76	0
Residual	50.4135	3	16.8045		
Total	24144	4			
$R^2 = 99.7912$			Error estándar est. = 4.09935		

Tabla 5. Prueba de Estabilidad para dos extractos polares de neem

Días	Producto 1			Producto 2		
	Pupas	Adultos	% Inhibición	Pupas	Adultos	% Inhibición
0	11	0	100	0	0	100
27	0	0	100	0	0	100
68	35	0	100	223	0	100
94	31	0	100	392	383	4.0
125	4	0	100	-	-	-
195	11	0	100	-	-	-

tracciones de los productos comerciales empleando modelos de regresión tal como los presentados en la tabla 3 y donde la comparación se establece a partir de las DL_{50}

Conclusiones

- El modelo *D. melanogaster* puede ser empleado adecuadamente para definir parámetros en función de la actividad biológica de extractos naturales.
- El modelo *D. melanogaster* representa una alternativa viable para la realización de estudios de estabilidad y vida media de extractos naturales con actividad insecticida.
- El modelo *D. melanogaster* puede ser empleado para el control de calidad de diferentes presentaciones comerciales de extractos naturales.
- Dada la facilidad de manejo y los bajos costos para su mantenimiento a nivel de laboratorio, el modelo *D. melanogaster* es una herramienta promisoría en la evaluación de extractos naturales.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Comité de Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia y a la Universidad Católica de Oriente por la cofinanciación de este proyecto.

Bibliografía

ASHOK, M.; TURNER, C.; WILSON, T. 1998. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the BHLH-PAS family of transcriptional regulators. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. (Colorado U.S.A) 95 (6) :2762-2766.

ASOCOLFLORES. Colombia, Home page: www.colombiaexport.com

BIANCHI, N.O.; MERANI, N.S.; LIZARRALDE, M.S.; ACUÑA, A.M. 1978. Desarrollo de modelos animales para estudios genéticos. Ccia. Interamer. 19 (1-4): 20.

BLOOMQUIST, J.R.; FERGUSON, H.J.; COX, E.D.; REDDY, M.S.; COOK, J.M. 1997. Mode of action beta-carboline convulsants on the insect nervous system and their potential as insecticides. Pestic. Sci. 51 (1): 1-6.

BRIDE, J.M.; CUANY, A.; AMICHOT, M.; BRUN, A.; BABAULT, M.; LE-MOUSEEL, T.; DE SOUSA, G.; RAHMANI, R.; BERGE, J.B. 1997. Cytochrome P-450 field insecticide tolerance and development of laboratory resistance in grape vine populations of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). J. Econ. Entomol. 90 (6): 1514-1520.

DHAR, R.; DAWAR, H.; GARG, S.; BASIR, S.F.; TALWAR, G.P. 1996. Effects of volatiles from neem and other natural products on gonotrophic cycle and oviposition on *Anopheles stephensis* an *A. culicifacies* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 33(2):195-201.

DUNKOV, B.C.; RODRIGUEZ-ARNAIS, R.; PITTENDRIGH, B.; FRENCH-CONSTANT, R.H.; FEYEREISEN, R. 1996. Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. Mol. Gen. Genet. 251 (5): 290-297.

DUNKOV, B.C.; GUZOV, B.M.; MOCELIN, G.; SHOTKOSKI, F.; BRUN, A.; AMICHOT, M.; FRENCH-CONSTANT, R.H.; FEYEREISEN, R. 1997. *Drosophila* cytochrome P450 gene Cyp6a2: structure, localization, heterologous expression, and induction by phenobarbital. DNA. Cell. Biol. 16 (11): 1345-1358.

HOSIE, A.M.; BAYLIS, H.A.; BUCKINGHAM, S.D.; SATTELLE, D.S. 1995. Action of the insecticide fipronil, on dieltrin-sensitive and -resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. Br. J. Pharmacol. 115 (6): 909-912.

JAGLAN, M.S.; KHORKHAR, K.S.; MALIK, M.S.; SINGH, R. 1997. Evaluation of neem (*A. indica* A. juss) Extracts against American Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). J. Agr. Food Chem. 45 (8): 3262-3268.

JARAMILLO, L.M. 1987. Fundamentos de la separación y purificación de compuestos por métodos de distribución entre fases. Dpto. Qca, Fac. Ciencias. U. del Valle. Pp. 65.

JARVIS, A.P.; JOHNSON, S.; MORGAN, E.D.; SIMMONDS, M.S.J.; BLANEY, W.M. 1997. Photooxidation of nimbin and salannin, tetranortriterpenoids from the neem tree (*Azadirachta indica*). J. Chem. Ecol. 23 (12): 2841-2860.

MITCHELL, M.J.; SMITH, S.L.; JOHNSON, S.; MORGAN, E.D. 1997. Effects of the tree compounds azadirachtin, salannin, nimbin, and 6-desaceylnimbin on 20-mono-oxygenase activity. Arch. Insect Biochem. Physiol. 35 (1-2): 199-209.

MORENO, J.; ZULETA, M. 1973. Técnicas para el mantenimiento de *D. melanogaster*. Act. Biológ. 2(4): 46-49.

STILWELL, G.E.; ROCHELEAU, T.; FRECH-CONSTANT, R.H. 1995. GABA receptor minigenescues insecticide resistance phenotypes in *Drosophila*. J. Mol. Biol. 253 (2): 223-227.

VEERESHAM, C.; RAJ-KUMAR, M.; SOWJANYA, D.; KOKATE, C.K.; APTE, S.S. 1998. Production of azadirachtin from callus cultures of *Azadirachta indica*. Fitoterapia LXIX (5): 423-424.

VIDART, D. 1983. Un modelo ambiental. Ccia. Tecnol. Desllo. 7(1-2): 128.

WEISSLING, T.; LEWIS, T.M.; MC DONOUGH, L.M.; HORTON, D.R. 1997. Reduction in pear (Homoptera: Psyllidae) oviposition and feeding by foliar application of various materials. Can. Entomol. 129(4): 637-643.

WILSON, T.G. 1997. Cyromazine toxicity to *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) and lack of cross-resistance in natural populations strains. J. Econ. Entomol. 90 (5): 1163-1169.