

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO
DE LICENCIADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA



TEMA: EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA-MINSA. JULIO-DICIEMBRE, 2015.

Autores:

Br. Nahúm Levy Alemán Alvarado

Bra. Xochith Karina Gurdían Rosales

Bra. Heyssel Raquel Ortiz Machado

Tutora:

Lic. Sara Negaresh

Asesora Técnica:

Lic. Emperatriz Lugo

Asesora Metodológica:

MSc. María Nathalia Gutiérrez

Managua, Marzo 2016

DEDICATORIA

Acto que dedico a mi creador, Jehová (YHWH) **por haberme permitido la vida y sus bendiciones.** Además de renovarme la fe y las fuerzas, en los momentos más difíciles mi mejor amigo fiel. “Digno eres tú, Jehová nuestro Dios mismo, de recibir la gloria, la honra y el poder, porque tú creaste todas las cosas, y a causa de tu voluntad existieron y fueron creadas” (Revelación: 4,11)

Nahúm Levy Alemán Alvarado

DEDICATORIA

A Dios

Por ser la luz que guía mi camino y ser a quien le debo todo lo que he logrado en la vida, por darme la fuerza para poder culminar mi carrera profesional, por darme sabiduría y paciencia en momentos difíciles sin duda todo se lo debo a él, su fidelidad y misericordia son incomparables.

A mi madre

Sr. Mayra Rosales por ser mi apoyo en todo momento, por sus consejos para ser mejor cada día, comprenderme y dar lo mejor de sí para que yo pudiera salir adelante en la vida.

Xochilt Karina Gurdíán Rosales

DEDICATORIA

ACTO QUE DEDICO A DIOS, por él amor tan grande que por mí él ha
tenido, en este sendero de vida es mi confianza, guía, luz, sostén y mi redentor.
Porque todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

Heyssel Raquel Ortiz Machado.

AGRADECIMIENTO

A mis padres en especial a mi maravillosa madre, *Elena Alvarado* por su amor incondicional, y su empeño en inculcarme sus sabios consejos.

A todos mis seres *queridos y amigos* que de muchas maneras son partícipes de la culminación de esta etapa.

Agradezco de corazón a mi tutora *Líc. Sara Negaresh* por su excelencia y dedicación en este trabajo.

A nuestra querida *Msc. Natalia Gutiérrez Arias* por sus valiosos consejos y compartir su experiencia en este proyecto.

A mis apreciadas colegas *Heyssel Ortiz y Xochilt Gurdían* por haberme brindado su confianza, amistad, durante cinco años de carrera y por haberme permitido trabajar juntos en nuestro proyecto de investigación.

A *PhD José Calero* por su nobleza e incondicionalidad y sus válidos aportes en nuestra investigación, y a quien siempre será un noble ejemplo de superación tanto personal como en el campo profesional.

Al *PhD Jorge Pitty* por sus valiosos aportes para mejorar la investigación.

Al personal del área del *Bióterio e Insectario* de entomología médica del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR).

A todos los profesores del departamento de Química porque con su arduo trabajo lograron encaminarme en el maravilloso mundo del conocimiento.

Nahúm Levy Alemán Alvarado.

AGRADECIMIENTO

A Dios por dar salud a mí y a mi familia por permitirme llegar a esta etapa de culminar mi carrera profesional, por siempre abrir las puertas para poder realizar este estudio y darme la fuerza para seguir adelante.

Mi madre por todo el apoyo, amor y paciencia, por confiar siempre en mí todo este tiempo.

Mi familia por sus consejos y demostrarme su amor siempre en especial a mi abuela **Sr. María Elsa Rosales**.

Mis amigos por confiar en mí, por sus consejos y siempre estar dispuestos a tenderme su mano para la realización de este trabajo en especial a **Henry Antonio López Rivera**.

Mis compañeros de monografía por luchar juntos para conseguir una de nuestras metas, en especial a mi compañera en todo desde el primer día en esta Universidad **Heysel**, por sus consejos, apoyo y confianza.

Mis maestros por transmitirme sus conocimientos a lo largo de mi formación y por estar dispuestos a ayudarnos en especial: **PhD. José Calero y PhD. Jorge Pitty** quienes nos dieron sus consejos y apoyo siempre, más que maestros amigos.

Mi Tutora Lic. Sara Negaresh por confiar en nosotros, transmitir sus conocimientos desde el primer año de nuestra carrera y apoyarnos para la realización de este trabajo.

Mi asesora metodológica MSc. María Nathalia Gutiérrez por ayudarnos con la estructura metodológica de nuestro trabajo y brindarnos sus conocimientos.

Mi asesora Técnica Lic. Emperatriz Lugo por abrirnos las puertas del laboratorio de entomología para poder realizar nuestros ensayos y al personal del insectario de entomología por su apoyo para poder realizar este estudio.

Xochilt Karina Gurdíán Rosales

AGRADECIMIENTO

A mis padres: María José Machado y Víctor Ortiz gracias por enseñarme que la educación es un tesoro.

A mis compañeros: Xochilt y Nahúm por todas las experiencias que vivimos juntos sobre todo gracias por aguantarme.

A mis amigos: Yader Mairena e Irvin Alemán por brindarme más que un compañerismo gracias por su amistad sincera.

A mi tutora: Sara Negaresh por que se aventuró junto con nosotros en este estudio, por sus aportes y paciencia.

Al Doctor José calero: por haber sido la primera persona que deposito plena confianza en mí, es un ejemplo a seguir.

Al Lic. Róger Jaime Manzanarez: por permitirme ser parte del equipo del Laboratorio de Análisis Físico-Químico de Alimentos (LAFQA), por su confianza y apoyo que contribuyen a mi vida para seguir creciendo como persona y profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-Managua: por el conocimiento transmitido y las oportunidades que me ha brindado.

Heyssel Raquel Ortiz Machado

OPINIÓN DEL TUTOR Y ASESOR

Managua, 11 de marzo de 2016

“AÑO DE LA MADRE TIERRA”

Por la presente, expreso en mi calidad de tutora, mi formal aceptación para que la monografía titulada: *EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS Azadirachta indica A. Juss (NEEM) CONTRA Aedes aegypti VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA-MINSA. JULIO-DICIEMBRE, 2015* sea defendida ante el tribunal a tal efecto se constituya.

La monografía en mención, reúne todos los requisitos de un trabajo propio de esta índole, por su rigurosidad, alcance teórico y propuesta metodológica y científica, representando un importante aporte en el campo de las investigaciones e innovaciones farmacéuticas.

Tutora del Trabajo Monográfico
Departamento de Química
Lic. Sara Negaresh

MSc. María Natalia Gutiérrez
Asesora del Trabajo Monográfico
Departamento de Química

Resumen

Las recientes epidemias tales como el Dengue, Chikungunya y Zika provocadas por el vector *Aedes aegypti*, han causado emergencias sanitarias en todo el país y la región centroamericana. En la presente investigación se realizan encuestas para averiguar la importancia de repeler mosquitos en pobladores de la comarca Jocote Dulce encontrándose que un 89% utiliza repelente para prevenir la picadura de mosquitos. Posteriormente se identifican de forma cualitativa metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, saponinas, taninos y terpenoides en semillas de Neem. Ubicando a la especie en estudio en alto valor farmacológico.

Se evalúa la actividad repelente de extractos acuosos de semillas de Neem obtenidos a través de la técnica extractiva maceración en frío a concentraciones del 3 y 5 % contra mosquitos hembras *Aedes aegypti*. Luego se realizan ensayos *in vivo* a través del diseño factorial 2^3 y se cuantifica el porcentaje de repelencia en ambas concentraciones del extracto. El paquete estadístico Design Expert 7 es utilizado para medir el aporte de cada factor y su significancia estadística a través de ANOVA con un nivel de confianza del 95%.

La metodología aplicada demuestra que los extractos acuosos de Neem al 3 y 5% poseen entre 33-90% de actividad repelente y que esta es proporcional al incremento de la concentración. Mediante ANOVA se observa que los valores críticos (P-Value) son menores al valor de significancia ($p < 0.05$) y se concluye que los factores A (concentración), B (temperatura) y C (luz) influyen sobre la actividad repelente de los extractos acuosos de Neem, siendo el factor C el de mayor influencia y el factor B el de menor.

Palabras Claves: Extracto acuoso, Neem, actividad repelente, *in vivo*, vector, *Aedes aegypti*, metabolitos secundarios, Chikungunya, Dengue, Zika.

Índice

Dedicatorias	i
Agradecimientos	ii
Opinión del tutor	iii
Resumen	iv

CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES

1.1 Introducción	1
1.2. Objetivos	2
1.2.1 Objetivo General	2
1.2.2 Objetivos Específicos	2
1.3 Planteamiento del problema.....	3
1.4 Justificación	4
1.5 Antecedentes	5

CAPÍTULO II: MARCO DE REFERENCIA.....

2.1 Generalidades del árbol <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	7
2.1.1 Nombres comunes.....	7
2.1.2. Distribución geográfica	7
2.1.3 Descripción Botánica	8
2.1.4 Requerimientos ambientales	11
2.1.5 Propagación.....	11
2.1.6 Germinación	11
2.1.7 Plagas.....	11
2.1.8 Uso y propiedades	12
2.1.9 Toxicología	12
2.1.10 Composición Química.....	13
2.1.11 Azadiractina	13
2.2 Material vegetal.....	14
2.2.1 Recolección	14

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

2.2.2 Secado.....	15
2.2.3 Molienda	16
2.3 Procesos de extracción.....	16
2.3.1 Maceración	17
2.3.2 Soxhlet.....	17
2.4 Tipos de extractos.....	18
2.5 Estudios preclínicos	19
2.5.1 Especies utilizadas	21
2.6 Repelencia	22
2.6.1 Mecanismo de repelencia en mosquitos.....	23
2.7 Generalidades del <i>Aedes aegypti</i>	23
2.7.1 Taxonomía.....	23
2.7.2 Descripción Morfológica.....	24
2.7.3 Reproducción	24
2.7.3.1 Copulación.....	25
2.7.3.2 Ingesta de sangre	25
2.7.3.3 Actividad hematofágica.....	26
2.7.3.4 Ovopostura	26
2.7.3.5 Ciclo biológico.....	27
2.8 Distribución mundial de los mosquitos	28
2.9 Arbovirus.....	29
2.9.1 Arbovirus en Nicaragua	30
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS	32
CAPÍTULO IV: DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
4.1 Descripción del ámbito de estudio	35
4.2 Tipo de estudio	35
4.3 Población y Muestra.....	35
4.3.1 Población	35
4.3.2 Muestra.....	36
4.3.2.1 Criterios de Inclusión	36

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica A. Juss* (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

4.3.2.2 Criterios de exclusión.....	36
4.4 Variables.....	36
4.4.1 Variables Independientes	36
4.4.2 Variables Dependientes.....	36
4.5 Operacionalización de variables	38
4.6 Materiales y Métodos	39
4.6.1. Materiales para recolectar la información	39
4.6.2 Materiales para procesar la información	39
4.6.3 Métodos	40
4.6.3.1 Aplicación de encuesta.....	40
4.6.3.2 Procesamiento del material vegetal	40
Fase I: Recolección	41
Fase II: Despulpado y lavado	41
Fase III: Secado.....	41
Fase IV: Molienda.....	42
4.6.3.3 Preparación de extractos de semillas de Neem para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios.	42
4.6.3.4 Preparación del extracto acuoso de Neem para evaluar la actividad repelente.....	46
4.6.3.5 Evaluación de la actividad repelente de las semillas de Neem contra mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	46
CAPÍTULO V: ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
5.1 Resultados de la encuesta que se realiza a pobladores de la comarca Jocote Dulce.	53
5.2 Identificación cualitativa de metabolitos secundarios en las semillas de <i>Azadirachta indica A. Juss</i> (Neem).	57
5.3 Obtención del Extracto acuoso de Neem para la prueba de repelencia	58
5.4 Efecto de las variables operacionales sobre la actividad y tiempo de repelencia	58
5.4.1 Resultados de los bioensayos experimentales en mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	59

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

5.4.2 Comportamiento de los factores sobre la actividad repelente de los extractos acuosos de Neem.	61
5.4.3 Comportamiento de los factores sobre el tiempo de repelencia de los extractos acuosos de Neem	65
5.4.4 Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño factorial.	68
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	73
BIBLIOGRAFIA	75
ANEXOS	
GLOSARIO	

ÍNDICE DE TABLAS	Pág.
Tabla 2.1. Condiciones ambientales eficientes para el crecimiento de <i>Azadirachta Indica A. Juss</i>	11
Tabla 2.2. Plagas que afectan al árbol de Neem en Nicaragua	12
Tabla 2.3. Tamaño de partículas de los polvos obtenidos de Material vegetal	16
Tabla 2.4. Montaje del sistema Soxhlet	18
Tabla 2.5. Tipos de extractos vegetales	19
Tabla 2.6. Ambientes que se controlan para los animales de experimentación	21
Tabla 2.7. Especies de animales utilizadas en investigaciones médicas	22
Tabla 2.8. Clasificación taxonómica del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	23
Tabla 2.9. Arbovirus más importantes en Nicaragua.	30
Tabla. 4.1. Materiales y equipo	40
Tabla 4.2. Materiales, equipos y reactivos que se utilizan en la identificación fitoquímica	42
Tabla 4.3. Identificación fitoquímica	44
Tabla 4.4. Materiales	46
Tabla 4.5. Matriz del Diseño de experimento (diseño factorial 2 ³)	48
Tabla 4.6. Diseño de experimento para medir actividad y tiempo de repelencia	48
Tabla 4.7. Materiales para evaluar la actividad repelente	49
Tabla 5.1. Metabolitos secundarios en semillas de <i>Azadirachta Indica A. Juss.</i>	57
Tabla 5.2. Matriz del diseño de experimento 2 ³	59
Tabla 5.3. Porcentaje de mosquitos sin importar las variables operacionales	60
Tabla 5.4. Resultados de las variables respuestas	60

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

Tabla 5.5. Predicción del porcentaje de repelencia	68
Tabla 5.6. Influencia de los factores sobre la actividad repelente de los extractos acuoso de Neem	69
Tabla 5.7. Influencia de los factores en estudio sobre el tiempo de repelencia de los extractos acuosos de Neem	70

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 2.1. Distribución mundial del árbol de Neem	8
Figura 2.2. Hojas, flores frutos y madera del Neem	9
Figura 2.3. Color del fruto de Neem cuando esta verde, verde-sazón y maduro.	10
Figura 2.4. Semillas de Neem secas	10
Figura 2.5. Efecto de la temperatura en la de degradación de aceite de Neem	16
Figura 2.6. Ejemplo de maceración en frío con flores	17
Figura 2.7. Sistema Soxhlet	18
Figura 2.8. Animales utilizados en experimentación	20
Figura 2.9. Ratones en experimentación.	21
Figura 2.10. Estructura del <i>Aedes aegypti</i>	24
Figura 2.11. Ciclo de vida del <i>Aedes aegypti</i>	27
Figura 2.12. Casos de Dengue a nivel mundial, Diciembre 2015	29

ÌNDICE DE GRÁFICOS	Pág.
Gráfico 5.1. Uso de repelente personal	53
Gráfico 5.2. Uso de repelente Vs Sexo	54
Gráfico 5.3. ¿Frecuencia de compra de repelentes?	54
Gráfico 5.4. ¿Lugares donde se necesita usar repelentes?	54
Gráfico 5.5. ¿Insectos que se necesita repeler?	55
Gráfico 5.6. ¿Nivel de confianza al usar repelente?	55
Gráfico 5.7. ¿Se debe de promover el uso de repelentes?	56
Gráfico 5.8. ¿Importancia de usar repelente que no dañe el medio ambiente?	56
Gráfico 5.9. % de Repelencia Vs Concentración del extracto acuoso	62
Gráfico 5.10. % de repelencia Vs temperatura	63
Gráfico 5.11 % de repelencia Vs luz	64
Gráfico 5.12 Tiempo de repelencia Vs Concentración del extracto acuoso	65
Gráfico 5.13 Tiempo de repelencia Vs temperatura	66
Gráfico 5.14 Tiempo de repelencia Vs luz	67

ÍNDICE DE ANEXOS	Pág.
Anexo 1 Metabolitos secundarios encontrados en el árbol de Neem	1
Anexo 2 Fig.1. Caso de Dengue en Centro américa	2
Anexo 3 Encuesta	3
Anexo 4 Tabla 2. Obtención de los datos para cada ensayo	5
Anexo 5 Descripción del programa Design Expert 7	6
Anexo 6 Constancia de identificación de planta emitida por la Universidad Centroamericana (UCA)	7
Anexo 7 Fig. 2. Procesamiento del material vegetal	8
Anexo 8 Preparación de reactivos para la identificación fitoquímica	9
Anexo 9 Fig.3 Preparación de extractos acuosos de Neem para la identificación fitoquímica	10
Anexo 10 Fig. 4 y 5 Extractos acuosos de Neem después de centrifugado y separación del extracto acuoso en fracciones	11
Anexo 11 Fig.6 Obtención de extracto Metanólico en equipo Soxhlet	12
Anexo 12 Fig.7 Destilación del extracto Metanólico de Neem	13
Anexo 13 Fig.8 Proceso de preparación de extractos acuosos de Neem	14
Anexo 14 Protocolo de crianza de mosquitos <i>Aedes aegypti</i> para la evaluación de la actividad repelente	15-19

Anexo 15 Fig.9 Jaula de hierro 20

Fig.10 Capturador Oral

Fig.11 Atomizadores para asperjar a los ratones

Fig. 12 Termómetro digital

Fig. 13 Trampa para ratones

Anexo 16 Fig.14 Procedimiento de la evaluación de actividad 21
 repelente de extractos acuosos de Neem

Anexo 17 Fig.15 Presencia de Taninos 22

Fig.16 Presencia de Flavonoides

Fig.17 Presencia de Saponinas

Fig.18 Presencia de Alcaloides

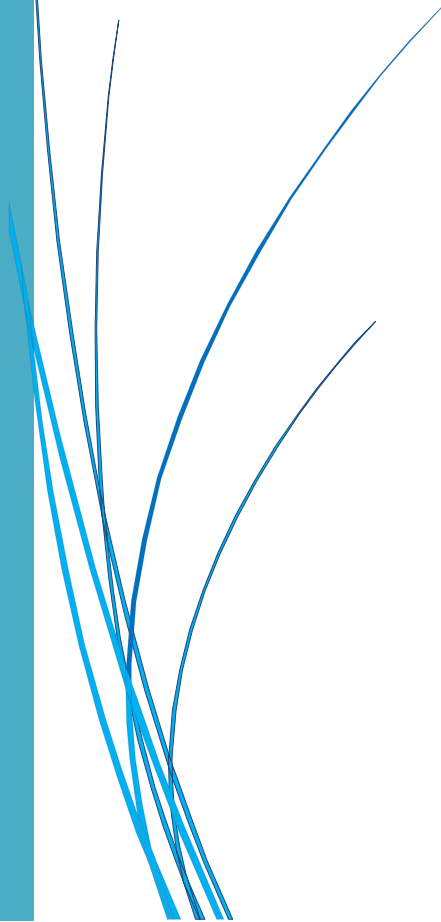
Fig.19 Presencia de Terpenoides

LISTA DE ABREVIATURAS

- CNDR: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
- H: Hora
- LAFQA: Laboratorio de Análisis Físico Químico de Alimentos
- Min: Minutos
- MINSA: Ministerio de Salud
- MAGFOR: Ministerio de Agricultura y Forestal
- INAFOR: Instituto Nacional Forestal
- MARENA: Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- MSNM: Metros sobre el nivel del Mar

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES



1.1. INTRODUCCIÓN

En Centro América las enfermedades infecciosas Dengue, Chikungunya y Zika transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti* han provocado brotes epidemiológicos, debido a la contribución de factores como el desorden poblacional urbano y el manejo inadecuado de desechos sólidos y líquidos que facilitan condiciones de hábitat en las que este vector puede desarrollarse satisfactoriamente.

Ante tal situación, se aplica una encuesta con el fin de investigar el uso e importancia de repelentes contra mosquitos e identificar una alternativa de prevención a través de la utilización de recursos forestales prometedores como el árbol *Azadirachta indica A. Juss*, que produce el metabolito Azadiractina, terpenoide que ha demostrado tener actividad repelente contra insectos (Ramos et al, 2004), actualmente en Nicaragua este árbol se desarrolla muy bien en distintas zonas geográficas del país y a pesar de ello no se le da un aprovechamiento de gran impacto económico o social.

Por lo antes mencionado en el presente estudio se realiza un ensayo experimental preclínico, con el objetivo de investigar si los extractos acuosos de semillas del árbol *Azadirachta indica A. Juss* poseen actividad repelente contra mosquitos hembras *Aedes aegypti* utilizando ratones de experimentación y manipulando mediante la aplicación del diseño factorial 2^3 , los componentes luz eléctrica, temperatura ambiente controlada y concentración del extracto a fin de observar la respuesta conductual de los mosquitos en cada uno de las pruebas del estudio preclínico.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar *in vivo* la actividad repelente de semillas *Azadirachta indica A. Juss.* Contra *Aedes aegypti* vector de importancia en salud pública. Laboratorio de Entomología Médica-MINSA. JULIO-DICIEMBRE, 2015.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Analizar la información obtenida a través de encuestas aplicadas a pobladores, acerca del uso e importancia de repelentes en la comarca Jocote Dulce.
2. Identificar cualitativamente metabolitos secundarios de interés farmacológico en las semillas de Neem (*Azadirachta indica A. Juss*) a través de tamizaje fitoquímico siguiendo la metodología descrita por Pushker et al (2011).
3. Obtener extractos acuosos de semillas *Azadirachta indica A. Juss* (Neem) a concentraciones de 3 y 5% mediante la técnica extractiva maceración en frío.
4. Realizar ensayo preclínico por medio del diseño factorial 2^3 manipulando (concentración de extracto acuoso, luz eléctrica y temperatura ambiente controlada) para evaluar la actividad repelente de extractos acuosos de Neem contra mosquitos hembras *Aedes aegypti*.

1.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Nicaragua las enfermedades transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti* como el Dengue, artritis epidémica Chikungunya y Zika van en aumento a pesar de que el Ministerio de Salud (MINSAL) realiza con más frecuencia medidas de control para erradicar estas arbovirosis usando insecticidas químicos, prueba de ello es que en el primer cuatrimestre del año 2016 se han reportado 1,420 casos de Dengue, 387 casos de Chikungunya y 150 casos de Zika (MINSAL, 2016).

Dentro de este contexto la repelencia es uno de los mecanismos que se puede utilizar para disminuir la probabilidad de contacto entre humanos y vectores. En Nicaragua no se han publicado estudios científicos sobre la actividad repelente de plantas a pesar de ser un país vulnerable a epidemias, causadas principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*, el cual está muy bien adaptado a las condiciones climáticas del país.

Es necesario recalcar que en Nicaragua el árbol *Azadirachta indica* A. Juss es considerado una plaga, por su alto poder de propagación y poca utilidad ya que su uso se limita como árbol ornamental e insecticida para animales, su abundancia en el país no se aprovecha para realizar investigaciones en áreas importantes como salud humana, por lo tanto no se conoce si metabolitos secundarios de este árbol pudieran tener actividad farmacológica para ser utilizados en preparados farmacéuticos que ayuden a la prevención o tratamiento de algunas enfermedades.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Actualmente la comunidad científica de la salud investiga repelentes naturales como alternativa amigable con el medio ambiente que contribuya a la lucha contra la picadura de mosquitos, estos esfuerzos se enfocan en disminuir las emergencias de salud a nivel mundial causadas por picaduras de mosquitos vectores de enfermedades infecciosas como el *Aedes aegypti*, causante de epidemias en salud pública.

Artículos científicos publicado en Cuba (Valencia Botin et al, 2004) y México (Martínez Tomás, S.H, 2007) afirman que el árbol de Neem posee actividad repelente contra insectos, por eso esta investigación selecciona al árbol *Azadirachta indica* A. Juss además porque en Nicaragua éste presenta un alto nivel de propagación en diversas condiciones ambientales. Así mismo porque a través de encuestas se confirma que habitantes propensos a Dengue, Chikungunya y Zika creen urgente y confiable usar repelentes naturales, ante tal situación se considera importante llevar a cabo esta investigación.

Este estudio tiene como propósito realizar un ensayo preclínico para evaluar la actividad repelente de extractos acuosos de semillas *Azadirachta indica* A. Juss contra mosquitos hembras *Aedes aegypti*, utilizando el diseño de experimento 2³ con el fin de manipular factores que permitan medir la variable respuesta en estudio

El desarrollo de esta investigación se enfoca en buscar una alternativa ecoamigable que sirva de base para la formulación de un repelente dermoprotector utilizando extractos acuosos de Neem, a fin de evitar picaduras de mosquitos transmisores de arbovirosis en pobladores nicaragüenses. Además pretende motivar al estudio *in vivo* de posibles propiedades farmacológicas de este árbol al que actualmente no se le da importancia médica en el país.

1.5 ANTECEDENTES

Estudios científicos realizados en Nicaragua utilizando al árbol de Neem están enfocados en veterinaria Gruber (1992); Lacayo Parajón, L.I (1989) y no se han realizado estudios en búsqueda de propiedades farmacológicas u otros usos en salud humana. Sin embargo a nivel internacional varios estudios demuestran que el Neem posee metabolitos de interés farmacológico y que es efectivo contra larvas de mosquitos, además indican que posee efecto repelente en insectos voladores que afectan los cultivos, algunos de los estudios antes mencionados son los siguientes:

A.K Pushker, S. Kaushik, K.K. Sharma y R. Ramani, en 2011 realizaron identificaciones fitoquímicas de metabolitos secundarios en plantas que son utilizadas contra insectos entre ellas *Azadirachta indica* A. Lynn encontrando Alcaloides, Taninos, Saponinas, Esteroides, Terpenoides y Flavonoides.

Valencia Botin et al (2004) evaluaron la actividad repelente de extractos acuosos de semillas de Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) contra la mosca Mexicana (*Tephritidae: Díptera*) utilizando la fruta Naranja Valencia (*Anastrepha Ludens* Loew), encontrando que los extractos acuosos de Neem al 3 y 5% provocan repelencia de la mosca en la fruta.

En 2007 Martínez Tomás, S.H, trabajó con extractos acuosos de semillas de Neem en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*, obteniendo que concentraciones al 4.4, 4.6, y 5.5% inhibían el crecimiento larval y pupal en un 50%, al tal grado que se evitó la formación y desarrollo de adultos transmisores de encefalitis, fiebre del Nilo Occidental y filariasis.

CAPÍTULO II

MARCO DE REFERENCIA

2.1 Generalidades del árbol *Azadirachta indica* A. Juss

Es nativo de los bosques secos de la India. Su nombre científico es *Azadirachta indica* A. Juss, género *Azadirachta*, familia Melaceae, especie índica. Se caracteriza por ser un árbol siempre verde excepto en período de extrema sequía (López Gomar, M.M, 2012).

2.1.1 Nombres comunes

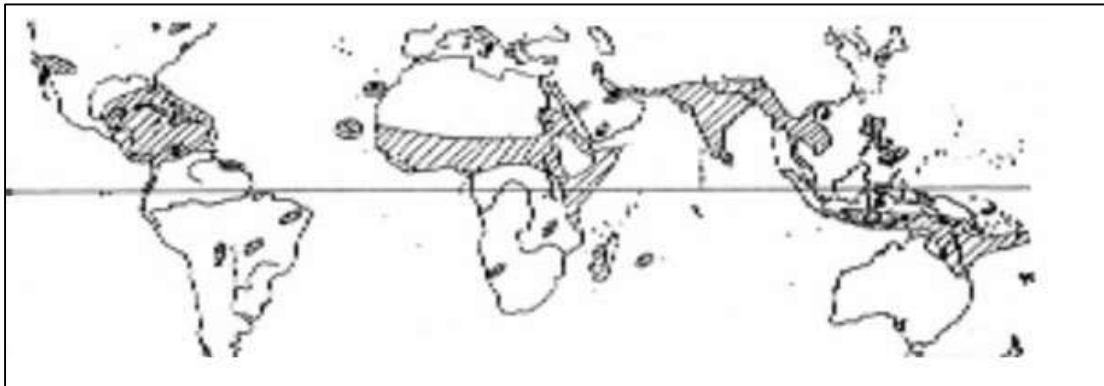
El árbol *Azadirachta indica* A. Juss es conocido con diversos nombres comunes como: (Damajagua y Neem) en R. Dominicana, (Neem) en Nicaragua, (Majagua Hembra) en Cuba, (Emajagua) en P. Rico y (Majao) en Honduras (MARENA/INAFOR, 2002).

2.1.2. Distribución geográfica

Según López Gomar (2012), en el siglo XX fue introducido en África y actualmente se encuentra bien establecido en al menos 30 países de ese continente, particularmente al sur del Sahara, en América del sur, Centro América y Estados Unidos. Se calcula que en todo el mundo existen entre 64 y 91 millones de ejemplares (Ramos Sánchez, R, 2010).

Fue introducido a Nicaragua por británicos en 1975 y distribuido en diferentes zonas del país región ecológica I (sector del Pacífico), y en la región ecológica II (sector Norcentral) (MARENA/INAFOR, 2002).

Figura 2.1. Distribución mundial del árbol de Neem.



Fuente: (Ramos Sánchez, R, 2010).

2.1.3 Descripción Botánica

Árbol de raíces profundas que alcanza alturas de 10-15 m. En períodos de extrema sequía las hojas pueden caer. Los árboles de Neem viven entre 100 y 200 años (MARENA/INAFOR, 2002).

La corteza según MARENA/ INAFOR-MAGFOR (2002), es finamente fisurada de color gris café. Sin embargo López Gomar (2012), afirma: “El color de la corteza varía según la parte de la planta, su edad y localidad, la superficie interna de la corteza es fibrosa y de color rojizo”.

Su madera tiene una albura (parte entre corteza y duramen) de color amarillo pálido y duramen (parte central del tronco) castaño muy pálido, textura fina a media, superficie medianamente lustrosa, olor y sabor característicos (MARENA/INAFOR, 2002).

Posee hojas imparipinadas (impares) con bordes aserrados, folíolos de color verde claro e intenso y de longitud que varía entre 3 y 8 cm. Cada rama cuenta con una cantidad de hojas entre 20 y 31 unidades y normalmente la hoja terminal es faltante (López Gomar, M.M, 2012).

Figura 2.2. Hojas, flores frutos y madera del Neem.



Fuente: (Conrick, J, 2004).

Las flores se encuentran en racimos terminales que poseen de 150 a 250 flores muy pequeñas y blancas, éstas miden de 5 a 6 milímetros de longitud y de 8 a 11 milímetros de ancho, son melíferas por lo que atraen mucho a las abejas. En Nicaragua el árbol de Neem florece a finales de febrero o inicios de marzo (López Gomar, M.M, 2012).

Los frutos de Neem son drupáceos, parecidos a una aceituna, su longitud oscila entre 1.4 y 2.8 cm y su diámetro o ancho entre 1.0 y 1.5 aproximadamente, el color del pericarpio varía, es de color verde claro, tornándose progresivamente hasta amarillo y de textura rugosa en la madurez (Figura 2.3), en Nicaragua la producción de frutos de Neem se da en el mes de mayo (López Gomar, M.M, 2012).

Figura 2.3. Color del fruto de Neem cuando esta verde, verde-sazón y maduro.



Fuente: (FAO, 2006).

La producción de frutos inicia a los tres años con un rendimiento aproximado de 10 kg/árbol y a los cinco años unos 15 kg/árbol anualmente, la cantidad de semillas por kilogramos de fruto es entre 4,000 y 4,500 (MARENA/INAFOR, 2002).

Cada fruto contiene una semilla que se caracteriza por ser alargada, de tamaño variable y de color blanco cuando está seca, compuesta de una coraza y una almendra, cada almendra pesa alrededor de la mitad de la semilla en su totalidad (López Gomar, M.M, 2012).

Figura 2.4. Semillas de Neem secas.



Fuente: (FAO, 2006).

2.1.4 Requerimientos ambientales

Tabla 2.1. Condiciones ambientales eficientes para el crecimiento de *Azadirachta Indica* A. Juss.

Climas	Suelos	Temperaturas	Precipitaciones	Altitudes
Tropicales, húmedos, subtropicales y áridos.	Franco arenosos a francos arcillosos con pH entre 6.5 a 7.5.	Temperaturas de 20 a 35 °C.	Entre 500 y 1,200 mm anuales.	1,500 msnm.

Fuente: (López Gomar, M.M, 2012).

2.1.5 Propagación

Este árbol se propaga fácilmente, tanto sexual como vegetativamente, normalmente se cultiva a partir de semillas. En su ambiente natural se propaga ampliamente porque las semillas son distribuidas por las aves, murciélagos y monos (López Gomar, M.M, 2012).

Esta especie es considerada gran invasora por su alto poder de propagación y se ha convertido en un problema ya que se adapta a diversos climas (Sue,M, 2005).

2.1.6 Germinación

El período de germinación va de 12 a 30 días, la semilla fresca tiene un alto porcentaje de germinación (75-100%), pero pierde su viabilidad a las tres semanas de ser recolectada (MARENA/INAFOR, 2002).

2.1.7 Plagas

En un estudio realizado durante seis años consecutivos por Gruber (1992), en Nicaragua, se observó las plagas que afectan al árbol de Neem las cuales se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Plagas que afectan al árbol de Neem en Nicaragua.

Tipo de Plaga	Mecanismo de acción
Escama blanca (<i>Pinnas pisstracbani</i>)	Defolia las ramas y hasta el árbol entero.
Escarabajo (<i>Espitragus .sal.lci</i>)	Se come la corteza tierna, lo que provoca que se seque y tenga una ramificación anormal.
Especies de chapulín (p.e. <i>Melano plusspp.</i>)	Se alimentan de las hojas tiernas evitando que estas desarrollen.
Zompopos (<i>Atta. spp.</i> y <i>Acromyrmexspp.</i>)	Parten las hojuelas para alimentar a sus cultivos de hongos subterráneos

Fuente: (Gruber, 1992).

2.1.8 Uso y propiedades

Varias partes de esta árbol han sido utilizadas desde hace siglos en comidas como condimentos, en agricultura como insecticida natural y en la India afirman que posee propiedades farmacológicas como: anticancerígeno, antitrombótico, hipocolesterolemiante, hepatoprotector, antiinflamatorio, analgésico, antimicrobiano, antioxidante, antiespasmódicos, antiarrítmico, antihipertensivo, antimalárico, antiamebiano, antitusivo y también se utiliza para forraje, reforestación, leña y muebles (Herbal de Chiapas, 2010).

2.1.9 Toxicología

Fichas técnicas de este árbol indican que su extenso uso en la india es indicio del amplio margen de seguridad del Neem, sin embargo se han realizado recientemente estudios *in vivo* con el fin de conocer claramente su toxicidad utilizando partes del árbol.

Berenguer et al. (2010), Utilizaron la decocción de hojas y tallos de Neem en un ensayo realizado en Cuba, quienes administraron durante 28 días dosis repetidas 1000 mg/Kg en ratas las cuales no presentaron ningún signo clínico indicador de toxicidad asociado a la administración repetida de la decocción de la planta.

Tres años más tarde estos mismos autores realizaron otro ensayo de toxicidad del árbol de Neem pero esta vez con dosis única de 2000 mg/Kg encontrándose los

mismos resultados del ensayo anterior, por lo que los autores no lograron clasificar al árbol en ninguna de las categorías de toxicidad existente con el biomodelo animal utilizado (Berenguer Rivas et al, 2013).

2.1.10 Composición Química

El Neem contiene miles de moléculas químicas compuestas por C, H y O; y se ha convertido en una planta de especial interés en salud, agricultura y veterinaria, aislándose de ella desde 1942 compuestos terpenoides como: Nimbina, Nimbidina, Salanina y Azadiractina (Roja Alba, M, 2003) (Anexo 1).

Además otros tipos de compuestos como flavonoides, alcaloides, saponinas, taninos, entre otros, han sido identificados cualitativamente través de tamizaje fitoquímico, lo que explica el sin número de aplicaciones que posee esta planta.

2.1.11 Azadiractina

Se conoce que el 72 al 90 % de la actividad insecticida y repelente del Neem es debido a Azadiractina que se encuentra en hojas, semilla, corteza, raíz, fruto y flor (Ramos Sánchez, R, 2010), su contenido varía por causas genéticas, ambientales, etapa fenológica, humedad relativa, temperatura, manejo de material vegetal, exposición a la luz, secado, método de extracción y almacenamiento (Ramos et al, 2004).

Los factores más influyentes que afectan a Azadiractina son la temperaturas de secado o de extracción además de la exposición a la luz debido a que es una molécula fotosensible que se degrada por los rayos ultravioletas y es afectada por temperaturas superiores a 50 °C (Contreras, L.L.C, 2011).

Ramos et al. (2004) Afirma que la mayor concentración de Azadiractina se encuentra en las semillas de Neem presentándose la mayor concentración a los 127 días después de la producción del fruto. Gruber (1992), encontró que el contenido promedio de Azadiractina en las semillas de Neem en Nicaragua oscila entre 4 a 4.2

mg/g de semilla, éste afirma que es un contenido alto de Azadiractina en comparación con otros países de la región.

Se ha demostrado que Azadiractina provoca efecto repelente en insectos he inhibe su alimentación, siendo utilizado para evitar la ovoposición en cultivos agrícolas, aunque no se conoce el mecanismo de acción de este compuesto se plantea la hipótesis de que provoca disuasión alimentaria (o gustativa) y que posiblemente afecta los niveles sensoriales del insecto (Delgado Barreto et al, 2012).

2.2 Material vegetal

El material vegetal que se usa para procesos de investigación requiere de un cuidado y procesamiento especial, con el fin de garantizar resultados fiables y reproducibles desde el punto de vista experimental.

2.2.1 Recolección

Es importante conocer en que parte de la planta se localiza la mayor concentración de principios activos de interés ya que no se distribuyen uniformemente por la planta entera, además se debe de conocer el tiempo correcto de recolección que permita obtener la mejor calidad del material vegetal (Nikolai Sharapin et al, 2000).

Ramos et al. (2004), afirma que la Azadiractina se encuentra en mayor concentración en las semillas de Neem y Angulo Escalante et al. (2004) demuestra que el momento más adecuado de recolección del fruto es durante la etapa “verde-sazón”, debido a que en esta etapa se encuentra el nivel máximo de concentración, que luego va decreciendo durante su almacenamiento.

Después de la recolección del material vegetal es necesario determinar que la especie en estudio es de la identidad que se requiere y debe de ser identificada en un herbario con literatura especializada que sirva de soporte físico de la investigación (UNAD, 2012).

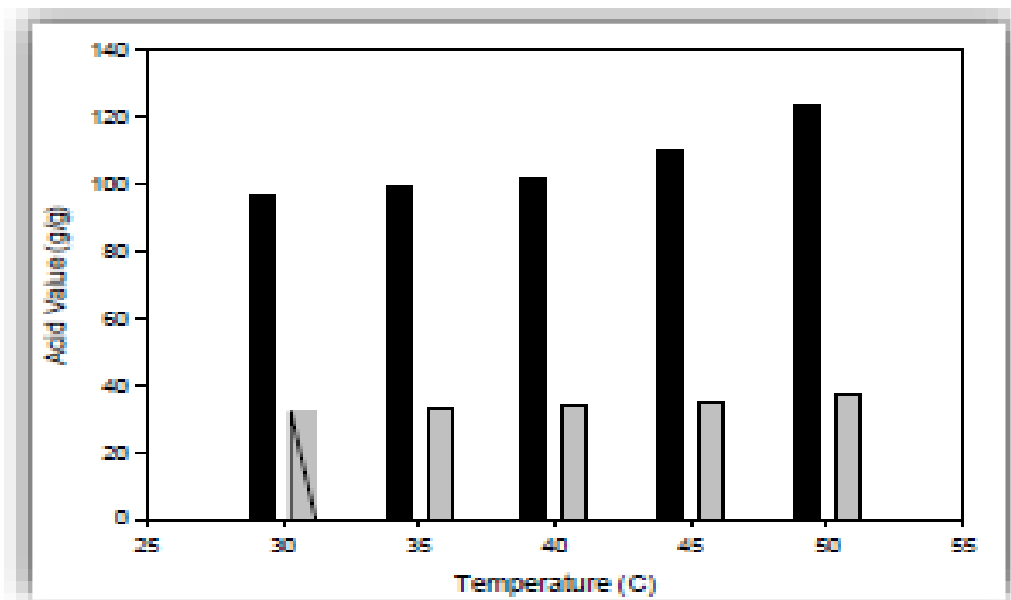
2.2.2 Secado

Es el método en que el agua se elimina del material vegetal ya sea por evaporización o bien por vaporización con ayuda de calor (Álvarez, N.S & Bagué, A.J, 2012). Es una etapa que facilita la conservación del material vegetal por periodos de tiempo prolongados, interrumpe procesos de degradación enzimática, oxidación, hidrólisis y desarrollo de microorganismos (Nikolai Sharapin et al, 2000).

Este proceso puede provocar la degradación de sustancias termolábiles por lo que la temperatura de secado deberá ser entre 30 y 60 °C garantizando una buena circulación de aire para facilitar el secado, así que la manera y el tiempo de secado debe ser determinado experimentalmente para cada droga vegetal (Nikolai Sharapin et al, 2000).

Se ha demostrado que el Neem se degrada en procesos de secado y extracción a temperaturas > 50 °C, encontrándose en extractos oleosos mayores reacciones oxidativas y de acidez que son indicadores de degradación (Liauw et al, 2008).

Figura 2.5. Efecto de la temperatura en la degradación de aceite de Neem.



Fuente: (Liauw et al, 2008).

2.2.3 Molienda

Esta etapa se aplica sobre el material vegetal seco para reducir su tamaño de partículas convirtiéndolo en polvo, con el fin de adecuarlo a la etapa de extracción para que al entrar en contacto el solvente con las membranas fragmentadas o divididas del material vegetal facilite la disolución de los constituyentes celulares (Nikolai Sharapin et al, 2000).

Se debe conocer el tamaño de partícula en dependencia del tipo de extracción que se desea utilizar ya que la fragmentación excesiva o muy pobre puede causar problemas en el transcurso de la extracción, la droga molida se clasifica de acuerdo con el tamaño de partícula (Tabla 2.3.) durante la molienda se deben separar materiales extraños como pedazos de madera o materiales de otra naturaleza (Nikolai Sharapin et al, 2000).

Tabla 2.3 Tamaño de partículas de los polvos obtenidos de material vegetal.

Clasificación de los polvos	
Tipo de polvo	Tamaño de partícula
Polvo grueso	1700 μm
Polvo moderadamente grueso	710 μm
Polvo semi-fino	355 μm
Polvo fino	180 μm
Polvo finísimo	125 μm

Fuente: (Nikolai Sharapin et al, 2000).

2.3 Procesos de extracción

Según Guerra Corado, A.E. (2005), los procedimientos de extracción son utilizados para separar una mezcla de sustancias por disolución en un solvente, obteniéndose la solución extraída concentrada. Estos varían en función de la naturaleza de la materia prima y del solvente.

2.3.1 Maceración

Es un tipo de extracción que da como resultado un equilibrio de concentraciones entre el soluto y solvente, puede ser llevada a cabo en frío o con calor en dependencia de la naturaleza del material vegetal (Ecured, 2012).

Consiste en mantener en contacto a la droga con el solvente en una cantidad específica pero suficiente, en condiciones estables, dejando reposar en un recipiente durante varios días y por ultimo su filtración. Es importante conocer que el rendimiento del extracto disminuye cuando la relación droga/solvente aumenta (Nikolai Sharapin et al, 2000).

Figura 2.6. Ejemplo de maceración en frío con flores



La maceración en frío es un proceso bastante utilizado en preparaciones a pequeña escala y sus mayores desventajas es la lentitud del proceso y no alcanzar la extracción completa de la droga. Normalmente se macera una droga por 7 días si el solvente no es agua, pero si es así no debe de sobrepasar las 48 h a fin de evitar fermentación o formación de hongos (Nikolai Sharapin et al, 2000).

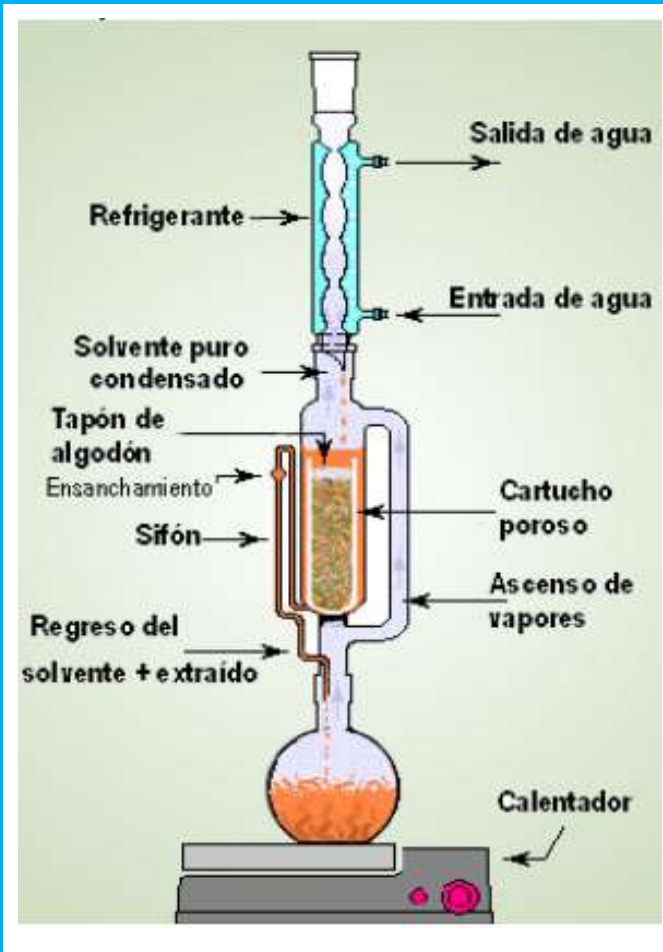
2.3.2 Soxhlet

Es una extracción semicontinua de ciclos donde el mismo solvente que se evapora y condensa llega siempre de manera pura al material vegetal de forma que se dé una extracción exhaustiva de la droga, la purificación se realiza en forma

paralela por destilación del solvente, ésta técnica es muy útil a escala de laboratorio (Guerra Corado, A.E, 2005)

Figura 2.7. Sistema Soxhlet

Tabla 2.4. Montaje del sistema Soxhlet

	<p>Etapas de extracción Soxhlet</p> <ol style="list-style-type: none">1) colocación del solvente en un balón.2) temperatura de ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un dedal con la muestra en su interior.4) ascenso del nivel del solvente cubriendo el dedal de extracción hasta el punto en que se produce el reflujo donde vuelve el solvente con el material extraído al balón.5) Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada.
--	--

Fuente: (Nuñez, E.C, 2008).

2.4 Tipos de extractos

Los extractos son preparaciones farmacéuticas de consistencia líquida, semisólida o sólida obtenidos a partir de drogas vegetales o tejidos animales en estado generalmente seco (Olaya, J.M & Méndez, J, 2003).

Tabla 2.5. Tipos de extractos vegetales

Tipos de extractos	
Extractos	Características
Fluidos	El volumen de líquido del extracto es igual al volumen de la planta seca.
Blandos	Se les retira el agua parcialmente hasta obtener una consistencia de unguento.
Secos	Se les retira en su totalidad el agua y su apariencia es de un polvo fino.
Oleosos	Fracción líquida de los aceites esenciales del material vegetal.

Fuente: (Olaya, J.M & Méndez, J, 2003).

2.5 Estudios preclínicos

Los estudios preclínicos o de laboratorio son llevados a cabo en animales vivos con aquellas sustancias que parecen ser prometedoras, estos proporcionan a los investigadores una idea de que tan seguro es seguir evaluando la sustancia en criaturas vivientes como estudios clínicos en humanos (American Cancer Society, 2014).

A través del uso de animales de laboratorio es que se lograron encontrar vacunas contra la rabia, viruela, tétano, poliomielitis, avances en cáncer, cardiología etc. Los estudios preclínicos proporcionan bastante información, sin embargo se debe de tomar en cuenta que los humanos y animales tienen diferente mecanismo de absorción, procesamiento y desecho de las sustancias, lo que puede provocar que haya efectos secundarios u otros problemas que no se presentaron cuando el tratamiento se usó en animales (American Cancer Society, 2014).

Figura 2.8. Animales utilizados en experimentación.



Fuente: (Rojas, T.Y, 2011).

Los animales de experimentación en los laboratorios se han convertido en piezas fundamentales de las ciencias biomédicas, usados como biomodelo para conocer las causas, diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades transmisibles y no transmisibles que afectan al humano y animales, (Figura 2.6).

Según las buenas prácticas de ensayos clínicos (Mahmoud.F & Mohamed.M, 2004). Para la investigación con animales se precisa la aprobación ética de las autoridades locales y nacionales adecuadas que deben ser centros capacitados y certificados. Solo los investigadores y el personal que tienen la capacitación y la experiencia apropiadas deben llevar a cabo la investigación pertinente.

Los animales de investigación deben ser atendidos adecuadamente en lo que respecta a su cobijo, las condiciones ambientales, nutrición y atención veterinaria. Normalmente, el cuidado de los animales debe estar bajo la supervisión de veterinario que tenga experiencia en la ciencia de los animales de laboratorio. El modelo animal elegido debe ser pertinente y la información debe ser aplicable al ser humano.

Para el investigador los animales de experimentación son reactivos biológicos que igual a cualquier reactivo se vigila su pureza controlando su ambiente de crianzas para evitar que se estresen (Hernández, S, 2006) (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Ambientes que se controlan para los animales de experimentación.

Características genéticosanitarias y ambientales en animales de experimentación	
Macro ambiente	Micro ambiente
Tamaño de la habitación, iluminación, temperatura, ventilación y humedad	Tamaño de la jaula, lecho, agua, alimento y número de animales

Fuente: (Hernández, S, 2006).

2.5.1 Especies utilizadas

Dentro de los modelos de experimentación más conocidos esta sin duda el ratón, utilizado en la mayor parte de las experimentaciones *in vivo*. Muchos investigadores consideran al ratón como un biomodelo casi perfecto por su corto tiempo generacional, alta reproductividad y fácil mantenimiento, sin embargo hay otros tipos de animales usados en investigaciones, los cuales se muestran en la Tabla 2.7 (Boada et al, 2010).

Figura 2.9. Ratones en experimentación.



Fuente: (Boada et al, 2010).

Tabla 2.7. Especies de animales utilizadas en investigaciones médicas.

Nombre	Usos
<i>Muss musculus</i> (Ratón)	Farmacología: Evaluación de nuevas moléculas. Toxicología: Dosis, mutágenesis. Inmunología: Anticuerpos monoclonales
<i>Rattus norvegicus</i> (Rata)	
<i>Cabiaporcellus</i> (Cobaya)	Dietética: Estudios sobre vitamina C, ácido fólico, tiamina y aminoácido
<i>Cricetulus</i> (Hámters)	Citología, citogénesis y genética

Fuente: (Boada et al, 2010).

2.6 Repelencia

Es la acción de evitar que un insecto en pleno vuelo se pose sobre una persona, animal o planta y este no pueda picar, masticar o chupar. Algunas sustancias naturales o sintéticas poseen esta acción y son llamadas repelentes, aunque estas no matan al insecto son una buena alternativa para evitar que estos causen algún tipo de daño (Roldán et al, 2012).

Se utilizan sustancias repelentes en agricultura que son rociadas sobre el cultivo para evitar daños por moscas, abejas, gusanos y otros tipos de insectos que se alimentan o transmiten algún tipo de parasito al cultivo, en veterinaria principalmente se usan en ganado, afectados por gusanos, parásitos, garrapatas, entre otros, y en salud humana se usa sobre la piel o volatilizado en el ambiente con el fin de evitar que insectos entre ellos mosquitos piquen y transmitan virus o enfermedades en la piel.

2.6.1 Mecanismo de repelencia en mosquitos

Los mosquitos antropofílicos prefieren alimentarse de sangre humana y son capaces de localizar a sus víctimas a través del olor corporal y la exhalación de dióxido de carbono, partiendo de esto se crean los repelentes dermoprotectores que al aplicarse sobre la piel vuelven no atractiva o inapetente a los humanos para el mosquito debido que se alteran sus receptores Ir40a olfativos (Sanz,E, 2013).

El repelente de mosquitos más utilizados en humanos hasta el momento es un producto de origen sintético denominado N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), es efectivo pero se han dado casos de baja toxicidad moderada en humanos, debido a esto es que se investigan repelentes de origen natural como opción factible, segura, eficaz y económica (García et al, 2010).

2.7 Generalidades del *Aedes aegypti*

El *Aedes aegypti* es un mosquito que representa un problema de salud pública a nivel mundial por ser el vector del mayor número de enfermedades arbovirales en humanos, la OMS estimó que más de 2.500 millones de personas nos encontramos expuestas debido al aumento poblacional de este mosquito (Conde Osorio,A.M, 2003).

2.7.1 Taxonomía

Tabla 2.8 Clasificación taxonómica del mosquito *Aedes aegypti*.

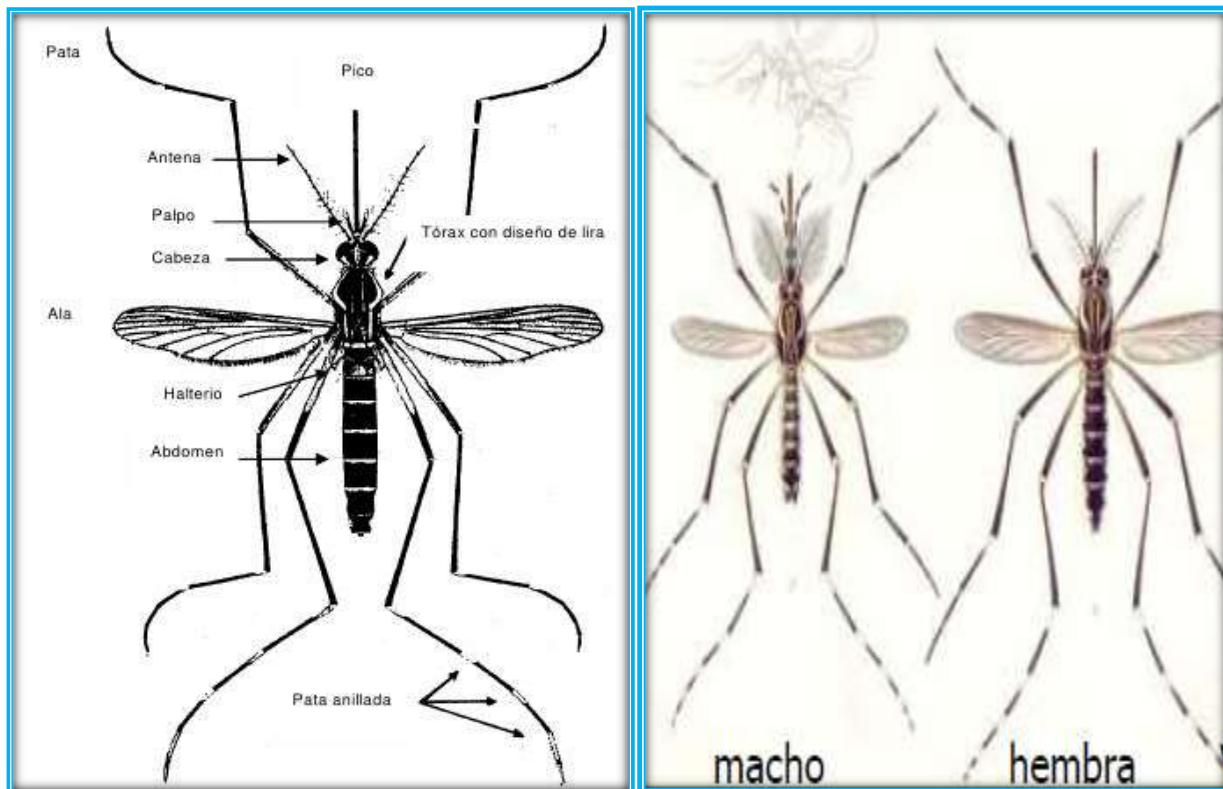
Categoría taxonómica	
Reino	Animalia
Phyllum	Artrópoda
Clase	Insecta
Orden	Díptera
Familia	Culicidae
Género	<i>Aedes</i>
Especie	<i>Aegypti</i>

Fuente: (Garza Hernández, J.A, 2010).

2.7.2 Descripción Morfológica

Es de color oscuro (castaño oscuro o negro) con rayas blanco-plateadas. El tórax presenta un diseño en forma de lira y las patas son anilladas, miden aproximadamente 5 mm de largo, el macho es de menor tamaño que las hembras (Figura 2.5.) y estas tienen el pico largo de tipo picador-chupador (Almirón, Walter, 2009).

Figura 2.10. Estructura del *Aedes aegypti*



Fuente: (Almirón, Walter, 2009).

2.7.3 Reproducción

Los mosquitos pasan por 4 etapas de ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto para poder llegar a reproducirse, estos buscan los elementos necesarios tales como

alimentación, clima y hábitat para que las próximas generaciones sobrevivan (Niaves Nava, E, 2015).

2.7.3.1 Copulación

El *Aedes aegypti* comienza aparearse después de 24 horas de haberse convertido en mosquito adulto cuando su cuerpo ya se ha endurecido y está listo para volar, los machos se guían de las vibraciones de aleteo de las hembras y en el aire engancha sus genitales sobres ellas y en segundos la inseminan. Una sustancia llamada matrona permite que el semen del macho se mantenga en una espermateca en donde el semen queda reservado dentro de la hembra (Conde Osorio, A.M, 2003).

Una vez que la espermateca está llena, la hembra queda fecundada de por vida ya que este semen le servirá para inseminar a todos los huevos que se ovopositan por paquetes a lo largo de su vida, de manera que las hembras tienen una sola cópula (Niaves Nava, E, 2015).

2.7.3.2 Ingesta de sangre

Las hembras fecundadas necesitan de la ingesta de sangre rica en aminoácidos con el fin de sintetizar proteínas durante la producción de huevos. Evidentemente muestran preferencia por los humanos por lo que se encuentran dentro de las casas o alrededor de estas, el proceso de toma de sangre cumple con las siguientes cuatro etapa denominada ciclo gonotrófico que se produce cada vez que la hembra necesita ovopositar un nuevo paquete de huevos:

1. Reconoce al huésped y reposa sobre él donde busca un lugar adecuado para realizar la picadura
2. Inserta la probóscide causando laceraciones en los tejidos adyacentes y el contacto de este con la sangre activan una serie de señales moleculares con las que la ingesta comienza
3. Succiona la sangre y mientras lo hace segrega saliva que contiene vasodilatadores, antihistamínicos y anticoagulante a fin de contrarrestar el efecto del sistema inmune del hospedador

4. Retira la probóscide de la piel (Conde Osorio,A.M, 2003).

Este ciclo de alimentación también llamado ciclo gonotrófico dura alrededor de 10 a 15 días y es muy probable que pique más de una vez, el número de picaduras necesarias es la que provoca una alta probabilidad dinámica de contagio que sucede si el mosquito se encuentra infectado de algún virus (Niaves Nava, E, 2015).

2.7.3.3 Actividad hematofágica

Se conoce que las horas de mayor actividad hematofágica del *Aedes aegypti* son durante las primeras horas de la mañana, pero se ha demostrado que las características regionales y las estaciones climáticas pueden marcar variaciones en las horas que eligen para alimentarse (Estallo et al, 2011).

Es importante conocer mejor la biología de *Aedes aegypti*, determinando el momento del día en que sus actividades de alimentación y de ovoposición son máximas ya que podría ayudar al control de este vector en cada país (Estallo et al, 2011).

2.7.3.4 Ovopostura

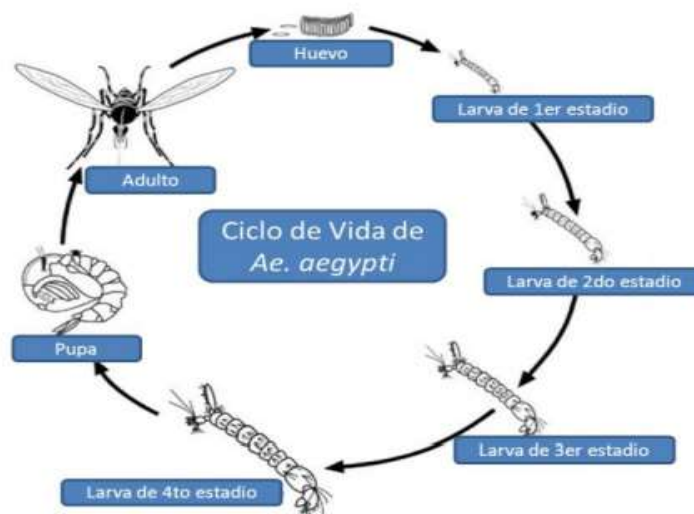
La ovopostura u ovoposición de los huevos normalmente se realiza tres días después de la última ingesta de sangre, generalmente son ovopositados sobre superficies de agua debido a que las primeras etapas el *Aedes aegypti* son acuáticas, el agua contenida en recipientes posee materia orgánica y sales disueltas que permiten el desarrollo de los huevos (Conde Osorio,A.M, 2003).

Los lugares de ovopostura de las hembras preferiblemente son los charcos, floreros, tumbas de cementerio, llantas viejas y canaletas de desagüe, acción que puede verse afectada por la contaminación del agua, la profundidad del agua, la superficie donde son ovopositados, la temperatura y la intensidad de la luz (Niaves Nava, E, 2015).

2.7.3.5 Ciclo biológico

Después que la hembra ha puesto sus huevos estos sufren un sin número de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento que se pueden diferenciar en cuatro fases de vida las cuales duran alrededor de 10 días (Niaves Nava, E, 2015), estas se presentan en la Figura 2.11.

Figura 2.11. Ciclo de vida del *Aedes aegypti*.



Fuente: (Niaves Nava, E, 2015).

Huevo: Está encerrado en una cubierta de tres capas con un pasaje con aspecto de embudo que facilita la entrada de los espermatozoides para ser fecundados dentro de la hembra (Cabrera Muñoz et al, 2006).

Se estima que las hembras producen en cada ovoposición un paquete de huevos que contienen de 20 a 120 huevos, la cantidad depende de factores como el tamaño corporal, cantidad, calidad de sangre ingerida y su edad, (Niaves Nava, E, 2015).

Larva: son cuatro estadios larvales en los cuales va aumentando su tamaño hasta formar al mosquito adulto, de manera general las larvas son alargadas,

cilíndricas, compuestas por cabeza, tórax y abdomen, estas nadan desordenadamente alcanzando la superficie para respirar ya que se desarrollan en medio acuáticos.

Pupa: Es cuando se excreta una sustancia dura que pasa a recubrir el cuerpo esta permite el desarrollo de alas, tres patas y ovarios en caso de las hembras, aquí se asemeja a un signo de puntuación coma y presenta movilidad en respuesta a estímulos como la luz y las vibraciones (Niaves Nava, E, 2015).

Adulto: Es el fin del desarrollo acuático ya que el mosquito adulto emerge de la pupa en donde sucedieron los cambios fisiológicos antes mencionados, después de su salida reposa sobre la película de agua en el que se crío y al transcurrir 24 horas está listo para volar, copular y alimentarse (Niaves Nava, E, 2015).

La sobrevivencia de los mosquitos adultos tiene un promedio de cuatro a ocho semanas, aunque puede variar por circunstancias climatológicas; la hembra sobrevive más tiempo que el macho y es más resistente a las variaciones de temperatura y humedad ambiental (Ministerio de Salud, 2012).

2.8 Distribución mundial de los mosquitos

La distribución de los mosquito a nivel mundial está asociada al incremento del comercio y transporte internacional de neumáticos debido a que en las embarcaciones son almacenados al aire libre donde al caerles lluvia acumulan agua en su interior, convirtiéndose en un magnífico hábitat de cría para mosquitos pues imitan su hábitat natural, es así como los mosquito han alcanzado incrementar su expansión por todo el mundo (Jiménez Clavero, M.A, 2012).

Jiménez Clavero, M.A. (2012), afirma: “los mosquitos se han desplazado a zonas que antes no vivían y en altitudes mayores a las observadas anteriormente”. Un factor característico en Nicaragua que favorece el desarrollo de mosquitos, es el uso de recursos hídricos para crear zonas de regadío o la acumulación de agua potable, estas prácticas están detrás de la expansión de vectores en el país.

2.9 Arbovirus

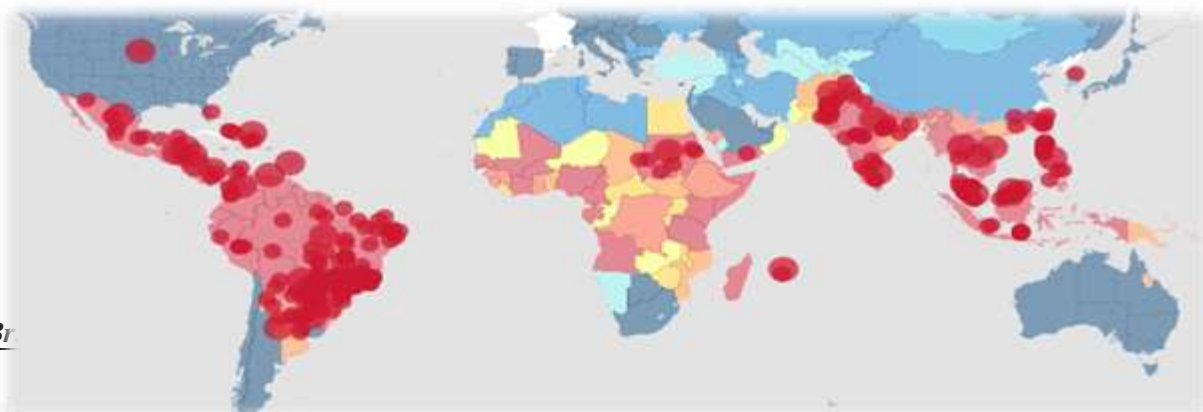
La (OMS, 1967) define Arbovirus como: virus transmitido por picadura de artrópodos (mosquitos, garrapatas, flebótomos e insectos culicoides) a un hospedador, en donde la trasmisión de los agentes infecciosos se produce en un ciclo que implica la interacción artrópodo-vertebrado-artrópodo esto se ve beneficiado de condiciones ambientales específicas en las que pueden prosperar tanto vectores como hospedadores y así vivir en conjunto.

Se conoce alrededor de 200 arbovirus, de los cuales entre 50 a 60 son patógenos para el hombre. Algunos de ellos producen temibles epidemias como el Dengue (OMS, 1967).

El Dengue es un Arbovirus con cuatro variedades diferentes del virus que se transmite por medio de la picadura del mosquito hembra *Aedes aegypti*, cuando ésta se alimenta de sangre humana. Su alto poder de redistribución ha causado epidemias a nivel mundial a lo largo de la historia (CIET, 2004). (Figura 2.6.).

Los síntomas del virus del Dengue pueden incluir cuadros febriles, erupción cutánea, dolor de: cabeza, órbitas oculares, músculos, articulaciones y malestar general. Estos pacientes nunca vuelven a enfermarse por la misma variedad de virus, pero si vuelven a ser picados por un mosquito con otra variedad del virus, entonces pueden contraer dengue hemorrágico, una complicación que puede llevar a la muerte (CIET, 2004).

Figura 2.12. Casos de Dengue a nivel mundial Diciembre 2015. (●)



Fuente: (Dengue. Mapa interactivo de la actividad del Dengue a nivel mundial, 2015).

Un virus introducido en las américas por el *Aedes aegypti* es el Chikungunya este causa fiebre alta, dolor de cabeza, dolor en articulaciones y dolor muscular algunos pacientes desarrollan dolores en las piernas e inflamación de las articulaciones de manera crónica, pero mayoría de los pacientes tienden a sentirse mejor semanas después de la infección (OPS/OMS, 2014).

Actualmente Nicaragua está siendo atacada por otro virus llamado Zika transmitido también por el vector *Aedes aegypti* el cual provoca síntomas como: dolores musculares, fiebre alta, dolor de cabeza, mareo, dolor ocular, pérdida de peso, sangrado en la nariz y encías. Generalmente estos síntomas duran entre 2 y 7 días (MSP, 2016).

2.9.1 Arbovirus en Nicaragua

La primera epidemia de dengue en Nicaragua fue en el año 1985 notificándose 7,843 afectados y 8 fallecidos, desde esa fecha el virus se ha mantenido permanente en nuestra población llegando a su pico más alto en el año 1994, durante el cual se reportaron enfermos de dengue un total de 20,469 personas (Antonio Amoretys et.al, 2006), además del Dengue actualmente hay otros virus (Tabla 2.9.).

Tabla 2.9. Arbovirus más importantes en Nicaragua.

Enfermedad	Especie de mosquito
Dengue y Dengue hemorrágico.	<i>Aedes aegypti</i> .
Chikungunya.	
Zika	

Fuente: Elaborada por el equipo investigador.

Recientemente Centro América, ha contribuido en los últimos 5 años con 7.7% de casos en el continente con una media de 88,470 casos de dengue, 2,545 casos graves y 57 muertes. En el año 2013 en Nicaragua se reportó un incremento en los casos de dengue del 41% en comparación con los casos en 2012, año en el que Nicaragua se posicionó como el segundo país con mayor incidencia en centro américa (OPS/OMS, 2013) (Anexo 2).

El Gobierno de Nicaragua el 14 de agosto del 2015 decretó alerta sanitaria nacional para combatir el Chikungunya y Dengue así que el Ministerio de Salud intensificó su lucha contra el mosquito *Aedes aegypti*, con jornadas de limpieza, fumigación y eliminación de criaderos del mosquito. Sin embargo, se reportaron 174 nuevos casos de dengue en octubre 2015 lo que da un acumulado de 1,673 casos y 8 muertes por dengue durante 2015 en el país (MINSA, 2015).

Actualmente las autoridades de salud de Nicaragua luchan contra el virus del Zika y el 25 de abril de 2016, reportaron 150 casos positivos de personas afectadas por este virus transmitido por el vector *Aedes aegypti* (MINSA, 2016).



CAPÍTULO III



HIPÓTESIS

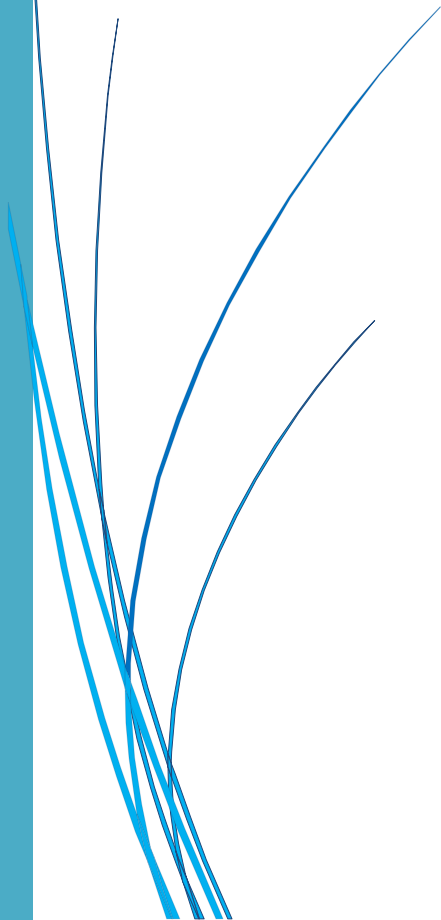


EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGIA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

Los extractos acuosos de semillas de *Azadirachta indica* A. Juss obtenidos por maceración en frío demuestran actividad repelente contra mosquitos hembras *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO IV

DISEÑO METODOLÓGICO



4.1 Descripción del ámbito de estudio

La fase experimental para la obtención de los extractos acuosos de Neem se lleva a cabo en el Laboratorio de Análisis Físico Químico de Alimentos (LAFQA) ubicado en el pabellón 3 de la UNAN-Managua, y la realización de los ensayos de repelencia en el Laboratorio de Entomología Médica perteneciente al Ministerio Nacional de Salud (MINSA) durante el período de Julio a Diciembre 2015.

4.2 Tipo de estudio

Según Hernández Fernández, R.C. (2006), es una investigación experimental con enfoque cuantitativo y diseño experimental factorial, porque mide el efecto que sobre la(s) variable(s) dependiente(s) tiene la manipulación de más de una variable independiente, lo que tiene como propósito principal establecer relación causa-efecto utilizando la experimentación, en cuanto a su orientación en el tiempo se considera un estudio de carácter prospectivo.

4.3 Población y Muestra

4.3.1 Población

- Población de Árboles

Este estudio considera como población a todos los árboles de *Azadirachta indica* A. Juss que se encuentran en la finca el Clavel ubicada en el Km 15 carretera vieja a León departamento de Managua, en estado de madurez bajo condiciones naturales favorables para su desarrollo, en etapa de producción de frutos y sin presencia de ningún tipo de plaga.

- Población de Mosquitos

Se considera como población de mosquitos a todos los *Aedes aegypti* capturados en estado larval en el cementerio de Jocote Dulce, ubicado de la UNAN-Managua 500 metros al sur terminal de ruta 168 y 111.

4.3.2 Muestra

- Muestra de frutos

Para determinar la cantidad de semillas secas requeridas para realizar la investigación, se calcula la cantidad de fruto necesario a recolectar a partir del peso de la semilla seca, siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ fruto} \text{ ————— } 0.75 \text{ g de semilla seca} \\ X \text{ ————— } 150 \text{ g de semillas seca} \end{array} \quad X= 200 \text{ Frutos}$$

Para la realización de los extractos son necesarios aproximadamente 200 frutos que cumplan con los criterios de inclusión (Apartado 4.3.2.1), estos son tomados de 2 árboles *Azadirachta indica A. Juss* ubicados en la finca el Clavel Km 15 carretera vieja a León departamento de Managua.

- Muestra de Mosquitos

Se considera como muestra únicamente a las hembras *Aedes aegypti*.

Para cada ensayo de repelencia son utilizados 40 mosquitos hembras *Aedes aegypti*, la cantidad final de mosquitos utilizados es 320 porque se realizan 8 ensayos en total, estos mosquitos deben de cumplir con los criterios de inclusión (Apartado 4.3.2.1).

4.3.2.1 Criterios de Inclusión

Frutos

- Frutos cortados directamente del árbol
- Frutos enteros
- Frutos color verde-amarillo (sazón)

Mosquitos

- Mosquitos hembras *Aedes aegypti* sin alimentarse tres días

4.3.2.2 Criterios de exclusión

Frutos

- Frutos picados por pájaros
- Frutos con manchas

4.4 Variables.

4.4.1 Variables Independientes

- Concentración del extracto acuoso
- Temperatura ambiente controlada
- Luz eléctrica

4.4.2 Variables Dependientes

- Actividad repelente
- Tiempo de acción repelente

**EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM)
CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE
ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSa, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015**

4.5 Operacionalización de variables

Variables	Definición operacional	Indicadores	Valores/Categorías
Independientes			
Concentración del extracto acuoso	La relación peso de semilla seca volumen de agua (p/v) permite determinar el porcentaje del extracto acuoso	Ecuación: $\% \text{ ext} = \frac{\text{solute (g)}}{\text{solvente (mL)}} \times 100$	[Los valores se expresan en forma numérica] (3 y 5%)
Temperatura ambiente controlada	Temperatura que se mantiene entre 15 y 30 °C en una área de trabajo	grados Celsius (°C)	20-30 °C
Luz eléctrica	Estimulo luminoso captado a través de la vista	Luz visible	Apagada-Encendida
Dependientes			
Actividad repelente	Es la acción de evitar que un insecto en pleno vuelo se pose sobre una persona, animal o planta	$\% PR = \left[\frac{(N_C - N_T)}{(N_C + N_T)} \right] \times 100\%$ PR= Porcentaje de Repelencia N_C : N° de mosquitos que se posan en el Ratón sin extracto N_T : N° de mosquitos que se posan en ratón con extracto	0-100 %
Tiempo de acción repelente	Duración de la actividad repelente para las concentraciones de extracto	Tiempo de repelencia observado	(0-30 min)

4.6 Materiales y Métodos

4.6.1. Materiales para recolectar la información

- Encuesta
- Fichas de resumen
- Termómetro digital
- Tablas de recolección de datos
- Artículos Científicos
- Libros

4.6.2 Materiales para procesar la información

- Microsoft Word 2013
- Microsoft Excel 2013
- Microsoft Power Point 2013
- Design- Expert 7 (Anexo 5)

4.6.3 Métodos

4.6.3.1 Aplicación de encuesta

Se aplica la encuesta ubicada en el Anexo 4 a pobladores de la comarca de Jocote Dulce del departamento de Managua, con el fin de conocer si estos pobladores utilizan repelente.

4.6.3.2 Procesamiento del material vegetal

El procesamiento del material vegetal consiste en recolección, lavado, secado y molienda de las semillas los materiales y equipos que se utilizan se detallan a continuación:

Tabla. 4.1 Materiales y equipos

Materiales	Marca	Capacidad/tamaño	Clase/tolerancia
Mortero y pilón	Mastrad	-	-
Termómetro	Fisher	-10 a 260 °C	± 1°C
Beaker	Pyrex®	600 mL	Clase A /±0.05
Frasco de vidrio color ámbar	-	500 g	-
Espátula Stainless Acero inoxidable	Sponula	32x14 mm	-
Guantes de nitrilo	Caplinpoint	Talla M y L	
Platos Petri	Anumbra	9 mm de diámetro	-
Papel toalla	Scott®	1000 hojas dobles	-
Moldes de aluminio	Always	2 Lb	-
Recipiente de plástico	Rotoplast	3 Litro	-
Bolsas plásticas de polietileno	Ziploc®	30x27 cm	-
Equipos	Marca	Fabricante	
Estufa de convección	Conterm 2000210	J. P. Selecta	
Molino manual	Corona	-	
Balanza Electrónica Digital	Snug III 3000	Jadever	
Frigorífico industrial	Stocklow G	J. P. Selecta	

- **Fase experimental**

El procedimiento para obtener el material vegetal consta de 4 fases descritas a continuación: (Anexo 7)

Fase I: Recolección

- La recolección de los frutos se realiza cuando están en la etapa verde-sazón, durante el invierno (julio-agosto) en horas de la tarde en la finca el Clavel, aquí se procede a seleccionar los frutos que cumplen con los criterios de inclusión que se muestran en la sección (4.3.2.1) y se procede a almacenarlos en bolsas Ziploc envueltas en papel aluminio para protegerlas de la luz solar.
- Los frutos son llevados al Herbario Nacional de la facultad de ciencia tecnología y ambiente de la Universidad Centroamericana UCA, para su identificación y se comprueba el tipo de especie en estudio (anexo 6).

Fase II: Despulpado y lavado

- Utilizando guantes de nitrilo, se procede a despulpar los frutos seleccionados en un recipiente plástico, desprendiendo el pericarpio completamente de la semilla luego se lavan con abundante agua, por último se secan con papel toalla y se conservan en bolsas Ziploc en el frigorífico a 4 °C.

Fase III: Secado

- El secado se realiza en estufa de convección eléctrica J.P Selecta, colocándolas en platos Petri, para evitar la degradación de los compuestos en las semillas se elimina el agua a una temperatura de 50 °C, vigilando que esta temperatura sea estable durante 24 horas.
- Transcurrido este tiempo la coraza es la única parte de la semilla que se encuentra totalmente seca entonces se separa de las almendras que aun contiene agua, se golpea la coraza con ayuda de un morter

Pilón y se colocan nuevamente las almendras por 24 horas más para completar su secado.

Fase IV: Molienda

- Una vez seca tanto la coraza como la almendra que forma a las semillas se procede a pulverizarlas utilizando un molino manual marca Corona, el cual se lava previamente para evitar contaminación de la muestra, se agregan poco a poco las semillas hasta su completa trituración, se deja caer el polvo en moldes de aluminio.
- Finalmente se procede a trasvasar a un Beaker de 600 mL el polvo que se obtiene, y se pesa en una balanza semianalítica. Luego la muestra se trasvasa a un frasco color ámbar para protegerlo de la luz debido a que Azadiractina es fotosensible luego se conserva a 4 °C en frigorífico.

4.6.3.3 Preparación de extractos de semillas de Neem para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios.

Se realiza la identificación cualitativa de metabolitos secundarios de importancia farmacológica, a fin de determinar la presencia de constituyentes químicos en la semilla de Neem que pudieran ser extraídos para ser utilizados a beneficio de la salud, para ello se siguió la metodología descrita por Pushker et al. (2011).

Tabla 4.2 Materiales, equipos y reactivos que se utilizan en la identificación fitoquímica.

Materiales	Marca	Capacidad/tamaño	Clase/tolerancia
Espátula	Sponula	32x14 mm	-
Dedales de celulosa	Dionex	22 mL	-
Papel filtro Whatman N°42	Filter lab	125mm	Análisis cualitativo
Vidrio reloj	Kartell	10 cm	-

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

Tubos de ensayo	Pyrex®	15 mL	-
Beaker	Pyrex®	500 mL	B
Probeta volumétrica	Kimax	250 mL	B
Termómetro	Fisher	-10 a-260 °C	±1 °C
Parafilm	Bemis	2 IN x 250 rollo	-
Agitador de vidrio	Pyrex	20 cm	-
Erlenmeyer	Pyrex	125 mL	± 5 mL
Mangueras flexibles	Fisherbrand	40/50	-
Equipos	Marca	Fabricante	
Centrifuga	Ortoalsera	27 tubos	
Manta calefactora	Horst	250 °C	
Termostato	J.P Selecta	10-100 °C	
Equipo Soxhlet	Kimax	500 mL	
Destilador de vidrio	Kimax	500 mL	
Baño María	Aquaterm	1.5 L	
Reactivos	Formula química	Marca	
Cloruro de mercurio	Hg ₂ Cl ₂	EMD, MERCK	
Yoduro de potasio	KI	Merck	
Cloruro de hierro III	FeCl ₃	Merck	
Amoniaco	NH ₃	Scharlab	
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	J.T.Baker	
Cloroformo	CHCl ₃	EMD Science	
Ácido Clorhídrico	HCl	EMD Science	
Acético anhídrido	C ₄ H ₆ O ₃	Merck	
Sulfato de Sodio anhídrido	Na ₂ SO ₄	Merck	

Nota: La preparación de los reactivos utilizados para la identificación fitoquímica se describe en el Anexo 8.

1. **Preparación de Extracto acuoso:** Se prepara un extracto acuoso utilizando la técnica extractiva maceración con calor para la identificación de taninos, flavonoides, saponinas y terpenoides.

- **Fase experimental**

- 1.1. Se pesa 50 g de semillas pulverizadas de Neem en un Erlenmeyer de 250 mL
- 1.2. Se adiciona 250 mL de agua destilada y se agita vigorosamente
- 1.3. Luego se coloca en baño maría a 50 °C durante 12 horas
- 1.4. Transcurrido el tiempo, se filtra con papel filtro Whatman N° 42 y posteriormente se centrifuga a 2500 rpm durante 15 min (Anexo 9)
- 1.5. El sobrenadante obtenido se toma con gotero creando fracciones en tubos de ensayos a las que se les designa como: EA₁, EA₂, EA₃, EA₄ de 2, 5, 10, y 5 mL respectivamente y se añaden los siguientes reactivos a cada fracción (Anexo 10)
- 1.6. A la **Fracción EA₁**: unas gotas de FeCl₃ al 5 %
- 1.7. **Fracción EA₂**: 5 mL de amoníaco diluido y unas gotas de H₂SO₄ concentrado
- 1.8. **Fracción EA₃**: 5 mL de agua destilada agité vigorosamente durante 30 segundos y deje reposar durante 15 minutos
- 1.9. **Fracción EA₄**: 2 mL de cloroformo y 3 mL de H₂SO₄ concentrado.
- 1.10. Los resultados esperados en cada fracción se presentan en la **Tabla 4.3**

Tabla 4.3. Identificación fitoquímica

Resultados esperados	
Fracción EA ₁	Coloración verde indica la presencia de taninos catéquicos
Fracción EA ₂	Coloración amarilla indica la presencia de flavonoides
Fracción EA ₃	La altura de espuma mayor a 5 mm indica la

	presencia de saponinas .
Fracción EA₄	Formación de un color rojizo inter-fase marrón indica la presencia de terpenoides

Fuente: Elaborada por el equipo investigador.

2. Preparación de Extracto Metanólico: Se prepara un extracto metanólico utilizando equipo Soxhlet para la identificación de alcaloides y esteroides en las semillas de Neem.

- **Fase experimental**

2.1 Se pesa 50 g de semillas de Neem pulverizadas dentro de un dedal de celulosa y luego se sella con fibra de vidrio

2.2 Se prepara, el equipo Soxhlet de la siguiente manera:

2.2.1 A un soporte universal se ajusta una manta calefactora

2.2.2 Sobre la manta calefactora se coloca un balón de 500 mL y se le adiciona perlas de ebullición y 250 mL de metanol

2.2.3 Sobre el balón se instala el sistema extractor sujetándolo con pinzas de tres dedos al soporte universal

2.2.4 Se ubica el dedal con la muestra dentro del sistema extractor y finalmente sobre este se instala el condensador allí en una posición que asegure el goteo directo del solvente dentro del dedal.

2.2.5 La parte superior del condensador fue sellado con algodón conteniendo una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhídrido

2.2.6 Se programa el calentamiento de la manta calefactora aproximadamente a 65 °C durante 6 horas (Anexo 11)

2.3 Lugo al extracto obtenido por Soxhlet se le realiza destilación simple a temperatura de 65 °C hasta obtener el extracto puro del cual se toman dos fracciones una llamada EM1 y EM2 de 2 mL (Anexo 12).

2.4 A la Fracción EM1: se adiciona 1ml de HCl al 1% y unas gotas del reactivo de Mayer.

2.4.1 Resultado esperado: La aparición de un precipitado cremoso/marrón indica la presencia de **alcaloides**.

2.5 A la fracción EM2: Se adiciona 2 mL de acético anhídrido y 2 mL de H₂SO₄ concentrado.

2.5.1 Resultado esperado: La aparición de coloración azul verdosa indica la presencia de **esteroides**.

4.6.3.4 Preparación del extracto acuoso de Neem para evaluar la actividad repelente.

Se utiliza la técnica extractiva maceración en frío para elaborar extractos acuosos de semillas de Neem al 3 y 5 % siguiendo la metodología descrita por Pérez et al (2004).

Tabla 4.4 Materiales

Materiales	Marca	Capacidad/tamaño	Clase/tolerancia
Embudo	Pyrex®	15 mL	B
Papel filtro	Filter Lab	110 mm	Análisis cualitativo
Frascos de plástico color ámbar	-	60 mL	-
Espátula	Sponula	32x14 mm	-
Probeta volumétrica	Pyrex®	100 mL	± 5 °C
Frasco atomizador	-	100 mL	-

- Fase experimental (Anexo 13)**

1. Se pesa la cantidad correspondiente de polvo de Neem según la concentración a evaluar en un frasco color ámbar, al 3% se pesa 1.5 g y al 5 % 2.5 g
2. Se agregan 50 mL de agua destilada, agitando luego vigorosamente y se dejar reposar en lugar oscuro por 24 horas

3. Finalmente se filtra con papel filtro Whatman N° 110 mm y se deja caer el extracto sobre el frasco atomizador para ser utilizado en los ensayos de repelencia del diseño de experimento.

4.6.3.5 Evaluación de la actividad repelente de semillas de Neem contra mosquitos *Aedes aegypti*.

Se realiza la evaluación de extractos acuosos de Neem a nivel de laboratorio, siguiendo la metodología descrita por Roldán et al (2012) para probar la capacidad de repelencia de las diferentes concentraciones de extracto acuoso de Neem.

Debido a que factores como temperatura ambiente y luz pueden influir en la respuesta de estos mosquitos a la sustancia en estudio (Daza, L & Flores, N, 2006). (Figura 2.7), se manipulan estas variables mediante un diseño de experimento a fin de determinar si estas condiciones experimentales permiten medir acción repelente de los extractos de Neem contra mosquitos hembras *Aedes aegypti*.

Se implementa la construcción del diseño factorial 2^3 (Tabla 4.5.) el cual es ampliamente utilizado en experimentos donde intervienen varios factores, para estudiar el efecto en conjunto de estos sobre una respuesta, en este tipo de estudio se definen dos niveles uno alto y otro bajo para cada variable operacional, los ensayos experimentales son ocho y se muestra el diseño de experimento implementado en la tabla (4.6).

Figura 2.7. Diagrama de los factores que influyen en la actividad repelente.

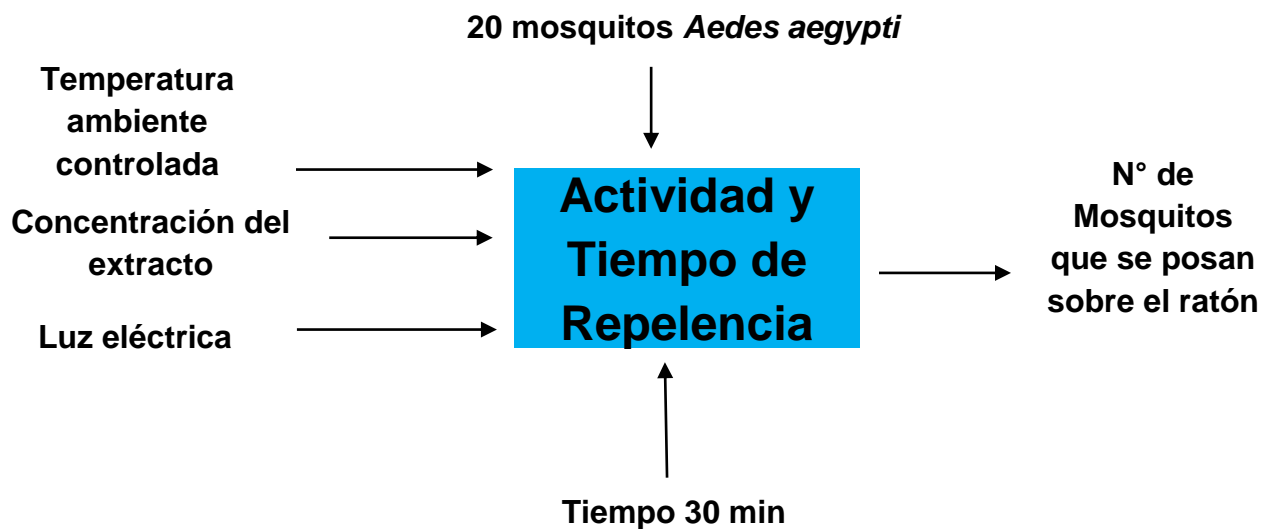


Tabla 4.5. Matriz del Diseño de experimento (diseño factorial 2³).

Nº de ensayos	Variables Operacionales		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fuente: (Ferré. J, 2005).

Dónde:

Nivel alto (+)

Nivel bajo (-)

Tabla 4.6. Diseño de experimento para medir actividad y tiempo de repelencia

Matriz de experimento 2 ³				
Factores	Variables operacionales	Unidad de medida	Niveles	
			Alto(+)	Bajo(-)
A	Concentración del extracto acuoso	Porcentaje (%)	5	3
B	Temperatura ambiente controlada	grado Celsius (°C)	30	20
C	Luz Eléctrica	Fuente luminosa	Encendida	Apagada

Fuente: Elaborado por el equipo investigador.

Para realizar la prueba primero se lleva a cabo la captura de larvas *Aedes aegypti* en el cementerio de Jocote Dulce y llevadas al laboratorio de entomología médica del MINSA, con el fin de criarlos bajos las mismas condiciones climáticas y alimenticias, que permite controlar su desarrollo hasta la realización del bioensayo (Anexo 14).

Los mosquitos son remplazados en cada ensayo, porque al manipular las variables operacionales como luz, temperatura y concentración, estas pueden causar estrés en los mosquitos alterando su comportamiento.

Además se seleccionan ratones que no han sido utilizados en algún otro tipo de estudio, se cuida su alimentación y se vigila que estén quietos antes de las pruebas de repelencia..

Tabla 4.7 Materiales para evaluar la actividad repelente (Anexo 15)

Materiales	Equipos
Jaulas de hierro de 15x20 Cm. forradas tela de tul	Termómetro digital
Trampas para ratones (elaborados por el autor)	Reactivos
Atomizador de plástico	Formaldehído
Cronómetro con segundero	
Marcador parmente	
Capturador oral para atrapar mosquitos	
Papel toalla	

Hojas de papel y lápiz para el registro de datos
Guantes de nitrilo
Gabacha de laboratorio
Vasos plásticos
Ligas de hule
Tela de tul

- **Fase experimental (Anexo 16)**

1. Cada ensayo se lleva cabo en un día, y se procede a realizar las pruebas una vez que se obtienen los mosquitos adultos tanto machos como hembras criados en una misma jaula, estos se dejan en inanición durante 3 días antes de cada ensayo.
2. Solo se necesitan mosquitos hembras, porque estas son las que succionan sangre para alimentarse y desarrollar sus huevos, entonces estas se capturan de la siguiente manera:
 - 2.1 Primero se procede a conocer las características físicas del mosquitos hembra
 - 2.2 Se atrapan los moquitos hembras con ayuda de un capturador oral sin tener en cuenta si es hembra o macho
 - 2.3 Aparte se tienen dos recipientes plásticos tapados con tela de tul uno para hembra y otro para machos, cada recipiente tiene un orificio donde se introduce el succionador, clasificando a los mosquitos según su sexo
 - 2.4 Posteriormente se trasladan 20 hembras a una jaula de hierro de 15 x 20 cm forradas con tela de tul para que no escapen, además estas poseen un orificio el cual permite introducir el brazo a través de una manga
3. Se dejan reposar por 5 minutos a los mosquitos para que se adapten y mientras tanto se procede a colocar al ratón en la trampa, oprimiéndolo para evitar que este se mueva

4. Luego el ratón se asperja con el extracto acuoso de Neem que se está evaluando y finalmente se introduce en la jaula que contiene los mosquitos hembras seleccionados
 5. Se procede de la misma manera para una jaula que sirve para comprobar la apetencia de los mosquitos por el ratón sin extracto. Lo cual es utilizado como blanco en la experimentación
 6. En cada ensayo por lo tanto se utiliza una jaula en la que se evalúa la actividad y tiempo de repelencia y en otra la apetencia de la ingesta de sangre de los mosquitos por el ratón
 7. Luego se manipulan las variables operacionales luz y temperatura en dependencia del ensayo que se esté llevando a cabo, se mide la temperatura del área de trabajo con un termómetro digital, una vez que se estabilizan las variables se anota en la tabla 2 los resultados (Anexo 4)
 8. Se procede a contabilizar cuantos mosquitos se posan en el ratón durante 30 min tanto en la muestra como en el blanco
 9. Una vez que finaliza el ensayo, se procede a matar a los mosquitos, se humedece algodón con formaldehído y es expuesto a los mosquitos hasta que todos mueren.
- La actividad repelente es medida en porcentaje utilizando la formula siguiente:

$$PR = \left[\frac{(N_C - N_T)}{(N_C + N_T)} \right] \times 100\%$$

Dónde:

PR= Porcentaje de Repelencia

N_C : Número de mosquitos que se posan en el blanco (Ratón sin extracto)

N_T : Número de mosquitos que se posan en la muestra (Ratón con extracto)

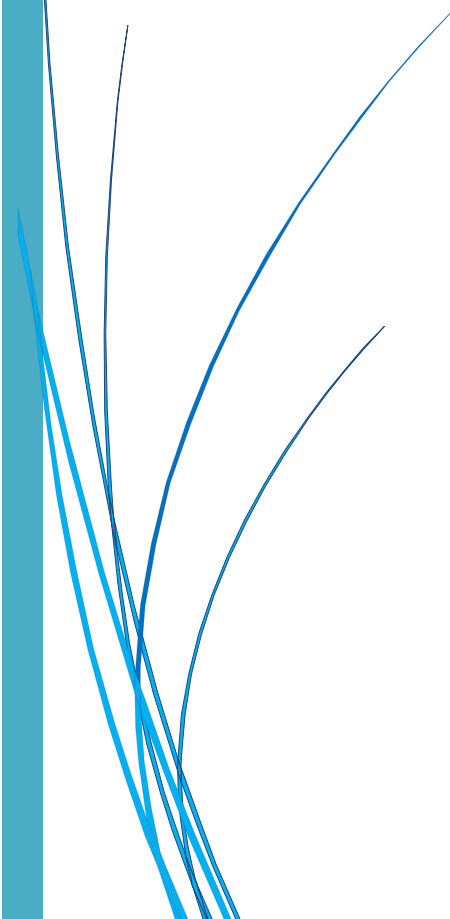
Si es mayor el número de mosquitos en el área no tratada con extracto ($N_T < N_C$), el porcentaje de repelencia se considera positivo, e interpretado como actividad

repelente, en caso contrario ($N_T > N_C$) el porcentaje de repelencia se considera negativo e interpretado como actividad atrayente.

El tiempo de repelencia es medido a partir de que son expuestos los mosquitos al ratón con extracto de Neem y el tiempo de repelencia finaliza cuando se posa el primer mosquito sobre el ratón.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS DE RESULTADOS

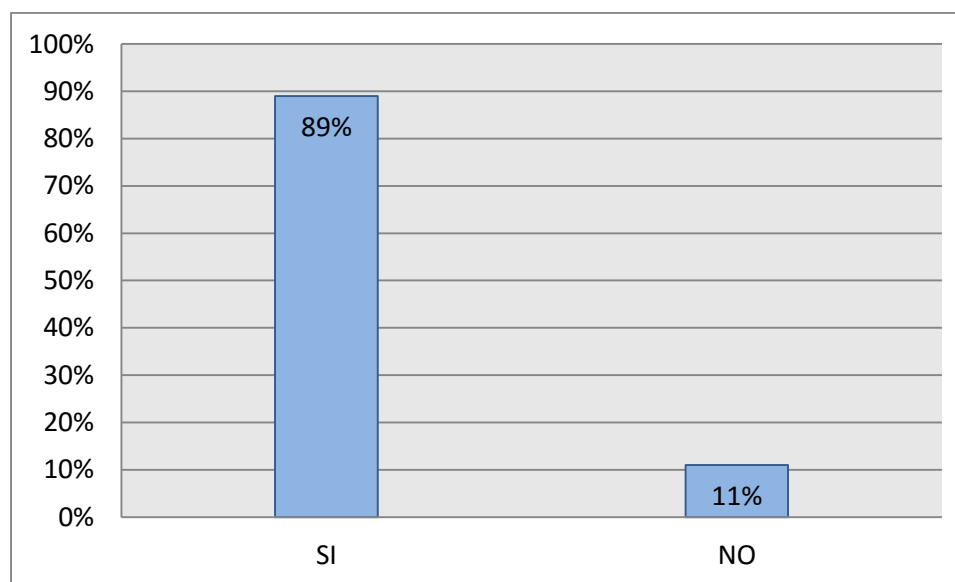


5.1 Resultados de la encuesta que se realiza a pobladores de la comarca Jocote Dulce.

Se aplicaron 90 encuestas una por cada familia para determinar si los pobladores de la comarca Jocote Dulce usan repelentes y si consideran importante usarlo, ya que en esa comarca se han reportado varios casos de Dengue, Chikungunya y hasta muerte por estas Arbovirus.

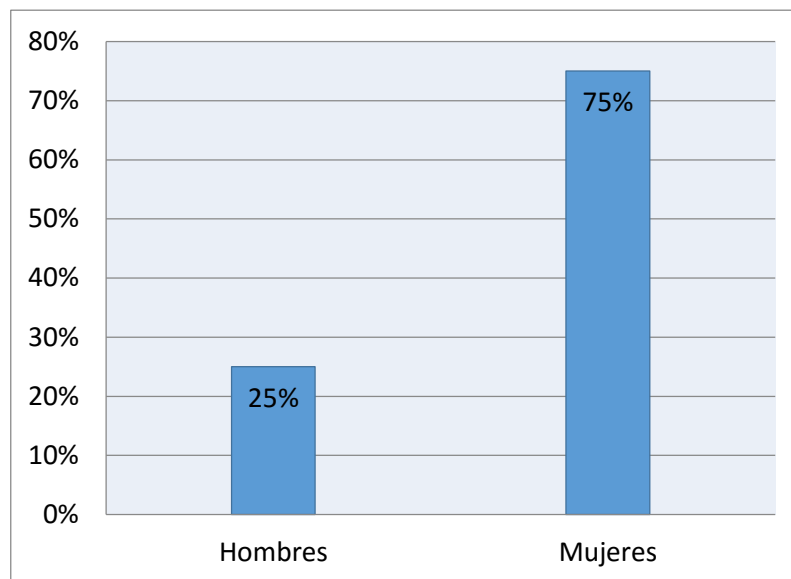
De estas 90 familias 10 no utilizan repelente como opción de prevención contra la picadura de mosquitos, por lo tanto estas 10 familias que representan el 11% no son tomadas en cuenta para seguir contestando las demás preguntas de la encuesta, debido a que solo pueden ser contestadas por personas que si usan repelentes.

Gráfico 5.1. Uso de repelente personal



De acuerdo al gráfico 5.1 de las 90 familias encuestadas el 89% afirman utilizar repelentes como protector contra insectos y un 11% no utilizan hasta la fecha repelente como opción de prevención, lo que indica que la mayoría de la población de este sector utiliza este tipo de producto ofertado en el mercado.

Gráfico 5.2 Uso de repelente Vs Sexo



El gráfico 5.2 muestra que aproximadamente el 75% de las mujeres usan repelente en comparación con los hombres que lo utilizan en un 25%, lo que demuestra que las mujeres son los usuarios mayoritarios de repelentes en el mercado.

Gráfico 5.3. Frecuencia de compra de repelentes

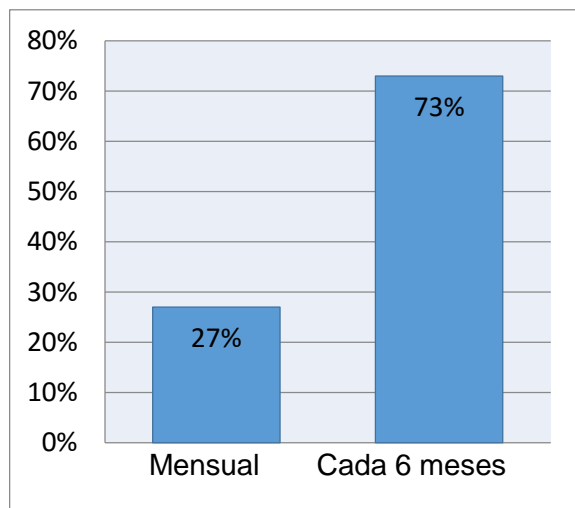
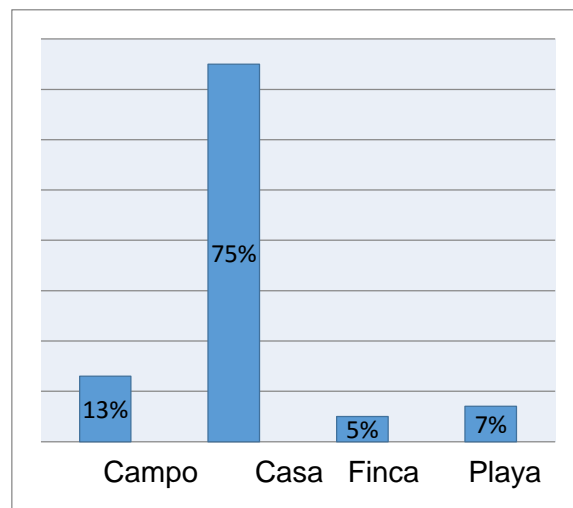


Gráfico 5.4. Lugares donde se necesita usar repelentes



Los gráficos 5.3 y 5.4 muestran que el 73% de las personas encuestadas compran repelente cada 6 meses y que el 75% lo utiliza más en su casa.

Gráfico 5.5. ¿Insectos que se necesita repeler?

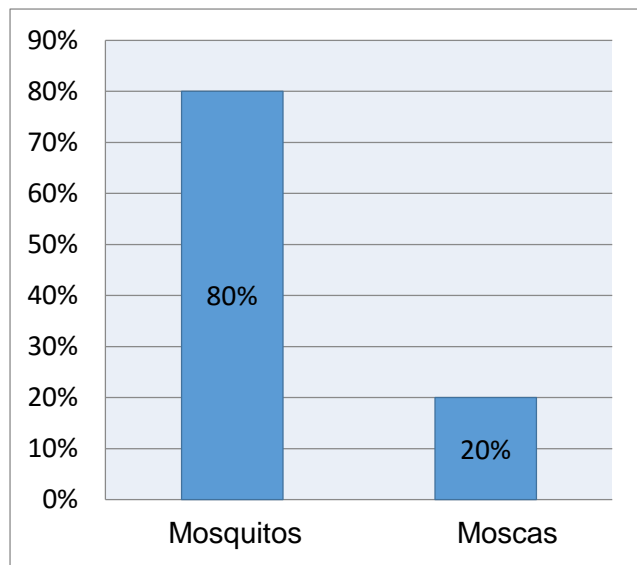
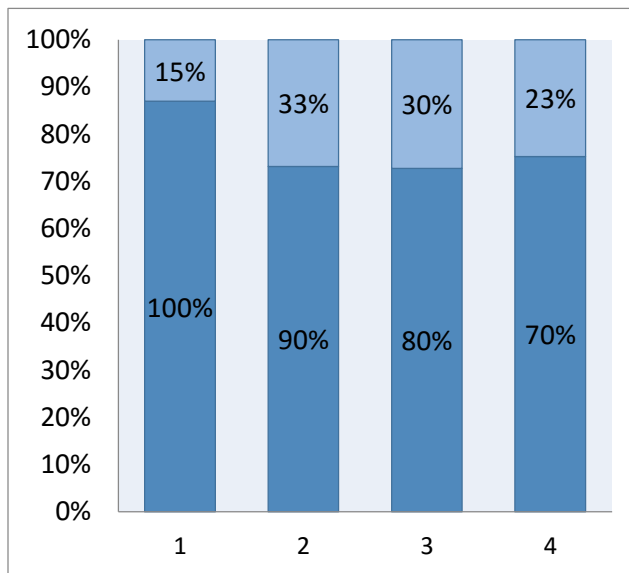


Gráfico 5.6. Nivel de confianza al usar repelente



En los gráficos 5.5 y 5.6 se observa que el principal motivo por el que los pobladores utilizan repelente es por temor a la picadura de mosquitos y que un 15% al utilizarlo se sienten protegidos de las picaduras de mosquitos en hasta un 100%.

Gráfico 5.7. ¿Se debe de promover el uso de repelentes?

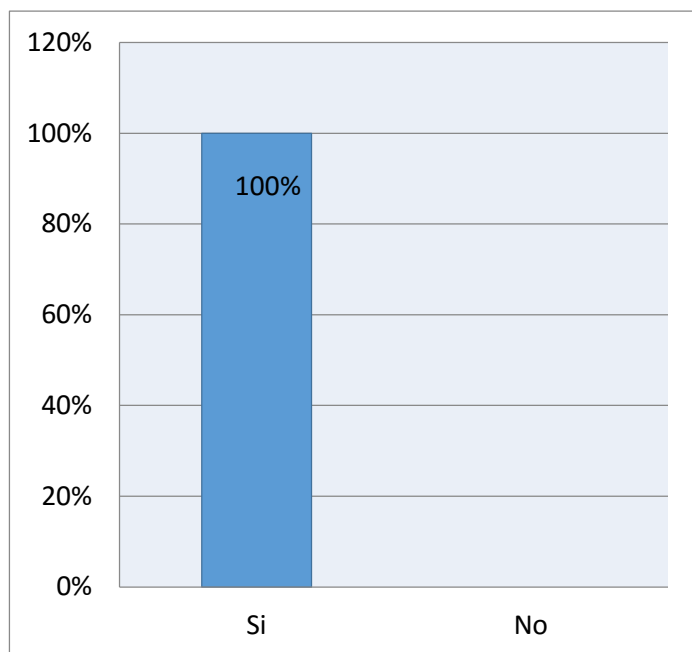
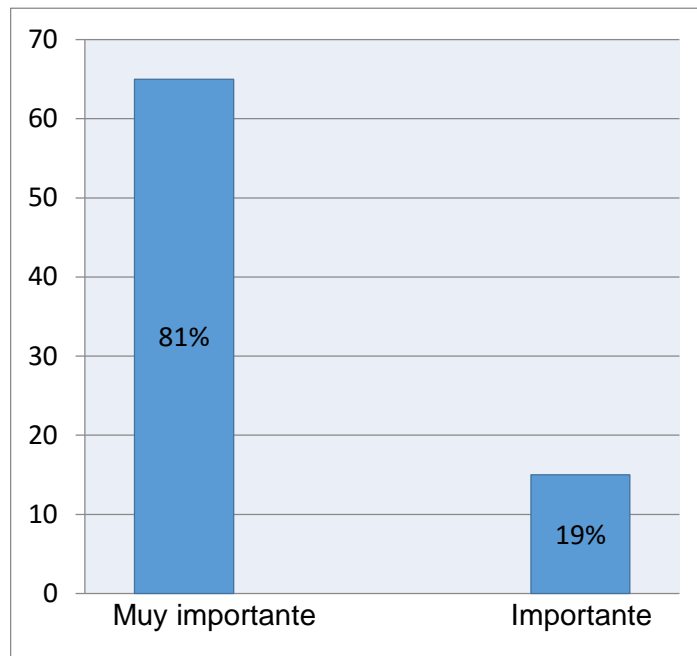


Gráfico 5.8. ¿Importancia de usar repelente que no dañe el medio



En los gráficos 5.7 y 5.8 se observa que los habitantes contundentemente aceptan que por parte de las autoridades se debe de formentar el uso de repelente como medida prevención, además afirman que es muy importante para ellos que el repelente que usen no dañe el medio ambiente.

5.2 Identificación cualitativa de metabolitos secundarios en las semillas de *Azadirachta indica* A. Juss (Neem).

La identificación cualitativa se lleva a cabo cómo se detalla en la sección (4.6.3.3) en semillas de Neem de la especie *Azadirachta indican* A. Juss, donde se sigue la metodología descrita por Pushker et al (2011) quien identificó taninos, flavonoides, saponinas, terpenoides, alcaloides y esteroides en semillas de Neem, en la especie *Azadirachta indica* Lynn.

Los resultados que se obtienen de *Azadirachta indican* A. Juss se presentan en la tabla 5.1 donde se observa que de los seis metabolitos secundarios en estudio solamente 5 resultan positivos no encontrando así esteroides e identificado con mayor intensidad a los flavonoides.

Tabla 5.1. Metabolitos secundarios en semillas de *Azadirachta Indica* A. Juss. (Anexo 17).

Metabolitos	Indicador	Tipos De extracto	
		Acuoso	Metanólico
Taninos EA ₁	Coloración verde	+	
Flavonoides EA ₂	Coloración amarilla	+	
Saponinas EA ₃	Espuma	+	
Terpenoides EA ₄	Coloración rojiza	+	
Alcaloides EM ₁	precipitado cremoso/marrón		+
Esteroides	Coloración azul		–

(+) Indicador de presencia y (–) Indicador de ausencia del metabolito de interés.

Además es necesario recalcar que para este estudio es de especial interés comprobar la presencia de **Terpenoides** en extracto acuoso no solamente porque son metabolitos secundarios de interés farmacológico sino también porque Angulo Escalante et al (2004) y Ramos et al (2004) afirman que Azadiractina pertenece a esta clasificación y es el compuesto químico responsable de la actividad repelente del Neem.

Los metabolitos secundarios que se encuentran en las semillas de Neem posicionan a la especie vegetal en estudio en un alto nivel de importancia farmacológica.

5.3 Obtención del Extracto acuoso de Neem para la prueba de repelencia

Para la realización de cada uno de los ensayos se prepara un nuevo extracto ya sea al 3 o 5%, obteniéndose con las siguientes características: color marrón oscuro, olor parecido al ajo, alta fluidez, sabor amargo, y un pH entre (5-5.3) resultados que concuerdan con Cheminova (2010) quienes analizaron las propiedades físicas y químicas de un extracto de Neem.

5.4 Efecto de las variables operacionales sobre la actividad y tiempo de repelencia

Para comprobar la actividad repelente de los extractos acuosos los mosquitos son mantenidos en inanición por 3 días antes de cada ensayo, a fin de garantizar que tengan apetencia de sangre; al iniciar con los ensayos se observa que si la jaula que contiene al ratón rociado con extracto de Neem se encuentra cerca de la jaula con el ratón sin extracto, los mosquitos en ambas jaula no se acercan a ninguno de los ratones, esto permite comprobar que el extracto de Neem afecta el comportamiento normal de alimentación de los mosquitos con una amplia cobertura.

A partir de esto se comprueba que a 2 metros los extractos ya no tienen influencia sobre el comportamiento de los mosquitos en el blanco y con el objetivo de obtener resultados confiables en cada ensayo son colocadas las jaula a esta distancia una de la otra, para demostrar el comportamiento conductual de los mosquitos frente a los extractos de Neem.

5.4.1 Resultados de los bioensayos experimentales en mosquitos *Aedes aegypti*.

En la tabla 5.2 se muestra la cantidad de mosquitos que se posaron en el ratón con extracto y sin extracto en dependencia del tipo de ensayo, donde cambian los valores de las variables operacionales luz, temperatura ambiente controlada y concentración del extracto, esto con la intención de conocer si los extractos de Neem poseen actividad repelente contra la especie de mosquitos *Aedes aegypti*.

Tabla 5.2. Matriz del diseño de experimento 2³.

N° de ensayos	Variables Operacionales			Cantidad de Mosquitos	
	Concentración del extracto (%)	Temperatura ambiente (°C)	Luz eléctrica	Con extracto	Sin extracto
				Cantidad	Cantidad
1	3	20	Apagada	4	16
2	5	20	Apagada	2	19
3	3	30	Apagada	3	17
4	5	30	Apagada	1	19
5	3	20	Encendida	7	14
6	5	20	Encendida	3	13
7	3	30	Encendida	5	16
8	5	30	Encendida	3	14

A través de la aplicación del diseño de experimentos en ratones se demuestra que los extractos en contribución con las variables operacionales repelen a los mosquitos *Aedes aegypti* de la fuente de alimentación utilizada, lo contrario sucede si esta fuente de alimentación no es rociada con extracto de Neem aunque estos se encuentren bajo las mismas condiciones operacionales.

Además se demuestra que las condiciones experimentales del ensayo 4 son en las que se acercan menos mosquitos al ratón rociado con extracto de Neem al 5%.

Tabla 5.3. Porcentaje de *Aedes aegypti* sin importar las variables operacionales.

Tipo de ensayo	Concentración	Cantidad de <i>Aedes aegypti</i> en el ratón
Con extracto	3%	25%
	5%	15%
Sin extracto	Blanco (0%)	80%

En la tabla 5.3 se representa el porcentaje de mosquitos que se posan según las concentraciones de los extractos y se observa a simple vista la diferencia que existe entre la cantidad de mosquitos en el ratón con extracto y sin extracto, lo que comprueba que tienen actividad repelente sin tomar en cuenta cuales sean las variables operacionales de cada ensayo, además se demuestra que realmente la fuente de alimentación utilizada como blanco es útil para corroborar la apetencia de los mosquitos ya que se alimentan hasta el 80% de la cantidad total de mosquitos utilizados.

Tabla 5.4. Resultados de las variables respuestas.

N° de ensayos	Variables Operacionales			Variables Respuesta	
	Concentración del extracto (%)	Temperatura ambiente (°C)	Luz eléctrica	%Repelencia	Tiempo de repelencia
1	3	20	Apagada	60	24
2	5	20	Apagada	80	30
3	3	30	Apagada	70	25
4	5	30	Apagada	90	30
5	3	20	Encendida	33	4
6	5	20	Encendida	63	9
7	3	30	Encendida	52	5
8	5	30	Encendida	64	15

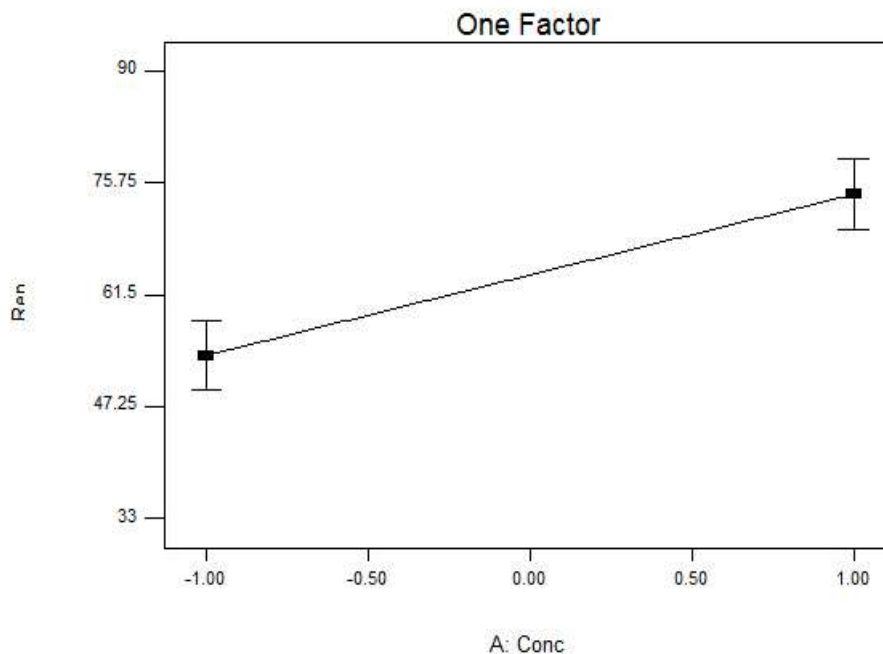
En la tabla 5.4 se observa que los extractos de Neem al 3 y 5% evaluados con el diseño de experimento demuestran tener actividad repelente tomando valores en

porcentaje que van desde un 33% hasta un 90% de repelencia frente a los mosquitos, en todos los ensayos los extractos demuestran tener esta actividad sin importar los valores que tomen las variables operacionales resultados que concuerdan con (Valencia Botin et al, 2004) quien también encontró actividad repelente frente a moscas con las mismas concentraciones de extractos de Neem al 3 y 5%.

El mayor porcentaje de repelencia se obtiene bajo las condiciones operacionales del ensayo número 4 dando un 90% de actividad repelente durante 30 minutos.

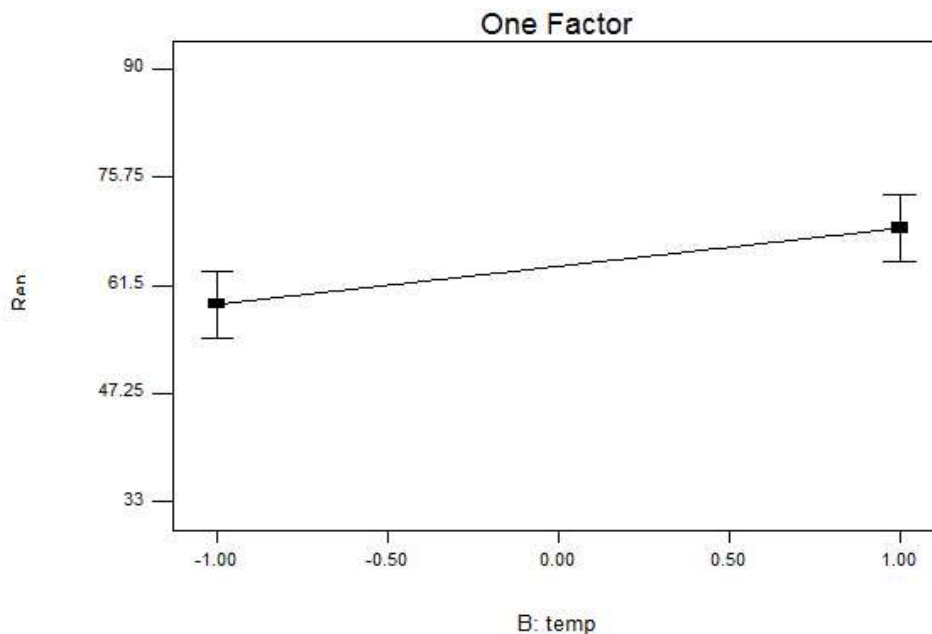
5.4.2 Comportamiento de los factores sobre la actividad repelente de los extractos acuosos de Neem.

Gráfico 5.9 % de Repelencia Vs Concentración del extracto acuoso.



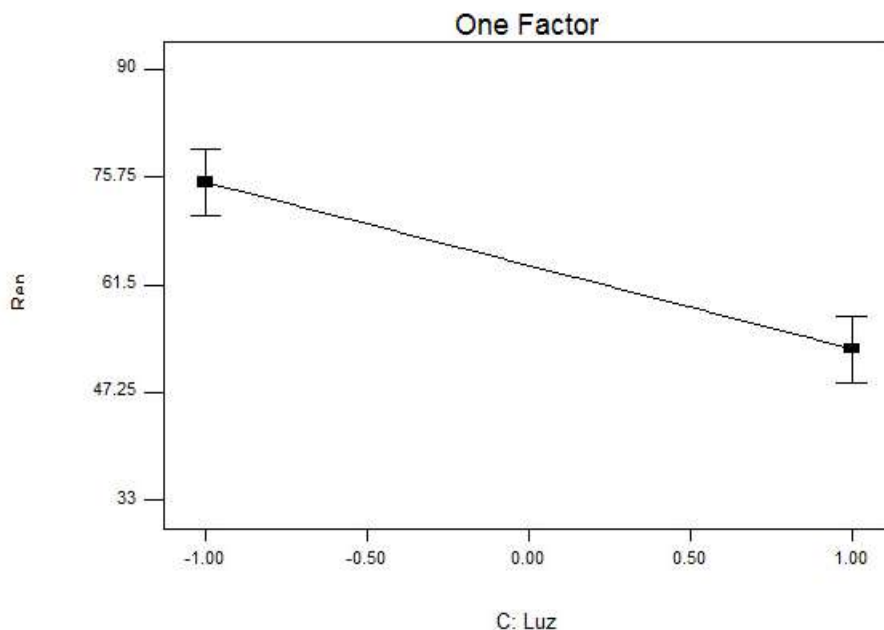
Se observa en el gráfico 5.9 que la concentración de los extractos y el porcentaje de repelencia son directamente proporcional, produciéndose más repelencia cuando es mayor la concentración del extracto de Neem, por lo que se consigue mayor repelencia al 5% y menor repelencia al 3%, se asume entonces que los extractos logran alcanzar el equilibrio entre la cantidad de soluto (polvo de Neem) adicionado y el volumen de solvente utilizado (agua) es decir son las cantidades proporcionales suficientes para que los compuestos químicos o el compuesto químico responsable de la repelencia se disuelva favorablemente presentando su intensidad de repelencia según la cantidad de polvo adicionado.

Gráfico 5.10. % de Repelencia Vs Temperatura



El gráfico 5.10 muestra que cuando la temperatura aumenta el porcentaje de repelencia también aumenta, esto podría deberse a que se dispersa más favorablemente por la contribución del calor en el medio (aire) logrando que los mosquitos lo perciban más eficazmente y se mantengan alejados del ratón, lo contrario sucede cuando la temperatura está a 20 °C, es decir el factor temperatura no afecta en si al comportamiento conductual de los mosquitos si no a la forma de dispersión del extracto en relación con la temperatura del medio.

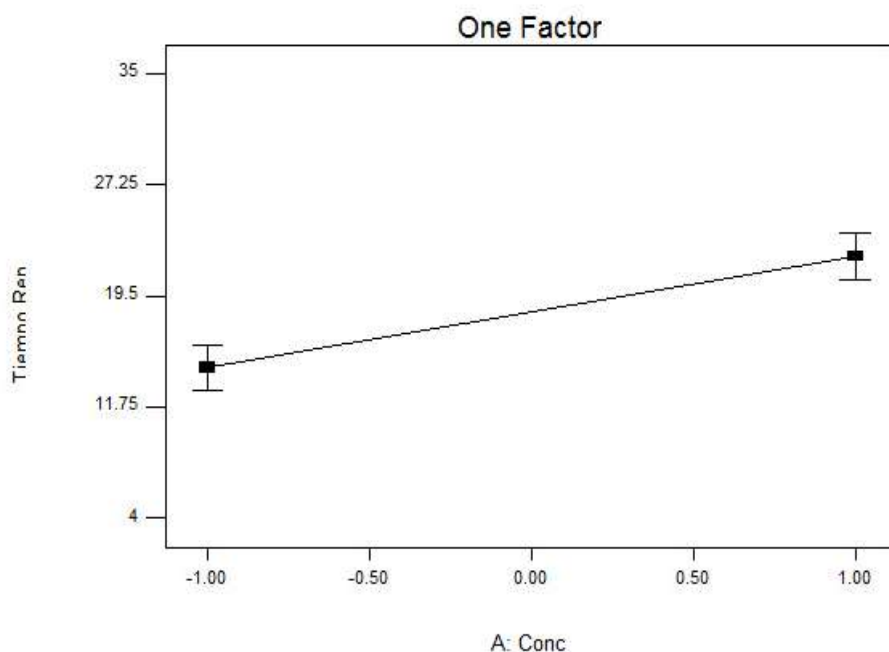
Gráfico 5.11 % de Repelencia Vs Luz



El gráfico 5.11 demuestra que el extracto posee repelencia tanto con luz apagada como encendida, sin embargo la actividad repelente de los extractos disminuye si la luz está encendida, se asume que esto se da porque el compuesto químico Azadiractina responsable de la actividad repelente del extracto es fotosensible es decir se degrada en presencia de luz lo que provoca que disminuya la actividad repelente, por ello lo contrario sucede cuando la luz está apagada.

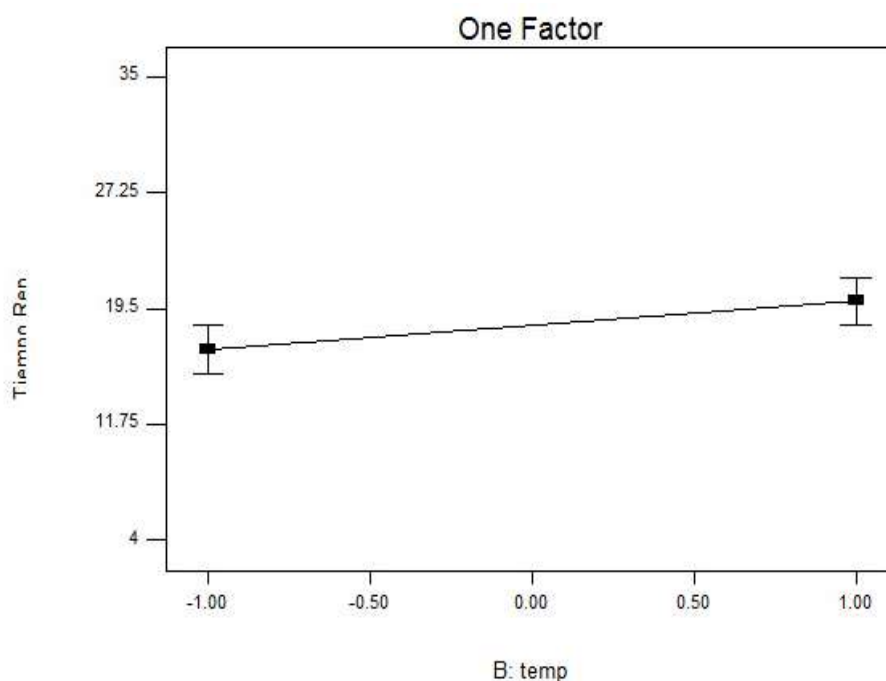
5.4.3 Comportamiento de los factores sobre el tiempo de repelencia de los extractos acuosos de Neem

Gráfico 5.12 Tiempo de Repelencia Vs Concentración del extracto acuoso



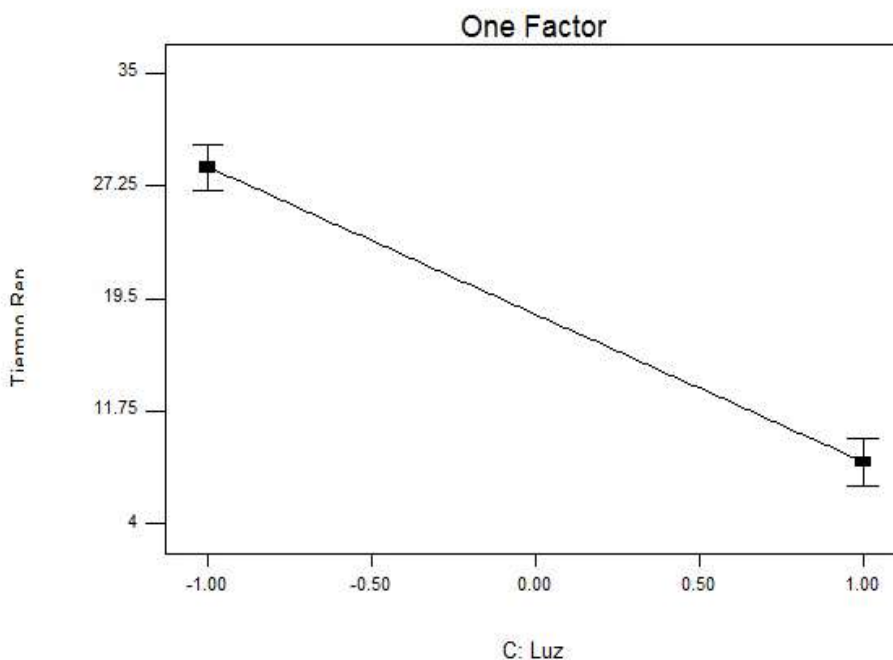
El gráfico 5.12 muestra que la concentración es directamente proporcional al tiempo de repelencia esto puede explicarse basándose en la cantidad de polvo contenido en el extracto lo que conduce a que el efecto se prolongue con respecto al tiempo, pero esto no quiere significar que la proporcionalidad se mantenga a medida que aumentamos la concentración, podemos afirmar lo anterior solamente en el dominio de nuestro experimento.

Gráfico 5.13 Tiempo de Repelencia Vs temperatura



Nuevamente en el gráfico 5.13 se observa que hay relación directamente proporcional entre la temperatura y el tiempo de repelencia, a mayor temperatura mayor tiempo de repelencia, lo cual puede explicarse que a mayor temperatura el olor del extracto se dispersa en el aire por la influencia de calor y logra permanecer en el ambiente evitando que los mosquitos se acerquen rápidamente al ratón.

Gráfico 5.14 Tiempo de Repelencia Vs luz



El gráfico 5.14 demuestra que el tiempo de repelencia de los extractos disminuye si la luz está encendida estos se da porque los extractos de Neem son fotosensibles y su intensidad de repelencia disminuye en presencia de luz, lo contrario se observa en oscuridad donde el efecto de los extractos es más intenso provocando que sean repelidos los mosquitos por mayor tiempo.

Con los resultados que proporciona el programa Design Expert 7, se observa que la máxima actividad y tiempo de repelencia están relacionadas con la concentración al 5%, máxima temperatura de 30 °C y luz apagada y la menor actividad y tiempo de repelencia se presentan con concentración al 3%, temperatura de 20 °C y luz encendida.

El software utilizado permite predecir resultados de las variables respuestas, tiempo y acción repelente con las ecuaciones de la tabla 5.5, al introducir valores no

experimentados de los factores A: Concentración del extracto, B: Temperatura ambiente controlada y C: Luz eléctrica, calculando así una respuesta teórica útil para optimizar tiempo y recursos a fin de encontrar los resultados que se desea obtener de manera más rápida.

Tabla 5.5 Predicciones del % y tiempo de repelencia según Design- Expert 7

Ecuación para calcular % Repelencia	Ecuación para calcular tiempo de repelencia
$\%R=(64+10.25) \times (A+5.0) \times (B-2.25) \times (A \times B)$	$T_R=(18.38+3.88) \times (A-10.13) \times (C-0.13) \times (A \times C)$

5.4.4 Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño factorial.

Esta técnica ayuda a explicar la variabilidad en las observaciones contenidas en el diseño de experimento. Según los resultados de la tabla 5.6 podemos observar que los valores críticos (p-value) de los factores A (concentración), B (temperatura) y C (Luz) son menores que el nivel de significancia estadística utilizado 0,05, siendo el factor C: luz el que tiene mayor efecto, el B: temperatura menos influencia, quedando el factor A: concentración con un efecto intermedio, sin embargo la interacción entre estos factores no demuestra tener efecto significativo debido a que sus valores crítico son mayores al valor de significancia estadística 0,05.

Por lo tanto se concluye según el test de Fisher planteado, que se acepta la hipótesis nula (Los extractos acuosos de semillas de Neem obtenidos por maceración en frío demuestran actividad repelente contra mosquitos hembra *Aedes Aegypti*) cuando las variables interactúan ya que sus valores críticos son mayores del valor 0.05.

Tabla 5.6. Influencia de los factores sobre la actividad repelente de los extractos acuosos de Neem.

Response	1	Rep				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2008.50	3	669.50	32.86	0.0028	significant
<i>A-Conc</i>	840.50	1	840.50	41.25	0.0030	
<i>B-temp</i>	200.00	1	200.00	9.82	0.0351	
<i>C-Luz</i>	968.00	1	968.00	47.51	0.0023	
Residual	81.50	4	20.37			
Cor Total	2090.00	7				

Response	1	Rep				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	81.50	4	20.38	0.030	0.9972	not significant
<i>AB</i>	40.50	1	40.50	0.060	0.8216	
<i>AC</i>	0.50	1	0.50	7.468E-004	0.9799	
<i>BC</i>	0.000	1	0.000	0.000	1.0000	
<i>ABC</i>	40.50	1	40.50	0.060	0.8216	
Residual	2008.50	3	669.50			
Cor Total	2090.00	7				

Tabla 5.7 Influencia de los factores en estudio sobre el tiempo de repelencia de los extractos acuoso de Neem.

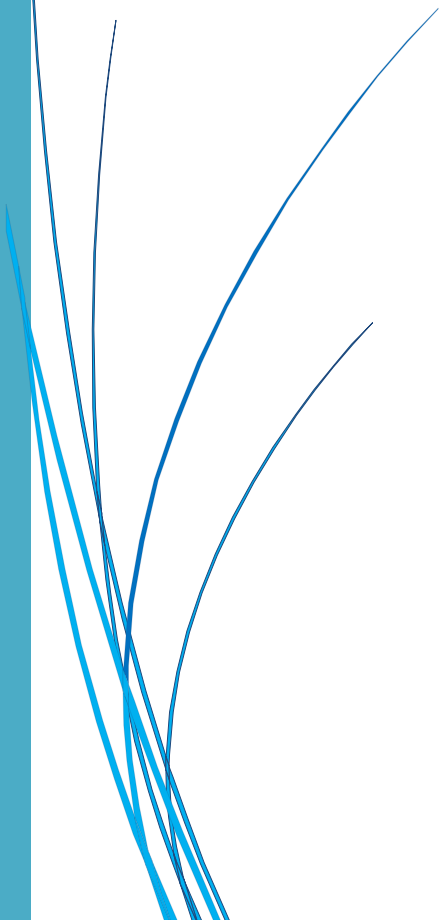
Response	2	Tiempo Rep				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	961.50	4	240.38	69.51	0.0027	significant
A-Conc	120.13	1	120.13	34.73	0.0098	
B-temp	21.13	1	21.13	6.11	0.0899	
C-Luz	820.12	1	820.12	237.14	0.0006	
AC	0.13	1	0.13	0.036	0.8614	
Residual	10.38	3	3.46			
Cor Total	971.88	7				

Response	2	Tiempo Rep				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	10.50	4	2.62	8.191E-003	0.9998	not significant
AB	10.12	1	10.12	0.032	0.8702	
AC	0.12	1	0.12	3.901E-004	0.9855	
BC	0.12	1	0.12	3.901E-004	0.9855	
ABC	0.12	1	0.12	3.901E-004	0.9855	
Residual	961.38	3	320.46			
Cor Total	971.88	7				

En la tabla 5.7 se muestra que el factor A (concentración), B (Temperatura) y C (luz) tienen efecto significativo sobre el tiempo de repelencia porque sus valores críticos son menores al nivel de significancia 0,05 con un nivel de confianza especificado del 95%, es decir que estos factores influyen sobre el tiempo de repelencia de los extractos acuosos de Neem, siendo el factor luz el de mayor efecto seguido por la concentración y el de menos influencia el factor temperatura, sin embargo sus interacciones no influyen significativamente sobre la variable respuesta tiempo de repelencia.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES



De acuerdo al análisis de los resultados se obtienen las siguientes conclusiones:

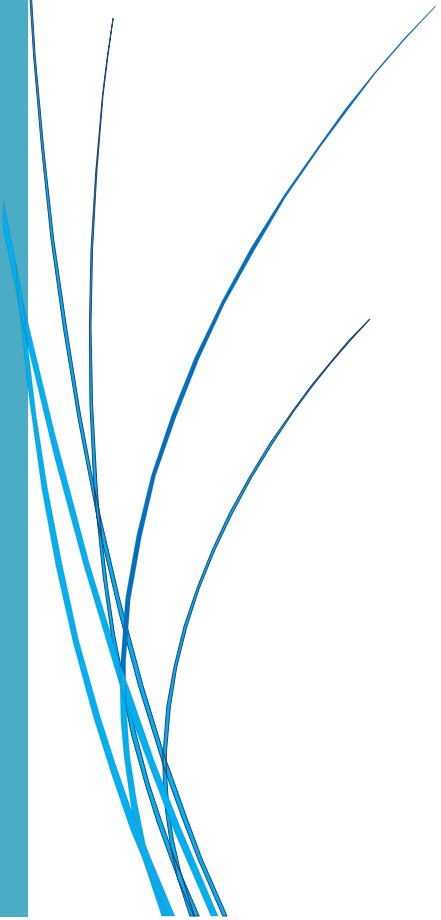
1. Aplicando encuestas a pobladores de la comarca de Jocote Dulce en Managua se logra demostrar que el 89% de las personas utilizan repelentes como alternativa de prevención contra la picadura de mosquitos, además se comprueba que para los usuarios de estos productos es de suma importancia que sean de origen natural.
2. El tamizaje fitoquímico permite comprobar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en las semillas de Neem (*Azadirachta indica A. Juss*) identificando Flavonoides, Alcaloides, Taninos, Saponinas y Terpenoides lo que demuestra que las semillas de Neem son una fuente rica de metabolitos secundarios de importancia farmacológica, que permite posicionar al árbol de Neem como un candidato potencial para el desarrollo de nuevos fitofármacos en Nicaragua.
3. A través de la técnica maceración en frío se obtienen extractos acuosos de semillas de Neem al 3 y 5% (*Azadirachta indica A. Juss*) utilizando pocos equipos, de manera sencilla y económica lo cual propone un método factible para otras investigaciones.
4. Los resultados obtenidos del ensayo preclínico utilizando el diseño de experimento 2³, demuestra que todas las variables operacionales (concentración del extracto acuoso, temperatura ambiente y luz) permiten comprobar que los extractos de Neem al 3 y 5% poseen actividad repelente frente a la especie de mosquitos hembras *Aedes aegypti*, por lo tanto se acepta la hipótesis planteada del presente estudio.



CAPÍTULO VII



RECOMENDACIONES



De acuerdo a las conclusiones de este estudio se hacen las siguientes recomendaciones a futuros investigadores del área de salud:

1. Realizar encuestas en otros sectores del país con el fin de determinar el uso de repelentes en distintas poblaciones tomando en cuenta nivel académico, socioeconómico y sociocultural.
2. Identificar metabolitos de interés farmacológico, que no fueron identificados en este estudio, en distintas partes del árbol de Neem *Azadirachta indica* A. Juss.
3. Hacer evaluaciones *in vivo* de otras posibles propiedades farmacológicas del árbol de Neem que pueden ser de utilidad.
4. Elaborar un repelente a partir de extracto acuoso de Neem y realizar ensayos de acuerdo al diseño de experimento planteado en este estudio para comprobar si se mantienen o cambian los resultados de repelencia con un producto terminado.
5. Realizar estudio de estabilidad a la formulación optimizada.



BIBLIOGRAFIA

1. Almirón, Walter. (2009). Ficha técnica *Aedes aegypti*. Córdoba: Centro de investigaciones Entomológicas de Córdoba.
2. Álvarez, N.S & Bagué, A.J. (2012). *Tecnología Farmacéutica*. España: Club Universitario. American Cancer Society. (11 de Noviembre de 2014). *Que son estudios preclínicos*. Obtenido de <http://www.cancer.org>
3. Angulo Escalante et al. (2004). Contenido de Azadiractina en semillas de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, Vol 27(4), pág. 305-311.
4. Antonio Amoretys et.al. (2006). *Tasa de incidencia de Dengue en el municipio de Morrito departamento de Rio San Juan (Monografía)*. UNAN-Managua, Rivas, Nicaragua.
5. Berenguer Rivas et al. (2010). Toxicidad a dosis repetidas de *Azadirachta indica* A. Juss. (árbol del Nim). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.*, 15(3), 143-151.
6. Berenguer Rivas et al. (2013). Toxicidad aguda oral de *Azadirachta indica* (árbol del Nim). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Vol 18(3), pág. 502-507.
7. Boada et al. (2010). *La experimentación animal*. España: Univeridad española.
8. Buxton, R. (2007). *Design Expert 7*. Obtenido de Mathematics Learning Support Centre: www.lboro.ac.uk
9. Cabrera Muñoz et al. (2006). Los mosquitos (Diptera culicidae) de Tlaxcala, México. Lista comentada de especies. *Revista folia entomologica mexicana*, Vol 45(3), pág.223-271.
10. Cheminova Agro, S.A. (2010). *Fichas de datos de seguridad de Ziradina*. Madrid: Catellana.

11. CIET. (20 de Septiembre de 2004). *Estudio piloto para el control de mosquitos en barrios de Managua*. Obtenido de Camino verde para la prevención del dengue: <http://caminoverde.ciet.org/es/nicaragua/pilot-study/>
12. Conde Osorio, A.M. (2003). *Estudio de longevidad y el ciclo gonotrófico del Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) cepa Girarpot (Cundinamarca) en condiciones de laboratorio*. Bogotá, D.C. Colombia: Facultad de ciencias.
13. Conrick, J. (27 de septiembre de 2004). *Arbol de neem. El árbol del siglo XXI. Propiedades del aceite esencial y usos*. Obtenido de Cartagena ecológica: <http://ecologicocartagena.blogst.com>
14. Contreras, L.L.C. (2011). *Utilización de un extracto alcohólico de Neem (Azadirachta indica A. Juss) Para el control de Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae)*. Valdivia, Chile: Facultad de ciencias agrarias.
15. Daza, L & Flores, N. (2006). *Diseño de un repelente para insectos voladores con base en productos naturales*. Medellín: Departamento e ingeniería en procesos.
16. Delgado Barreto et al. (2012). Propiedades entomótóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hubner. *Chapingo Serie Horticultura, Vol 18(1)*, pág. 55-69.
17. Dengue. Mapa interactivo de la actividad del Dengue a nivel mundial. (Diciembre de 2015). Obtenido de Center for disease control and prevention: <http://www.cdc.gov/dengue/>
18. Ecured. (25 de mayo de 2012). *Maceración*. Obtenido de Conocimientos con todos y para todos: www.ecured.cu
19. Estallo et al. (2011). Oviposición diaria de *Aedes aegypti* en Orán, Salta, Argentina. *Revista Saúde Pública, Vol 45(5)*, pág. 977-980.

20. FAO. (2006). *Evaluación de los ensayos internacionales de procedencias de neem*.
Obtenido de Ensayos internacionales de procedencia: <http://www.fao.org>
21. Ferré. J. (2005). *El diseño factorial completo 2^K*. Tarragona: Departamneto de Química Analítica y Química Orgánica. Obtenido de www.rodri.urv.es
22. García et al. (2010). Búsqueda de modelos QSAR para la calidad repelente de sesquiterpenos naturales frente al mosquito de la fiebre amarilla, *Aedes aegypti*. *Revista afinidad*, Vol 461(457), pág.187-192.
23. Garza Hernández, J.A. (2010). *Determinacion molecular del impacto de infecciones mixtas con el virus del Dengue y metarhizium anisopliae sobre la capaciad reproductiva y vectorial de Aedes aegypti*. Reynosa, México.
24. Gruber, A. (1992). Biología y ecología del árbol de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) extracción, medición, toxicidad y potencial de crear resistencia. *Revista Ceiba*, Vol 33(8), pág. 250-256.
25. Guerra Corado, A.E. (2005). Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodiumpseudoaureum*) a nivel de laboratorio. Guatemala.
26. Herbal de Chiapas. (3 de marzo de 2010). *Propiedades del Neem, qué contiene, para qué sirve*. Obtenido de Herbal de Chiapas, naturaleza artesanal para tu bienestar: www.herbaldechiapas.com
27. Hernández Fernández, R.C. (2006). *Metodología de la investigación*. México: Industria Editorial Mexicana.
28. Hernández, S. (2006). El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Revista Biomedica*, Vol 2(3), pág. 252-256.
29. Jiménez Clavero, M.A. (25 de Febrero de 2012). *Los arbovirus emergentes y el cambio global*. Obtenido de Madrid: <http://www.madrimasd.org>

30. Lacayo Parajón, L.I. (1989). *Efectos de los extractos de semillas de Neem (Azadirachta Indica A.Juss) en adultos de dos especies de crisomelidos*. Turialba, Costa Rica: Centro agrónomo tropical de investigación y enseñanza.
31. Liauw et al. (2008). Extration of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) using n-hexane and ethanol: studies of oil quality, kinetic and thermodynamic. *Revista ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*, Vol 3(3), pág.49-54.
32. Lopéz Gomar, M.M. (2012). *Caracterizacion de la fracción lipídica extractable de la semilla del arbol de neem (azaridactha indica A.juss) obtenida a nivel de laboratorio por lixiviación*. Guatemala: Facultad de ingeniería.
33. Mahmoud.F & Mohamed.M. (2004). *Guia practica de investigacion en salud*. Washington,D.C.: Organización Panamericana de la Salud.
34. MARENA/INAFOR. (2002). *Guia de especies forestales de Nicaragua* (Vol. 1). Managua: Arte, S.A.
35. Martínez Tomás, S.H. (2007). *Efecto del extracto acuoso de semilla de Nim Azadirachta indica solo y en mezcla con el nematodo Romanomermis iyengari en larvas de Culex quinquefascitus*. Mexico: Departamento de entomología y acarología.
36. Ministerio de Salud. (23 de Diciembre de 2012). *Ciclo de vida del Aedes aegypti*. Obtenido de Dengue Catamarca: <http://denguecatamarca.blogspot.com/>
37. MINSA. (19 de Octubre de 2015). Nicaragua reporta 174 nuevos casos de dengue. *Hoy*, pág. 1.
38. MINSA. (25 de Abril de 2016). Minsa detalla situación epidemiológica del país. *El 19 Digital*, 1. Obtenido de <http://www.minsa.gob.ni/>
- 39.MSP. (Enero de 2016). *Virus del Zika*. Obtenido de MINSA: www.policiaecuador.gob.ec

40. Niaves Nava, E. (2015). *Evaluación del riesgo ambiental para la liberación de poblaciones *Aedes aegypti* génicamente modificados portadores de un sistema fsRIDL en el contexto del sureste mexicano*. México: Departamento de biología.
41. Nikolai Sharapin et al. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. (R. Pinzón, Ed.) Santa fé de Bogotá, D.C. Colombia: Quebecor-impreandes.
42. Nuñez, E.C. (3 de Agosto de 2008). *Texto libre*. Obtenido de Extracciones con equipo Soxhlet: www.cenucez.com.ar
43. Olaya, J.M & Méndez, J. (2003). *Guía de plantas y productos medicinales*. Bogotá., Colombia: Convenio Andrés Bello.
44. OMS. (1967). *Los arbovirus y su importancia en patología humana* (Vol. 369). Ginebra.
45. OPS/OMS. (15 de Julio de 2013). *Situación de Dengue en Centro América y República Dominicana*. Obtenido de Programa regional de Dengue: www.paho.org
46. OPS/OMS. (Lunes 20 de Octubre de 2014). *OPS/OMS, Argentina*. Obtenido de Chikungunya: un nuevo virus en la región de las Américas: www.paho.org
47. Pérez et al. (2004). Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos *Culex quinquefasciatus* say (Diptera culicidae). *Revista Acta Zoológica Mexicana*, 20(1), pág.141-152.
48. Pushker et al. (2011). Preliminary phytochemical investigation on the bark of some of the important host plants of kerria lacca-the Indian lac insect. *Revista Botany Research International*, Vol 4(3), pág. 48-51.
49. Ramos et al. (2004). Variación en contenido de azadirachtina en frutos de Margosa durante su desarrollo. *Revista Fítotecnia Mexicana*, Vol 27(1), pág.81-85.

50. Ramos Sánchez, R. (2010). *Aceite de Neem un insecticida ecológico para la agricultura*. Obtenido de ZOE: www.zoetecnocampo.com
51. Roja Alba, M. (Marzo de 2003). *Neem la planta asombrosa*. Obtenido de Tlahui-medic: www.tlahui.com
52. Rojas, T.Y. (17 de Octubre de 2011). *Cuidado y manejo de animales de experimentación*. Obtenido de SlideShare : www.fr.slideshare.net
53. Roldán et al. (2012). Efecto repelente del aceite esencial de *Euclyptus globulus* contra la picadura de *Lutzomyia peruensis*, bajo condiciones experimentales. *Revista científica de la facultad de ciencias biologicas, Vol 32(2)*, pág.91-98.
54. Sanz, E. (2 de Octubre de 2013). *¿Cómo los mosquitos son atraídos a la piel humana y la respiración?* Obtenido de Dato anuncios: www.datoanuncios.org
55. Sue, M. (2005). *El programa mundial sobre especies invasoras* (Vol. 1). (K. Brand, Ed.) Brasil: Secretaria del GIPS.
56. UNAD. (2012). *Procesamiento de material vegetal*. Obtenido de UNAD: www.datateca.unad.edu.co
57. Valencia Botin et al. (2004). Uso de extractos acuosos de Nim, *Azadirachta indica* A. Juss en la oviposición de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* loew (Diptera: Tephritidae) en naraja valencia. *Revista Fitosanidad, Vol 8(4)*, pág 57-59.

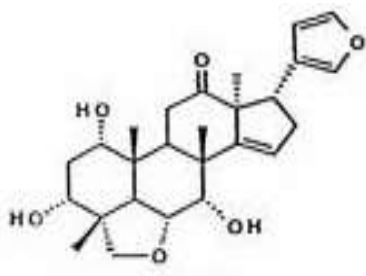
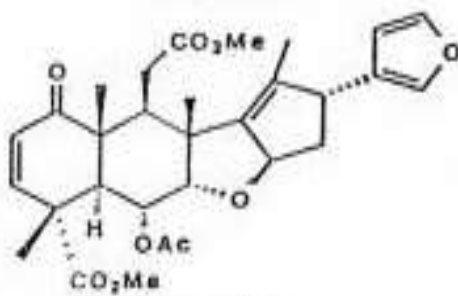
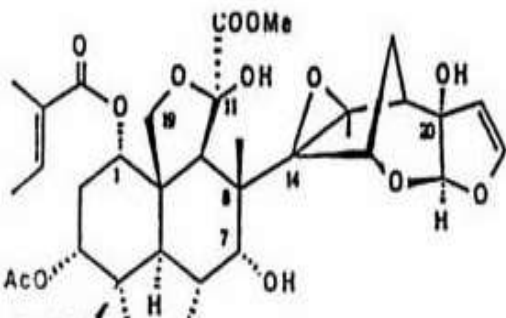
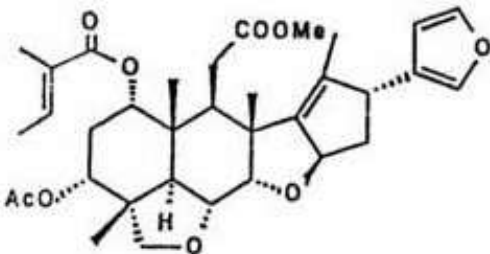


ANEXOS



ANEXO 1

Tabla 1. Actividad de Metabolitos secundarios del árbol de Neem.

<p>Nimbidina (actividad antiviral)</p> 	<p>Nimbina (actividad espermaticida)</p> 
<p>Azadirachtina (actividad repelente)</p>  <p>Fuente: (Ramos Sánchez, R, 2010)</p>	<p>Salanina (actividad antialimentaria de insectos)</p> 

Nota: Estructuras químicas de los metabolitos secundarios más estudiados del árbol de Neem

ANEXO 2

Fig. 1. Casos de Dengue en Centroamérica.

País	2012		2013	
	Casos	Incidencia	Casos	Incidencia
Belice	2.759	856,8	SD	SD
Costa Rica	3.789	83,0	13.474	295,3
El Salvador	11.691	182,8	10.367	162,1
Guatemala	1.603	13,7	3.361	21,8
Honduras	2.714	32,4	9.344	109,2
Nicaragua	3.685	70,8	8.967	172,2
Panama	165	4,6	331	9,3
R. Dominicana	1.106	13,0	5.250	61,8
Total	27.512	56,4	51.094	104,7

Fuente: (OPS/OMS, 2013)



UNAN-Managua

Encuesta

Esta encuesta se ha diseñado a fin de conocer la importancia de usar repelente personal contra mosquitos. La información reunida se utilizará como fuente primaria y de soporte para el desarrollado de un trabajo de grado, éste será llevado a cabo por estudiantes de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-Managua).

De antemano agradecemos el tiempo que está dedicando a nuestra encuesta y su sinceridad al responderla.

Fecha _____ Edad _____ Sexo _____

Nivel académico _____

1. ¿Utiliza repelente personal para mosquitos?

Sí

No

Porque? _____

2. ¿Con qué frecuencia usted compra repelente?

Mensual

Cada dos meses

Cada seis meses

Otro. ¿Cada cuánto? _____

3. Identifique con una X en qué lugar necesita usar repelente personal. (Señale las que crea necesario)

Casa

Campo

Restaurantes

Finca

Playa

4. Señale con una X cuál de los siguientes insectos voladores necesita repeler. (Señale las que desee)

Moscas

Mosquitos

- Abejas
- Avispas
- Otros. ¿Cuáles? _____

5. En qué porcentaje cree usted que utilizar repelente lo ha protegido de picaduras mortales

6. ¿Usted cree que se debería de promover más en la sociedad el uso de repelente para evitar picaduras de insectos?

- Si
- No

7. ¿Qué tan importante es para usted que el repelente comprado no dañe el medio ambiente?

- Muy importante
- Importante
- Poco importante
- Nada importante

ANEXO 4

Tabla 2. Obtención de los datos para cada ensayo

Ensayo # _____	T ° C ambiente controlada:	Luz eléctrica:
	Ratón con extracto de Neem	Ratón sin extracto de Neem
N° de mosquitos que se posan		
Tiempo en el que se posó el primer mosquito		

Fuente: Elaborado por el equipo investigador.

ANEXO 5

Descripción del programa Design Expert 7

Design Expert 7 es una herramienta de software creada para ayudar a diseñar e interpretar experimentos multifactoriales. El software ofrece una amplia gama de diseños, incluyendo los factoriales, factoriales fraccionados y diseños compuestos. Una vez que se haya decidido sobre el tipo de diseño que se va a utilizar, hay tres pasos principales:

1. **Construir el diseño:** Design Expert 7 le lleva a través de una serie de pantallas en las que se especifica la información necesaria para construir el diseño por ejemplo: nombres, rangos de las variables y grado de replicación.
2. **La evaluación del diseño:** Design Expert 7 ofrece dos tipos de información para ayudarle a comprobar si un diseño se adapte a sus necesidades.
3. **Interpretación de los datos experimentales:** Design Expert 7 ofrece una amplia gama de técnicas analíticas y gráficas para el modelo apropiado y la interpretación, además permite predecir el posible resultado de la variable en estudio al asignar valores distintos a los experimentados de las variables operacionales (Buxton, R, 2007).



Facultad de Ciencia Tecnología y Ambiente
Herbario Nacional de Nicaragua

CONSTANCIA DE IDENTIFICACION

Sr. Levy Alemán Alvarado
Química Farmacéutica
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
UNAN Managua, Managua.

Estimado Sr. Alemán Alvarado: Hacemos constar que la muestras botánica de Ním traída al Herbario Nacional para su identificación, el pasado 25 de Enero, corresponde a *Azadirachta indica* A. Juss., de la familia Meliaceae.

Se extiende la constancia en la ciudad de Managua, a los veinte y seis días del mes de Enero del año dos mil dieciséis.


MSc. Alfredo Grijalva Pineda
Director Herbario Nacional de Nicaragua
Universidad Centroamericana UCA.



ANEXO 7

Fig. 2. Procesamiento del material vegetal



1. Lavado y despulpado



2. Secado



4. Almacenamiento



3. Molienda de las semillas de Neem

Fuente: Capturadas por el equipo investigador.

ANEXO 8

Preparación de reactivos que son utilizados en las identificaciones fitoquímica.

1. **Reactivo de Mayer:** Se disolvió 1.35 g de **cloruro de mercurio** en 60 mL de agua y 5 g de **yoduro de potasio** en 20 mL de agua destilada mezclar y agitar.
2. **FeCl₃ al 5 %** = $g FeCl_3 = \frac{(5\%)(10\text{ mL})}{1000} = 0.05\text{ g}$, aforar a 10 mL con agua destilada.
3. **HCl al 1%** = $\frac{60\text{ mL} \times 1\%}{38\%} = 1.6\text{ mL}$, aforar a 60 mL con agua destilada.
4. **Amoniaco diluido** : 1 mL de amoniaco concentrado más 1 ml de agua destilada
5. **H₂SO₄**: Concentrado
6. **Cloroformo**: Concentrado
7. **Sulfato de sodio anhídrido**: Puro

Fig.3 Preparación de extracto acuoso de Neem para la identificación **ANEXO 9** fitoquímica



Fuente: Capturadas por el equipo investigador

Fig.4 Extracto acuoso de Neem después de centrifugado.

ANEXO 10

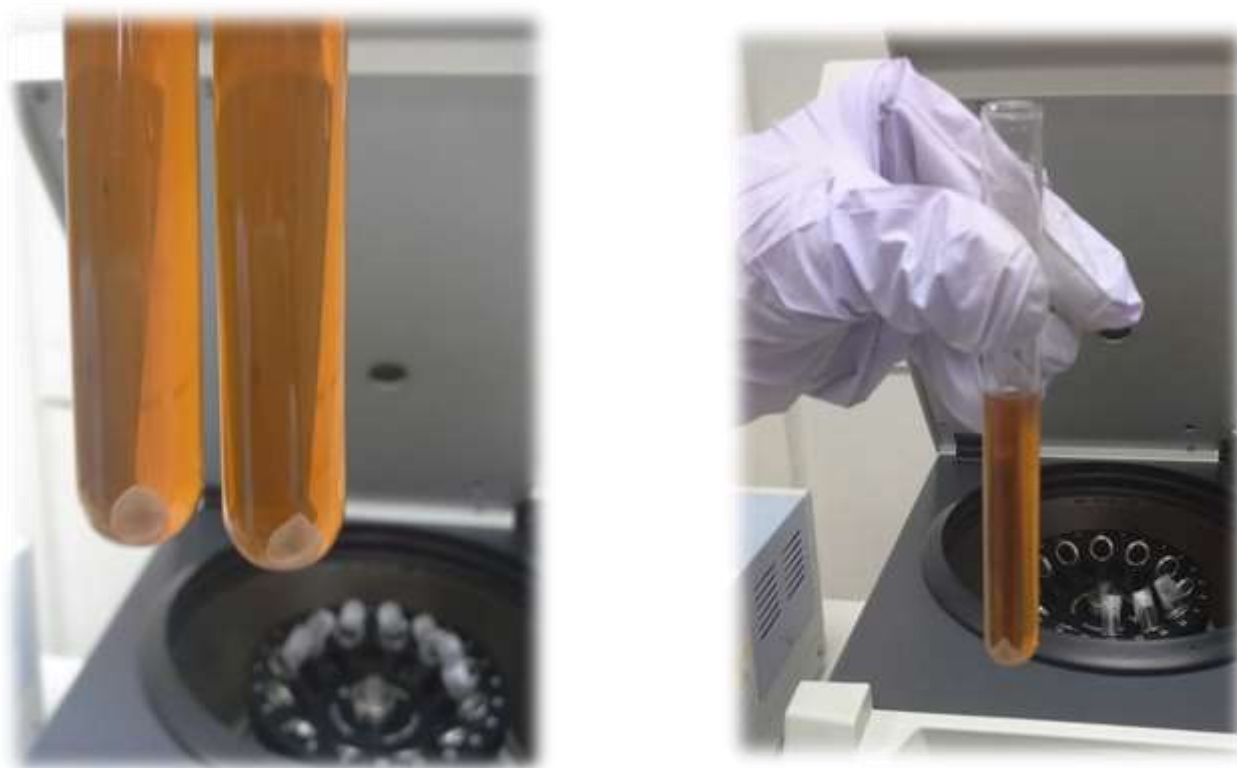


Fig.5 Separación del extracto acuoso en fracciones.



Fuente: Capturadas por el equipo investigador.

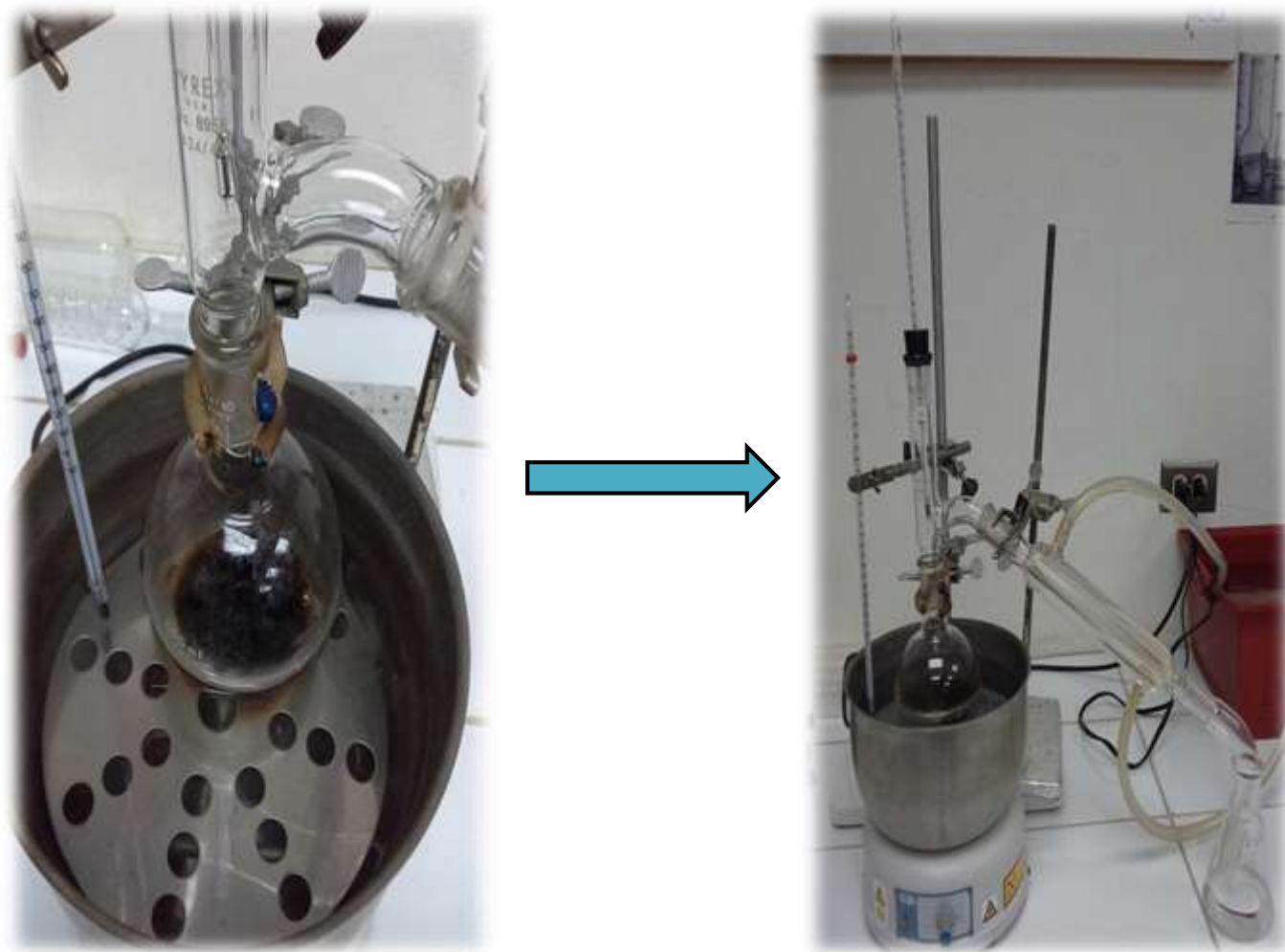
Fig.6 Obtención del extracto metánolico en equipo Soxhlet.

ANEXO 11



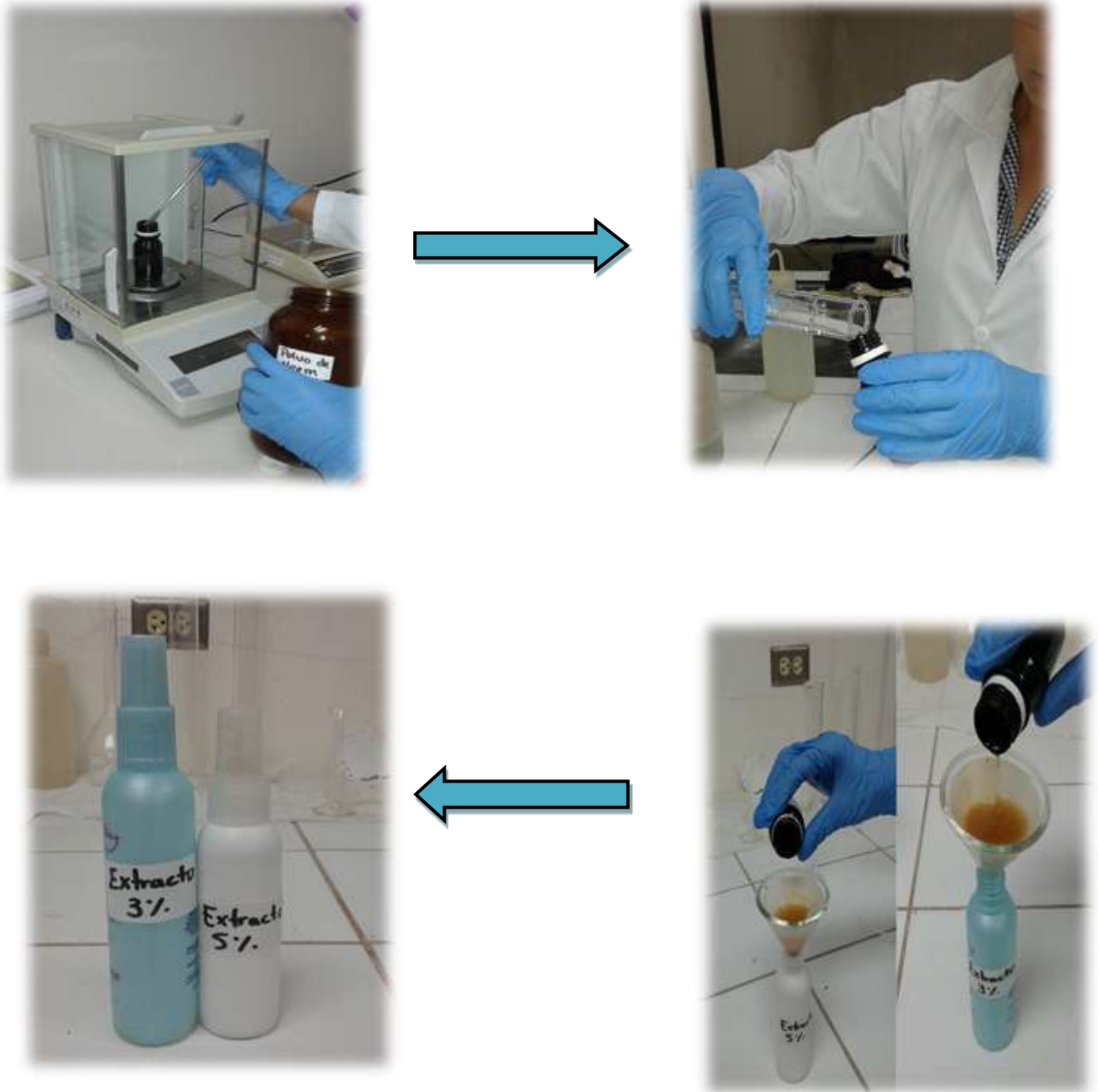
Fuente: Capturada por el equipo investigador.

Fig. 7 Destilación del extracto metánolico de Neem



Fuente: Capturadas por el equipo investigador.

Fig.8 Proceso de preparación de extractos acuosos de Neem para la prueba de repelencia. **ANEXO 13**



ANEXO 14

PROTOCOLO DE CRIANZA DE MOSQUITOS *Aedes aegypti* PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPELENTE.

Para disponer de mosquitos de edad y procedencia conocida son capturadas larvas *Aedes aegypti*, con el fin de controlar sus condiciones de crianza como temperatura y alimento. Esta captura se realiza porque es necesario tener producción constante de huevos que permita la regeneración de colonias para los ensayos de repelencia.

Estas larvas se capturan en el cementerio de Jocote Dulce ubicado de la Unan Managua 2 KM al sur 1 C oeste. Managua, la mayoría de las larvas se encuentran en el primer estadio larval en floreros de tumbas (Figura14.1).

Tabla 14.1. Materiales	
Recipiente plástico de 21×10×32 cm.	Termómetro digital
Beaker	Azúcar
Cajas de 50×25×30 cm	Ratones
Pipetas Pasteur	Recipiente plástico de 10×5×10 cm
Vasos desechables	Comida para peces (Sollatrucha)
Liga de hule	Tela de tul

- **Captura de las larvas *Aedes aegypti***

Previamente a la captura se estudia la morfología de las larvas *Aedes aegypti* en el laboratorio de entomología médica del MINSa, a fin de reconocer a la especie en estudio una vez que se esté en el lugar de captura.

Estando en el cementerio se comienzan a buscar las larvas en floreros y recipientes que acumulen agua. Cuando las larvas son identificadas se capturan de la siguiente manera:

1. Se Toma las larvas con ayuda de una pipeta pasture y se trasladan a vasos desechables
 2. Una vez que se capturan aproximadamente 200 larvas se procede a sellar con tela de tul y liga de hule los vasos, se trasladan al laboratorio de entomología médica.
- **Crianza de larvas (Diagrama 14.1)**
3. Se llena un recipiente plástico de 21x10x32 cm hasta la mitad de agua, se le agregó alimento para peces (Sollatrucha).
 4. Pasado una hora se colocan las larvas con ayuda de una pipeta y se distribuyen por todo el recipiente a fin de que tengan espacio y no se amontonen
 5. El recipiente plástico es tapado con tela de tul, para que las larvas siempre tengan ventilación
 6. El aire acondicionado también es monitoreado y se vigilaba que la temperatura del ambiente no sobrepase los 28 °C, para lograr que las larvas completen su desarrollo en el menor tiempo posible
 7. Se vigilan diariamente el alimento de las larvas y si es necesario se le agrega más, para evitar que estas mueran
 8. A partir del cuarto día de crianza las larvas comienzan a convertirse en pupas y solamente estas se retiran del recipiente hacia un vaso con agua a la mitad, no se trasladan más de 10 pupas por vaso
 9. Diariamente se trasladan pupas a los vasos y estos se colocan en la jaula de crianza de 50x25x30 cm
 10. Se dejan los vasos en el interior de la jaula y después de dos días todos los mosquitos ya han emergido
 11. Después de 24 horas se comienzan a ver que estos empiezan a volar

12. A partir de este momento se comienzan a alimentarlos dentro de la jaula de crianza
 13. A las hembras se alimentan con ratones y a los machos con agua azucarada al 10% con esta solución es empapada motas de algodón que son puesto en un ganchito de alambre, sobre el algodón se posan los machos para comer
 14. El o los ratones son puestos dentro de una trampa a fin de que no se muevan mientras son picados por las hembras durante una a tres horas
 15. Los ratones son retirados de la jaula de crianza una vez que estas son alimentadas
 16. Es importante señalar que hembras y machos son alimentados en tiempos distintos es decir uno a la vez
 17. La jaula de crianza es limpiada con ayuda de un trapo tanto por fuera como por dentro.
- **Obtención de huevos**
 1. En la jaula donde se encuentran los adultos se introduce un recipiente de 10x5x10 cm conteniendo agua y pedazos de papel para que las hembras pongan sus huevos ahí.
 2. Estos nuevos huevos son trasladados nuevamente al recipiente de 21x10x32 cm donde fueron colocadas las larvas capturadas en el cementerio y estas también son criadas de la misma manera que los mosquitos anteriores.

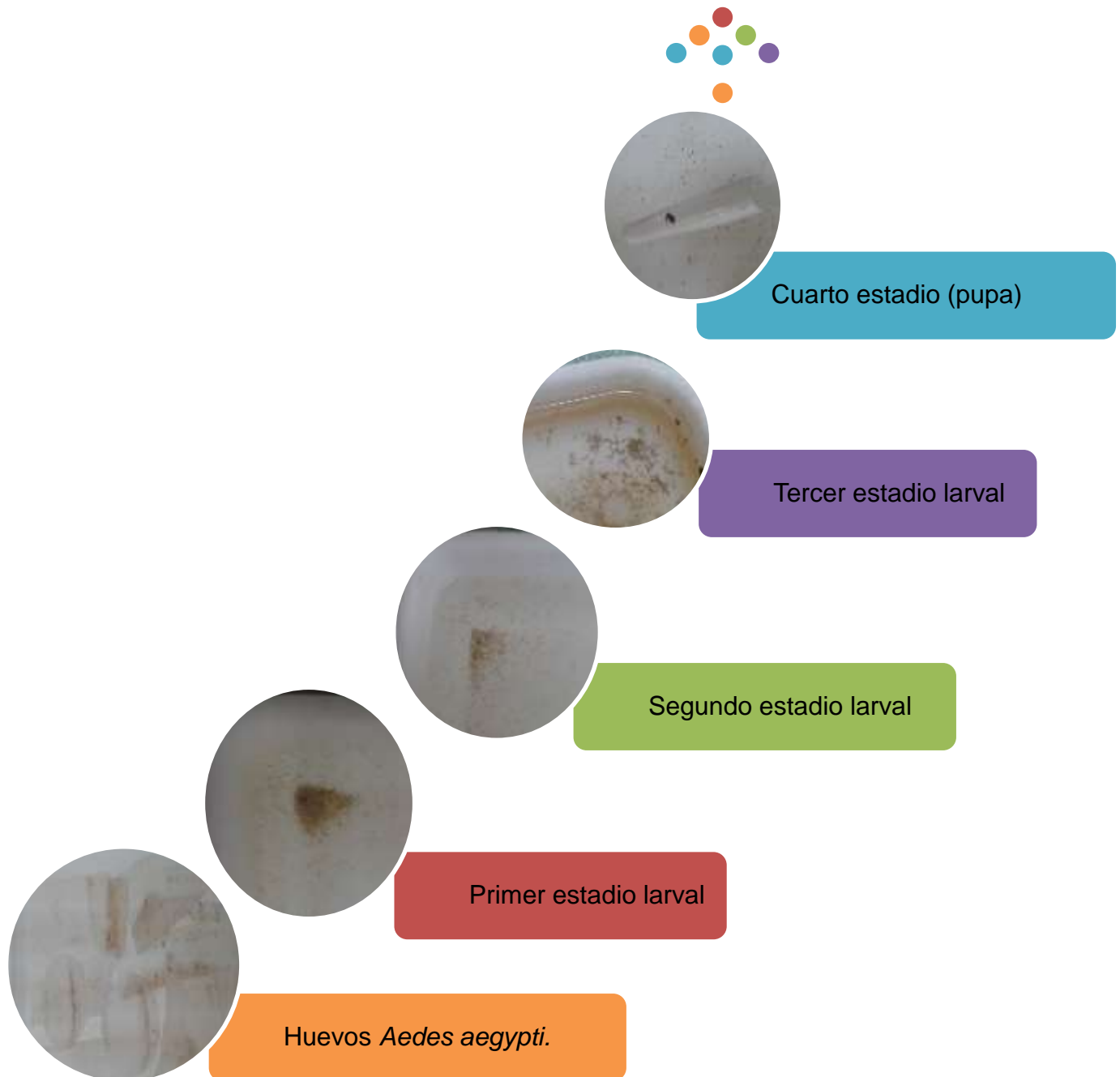
Una vez que se logra seguir reproduciendo constantemente a los mosquitos *Aedes aegypti* entonces se procede a realizar los ensayos, para evitar la sobrepoblación de mosquitos, para cada ensayo son extraídos la cantidad necesaria de mosquitos.

Figura 14.1. Captura de larvas *Aedes aegypti* en cementerio de Jocote Dulce.



Fuente: Capturadas por el equipo investigador.

Diagrama 14.1 Crianza de larvas *Aedes aegypti*.



Fuente: Elaborado por el equipo investigador.

ANEXO 15

Fig.9 Jaulas de hierro de 15x20 Cm. forradas con tela de tul



Fig. 10 Capturador oral para atrapar mosquitos



Fig.11 Atomizadores para asperjar a los ratones



Fig.12 Termhídrómetro



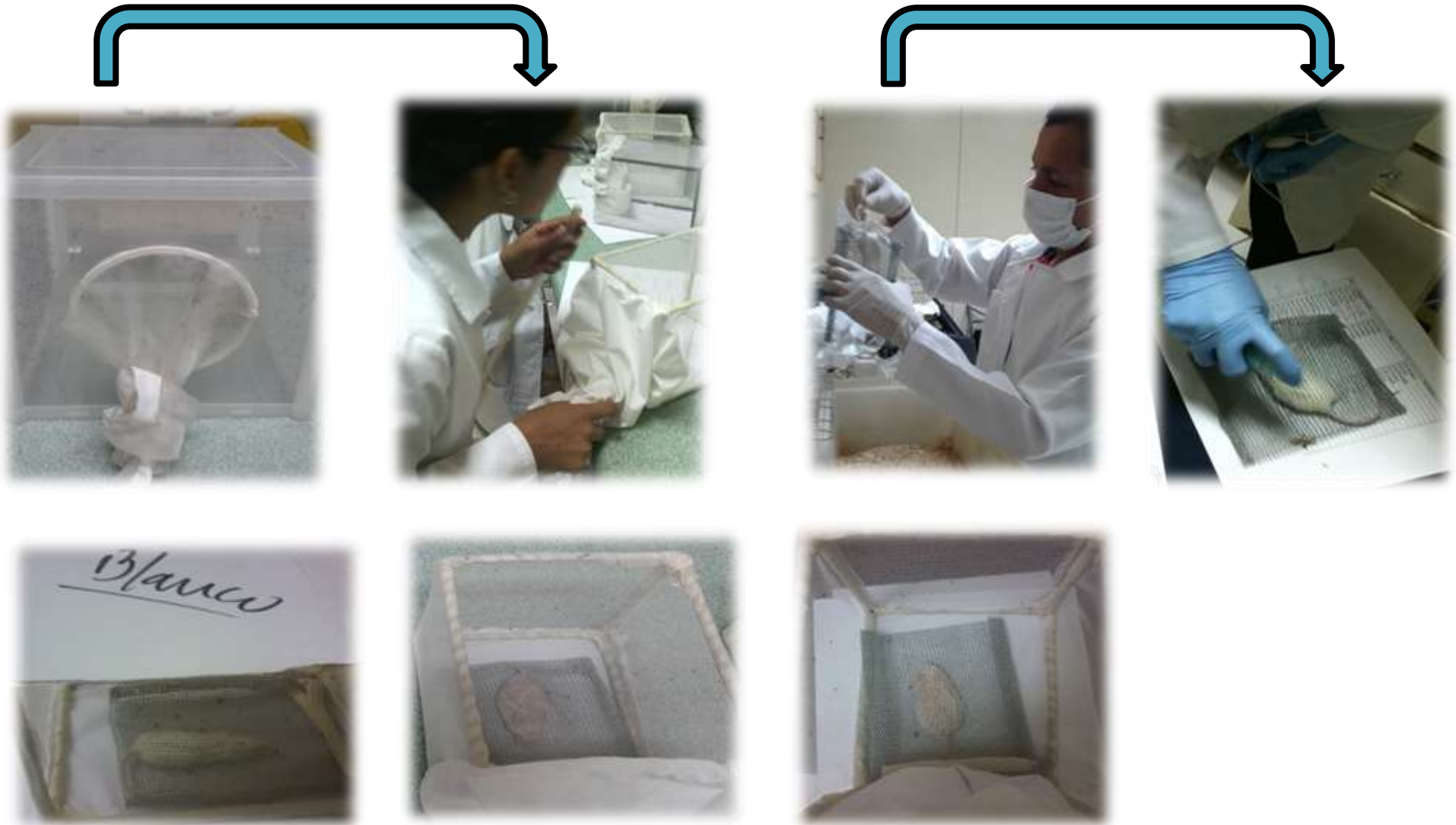
Fig.13 Trampa para ratones



Fuente: Capturadas por el equipo investigador.

ANEXO 16

Fig. 14 Procedimiento de la evaluación de actividad repelente de extractos acuosos de Neem.



ANEXO 17

Fig.15 Presencia de taninos catéquicos



Fig.16 Presencia de Flavonoides



Fig. 17 Presencia de Saponinas



Fig. 18 Presencia de Alcaloides Fig. 19 Presencia de Terpenoides



Fuente: Capturadas por el equipo investigador.

GLOSARIO

Aedes aegypti: Es un mosquito culícido que puede ser portador y transmisor del virus del dengue y de la fiebre amarilla.

Aedes albopictus: Es un mosquito vector de enfermedades como el dengue virus del Nilo Occidental.

Acarología: Es la disciplina que estudia a los ácaros.

Actividad hematofágicas: Es el hábito de alimentación de aquellos que se nutren con sangre.

Agrosilvicultura: Actividad forestal en el uso de la tierra y en el ordenamiento del territorio.

Albura: Es la parte del leño del árbol, que se encuentra entre la corteza e duramen.

Alcaloides: Metabolitos secundarios que la planta sintetiza a partir de aminoácidos.

Almendra: Parte interna de algunas semillas que recubiertas por una capa dura llamada coraza.

Anticuerpo monoclonal: Es un anticuerpo homogéneo producido por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral.

Antifúngico: Que evita el desarrollo de hongos

Antihistamínico: Que combate los efectos de la histamina.

Antipirético: Sustancia o fármaco que disminuye la fiebre.

Antropofilia: Apetencia selectiva de ciertos artrópodos por la sangre humana.

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

Aparearse: Unirse sexualmente [dos animales] o depositar el macho el esperma en los huevos puestos por la hembra.

Arbovirosis: conjunto de virus transmitidos todos por artrópodos.

Arbovirus: Es el nombre que se le ha dado a un conjunto de virus transmitidos todos por artrópodos.

Artrópodos: Animales invertebrados dotados de un esqueleto externo y apéndices articulados, insectos, arácnidos, crustáceos y miriápodos.

Asperjar: Esparcir un líquido en gotas muy finas

Azadirachtina: Es un metabolito secundario presente en las semillas del árbol de Neem o margosa.

Bioinsecticida: Sustancia orgánica utilizado para matar insectos, mediante la inhibición de enzimas vitales.

Chikungunya: Enfermedad vírica transmitida al ser humano por mosquitos infectados, principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*.

Ciclo Gonotrófico: Es el nombre que se le adjudica al período que existe desde que el mosquito chupa la sangre- ovopostura- hasta que vuelve a alimentarse.

Ciencias biomédicas: Campos de la medicina como la odontología, bioquímica, inmunología, química, biología, histología, genética, embriología, anatomía, fisiología, patología, ingeniería biomédica, zoología, botánica.

Citogénesis: Proceso de separación y segmentación del citoplasma que tiene lugar durante la última fase de la mitosis.

Citología: Parte de la biología que estudia la célula y sus funciones.

Copulación: Unión sexual entre macho y hembra, normalmente con transferencia de espermatozoides del primero a la segunda mediante el órgano copulador.

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

Crisálida: Insecto (especialmente el lepidóptero) que se encuentra en la fase de desarrollo posterior a la forma de larva y anterior a la forma adulta.

Culicidae: Los culícidos (Culicidae) son una familia de dípteros nematóceros conocidos vulgarmente como mosquitos.

Culicoides: Es un género de dípteros nematóceros de la familia Ceratopogonidae.

Coraza: Parte externa de algunas semillas que recubren otra parte de la misma a fin de resguarda la información genética más sensible a cambios climáticos.

Decocción: Extracto hecho de vegetales u otras sustancias filtrado mientras éste estaba en ebullición.

Dedal: Cartuchos de celulosa para la extracción en Soxhlet.

Dengue: Enfermedad infecciosa causada por el virus del dengue transmitida por el mosquito *Aedes aegypti*.

Disuasión: Capacidad de conseguir mediante razonamientos que alguien cambie su manera de actuar, pensar o sentir.

Dípteros: Orden de insectos de metamorfosis complicada, con la boca de tipo chupador.

Drupáceos: Fruto monospermo de meso carpo carnoso, coriáceo o fibroso que rodea un endocarpio leñoso (“carozo” o, más comúnmente, “hueso”) con una sola semilla en su interior.

Duramen: Es la madera que encuentra ocupando prácticamente toda la porción central del tronco y ramas de un árbol.

Encefalitis: Conjunto de enfermedades producidas por inflamación del encéfalo.

Entomología: Parte de la zoología que estudia los insectos.

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

Espermateca: Es un órgano del aparato reproductivo de las hembras de ciertos insectos, moluscos y de algunos otros invertebrados y vertebrados.

Evaporización: Acción de evaporar o evaporarse.

Extracto: Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, animales o minerales por diversos procedimientos.

Filariasis: Grupo de enfermedades parasitarias en el humano y otros animales.

Fitoquímica: Parte de la bioquímica que se ocupa de los procesos químicos de las plantas.

Flavonoides: Metabolitos secundarios que la planta sintetiza a partir de una molécula de fenilalanina y 3 demalonil-CoA.

Flebótomos: Son insectos de tamaño reducido que miden de 2 a 4 mm y que tienen el aspecto de un pequeño mosquito.

Folíolo: Separación que hay entre una hoja y otra.

Forraje: Hierba verde o seca que se da al ganado para alimentarlo.

Franco arenoso: Suelo con contenido poco de arena.

Franco arcilloso: Suelo que contiene en exceso arcilla.

Germinación: proceso mediante el cual una semilla se desarrolla hasta convertirse en una planta.

Herbario: Colección de plantas secas y clasificadas que se usa como material para el estudio de la botánica.

Hematófaga: Animal que se alimenta de sangre.

Humedad relativa: La cantidad de vapor de agua contenida en el aire

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

Imparipinadas: Aquellas con un número impar de foliolos

Inanición: Extrema debilidad física provocada por la falta de alimento.

Insecticida: Compuesto químico utilizado para matar insectos.

Inseminar: Llegada del semen del macho al óvulo de la hembra para fecundarlo.

In vivo: Experimentación hecha dentro o sobre el tejido vivo de un organismo vivo.

Larva: Animal en estado de desarrollo, cuando ha abandonado las cubiertas del huevo y es capaz de nutrirse por sí mismo. .

Malaria: Enfermedad infecciosa que se caracteriza por ataques intermitentes de fiebre muy alta y se transmite por la picadura del mosquito anofeles hembra.

Melíferas: Plantas que producen miel o polen.

Metabolitos secundarios: Compuestos químicos sintetizados por las plantas que no son esenciales porque no intervienen en el metabolismo primario de las mismas.

Mosquitos: Son los insectos únicamente de la especie culícidos aquellos en lo que las hembras se alimentan de sangre caliente.

Mutágenesis: Producción de mutaciones sobre ADN, clonado o no.

Organismos: Entidad biológica capaz de reproducirse o de transferir material genético.

Organismos modelos: En la ciencia biológica es una especie muy estudiada para atender fenómenos biológicos particulares.

Ovoposición: Acto de poner o depositar huevos por el miembro femenino de los animales ovíparos.

Pericarpio: Parte exterior del fruto de las plantas que envuelve las semillas.

Phyllum: En taxonomía, categoría de alto nivel entre el reino y la clase; grupo de clase similares y relacionadas.

Poliomielitis: Enfermedad infecciosa producida por un virus que ataca la médula espinal y provoca atrofia muscular y parálisis.

Probóscide: Órgano bucal de forma alargada, propio de algunos insectos, invertebrados marinos y otros animales, que les sirve para succionar alimentos.

Pupa: Fase de desarrollo de un insecto posterior al estado de larva y anterior al estado de adulto.

Receptores olfativos: Estructura de un ser vivo que detecta diferentes estímulos del medio a nivel olfativo y los transmite al sistema nervioso para que este genere una respuesta mediante un efecto.

Repelente: Sustancia o producto que sirve para alejar a los insectos u otros animales.

Saponinas: Son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos y un elemento soluble en agua, forman espuma cuando son agitadas en agua.

Taninos: Son compuestos polifenólicos, más o menos complejos, de origen vegetal.

Termolábil: Sustancia que se descompone o se desnaturaliza por el calor, perdiendo, generalmente, su actividad.

Terpenos: Son una amplia clase de compuestos orgánicos de origen natural derivados del isopreno, un hidrocarburo de cinco átomos de carbono.

Terpenoides: Clase de terpenos modificado químicamente por oxidación o reorganización en su esqueleto de hidrocarburo.

EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS *Azadirachta indica* A. Juss (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* VECTOR DE IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA. LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA MÉDICA MINSA, UNAN-MANAGUA, JULIO-DICIEMBRE, 2015

Tiempo generacional: Tiempo promedio que pasa desde que nace un individuo y nace su descendencia

Triterpenoides: Son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogénicamente del escualeno.

Tetranortriterpenoides: Son una clase de terpenoides (lípidos aromáticos comunes a algunas especies de plantas) que pueden afectar el desarrollo de la larva y de la crisálida en los insectos.

Vectores: Organismos, que transmite un agente infeccioso desde los individuos afectados a otros que aún no portan ese agente.

Fiebre del Nilo Occidental: Virus transmitido por mosquitos infectados.

