

Evaluación preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*), como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida)¹

Preliminary evaluation of Neem (*Azadirachta indica*) extracts as alternative for cattle tick *Boophilus microplus* control

EFRAÍN BENAVIDES O., GUSTAVO HERNÁNDEZ M., ALVARO ROMERO N.,
HERNANDO CASTRO A., JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ B. ²

Revista Colombiana de Entomología 27(1-2): 1-8 (2001)

Resumen. Los extractos vegetales son una posible alternativa para reducir la dependencia en los plaguicidas para el control de garrapatas. El árbol del Neem (*Azadirachta indica*) es reconocido por sus propiedades insecticidas. Se evaluó en campo y laboratorio, de modo preliminar, el uso de extractos de semilla del árbol, como herramienta de control. Mediante la Prueba de Inmersión de Adultos de garrapatas se verificó el efecto de soluciones acuosas, en alcohol y éter sobre la capacidad reproductiva de la garrapata. La posible toxicidad de un extracto acuoso de semilla al 4% se midió en conejos mediante pruebas de instilación ocular, sensibilidad dérmica, inoculación dérmica e inmersión o baño completo. En campo se comparó el efecto de tratar bovinos en pastoreo con hidrolato jabonoso al 5% de semillas de Neem contra la aplicación de acaricida comercial (amitraz) mediante dos pruebas consecutivas con 5 y 4 animales por grupo. En las pruebas de laboratorio, el Porcentaje de Control de la Eficacia Reproductiva (PCONER) más alto encontrado correspondió a la solución en éter a una dilución 1:5 (100%). Los resultados en solución acuosa sugirieron problemas de solubilidad o estabilidad del compuesto. Los mayores PCONER observados en el extracto alcohólico fueron de 70 y 69% en las diluciones 1:5 y 1:20, respectivamente. Ningún conejo demostró alguna reacción desfavorable en las pruebas de toxicidad evaluadas. En las pruebas de campo, no se hallaron diferencias en los recuentos entre los dos grupos de bovinos de la primera prueba ($t=0.50$, $p>0.05$), ni en los de la segunda ($t=0.63$, $p>0.05$), lo que indica que el hidrolato de semilla tuvo un efecto similar al del acaricida comercial. La validación definitiva de esta alternativa requerirá pruebas de campo con mayor número de animales, ensayos de establo y evaluaciones con diferentes tipos de formulaciones que resulten prácticas para su uso bajo condiciones de campo.

Palabras clave: *Azadirachta indica*. *Boophilus microplus*. Extractos vegetales. Garrapatas. Control Integrado de Parásitos. Árbol del Neem.

Summary. Plant extracts are a probable alternative to reduce the dependence on pesticides to control ticks. The Neem tree (*Azadirachta indica*) is well known for its insecticidal properties. In a preliminary study, field and laboratory experiments were conducted to evaluate the use of Neem seed extracts as a control tool. Using the tick's Adult Immersion Test, the effect on the reproductive capability of ticks of aqueous, alcoholic and ether solutions of seed extracts were evaluated. The possible toxicity of a 4% aqueous extract of seed was evaluated on rabbits through test of ocular instillation, dermal sensitivity, intradermal inoculation, and entire immersion or dip. In the field, the effect of treating grazing cattle with a 5% hidrolate of Neem's seeds was compared against the application of commercial acaricide (Amitraz), through two consecutive tests with five and four animals per group. In the laboratory tests, The highest Percentage Control of the Reproductive Efficacy (PCONER) found corresponded to the ether solution at a 1:5 dilution (100%). The results on aqueous solutions suggested solubility or stability problems of the compound. The highest PCONER observed on the alcoholic extracts were of 70% and 69% respectively for dilutions 1:5 and 1:20. No rabbit showed any unfavorable reaction in the toxicity tests used. In the field tests, no difference were found in the tick counts between the two groups, neither in the first ($t=0.50$, $p>0.05$) or in the second test ($t=0.63$, $p>0.05$), indicating that the seed hidrolate had a similar effect to the commercial acaricide. The definitive validation of this alternative will require field tests with a higher number of animals, stall tests and evaluations using different types of formulations that could be practical for their use under field conditions.

Key words: *Azadirachta indica*. *Boophilus microplus*. Plant extracts. Ticks. Integrated Control of Parasites. Neem Tree.

1 Contribución del Proyecto "Generación de Metodologías de Manejo Integrado de Plagas (MIP) para el Control de Enfermedades Parasitarias del Ganado" del Plan de Modernización de la Ganadería Colombiana. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA.

2 Respectivamente, Médico Veterinario, MSc., PhD., Investigador Principal-CEISA; M.V. Investigador Asistente CRECED frontera Nor Oriente Regional 7; M.V. Investigador Principiante-CEISA; M.V.Z. Investigador Asistente CRECED frontera Nor Oriente Regional 7; M.V., Investigador Principiante-CEISA. Centro de Investigación en Salud y Producción Animal-CEISA. Avenida el Dorado N° 42-42, Bogotá. A. A. 240142, Las Palmas, Bogotá. E-mail: ebenavid@hemeroteca.icfes.gov.co

Introducción

La garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Canestrini 1877) se considera problema importante para la ganadería del trópico, tanto por su capacidad de transmisión de enfermedades, como por los daños directos e indirectos que ocasiona su presencia (Sutherst *et al.* 1983; Benavides 1992); un estudio realizado por FAO en 1984, estimó las pérdidas causadas por estos parásitos en US\$ 7.3 por cabeza/año (Betancourt 1992).

Tradicionalmente, su control se ha basado en el uso continuo de acaricidas; sin embargo, esta práctica se ha vuelto ineficaz debido a la aparición de garrapatas resistentes a estos productos, contaminación del medio ambiente, toxicidad para organismos benéficos y efectos residuales en carne y leche que causan una seria amenaza para la salud humana (Kunz y Kemp 1994; Sidhu 1995). Actualmente, se propone disminuir la dependencia del uso de químicos mediante el desarrollo de programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) los cuales deben estar basados en la combinación racional y estratégica de métodos químicos y no químicos para el control; dentro de estos últimos se incluye el uso de animales resistentes, la rotación y descanso de praderas y la aplicación de vacunas anti-garrapatas (Walker *et al.* 1988). Recientemente se ha sugerido la utilización de herramientas de control biológico para el control, destacándose entre ellos el uso de hongos entomopatógenos y de extractos vegetales (Samish 1999).

En últimos años existe un creciente interés por el uso de insecticidas botánicos para el control de plagas en la agricultura; el árbol del Neem, *Azadirachta indica*, es la especie más reconocida por sus propiedades insecticidas y nematocidas; el árbol es también conocido como "árbol de la India", "árbol Africano" o "Nim" (Schmutterer 1990). El especial interés por su uso se debe a la alta biodegradación de sus principios activos, su fácil consecución y por tanto, un recurso económico para ser utilizado en planes MIP (Sidhu 1995).

El Neem es originario del sureste y suroeste de Asia y está ampliamente propagado en zonas tropicales y subtropicales de África, América y Australia. Debido a que posee raíces profundas, su desarrollo es óptimo aún en zonas con precipitaciones entre 400 a 800 mm (Schmutterer 1990). Posee alta tolerancia a suelos secos, pobres, alcalinos y salinos; siendo un árbol de lugares marginales de zonas secas y bajas hasta 800 m.s.n.m. (Brechtel 1993; Rawat 1995). El peso de la semilla representa el 10% del peso total del fruto (Schmutterer 1990). Aparte de utilizarse como fuente de biopesticidas, el árbol del Neem mejora la fertilidad de los suelos, neutraliza los suelos ácidos y es la base de los programas de reforestación en áreas secas y degradadas (Sidhu 1995; Kumar y Jattan 1995).

Todas las partes de la planta son biológicamente activas, pero los compuestos químicos que poseen la mayor actividad insecticida son los triterpenoides, azadirachtina y salanina, los cuales se extraen a partir de la semilla (Vanranden y Roitberg 1998; Sidhu 1995). La azadirachtina es el principal componente de la semilla, pero la cantidad de este compuesto puede variar de acuerdo con las condiciones climáticas y posiblemente con factores de tipo genético (Schmutterer 1990). La azadirachtina y sus derivados generan desórdenes hormonales por la afección de las células neurosecretoras del cerebro del insecto, causando inhibición del crecimiento y de la metamorfosis e incapacidad de los insectos de desarrollarse de una manera normal, resultando deformaciones de la piel, alas, patas y otras partes del cuerpo (Schmutterer 1990; Brechtel 1993). Adicionalmente, la azadirachtina posee efectos repelentes, disminuye la oviposición, altera el comportamiento alimenticio de los insectos e influye negativamente en la fecundidad de los huevos (Schmutterer 1990).

La obtención de productos derivados del Neem se puede realizar de manera simple, incluso en condiciones de finca, obteniéndose la mayor cantidad de ingredientes mediante extracción alcohólica, mientras que el extracto acuoso ofrece una menor cantidad de ingredientes activos (Latum 1985; citado por Sidhu 1995). En algunas zonas cálidas de Colombia la siembra del Neem se ha difundido desde hace dos años y existen esfuerzos aislados para propagar y utilizar esta especie.

En este trabajo se presentan resultados de un estudio preliminar realizado conjuntamente entre profesionales CORPOICA del CRECED Frontera Nor-Oriente, Cúcuta (Norte de Santander) y el Programa Nacional de Salud Animal (Laboratorio de Ectoparásitos, CEISA); el objetivo consistió en estudiar el potencial garrapaticida de extractos del Neem, como una alternativa no química para el control, en el marco de programas MIP.

Materiales y Métodos

El experimento estuvo subdividido en 4 actividades: recolección de semilla, establecimiento de semilleros y obtención de los extractos; pruebas de toxicidad en conejos; evaluaciones en bovinos en pastoreo y evaluaciones sobre parámetros reproductivos de las garrapatas (*in vitro*). Las tres primeras actividades se desarrollaron con base en las instalaciones del CRECED Frontera Nor-Oriente en Cúcuta y los trabajos de campo se desarrollaron en una finca del Valle del Zulia, lo que corresponde a una clasificación de Zonas de Vida de Holdridge, de Bosque Seco Premontano (transición cálida) y de Bosque Seco Tropical (Malagón *et al.* 1988), zonas agroecológicas Cu y Cv (IGAC 1988).

Recolección de semilla y establecimiento de semilleros

Las semillas fueron recolectadas de los árboles plantados en diferentes áreas del municipio de Cúcuta. A partir de estas semillas se estableció un cultivo en el vivero de la Alianza INEM-CORPONOR, ubicado en la granja "Las Piedras", Municipio de El Zulia. El proceso de despulpado y secado se realizó en las instalaciones del CRECED Frontera Nor-Oriente Regional 7 en Cúcuta. Las semillas se almacenaron al medio ambiente.

Preparación de las soluciones de extractos de Neem

La semilla se molió mediante un molino a motor y se obtuvo una harina de aspecto grasoso-pastoso. Para las pruebas de instilación ocular, sensibilidad dérmica e inoculación dérmica en conejos, se preparó una solución acuosa así: por cada litro de agua destilada se adicionaron 40 g de la semilla molida (4%), dejando esta mezcla en reposo por 12 horas. Transcurrido este tiempo, la solución se pasó por un tamiz. Para la prueba de inmersión o baño completo, a la solución se le agregaron 50 g de jabón de coco. En tanto, para la prueba *in vivo*, la solución jabonosa se preparó al 5% (50 g de semilla en 1L de agua jabonosa) y se aplicó a los animales mediante bomba de espalda.

Pruebas de toxicidad en conejos

Para cada una de las pruebas que se describen a continuación se utilizaron dos conejos adultos de la raza Nueva Zelanda Blanca: uno como tratamiento y el otro como control. Estas pruebas son las típicamente usadas en el estudio de reacciones de hipersensibilidad (Roit *et al.* 1987).

Instilación ocular. Se aplicaron en el ojo derecho de cada conejo 2 gotas del extracto dejando el ojo izquierdo como control. Se evaluaron reacciones como lagrimeo, enrojecimiento y opacidad de la córnea, mediante observaciones que se realizaron a los 15 y 30 minutos, 1, 2 y 4 horas post-instilación.

Sensibilidad dérmica. Se depiló un área de 5x5 cm de la espalda de un conejo y se aplicaron, en forma tópica, 2 cc del extracto; al otro conejo, utilizado como testigo, se aplicaron 2 cc de solución salina fisiológica. Se evaluaron reacciones como engrosamiento de la piel, rubor y edema en el área de aplicación, además se midieron variables fisiológicas como temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria, antes y después de la prueba.

Inoculación dérmica. Se procedió a depilar en forma similar a lo descrito en la prueba anterior, y antes de inyectar 0.1 ml del extracto en uno de los conejos se midió el grosor de la piel. Se realizaron las mismas evaluaciones que en la prueba de sensibilidad dérmica, haciendo observa-

ciones a los 15, 30 minutos; 1, 2, 4, 12 y 24 horas post-aplicación.

Inmersión o baño completo. Se mojó un conejo por 5 días consecutivos con una solución preparada con 40 g de semilla molida en 1L de agua jabonosa. En igual forma se bañó el otro conejo testigo utilizando únicamente agua jabonosa.

Evaluaciones en bovinos en pastoreo

Las pruebas se realizaron en la finca "Los Tanques" ubicada en el municipio de San Cayetano, Norte de Santander. Una primera prueba se realizó en el segundo semestre de 1998 en 10 hembras mestizas Gyr x Pardo Suizo con edades entre 8 y 12 meses, las cuales fueron divididas en dos grupos de 5 animales cada uno. El grupo 1 se trató con una solución garrapaticida que tenía como base el amitraz (aplicado a la concentración recomendada por el fabricante), mientras que al grupo 2 se le aplicó, en las mismas fechas de tratamiento del grupo 1, extracto acuoso de semilla al 5% en agua jabonosa. Ambos grupos permanecieron pastoreando en el mismo potrero y se les realizaron recuentos de garrapatas adultas (tamaño superior a 4.5 mm) sobre el lado izquierdo, cada 21 días. La evaluación se repitió en el segundo semestre de 1999 en la misma finca, esta vez utilizando 8 hembras mestizas Gyr x Pardo Suizo de 10 a 14 meses de edad. Al igual que la primera prueba, se conformaron dos grupos al azar: uno se trató con Amitraz y el otro con hidrolato de Neem en solución jabonosa. En esta prueba los recuentos se hicieron semanalmente.

Efecto sobre los parámetros reproductivos de las garrapatas

Pruebas in vitro. En el laboratorio de ectoparásitos del CEISA se realizaron algunas observaciones utilizando garrapatas *Bo. microplus* hembras adultas repletas (teleoginas) de la cepa de referencia Yeerongpilly, la cual es susceptible a todos los acaricidas. La prueba utilizada fue la inmersión de adultos (Drummond *et al.* 1971), con algunas modificaciones (Benavides *et al.* 1989; Benavides *et al.* 1999), donde la unidad experimental es un grupo de 10 teleoginas, la cual siempre se monta por duplicado; se realizaron inmersiones por diez minutos en diferentes diluciones de extractos acuosos, etéreos y alcohólicos del Neem, utilizando como control agua destilada. Las soluciones se prepararon, obteniendo en primera medida una pasta básica de semilla en cada diluyente (10 g de semilla y 5 ml de diluyente); dos gramos de esta preparación se adicionaron a 10 ml de diluyente, se centrifugó y el sobrenadante se completó hasta 50 ml con cada diluyente (alcohol, éter o agua), lo que se consideró la solución patrón inicial (100%). A partir de ésta se prepararon las siguientes diluciones en agua destilada 1:5, 1:20, 1:50, 1:200, 1:500; lo que en términos prácti-

cos se consideró como concentraciones desde 0.2% hasta 20%. A partir de la prueba de inmersión se calcularon tres parámetros a saber:

- El número de teleoginas incapaces de ovipositar (Adultas muertas); se consideró una teleogina como muerta cuando fue incapaz de producir una masa de huevos (así fuese mínima) durante los catorce días de incubación de la prueba.
- El Porcentaje del Control del Índice de la Eficiencia Reproductiva (PCIEC), el cual mide la habilidad del compuesto para inhibir el proceso de oviposición de la garrapata, a partir de la comparación del peso de la postura y de las teleoginas; para su cálculo, cada grupo de 10 teleoginas se pesó previo a la inmersión, lo mismo que los huevos producidos luego de 14 días de incubación (30° C; 90% H.R.) y el parámetro Índice de la Eficiencia de la Conversión fue calculado ($IEC = \text{peso huevos} / \text{peso teleoginas}$) para cada grupo. Para el cálculo del PCIEC para cada tratamiento (concentración) se obtuvo la sumatoria del peso de los huevos en la réplica uno y la réplica dos, la que fue dividida por el peso total de las teleoginas en ambos grupos, para obtener así el IEC de ambas réplicas (tratamiento = IEC_{CT} , control = IEC_{CT}). El PCIEC se computó utilizando este valor agregado, de la siguiente manera: $PCIEC = 100 \times \{(IEC_{CT} - IEC_{CT}) / IEC_{CT}\}$.
- El Porcentaje del Control de la Eficacia Reproductiva (PCONER), mide la capacidad de inhibición de la postura y de eclosión de los huevos producidos por cada grupo de teleoginas; para su cálculo, para cada grupo, se computó el parámetro Eficacia Reproductiva, con base en el IEC y el porcentaje de eclosión (por ejemplo, 80% = 0.8), determinado visualmente para cada masa de huevos ($ER = IEC \times \% \text{ de eclosión} \times 20000$). El PCONER para cada tratamiento se determinó teniendo en cuenta el ER de cada réplica de tratamiento (ER_{Tn}) o de control (ER_{Cn}) así: $PCONER = 100 \times \{[(ER_{C1} + ER_{C2}) - (ER_{T1} + ER_{T2})] / (ER_{C1} + ER_{C2})\}$ (Benavides *et al.* 1989).

Resultados y Discusión

Recolección de semilla, establecimiento de semilleros

Se encontró un porcentaje de germinación del 100% de las semillas plantadas en el vivero Alianza INEM-CORPONOR; la fase de vivero duró tres meses. Para acelerar la germinación se realizaron dos procedimientos: inmersión en agua caliente por 10 minutos y corte en un extremo de la semilla para romper la cutícula. La germinación de las semillas a las que se les hizo el corte se presentó a los ocho días, mientras que en las tratadas con agua caliente la germinación se inició a los 29

días. Se observó la pérdida de viabilidad de las semillas hasta de un 60% después de dos meses de recolectadas. Las plántulas se sembraron en la granja "Las Piedras" y su desarrollo fue bueno (alcanzaron una altura de 1.90 m en ocho meses) a pesar de las condiciones del suelo y las épocas críticas de verano que han tenido que soportar, demostrando gran adaptación al medio. Las condiciones ecológicas del Valle del Zulia, corresponden a las condiciones consideradas como óptimas para el crecimiento del árbol (Schmutterer 1990), con la presencia de una humedad moderada en los suelos, lo que corresponde a la clasificación de Zonas de vida de Bosque Seco Premontano (transición cálida) y de Bosque Seco Tropical (IGAC 1988; Malagón *et al.* 1988).

Se ha descrito que el árbol crece adecuadamente hasta altitudes de 800 m.s.n.m. (Brechelt 1993), pero en cuanto a la humedad requerida, existe controversia en la literatura; mientras Schmutterer (1990) indica que las condiciones óptimas de crecimiento en climas tropicales está entre 400-800 mm de precipitación pluvial anual, Brechelt (1993) indica que ese rango está entre 800-1800 mm y que a mayores humedades se reduce el crecimiento y producción de frutos; siendo la temperatura óptima de crecimiento entre 20° - 27° C. Esto significa que bajo las condiciones colombianas el árbol del Neem podría ser indicado para las regiones de Bosque Seco Tropical (bs-T) y Bosque Muy Seco Tropical (bms-T), los que para el país corresponden respectivamente a extensiones de 11'342.642 ha y 377.308 ha (Malagón *et al.* 1988). Esto además podría extenderse a 5'124.261 ha, correspondiente a las zonas de Bosque Húmedo Premontano - Transición Cálida (bh-PM) y a las de Bosque Seco Premontano - Transición Cálida (bs-PM), con una extensión de 1'170.092 ha; es decir una extensión considerable del país podría utilizar esta tecnología. El uso del árbol del Neem pudiese llegar a ser un componente importante de sistemas de silvopastoreo, además de que se ha descrito (Sidhu 1995; Kumar y Jattan 1995) que en otras latitudes este árbol es parte de los sistemas agroforestales y de reforestación, como fuente de forraje y leña, además de mejorar la capacidad de retención de agua del suelo e incremento de la fertilidad de los suelos al disminuir su acidez.

Pruebas de toxicidad en conejos

Instilación ocular. No se observaron cambios morfológicos en la estructura ocular, ni enrojecimiento de la esclerótica o lagrimeo. Esto indica que el extracto acuoso no es un preparado irritante a la concentración del 4%.

Sensibilidad dérmica. En las observaciones realizadas, no se evidenció rubor, dolor o edema en la epidermis. Los parámetros fisiológicos como temperatura (39.5°C), frecuencia cardíaca (250 latidos/minuto) y frecuencia respiratoria (39 resp./minuto),

se mantuvieron dentro de los valores fisiológicos normales. No se encontró ninguna diferencia con el conejo testigo.

Inoculación dérmica. En esta prueba al igual que en la anterior, no se presentaron diferencias estadísticas en los cambios morfológicos en la piel de los dos conejos ($p > 0.05$), ni en la temperatura ($p > 0.05$), ni en la frecuencia respiratoria ($p > 0.05$), pero si hubo diferencias entre las frecuencias cardíacas ($p < 0.05$) (Tabla 1).

Inmersión o baño completo. No se observaron cambios morfológicos en la piel, ni en las variables fisiológicas evaluadas.

La ausencia de efectos tóxicos o alérgicos en los conejos evaluados son un indicio de que el uso de extractos de esta semilla sobre mamíferos podría ser seguro, pero no se convierte en una prueba exhaustiva o definitiva sobre el particular, ya que simplemente se trataba de una evaluación preliminar; sin embargo, existe información de que los extractos de Neem son de baja toxicidad. Schmutterer (1990) describe que en Estados Unidos se llevaron a cabo evaluaciones toxicológicas de productos comerciales a base de Neem (llamado, Margosan-O®), demostrando mediante pruebas de irritación cutánea, irritación ocular o inhalación, más pruebas de hipersensibilidad, de que no existían resultados preocupantes con este tipo de compuestos. Por otra parte, Farries (1996a) describe que el aceite de Neem es irritante para el ganado cuando se aplica puro a una concentración de 2 ml/kg de peso vivo

y sugiere el uso de una concentración máxima de 1 ml/kg, para ser aplicado mediante aspersión de emulsiones en agua.

Evaluaciones en bovinos en pastoreo

En la figura 1 se presentan los recuentos de garrapatas (valores promedio) detectados en cada uno de los grupos experimentales de la primera prueba realizada en el segundo semestre de 1998. Los recuentos fueron altos solamente en la primera fecha de observación y luego disminuyeron en ambos grupos. Para el análisis, para cada animal se calculó la sumatoria de las garrapatas presentes en todos los recuentos, determinando así la carga parasitaria total durante el período de evaluación; no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos (t student = 0.5002, $p > 0.05$).

En lo referente a los resultados de la segunda prueba (realizada en el segundo semestre de 1999), tampoco se encontraron diferencias significativas (Fig. 2) entre el grupo bañado con amitraz y el grupo bañado con el preparado de Neem (t student = 0.6298, $p > 0.05$); se destaca que en esta prueba, a diferencia de la primera, los recuentos se realizaron con mayor regularidad, lo que permite una mayor confiabilidad de los datos. El comportamiento general fue muy similar al de la primera prueba, hallándose recuentos altos solamente en la primera fecha de observación.

Debido a que la prueba no incluyó controles absolutos (animales sin tratamiento),

porque se realizó en una explotación comercial donde el propietario no permite este tipo de manejo en sus animales, es difícil determinar si la reducción de garrapatas en cada grupo fue debida únicamente al baño realizado o si por el contrario, un factor externo indujo a la reducción de las poblaciones en ambos grupos simultáneamente. Este aspecto será discutido más ampliamente luego de presentar los resultados de las pruebas en el laboratorio.

Efecto sobre los parámetros reproductivos de las garrapatas

Las garrapatas adultas se expusieron a las siguientes concentraciones de cada uno de los extractos: 0.2%, 0.5%, 2%, 5% y 20%. Los tres parámetros básicos trabajados fueron utilizados conjuntamente para poder determinar el efecto global del compuesto sobre la capacidad reproductiva y viabilidad de la garrapata ya que cada uno de ellos mide una característica diferente.

Únicamente el extracto en éter produjo actividad biológica inhibidora de manera consistente; en cuanto al hidrolato, todas las garrapatas de todas las concentraciones evaluadas, demostraron postura y sólo se presentó un valor moderado de inhibición de postura (PCIEC = 16.9) o del índice reproductivo (PCONER = 37.1) en la concentración más alta evaluada (20%); ninguno de estos parámetros demostró ajuste al modelo Probit. Por su parte el extracto alcohólico demostró una actividad superior, pero sin llegar a ser la óptima; la

Tabla 1. Parámetros fisiológicos y grosor de piel observado en un conejo inoculado intradérmicamente con 0.1 ml de un extracto acuoso al 4% (40 g Semilla/1L de agua). Al conejo testigo se le aplicó 0.1 ml de solución salina fisiológica por la misma vía

TIEMPO DE OBSERVACIÓN	EXTRACTO DE NEEM AL 4%				SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA			
	Grosor piel. mm	T°C	F.R. Resp/min.	F.C. Lat./min.	Grosor piel. mm	T°C	F.R. Resp/min.	F.C. Lat./min.
0 min.	2.0	39.3	39	230	1.0	39.2	39	240
15 min.	2.0	39.3	40	235	1.0	39.2	39	243
30 min.	2.0	39.3	39	240	1.0	39.2	39	240
1 hora	2.5	39.4	39	230	1.5	39.2	39	239
2 horas	2.5	39.5	39	230	1.5	39.2	39	245
4 horas	3.0	39.5	39	245	1.5	39.4	39	240
12 horas	3.0	39.5	39	250	1.5	39.4	39	242
24 horas	3.0	39.3	39	235	1.5	39.4	39	240

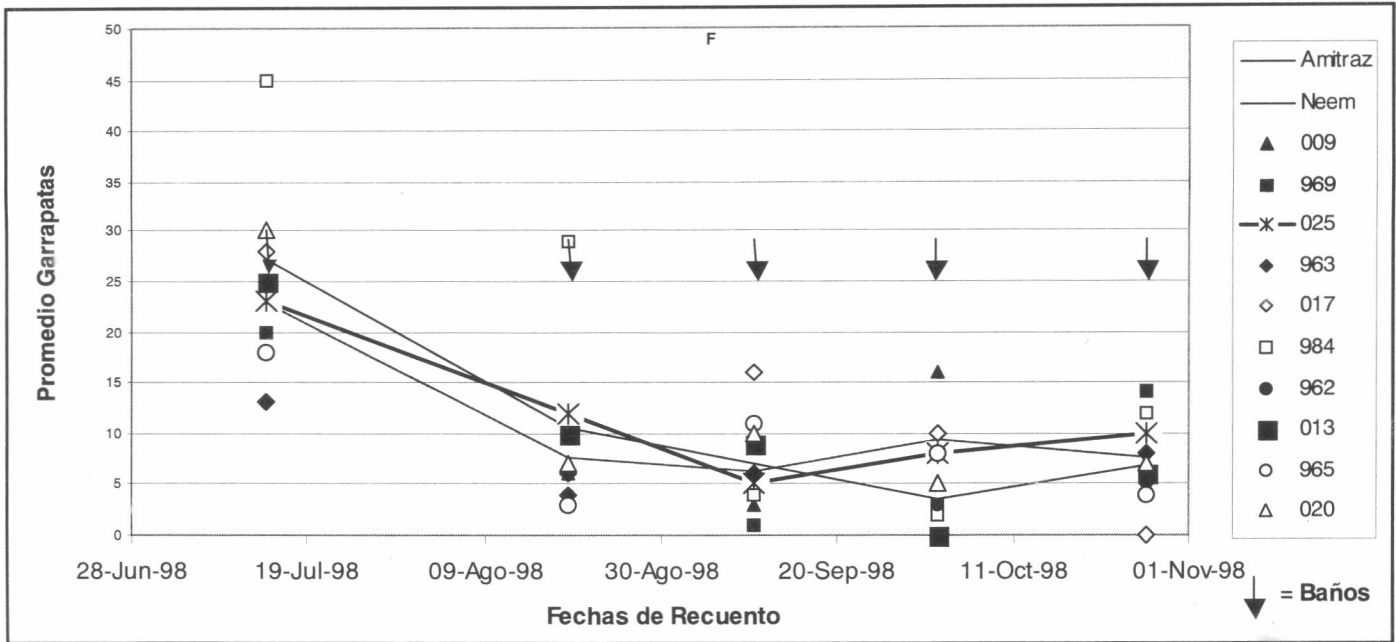


Figura 1. Comparación del promedio de garrapatas observado en terneros sometidos a infestación natural en pastoreo y tratados cada 21 días con acaricida comercial (Amitraz) o una solución jabonosa al 5% de semillas de Neem. Prueba 1998, cinco animales por grupo; cada símbolo identifica a un animal individual.

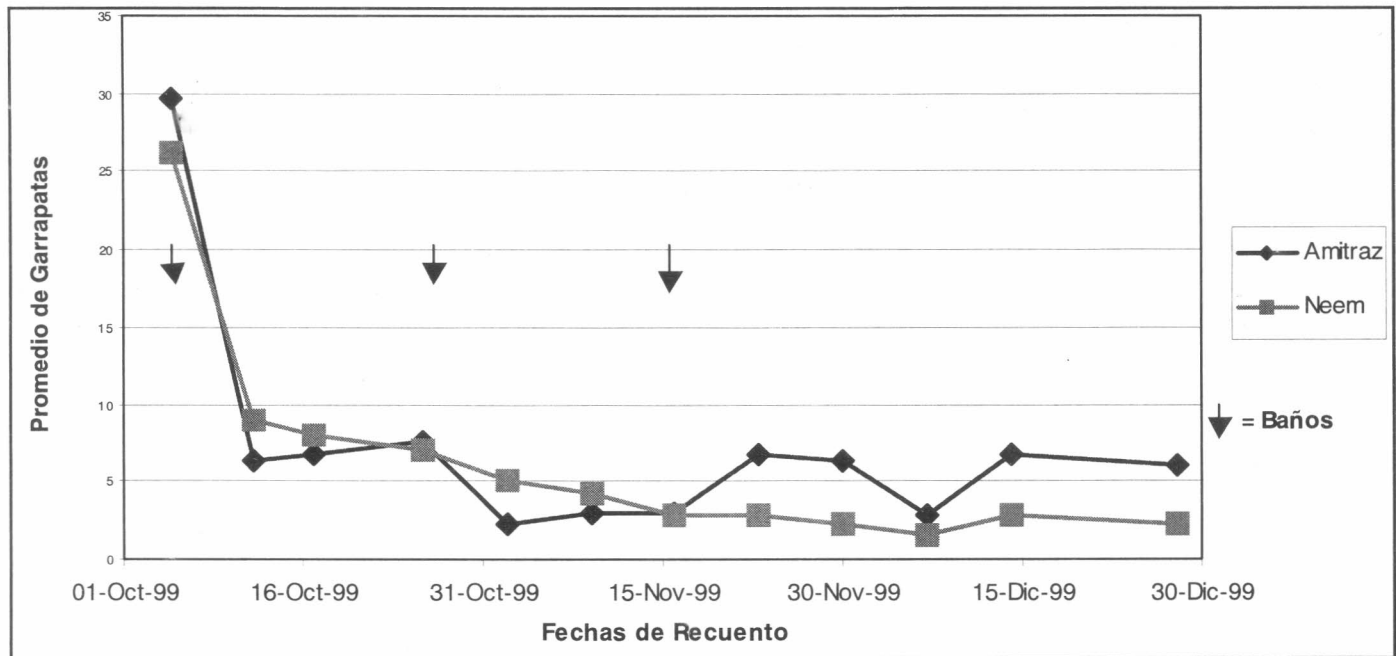


Figura 2. Recuento del promedio de garrapatas en terneros sometidos a infestación natural en pastoreo y tratados cada 21 días con producto comercial (Amitraz) o Hidrolato de Neem al 5%. Segunda prueba, segundo semestre de 1999, cuatro animales por grupo.

mortalidad de adultos fue limitada y sólo se alcanzó 25% y 15% de mortalidad, respectivamente en las concentraciones de 5% y 20% de extracto; el máximo PCIEC fue de 41.7 y se alcanzó en la concentración del 5%, pero en este parámetro no se presentó ajuste al modelo Probit ($P=0.386$); en cuanto al PCONER el modelo Probit resultó significativo, pero con bajo ajuste ($p <$

0.01 , $R^2= 0.76$) y la máxima inhibición (70.0%) se alcanzó en la concentración del 20% de extracto alcohólico.

La actividad biológica mayor y más consistente se observó en el extracto etéreo; los resultados del PCIEC (capacidad del compuesto para reducir la oviposición), demostraron un adecuado comportamiento

en la curva dosis - efecto ($p < 0.01$; $R^2= 0.95$), la mayor inhibición de 90.7% se logró en la mayor concentración (Fig. 3), el modelo Probit indicó una Dosis Efectiva 50 (DE_{50}) de 10.1% y DE_{99} de 28.1%.

La mortalidad de adultos fue otro parámetro que demostró la actividad biológica del extracto etéreo, al utilizar el com-

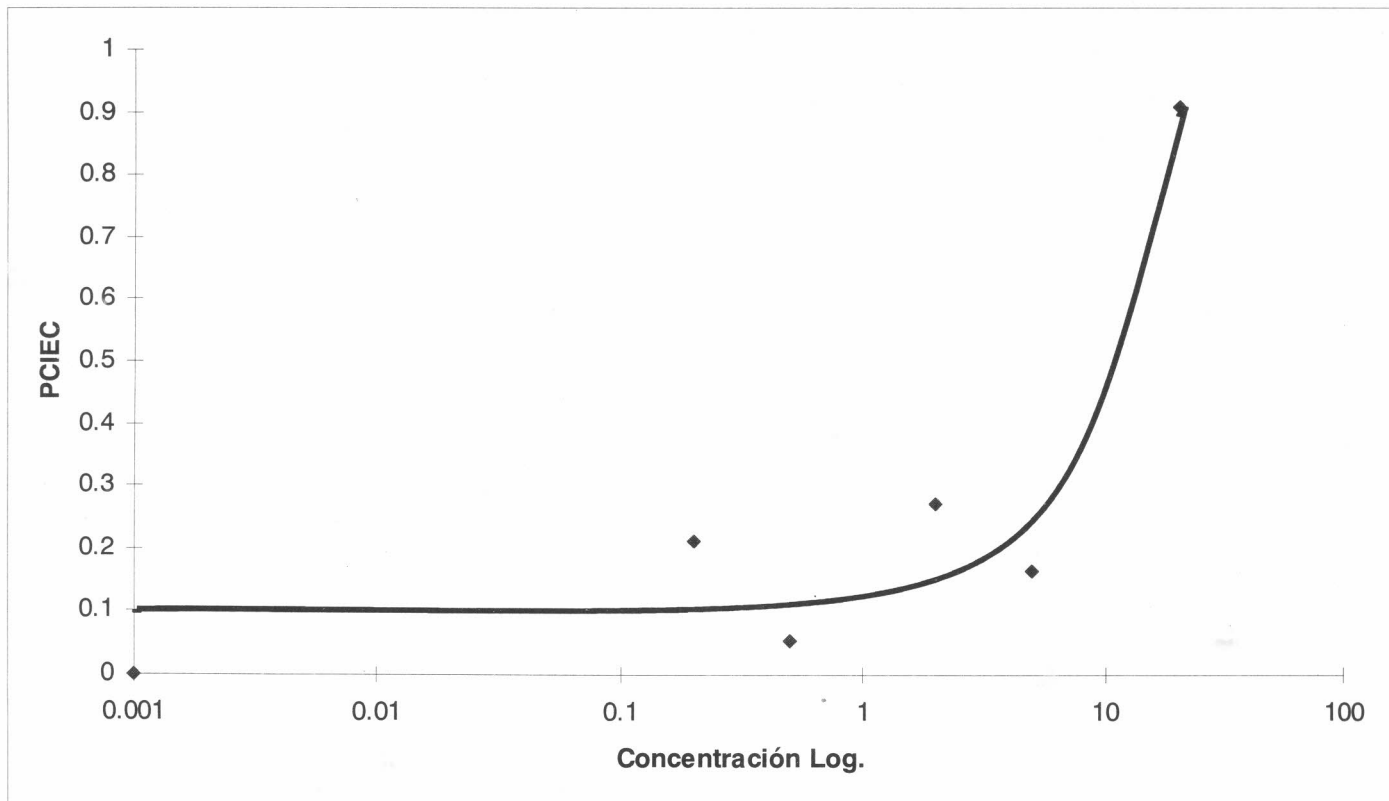


Figura 3. Valor estimado del Porcentaje del Control del Índice de Eficiencia de la Conversión (PCIEC) en una prueba de inmersión de adultos utilizando diferentes concentraciones de extracto etéreo de Neem, ajustado a un modelo Probit. La gráfica corresponde a resultados con la cepa de referencia susceptible Yeerongpilly.

puesto a una concentración 20%, 16 de 20 teleoginas (80%) fueron incapaces de ovipositar (Fig. 4). Las DE_{50} y DE_{99} registradas en el análisis Probit correspondieron respectivamente a 11.2 y 33.8% ($p < 0.01$; $R^2 = 0.97$). En cuanto al PCONER, la figura 5 demuestra que la mayor concentración

produjo total inhibición (100%), pero el ajuste del Probit fue pobre ($p < 0.01$; $R^2 = 0.787$), la DE_{99} correspondió a 21.5% y la DE_{50} fue de 5.9%.

Aunque varios autores han descrito las propiedades insecticidas de Neem (Rawat

1995; Schmutterer 1990), son escasos los trabajos que describan el efecto garrapaticida del Neem, evaluado, bien mediante sistemas *in vitro* o *in vivo*; un trabajo reciente (Huerta y Rodríguez 1999) evaluó extractos acuosos de semilla del Neem sobre larvas (mediante la prueba de inmer-

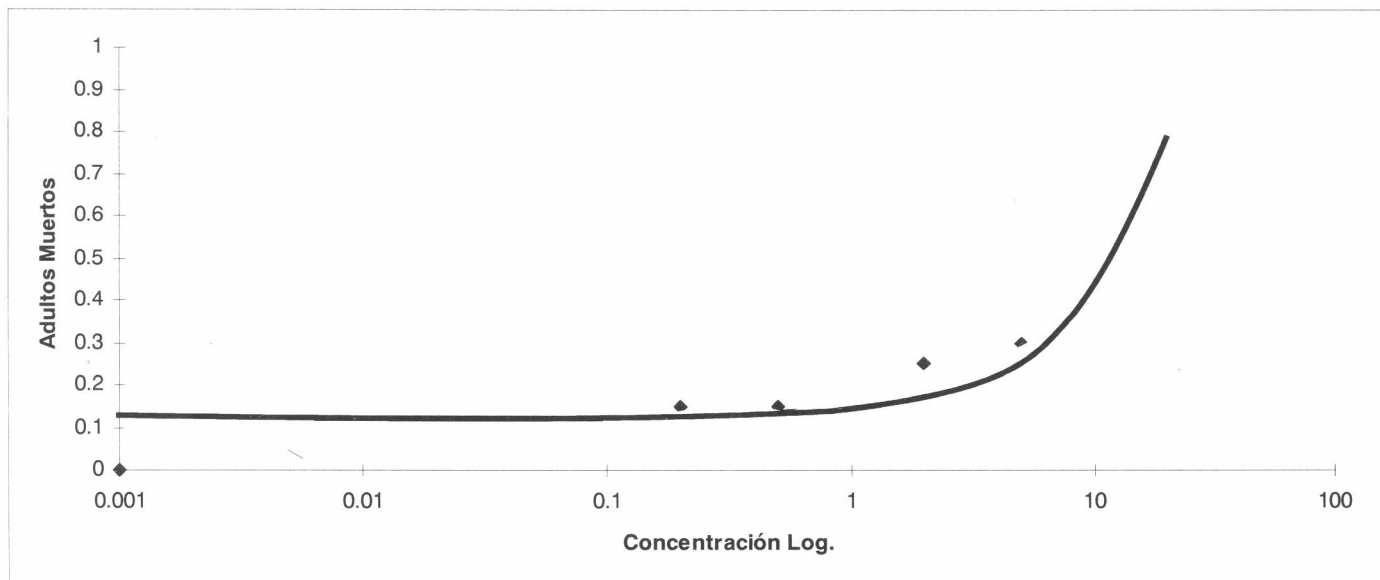


Figura 4. Valor calculado para el Probit del efecto letal registrado a partir de la prueba de inmersión de adultos, usando diferentes concentraciones del extracto en éter del Neem.

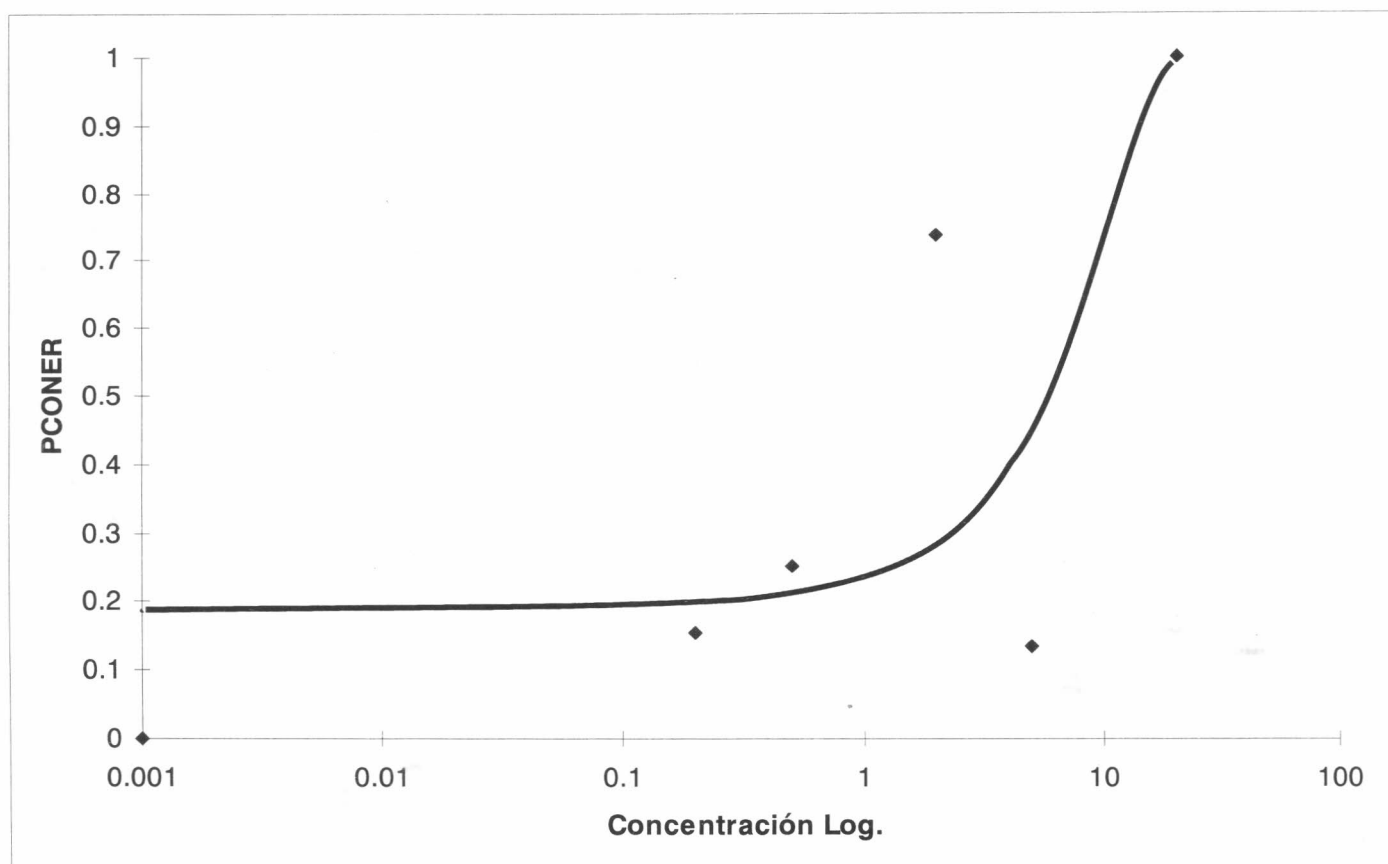


Figura 5. Valor estimado (curva) en un modelo Probit y promedio de las observaciones reales (Punto) del Porcentaje del Control de la Eficacia Reproductiva (PCONER), obtenidos a partir de la exposición de garrapatas adultas a diferentes concentraciones de extracto etéreo del Neem.

sión, que mide mortalidad) y adultos de la garrapata *Bo microplus* utilizando métodos similares a los de este trabajo y concluyó que el efecto biológico era limitado, lo cual es similar a nuestros hallazgos. Esto posiblemente sea debido al modo de acción de los compuestos del Neem, principalmente de la Azadirachtina, la cual actúa prácticamente como un compuesto inhibidor de quitina (Schmutterer 1990; Brechelt 1993), el cual no causa mortalidad inmediata, sino que interfiere con diversas fases del ciclo de vida del artrópodo; esto implica que el efecto poblacional de la aplicación de los compuestos del Neem no se observará, sino luego de algunos días o semanas de la aplicación; pero también se le han descrito propiedades repelentes (VanRanden y Roitberg 1998), las cuales no es posible determinar mediante la prueba de inmersión de larvas.

Por su parte, en un trabajo realizado en Tailandia (Farries 1996a; 1996b) se describe el efecto benéfico de uso del aceite de Neem, tanto para el control de los parásitos externos del ganado (incluidas moscas), como específicamente para la garrapata *Bo. microplus*, indicando que a los animales tratados el pelaje se les tornaba brillante y aceitoso, en estos animales se detectaron menores niveles de ectoparásitos, lo que es similar a lo observado en

este estudio. Además, en una evaluación con garrapatas en las que se les aplicó una dilución de aceite con un pincel (Farries 1996b), se demostró efecto sobre la capacidad de postura de garrapatas solamente en la más alta concentración utilizada (1%), pero también se detectó una importante reducción en la capacidad de eclosión de los huevos a partir de la concentración del 0.4%. Esto es comparable a lo hallado en este estudio en las pruebas *in vitro*.

Aunque este resultado es bastante alentador, aun existen trabajos de investigación aplicada que deberían culminarse para poder ofrecer este tipo de alternativa de control para los productores; teniendo en cuenta como principio general que esta alternativa debe ser utilizada dentro de un concepto silvopastoril, en el cual el árbol es además utilizado como fuente de sombra y tal vez de forraje para los animales. Se debe estudiar qué tipo de preparación es la más efectiva (aceite, hidrolato, extractos en alcohol o éter, jabones, etc.), pero también se debe explorar qué posible efecto benéfico existe, en cuanto a control parasitario, cuando las hojas del árbol son suministradas a los animales como forraje. El efecto sobre otros ectoparásitos, principalmente la mosca de los cuernos, *Haematobia irritans*, debe también ser estudiado de modo experimental.

Conclusiones

- El árbol del Neem se adaptó y desarrolló en condiciones secas y de poca precipitación correspondiente a la Zona de Vida de Bosque Seco Tropical. La semilla requiere algún tipo de escarificación para asegurar germinación.
- El extracto acuoso a una concentración del 4% no demostró toxicidad ni reacciones alérgicas en las pruebas realizadas en conejos.
- Una evaluación limitada sobre animales en condiciones de finca demostró que los niveles de infestación en animales tratados con solución jabonosa de hidrolato de Neem al 5% fueron similares a los de animales que recibieron aplicación con acaricida comercial. Sin embargo, este tipo de observaciones debe refinarse y desarrollarse sobre un mayor número de animales, incluyendo controles absolutos sin tratamiento.
- La preparación de extractos o formulación del compuesto es un aspecto que aún requiere de mayor estudio. El extracto etéreo demostró poseer el mayor efecto inhibitor sobre la capacidad reproductiva de la garrapata.
- La extracción acuosa demostró poseer el efecto biológico menor sobre las garrapa-

tas debido a su baja solubilidad. Además posee la desventaja de que se fermenta en forma rápida.

Literatura citada

- BENAVIDES, O. E. 1992. Control de garrapatas, moscas y hemoparásitos en bovinos del trópico. *Revista ICA - Informa* 26: 9-15.
- BENAVIDES, O. E.; ROMERO, N. A. 1999. Resultados preliminares de una prueba de inmersión larvaria para determinar resistencia a las Lactonas Macroclínicas utilizando cepas de referencia de la garrapata *Boophilus microplus*. XXVI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. 28, 29 y 30 de Julio.
- BENAVIDES, O. E.; GONZÁLEZ, L.R.; MARTÍNEZ, R.H.; PARRA, G.D.; VILLAR, C.C. 1989. Espectro de sensibilidad a acaricidas de una colonia de la garrapata *Boophilus microplus* establecida en el piedemonte Llänero. *Revista ICA* 24(1): 24-31.
- BENAVIDES, O. E.; RODRÍGUEZ, B. J.L.; ROMERO N. A. 1999. Isolation and partial characterisation of Montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multi-resistant to different Acaricides. *Annals of New York Academy of Sciences*. (In press). 5th Biennial Conference of Society for Tropical Veterinary Medicine. Key West, Florida, June 12-16.
- BETANCOURT, E. A. 1992. Situación actual de la garrapata en Colombia. En: *Memorias I Foro Nacional sobre la situación de garrapatas y moscas en la ganadería*, Asociación Nacional de Laboratorios de Productos Veterinarios, APROVET. Bogotá. Julio 29, pp 62-81.
- BRECHELT, A. 1993. El Nim: un árbol para la agricultura y el medio ambiente. Documento Proyecto "Fabricación de Insecticidas Naturales". Instituto Politécnico Loyola/Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, IPL/GTZ. San Cristobal, Santo Domingo, República Dominicana. 26 p.
- DRUMMOND R. O; GLANDEY W.; WHETSTONE, T.; ERNEST, S. 1971. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. *Journal of Economic Entomology* 64: 686-688.
- FARRIES, J. 1996a. A study on the effect of neem oil extract to control external cattle parasite. En: *Working Papers in Development. Agriculture and Natural Resources Series*. VSO Books, Paper No. 1. (<http://www.vso.org.uk/pubs/wpapers/parasites.htm>).
- FARRIES, J. 1996b. A study on the effect of neem oil on the life cycle of the cattle tick (*Boophilus microplus*). En: *Working Papers in Development. Agriculture and Natural Resources Series*. VSO Books, Paper No. 2. (<http://www.vso.org.uk/pubs/wpapers/tick.htm>).
- HUERTA P, R.A.; RODRÍGUEZ H., C. 1999. Evaluación de la actividad de extractos acuosos del Nim (*Azadirachta indica* (L.) Juss.) (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus*. En: *Control de la Resistencia en Garrapatas y Moscas de Importancia Veterinaria y Enfermedades que transmiten*. Memorias IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. CONASAG-INIFAP-INFARVET-IICA-AMPAVE-FILASA. Puerto Vallarta, México, octubre 20-22. pp. 121.
- INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI, IGAC 1988. Estudio general de los suelos de la parte central del Departamento Norte de Santander. IGAC. 290p.
- KUMAR, S.; JATTAN, S.S. 1995. Neem - A Green Contraceptive. *The Indian Forester* 121(11): 1006-1008.
- KUNZ, S.E.; KEMP, D.H. 1994. Insecticides and Acaricides: Resistance and environmental impact. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 13 (4): 1249-1286.
- MALAGÓN, D.; CORTÉS, M.; PICHOTT, J.; USECHE, L.; GUEVARA, J.; CORTÉS, M.; CALLEJAS, H.; CASTELLANOS, J.; CARVAJAL, F.; DE BECERRA, S.; PULIDO, C.; MARULANDA, J.; ORTEGA, D.; BURGOS, L.; RODRÍGUEZ, H.; ROVEDA, G.; OLMOS, H.; MONTENEGRO, H.; PALACINO, A.; SINNING, G.; BERNAL, A.; CORTÉS, A.; DE CARVAJAL, C.; SALZBURG, A.; SALAZAR, G.; POSADA, M.; BARÓN, C. 1988. Suelos y bosques de Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Ministerio de Hacienda y Crédito Público. Subdirección Agrícola. Bogotá, D.E. (Colombia). 134 p.
- RAWAT, G.S. 1995. Neem (*Azadirachta indica*) Nature's drugstore. *The Indian Forester* 121(11): 977-990.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. 1987. Immunology. First Edition. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- SAMISH, M. 1999. Biocontrol of ticks. *Annals of New York Academy of Sciences*. (In press). 5th Biennial Conference of Society for Tropical Veterinary Medicine. Key West, Florida, June 12-16.
- SCHMUTTERER, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review Entomology*. 35: 271-197
- SIDHU, D.S. 1995. Neem in agroforestry as a source of plant derived chemicals for pest management. *The Indian Forester* 121(11): 1012-1021.
- SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G.F.; KERR, J.D.; STEGEMAN, D.A. 1983. The effect of cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers. *Australian Journal of Agricultural Research* 34: 317-27.
- VAN RANDEN, E.J.; ROITBERG, B.D. 1998. Effect of a Neen (*Azadirachta indica*) - Based Insecticide on oviposition Deterrence, survival, behavior and reproduction of adult western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal Economy Entomology* 91(1): 123-131.
- WALKER A. R.; BENAVIDES O., E.; BETANCOURT, A. 1988. Uso del concepto del manejo integrado de plagas para el control de garrapatas. *Carta Ganadera* 25 (8): 52-57.

FE DE ERRATAS

Rev. Col. de Ent. Vol 26 (3-4): 151 - 156 (2000)

Dirección correcta de los autores:

Patricia Chacón de Ulloa, Javier Bustos, Rosa Cecilia Aldana, Martha Lucía Baena

es:

Universidad del Valle. Departamento de Biología. A.A. 25360. Cali, Colombia