

January 2013

Actividad antihelmíntica in vitro de extractos oleosos de *Azadirachta indica* y extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* sobre nematodos gastrointestinales de cabras

Richard Zapata Salas
Universidad de Antioquia, microbiolorich@gmail.com

Carolina González Agudelo
Universidad de Antioquia, caritog19@hotmail.com

Lila Natalia Mosquera Cardona
Universidad de Antioquia, violetac86@hotmail.com

Ilda Yurani Usuga Tamayo
Universidad de Antioquia, iyurani1213@yahoo.es

Diana Polanco Echeverry
Universidad de Antioquia, dianapolancoecheverry@gmail.com

See next page for additional authors

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv>

Citación recomendada

Zapata Salas R, González Agudelo C, Mosquera Cardona LN, Usuga Tamayo IY, Polanco Echeverry D y Araque Marín P. Actividad antihelmíntica in vitro de extractos oleosos de *Azadirachta indica* y extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* sobre nematodos gastrointestinales de cabras. *Rev Med Vet.* 2013;(26): 25-36. doi: <https://doi.org/10.19052/mv.1134>

This Artículo de Investigación is brought to you for free and open access by the Revistas científicas at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Revista de Medicina Veterinaria by an authorized editor of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

Actividad antihelmíntica in vitro de extractos oleosos de *Azadirachta indica* y extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* sobre nematodos gastrointestinales de cabras

Autor

Richard Zapata Salas, Carolina González Agudelo, Lila Natalia Mosquera Cardona, Ilda Yurani Usuga Tamayo, Diana Polanco Echeverry, and Pedronel Araque Marín

Actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos oleosos de *Azadirachta indica* y extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* sobre nematodos gastrointestinales de cabras

Richard Zapata Salas¹ / Carolina González Agudelo² / Lila Natalia Mosquera Cardona³ / Ilda Yurani Usuga Tamayo⁴ / Diana Polanco Echeverry⁵ / Pedronel Araque Marín⁶

Resumen

Los nematodos gastrointestinales son los parásitos más frecuentes en los rumiantes del mundo. Estas parasitosis causan gastroenteritis parasitaria con un impacto negativo sobre la productividad. El control de nematodos se ha basado en el uso de antihelmínticos químicos —ante los cuales los nematodos han desarrollado cierto grado de resistencia— que se han valorado como sustancias residuales en productos de la cabra que pueden desencadenar efectos nocivos en el consumidor final. Por tanto, el estudio de componentes de plantas se ha propuesto como una alternativa sostenible para el control de la nematodosis caprina. En este trabajo se evaluó *in vitro* el potencial antihelmíntico de extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* y de extractos oleosos de *Azadirachta indica* sobre nematodos gastrointestinales que afectan la cadena caprina. Se realizaron ensayos de actividad nematocida sobre muestras de materia fecal de caprinos con alta carga parasitaria (trichostrongilidos), mediante la realización de curvas dosis/respuesta. El porcentaje de inhibición en la eclosión de huevos para el extracto acuoso de *N. tabacum* y el extracto oleoso de *A. indica* fue de 99 % y 80 %, respectivamente. Los extractos presentaron efecto sobre larva 3 (estadio infectante), con un tiempo letal medio para extractos de *N. tabacum* de 8 ± 1 minutos, y para el extracto *A. indica* de 8 ± 1 minutos. Los resultados de la actividad nematocida a nivel *in vitro* muestran que los extractos de *N. tabacum* y *A. indica* pueden ser una alternativa promisoriosa para el control de nematodos en rumiantes.

Palabras clave: *Nicotiana tabacum*, *Azadirachta indica*, nematodos gastrointestinales, antihelmíntico, cabra.

- 1 Microbiólogo y bioanalista. MSc. Miembro del grupo de investigación en Microbiología Veterinaria. Docente de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia y de la Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista, Medellín, Colombia.
✉ microbiolorich@gmail.com; rizapata@lasallistadocentes.edu.co
- 2 Microbióloga Industrial y Ambiental. Miembro del grupo de investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
✉ caritog19@hotmail.com
- 3 Microbióloga Industrial y Ambiental. Miembro del grupo de investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
✉ violetac86@hotmail.com
- 4 Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental. Miembro del grupo de investigación en Microbiología Veterinaria, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
✉ iyurani1213@yahoo.es

In vitro Anthelmintic Activity of Oily Extracts of *Azadirachta indica* and Aqueous Extracts of *Nicotiana tabacum* on Gastrointestinal Nematodes in Goats

Abstract

Gastrointestinal nematodes are the most common parasites found in ruminants in the world. These parasites cause parasitic gastroenteritis and have a negative effect on productivity. Nematode control has been based on the use of anthelmintic chemicals—against which nematodes have developed a certain degree of resistance—which have been rated as residual substances in goat products that may cause adverse effects on the final consumer. As a result, the study of plant components has been proposed as a sustainable alternative to

Cómo citar este artículo: Zapata R, González C, Mosquera LN, Usuga IY, Polanco D, Araque P. Actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos oleosos de *Azadirachta indica* y extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* sobre nematodos gastrointestinales de cabras. Rev Med Vet. 2013;(26):25-36.

- 5 Bacterióloga y laboratorista clínica. MSc y PhD (c). Miembro del grupo de investigación en Microbiología Veterinaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
✉ dianapolancochevery@gmail.com
- 6 Químico. MSc. Miembro del grupo de investigación en Gestión Ambiental (IGEA). Docente de la Escuela de Ingeniería de Antioquia, Medellín, Colombia.
✉ pfparaque@eia.edu.co

control nematodosis in goats. The anthelmintic potential of aqueous extracts of *Nicotiana tabacum* and oily extracts of *Azadirachta indica* on gastrointestinal nematodes affecting the goat chain was evaluated *in vitro* in this study. Nematicidal activity tests were performed on stool samples from goats with a high parasite load (trichostrongyles), by performing dose/response curves. Percent inhibition in egg hatch for the aqueous extract of *N. tabacum* and the oily extract of *A. indica* was 99% and 80%, respectively. Extracts showed an effect on larva 3 (infective stage), with a mean lethal time of 8 ± 1 minutes for extracts of *N. Tabacum*, and of 8 ± 1 minutes for extract of *A. indica*. The *in vitro* results of the nematicidal activity show that *N. tabacum* and *A. indica* extracts can be a promising alternative for controlling nematodes in ruminants.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, *Azadirachta indica*, gastrointestinal nematodes, anthelmintic, goat.

Atividade anti-helmíntica *in vitro* de extratos oleosos de *Azadirachta indica* e extratos aquosos de *Nicotiana tabacum* sobre nematoides gastrointestinais de cabras

Resumo

Os nematoides gastrointestinais são os parasitas mais frequentes nos ruminantes do mundo. Estas parasitoses causam gastroenterite parasitária e influem negativamente na produtividade. O controle de nematoides tem se baseado no uso de anti-helmínticos químicos — perante os quais os nematoides têm desenvolvido certo grau de resistência — que têm se valorado como substâncias residuais em produtos da cabra que podem desencadear efeitos nocivos no consumidor final. Por tanto, se propôs o estudo de componentes de plantas como uma alternativa sustentável para o controle de nematódeos em caprinos. Neste trabalho se avaliou *in vitro* o potencial anti-helmíntico de extratos aquosos de *Nicotiana tabacum* e de extratos oleosos de *Azadirachta indica* sobre nematoides gastrointestinais que afetam a cadeia caprina. Realizaram-se ensaios de atividade nematicida sobre amostras de fezes de caprinos com alta carga parasitária (tricostrongilídeos), mediante a realização de curvas dose/resposta. A porcentagem de inibição na eclosão de ovos para o extrato aquoso de *N. tabacum* e o extrato oleoso de *A. indica* fue de 99 % e 80 %, respectivamente. Os extratos apresentaram efeito sobre larva 3 (estado infectante), com um tempo letal médio para extratos de *N. tabacum* de 8 ± 1 minutos, e para o extrato *A. indica* de 8 ± 1 minutos. Os resultados *in vitro* da atividade nematicida mostram que os extratos de *N. tabacum* e *A. indica* podem ser uma alternativa promissória para o controle de nematoides em ruminantes.

Palavras chave: *Nicotiana tabacum*, *Azadirachta indica*, nematoides gastrointestinais, anti-helmíntico, cabra.

INTRODUCCIÓN

Las cabras son consideradas ganado con gran potencial productivo dadas las características de su carne y leche. La primera es la fuente primaria de

proteína en muchos países del mundo y además tiene importantes características nutritivas como bajos contenidos de grasa. El 6 % de toda la carne roja que se consume en el mundo proviene de esta, es rica en proteínas, lo que la hace altamente acep-

table desde el punto de vista nutricional. Aunque la leche de cabra solo supone un 3 % del total de la leche que se consume en el mundo, en algunos países de Asia como Turquía, China, entre otros, se consume tanto o más que la leche de vaca, y hoy en día se emplea principalmente en la elaboración de diversos derivados lácteos. Las investigaciones han mostrado que la proteína de la leche de cabra es de mejor calidad que la de la leche de vaca, y de más fácil absorción por el organismo por su alto contenido de nutrientes y propiedades organolépticas (1,2).

Uno de los principales problemas que afecta la productividad y salud de caprinos es la infección por nematodos gastrointestinales del grupo de los trichostrongilidos a los cuales pertenecen los géneros *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Marshallagia*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Bunostomum*, *Chabertia* y *Oesophagostomum*. Se ha demostrado que estos parásitos con acción hematófaga pueden generar una pérdida aproximada de 0,05 mL de sangre por nematodo adulto por día; es decir, una carga parasitaria de 5000 nematodos adultos puede representar una pérdida de hasta 250 mL de sangre al día en un caprino, lo cual se refleja en anemia, anorexia y problemas de salud y producción (3).

Los sistemas de producción de rumiantes, basados principalmente en la utilización de pasturas, encuentran en las parasitosis por trichostrongilidos una de las limitantes más importantes para el aprovechamiento eficiente de este recurso nutricional. Esta tiene efectos sobre las ganancias de peso, el comportamiento reproductivo y la producción de leche, y de forma indirecta trae problemas como la subutilización del recurso forrajero, la predisposición a enfermedades concomitantes y complicaciones en el manejo (4).

El manejo convencional de los nematodos gastrointestinales se ha basado en el control químico a

través de diferentes vermífugos pertenecientes a los benzimidazoles, imidazotiazoles/tetrahidropirimidinas y lactonas macrocíclicas, entre otros (5). Sin embargo, estos productos han traído problemas de contaminación ambiental, ineficacia por resistencia y residuos en leche y carne que pueden generar un impacto negativo sobre la salud del consumidor final y la comercialización a nivel nacional e internacional (5,6).

Recientemente, en el ámbito mundial, se ha desarrollado preocupación por la implementación de sistemas de producción sustentables, con una mínima dependencia de insumos externos que reduzcan el deterioro del medio ambiente. Entre las alternativas disponibles se menciona el empleo de fitofármacos. Diversas especies vegetales han sido empleadas, entre ellas el árbol Neem (5), especie originaria de la India y Birmania donde se ha empleado en la medicina tradicional, y la *Nicotiana tabacum* planta evaluada como fitofármaco en nematodos de ovejas (7). El propósito de este estudio fue evaluar el potencial nematicida de extractos oleosos de *Azadirachta indica* y extractos acuosos de *Nicotiana tabacum* sobre nematodos gastrointestinales de cabras a través de pruebas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental comparativo:

Preparación de extractos

Nicotiana tabacum (tabaco)

Los extractos acuosos de *N. tabacum* fueron obtenidos a partir de hoja de tabaco rubio, seca y molida. Fueron evaluadas diferentes relaciones hoja de tabaco (g)/solvente "agua" (mL), 10:30, 10:50, 10:70, 10:100 con el fin de encontrar el mejor sistema extractor.

Análisis cuantitativo de nicotina

La determinación de nicotina en los extractos acuosos fue realizada utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en el equipo Gilson 170 con detector de arreglo de diodos. Las condiciones de la cromatografía líquida se describen en la tabla 1.

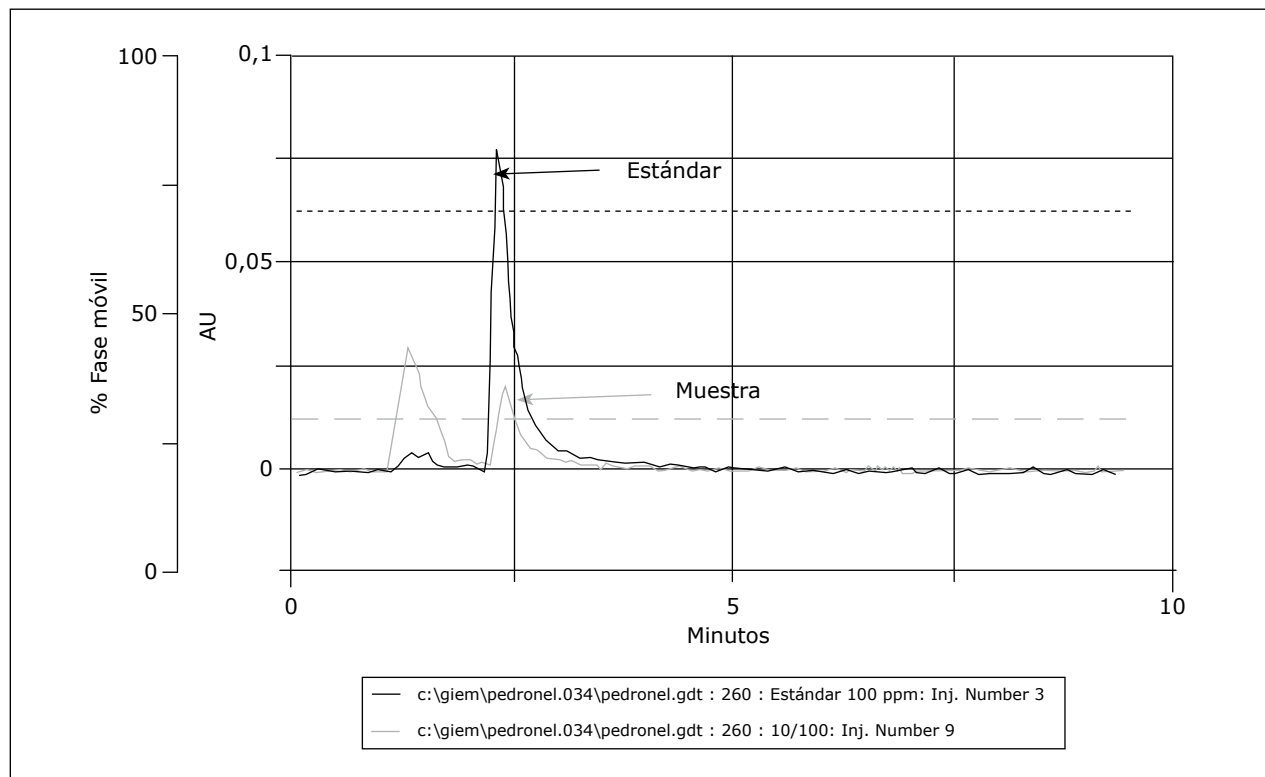
A partir del tiempo de retención de nicotina y del área de integración (figura 1) se evaluaron los es-

tándares de nicotina (por triplicado) en solución acuosa. Estos presentaron una correlación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre concentración de nicotina (N_{Total}) y el área de integración, con un nivel de confianza del 95 %. Para este comportamiento se describió un modelo concentración-respuesta (el coeficiente de correlación para el modelo es 0,999967) expresado por la ecuación $\text{Área} = 210259C_{N_{Total}}$.

Tabla 1. Condiciones de cromatografías para la determinación de nicotina

Descripción	Cantidad
Columna	Phenomenex luna C18 150 × 4,60 mm 5 μm
Volumen de inyección	20 μL
Flujo	1 mL/min
Buffer (pH = 2,6)	KH ₂ PO ₄ / H ₃ PO ₄ (20mM)
Fase móvil	Buffer/acetoneitrilo (70:30)
Longitud de onda	260 nm
Tiempo de corrido	5 min

Figura 1. Cromatograma estándar de nicotina a 260 nm



Azadirachta indica (Neem)

Para la obtención del extracto oleoso de *A. indica* se planteó como alternativa el método de percolación. Este consistió en dejar durante 48 horas la semilla de *A. indica* previamente molida en contacto con éter de petróleo 40/60. Luego se filtró y rotoevaporó el solvente utilizado.

Caracterización del extracto oleoso de *A. indica*

La caracterización del extracto oleoso de *A. indica* se realizó con cromatografía de gases. Las condiciones de la prueba se describen en la tabla 2.

La temperatura inicial de la columna es de 200 °C (por 10 min) y se eleva hasta 220 °C con una razón de 2,0 °C/min.

Preparación de fase oleosa de aceite de Neem

El aceite de Neem fue mezclado lentamente con Tween® 80 a 25 °C. El contenido en la fase oleosa corresponde a: extracto de Neem (80 % g/g) y Tween® 80 (20 % g/g) (8).

Preparación y caracterización de las emulsiones

La emulsión de Neem (12,5 % g/g de fase oleosa) fue preparada a 25 °C, usando como emulsificador un sistema con llave de tres vías acoplado a un filtro (éster de celulosa 0,2 µm) con un límite de presión de 0,51 MPa. La emulsión fue preparada por triplicado.

Obtención y preparación de muestras de materia fecal de caprino para análisis del efecto de los extractos sobre los estadios huevo y larva 3

Toma de muestra de materia fecal

Las muestras de materia fecal fueron tomadas directamente del recto del animal utilizando guantes de látex; las heces fueron depositadas en frascos tapa rosca de 80 ml sin preservante. Se tuvo como criterio de inclusión para la selección de los animales donantes de la muestra de materia fecal animales que llevaran un periodo mayor a dos meses sin desparasitar con químicos.

Determinación de la carga parasitaria

Se seleccionó una muestra de materia fecal de cabra cuya carga parasitaria fuera alta, utilizando la técnica McMaster con la cámara triple-chambered McMaster counting slide (Chalex corporation). Se seleccionó entre muestras de cinco caprinos aquella cuya carga parasitaria fue de 8125 huevos por gramo (hpg) de materia fecal.

Se midieron cuatro gramos de materia fecal, se maceraron y mezclaron con 26 ml de solución de Sheather; luego la mezcla se filtró para separar el material sólido de la solución que contenía los huevos. Se llenó la cámara de McMaster y se hizo el conteo.

Tabla 2. Condiciones de cromatografías para la caracterización del extracto oleoso de *A. indica*

Descripción	Cantidad
Volumen de inyección	1,0 mL
Temperatura del inyector	220 °C
Temperatura del detector	240 °C
Presión de columna	23,04 psi
Velocidad promedio del gas portador	40 mL/min
Flujo de hidrógeno en el detector	45 mL/min
Flujo de aire en el detector	450 mL/min
Flujo de gas compensatorio (N ₂)	45 mL/min
Divisor de flujo	70,2 mL/min
Relación entre flujo divisor y columna	50:1

Obtención de larva 3. Técnica Corticelli-Lai

Se utilizó la técnica de Corticelli-Lai para la obtención del estadio larvario L3. De acuerdo con esta técnica se depositaron aproximadamente 5 g de materia fecal en una caja de Petri de 6 cm de diámetro, y esta a su vez se colocó dentro de una caja de Petri de 9 cm de diámetro que contenía agua a la altura de 5 mm aproximadamente (cámara húmeda). El cultivo se incubó a temperatura ambiente durante quince días. Transcurridos este tiempo se invirtió la caja de Petri pequeña con la muestra, dentro de la caja de Petri grande (migración larvaria L3). Luego de 24 horas, se tomó la fase acuosa con pipeta Pasteur y se depositó en un tubo de ensayo; se centrifugó a 4000 rpm durante cuatro minutos y se descartó el sobrenadante.

Evaluación del potencial ovicida y larvicida

La evaluación se realizó por medio de la dosis letal 50 (DL_{50}) y el tiempo letal 50 (TL_{50}) a través del porcentaje de mortalidad de las larvas y de los huevos en relación con tiempo. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Bioensayos de *N. tabacum* y *A. indica* sobre huevos de nematodos gastrointestinales de cabras

Ortiz y Araque reportaron efecto ovicida de extractos de *N. tabacum* sobre *Drosophila melanogaster* con concentraciones de entre 400 y 1000 ppm, y de extractos de *A. indica* con concentraciones de entre 8 y 1000 ppm (8, 9). Para observar el potencial ovicida de los extractos de *N. tabacum* y *A. indica* se seleccionaron cuatro concentraciones según los estudios anteriormente descritos. Se realizaron cuatro diluciones correspondientes a 1000, 500, 250 y 125 ppm de cada uno de los extractos, por triplicado; luego de agregar cada una de las diluciones a los medios de cultivos correspondientes se dejaron por un periodo de quince días. Posteriormente se evaluó el efecto ovicida de cada uno de los extractos a través del porcentaje de eclosión,

el cual fue determinado por la observación de larvas que se desarrollaron después de la incubación con los extractos. Esta evaluación se realizó en un microscopio óptico Nikon Eclipse E 200 en aumento de 40X. Se utilizaron como controles cultivos de L3 de nematodos sin extractos.

Bioensayos de *N. tabacum* y *A. indica* sobre larvas en el estadio 3 (L3) de nematodos gastrointestinales de cabras

Para observar el potencial larvicida de los extractos de *N. tabacum* y de *A. indica* se prepararon las mismas diluciones utilizadas en la evaluación del efecto ovicida. Los cultivos de nematodos se realizaron por triplicado para cada una de las diluciones. Después de separar las larvas en estadio 3, se tomó una muestra de 20 μ l, se depositó en un portaobjetos y se le adicionó 20 μ l de cada uno de los extractos. A partir de ese momento se realizó la medición del tiempo y concentración de los extractos para determinar el tiempo letal 50 (TL_{50}) y la dosis letal 50 (DL_{50}). La evaluación se realizó en un microscopio óptico Nikon Eclipse E 200 en aumento de 40x. Se utilizaron como controles L3 de nematodos obtenidas de cultivo con 20 μ L de agua destilada.

Plan de análisis

Para el análisis estadístico se utilizó el *software* STATGRAPHICS Plus 5.1 para Windows (Statistical Graphics Corp.), con el fin de analizar las variaciones en los resultados obtenidos a través de un análisis de varianza (Anova). Los análisis se realizaron con un nivel de confianza del 95 % y un nivel de significancia de 5 %.

RESULTADOS

Efecto ovicida

El efecto de soluciones acuosas de Tween 80, de extracto acuoso de *N. tabacum* y de extractos oleosos de *A. indica* (125-1000 ppm) sobre huevos de nematodos se expresan en la tabla 3.

Tabla 3. Efecto de las concentraciones de Tween 80, extracto *N. tabacum* y extracto *A. indica* sobre el número de huevos de nemátodos

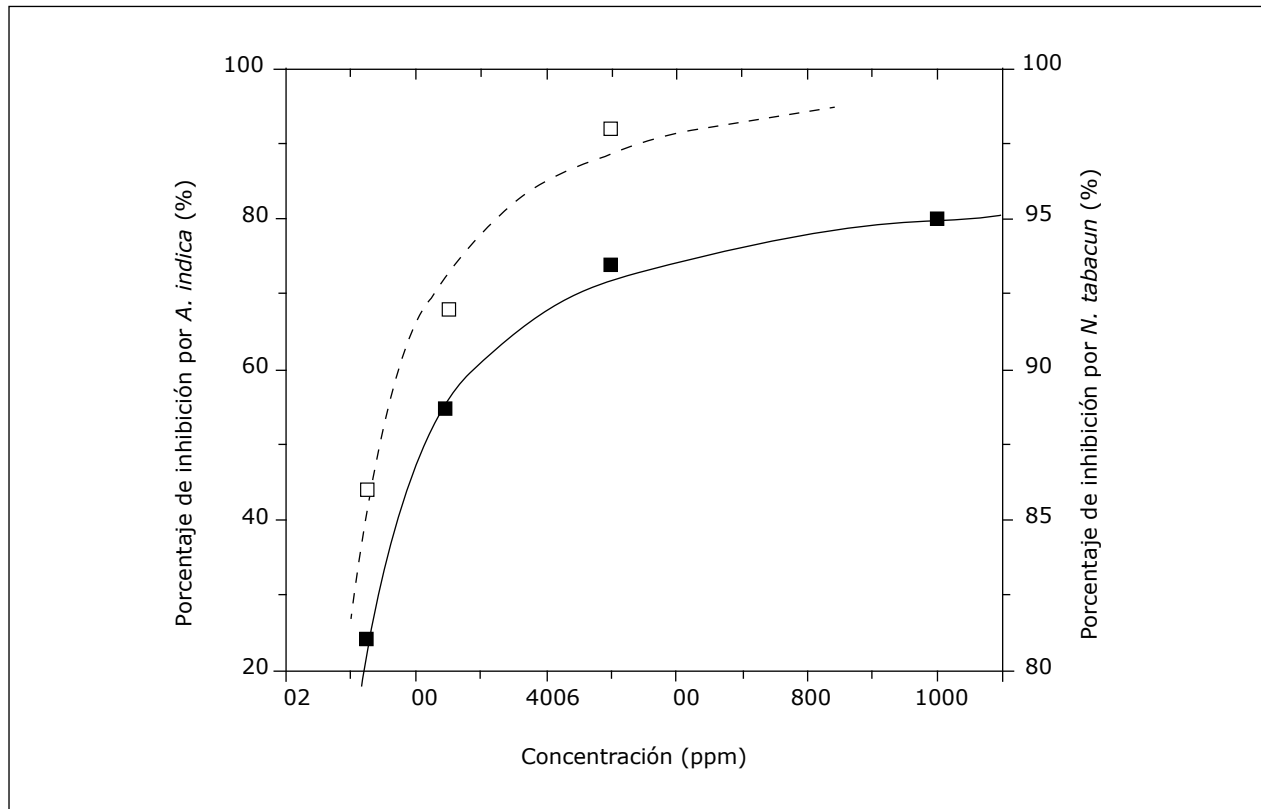
Sistema	125 ppm	250 ppm	500 ppm	1000 ppm	p
Control	172 ± 76*				
Tween 80	143 ± 49*	121 ± 12*	109 ± 22*	137 ± 40*	0,579
Extracto <i>A. indica</i>	131 ± 31*	78 ± 8*	45 ± 4*	34 ± 5*	0,231
Extracto <i>N. tabacum</i>	23 ± 4*	13 ± 3*	3 ± 1*	2 ± 1*	0,003

*Los valores representan el promedio de número de larvas que eclosionaron de huevos observadas en placa.

En la tabla 3 se observa que no hubo efecto ovi-cida estadísticamente significativo ($p = 0,579$) del Tween 80 comparado con el número de larvas del control que eclosionaron (H_2O) 172 ± 76 . El extracto de *A. indica* a 125 ppm no presentó diferencia estadística significativa ($p = 0,231$) en relación con el control. En las demás concentra-

ciones se observa una disminución en el número de larvas que eclosionaron de huevos: entre 55 % y 80 %. Para el extracto de *N. tabacum* se obtuvo una diferencia estadística significativa ($p = 0,003$) con una disminución en la eclosión de huevos del 99 %, como se muestra en la figura 2.

Figura 2. Efecto de la concentración de nicotina en el extracto acuoso de *N. tabacum* (□) y extracto oleoso de *A. indica* (■) sobre huevos de nemátodos



La actividad ovicida del extracto acuoso de *N. tabacum* presentó una correlación estadísticamente significativa ($p = 0,025$) entre la concentración de nicotina (C_{Nicotina}) y el porcentaje de inhibición con un nivel de confianza del 95 %, que describe para este comportamiento un modelo dosis-respuesta expresado por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = 101 - \frac{1922}{C_{\text{Nicotina}}} \quad (1)$$

El coeficiente de correlación para el modelo es 0,9881, lo que indica una buena correlación entre las variables.

La actividad ovicida del extracto oleoso de *A. indica* presentó una correlación estadísticamente significativa ($p = 0,022$) entre la concentración de

Neem (C_{Neem}) y el porcentaje de inhibición con un nivel de confianza del 95 %, describiendo para este comportamiento un modelo dosis-respuesta expresado por la siguiente ecuación:

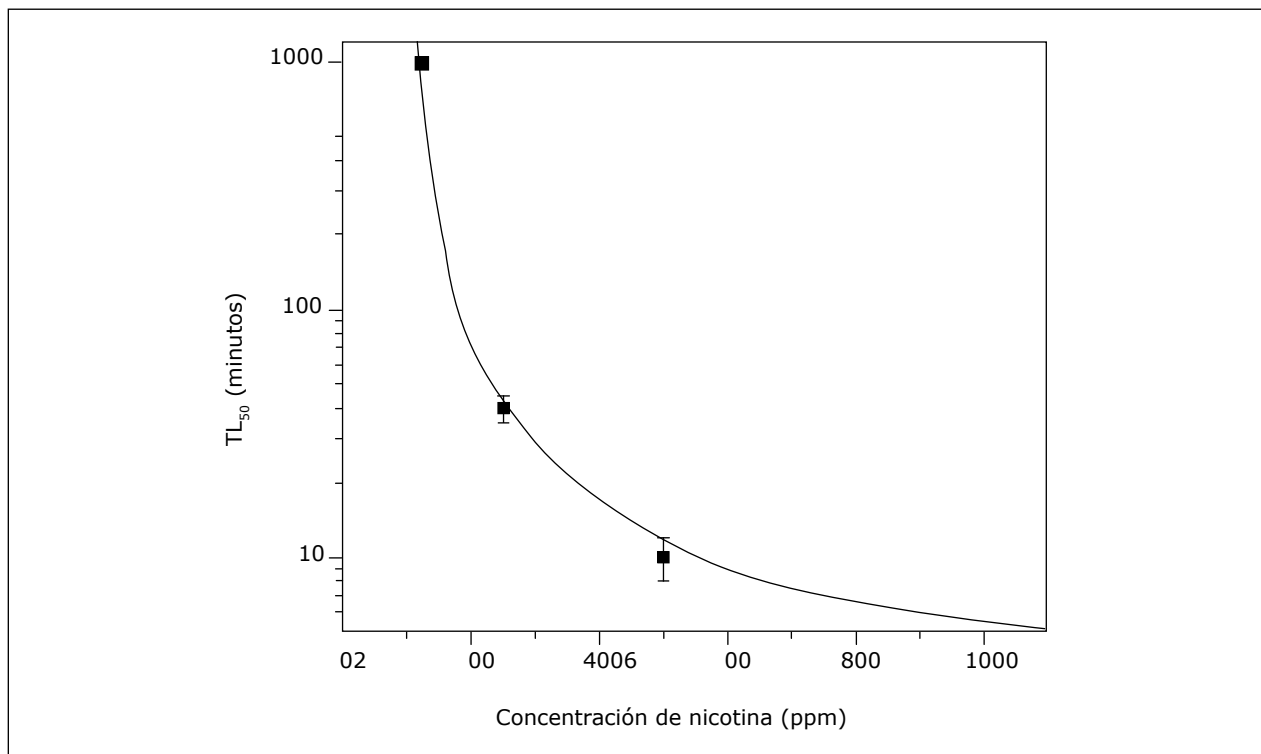
$$\% \text{ inhibición} = 88 - \frac{8130}{C_{\text{Neem}}} \quad (2)$$

El coeficiente de correlación para el modelo es 0,9989, lo que indica una buena correlación entre las variables.

Efecto larvicida

Se evaluaron soluciones acuosas de nicotina (125-1000 ppm) sobre nematodos con el fin de determinar la correlación entre la concentración de nicotina (C_{Nicotina}) y el tiempo letal 50 (TL_{50}) (figura 3).

Figura 3. Efecto de la concentración de nicotina en el extracto acuoso de *N. tabacum* sobre larva 3 de nematodos



Comparando los resultados con el control, se presentó una correlación estadísticamente significativa ($p = 0,039$) entre la concentración de nicotina (C_{Nicotina}) y el TL_{50} , con un nivel de confianza del 95 %, que describe para este comportamiento un modelo dosis-respuesta expresado por la siguiente ecuación:

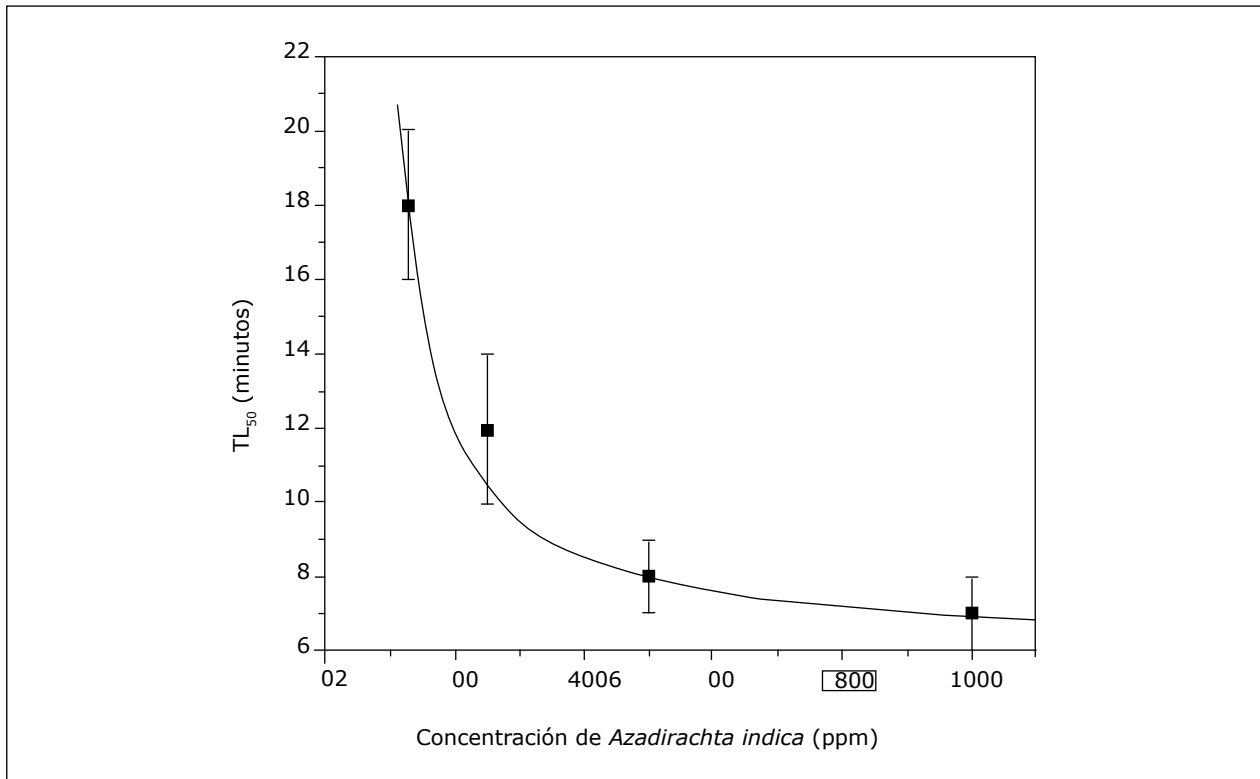
$$TL_{50} = \exp\left(1 + \frac{712}{C_{\text{Nicotina}}}\right) \quad (3)$$

El coeficiente de correlación para el modelo es 0,9934, lo que indica una buena correlación entre las variables.

A partir de estos resultados, se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,566$) en la actividad nematocida en el rango de concentraciones 500-1000 ppm, en la cual se presentó $TL_{50} = 8 \pm 1$ min. A partir de la ecuación 3 se puede predecir que para un tiempo de 60 min, la concentración letal mínima es de aproximadamente de 230 ppm de nicotina y, si se observa la figura 3, a 125 ppm se presentó un TL_{50} de 1000 minutos, en el cual la muerte de los nematodos no es atribuida al extracto sino a otros factores tales como la desecación.

Se evaluaron emulsiones de extractos oleosos de *A. indica* (125-1000 ppm) sobre nematodos con el fin de determinar la correlación entre la concentración de Neem (C_{Neem}) y el tiempo letal 50 (TL_{50}) (figura 4).

Figura 4. Efecto de la concentración de extracto de *A. indica* sobre larva 3 de nematodos



Al comparar los resultados del blanco (Tween en solución acuosa) con la evaluación del extracto oleoso en un periodo de 24 horas, se obtuvo una correlación estadísticamente significativa ($p = 0,024$) entre la concentración de Neem (C_{Neem}) y el TL_{50} , con un nivel de confianza del 95 %, que describe para este comportamiento un modelo dosis-respuesta expresado por la siguiente ecuación:

$$TL_{50} = \exp\left(1,8 + \frac{136}{C_{Neem}}\right) \quad (4)$$

El coeficiente de correlación para el modelo es 0,9875, lo que indica una buena correlación entre las variables.

A partir de estos resultados se puede observar que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,789$) en la actividad nematicida en el rango de concentraciones 500-1000 ppm en la cual se presentó un $TL_{50} = 8 \pm 1$ min. A partir de la ecuación 4 se puede predecir que para un tiempo de 60 minutos, en el cual se garantiza que no hay actividad de nematodos, la concentración letal mínima es de aproximadamente 60 ppm de extracto de Neem.

DISCUSIÓN

Los experimentos realizados para evaluar el potencial larvicida y ovicida de extractos oleosos de *A. indica* y extractos acuosos de *N. tabacum* en el control de nematodos gastrointestinales presentes en cabras evidenciaron resultados satisfactorios.

La planta *A. indica* ha sido descrita como bioinsecticida, con control sobre más de 400 especies de insectos, arañas y nematodos. Las sustancias contenidas en el Neem afectan la alimentación, el crecimiento, la metamorfosis, la fecundidad, la esterilidad de los huevos, la oviposición, la longevidad,

las conductas de cortejo y apareamiento, los sentidos de la vista, el olfato, las habilidades de saltar, escalar y volar (10,11). Sin embargo, su eficiencia en el control de nematodos no es concluyente, lo cual puede estar relacionado con el tipo de metodología empleada en cada estudio (12-14).

Costa y colaboradores (2006) evaluaron la actividad antihelmíntica de *A. indica* en ovejas infectadas naturalmente con nematodos gastrointestinales y no encontraron actividad antihelmíntica al ser utilizadas las hojas en la dieta de las ovejas. Estos hallazgos podrían estar relacionados con la metodología implementada dado que se utilizaron dosis de 0,1 g diarios y hojas secas de la planta (12); resultados que contrastan con los obtenidos en este estudio, donde la actividad antihelmíntica se evidenció tanto en estadio de huevo como en el estadio larva 3 al ser expuestos al extracto obtenido de la semilla (14). Este resultado puede estar relacionado con la diferencia en la concentración de *Azadirachta indica* según la parte de la planta. Sundaram, citado por Chagas y colaboradores (14), encontró que la *Azadirachta indica* se encuentra en las hojas de la planta en una concentración aproximada de 0,59 mg/g, valores que contrastan con concentraciones aproximadas a los 24,85 mg/100 g en la semilla; por lo tanto, la semilla es considerada la parte de la planta con mayor contenido de ácidos grasos y metabolitos con actividad nematicida.

En concordancia con la metodología de este estudio, en donde el extracto se obtuvo a partir de la semilla de Neem, resultados satisfactorios fueron obtenidos en estudios *in vivo* en ovejas utilizando la semilla de Neem en polvo, donde se halló una disminución en el número de huevos de nematodos y un incremento en la ganancia de peso de los animales (15).

Estudios *in vitro* hechos por Iqbal y colaboradores (16) sobre el efecto nematicida de *Nicotiana*

tabacum con estadios maduros de *Haemonchus contortus* obtuvieron una letalidad cercana al 50 % después de una hora aproximadamente. Esos resultados contrastan con los obtenidos en este estudio, donde el efecto nematicida sobre huevos alcanzó la inhibición del desarrollo de las larvas en el 99 % de los huevos y con las larvas 3 se obtuvo un $TL_{50} = 8 \text{ min} \pm 1$, con concentraciones de 500 y 1000 ppm. Estos resultados muestran al extracto acuoso de *N. tabacum* como una alternativa para el control de las nematodosis caprinas.

El potencial nematicida de ambos extractos sobre los huevos de nematodos está determinado por la interacción entre los extractos y la estructura de los huevos, dada la naturaleza química de estos. La cubierta que conforma el huevo de algunos nematodos (estrongilidos y ancilostomidos) está formada por tres capas: una cubierta o capa lipídica, una capa media denominada capa quitinosa, y otra capa externa o capa vitelina que está compuesta en su mayoría por proteínas. Por tanto, la penetración de ambos extractos puede ser el resultado de una presión física y de la actividad hidrolítica en la cubierta (3).

Al evaluar el efecto larvicida se pudieron determinar las correlaciones de ambos extractos con el tiempo letal 50 (TL_{50}), encontrando que al aplicar *N. tabacum* sobre el portaobjetos que contenía las larvas activas, el extracto pudo haber afectado el sistema nervioso del nematodo, dado que se observó la parálisis o disminución paulatinamente del movimiento de las larvas hasta morir. Además se comparó el tiempo letal 50 con el control, el cual solo contenía agua, y se observó que las larvas en condiciones naturales solo mueren debido a la falta de humedad en el portaobjetos. En condiciones naturales, las larvas en estadio de L3 pueden sobrevivir en las pasturas varios meses. Este tiempo varía y está condicionado según la especie de la

larva por la resistencia a las condiciones de temperatura y humedad (17).

CONCLUSIONES

A partir de los resultados encontrados en este trabajo se puede concluir que los extractos oleosos de *A. indica* y acuosos de *N. tabacum* evidenciaron potencial nematicida sobre los estadios de desarrollo huevo y L3 de nematodos del grupo de los trichostrongilidos. Son necesarios estudios *in vivo* sobre la actividad nematicida de los extractos oleosos de *A. indica* y acuosos de *N. tabacum* y sobre su toxicidad en rumiantes para poder evaluar su valor terapéutico en condiciones naturales.

REFERENCIAS

1. Felix L, Felix D, Rubio M, Mendez RD, Trujillo AM. Análisis comparativo de carnes y productos cárnicos de cabrito alpino francés y alpino francés (3/4) con boer (1/4). Técnica pecuaria en México, Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias México. Redalyc, Universidad Autónoma del Estado de México. 2001;39(003):237-244.
2. Espinal CF, Martínez H, Amézquita JE. La cadena de ovinos y caprinos en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo No. 125 [internet]. 2006 [citado 2011 jul 24]. Disponible en: http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/20078611357_caracterizacion_ovinosycaprinos.pdf
3. Cordero M, Rojo FA. Parasitología Veterinaria. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1999.
4. Suárez VH, Olaechea FV, Rossanigo CE, Romero JR. (Ed.). Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes en el cono sur de América. Anguil: Estación Experimental Anguil-INTA; 2007.
5. Mederos A, Waddell L, Sánchez J, Kelton D, Peregrine AS, Menzies P, Vanleeuwen J, Rajic A. A sys-

- tematic review-meta-analysis of primary research investigating the effect of selected alternative treatments on gastrointestinal nematodes in sheep under field conditions. *Prev Vet Med.* 2012;104:1-14.
6. Hoste H, Sotiraki S, Torres-Acosta JF. Control of Endoparasitic Nematode Infections in Goats. *Vet Clin Food Anim.* 2011;27:163-173.
 7. Zaman MA, Iqbal Z, Abbas RZ, Khan MN, Muhammad G, Younus M, Admed S. In vitro and in vivo acaricidal activity of a herbal extract. *Vet Parasitol.* 2012;186:431-436.
 8. Ortiz YA. Emulsiones O/W de extractos oleosos de *Azadirachta indica* y *Nicotiana tabacum* con actividad repelente e insecticida [tesis pregrado]. Medellín: Universidad de Antioquia; 2007.
 9. Araque P. Formulaciones insecticidas de Nicotina: caracterización estructural y su efecto en la actividad biológica [tesis pregrado]. Medellín: Universidad de Antioquia; 2008.
 10. El-Shafie HAF, Basedow T. The efficacy of different neem preparations for the control of insects damaging potatoes and eggplants in the Sudan. *Crop Protection.* 2003;22:1015-1021.
 11. Hasan F, Ansari MS. Toxic effects of neem-based insecticides on *Pieris brassicae* (Linn.). *Crop Protection.* 2011;30:502-507.
 12. Costa CT, Bevilaqua CM, Maciel MV, Camurça-Vasconcelos AL, Morais SM, Monteiro MVB, Farias VM, da Silva MV, Souza MMC. Anthelmintic activity of *Azadirachta indica* A. Juss against sheep gastrointestinal nematodes. *Vet Parasitol.* 2006;137:306-310.
 13. Boeke SJ, Boersma MG, Alink GM, van-Loon JJA, van-Huis A, Dicke M, Rietjens I. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *J Ethnopharmacol.* 2004;94:25-41.
 14. Chagas ACS, Vieira LS, Freitas AR, Araújo MRA, Araújo-Filho JA, Araguao WR, Navarro AMC. Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and the homeopathic product Fator Vermes1 in Morada Nova sheep. *Vet Parasitol.* 2008;151(1):68-73.
 15. Ahmed NU, Mostofa M, Awal MA, Alam MN. Comparative efficacy of modern anthelmintics with that of neem seeds against gastro-intestinal nematodiasis in sheep. *Bangladesh Vet J.* 1994;28:21-23.
 16. Iqbal Z, Lateef M, Abdul A, Ghayur MN, Gilani AH. In vitro and In vivo anthelmintic activity of *Nicotiana tabacum* L. leaves against gastrointestinal nematodes of sheep. *Phytother. Res.* 2006;20:46-48.
 17. Morgan ER, van-Dijk J. Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Vet Parasitol.* 2012;189:8-14.