

## Actividad garrapaticida de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim)

### Tick control activity of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem)

Dr. Gerardo Alberto Isea Fernández, Dra. Ilsen Emérita Rodríguez Rodríguez, Dr. Alfonso José Hernández Paz

Universidad del Zulia. Zulia, Venezuela.

---

#### RESUMEN

**Introducción:** la infestación por garrapatas constituye en muchos países un grave problema que limita la producción agropecuaria, altera la salud de animales productores de alimento, de animales de compañía y quizá en muchas ocasiones también del ser humano. La planta *Azadirachta indica* A. Juss. es una de las más estudiadas por su amplia actividad biocida, en particular para artrópodos. Por considerarse fuente de acaricidas biodegradables, la actividad garrapaticida de sus extractos obtenidos, sobre todo de hojas y semillas, ha sido investigada de modo insistente; sin embargo, la información potencialmente útil continúa estando dispersa, variable desde el punto de vista metodológico o de su eficacia, y no pocas veces contradictoria.

**Objetivo:** recopilar y analizar la información publicada disponible sobre el efecto garrapaticida de *Azadirachta indica*.

**Métodos:** se realizó una revisión de la literatura sobre la base del motor de búsqueda Google y la base de datos PubMed a partir del año 2000, con el fin de organizar la información disponible sobre la actividad garrapaticida de la planta.

**Resultados:** se logró recopilar y organizar información sobre la actividad garrapaticida de *Azadirachta indica* A. Juss., considerando especialmente parte de la planta empleada, tipo de extracto elaborado, productos disponibles, metodología para su preparación, tipo de ensayo *in vivo* o *in vitro*, dosificación, efectos sobre el parásito y eficacia.

**Conclusiones:** puede considerarse la planta lo suficiente bien estudiada en cuanto a sus efectos garrapaticidas, se requiere probar la incorporación de sus extractos a productos como baños, champús, jabones y otros, así como comprobar la persistencia de sus propiedades y eficacia.

**Palabras clave:** *Azadirachta indica*, nim, garrapata, garrapaticida.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** tick infestation is a serious problem in many countries, for it affects agricultural yield and the health of food-producing animals, pets and on many occasions even human beings. *Azadirachta indica* A. Juss. is one of the most widely studied plants, due to its broad biocide activity, particularly against arthropods. Considered a source of biodegradable acaricides, the tick control activity of the extracts obtained mainly from its leaves and seeds has been widely studied. However, potentially useful information about the subject is still scattered, methodologically variegated, of varying effectiveness and often contradictory.

**Objective:** collect and analyze the available published information about the tick control effect of *Azadirachta indica*.

**Methods:** a bibliographic review was conducted based on Google search engine and PubMed database as of the year 2000, with the purpose of organizing the information available about the tick control activity of the plant.

**Results:** information about the tick control activity of *Azadirachta indica* A. Juss. was gathered and organized according to the plant section used, type of extract obtained, available products, preparation methodology, in vivo or in vitro assay type, dosing, effects on the parasite and effectiveness.

**Conclusions:** the tick control effects of the plant may be considered to be sufficiently studied. Incorporation of its extracts into products such as baths, shampoo, soap and others, require further research. Persistence of its properties and effectiveness should also be verified.

**Key words:** *Azadirachta indica*, neem, tick, tick control.

---

## INTRODUCCIÓN

Las garrapatas pueden deteriorar la salud de los animales por alimentarse de su sangre y dañar su piel, o por ser vectores de microorganismos patógenos. Bajo condiciones ambientales ideales para que proliferen y vivan, su control y erradicación continúa fundamentándose en el uso de insecticidas de síntesis (control químico). Esta práctica se cuestiona por ser contaminante del medioambiente, en no pocas ocasiones pobre eficacia antiparasitaria y, por tanto, en el control de las enfermedades que transmite y porque también puede resultar costosa, lo que la hace poco sostenible. El problema ecológico del mal uso de plaguicidas radica en que, al aumento progresivo de resistencia del ectoparásito, sigue un aumento de la frecuencia en la aplicación del plaguicida, incrementando potencialmente sus residuos en productos como leche y carne.<sup>1-4</sup>

La necesidad de métodos de control de garrapatas más seguros, menos agresivos al hombre y al medio ambiente, ha estimulado la búsqueda de nuevos acaricidas a partir de extractos vegetales, que de forma aislada o en combinación, retrasen el desarrollo de resistencia o reduzcan el problema de los residuos por su característica biodegradable. El desarrollo de plaguicidas "orgánicos" o "biológicos" obtenidos preferiblemente desde recursos autóctonos y que muestren una mejor relación costo-eficacia, es una alternativa a los productos hoy día, utilizados.

Respecto al nim, es necesario establecer un uso adecuado, pues en general, cada vez que las garrapatas sobreviven a la aplicación de un producto químico natural o de síntesis, transmiten la información genética de cómo sobrevivir, a posteriores generaciones.<sup>1,3,4</sup>

El árbol de nim (*Azadirachta indica* A. Juss., familia de las Meliaceas) es probablemente la especie botánica más estudiada en la actualidad, por su alta eficiencia como repelente o plaguicida y bajo efecto residual; los principios activos se encuentran en todas sus partes.<sup>1,4</sup>

La azaridactina (del grupo de los tetraidroterpenoides conocidos como limonoides), es uno de los 2 principios biocidas más estudiados y de mayor concentración en el árbol de nim. La semilla contiene las concentraciones más altas de azaridactina. A partir de los 3-4 años de edad un árbol produce alrededor de 50 kg al año, lo que da una idea de su potencial como fuente de sustancias biocidas. La azaridactina se considera un fitotóxico de amplio espectro, de bajo efecto residual, sin toxicidad para los seres humanos y el medio ambiente.<sup>2,4</sup>

Se han aislado aproximadamente otros 24 principios activos con actividad biológica sobre artrópodos. En las semillas se han identificado además salanina, meliantriol, nimbina, nimocinolida e isonimocinolida, con probable actividad antialimentaria, de inhibición del crecimiento y de la oviposición. La diversidad de principios activos reduce la aparición de resistencia, por ello varios investigadores señalan la necesidad de información precisa sobre los principios químicos contenidos en los extractos de nim, su mecanismo de acción y eficacia en el control de garrapatas.<sup>2-7</sup>

El objetivo de esta revisión era ordenar la información disponible en relación con la utilidad del nim para el control de garrapatas y sus efectos sobre el parásito, así como el procedimiento para obtener el extracto o producto utilizado con intención garrapaticida.

## ENSAYOS CON EXTRACTOS ACUOSOS

Todos los ensayos realizados con extractos acuosos a los que se tuvo acceso se hicieron *in vivo*. En bovinos, un extracto de semilla al 5 % (pv) redujo de manera significativa ( $p < 0,01$ ) el número de garrapatas ingurgitadas (*Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus evertsi*, *Hyalomma truncatum* y *Boophilus decoloratus*), con promedio de 19,75 y 37,5 para el grupo tratado con nim y control (agua), respectivamente. Guerra-Liera y otros en bovinos lecheros, también utilizaron un extracto acuoso de semilla al 5 %, no observando diferencia ( $p < 0,05$ ) respecto del control de alfa-cipremetrina 5 %, aunque el número de garrapatas (genero *Boophilus*) encontradas fue 10,4 % menor con el piretroide. En cabras (2,5 a 4 meses de edad), un extracto de semilla al 10 % también redujo ( $p < 0,01$ ) el número de *Amblyomma hebraeum*, *Hyalomma truncatum* y *Rhipicephalus evertsi*, con promedio entre 20 y 80 para el grupo tratado y entre 142 y 243 para el control de solo agua. De acuerdo con algunos investigadores, la disminución en el número de garrapatas puede deberse a efectos repelentes o garrapaticidas.<sup>1,2,6</sup>

En 2 de estas investigaciones se colectó el fruto maduro. Guerra-Liera y otros no lo especifican. El procesamiento de la semilla para obtener el polvo fue similar: cortadas, secadas al sol y aplastadas en un mortero, pudiendo además tamizar el polvo obtenido; sin embargo, Guerra-Liera y otros controlaron la temperatura y el tiempo de secado (60 °C por 48 h) e incluyeron un tiempo de maceración (24 h) a

temperatura ambiente antes de su empleo. En todos los casos el extracto se aplicó tópicamente como baños o *spray*.

En la tabla 1 se presentan las diluciones y dosificaciones empleadas con extractos acuosos de semillas. Resalta el diferente criterio en la expresión de la dosis y que en ningún caso se menciona el tiempo transcurrido posterior al tratamiento para realizar el conteo de las garrapatas. Varía también la zona escogida para aplicar y probar el tratamiento o no se menciona.

**Tabla 1.** Ensayos de extractos acuosos de semillas de nim contra garrapatas

| Concentración           | Hospedador          | Garrapata  | Dosificación   | Resultado   |
|-------------------------|---------------------|--|--|---|
| 5 %<br>(350 g/7 L)      | Bovino <sup>2</sup> | <i>Boophilus microplus</i>   | Baños  | Disminución (13 %) del número de garrapatas ( $p < 0,05$ ) respecto del control. No hubo diferencia con alfa-cipermetrina 5 % |
| 5 %                     | Bovino <sup>6</sup> | <i>Amblyomma hebraeum</i><br><i>Hyalomma truncatum</i><br><i>Rhipicephalus evertsi</i><br><i>Boophilus decoloratus</i> | 5 g/kg/semana/año.<br>Tópico en región perineal, vientre, esternón, ubre, orejas y escroto | Disminución del número de garrapatas ( $p < 0,01$ )   |
| 10 % g/L<br>(1 kg/10 L) | Cabra <sup>1</sup>  | <i>Amblyomma hebraeum</i><br><i>Hyalomma truncatum</i><br><i>Rhipicephalus evertsi</i>                                 | 10 mL/kg/semana/año<br>Tópico en regiones perineal, ubre, orejas y esternón                | Disminución del número de garrapatas ( $p < 0,01$ )   |

Los extractos acuosos de hojas aplicados *in vivo*, eficaces en el control de garrapatas consultados para esta revisión, fueron de concentración igual o superior al 15 %. Así, *Ramzam* y otros disolvieron en 3 a 4 L de agua una cantidad del polvo obtenido que permitiese la administración tópica de una dosis de 40 g/100 kg peso vivo (pv), previa maceración de 48 h, comparándolo con ivermectina y doramectina (0,2 mg/kg pv, vía subcutánea) frente a *Boophilus microplus*, *Boophilus annulatus* y *Hyalomma aegyptum*. El extracto presentó eficacia 0 calculada a los días 7 y 14.<sup>8</sup>

Debe señalarse que la dosis y la concentración empleada en este ensayo fue muy baja: 0,4 g/kg pv y 1,3 %, respectivamente. Además, el cálculo de la eficacia se realizó como la expresión en porcentaje de animales curados respecto de animales tratados y no sobre la base del número de garrapatas.

En contraste con el ensayo anterior, la aplicación única en *spray* de un preparado acuoso al 15 % de hojas, a becerros entre 5 y 6 meses de edad, mostró 68 % de eficacia. El control positivo (ivermectina subcutánea, 200 µg/kg) alcanzó 100 % de eficacia. Se contó el número de garrapatas en la región lumbar (30 cm<sup>2</sup>) a los días 7, 14, 21 y 28, tras tratamiento. En los ensayos con extractos acuosos de hojas mencionados, el material vegetal fue secado al sol y luego hecho polvo. En el primero además se almacenó 48 h antes de aplicarlo; en el segundo se agitó

durante 2 h en agua destilada, dejándose a 40 °C durante una noche, para finalmente utilizar el sobrenadante.<sup>8,9</sup>

La investigación realizada por *Denardi* y otros tuvo como objetivo valorar los cambios morfológicos en oocitos (óvulos inmaduros) de *Rhipicephalus sanguineus*, tras la exposición de hembras ingurgitadas a extractos acuosos de hojas secas de nim al 10 y 20 %. Para elaborar el extracto colocaron 150 g de hojas secas cortadas en 1 L de agua durante 24 h, filtraron a través de algodón y papel filtro, con lo cual elaboraron las soluciones utilizadas. El ensayo estuvo dividido en 2 partes: uno *in vitro* y otro *in vivo*. Para el primero colocaron 20 garrapatas en prueba de inmersión durante 5 min, a 28 °C y 80 % de humedad relativa. Luego (ensayo *in vivo*) las garrapatas (20 hembras y 10 machos) se colocaron en conejos por un período de 12 días, para finalmente estudiar desde el punto de vista histológico los ovarios de las garrapatas expuestas a la planta. Emplearon un control de agua destilada. Observaron cambios histológicos tanto en los ovarios como en los oocitos; algunos, como la vocalización del citoplasma se observaron solo con el tratamiento al 20 %.<sup>10</sup>

Sin embargo, *Valente, Barranco y Sellaive Villaroel* utilizaron hojas frescas, para preparar un extracto acuoso al 20 %. Colocaron a temperatura ambiente por 12 h, 1 kg de hojas frescas trituradas en 5 L de agua, filtrando y envasando en frascos ámbar. Bovinos infestados con *Boophilus microplus* fueron bañados semanalmente (2 L cada vez) durante un mes. Se comparó amabectina colocada en el dorso una sola vez al inicio del ensayo. Realizaron 3 colectas en 1 mes a los días 0, 15 y 30. No se encontró diferencia ( $p < 0,0001$ ) entre los tratamientos.<sup>7</sup>

**Tabla 2.** Ensayos de extractos acuosos de hojas de nim contra garrapatas

| Concentración                           | Hospedador  | Garrapata  | Dosificación  | Resultado  |
|---|---|--|---|--|
| 1,3 %<br>Hojas secas                    | Bovino <sup>8</sup>   | <i>Boophilus microplus</i><br><i>Boophilus annulatus</i><br><i>Hyalomma aegyptum</i> | Aplicación tópica.<br>40 g/100 kg pv/semana<br>durante 1 año                                | Cero eficacia  |
| 15 %<br>Hojas secas<br>15 g/100 mL      | Becerros <sup>9</sup>   | No especificado  | 5 g/100 mL/30 cm <sup>2</sup><br>En zona lumbar. Una<br>aplicación<br>semanal durante 1 mes | Disminución del<br>número de<br>garrapatas. 68 % de<br>eficacia                                  |
| 20 %<br>Hojas frescas<br>(1 kg/5 L)     | Bovinos <sup>7</sup>  | <i>Boophilus microplus</i>   | 2 L/aplicación/semana/animal<br>durante 1 mes   | Disminución del<br>número de<br>garrapatas. No fue<br>diferente de<br>ivermectina ( $p < 0,01$ ) |
| 20 y 40 %<br>Hojas secas                | Pollos <sup>11</sup>  | <i>Argas persicus</i>  | Aplicado como <i>spray</i> .<br>No establece dosis  | Disminución del<br>número de<br>garrapatas. Eficacia<br>25 a 52 %                                |
| 10 y 20 %<br>Hojas secas<br>(150 g/1 L) | <i>In vitro</i><br>Infestación<br>de<br>conejos <sup>10</sup> | <i>Rhipicephalus sanguineus</i>  | Prueba de inmersión.<br>5 min. Luego de secadas<br>se colocaron 12 días sobre<br>conejos    | Alteraciones<br>morfológicas de<br>ovarios y oocitos del<br>parásito                             |

El nim también ha sido utilizado en pollos para controlar las garrapatas. Khan y otros ensayaron en pollos, extractos acuosos de hojas al 20 y 40 % aplicados como *spray*. Se comparó con cipermetrina (1 mL/L de agua, como *spray*), ivermectina (100 fg/kg pv, vía oral) y triclorfón (0,15 %, como *spray*). Las garrapatas se contaron antes y después del tratamiento diario a los días 1, 7, 14, 21 y 28. Desde los días 1 hasta el 28 el mejor tratamiento fue la cipermetrina con una eficacia de 35 a 87 %, respectivamente. Le siguieron ivermectina (2-83 %), *Azadirachta indica* al 40 % (42-52 %), *Azadirachta indica* 20 % (25-35 %) y triclorfón (29-43 %, hasta el día 14).<sup>11</sup> En la tabla 2 se presentan las diluciones y dosificaciones empleadas con extractos acuosos de hojas. Resalta que en algunos de estos estudios no se emplea una dosis por kilogramo de peso vivo, lo que podría sugerir que la concentración del tratamiento es más importante para la acción garrapaticida.

## ENSAYOS CON ACEITE DE NIM

Las investigaciones con extractos de aceite de nim pueden considerarse más exhaustivas, siendo realizadas gran parte de ellas *in vitro*. La semilla es la parte vegetal empleada para obtenerlo y siempre fueron realizados *in vitro*. Forti y otros emplearon 2 productos comerciales emulsionables sobre la base de aceite de semilla de nim, en diluciones al 2 % en agua destilada. Hembras ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* fueron sumergidas (25 garrapatas/100 mL) 5 min a temperatura ambiente, registrando datos de mortalidad, tiempo de muerte, peso de huevos, eclosión y eficacia del tratamiento. La eficacia de los productos fue diferente: 65,6 y 17,6 % para los productos I y II respectivamente ( $p < 0,05$ ). El segundo no fue diferente del control. También resultaron diferentes en mortalidad (96 y 48 %) y número de oviposiciones (12, 20 y 21). Ninguno disminuyó las eclosiones, aunque el primero sí el peso de la masa de huevos.<sup>4</sup>

La diferencia entre los productos puede deberse al contenido de principios activos, lo que llevaría a pensar en la necesidad de un mayor control en la calidad de la materia prima para su elaboración, pero también en el procedimiento para esta. Además, la baja dilución empleada sugiere que la concentración de principios activos en el aceite puede ser mayor a las encontradas en extractos acuosos de hojas secas, al comparar los resultados del trabajo anterior con los de Ramzan y otros (1,3 % de hojas secas).<sup>8</sup>

Los ensayos sobre larvas sugieren un efecto directo de los principios activos presentes en el aceite a concentraciones de al menos 10 %. Handule y otros obtuvieron el aceite por compresión de semillas secas cortadas, preparando diluciones en agua destilada al 10, 20, 30 y 40 %. Probaron su eficacia frente a larvas de *Rhipicephalus pulchellus* de 1 mes de edad en prueba de inmersión: 0,5 mL/15 larvas a  $24 \pm 2$  °C y  $70 \pm 5$  % de humedad relativa. Registraron mortalidad a 30 min y 1, 2, 3 y 24 h. El menor TL<sub>50</sub> (tiempo de letalidad) fue para la concentración 40 %, que tuvo también la mayor pendiente, encontrándose una relación dosis-respuesta ( $p < 0,01$ ). En el aceite se cuantificaron azaridactina A (0,119 %) y B (0,034 %).<sup>3</sup> La mayor pendiente indica que pequeñas variaciones en el tiempo de exposición se manifestarían en mayor número de larvas muertas. No se registró porcentaje de mortalidad.

Choudry, ensayó el aceite de semillas sobre larvas de *Boophilus decoloratus* de 2 semanas de edad. Las semillas se colectaron de plantas silvestres y luego se despulparon, lavaron y secaron bajo el sol, se trituraron y pasaron por licuadora. Se hirvieron en agua durante 1 h, tiempo en el que se observó el aceite flotando en

la superficie. Las 2 fases se separaron mediante un embudo, y la fase oleosa se secó con sulfato de sodio. Las larvas (incubadas a 29 °C y 80 % de humedad relativa) fueron colocadas sobre papel de filtro impregnado de diferentes diluciones del aceite obtenido: 100, 80, 60, 40 y 20 %, equivalentes a colocar 1 mL, 0,8 mL, 0,6 mL, 0,4 mL, 0,2 mL y un control de agua destilada (para 154, 110, 103, 96, 76 y 160 larvas, respectivamente). A las 3 h la mortalidad resultó de 97, 11, 10, 10 y 8 % para las concentraciones 100, 80, 60, 40 y 20 %, respectivamente, y a las 24 h de 100, 83, 43, 63 y 75 %. En el control la mortalidad se reportó de cero. También hubo relación dosis-respuesta.<sup>12</sup> La forma de obtención del aceite en la investigación anterior puede sugerir que los principios activos presentes son resistentes a temperaturas cercanas a los 100 °C.

La investigación de *Landau* y otros se realizó en hembras ingurgitadas y larvas de *Dermacentos variabilis*, en corderos, utilizando además 2 vías de administración para un producto comercial (Neem Azal<sup>®</sup>) con 43 % de azaridactina. La infestación se hizo de modo artificial con garrapatas adultas. Suministraron durante 14 días dietas con 0 (control), 0,3 y 0,6 % del principio activo sobre materia seca. Otro grupo se roció con una emulsión (0,6 %, 2,6/L/animal) al cuarto día de iniciado el primer ensayo. Las garrapatas se colectaron (días 7 y 14) mediante bolsas en zonas previamente esquiladas (20 cm<sup>2</sup> entre orejas y parte superior de la cabeza y alrededor de la lumbar 5). Las garrapatas pesaron menos solo en el grupo tratado con 0,6 % de azaridactina en la dieta ( $p < 0,04$ ). Los autores consideraron que por razones metodológicas el número de parásitos muertos no debía ser atribuido solo al efecto del tratamiento.<sup>5</sup>

La comparación de las investigaciones de *Handule* y otros, que emplearon un aceite con 0,153 % de azaridactina (A+B), con los de *Landau* y otros que emplearon un producto con 43 % de azaridactina aplicándolo en dilución al 0,6 % tópicamente,<sup>3,5</sup> puede sugerir que la azaridactina no es el componente fundamental responsable de la acción garrapaticida del nim, y que quizá esta sea consecuencia de la acción sinérgica de varios principios activos.

En este sentido, resulta interesante el trabajo *in vitro* realizado por *Giglioti* y otros. De aceites obtenidos por compresión con concentraciones conocidas de azaridactina (2 000; 5 000; 9 000 y 10 000 ppm), prepararon además diluciones al 1,25; 2,5; 5; 10 y 12,8 %. En hembras ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* midieron eficacia de los tratamientos (sobre la base de la reproducción estimada) y observaron efectos sobre la oviposición y la eclosión, tras pruebas de inmersión de 5 min (27 °C, 90 % humedad relativa). Al día 15 los huevos fueron pesados y luego las larvas contadas. Incubadas a 40 °C. El enriquecimiento con azaridactina se hizo con un extracto etanólico concentrado medido por cromatografía líquida.<sup>13</sup>

Los investigadores *Giglioti* y otros observaron que la eficacia aumento y la oviposición y la eclosión disminuyeron, y en la medida en que se incrementó el porcentaje de aceite y la cantidad de azaridactina ( $p > 0,05$ ); sin embargo, los resultados fueron muy variables. Así, el aceite a la dilución 1,25 % resultó más efectivo (17,33 %) con 5 000 ppm de azaridactina, mientras que con 10 000 ppm la eficacia fue menor (7,67 %). Los investigadores consideraron que otros limonoides podrían determinar la acción biocida del aceite y que quizá la adición de azaridactina disminuyó proporcionalmente su cantidad. La eficacia, considerando la reproducción estimada en grupos tratados y control, fue para la dilución 12,80 % de 67,67 % (2 000 ppm); 88,33 % (5 000 ppm); 86 % (9 000 ppm) y 93,33 % (10 000 ppm).<sup>13</sup> De acuerdo con *Ndumu* y otros, *Abdel-Shafy* y *Zayed*, así como *Schmahl* y otros, los principales factores que determinan la eficacia son el tiempo de exposición, la concentración de aceite, la dosis y susceptibilidad de la especie de garrapata.<sup>14,15</sup>

Otro producto comercial (MiteStop®) obtenido de la semilla fue probado por Schmahl y otros frente a estados adultos de *Rhipicephalus sanguineus* e *Ixodes ricinus*, en diluciones acuosas de 1:40 y 1:66, que se administraron de 2 formas: a) rociadas sobre un papel de filtro seco hasta humedecerlas y b) colocadas sobre un papel de filtro impregnado con el tratamiento. En 48 h se registró la aparición sucesiva de inmovilidad, patas rígidas, posición supina y muerte. Cuando fueron rociadas (1:40) tanto *Ixodes ricinus* como *Rhipicephalus sanguineus* mostraron inmovilidad a 1 y 2 h, respectivamente, y en ambos a las 5 h la mortalidad resultó 100 %. Colocadas sobre el papel de filtro impregnado los resultados fueron similares. Sin embargo, con la dilución 1:66, en *I. ricinus* la muerte fue más rápida (5 h) cuando se rociaron, que cuando se colocaron sobre el papel impregnado (24 h). En *R. sanguineus* la muerte ocurrió a las 24 h en el primer caso, permaneciendo 2/4 vivas en el segundo. Esto sugiere variaciones producto de la forma de administración del tratamiento.<sup>14</sup> En la tabla 3 se presentan resultados de ensayos realizados con aceite o productos comerciales de aceite de nim.

**Tabla 3.** Ensayos con aceite o productos comerciales de aceite de nim contra garrapatas

| Concentración                       | Hospedador                             | Garrapata   | Dosificación  | Resultado   |
|-------------------------------------|--|---|---|---|
| 2 %<br>Dos productos<br>comerciales | <i>In vitro</i> <sup>4</sup>           | <i>Boophilus<br/>microplus</i>                                      | Prueba<br>de inmersión.<br>25 garrapatas/<br>100 mL/5 min                         | Incremento de<br>mortalidad y<br>eficacia y<br>disminución de<br>oviposiciones,<br>peso de<br>huevos y<br>eclosiones de<br>un producto<br>(p< 0,05) |
| 10, 20, 30 y 40 %                   | <i>In vitro</i> <sup>3</sup>           | <i>Rhipicephalus<br/>pulchellus</i><br>(larvas de 1<br>mes de edad) | Aplicación tópica.<br>0,5 mL/15 larvas  | Incremento de<br>mortalidad<br>dependiente de<br>la dosis<br>(p< 0,01)  |
| 20, 40, 60, 80 y<br>100 %           | <i>In vitro</i> <sup>12</sup>          | <i>Boophilus<br/>decoloratus</i><br>(larvas)                        | Colocadas sobre<br>papel filtro<br>impregnado con<br>0,2; 0,4; 0,6; 0,8<br>y 1 mL | Incremento de<br>la mortalidad<br>(de 8 hasta<br>100 %) entre 3<br>y 24 h   |
| 0,3 y 0,6 %<br>(azaridactina)       | <i>In vitro</i><br>Ovejos <sup>5</sup> | <i>Dermacentor<br/>variabilis</i>                                   | 0,6 % tópica<br>0,3 y 0,6 % como<br>aditivo alimentario                           | Solo el<br>tratamiento<br>0,6 % como<br>aditivo<br>alimentario<br>disminuyó el<br>peso de las<br>garrapatas. No<br>se observó<br>mortalidad         |



|  |                               |   |  |   |
|--|-------------------------------|---|--|---|
| Semillas.<br>Aceite con concentraciones de azaridactina de 2, 5, 9 y 10 mil ppm, y diluciones de 1,25; 2,5; 5; 10 y 12,8 % | <i>In vitro</i> <sup>13</sup> | <i>Rhipicephalus microplus</i> <sup>6</sup>                   | Prueba de inmersión. 10 garrapatas/cápsula de Petri. No se especifica cantidad de mL     | Mortalidad variable pero con relación dosis-respuesta   |
| Producto comercial oleoso MiteStop®. Diluciones 1:40; 1:66   | <i>In vitro</i> <sup>14</sup> | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .<br><i>Ixodes ricinus</i> .  | Garrapatas colocadas sobre papel de filtro humedecido o aplicación mediante <i>spray</i> | Mortalidad 100 % a las 5 h. <i>Ixodes ricinus</i> a las 6 h aplicado con papel de filtro humedecido |
| Producto comercial oleoso Neem Azal®. Diluciones 1,6; 3,2; 6,4 y 12,8.   | <i>In vitro</i> <sup>15</sup> | Adulto, huevos, larvas y ninfas de <i>Hyalomma anatolicum</i> | Aplicación como gotas  | Aumento de eclosiones con muerte de larvas prematuras   |
| Producto comercial oleoso 70 % aceite. 0,1 % azaridactina  | <i>In vivo</i> <sup>18</sup>  | Ninfas de <i>Ixodes ricinus</i>                               | 3 mL sobre mantas de 1 m <sup>2</sup> que se colocaban sobre el suelo                    | Disminución (p< 0,0001) respecto del control  |

*Abdel-Shafy* y *Zayed* ensayaron otro producto comercial (Neem Azal F®) en diluciones con agua destilada (1,6; 3,2; 6,4 y 12,8 %), aplicándose por inmersión (1 min) sobre huevos embrionados, larvas, ninfas y adultos de *Hyalomma anatolicum excavatum*. Al grupo control se aplicó agua destilada. El efecto sobre huevos embrionados fue claro al día 7 (aunque se observó a partir del día 1) en comparación con el control, en el cual las eclosiones alcanzaron 30, 31, 51 y 54 % para las diluciones 1,6; 3,2; 6,4 y 12,8 respectivamente, y para el control fue de 30 %. Las larvas eclosionadas mostraron desarrollo incompleto y murieron en pocos días (83 y 87 % a las diluciones; 1,6 y 3,2, respectivamente). Cuando los tratamientos se aplicaron sobre larvas (no alimentadas), la mortalidad fue de 100 % al tercer día y 64 % en el control, pero ya en el día 1 fue de 72, 74, 78 y 97 %, y solo 9 % en el control. No hubo un efecto significativo sobre el estadio de ninfa y la muda, aunque se observaron malformaciones en el 4 %. En el adulto la diferencia se observó a partir del primer día: 30, 42, 68 y 68 % y 0 % en el control. Al día 7 la mortalidad osciló entre 72 y 88 % en los tratamientos con nim y 10 % en el control, y al día 15 entre 92 y 100 % en tratamientos con nim y 12 % en el control<sup>15</sup>. Este ensayo, al observar que el número de eclosiones disminuye, plantea una contradicción con otras investigaciones, en que las eclosiones ocurren en menor tiempo y con nacimiento de larvas inviables.<sup>13,16,17</sup>

Los investigadores *Garboni* y *Jaenson* evaluaron la acción repelente sobre ninfas de *Ixodes ricinus*, de un producto que contenía 70 % de aceite con 1 g/L (0,1 %) de azaridactina. El tratamiento fue aplicado (3 mL/9 mL de agua, equivalente a 3 g/m<sup>2</sup>) sobre mantas blancas de 1 m<sup>2</sup> que se colocaban sobre el suelo y encima una persona. Cada evaluación duró 1 día y se repitió 40 veces. El número de ninfas de

*Ixodes ricinus*, fue significativamente menor ( $p < 0,0001$ ) en el tratamiento respecto del control.<sup>18</sup>

## ENSAYOS DE EXTRACTOS CON SOLVENTES ORGÁNICOS

En el experimento de Forti y otros, cuya metodología ya se comentó, se probaron también extractos hexánico y etanólico al 2 %, obtenidos a partir de semillas. El hexánico produjo 96 % de mortalidad al día 21 y redujo alrededor de la mitad respecto del control el número de oviposiciones, peso de la masa de huevos y porcentaje de eclosiones (11, 0,20 g y 40 %, respectivamente). La eficacia del tratamiento (73,2 %) fue la más alta del ensayo. El etanólico produjo una mortalidad de 32 %, no diferenciándose del control ( $p < 0,05$ ). Tampoco fue diferente del control respecto del número de oviposiciones (21,20), peso de la masa de huevos (0,43 g), porcentaje de eclosiones (100 %) y eficacia del tratamiento (17 %).<sup>13</sup>

También Forti y otros, en un experimento compararon extractos etanólicos de hojas de *A. indica* y *C. citratus*, semillas de la *A. muricata*, flores de *S. malaccensis*, y un extracto hexánico de semillas de *A. indica*, frente a hembras ingurgitadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* bajo pruebas de inmersión de 5 min. Las hojas se secaron en estufa con recirculación (40-45 °C) para convertirla en polvo, que se colocó en alcohol etílico hidratado por 48 h (27 °C). El solvente se extrajo en evaporador rotativo a vacío a 45 °C. El residuo se retomó con dimetilsulfóxido 1 % y agua destilada y esterilizada, hasta obtener en preparado al 1 %. Se evaluó mortalidad, tiempo letal, número de oviposiciones, peso de los huevos, porcentaje de eclosiones y eficacia del tratamiento. Similar procedimiento se realizó con las semillas pero empleando hexano como solvente.<sup>16,17</sup>

Los extractos de *A. indica* produjeron una mortalidad de 65 %, iguales a *S. malaccensis*, superiores a *C. citratus*, pero inferiores a *A. muricata* (100 %). En cuanto a número de oviposiciones, peso de huevos y porcentaje de eclosiones, el extracto de hojas de *A. indica* se comportó igual al control, pero el extracto de semillas produjo menor peso de huevos. Para esta variable el extracto de hojas fue el menos eficaz, mientras que el hexánico se comportó igual al resto de tratamientos. En el tiempo de letalidad, medido a los 3, 6, 10, 13, 17 y 21 días, para hojas y semillas de *Azadirachta indica* fue de 5 % al día 10, alcanzando 65 % al día 21. *A. muricata* y *S. malaccensis* mostraron 60 y 30 % de mortalidad respectivamente, al tercer día.<sup>16,17</sup> En la tabla 4 se presentan los resultados de ensayos de extractos obtenidos con solventes orgánicos.

Costa y otros valoraron la eficiencia de nim y citronela al 20 % y eucalipto al 10 % en hembras ingurgitadas colectadas manualmente de bovinos infestados con *Boophilus microplus*. Utilizando hojas prepararon extractos hidroalcohólicos deshidratados. Las secaron primero a la sombra y luego en estufa a 60 °C, haciéndolas polvo. Colocaron 20 g en 80 mL para los 2 primeros extractos y 10 g en 90 mL para el tercero, dejando en infusión durante 72 h para luego filtrar.<sup>19</sup>

**Tabla 4.** Ensayos de extractos de nim utilizando solventes orgánicos

| Concentración  | Hospedador  | Garrapata                                  | Dosificación                                       | Resultado  |
|--|---|--|--|--|
| Extractos hexánico (semillas) y etanólico (hojas) al 2 %                               | <i>In vitro</i> <sup>13</sup>   | <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> | Prueba de inmersión. 25 garrapatas/ /100 mL        | Mortalidad de garrapatas adultas 96 % con extracto hexánico y 32 % con etanólico (p< 0,05)   |
| Extracto hexánico (semillas) y alcohol etílico hidratado (hojas) al 1 %                | <i>In vitro</i> <sup>16,17</sup>  | <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> | Prueba de inmersión (5 min). 20 garrapatas /100 mL | Mortalidad de garrapatas adultas 65 %  |
| Hojas secas. Extracto hidroalcohólico al 20 %  | <i>In vitro</i> <sup>19</sup>   | <i>Boophilus microplus</i>                 | Prueba de inmersión (2 min). 10 garrapatas /10 mL  | Eficacia de 32 % sobre la base del número de eclosiones  |
| Hojas, semillas y corteza. Extracto etanólico. Diluciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 % | Realizados ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en becerros <sup>20</sup> | <i>Boophilus microplus</i>                 | Prueba de inmersión. 1 min. Aplicado como baños    | A la concentración 8 % la mortalidad fue 70 % (p< 0,05) y disminuyó la masa de huevos (p< 0,001), ensayo <i>in vitro</i> . En ensayo <i>in vivo</i> la mortalidad fue de 70 % a los 3 días |

El ensayo se realizó *in vitro* en grupos duplicados de 10 unidades experimentales, sometidas a pruebas de inmersión de 2 min en 10 mL. Hubo controles positivos (cipermetrina+clorpirifos+citronela y deltametrina) y negativos. Los huevos se tomaron a los 10 días de iniciada la postura y luego del período de incubación se midió el porcentaje de eclosión. El extracto de eucalipto, siguiendo el método de Drummond presentó una eficacia de 96 %; el nim y la citronela de 32 y 17, respectivamente, considerándose ineficaces. El Ministerio de Agricultura de Brasil, en sus normas para la producción, control y utilización de productos antiparasitarios, considera un valor mínimo de 95 % de eficacia para un extracto de plantas. Todos los tratamientos fueron diferentes (p< 0,0001) del control negativo en cuanto al porcentaje de eclosión.<sup>19</sup>

*Srivastava* y otros utilizaron hojas, semillas y corteza de nim en el control de *Boophilus microplus*; se compararon semillas y hojas de melocotón (*Prunus persica*), corteza de mango (*Mangifera indica*), hojas de guayaba (*Psidium guajava*) y rizoma de cúrcuma (*Curcuma longa*). De cada planta y parte se tomaron 100 g que fueron sometidos a extracción en columna con etanol (250 mL) a 80 °C, que luego se extrajo en evaporador rotativo a vacío a 40 °C. El extracto semiseco fue pesado para preparar diluciones (1 a 8 %) en agua destilada. Tras prueba de inmersión (1 min) de garrapatas ingurgitadas se midió la mortalidad (pérdida de motilidad y pedaleo con exposición a luz) a las 1, 2, 3, 4, 5 y 24 h posteriores al tratamiento; también se midieron efectos sobre la oviposición. Tras el ensayo *in vitro*, también realizaron un ensayo *in vivo* en becerros, a los que infestaron con larvas de entre 5-7 días de edad; tras 20 días grupos de 5 becerros fueron bañados con agua, cipermetrina (0,05 %) y extracto de semilla (8 %), midiendo porcentaje

de mortalidad, masa de huevos producida, peso de garrapatas adultas y eficacia del extracto.<sup>20</sup>

En el ensayo *in vitro*, el extracto de semilla de nim mostró la mayor efectividad (80 %), seguido de la semilla de *P. persica* (70 %) y hojas de *A. indica* (30 %), y la raíz de *C. longa* (10 %). El resto de extractos no mostró efectividad. La mortalidad con la semilla de nim fue de 70 % (24 h), mientras que la CL<sub>50</sub> fue de 5,12 %; las concentraciones al 7 y 8 % no fueron diferentes ( $p < 0,05$ ), y al 8 % disminuyó la masa de huevos producidos ( $p < 0,001$ ) en comparación con el control de agua destilada, aunque el resto de diluciones también lo hicieron ( $p < 0,05$ ).<sup>20</sup>

En el ensayo *in vivo*, la caída de las garrapatas ocurrió a los 3 días en los animales tratados con cipermetrina, mientras que con la semilla de nim ocurrió a los 5 días posteriores al tratamiento. La mortalidad fue de 92,4 % a los 3 días y 70,5 % a los 5 días, respectivamente. Estos tratamientos no fueron diferentes ( $p < 0,01$ ) respecto de índices reproductivos, pero ambos lo fueron del grupo control. El peso de las garrapatas adultas también resultó menor de manera significativa, en comparación al grupo control (38 % con cipermetrina, 28 % con semilla de nim 8 %). La masa de huevos fue de 60,2 mg para el control, 19,5 mg cipermetrina y 26,7 mg nim 8 %. La eficacia de los 2 tratamientos fue de 80,48 y 68,32 %, respectivamente.<sup>20</sup> Resulta interesante en la investigación de *Srivastava* y otros la similitud en los porcentajes de mortalidad observada en los ensayos *in vivo* e *in vitro*.

## CONCLUSIONES

Se puede concluir que las hojas o semillas de *Azadirachta indica* A. Juss, pueden ser utilizadas con potencial éxito en el control de garrapatas en diferentes especies animales. Los ensayos *in vitro* parecen ser predictivos de lo esperado en ensayos *in vivo*.

Los extractos acuosos de hojas o semillas de nim, de solventes orgánicos o el aceite de semilla, parecen tener efectos tóxicos dosis-dependientes, letales y directos, sobre garrapatas adultas, ninfas, larvas y huevos; pero también efectos sobre el ciclo reproductivo, como disminución de la masa de huevos y modificación del número y tiempo de eclosiones. No está claro si el tiempo de eclosión se acorta o se incrementa, y tampoco los efectos de la planta sobre la muda y la alimentación del parásito.

Cuando se emplean semillas para obtener extractos acuosos, concentraciones de 5 a 10 % pv han sido eficaces, mientras que con hojas requieren ser probablemente de al menos 15 % pv, para obtener un efecto tóxico letal directo sobre el parásito adulto. Con concentraciones inferiores podrían conseguirse efectos tóxicos sobre su reproducción.

Los extractos con el aceite de la semilla, o extractos de solventes orgánicos de hojas o semillas, parecen tener similar eficacia a concentraciones inferiores al 5 % y los extractos acuosos de hojas frescas o secas han mostrado efectos garrapaticidas. Preparados de hojas o semillas para administración con el alimento, podrían ser útiles en el control de garrapatas en especies animales.

Productos comerciales sobre la base de aceite de la semilla, han mostrado eficacia diferente, quizá por variaciones en el contenido total de principios activos del material vegetal o de su adecuada proporción, requerida para un efecto tóxico sinérgico. Esto puede explicar también las diferencias observadas con otros extractos. Se requiere una estandarización de la materia prima que implique no solo la medición de la concentración de azadiractina.

Se presentan dificultades metodológicas, por ejemplo en el conteo de garrapatas en ensayos *in vivo*, o en la forma de exposición al tratamiento en ensayos *in vitro*, que restan confiabilidad a los resultados de las investigaciones. Igual, diferencias metodológicas impiden muchas veces la comparación de resultados. Se requiere de una estandarización metodológica para evaluar el efecto de extractos vegetales frente a garrapatas y comparar resultados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schwalbach LMJ, Greyling JPC, David M. The efficacy of a 10 % aqueous Neem (*Azadirachta indica*) seed extract for tick control in Small East African and Toggenburg female goat kids in Tanzania. South African J Animal Science. 2003;33(2):83-8.
2. Guerra JE, Corrales JL, Soto LE, Moreno J, Rodríguez J, Gastelúm MA, et al. Dairy cattle tick (*Boophilus microplus*) control with *Azadirachta indica* A. Juss. ISHA. 2005;1:248-51.
3. Handule IM, Ketavan Ch, Gebre S. Toxic effect of Ethiopian neem oil on larvae of cattle tick, *Rhipicephalus pulchellus* Gerstaecker. Kasetsart J. 2002;36:18-22.
4. Forti SM, da Silva N, Neves EC, Alves L, Peixoto DO, dos Santos JM. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) Acari: Ixodidae em laboratório. Rev Brasileira Parasitol Vet. 2010;19(1):44-8.
5. Landau SY, Provenza FD, Gardner DR, Pfister JA, Knoppel EL, Peterson C, et al. Neem-tree (*Azadirachta indica* Juss) extract as a feed additive against the American dog tick (*Dermacentor variabilis*) in sheep (*Ovis aries*). Veterinary Parasitol. 2009;165:311-7.
6. Webb EC, David M. The efficacy of neem seed extract (*Azadirachta indica*) to control tick infestation in Tswana, Simmentaler and Brahman cattle. South African J Animal Science. 2002;32(1):1-6.
7. Valente M, Barranco A, Sellaive-Villarroel AB. Eficacia do extrato aquoso de *Azadirachta indica* no controle de *Boophilus microplus* em bovino. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia. 2007;59(5):1341-3.
8. Ramzan M, Khan MS, Avais M, Khan JA, Pervez K, Shahzad W. Prevalence of ectoparasites and comparative efficacy of different drugs against tick infestation in cattle. J Animal Plant Science. 2008;18(1):17-9.
9. Rahman MM, Mostofa M, Jahan MS, Kamal MAHM. Comparative efficacy of Neem leaves and Ivermectin (Ivomec®) against ectoparasites in calves. J Bangladesh Agricultural University. 2009;7(1):73-8.
10. Denardi SE, Bechara GH, de Oliveira PR, Camargo-Mathias MI. *Azadirachta indica* A. Juss (neem) induced morphological changes on oocytes of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) tick females. Experimental Parasitology. 2010;126:462-70.
11. Khan LA, Khan MN, Iqbal Z, Qudoos A. Comparative acaricidal efficacy of cypermethrin, ivermectin, trichlorophon and *Azadirachta indica* (neem) in layers naturally infested with *Argas persicus*. Pakistan J Agricultural Sciences. 2001;38:3-4.

12. Choudhury MK. Toxicity of neem seed oil against the larvae of *Boophilus decoloratus*, a one-host tick in cattle. Indian J Pharmaceutical Sciences. 2009;71(5):562-3.
13. Giglioti R, Forim MR, Oliveira HN, Chagas ACS, Ferrezini J, Brito LG, et al. *In vitro* acaricidal activity of NET (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Parasitology. 2011;181:309-15.
14. Schmahl G, Al-Rasheid K, Abdel-Ghaffar F, Klimpel S, Mehlhoru H. The efficacy of neem seed extracts (Tre-san<sup>®</sup>, MiteStop<sup>®</sup>) on a broad spectrum of pests and parasites. Parasitology Research. 2010;107:261-9.
15. Abdel-Shafy S, Zayed AA. *In vitro* acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). Veterinary Parasitology. 2002;106:89-96.
16. Forti SM, Neves EC, Alves L, da Silva N, Giron K, Prédés RC. Control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) con extractos vegetales. Rev Colombiana Entomología. 2009;35(2):145-9.
17. Forti SM, Neves EC, Alves L, da Silva N, Nascimento AM. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratorio. Rev Brasileira Parasitol Vet. 2009;18(4):44-8.
18. Garboni SS, Jaenson TG, Pålsson K. Repellency of MyggA<sup>®</sup> Natural spray (*para*-menthane-3,8-diol) and RB86 (neem oil) against the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the field in east-central Sweden. Experimental Applied Acarology. 2006;40:271-7.
19. Costa FB, Vasconcelos PS, Silva AM, Brandão VM, da Silva IA, Teixeira WC, et al. Eficacia de fitoterápicos em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus*, provenientes da mesorregião, Brasil. Rev Brasileira Parasitol Vet. 2008;17(Supl. 1):83-6.
20. Srivastava R, Ghosh S, Mandal DB, Azhahianambi P, Singhal PS, Pandey NN, et al. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. Parasitology Research. 2008;104:149-53.

Recibido: 21 de octubre de 2012.

Aprobado: 13 de noviembre de 2012.

Gerardo Alberto Isea Fernández. Facultad de Ciencias Veterinarias. Departamento de Biología Bnimal. Cátedra de Farmacología y Toxicología. Universidad del Zulia. Urbanización Piedras del Sol. Condominio 3. Casa 85. Zulia, Venezuela. Correo electrónico: [gaisea3@gmail.com](mailto:gaisea3@gmail.com)