

Efecto biocontrolador de *Azadirachta indica* (Meliaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de laboratorio.

Biocontroller effect of *Azadirachta indica* (Meliaceae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) under laboratory conditions.

Jhojailith Rodríguez¹ , Elvira Alejandra Sánchez-González¹ , Doris Reyes² , Rafael Fernández Da Silva² 

RESUMEN

Los insecticidas vegetales son compuestos derivados de plantas que causan efectos nocivos en la fisiología de insectos y otros artrópodos, que eventualmente causan la muerte. Una de las plantas con mayor interés bioinsecticida es *Azadirachta indica* Juss o árbol de Neem. Aunque la toxicidad del Neem ha sido comprobada en mosquitos con importancia vectorial, en Venezuela se desconoce su efecto en *Aedes aegypti* Linn, vector de arbovirus asociados con dengue, chikungunya y zika. Por ello, en el presente estudio se evaluó en condiciones de laboratorio el efecto biocontrolador de un extracto etanólico foliar de *A. indica* sobre los estadios inmaduros y adultos de una población local *Ae. aegypti*. Se observó la mortalidad del 50% de los huevos a la concentración de 0,5 g/mL del extracto y del 97,50% a 2 g/mL. La mortalidad de los estadios larvales y la fase pupal fue superior al 70% cuando se utilizaron concentraciones de 1,5 g/mL y 2 g/mL. En los adultos, la mayor mortalidad fue del 35,83% a 2 g/mL, mientras que la inhibición del desarrollo fue superior al 63%. Los resultados demuestran la eficacia del extracto foliar de *A. indica* como biocontrolador de *Ae. aegypti* principalmente en las primeras etapas de desarrollo.

Palabras clave: Control biológico, azadiractina, Culicidae, Neem, *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Plant insecticides are compounds from plants with deleterious effects on the physiology of insects and other arthropods, eventually causing their death. One of the plants with the greatest bioinsecticide interest is *Azadirachta indica* Juss or Neem tree. Although the toxicity of Neem has been proven in mosquitoes with vector importance, in Venezuela its effect is unknown on *Aedes aegypti* Linn, vector of arboviruses associated with dengue, chikungunya and zika. Therefore, in the present study assessed the biocontrol effect of a leaf ethanolic extract of *A. indica* on the immature and adult stages of a local population *Ae. Aegypti* under laboratory conditions. Mortality of 50% of the eggs was observed at a concentration of 0.5 g/mL of the extract and 97.50% at 2 g/mL. The mortality of the larval stages and the pupal phase was higher than 70% in concentrations of 1.5 g/mL and 2 g/mL. In adults, the highest mortality was 35.83% at 2 g/mL, while the inhibition of development was higher than 63%. Results reveal the effectiveness of *A.indica* extract as *Ae. Aegypti* biocontroller, mainly in the early stages of development.

Key words: Biological control, azadirachtin, neem, *Aedes aegyptii*

INTRODUCCIÓN

Los insecticidas vegetales corresponden a compuestos botánicos que contienen una serie de fitoquímicos tales como saponinas, taninos, alcaloides, di y tri-terpenoides, que generan mortalidad y otros efectos nocivos en la fisiología de los organismos (1). Estos compuestos constituyen metabolitos secundarios, los cuales cumplen un rol ecológico mediando la interacción de la planta con su ambiente.

Hasta el presente, se han reportado aproximadamente 2.000 especies de plantas con propiedades insecticidas pertenecientes a las familias Solanaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Piperaceae, Fabaceae y Meliaceae, esta última se destaca por presentar alrededor de 1400 especies, algunas de las cuales se encuentran presentes en los trópicos y tienen una comprobada actividad biológica en insectos, generando una serie de efectos nocivos como actividad repelente, actividad anti-alimentaria e inhibición del crecimiento (2,3).

Dentro de la familia Meliaceae se encuentra la especie *Azadirachta indica* conocida comúnmente como Neem, un árbol tropical siempre verde de origen asiático que crece en las regiones más secas del sur de la India y Myanmar

¹Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología (FACyT), Universidad de Carabobo, Campus Bárbula, municipio Naguanagua, Valencia, Venezuela, Apartado 2005.

²Unidad de Biotecnología Aplicada (UBA), Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencia y Tecnología (FACyT), Universidad de Carabobo, Campus Bárbula, municipio Naguanagua, Valencia, Venezuela, Apartado 2005.

Autor de correspondencia: Elvira Alejandra Sánchez González 

E-mail: elviraalejandra@gmail.com

Recibido: 01-06-2020 Aprobado: 01-12-2020

(4). Fue introducida en Venezuela para ser implementado en programas de reforestación de zonas áridas en estados como Falcón, Trujillo, Lara y Zulia, y también como árbol ornamental (5). El Neem es conocido como el “árbol multipropósito” desde hace más de 4500 años, dada sus amplias propiedades cosméticas, medicinales y de control de plagas (4). En el control de insectos, la azadiractina (AZA) es el principal metabolito secundario del Neem asociado con la alteración del ciclo de vida, evitando que el insecto se alimente, mude y se reproduzca (6). A su vez, su acción insecticida presenta una gran ventaja ya que su modo de acción no induce a la resistencia, las tasas de toxicidad resultan inofensivas para el hombre y al degradarse no generan residuos tóxicos, por lo que no son contaminantes para el ecosistema (7). Diversos estudios han evaluado la actividad biológica de los extractos de *A. indica* en mosquitos con importancia vectorial, demostrando su efecto biocida sobre larvas del segundo (II) y tercer (III) instar de *Ae. aegypti* (8), en larvas del III instar en *Culex tarsalis* (9), en larvas de *Aedes albopictus* en condiciones de campo (10), así como en los huevos y adultos de *Anopheles culicifacies* (11).

A pesar de su comprobada toxicidad, en Venezuela no se han realizado investigaciones para evaluar su efecto en mosquitos con importancia vectorial. Por ello, el propósito del presente estudio fue evaluar el efecto biocontrolador de un extracto etanólico foliar de *A. indica*, sobre los estadios inmaduros y adultos de una población local *Ae. aegypti*, un importante vector de arbovirus asociados al dengue, Mayaro, chikungunya y Zika (12), y de esta manera generar conocimientos prácticos que contribuyan con el manejo integrado de las poblaciones de este vector en dicha región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares de *Ae. aegypti* fueron obtenidos a través de la recolección de sus estadios inmaduros en el Campus de la Universidad de Carabobo, (10°16'24"N; 68°00'11"W), municipio Naguanagua, estado Carabobo, Venezuela y su posterior cría en el Animalario del Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT), Universidad de Carabobo (UC) (13). La obtención del extracto etanólico foliar se realizó a partir de una plantación de árboles de *A. indica*, ubicada en las inmediaciones del Campus Bárbula, FACYT-UC (10°16'24"N; 68°00'11"W); se recolectaron hojas verdes, completamente extendidas y sin lesiones o manchas que indicaran infección de algún patógeno fúngico o viral. Todas las muestras foliares se lavaron con agua corriente y jabón para eliminar el polvo depositado, aplicándole un lavado posterior con agua destilada. Luego se aplicó un protocolo de extracción etanólico ya establecido (5), a partir del cual se prepararon las siguientes concentraciones del extracto foliar: 0,3 g/mL, 0,5 g/mL, 1 g/mL, 1,5 g/mL, 2 g/mL.

El efecto biocontrolador del extracto etanólico de *A. indica* se estimó a partir del porcentaje de mortalidad promedio

por cada concentración. Para la evaluación de las fases inmaduras (III instar, IV instar y pupas) se utilizaron 30 individuos por cada etapa de desarrollo, que fueron colocados en envases plásticos circulares con capacidad para 200 mL. En cada envase se adicionó 40 mL de agua destilada y 3 mL de la concentración del extracto a evaluar. También se determinó el porcentaje de inhibición del desarrollo por cada concentración, para ello se contabilizó el número de larvas del III instar que no lograron desarrollarse al IV instar (III-IV), las larvas del IV instar que no se desarrollaron a la fase pupal (IV-P) y por último, la cantidad de pupas que no lograron emerger como adultos (P-A). La inhibición del desarrollo se estimó como el número de individuos que no alcanzaron la siguiente fase de desarrollo entre el número total de individuos vivos por concentración.

La mortalidad en los adultos se estimó colocando 30 adultos recién emergidos dentro en un vaso de precipitado de 100 mL dentro del cual reposaba un papel de filtro impregnado con cada extracto a evaluar y se cubrió con tela de doppio para garantizar la circulación del aire en el interior (14).

Para determinar la actividad ovicida por cada concentración del extracto, se colocaron 30 huevos recién emergidos (6-12 horas) en envases plásticos con capacidad para 200 mL, se les adicionó 40 mL de agua destilada y 3 mL del extracto, se contabilizó en el número de larvas del primer instar emergidas hasta 72 horas post-tratamiento y posteriormente se estimó la actividad ovicida como el número de huevos no eclosionados dividido entre el número total de huevos sumergidas en el tratamiento (15, 16).

Se realizaron cuatro réplicas por etapa de desarrollo para cada concentración, la mortalidad de los estadios inmaduros y adulto se determinó 24 horas posteriores a cada tratamiento. Todos los análisis incluyeron la presencia de un grupo control en el cual se utilizó etanol al 80%. Los valores obtenidos fueron comparados PAST (PALaentological STATistics) ver. 3.03 (17), mediante la prueba de medias no paramétrica de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) con corrección de Bonferroni, para determinar si existían diferencias significativas de acuerdo a las diferentes concentraciones del extracto para cada caso. Se estimaron las concentraciones letales del 50% y 90% (CL50 y CL90 respectivamente) en cada una de las fases estudiadas, aplicando el modelo Probit (18).

RESULTADOS

El extracto etanólico foliar de *A. indica* mostró actividad biocida en todas las fases inmaduras (III instar, IV instar y pupa), con diferencias significativas en relación al porcentaje de mortalidad promedio por concentración (Tabla 1). Las larvas del III instar presentaron la mayor sensibilidad a todas las concentraciones del extracto, registrándose los valores más bajos para la CL50 y CL90. En larvas de IV instar y en pupas, se registró una actividad insecticida mayor al 50% a partir de 1,5 g/mL del extracto y el mayor porcentaje de mortalidad fue registrado a 2 g/mL (Tabla 1). En los adultos,

el extracto foliar de *A. indica* no mostró efectos mortales en las dos concentraciones más bajas evaluadas, mientras que el mayor porcentaje de mortalidad fue determinado a 2 g/mL (Tabla 1).

El efecto del extracto foliar de *A. indica* sobre la inhibición del desarrollo en *Ae. aegypti* se muestra en la Tabla 2. El aumento de la concentración generó una disminución importante en el desarrollo a la siguiente etapa. La fase de desarrollo IV-P fue la más susceptible, con una inhibición mayor al 50% en todas las concentraciones evaluadas. Mientras que en las fases III-IV y P-A el porcentaje de inhibición superó el 50% solo cuando estos fueron expuestos a 1 g/mL (Tabla 2).

Al evaluar la actividad ovicida, se obtuvo una respuesta diferencial significativa ($H=22,45$, $p<0,001$) en cada concentración del extracto, la mayor actividad ovicida se evidenció a 2 g/mL ($97,50\pm 1,59$), seguido de 1,5 g/mL ($87,50\pm 1,59$) y de 1 g/mL ($71,66\pm 2,15$), mientras que a

0,5 g/mL y 0,3 g/mL la actividad ovicida registrada fue de $50\%(\pm 2,72)$ y $33,33\%(\pm 1,36)$ respectivamente, finalmente en la muestra control el valor registrado fue de $2,50\%(\pm 1,59)$.

Se presentan los valores promedios del porcentaje de mortalidad y su error estándar. Dentro de cada columna, diferentes letras indican diferencias significativas (Instar III $H=18,48$, $p<0,001$; Instar IV $H=18,47$, $p<0,001$; Pupa $H=18,49$, $p<0,001$; Adulto $H=18,59$, $p<0,001$). Las CL50 y CL90 presentan entre paréntesis sus intervalos de confianza al 95% y el valor p.

Se presentan los valores promedios del porcentaje de inhibición del desarrollo y su error estándar. Dentro de cada fila, diferentes letras indican diferencias significativas (III-IV $H=18,03$, $p<0,001$; IV-P $H=17,75$, $p<0,001$; P-A $H=17,92$, $p<0,001$). III-IV: Número de larvas de III instar que no se desarrollaron al IV instar; IV-P: Número de larvas de IV instar que no se desarrollaron a la fase pupal; P-A: Número de pupas que no lograron emerger como adultos.

Tabla 1. Actividad insecticida del extracto etanólico de hojas de *A. indica* sobre los diferentes estados de desarrollo de *Ae. Aegypti*

Concentración (g/mL)	Fase de desarrollo			
	III instar	IV instar	Pupa	Adulto
Control	0,50±0,27a	0,67 ±0,30a	0,83 ±0,33a	0,00±0,00a
0,3	11,67±0,9b	6,67 ±1,36b	6,67±1,36b	0,00±0,00a
0,5	30,00 ±1,35c	24,17 ±1,59c	21,67±0,96c	0,00±0,00a
1	55,83 ±2,84d	48,33±2,15d	36,67±1,36d	10,00±1,35b
1,5	77,50±2,50e	70,00 ±1,35e	70,00 ±1,35e	20,00 ±1,35c
2	100,00±0,00f	100,00±0,00f	100,00±0,00f	35,83±1,59d
CL50	0,94	1,09	1,16	2,23
	(0,86-1,03) ($p<0,05$)	(1,00-1,19) ($p<0,05$)	(1,07-1,27) ($p<0,05$)	(2,05-2,47) ($p<0,05$)
CL90	1,79	1,95	2,02	3,24
	(1,63-2,03) ($p<0,05$)	(1,76-2,20) ($p<0,05$)	(1,83-2,30) ($p<0,05$)	(2,90-3,77) ($p<0,05$)

Tabla 2. Efecto del extracto etanólico de hojas de *A. indica* sobre la inhibición del desarrollo en *Ae. aegypti*.

Fase de desarrollo	Concentración (g/mL)				
	Control	0,3	0,5	1	1,5
III-IV	2,50±1,59a	34,90±1,69b	45,06±3,91b	63,80±3,95c	100±0,00d
IV-P	2,50±0,85a	63,24±4,09b	77,89±2,17c	80,54±0,81c	100±0,00d
P-A	8,30±0,96a	22,27±2,00b	27,62±1,91b	79,05±1,70c	100±0,00d

DISCUSIÓN

En los estados inmaduros se registraron diferencias significativas en la actividad biocida de acuerdo a las concentraciones del extracto. Resultados similares han sido reportados en larvas de *Ae. aegypti* tratadas con un extracto acuoso de semilla de Neem (19), donde un aumento en la concentración generó un aumento en el porcentaje de mortalidad, con letalidades máximas (46-82%) en las mayores concentraciones evaluadas (12-15mg/L). En relación a los adultos, los resultados determinaron que la mayor eficacia del extracto fue de 35,83% y se registró a 2 g/mL, debido a que la máxima concentración evaluada no logró generar una mortalidad de al menos de 50%, un aumento en las concentraciones del extracto sería necesario tal y como es reflejado en las CL50 y CL90 estimadas en el análisis probit. La efectividad del Neem como un biocontrolador, principalmente en los estados inmaduros de *Ae. aegypti* también ha sido reportado por diversos autores en otros mosquitos de importancia vectorial como; *Culex tarsalis*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus* y *Anopheles stephensi* (9, 10, 20,21).

Al evaluar el efecto ovicida, se determinó una importante actividad letal (mortalidad superior al 95%) al utilizar la mayor concentración del extracto. Resultados similares fueron observados al utilizar aceite de Neem en oviposuras de *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* (22), generando una mortalidad mayor al 65% en oviposuras expuestas a una concentración de 1.10^{-7} g/mL. Otros reportes señalan una inhibición en la eclosión de huevos de *Anopheles culicifacies* superior al 50% cuando fueron tratadas con concentraciones superiores a $5.0.10^{-5}$ g/mL de un extracto metanólico de Neem (23).

Finalmente, los resultados demostraron que es posible la interrupción del ciclo de vida de *Ae. aegypti* cuando los estados inmaduros son tratados con extracto de *A. indica*; un estudio similar determinó una inhibición de 100% de la muda de larvas de IV instar a pupa y de pupas a la fase adulta de *Ae. aegypti*, cuando se utilizó 10mg/L de un bioinsecticida formulado con Neem (19). De igual manera, un aumento en el tiempo de desarrollo ha sido reportado en larvas de *Culex pipiens* desarrolladas a una concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ g/mL de AZA purificada (19,75 días) en contraste a las larvas desarrolladas en la muestra control (8,75 días) (24).

Además de la prolongación del desarrollo, otros efectos adversos se han reportado en larvas y pupas de mosquitos expuestos a dosis letales y sub-letales de *A. indica*, entre los que se encuentran la disminución de la fecundidad, el aumento de la esterilidad, cambios del comportamiento de alimentación y oviposición (21, 11, 24, 25).

La actividad biocida del extracto foliar de Neem evidenciada en cada etapa de desarrollo de *Ae. aegypti*, así como el efecto inhibitorio en su ciclo de vida, podría estar asociado con el mecanismo de acción de la AZA, uno de los principales metabolitos secundarios con acción insecticida

presentes en el Neem. La AZA interfiere con la regulación neuroendocrina de las hormonas que actúan en el proceso de muda, inhibiendo la enzima que cataliza el último paso del proceso que convierte a la ecdisona en la hormona activa 20-hydroxyecdysone, provocando mudas incompletas que ocasionan la muerte del insecto antes que este pueda completar su desarrollo (26). Cuando los niveles de la AZA disminuyen, el efecto sobre la muda se hace menos intenso y los insectos pueden permanecer en la misma etapa de desarrollo durante largos períodos, cuando llegan a la siguiente etapa podrían morir o desarrollarse como adultos malformados (27).

Además de la AZA, existen otros limonoides presentes en el Neem que han reportado actividad biológica en la familia Culicidae. Entre estos componentes se incluyen la salannina y la nimbina, que actúan como reguladores del crecimiento al inhibir la ecdisona 20- monooxigenasa, enzima importante para el proceso de muda (3), ambos metabolitos secundarios han sido involucrados con la mortalidad larval en *An. gambiae* (25) y también podrían estar asociados con el efecto biocida en *Ae. aegypti* determinado en el presente estudio.

Los resultados obtenidos demuestran la eficacia del extracto etanólico de hojas de *A. indica* como controlador biológico de *Ae. aegypti*. Debido a su actividad biocida e inhibidora del desarrollo, su uso podría sumarse a las estrategias en el manejo integrado de vectores como un tipo de biocontrol que evite la emergencia y supervivencia de las fases inmaduras (huevo-larva-pupa), en criaderos potenciales como cauchos, floreros, recipientes para almacenar agua, entre otros. En adultos, se recomienda seguir evaluando el efecto biocida del extracto foliar de *A. indica*, así como realizar bioensayos que incluyan concentraciones iguales o superiores a la CL50 y CL90 estimadas en el estudio.

Agradecimientos. Deseamos agradecer al Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo por el financiamiento parcial de este trabajo. Agradecemos a los revisores anónimos por contribuir enormemente con correcciones y sugerencias para mejorar la primera versión del manuscrito

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nava-Pérez E, García-Gutiérrez C, Camacho-Báez JR, Vázquez-Montoya EL. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai* 2012; 8:17-29.
2. García-Mateos R, Pérez P, Rodríguez HC, Soto HM. Toxicidad de alcaloides de *Eythrina americana* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Rev Fitotec Mex* 2004; 27:297-303.
3. Castillo-Sánchez LE, Jiménez-Osornio JJ, Delgado-Herrera MA. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. *T Subtrop Agroecosyst*. 2010; 12: 445-462.
4. Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*). *Curr Sci* 2002; 82: 1336-1345.

5. Reyes E, Valero S, Garay D. 2003. Estudio preliminar de las propiedades físicas de la especie *Azadirachta indica* (Neem), procedentes del Estado Falcón (Venezuela). *Revista Forest. Venez.* 47(2): 23–29.
6. Orozco F, Rodríguez M. Cultivos de células en suspensión de *Azadirachta indica* para la producción de un bioinsecticida. *Rev Mex Ing Quim* 2007; 6: 251-258.
7. Nicoletti M, Mariani S, Maccioni O, Cocciolletti T, Murugan, K. Neem cake: chemical composition and larvicidal activity on Asian tiger mosquito. *Parasitol Res* 2012; 11: 205-213.
8. Nour AH, Sandanasamy J, Nour, AH. Larvicidal activity of extracts from different parts of Neem (*Azadirachta indica*) against *Aedes aegypti* mosquitoes' larvae. *Sci Res Essays* 2012;7: 2810-2815.
9. González R, Flores M, Guerrero E, Mendoza R, Cárdenas A, Aguirre L, Chávez E. Efecto insecticida de extractos vegetales sobre larvas de *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) en laboratorio. *Rev Mex Cs Agríc* 2013;4:273-284.
10. Benelli G, Bedini S, Cosci F, Toniolo C, Conti B, Nicoletti M. Larvicidal and ovideterrent properties of neem oil and fractions against the filariasis vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a bioactivity survey across production sites. *Parasitol Res* 2015; 114: 227-236.
11. Benelli G, Chandramohan B, Murugan K, Madhiyazhagan P, Kovendan K, Panneerselvam C, Dinesh D, Govindarajan M, Higuchi A, Toniolo C, Canale A, Nicoletti M. Neem cake as a promising larvicide and adulticide against the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae): a HPTLC fingerprinting approach. *Nat Prod Res* 2017; 31:1185-1190.
12. Rueda L. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia* 2008; 595:477-487.
13. Hernández M, Piña M, Soto-Vivas A, Rangel MA, Liria J. Primer registro de *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) en el Estado Carabobo, Venezuela. *Salus.* 2015; 19:39-41.
14. Nathan S, Kalaivani K, Murugan K. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Trop* 2015; 96:47-55.
15. Su T, Mulla MS. Ovicidal activity of neem products (*Azadirachtin*) against *Culex tarsalis* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Am Mosq Control Assoc* 1998; 14:204-209.
16. Govindarajan M. Evaluation of indigenous plant extracts against the malarial vector, *Anopheles stephensi* (Liston) (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 2011; 109:93-103.
17. Hammer, Ø. y D.A.T. Harper. 2011. PAST: Palaeontological Statistics, versión 3.03. Disponible en: [http:// folk.uio.no/ohammer/past](http://folk.uio.no/ohammer/past). (Acceso 23 de febrero 2020).
18. Finney DJ. *Probit Analysis*; 3rd ed. Cambridge University Press. London 1971; p.38.
19. Ndione R, Faye O, Ndiaye M, Dieye A, Afoutou M. Toxic effects of neem products (*Azadirachta indica* A. Juss) on *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 larvae. *African J Biotech* 2007; 6: 2846-2854.
20. Kudom A, Mensah B, Botchey M. Aqueous Neem extract versus Neem powder on *Culex quinquefasciatus*: Implications for control in anthropogenic habitats. *J Insect Sci* 2011; 11: 1-9.
21. Kumar AN, Murugan K, Madhiyazhagan P, Prabhu K. Spinosad and Neem seed kernel extract as bio-controlling agents for malarial vector, *Anopheles stephensi* and non-biting midge, *Chironomus circumdatus*. *Asian Pac J Trop Med* 2011; 7: 614-618.
22. Maheswaran R, Ignacimuthu S. A novel herbal formulation against dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Parasitol Res* 2012; 110: 1801-1813.
23. Balamurugan C, Kadarkarai M, Pari M, Kalimuthu K, Palanisamy M, Chellasamy P. Neem by-products in the fight against mosquito-borne diseases: Biototoxicity of neem cake fractions towards the rural malaria vector *Anopheles culicifacies* (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; 6:470-476.
24. Alouani A, Rehim N, Soltani N. Larvicidal activity of a neem tree extract (*Azadirachtin*) against mosquito larvae in the Republic of Algeria. *J Bio Sci* 2009;1: 15-22.
25. Howard A, Adongo E, Hassanali A, Omlin F, Wanjoya A, Zhou G, Vulule J. Laboratory Evaluation of the Aqueous Extract of *Azadirachta indica* (Neem) Wood Chippings on *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) Mosquitoes. *J Med Entomol* 2009;46: 107-114.
26. Mitchell MJ, Smit S, Johnson S, Morgan ED. Effects of the Neem tree compounds azadirachtin, alannin, nimbin, and 6-desacetylnimbin on ecdysone 20-monooxygenase activity. *Arch Insect Biochem Physiol* 1997; 35: 199-209.
27. Mondal E, Chakraborty K. *Azadirachta indica* - A Tree with multifaceted applications: An Overview. *J Pharm Sci & Res* 2016; 8:299-306.