

ARTÍCULO ORIGINAL

Actividad antihelmíntica *in vitro* de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario

Mireisy Barrabí -Puerta^I, J. Arece-García^{II}

^ICentro de Investigaciones de Bioalimentos. Km.1,5 Carretera Patria. CP.67210. Morón, Ciego de Ávila. Cuba.

Correo electrónico: mireisy@ciba.fica.inf.cu. ^{II}Estación Experimental de Pastos y Forrajes «Indio Hatuey».

Central España Republicana, CP 44280. Matanzas. Cuba.

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos acuosos de hojas y semillas de Neem (*A. indica*) se diseñó un experimento que estudió el efecto de la adición del extracto acuoso en la eclosión de huevecillos y el desarrollo larvario de estrongílidos gastrointestinales. Se prepararon tres concentraciones de extractos acuosos (500, 250 y 125 mg/ml) a partir de hojas y semillas secadas a la sombra. Se realizó una prueba *in vitro* de eclosión de huevecillos y otra de inhibición del desarrollo larvario. El extracto de semilla fue más efectivo pues en dosis de 500 mg/ml logró reducir la eclosión de huevecillos en un 99.1% sin diferencias significativas ($p < 0.01$) con el Albendazol y en un 88.8% el desarrollo de las larvas hacia L3. Por su parte, el extracto de hojas inhibió más de un 80% la eclosión de huevos e interfirió en el desarrollo de las larvas en más de un 70%. Los resultados indican que el árbol del Neem puede ser empleado como estrategia no farmacológica para el control parasitario, sin embargo se necesita de estudios *in vivo* y pruebas de toxicidad.

Palabras clave: *Azadirachta indica*, Neem, Haemonchus, ovinos, *in vitro*.

***In vitro* antihelmintic activity of an accuos extract of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaves and seeds. I. Inhibition of eggs hatching and larval development**

ABSTRACT: In order to evaluate the *in vitro* antihelmintic activity of an accuos extract of Neem (*Azadirachta indica*) leaves and seeds, two trials were designed to evaluate its effect on egg hatching and larval development of gastroduodenal strongyles. Three extract concentrations were prepared (500, 250 and 125 mg/ml) to perform an egg hatch assay and larval development test. The seed extract was the most effective at 500 mg/ml reducing egg hatching at 99.1% without differences ($p < 0.01$) with the control group (Albendazol); the larval development test was reduced at 88.8% at this same dose. The leaf extract inhibited egg hatching at 80% and the larval development in more than 70%. These results suggest that *A. indica* extracts may be useful in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants; however, *in vivo* studies and toxicological evaluation are still necessary.

Key words: *Azadirachta indica*, Neem, Haemonchus, ovine, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Las parasitosis por nematodos gastrointestinales de rumiantes representan un serio problema a nivel mundial ya que afectan la productividad del hospedador causando reducciones en las tasas de crecimiento, en la fecundidad e incremento en la mortalidad. Estas

constituyen una de las enfermedades que mayor impacto económico ocasiona en los sistemas de producción de pequeños rumiantes (1,2).

El control de las parasitosis, por lo general ha recaído en el uso indiscriminado de fármacos antiparasitarios. Esta situación ha favorecido la apari-

ción de resistencia a estos antiparasitarios, la que constituye una de los obstáculos de mayor peso para el control efectivo de las infestaciones por helmintos (3). En Cuba se ha diagnosticado la resistencia a los antiparasitarios (4) por lo que se necesita un enfoque integrador para el control parasitario.

Internacionalmente se reconoce la necesidad de encontrar alternativas para el control de los nematodos gastrointestinales que puedan reducir el uso de antihelmínticos. Varias opciones están siendo investigadas, dentro de las cuales se pueden citar la metodología FAMACHA (5), la producción de vacunas contra helmintos (6), estudios genéticos tendientes a encontrar animales resistentes a helmintos (7), así como la influencia de la suplementación proteica y energética en la dieta para modular la respuesta inmunológica de los animales (8).

Otra estrategia alternativa para el control de parásitos gastrointestinales la constituye el uso de las plantas, ya sea por la presencia en ellas de metabolitos secundarios a los que se le atribuyen propiedades antiparasitarias o por la acción propiamente dicha de sus principios activos, los que pueden constituir una alternativa de control por su aplicabilidad desde el punto de vista orgánico, sustituyendo el uso de químicos sintéticos (9).

En Cuba existen experiencias del uso de fitofármacos en el control parasitario, utilizando la *Bromelia pinguin* (Piña de ratón) la cual mostró ser efectiva ante *Haemonchus* spp. en terneros (10); también se evaluó en infestaciones por *Oesophagostomum columbianum* en ovinos en México con gran impacto (11). En Cuba se reportó resultados positivos en la reducción de la carga parasitaria con el uso de hojas secas deshidratadas de *A. indica* (Neem) incluidas en bloques nutricionales para bovinos (12).

El árbol del Neem, está presente en muchas explotaciones de ovino y resultados experimentales muestran que produce principios activos efectivos, particularmente contra endoparásitos (13,14,15,16).

Los ensayos *in vitro* son apropiados para evaluar especies de plantas ya que son rápidos de realizar y económicos, comparados con los ensayos *in vivo*, además permiten una más rápida respuesta en la realización de *screening* en la búsqueda de plantas con propiedades antiparasitarias (17). Se ha encontrado que existe una correlación significativa entre los test *in vitro* e *in vivo* en estudios de eficacia de los antihelmínticos y resistencia de los parásitos a las drogas sintéticas (9).

Este nuevo escenario y la urgencia de afrontar la problemática de la resistencia parasitaria, nos ha con-

vocado para trabajar en la búsqueda de alternativas o soluciones que contribuyan a mantener niveles aceptables de infestación parasitaria por nematodos gastrointestinales en los ovinos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos acuosos de hojas y semillas de Neem en infestaciones mixtas de estrongílicos gastrointestinales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización. El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Parasitología de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes «Indio Hatuey». Las hojas y semillas se colectaron en áreas del Centro de Investigaciones de Bioalimentos (CIBA) de la provincia Ciego de Ávila de una plantación con más de 15 años de establecida.

Colección del material experimental y preparación de los extractos. Las hojas se cosecharon en horas de la mañana y se trasladaron a las instalaciones del CIBA donde se secaron a la sombra. En el caso de las semillas se cosecharon en la época de fructificación y se secaron en las mismas condiciones. Posteriormente se molieron en un molino de martillo con tamaño de partícula de 2 mm.

Se preparó una solución madre en la cual se empleó una relación 1:1 (v/m) con PBS. Para ello se maceró por 4 horas la harina de hojas o semillas con el 50% del PBS a emplear en una zaranda mecánica. Transcurrido ese tiempo se filtró al vacío y al residuo se le aplicó el 50% restante del PBS y se maceró en igualdad de condiciones por dos horas. De la solución madre obtenida se prepararon tres concentraciones: 500, 250 y 125 mg/ml.

Prueba de eclosión de huevos (PEH). Se empleó una modificación de la técnica propuesta por Marie-Magdeleine *et al.* (18) para estudios *in vitro*. Para ello se realizaron seis tratamientos que corresponden a las tres concentraciones para semillas (S) (S-500, S-250 y S-125 mg/ml), tres concentraciones para hojas (H) (H-500, H-250 y H-125 mg/ml), PBS (control positivo, solvente de los extractos), tres concentraciones de Albendazol (ABZ, control positivo) (ABZ-50, ABZ-25 y ABZ-12,5 mg/ml) y Dimetilsulfóxido, DMSO (control positivo, solvente del ABZ). Se colectaron huevos de estrongílicos de animales infestados y se depositaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos para ser enfrentados con las diferentes soluciones o tratamientos experimentales sobre la base de un diseño completamente aleatorizado con seis réplicas por tratamiento. Se incubaron por 48h y transcurrido ese tiempo se detuvo la eclosión con 100 µl de solución de

Lugol. Se contaron larvas y huevos en 20 alícuotas de 10 µl, y se determinó el porcentaje de eclosión.

Prueba de desarrollo larvario (PDL). Para ello se empleó la técnica propuesta por Marie-Magdeleine (19). Se emplearon los mismos tratamientos que en la PEH. Su principio se basa en exponer las soluciones a evaluar en huevos eclosionados para determinar el efecto en el desarrollo de las larvas desde estadios L1/L2 hacia L3 o larvas infestantes. Se obtuvieron las L1/L2 a través del procedimiento descrito para PEH y se alimentaron con una solución nutritiva. A las 48h se aplicaron las soluciones a evaluar y transcurridos 8 días se detuvo el proceso de muda con 100 µl de solución de Lugol. Se contaron las L1/L2 y las L3 y se determinó el porcentaje de las larvas infestivas.

Análisis estadístico

Los datos se procesaron con el paquete estadístico SPSS® versión 15.0 para Windows®. Los valores porcentuales (X) de cada prueba se transformaron ($\arcseno\sqrt{X}$) para la realización de un análisis de varianza de clasificación simple mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Se comprobó la homogeneidad de las varianzas y la distribución normal de los datos. Las diferencias entre las medias se realizaron mediante la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El árbol del Neem es una planta versátil que ha mostrado resultados interesantes en la lucha integrada de plagas de diferentes cultivos y ectoparásitos en

el sector ganadero (20, 21). Existen estudios puntuales que han señalado que también poseen actividad nematocida (16, 22).

En la figura 1 se muestran los porcentajes de eclosión de los huevecillos en los extractos acuosos de hojas y semillas de Neem. Los extractos de semilla fueron más eficaces ($p < 0,05$) que los de hojas en la inhibición de la eclosión de los huevecillos. El grupo control positivo empleado (PBS) permitió el desarrollo de los huevos a larvas, mientras que, como era de esperar, el control positivo (Albendazol) inhibió la eclosión de los huevecillos y el desarrollo de las larvas de estadios L1/L2 a L3.

En el caso de las hojas de Neem se obtuvo un efecto inverso en el porcentaje de eclosión, es decir que en la medida que se incrementó la concentración del extracto acuoso disminuyó la eclosión de huevecillos ($p < 0,01$), mientras que en las semillas se obtuvo un efecto directo, pues en la medida que aumentó la dosis se incrementó la inhibición de la eclosión de huevecillos.

En estudios desarrollados en Brasil (16) se obtuvo que el uso de extractos acuosos de hojas de Neem interfirieron la capacidad de eclosión de huevecillos en cultivos de heces, sin diferenciar entre *H. contortus* y *T. colubriformis* y atribuyen estos efectos a la presencia de azadiractina. Esta sustancia o principio activo posee una mayor concentración en semillas que en hojas (23), lo que posiblemente intervino en que las concentraciones más elevadas de extractos en semillas tuvieron los mayores porcentajes de inhibición de la eclosión sin diferencias significativas con el Albendazol. En contraste, se apreció que el extracto

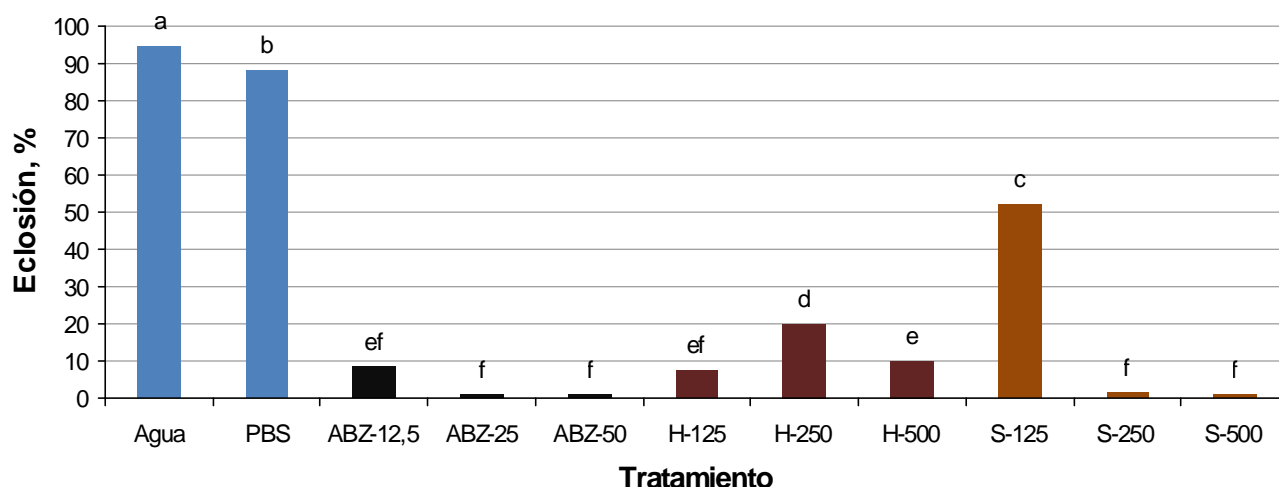


FIGURA 1. Porcentaje de eclosión de huevecillos de extracto acuoso hojas (H) y semillas (S) de árbol del Neem en diferentes concentraciones./ Egg hatching percentage of accuos extract in leaves (H) and seeds (S) of the Neem tree at different concentrations.

etanólico de Neem inhibió en un 97.7% la eclosión de huevecillos en dosis de 3.12 mg/mL y considera que posiblemente la acción ovicida está relacionada con otros compuestos secundarios como los triterpenoides y los taninos condensados (22).

En un estudio desarrollado por Pesoa (24) obtuvo con azadirachtina aislada de semillas de Neem, en dosis de 10 mg/ml, una reducción de la eclosión de huevecillos de un 68.3%, situación en la que se sustenta la hipótesis de Costa *et al.* (22) de la existencia de otros metabolitos secundarios en la inhibición de la eclosión de los huevecillos. Los resultados obtenidos en la presente investigación son superiores a los encontrados por Ahmed *et al.* (25) quienes encontraron valores entre 35 y 40% de eficacia en la eclosión de huevecillos.

El ensayo de desarrollo larvario (Figura 2) mostró que los controles a base de agua y PBS presentaron porcentajes de recuperación de larvas superiores al 80%, lo que indica que estas lograron sobrevivir y mudar a larvas del tercer estadio en estas condiciones. En el caso del grupo Albendazol se inhibió el desarrollo y muda de las larvas con diferencias significativas ($p < 0.01$) con el resto de los extractos evaluados.

El extracto de hojas no mostró una típica respuesta dosis dependiente pues en la concentración más baja se logró el más bajo porcentaje de larvas recuperadas ($p < 0.05$). En el caso del extracto de semillas se obtuvo una respuesta típica dosis-dependiente, pues en la concentración de 500 mg/ml se halló la menor cantidad de larvas.

Estos estudios coinciden con los realizados por Costa *et al.* (22) quienes hallaron porcentajes de eficacia en el desarrollo larvario al usar extractos de partes aéreas en etanol y acetato de etilo (dosis de 50 mg/ml) de 68.1 y 87.1% para cada uno, respectivamente.

Algunos estudios *in vivo* en el empleo del Neem como antiparasitario han sido contradictorios. En estudios *in vivo* en ovinos infestados con *H. contortus* y *T. colubriformis* que recibieron extractos etanólicos de semillas de árbol del Neem en dosis de 3 mg/kg de peso vivo, al decimotercer día posterior al tratamiento se obtuvo una eficacia de 5.2% en la reducción del conteo fecal de huevos (CFH) y, una reducción en el conteo de parásitos adultos de 0% (26). Por su parte, Githiori *et al.* (27) al suministrar hojas frescas de esta planta por tres semanas, obtuvo una reducción de consumo voluntario e incremento del CFH.

Estas diferencias encontradas en la capacidad ovicida y de inhibición del desarrollo larvario en diferentes estudios *in vitro* pudiera estar relacionado con el origen del material vegetal. Los constituyentes químicos de una planta pueden variar considerablemente entre plantas de una misma especie debido a diferencias genéticas y medioambientales, estado fenológico, proceso de colección y secado de la muestra, técnica de extracción, entre otras (28). En este sentido se recomiendan estrictos controles de la calidad de los materiales a evaluar (26).

El presente estudio indica la presencia de actividad antihelmíntica *in vitro* de extractos acuosos de hojas y

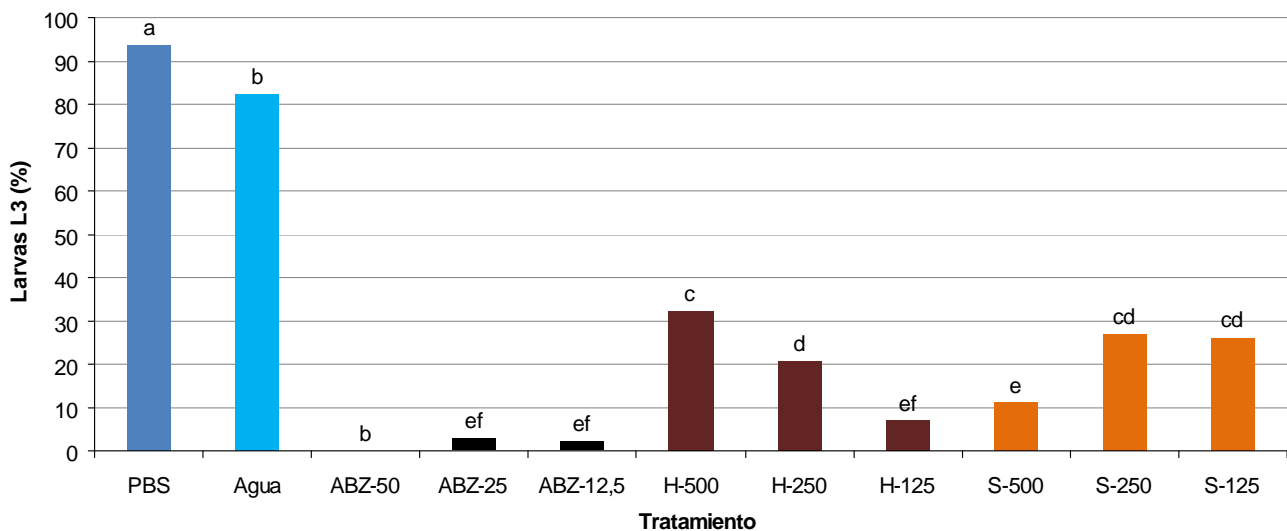


FIGURA 2. Porcentaje de larvas L3 con extracto acuoso hojas (H) y semillas (S) de árbol del Neem en diferentes concentraciones. / Larval percentage (L3) with the accuos extract in leaves (H) and seeds (S) of the Neem tree at different concentrations.

semillas de Neem, lo cual conlleva a la realización de estudios *in vivo* en ovejas y cabras.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los técnicos de laboratorio Marisol Ramírez Guerra, Michael Molina y Yaíma Roche por la colaboración en el desarrollo de este trabajo. Las investigaciones fueron parcialmente financiadas por la International Foundation for Science (B/4610).

REFERENCIAS

- McLeod RS. Cost of major parasites to the Australian livestock industries. *International J Parasitol.* 1995;25:1363-1367.
- Fiel C, Steffan P. Epidemiología de los nematodos gastrointestinales en la pampa húmeda. En: Nari A, Fiel, Editores. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control.* Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay. 1994.
- FAO. Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. FAO, Salud Animal. 2003.
- Arece J, Mahieu M, Archimède H, Aumont G, Fernández M, González, E. et al. Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research.* 2004;5(1-2):61-67.
- Larsen M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology.* 2000;120:121-131.
- Vercruyse J, Schetters TPM, Knox DP, Willadsen P, Claerebout E. Control of parasitic disease using vaccines: an answer to drug resistance? *Revue Scientifique et Technique - Office International des Épizooties.* 2007;26:105-115.
- Gasbarre LC, Miller JE. Genetics of helminth resistance. En: Axford RFE, Bishop SC, Nicholas FW, Owen JB, Editores. *Breeding for disease resistance in farm animals.* CAB International, Wallingford, UK. 2000. 129-152.
- Houdijk JGM, Kyriazakis I, Kidane A, Athanasiadou, S. Manipulating small ruminant parasite epidemiology through the combination of nutritional strategies. *Vet Parasitol.* 2012;186:38-50.
- Athanasiadou S, Kyriazakis I. Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2004;63:631-639.
- Marrero E, García T, Rodríguez-Diego JG, Figueredo MA, Pérez R. Actividad antihelmíntica de *Bromelia pinguin* L (Bromeliaceae) en terneros. *Rev Salud Anim.* 1994;16(1-3):63-68.
- Olivares J. *Oesophagostomum columbianum*: Puesta en evidencia, caracterización y control en ovinos de la región de Huichapán. Estado de Hidalgo. México (tesis doctoral). Universidad Agraria de la Habana. Mayabeque, Cuba. 2001.
- Devon R. Eficacia del Extracto Acuoso de hojas del Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos Pelibuey (tesis de grado). Universidad Agraria de La Habana. 2007.
- Pietrosemoli S, Olavez R, Montillo T, Campos Z. Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de nematodos gastrointestinales de bovinos a pastoreo. *Revista de la Facultad de Agronomía.* 1999;16:220-225.
- Salazar E. Manejo Sanitario con productos Naturales Zábila (*Aloe vera*) y Nim (*Azadirachta indica*). En: Pariacote, FA, Editor. Programa Caprino Nacional. Fundacite Falcón. Memoria. 1999.
- Salazar E. Endoparasite control with Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). 8th International Conference on Goat. South Africa, 4 -9 Julio, 2004.
- Chagas AC, Vieira L. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 2007;44(1):49-55.
- Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol.* 2006;139:308-320.
- Marie-Magdeleine C, Udino L, Philibert L, Bocage B, Archimede H. In vitro effects of cassava

- (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 2010;173(1-2):85-92.
19. Marie-Magdeleine, C. Etude de ressources végétales tropicales pour un usage anthelminthique en élevage de ruminants (tesis doctoral). Universidad de las Antillas, Guadalupe F.W.I. 2009.
 20. Giglioti R, Forim MR, Oliveira HN, Chagas ACS, Ferrezini J, Brito LG et al. In vitro acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol.* 2011;181(2-4):309-315.
 21. Ahmad N, Ansari M.S, Hasan F. Effects of neem based insecticides on *Plutella xylostella* (Linn.). *Crop Protection.* 2012;34:18-24.
 22. Costa CTC, Bevilaqua CML, Camurça-Vasconcelos AL, Maciel MV, Morais SM, Castor CMS, Braga RR, Oliveira LMB. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research.* 2008;74:284-287.
 23. Estrada J. Foliar Nim HM. Antiparasitario Natural. Proyecto ecológico Nim INIFAT, La Habana. 2006.
 24. Pessoa LM. Actividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus* (tesis de maestría). Universidade Estadual do Ceará. Brasil. 2001.
 25. Ahmed NU, Mostofa M, Awal M, Awal A, Alam MN. Comparative efficacy of modern anthelmintics with that of neem seeds against gastrointestinal nematodiasis in sheep. *Bangladesh Veterinary Journal.* 1994;8:21-23.
 26. Hördegen P, Hertzberg J, Heilmann J, Langhansd W, Maurera V. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially infected lambs. *Vet Parasitol.* 2003;117:51-60.
 27. Githiori JB, Höglund J, Waller PJ, Baker RL. Evaluation of anthelmintic properties of some plants used as livestock dewormers against *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Parasitol.* 2004; 129:245-253
 28. Cromm EM. Documenting and evaluating herbal remedies. *Economy Botany.* 1983;37(1):13-27.

Recibido: 26-6-2012.

Aceptado: 28-10-2012.