

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830  
“neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti* L. 1762  
en laboratorio**

**PRESENTADA POR:**

**Br. PAMELA MILAGROS MORANTE SILVA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**BIÓLOGO**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA**

**PIURA, PERÚ**

**2019**

**Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830  
“neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti* L. 1762  
en laboratorio**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA**



---

Br. PAMELA MILAGROS MORANTE SILVA  
EJECUTOR DE TESIS



---

Blgo. CLAUDIA DEL PILAR RUIZ GONZÁLEZ, M. Sc  
ASESOR



---

Blgo. NÉSTOR HUMBERTO ATARAMA MONTERO  
CO-ASESOR

## DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE INVESTIGACION

Yo Pamela Milagros Morante Silva identificado con DNI- N° 48382980, en la condición de egresado, de la Facultad de Ciencias Escuela de Profesional de ciencias Biológicas y domiciliado en Calle 9 Lote 6 San Jacinto-La Legua. Distrito de Catacaos Provincia de Piura Departamento de Piura. Celular: 948529007 Email: pamela\_07\_5@outlook.com

DECLARO BAJO JURAMENTO: que el trabajo de investigación que presento a la oficina central de investigación (OCIN), es original, no siendo copia parcial de un trabajo de investigación desarrollado, y/o realizado en el Perú o en el Extranjero, en caso de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances establecidos en el Art N° 411, del código penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.



Piura, julio del 2019

.....  
DNI N° 48382980

Artículo 411.- El que, en un procedimiento administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4 Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI Resolución del Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD.

# **JURADO EVALUADOR**

**Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830  
“neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti* L. 1762  
en laboratorio**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA**



---

**Mchlgo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, M.Sc.**

**PRESIDENTE DE JURADO**



---

**Mchlgo. JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE, M.Sc.**

**SECRETARIO DE JURADO**



---

**Blgo. HUMBERTO RIVERA CALLE, M.Sc.**

**VOCAL DE JURADO**

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



## UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA FACULTAD DE CIENCIAS



### ACTA DE SUSTENTACIÓN 034 - 2019-UI-FC-UNP

#### FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "Efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss 1830 "neem" sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti* L. 1762 en laboratorio", presentada por la señorita Bachiller **PAMELA MILAGROS MORANTE SILVA**, con el asesoramiento de la **Blgo. Claudia del Pilar Ruiz González, MS.c.** y co-asesor **Blgo. Néstor Humberto Atarama Montero, MS.c.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, la declaran:

APROBADA (X)

DESAPROBADA ( )

Con la mención de:


..... *Muy bueno* .....

En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que la sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 01 de julio de 2019.

UNP

  
Mcbigo. **CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, MS.c.**  
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

  
Mcbigo. **JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE, MS.c.**  
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

  
Blgo. **HUMBERTO RIVERA CALLE, MS.c.**  
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla  
PIURA - PERÚ

## **DEDICATORIA**

A mis queridos padres, Paulina y Wilfredo y a mi hermano Giancarlo, porque son mi ejemplo a seguir, por su amor infinito, sus consejos y apoyo incondicional para salir adelante.

A mi familia y amigos que siempre confían en mí, me apoyan y están conmigo siempre.

A mis angelitos en el cielo Q.E.P.D, en especial a mi abuelita y mi gran amiga china, porque me cuidan y sé que están conmigo en todo momento

## AGRADECIMIENTOS

Al culminar este trabajo de investigación, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mis agradecimientos; en primer lugar, a Dios por darme salud, cuidarme día a día, darme la fortaleza y la perseverancia para seguir adelante y por bendecirme brindándome la oportunidad de obtener un triunfo personal al lograr una meta profesional.

A mis queridos padres Paulina y Wilfredo y a mi hermano Giancarlo, que lo son todo para mí, por amarme, protegerme, educarme en valores y regalarme lo más valioso que puedo tener: mi profesión, gracias por guiarme y acompañarme a lo largo de mi carrera, y por siempre brindarme su apoyo incondicional.

A mi asesora Blgo. Claudia Ruiz González, a quien respeto, admiro y estimo mucho, no sólo por ser una gran profesional y docente, sino por ser una excelente persona y ahora una gran mamá, gracias por sus consejos, paciencia, amor a la ciencia y su dedicación a este trabajo.

A mi Coasesor Blgo. Néstor Atarama Montero, sin usted no hubiese sido posible este trabajo, gracias por sus consejos, por su confianza en mí para formar parte del proyecto Nature Solution, por siempre alentarme a seguir, por la paciencia, su apoyo y sus conocimientos para la realización del proyecto y la redacción del informe, lo admiro, lo respeto y aprecio mucho.

A los docentes de la Universidad Nacional de Piura, facultad de Ciencias, escuela profesional de Ciencias Biológicas, por ser formadores de grandes profesionales, e incentivar el amor por la ciencia, al Dr. Manuel Charcape Ravelo por la identificación taxonómica de la planta, a los docentes McBlgo. Cesar Torres Díaz, McBlgo. Jaime Fernández Ponce y en especial a los docentes Blgo Humberto Rivera Calle y Blgo. Miguel Cortez Oyola, por su orientación para el desarrollo de este trabajo, sus consejos y su cariño.

A los trabajadores del equipo de Vigilancia y Control de vectores del Ministerio de Salud, que laboran en el bajo Piura, por su amistad y apoyo, y al Ing. Adalberto Cano Vásquez por su comprensión y disposición para permitir la colecta de muestras de larvas adicionales para el desarrollo de la tesis.

A mis amigos, Henser y Romario, quienes estuvieron presentes en alguna fase de la realización de este proyecto, y en especial a Kepler, por su buen ánimo y disposición para brindarme ayuda de inicio a fin en esta investigación con sus conocimientos y aportes para mejorar; a mis mejores amigas, Anair, Verónica y Greysi por su amistad de años, el cariño y el ánimo siempre; y a todos los que de alguna manera siempre estuvieron ahí dándome ánimos, apoyándome e incentivándome a continuar, infinitas gracias y mi cariño incondicional.

# ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Pág.
DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD.....	iii
JURADO EVALUADOR .....	iv
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA.....	3
1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	3
1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
1.3 OBJETIVO.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
2.2 BASES TEÓRICAS.....	8
2.2.1 <i>Aedes aegypti</i> L. 1762.....	8
2.2.1.1 Aspectos generales.....	8
2.2.1.2 Ciclo de vida y reproducción.....	8
2.2.1.3 <i>Aedes aegypti</i> L. 1762 como vector de enfermedades.....	9
2.2.2 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss 1830 “neem” .....	10
2.2.2.2 Características físicas.....	11
2.2.2.3 Composición química.....	12
2.2.2.4 Usos y propiedades.....	13
2.3 GLOSARIO DE TÉRMINOS BÁSICOS.....	14
2.4. HIPÓTESIS.....	15
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	16



3.1 ENFOQUE Y DISEÑO.....	16
3.2. SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	16
3.3.1 Ubicación del Insectario.....	16
3.3.2 Descripción del insectario.....	17
3.3.3 Procedencia del material biológico y establecimiento de la colonia experimental.....	19
3.3.4 Ciclo biológico de <i>Aedes aegypti</i> .....	19
3.3.5 Obtención del extracto.....	21
3.3.6 Preparación de las disoluciones.....	23
3.3.7 Bioensayo.....	24
3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.....	24
3.4.1 Diseño Experimental.....	24
3.5. ASPECTOS ÉTICOS .....	25
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	26
4.1 RESULTADOS.....	26
4.1.1. Huevos.....	26
4.1.2 Larvas.....	29
4.2. DISCUSIÓN.....	33
II. CONCLUSIONES.....	40
III. RECOMENDACIONES.....	41
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
V. ANEXOS.....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 01 Taxonomía de <i>Aedes aegypti</i> (Marquetti, 2008)	9
Tabla 02 Taxonomía de <i>Azadirachta indica</i> (Romero y Vargas, 2005)	11
Tabla 03 Partes de <i>Azadirachta indica</i> donde se concentran los componentes limonoides (Romero y Vargas, 2005)	14
Tabla 04 Disoluciones en los tres tratamientos de extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. 1830 “neem”.	23
Tabla 05 Promedio de huevos eclosionados de <i>Aedes aegypti</i> por cada semana	26
Tabla 06 Promedio por tratamiento de Eclosión y No eclosión de huevos de <i>Aedes aegypti</i> .	27
Tabla 07 Análisis de Varianza para la Eclosión de Huevos de <i>Aedes aegypti</i> .	28
Tabla 08 Promedio por tratamiento de larvas muertas de <i>Aedes aegypti</i> .	29
Tabla 09 Promedio por tratamiento de mortalidad y viabilidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	30
Tabla 10 Análisis de Varianza para la mortalidad de larvas de <i>Aedes aegypti</i> entre tratamientos.	31
Tabla 11 Prueba estadística Tukey comparando la mortalidad de larvas de <i>A. aegypti</i> entre tratamientos.	32
Tabla 12 Diseño experimental para evaluar el efecto del extracto etanólico de <i>A. indica</i> “neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de <i>A. aegypti</i> .	47
Tabla 13 Prueba estadística Tukey comparando tiempo de eclosión de <i>A. aegypti</i> .	48
Tabla 14 Prueba estadística Tukey comparando el tiempo de mortalidad de larvas de <i>A. aegypti</i>	49
Tabla 15 Fecha de ejecución de los tratamientos testeados	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 01 Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	9
Figura 02 Árbol de <i>Azadirachta indica</i> “neem”	10
Figura 03 Ubicación del Insectario	13
Figura 04 Instalaciones del insectario correctamente señalizadas	18
Figura 05 a) División del insectario en dos cubículos. b) Parte interna del cubículo 1 con el estante para la crianza de los adultos. c) Parte interna del cubículo 2 para la crianza de huevos y larvas.	18
Figura 06 Bandeja de huevos puestos a eclosionar	20
Figura 07 Preparación del alimento y aplicación a la bandeja de larvas	21
Figura 08 Machos de <i>A. aegypti</i> alimentándose de algodones embebidos en azúcar y Hembra succionando sangre de brazo humano.	21
Figura 09 a) Pesado de hojas amarillas de <i>Azadirachta indica</i> . b) Molido de las hojas en el Magic Bullet. c) Maceración del extracto obtenido. d) Primer filtrado del extracto. e) Segundo filtrado del extracto con sistema al vacío. f) Vertido del extracto filtrado en placa Petri para la evaporación del etanol a temperatura ambiente	22
Figura 10 a) Retiro del extracto solidificado con una espátula. b) Pesado del extracto en una balanza analítica. c) Aplicación en 200 ml del agua declorada del ensayo biológico.	23
Figura11 Promedio acumulado por tratamiento de la eclosión de huevos de <i>A. aegypti</i>	27
Figura12 Porcentaje de Eclosión y No eclosión de huevos de <i>A. aegypti</i>	28
Figura 13 Promedio acumulado por tratamiento de la mortalidad de larvas de <i>A. aegypti</i> .	30
Figura 14 Porcentaje de Mortalidad vs. Viabilidad de larvas de <i>A. aegypti</i> .	31
Figura 15 Recolección de hojas de árboles de neem	46
Figura 16 Confección de cajas de crianza y ovitrampas	46
Figura 17 a) Materiales e ingredientes para preparar el alimento de machos adultos de <i>A. aegypti</i> . b) Levadura para alimentar a las larvas.	46
Figura 18 Control positivo: Pyriproxyfen (Pyrilarv 0.5%) con su cucharita medidora de 0.1 g para aplicar a depósitos menores de 50 L	47
Figura 19 a) Aspirador entomológico. b) Lupa entomológica	47

Figura 20	a) Aire acondicionado marca Soler. b) RH/Temp Datalogger modelo DTR-305. c) Certificado de calibración del RH/Temp Datalogger modelo DTR-305.	47
Figura 21	Hembra de <i>A. aegypti</i> después de alimentarse de sangre humana	48
Figura 22	Hembra de <i>A. aegypti</i> seleccionando el lugar para ovopositar	48
Figura 23	Huevos de <i>A. aegypti</i> en la ovitrampa colocados en las paredes del recipiente al borde de la superficie del agua.	48
Figura 24	Bioensayo con Huevos de <i>Aedes aegypti</i>	49
Figura 25	Bioensayo con larvas del IV estadio de <i>Aedes aegypti</i>	49
Figura 26	a) Huevo eclosionado de <i>Aedes aegypti</i> . b) Huevo eclosionado de <i>Aedes aegypti</i> comedido a Piriproxyfen. c) Huevo eclosionado de <i>Aedes aegypti</i> sometido a la C <sub>3</sub> del extracto etanólico de neem	49
Figura 27	Huevo aplastado para demostrar la presencia del embrión	50
Figura 28	Pupas y adultos muertos que no emergieron procedentes de huevos que fueron expuestos al extracto de neem	50
Figura 29	a) Pupa muerta emergida de huevo expuesto a tratamiento de C <sub>3</sub> b) Pupa que no pudo emerger a adulto, procedente de huevo expuesta a tratamiento de C <sub>3</sub>	50
Figura 30	Larvas muertas expuestas a tratamiento	51
Figura 31	a) Larva de <i>A. aegypti</i> sin ningún tratamiento, b) Larva de <i>A. aegypti</i> sometida al control positivo. c) Larva de <i>A. aegypti</i> sometida a tratamiento de C <sub>3</sub>	51
Figura 32	a) <i>A. aegypti</i> hembra adulto b) <i>A. aegypti</i> macho adulto	51

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Páginas
Anexo 1 Galería de fotos	46
Anexo 2 Tabla 12. Diseño experimental para evaluar el efecto del extracto etanólico de <i>A. indica</i> “neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de <i>A. aegypti</i> .	47
Anexo 3 Tabla 13. Prueba estadística Tukey comparando tiempo de eclosión de Huevos de <i>A. aegypti</i> .	48
Tabla 14. Prueba estadística Tukey comparando tiempo de mortalidad de larvas de <i>A. aegypti</i> .	49
Anexo 4 Tabla 15. Fecha de ejecución de los tratamientos testeados	52
Anexo 5 Documentos utilizados	53

## RESUMEN

*Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae), es el vector causante de varias enfermedades transmitidas al ser humano entre ellas el dengue, zika y chikungunya. Es necesario un control biológico para combatirlo ya que a nivel mundial se usan larvicidas organofosforados frente a los cuales ha presentado un alto grado de resistencia; es por ello que, se planteó como objetivo determinar el efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 “neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti* L. 1762 en laboratorio. Esta investigación constó de dos fases. La primera fue la obtención del extracto etanólico de hojas amarillas de *Azadirachta indica*. Y en la segunda, se realizó un bioensayo con huevos y larvas vivas del IV estadio de *Aedes aegypti*, sometidas a tres tratamientos con concentraciones de 0.0017 g/ml, 0.0034 g/ml y 0.0051 g/ml respectivamente, utilizándose 20 huevos y 20 larvas obtenidas directamente de la crianza del insectario; el ensayo se realizó por triplicado con cada una de las concentraciones frente a un control positivo usando Pyriproxyfen (Pyrilarv 0.5%) y un testigo. Se cuantificó el número de huevos viables, es decir eclosionados cada semana durante 4 semanas, y el número de larvas no viables, es decir que no lleguen al estado pupal por causa de muerte, cada 12 horas durante 120 horas. Se mostraron porcentajes de eclosión de huevos del 86.65% para 0.0017 g/ml, 83.35% para 0.0034 g/ml y 73.35% para la 0.0051 g/ml, además 0.0051 g/ml tuvo el promedio más bajo de eclosión (1.0) en la semana 1, y fueron 0.0034 g/ml y 0.0051 g/ml con las que se evidenció eclosión prolongada hasta la semana 4. Se mostraron porcentajes de mortalidad larval de 11.65% para 0.0017 g/ml, 36.65% para 0.0034 g/ml y 73.35% para 0.0051 g/ml, así mismo, fue 0.0051 g/ml la que presentó mortalidad a las 24 h, seguido de 0.0034 g/ml a las 36 h y finalmente 0.0017 g/ml a las 48 h. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio, muestran que el extracto etanólico de *A. indica* A. Juss disminuye la viabilidad de las larvas al presentar acción larvicida, más no la viabilidad de los huevos.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, *Azadirachta indica*, control biológico, extracto etanólico, viabilidad.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae), is the causative vector of several diseases transmitted to humans, including dengue, Zika and Chikungunya. Globally, organophosphorus larvicides are used to combat it, which has presented a high degree of resistance, therefore, the options of a biological control are necessary, for which the objective was to determine the effect of the ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 "neem" on the viability of the egg and larva of *Aedes aegypti* L. 1762 on the laboratory. This investigation consisted of two phases. The first was the obtaining of the ethanolic extract of yellow leaves of *Azadirachta indica*. And in the second, a bioassay was realized with eggs and living larvae of the IV stage of *Aedes aegypti*, subjected to three treatments with concentrations of 0.0017 g/ml, 0.0034 g/ml and 0.0051 g/ml respectively, using 20 eggs and 20 larvae obtained directly from the breeding of the insectary; the assay was performed in triplicate with each of the concentrations against a positive control using Pyriproxyfen (Pyrilarv 0.5%) and a witness. The number of viable eggs, that is the ones that hatched during 4 weeks, and the number of non-viable larvae, that is, the ones that do not reach the pupal status due to death, quantified every 12 hours until 120 hours. It was found for the eggs, a hatching percentage of 86.65% for 0.0017 g/ml, 83.35% for 0.0034 g/ml and 73.35% for 0.0051 g/ml, in addition 0.0051 g/ml had the lowest hatching average (1.0) on week 1, and was the 0.0034 g/ml and 0.0051 g/ml who continued to hatch until week 4. For the larvae, a mortality percentage of 11.65% was found for 0.0017 g/ml, 36.65% for 0.0034 g/ml and 73.35% for 0.0051 g/ml, likewise, it was 0.0051 g/ml that I present mortality at 24 h, followed by 0.0034 g/ml which was at 36 h and finally 0.0017 g/ml at 48 h. Therefore, the results obtained in this study show that the ethanolic extract of *A. indica* A. Juss decreases the viability of the larvae by presenting a larvicidal action, but not the viability of the eggs.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, *Azadirachta indica*, biological control, ethanolic extract, viability.

## INTRODUCCIÓN

*Aedes aegypti* L. 1762 es un mosquito de la familia Culicidae, su ciclo de vida es una metamorfosis completa, debido a que las formas inmaduras salidas del huevo son completamente diferentes al adulto; los tres primeros estadios (huevos, larvas y pupas) son de vida acuática y la fase final es el adulto de vida aérea. El adulto es de hábitos principalmente urbanos domésticos, preferentemente diurnos, y antropofílicos, y las hembras son hematófagas, condición que le confiere ser vector de enfermedades como el dengue, zika y chikungunya (Ramos, 2011).

En el Perú, el dengue, es una de las patologías infecciosas con mayor impacto, alcanzando altos niveles de morbilidad y mortalidad. Esto debido a la constante y rápida proliferación del vector, el cual se encuentra presente ya en 20 departamentos del país. Dentro de los cuales, Piura, ha reportado los mayores índices de infestación y muerte, así se manifestó un incremento sólo en casos de dengue del 55,6 % del 2016 al año 2017 (Dirección Regional de Salud [DIRESA], 2017).

Actualmente, el Ministerio de salud ha tomado medidas para el control de la proliferación de este insecto, basadas en la eliminación de los criaderos potenciales de reproducción de los mosquitos, mediante el saneamiento y la limpieza de los lugares en donde se encuentren aguas estancadas y cualquier depósito en donde estos puedan crecer; así mismo, intensifican las campañas de vigilancia y control vectorial, en las que se utilizan agentes insecticidas para eliminar y evitar su propagación, sin embargo *A. aegypti* ha adquirido resistencia. Además, el uso de estos insecticidas suele tener aspectos negativos para la salud como alergias a la piel, presencia de residuos en alimentos, problemas de contaminación ambiental debido a que proceden de síntesis químicas, olores desagradables e incluso algunos de ellos son inaccesibles a la población de bajos recursos debido a sus precios elevados (Rodríguez et al., 2014).

El incremento de serios problemas en la resistencia de plagas a pesticidas y contaminación de la biósfera asociado con el uso desmedido de pesticidas sintéticos de amplio espectro, ha impuesto la necesidad de buscar, por su eficacia, pesticidas biodegradables con mayor selectividad. Así mismo, no tóxicos al humano, con menor propensión a la resistencia del insecto y relativamente más baratos, lo que ha permitido reexaminar viejas prácticas de protección de productos almacenados usando derivados de algunas plantas, a las que se encontró resistencia al ataque de insectos, debido a que poseen un complejo aparato de defensa química.



El árbol del neem (*Azadirachta indica* A. Juss) ha sido usado desde hace siglos para la lucha contra las plagas, y en las dos últimas décadas su interés se ha generalizado por todo el mundo, habiéndose obtenido hasta la fecha, numerosos preparados elaborados a partir de uno o más principios activos que se encuentran en él. Además, desde el punto de vista ambiental se trata de una materia activa muy prometedora, por su rápida degradación que minimiza el problema de residuos, su baja toxicidad en mamíferos y por su benignidad en gran parte de los enemigos naturales (Méndez, 2015).

Ante esta problemática y considerando la búsqueda de soluciones alternativas que no afecten el ambiente y a su vez que controlen la desmedida proliferación de mosquito *Aedes aegypti* teniendo en cuenta su responsabilidad en la transmisión de enfermedades que aquejan a gran parte de la población mundial, se realizó este trabajo de investigación cuyo objetivo fue determinar el efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 “neem” sobre la viabilidad del huevo y larvas de *Aedes aegypti* L. 1762 en laboratorio.

# **CAPÍTULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA**

## **1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA**

El incremento de temperatura por el efecto del calentamiento global, en especial de países de climas tropicales, conlleva a la proliferación de enfermedades transmitidas por insectos y otras plagas propias de la época. Uno de estos transmisores es el mosquito *Aedes aegypti*, portador del virus del dengue y de la fiebre amarilla, así como de otras enfermedades, como el zika y chikungunya. La incidencia y las epidemias de dengue, han aumentado en los últimos 20 años, durante los cuales se han registrado ciclos epidémicos cada 3 a 5 años e incluso menores a este tiempo, aumentando el número de muertes. Por tal motivo, hoy en día la enfermedad presenta un comportamiento endemo-epidémico en la mayor parte de los países donde se registra y cuya presencia es favorecida por deficiencias sanitarias, sociales y económicas (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2014).

El Instituto Nacional de Salud estima que 2500 millones de personas en el mundo viven en áreas de riesgo de transmisión por la presencia del vector y que unos 50 millones se infectan cada año. El dengue es una de las enfermedades reemergentes más importantes, encontrándose que afectaba a 18 departamentos, 59 provincias y 256 distritos (Boletín epidemiológico de Lima, 2013) que al 2017 se reportan 20 departamentos, 93 provincias y 500 distritos positivos (Ministerio de salud [MINSA], 2017).

Según el MINSA (2017) a través de su Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y control de enfermedades, y la Dirección de salud Piura-DIRESA (2017), durante el período 2015 al 2017, la región Piura presentó un incremento en el número de casos de dengue, así de 20 043 casos del 2015 se elevó a 46 950 casos en el 2017, además los distritos del alto y bajo Piura como Chulucanas, la Matanza, Buenos Aires, Morropón, Sechura, la Unión y Catacaos presentaron índices aédicos variables y elevados cada año, mostrando además que la provincia de Piura presentó índices positivos desde el 2008 y Castilla desde el 2009 hasta la actualidad.

En el Perú, para disminuir pérdidas económicas y humanas, el MINSA realiza campañas de vigilancia y control vectorial, utilizando medidas de control químico basadas en la aplicación masiva de insecticidas sintéticos. Para estadios inmaduros se usa el Temefós 1% conocido como abate, y Pyriproxyfen 0.5% conocida como una hormona sintética juvenoide regulador de crecimiento con acción larvicida, y para adultos se usa el Malatión- ULV. Sin embargo, este vector ha adquirido resistencia; además, estos insecticidas suelen tener aspectos negativos para la salud como alergias a la piel y la presencia de residuos en alimentos, además de problemas de contaminación ambiental debido a que proceden de síntesis química; olores desagradables e

incluso algunos de ellos son inaccesibles a la población de bajos recursos debido a sus precios elevados (Rodríguez et al., 2014).

Según un estudio realizado en Cuba indica que se observó resistencia en larvas de culícidos, a un larvicida organofosforado conocido como Temefós, que puede haber sido generada debido a su uso sostenido para el control de esta especie. Un reciente estudio realizado en Colombia contribuye a esta versión, pues muestra que el vector del dengue *A. aegypti* se encontró resistente a insecticidas organofosforados. Las cifras de las poblaciones de adultos de *Aedes aegypti* resistentes al malatión coinciden con los estudios realizados en Cuba; incluso para el larvicida Temefós, se observó resistencia en el 70% de las poblaciones evaluadas. Sin embargo, a pesar de los hallazgos de pérdida de susceptibilidad de dichos compuestos organofosforado continúa siendo de elección para el control de dicho vector (Santacoloma et al., 2012).

La región Piura presenta diversidad de plantas consideradas poseedoras de propiedades medicinales para controlar insectos, una de ellas es *la Azadirachta indica* “neem”, planta silvestre no endémica pero muy bien adaptada, y con mucha presencia en la ciudad ya que no posee muchos requerimientos especiales para su crecimiento. Es un árbol de desarrollo rápido, robusto, hoja perenne y frondoso (García, 2013).

El extracto de neem no es tóxico para seres humanos, animales y la entomofauna acompañante. Sin embargo, en *Aedes aegypti*, actúa como antialimentario, inhibidor de crecimiento, prolonga las etapas inmaduras ocasionando la muerte, disminuye la fecundidad y la ovoposición, disminuye los niveles de proteínas y aminoácidos en la hemolinfa e interfiere en la síntesis de quitina. Estas características evidencian que las sustancias obtenidas intervienen en los procesos químicos y fisiológicos de los insectos, haciendo que no puedan reproducirse y sus poblaciones se reduzcan (Méndez, 2015).

El control biológico a base del extracto de “neem” cuya función sea evitar el desarrollo de los estadios de huevo y larva de los mosquitos que crecen en aguas estancadas, sería de una gran ayuda para la disminución del número enfermedades transmitidas por este insecto.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La rápida proliferación del vector *Aedes aegypti* en 20 departamentos del Perú, y por ende el incremento de casos de dengue del 55,6 % entre 2016 y 2017 ha generado total reportado por la DIRESA de 41 muertes de los 46 950 casos notificados sólo en la región Piura en el 2017; sumándose 13 casos reportados de Zika, 4 de ellos en gestantes; además de reportes de 8 casos autóctonos de Chikungunya en localidades del sur del Perú. Esto desencadena que se intensifiquen las campañas de vigilancia y control del vector transmisor, con el objetivo de disminuir la incidencia de estas enfermedades. Sin embargo, estas campañas se orientan sólo al control de estadios de larva, pupa y adulto del insecto, dejándose de lado el control desde la fase de huevo.

Actualmente se usan productos organosforados y los llamados reguladores de crecimiento con acción larvicida como el Temefós 1 % y Piriproxyfen 0.5% respectivamente, que representan costos elevados de hasta S/. 484 540.00 anuales; y cuyo uso prolongado y excesivo genera resistencia, además de contaminación ambiental, así como efectos tóxicos en la fauna y en humanos por consumo de residuos en el agua y alimentos.

Frente a estas razones, se propone una alternativa de solución a base del extracto de *Azadirachta indica* “neem”, como controlador biológico sobre los huevos y larvas de *Aedes aegypti*, como una estrategia innovadora, ecológica y que debido a su bajo costo de producción, disminuiría gastos por la adquisición de químicos; con la finalidad de proporcionar un nuevo marco de estrategias para el control de dicho vector, siendo así plataforma para el incremento de modelos biotecnológicos experimentales aplicados en el contexto epidemiológico de enfermedades.

## 1.3 OBJETIVO

### 1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 “neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti* L. 1762 en laboratorio.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar la crianza de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.
- Obtener el extracto etanólico de *Azadirachta indica* “neem”.
- Encontrar la concentración mínima de *Azadirachta indica* “neem” que reduzca la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Dado que la toxicidad es algo inherente al efecto plaguicida, insecticida o larvicida en sí, lo que se busca son compuestos que sean eficaces para la plaga que se pretende controlar, pero inocuos para el hombre y que afecten lo menos posible al ambiente (Céspedes, 2013). El control biológico es un método que emplea organismos vivos para reducir la densidad de una población de organismos plaga, y su aplicación se limita a determinadas circunstancias como aguas de recreación, azoteas inundadas, fuentes, entre otros; entre los usados se encuentran los microcrustáceos copépodos larvíparos, la siembra de *Bacillus thuringiensis*, la producción de peces larvífagos como “madrecitas de agua” de la especie *Poecilia reticulata*, y la transformación de materia prima de origen vegetal mediante extractos de plantas de forma acuosa, o con extracción de alcohol y acetona (García-Gutiérrez y Hernández-Velásquez 2012).

En Ecuador para el control de mosquitos se usa como larvicida el BACTIVEC, su ingrediente activo son las esporas y cristales endotóxicos del *Bacillus thuringiensis* variedad israelensis serotipo H-14 al 0.6%. Es un insecticida selectivo para el control de larvas de mosquitos de los géneros *Aedes sp.*, *Culex sp.*, *Anopheles sp.*, *Psorophora sp.*, *Mansonia sp.*, *Uranotaenia sp.* Su modo de acción es por las bacterias que los conforman, y actúa por ingestión provocando la paralización de la pared intestinal de las larvas entre las 24 y 48 horas después de consumido (Corbillón et al., 2012).

En un estudio realizado en el *Syzygium aromaticum* “Clavo de olor” se demostró la capacidad larvicida sobre larvas de cuarto estadio de *Aedes albopictus* mostrando CL50 y CL95 del aceite de hoja de 5,3 y 7,03 mg/ml. respectivamente, mientras que los valores de CL50 y CL 95 del aceite de brote fueron de 17,84 y 23,99 mg/ml, respectivamente. En otro estudio similar utilizando el extracto de éter del brote de flores de clavo de olor, también sobre *Aedes albopictus*, se encontró que la CL50 a las 24 y 48 horas fue de 403,4 ppm y 342,2 ppm respectivamente. En cuanto a los tiempos letales se encontró una letalidad superior al 50% a partir de las 17 horas (Bilal, 2012).

El “neem” fue probado por primera vez en la Universidad de Keele, por Morgan. Así mismo, en el Centro de Investigación de café en UpperKiambu, se observó que el “neem” controló el crecimiento de *Antestiopsis orbitalis* “chinche del café”. La mayoría de las ninfas tratadas con el extracto, murieron durante sucesivos estados de crecimiento y las pocas que sobrevivieron hasta forma adulta, tenían alas y tórax malformados y problemas de esterilidad (Valarezo, 2012).

A nivel centroamericano, la Cooperativa de producción de insecticida de neem (COPINIM) fundada en 1987 en Nicaragua se ha dedicado a la tarea de investigar los efectos del neem como insecticida. En base a las experiencias realizadas, los insecticidas a base de neem actúan como lo hace un insecticida “químico fabricado” a diferencia que poseen las ventajas de ser selectivos con los insectos dañinos, son inofensivos para el ser humano, los animales, las plantas y sus frutos, el aire y el agua, además de ser más favorables económicamente (Hidalgo, 2011).

Un estudio realizado por Cruz et al. (2013) indican que el extracto etanólico y acuoso de *A. indica* causa mortalidad del 95 a 100% en los huevos de *Bemisia tabaci*, y se observó que no hay diferencia significativa en la mortalidad entre los tipos de extracto, además en su análisis de CG-EM se identificó al fitol sugiriendo que es también un metabolito responsable de la actividad insecticida.

Nour y Sandanasamy (2012) reportan el efecto insecticida de las partes aéreas del neem, en especial en el extracto de las hojas, el cual demostró ser el más eficaz y con elevada actividad larvicida; comenzando el orden de acción entre las partes de la planta con la hoja, luego el fruto, la semilla, y finalmente la corteza.

Villamil et al. (2012) indican que el extracto de neem a concentraciones de 50ppm, 150ppm y 250ppm origina un porcentaje de mortalidad en *Aedes aegypti* de 85%, 90% y 97% respectivamente y concluye que el árbol del neem resulta ser un potencial inhibidor del crecimiento y poseer un importante efecto insecticida, antialimentarios, de repelencia, perturbador de la fecundidad, la ovoposición y el efecto inhibitorio de la metamorfosis de las larvas y nematodos.

En evaluaciones biológicas realizadas sobre los modelos *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* y *Liryomiza sp*, el bioplaguicida obtenido desde semillas de *Azadirachta indica* presentó efectividad a menores concentraciones; lo que hace que sea interesante económicamente, porque es un producto altamente efectivo a un bajo costo, que no requiere de procesos de extracción complicados (Maragathavalli et al., 2012).

En un estudio hecho en Ecuador para evaluar los extractos etanólicos de las hojas de la *Azadirachta indica* como larvicida contra el *Aedes aegypti*, usando tres concentraciones (0.001 g/ml, 0.002 g/ml, 0.005 g/ml) del extracto etanólico, se evidencio que había una mayor mortalidad de las larvas (93%) a las 72 horas de incubación a 0.005 g/ml de concentración, y en los extractos a 0.001 g/ml y 0.002 mg/ml un 47 % y 70%; además en el análisis del extracto etanólico por CG-EM se evidencio que el fitol fue el principal componente del extracto etanólico (14.4% área), el cual sería uno de los metabolitos responsables de la actividad larvicida (Villamar y Malusin, 2015).

## 2.2 BASES TEÓRICAS

### 2.2.1 *Aedes aegypti* L. 1762

#### 2.2.1.1 Aspectos generales

Dentro de los géneros y especies de interés sanitario se encuentra *Aedes aegypti* L. 1762, un culicido de origen africano y que ha iniciado desde hace siglos una dispersión cosmopolita; siendo un artrópodo perteneciente a la taxonomía que se describe en la Tabla 01 (Marquetti, 2008). El adulto es de tamaño relativamente pequeño, de unos 4 a 5 mm aproximadamente, de coloración oscura con franjas claras. Se caracteriza por las franjas plateadas en el cuerpo y en las patas. Además, las antenas son otro elemento que permiten reconocer sexos, las hembras tienen antenas con pelos simples mientras que en el caso de los machos estas son plumosas (Eiman et al., 2008).

Es una especie tropical y subtropical cuya dispersión se limita a latitudes comprendidas entre 35° norte y 35 ° sur. Además, es un ejemplo de adaptación al ámbito humano, con criaderos, hábitat, fuente de alimentación, desplazamientos activos principalmente de hábitos diurnos y pasivos ligados al ámbito domiciliario; por ello, estos son considerados antropofílicos (OMS, 2015).

**Tabla 01.** Taxonomía de *Aedes aegypti*

<b>Reino</b>	Animalia
<b>Clase</b>	Insecta
<b>Orden</b>	Díptera
<b>Familia</b>	Culicidae
<b>Género</b>	<i>Aedes</i>
<b>Especie</b>	<i>Aedes aegypti</i> L. 1762

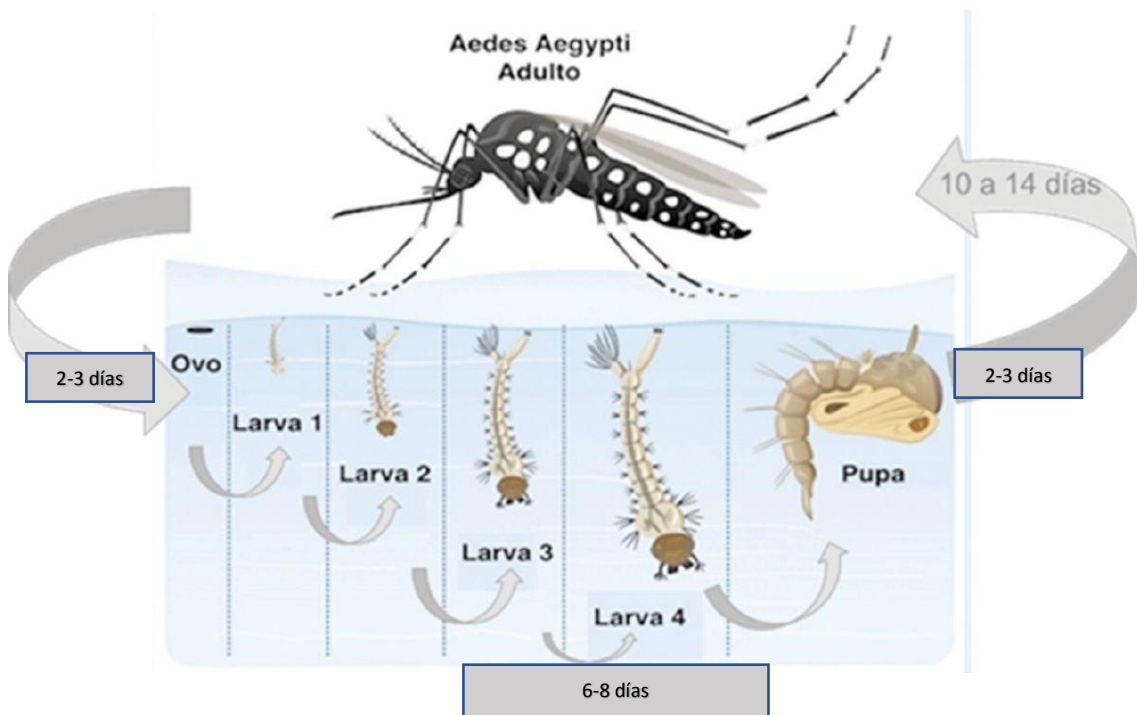
Fuente: (Marquetti, 2008)

#### 2.2.1.2 Ciclo de vida y reproducción

Su ciclo de vida es una metamorfosis completa (Fig. 01), ya que las formas inmaduras de los tres primeros estadios (huevos, larvas y pupas) son de vida acuática y la fase final es el adulto de vida aérea. Aproximadamente 1 a 3 días después de la ingesta de sangre se da la ovipositora, donde los huevos se adhieren individualmente a las paredes internas de los recipientes, justo por encima del nivel del agua, completando su desarrollo embrionario entre 48 y 72 horas, seguido de la eclosión larvaria, de esa forma se consideran etapas viables (Soares-Pinheiro et al., 2017); sin embargo, si este proceso normal de desarrollo ocurre bajo condiciones severas (por ejemplo,

falta de agua, bajas temperaturas e incluso alta insolación), el embrión puede soportar la desecación por hasta un año (OPS, 2010).

Posteriormente, las larvas pasan por cuatro estadios de desarrollo que dura entre 6 a 9 días, el tiempo de cada fase depende en gran medida de la disponibilidad de alimento, de la temperatura y la densidad larvaria del criadero. En la fase de pupa pasan aproximadamente dos a tres días, en los que no se alimentan; así completa su desarrollo con la emergencia del adulto, característico por la morfología de anillos blancos en sus patas. En condiciones óptimas (temperaturas de 25°C a 29°C) el período desde la ovipostura hasta la emergencia del adulto es de 10 a 14 días. Las extremas temperaturas pueden dilatar o acelerar este período (OPS, 2010).



**Fig. 01** Ciclo de vida de *Aedes aegypti*

Fuente: (Soares-Pinheiro et al., 2017)

### 2.2.1.3 *Aedes aegypti* L. 1762 como vector de enfermedades

Es considerado como un eficaz vector de arbovirosis como la fiebre amarilla, el dengue, zika y chikungunya, motivando con esto una de las grandes problemáticas de salud pública mundial, ya que posee una alta morbilidad capaz de bloquear las actividades de ciudades y países en picos epidémicos (OMS, 2015).

El dengue es una infección vírica producida por la picadura de los mosquitos, produce un síndrome pseudogripal grave y en ocasiones puede derivar el dengue mortal o hemorrágico. Se



conocen 4 serotipos del virus, que son el DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4; cuando una persona se recupera de la infección queda inmunizada de por vida para el serotipo en específico. Entre sus síntomas aparecen dolor de cabeza, fiebres altas, dolores musculares, dolores articulares, náuseas, vómitos y salpullido. Cuando el dengue clásico pasa a ser hemorrágico su principal síntoma es el sangrado, llegando a causar la muerte de la persona (OMS, 2015).

El zika es la infección por el virus del zika es causada por la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes* y suele generar fiebre leve, sarpullidos, conjuntivitis y dolores musculares. El virus fue aislado por primera vez en 1947 en el bosque de Zika, Uganda (África). Desde entonces, se ha encontrado principalmente en África y ha generado brotes pequeños y esporádicos también en Asia y América. Las complicaciones (neurológicas, autoinmunes) son poco frecuentes, pero se han descrito asociadas al síndrome de Guillain Barré y la Microcefalia en bebés de madres gestantes atacadas por el virus (OMS, 2015).

El chikungunya es un virus que provoca fiebre alta, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza y muscular. Aunque rara vez provoca la muerte, el dolor en las articulaciones puede durar meses o años y en ocasiones convertirse en un dolor crónico y causa de discapacidad para algunas personas (OMS, 2015).

## 2.2.2 *Azadirachta indica* A. Juss 1830 “neem”

### 2.2.2.1 Aspectos generales

Árbol perteneciente a la familia Meliaceae (Tabla 02); es originario de la India y de Birmania, que sólo vive en regiones tropicales y subtropicales. *Azadirachta indica* A. Juss 1830, conocido comúnmente como margosa o como neem en inglés, hindi y castellano.

**Tabla 02.** Taxonomía de *Azadirachta indica*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Sapindales
<b>Familia</b>	Meliaceae
<b>Género</b>	<i>Azadirachta</i>
<b>Especie</b>	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss 1830

Fuente: (Romero y Vargas, 2005)

En el Perú, la organización Plan Verde planta árboles de neem, originarios de la India, estos necesitan poca agua, crecen rápidamente y son de raíces profundas, de modo que son capaces de proteger los campos contra la erosión de los suelos. Se han sometido a los árboles a una serie de pruebas y ellos han superado todas como sumergirlas en agua durante varios meses; exponerlos a temperaturas de hasta 50 grados centígrados y hasta plantarlos en el suelo salado de la costa. La ONG “Plan Verde” ya ha plantado aproximadamente 200 000 árboles en la ciudad de Piura. Al mismo tiempo, estos pueden crecer hasta cuatro metros en tan solo un año y hasta 25 metros a los 8 años siendo un árbol maderable, con una densidad de 0.6 – 0.7 g/cm<sup>3</sup> y una producción de leña de 5 – 8 m<sup>3</sup>/Ha/año. La planta tiene además otras propiedades, por ejemplo, el aceite de neem es un excelente repelente de insectos y más aún, sus sustancias activas pueden incluso prevenir el crecimiento de las larvas de mosquito que transmiten diversas enfermedades a los humanos como el Dengue o la Malaria (Cárdenas, 2017).

#### **2.2.2.2 Características físicas**

La *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 es un árbol de tamaño mediano cuya altura puede llegar a alcanzar los 40 m. Abundante follaje todas las temporadas del año, pero en condiciones severas se deshoja. El ramaje es amplio, y puede alcanzar de 15 a 20 m de diámetro (Fig. 02).

El tronco es corto, recto y puede alcanzar 120 cm de diámetro. La corteza es dura, agrietada desde color gris claro hasta castaño rojizo. La savia es blanca grisácea y el corazón del tronco es rojo. Las raíces consisten de una robusta raíz principal y muy desarrolladas raíces laterales.

El tallo de hojas mide de 20 a 40 cm de longitud, con 20 a 31 hojas verde oscuras de 3 a 8 cm de longitud. La porción final de la hoja terminal es a menudo imparipinnada. La forma de las hojas maduras es menos asimétrica y sus márgenes son aserrados.

Las flores aparecen en panículas estrechas y ramificadas de 5 a 15 cm de largo. Las flores individuales están compuestas de 5 lóbulos del cáliz, redondeados y de un color verde pálido; 5 pétalos blancos, oblongos y redondeados de 0.5 cm de largo, 10 estambres unidos en un tubo y un pistilo con un ovario redondeado y un estilo delgado.

Los frutos son una drupa parecida a la aceituna de 1.0 a 2.0 cm de largo, son lisas y de un color de amarillo verdoso a amarillo cuando maduras. El endocarpio es blanco, duro y almacena una semilla, con una corteza de color castaño, la cual tiene un olor que asemeja al ajo (Parrota, 1994)



**Fig. 02.** Árbol de *Azadirachta indica* A. Juss 1830 “neem”

### **2.2.2.3 Composición química**

El árbol del neem se ha dado a conocer por su extensa y variada composición química, para los que se reportan más de 300 compuestos químicos, algunos juegan un papel importante en el control de plagas (Romero y Vargas, 2005). En la composición química del neem se reportan principalmente metabolitos activos terpenoides. Estas sustancias causan generalmente una inhibición del crecimiento y alteran la metamorfosis provocando un desorden hormonal en diferentes etapas en el desarrollo del proceso de crecimiento del insecto (López y Estrada, 2011).

Son de principal interés los terpenoides, compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno. La presencia del oxígeno hace esos compuestos más solubles en agua, metanol o etanol que en hexano, gasolina u otros solventes similares. Los limonoides son uno de los compuestos que se encuentran en mayor cantidad en el “neem” (Tabla 03), estos son sustancias químicas que se encuentran en ciertas plantas, son una subclase de terpenos más conocidos como triterpenoides (Romero y Vargas, 2005).

Para muchos autores la mayoría de los efectos antihormonales y antialimentarios del neem son del 72 al 90 % debidos al contenido en Azadiractina, estructuralmente parecida a las ecdisonas (hormonas que controlan el proceso de metamorfosis del insecto desde el estado de larva hasta que llega a ser adulto). Esta materia activa no mata insectos, al menos no inmediatamente, sino que inhibe su crecimiento y reproducción (Ramos, 2011)

**Tabla 03.** Partes de *Azadirachta indica* donde se concentran los componentes limonoides.

<b>Componentes limonoides</b>	<b>Tejidos donde se concentran</b>
Azadirona	Aceite de las semillas
Amorastaitina	Hojas frescas
Vepinina	Aceite de las semillas
Vilasinina	Hojas de neem
Geduninina	Aceite de las semillas y de la corteza
Nimbina	Las hojas y las semillas
Nimbolina	En las semillas
Salanina	En las hojas y las semillas

Fuente: (Romero y Vargas, 2005)

#### **2.2.2.4 Usos y propiedades**

A inicios del siglo XX el neem fue introducido en América y ciertas islas del Caribe en donde se usa generalmente para dar sombra, se ha plantado extensamente para la reforestación de las tierras degradadas; la madera se usa para la construcción en general; y como combustible tiene un valor calórico relativamente alto de 6.94 kcal por gramo. Mediante reportes de investigaciones científicas se han comprobado un sin número de propiedades tanto medicinales como insecticidas tras la utilización de sus hojas, flores, semillas e incluso de su corteza (Berenguer et al., 2010)

El neem es utilizado para ayudar al cuerpo a combatir enfermedades crónicas y temporales, como furúnculos, eczema, enfermedades oculares, dolores de cabeza, hepatitis, lepra, malaria, reumatismo, escrófula y úlceras. Se ha demostrado que los extractos del neem poseen propiedades antibacterianas, antidiabéticas, antifúngicas y antivirales y varias partes del árbol poseen efectos analgésicos, antipiréticos, antisépticos, diuréticos, y purgantes (Etcheverry, 2003).

Los extractos de neem actúan, en los insectos, como antialimentario, inhibidor de crecimiento, prolonga las etapas inmaduras ocasionando la muerte, disminuye la fecundidad y la ovoposición, disminuye los niveles de proteínas y aminoácidos en la hemolinfa e interfiere en la síntesis de quitina. Similar a las hormonas ecdisonas del insecto que controla el proceso de la metamorfosis, el extracto afecta a un órgano similar a la glándula pituitaria del humano, que regula la secreción de las hormonas, actuando como un bloqueador, es decir, obstruye la producción, entonces los insectos no mudan y por supuesto se rompe el ciclo vital (Adán et al., 2011).

### 2.3 GLOSARIO DE TÉRMINOS BÁSICOS

*Aedes aegypti*: es un mosquito pequeño, de la familia de los culícidos, transmisor de virus como el dengue, zika, chikungunya, y la fiebre amarilla; característico por su color oscuro y marcadas bandas blancas en las patas y abdomen.

*Azadirachta indica*: también llamado Neem, es un árbol perteneciente a la familia Meliaceae originario de la India y de Birmania, que solo vive en regiones tropicales y subtropicales; de rápido crecimiento que puede alcanzar 15 a 20 metros de altura y raramente 35 a 40 m y posee abundante follaje todas las temporadas del año.

**Concentración:** es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolvente presentes en una disolución.

**Control biológico:** es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

**Dengue:** es el nombre de una enfermedad contagiosa y de tipo epidémico que se produce por un virus transmitido por los mosquitos *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*.

**Extracto:** Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.

**Estadio:** o instar, es cada etapa por la que atraviesan los artrópodos como los insectos, hasta llegar a su madurez sexual.

**Huevo:** es un cuerpo redondeado de tamaño y dureza variables, que las hembras de diversos grupos de animales producen, y que sustenta y protege al embrión cuando el óvulo es fecundado; en los insectos pueden soportar la desecación y la madre los coloca de forma estratégica, espaciados entre sí, o cerca de una fuente importante de alimento para los futuros juveniles.

**Larva:** es la fase juvenil en los insectos con metamorfosis completa, resulta de la eclosión del huevo, y ella ya puede valerse por sí sola para alimentarse, en culícidos presenta 4 fases y se diferencian generalmente por el tamaño.

**Organofosforado:** son ésteres orgánicos del ácido fosfórico, son sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo, pero con gran actividad

neurotóxica que va a producir intoxicaciones agudas de gravedad. Son los insecticidas, junto con los carbamatos y piretroides, más ampliamente utilizados en la actualidad.

**Pyriproxyfen:** es un regulador de crecimiento del tipo juvenoide, que evita el desarrollo normal de la metamorfosis de los mosquitos, inhibiendo la emergencia de adultos.

**Viabilidad:** opción de que una acción se pueda llevar a cabo o concretice, con una cierta continuidad en el tiempo. En el aspecto biológico, hace referencia al *concepto* natural de nacimiento y la aptitud física para sobrevivir.

## 2.4 HIPÓTESIS

El extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 “neem” disminuye la viabilidad del huevo y la larva de *Aedes aegypti* L. 1762 en laboratorio.

# CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

## 3.1 ENFOQUE Y DISEÑO

<b>ENFOQUE:</b>	Cuantitativo
<b>DISEÑO:</b>	Experimental de estímulo creciente
<b>NIVEL:</b>	Correlacional
<b>TIPO:</b>	Aplicada

## 3.2 SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN

Población: Individuos de *Aedes aegypti* en estadio de huevo y larva presentes en la localidad de Piura.

Muestra: 300 huevos de *Aedes aegypti* obtenidos de la oviposición en el insectario; y 300 larvas de *Aedes aegypti*, obtenidas de huevos criados en el insectario.

### 3.3 MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

#### 3.3.1 Ubicación del Insectario

El trabajo se llevó a cabo en un insectario ubicado en el sector San Pedro, ciudad de Piura-Perú; de coordenadas  $5^{\circ}12'05''\text{S}$ ,  $80^{\circ}38'23''\text{O}$ ; lugar donde se llevó a cabo el proyecto Nature Solution (Fig. 03), el cual estaba acondicionado según normativas nacionales e internacionales que responde a los requisitos descritos por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) – Organización Mundial de la Salud (OMS) en Especificaciones para un insectario (1983).



**Fig. 03.** Ubicación del Insectario

Fuente: Google Earth

#### 3.3.2 Descripción del Insectario

El insectario se instaló en una habitación de medidas de 3 m largo, 2 m ancho, y 2.5 m de altura, de material concreto. Las instalaciones estaban correctamente señalizadas y contaban con las medidas de seguridad necesarias como botiquín y extintor, además de puertas y ventanas que impedían la posibilidad de fuga de los insectos (Fig. 04).

Este tenía una puerta de entrada y salida del personal, y dos cubículos o espacios (el principal fue para la crianza de pupas y de adultos en un armario protegido con malla tul para evitar la fuga de los insectos, y el segundo fue usado para la crianza de huevos y larvas), además contó con sistema de aire acondicionado de la marca Sole (Fig. 05).

En el primer cubículo, la iluminación se mantuvo con el fotoperiodo natural en todo momento y el segundo cubículo se mantuvo a oscuras (Modificado de Especificaciones para un insectario OMS, 1983; anexo 5.1); la temperatura fue medida con un sensor RH/Temp Datalogger DTR-

305 y fluctuó entre los  $25^{\circ}\pm 3^{\circ}$  y la humedad relativa de 60%, la cual se mantuvo con ayuda del sistema de aire acondicionado.



**Fig. 04.** Instalaciones del insectario correctamente señalizadas



**Fig. 05.** a) División del insectario en dos cubículos. b) Parte interna del cubículo 1 con el estante para la crianza de los adultos. c) Parte interna del cubículo 2 para la crianza de huevos y larvas.



### 3.3.3 Procedencia del Material Biológico y establecimiento de la colonia experimental

El estudio se realizó a partir de larvas de *Aedes aegypti*, proporcionadas por el área de Vigilancia y Control Vectorial del Ministerio de Salud-Piura, producto de sus actividades diarias, colectadas en los cementerios de los distritos del Bajo Piura: La arena, Cura Mori y Catacaos, las cuales fueron identificadas usando claves taxonómicas: clave ilustrada para la determinación genérica de culícidos de Colombia y el nuevo mundo (González y Darsie, 1996). Estas se criaron bajo condiciones de laboratorio, determinadas por un ensayo previamente realizado. Los adultos emergidos, se procedieron a sexar mediante el uso de claves taxonómicas. Posteriormente, se seleccionaron 6 parejas, cuyas primeras generaciones (F<sub>1</sub>) fueron nuestra población homogénea, de la cual se obtuvo los huevos y larvas para dar inicio al ensayo.

### 3.3.4 Ciclo Biológico de *Aedes aegypti*

Se desarrolló en base a la metodología usada por Quispe-Pretel et al. (2014). Para ello, se colocó las seis parejas de *Aedes aegypti*, cada una en una caja de plástico que actuó como cámara de crianza de los adultos (30x30 cm), la cual tenía en las caras laterales un orificio donde se colocó una manga de tul de 30 cm de largo por donde se alimentó a los insectos. Dentro de cada caja se colocó una ovitrampa que se confeccionó con un recipiente de plástico (12x 6 cm) pintado de color negro, el cual se cubrió por los bordes con papel filtro que fue previamente arrugado para dar mayor similitud a un recipiente rugoso, luego se llenó con agua limpia y declorada hasta los 2,5 cm. de la pared del envase.

**Huevos:** cada dos días se revisó las ovitrampas, así las que tenían huevos, se sacaron de la caja de la pareja y cuidadosamente se retiraba el papel filtro que contenía los huevos, este era puesto en una bandeja de plástico, la cual se rotuló con una etiqueta que contenía el número de huevos, la pareja y el número de puesta, además de la fecha (Fig. 06). Había dos grupos de bandejas con huevos: los que pasaban a las bandejas de eclosión a larvas, y los que sirvieron para el bioensayo con huevos.

**Larvas:** Cuando emergieron las larvas, con ayuda de un gotero de boca ancha y una lupa entomológica se manipularon y se contabilizaron para tener en cuenta el espacio vital, el agua del recipiente y la cantidad del alimento. Para ello se utilizó la fórmula empleada por Pérez et al. (2004), quien emplea bandejas de 625 cm<sup>3</sup> para 500 – 700 larvas con 2 litros de agua; se estableció colocar como máximo 200 larvas por bandeja, y mediante regla de tres se trabajó de la siguiente manera, considerando que el tamaño de la bandeja fue de 30x25= 750 cm<sup>3</sup>

$$\begin{array}{r}
 500 \text{ larvas.} \quad \text{—————} \quad 21 \\
 200 \text{ larvas} \quad \text{—————} \quad x \\
 X = \frac{200 \times 2}{500} = 0.81
 \end{array}$$

Así se colocó como máximo 200 larvas por bandeja de 750 cm<sup>3</sup> con 800 ml de agua declorada.

Como alimento se agregó levadura de cerveza, se calculó la cantidad según Pérez et al. (2004), que menciona 0.3 mg de alimento por larva en los primeros estadios y 0.6 mg en toda su vida larval. Así el primer día se agregó 60 mg de levadura, luego pasando 2 días se agregó 60 mg más de levadura. El agua y el alimento se cambiaron cada dos días para evitar la formación de hongos (Fig. 07).

**Pupas:** Luego de emergidas las pupas, estas se pusieron en envases de plástico con tapa, a esta tapa se le realizó una abertura la cual se cubrió con tela tul, posteriormente se trasladaron dichos envases a las cámaras de crianza de adultos.

**Adultos:** De los adultos emergidos se determinó el dimorfismo sexual, teniendo en cuenta el tipo de antenas y se trasladaron ya en parejas con ayuda del tubo capturador hacia las cajas de crianza. Los machos y hembras sin pareja se separaban también en cajas de crianza, pero por sexos.

Dentro de las cajas, para la alimentación de machos, se colocaron algodones embebido en agua azucarada en una proporción de 5g de azúcar en 100mL de agua, y se cambió el sustrato cada dos días para evitar la formación de hongos. Para la alimentación de las hembras, se le ofreció sangre humana, cada dos días por 15 minutos se introdujo la mano hasta la altura del brazo (Fig. 08).



**Fig. 06.** Bandeja de huevos puestos a eclosionar



**Fig. 07.** Preparación del alimento y aplicación a la bandeja de larvas



**Fig. 08.** Machos de *A. aegypti* alimentándose de algodones embebidos en azúcar y Hembra succionando sangre de brazo humano.

### 3.3.5 Obtención del Extracto

Se colectaron hojas amarillas del árbol de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 “neem”, que se encuentran en los jardines del Rectorado del campus de la UNP. Esta fue determinada por el docente de la Universidad Nacional de Piura Dr. Manuel Charcape Ravelo.

Se pesaron 1000g de hojas amarillas (Fig. 09 a), luego se procedió a lavarlas dos veces con agua destilada para remover partículas adheridas, después se dejaron secar al aire durante 24 horas, y posteriormente la muestra fue molinada durante 10 minutos con un equipo Magic Bullet (Fig. 09 b). Seguido a esto, se colocó en dos frascos de topacio con 250 ml de etanol en cada envase, para su maceración a temperatura y humedad ambientales durante 7 días, con agitación periódica de tres veces por día (Fig. 09 c). A continuación, se realizó un primer filtrado donde se separaron partículas más grandes (Fig. 09 d) luego se realizó un segundo filtrado, esta vez con sistema al vacío con un filtro de membrana de poro N° 0.45  $\mu\text{m}$  y 40 mm de diámetro (Fig. 09 e), dicho filtrado se colocó sobre una placa Petri y durante 72 horas se dejó evaporar el alcohol con ventilación forzada (Fig. 09 f).



**Fig. 09.** a) Pesado de hojas amarillas de *Azadirachta indica*. b) Molido de las hojas en el Magic Bullet. c) Maceración del extracto obtenido. d) Primer filtrado del extracto. e) Segundo filtrado del extracto con sistema al vacío. f) Vertido del extracto filtrado en placa Petri para la evaporación del etanol.

### 3.3.6 Preparación de las Disoluciones

Después de la evaporación del etanol, se procedió a retirar con ayuda de una espátula de acero el extracto solidificado de la placa (Fig. 10.a), posteriormente se pesó en una balanza analítica de marca A&D Company de precisión 0.0001 g, las cantidades de 0.340 g, 0.680 g y 1.020 g (Fig. 10. b).

Dichas cantidades, fueron disueltas en 200 mL de agua declorada, obteniendo las concentraciones del ensayo biológico (Fig. 10.c).

**Tabla 04.** Disoluciones en los tres tratamientos de extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. Juss. 1830 “neem”.

	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Extracto	0.340 g	0.680 g	1.020 g
Agua declorada	200 ml	200 ml	200 ml
Concentraciones (C)	0.0017 g/ml (C <sub>1</sub> )	0.0034 g/ml (C <sub>2</sub> )	0.0051 g/ml (C <sub>3</sub> )



**Fig. 10.** a) Retiro del extracto solidificado con una espátula. b) Pesado del extracto en una balanza analítica. c) Aplicación en 200 ml del agua declorada del ensayo biológico.

### **3.3.7 Bioensayo**

Para los huevos, se trabajó con un total de 300 huevos de la F<sub>1</sub> de las parejas del insectario, que como máximo tenían 7 días de vida, estos se colocaban en su mismo papel filtro cortado por cuadros, dentro de los envases y se dejaban aclimatando por un día.

Se realizaron 3 repeticiones, tomándose aleatoriamente 20 huevos para cada uno de los 5 envases plásticos transparentes que contenían 200 mL de agua declorada: (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, Control y Testigo) debidamente rotulados con fecha y hora.

Para las larvas, se trabajó con 300 larvas de *Aedes aegypti* (larvas del IV estadio) tomadas directamente de huevos eclosionados en el insectario, estas también eran puestas en los envases un día previo a la aplicación para que logren aclimatarse.

Se realizaron 3 repeticiones, tomándose aleatoriamente 20 larvas para cada uno de los 5 envases plásticos transparentes que contenían 200 mL de agua declorada (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, Control y Testigo), debidamente rotulados con fecha y hora. (Modificado de Bobadilla, et al. 2007).

Se contó con un Testigo (T) por repetición, al cual no se le aplicó ningún tratamiento; y un control positivo (P) por repetición, expuesto a 0.1 g de Pyriproxifen (Pyrilarv 0.5%) como referencia, cada uno con 20 huevos/larvas respectivamente.

Se mantuvo a las larvas y huevos con sus respectivos tratamientos a condiciones adecuadas para que el ciclo se desarrolle correctamente.

En todo momento se tuvo en cuenta el Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*, propuesto por la Red Latinoamericana de control de Vectores (2005) (Anexo 5.2).

## **3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS**

### **3.4.2 Diseño Experimental**

En esta investigación se utilizó el diseño experimental de estímulo creciente; debido a que en los grupos de comparación existió la manipulación de la variable independiente (tratamientos) para ver su efecto sobre la variable dependiente (efecto del extracto), pues dicha variable “estímulo” se aplicó en magnitudes diferentes para los grupos, uno de los cuales fue el testigo que recibió estímulo nulo y el grupo control que trabajó bajo el sometimiento del químico en circulación actual por el ministerio de salud llamado Piriproxyfen (Pyrilarv 0.5%) (Anexo 2. Tabla 12).

Para evaluar el efecto del extracto sobre la viabilidad de los huevos, se cuantificó el número de huevos viables, es decir que llegan a eclosionar, comparándolo con el grupo testigo y el grupo control, medido semanalmente durante 4 semanas, en cada uno de los tres tratamientos a aplicar.

Para evaluar el efecto del extracto sobre la viabilidad de las larvas, se cuantificará el número de larvas no viables, es decir que no pasaron a fase pupal por causa de muerte, comparándolo con el grupo testigo y el grupo control, medido cada 12 horas, hasta las 120 horas, en cada uno de los tres tratamientos a aplicar.

### **3.5 ASPECTOS ÉTICOS**

Existen regulaciones para la cría de mosquitos y otros insectos, que constituyen vectores de enfermedades humanas y de otros animales. Estas regulaciones han sido dictadas por la OMS, el Instituto Nacional de Salud en el Perú (INS), para el trabajo en este tipo de investigaciones, pues se debe justificar correctamente la cría de especies transmisoras de enfermedades y evitar la introducción de especies vectores que no existan en el país, con el criterio de que estas especies deben ser colonizadas de manera justificada. Para ello se hizo uso del Manual de Especificaciones de un Insectario, donde determina las medidas correctas de crianza y aspectos relacionados con la alimentación de los individuos, y posterior eliminación de las muestras, además de la ubicación apropiada del insectario.

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. RESULTADOS**

Después de establecida la colonia experimental con individuos de *Aedes aegypti* en los estadios de huevo y larva del IV instar, y tras haber obtenido el extracto etanólico de *Azadirachta indica* “neem” con las concentraciones de 0.0017 g/ml, 0.0034 g/ml y 0.0051 g/ml, se procedió a ingresar los datos en una matriz en el programa Microsoft Excel y se hallaron los estadísticos descriptivos con el paquete estadístico IBM SPSS statistics 24, además de comparación de medias mediante la prueba Tukey para los grupos con diferencias significativas, obteniéndose así los siguientes resultados:

### 4.1.1. HUEVOS

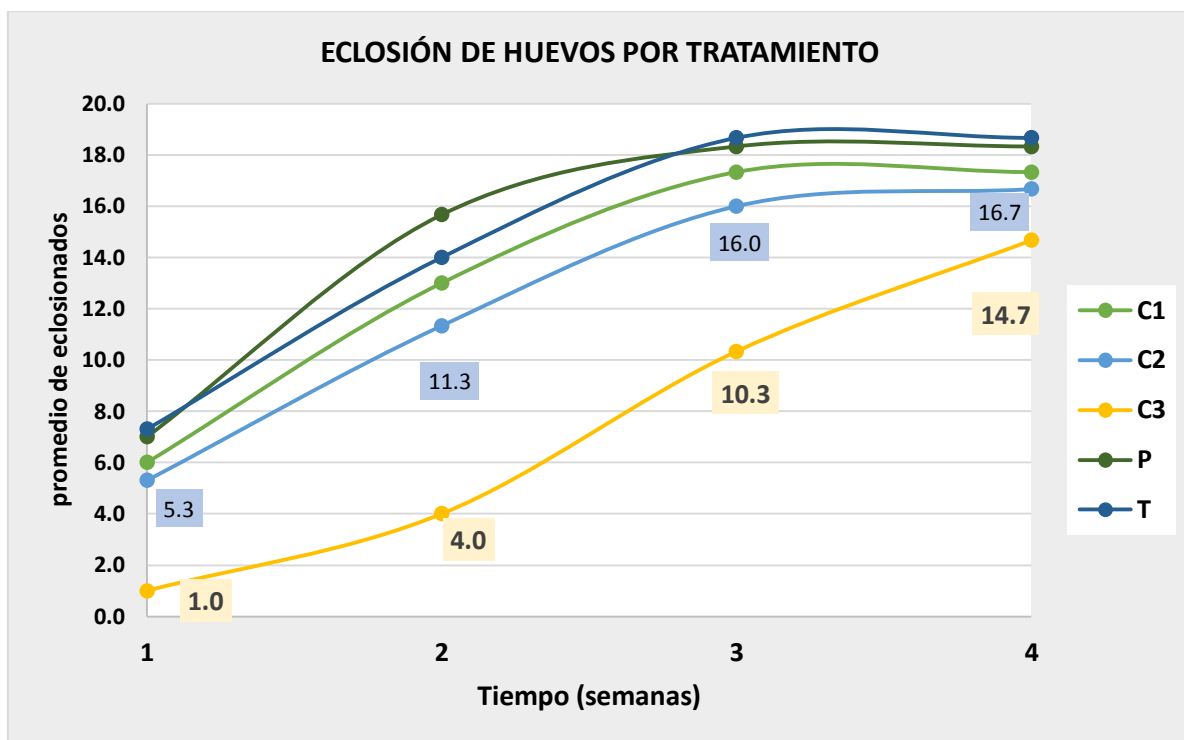
En el promedio de huevos eclosionados evaluados para cada una de las semanas, se evidenció que la C<sub>3</sub> tuvo los promedios menores en las dos primeras semanas en comparación con los otros tratamientos, además al igual que la C<sub>2</sub> fueron las únicas que eclosionaron hasta la semana 4; así mismo los promedios de eclosión más altos para C<sub>3</sub> recién en la 3era semana, mientras que para el Pyriproxyfen fueron en la semana 2 y para el Testigo en la primera semana (Tabla 05).

**Tabla 05.** Promedio de huevos eclosionados de *Aedes aegypti* por cada semana.

TIEMPO	C1	C2	C3	PYRI	TESTIGO
Semana 1	6.0	5.3	1.0	7.0	7.3
semana 2	7.0	6.0	3.0	8.7	6.7
semana 3	4.3	4.7	6.3	2.7	4.7
semana 4	0.0	0.7	4.3	0.0	0.0

De la matriz principal donde se contabilizó el número de huevos eclosionados en cada una de las tres repeticiones, se halló los promedios acumulados para cada tratamiento durante las 4 semanas evaluadas; así para la C<sub>1</sub> se obtuvo como promedios 6 huevos eclosionados en la semana 1, 13 a la semana 2, culminando con 17.3 en la semana 3 y en la cuarta no tuvo eclosionados; para la C<sub>2</sub> los promedios fueron de 5.3 en la semana 1, 11.3 a la semana 2, 16 a la tercera semana y 16.7 hasta la semana 4; para la C<sub>3</sub> de 1 en la semana 1, 4 en la semana 2, 10.3 a la semana 3 y finalizó con 14.7 hasta la semana 4; para el control positivo (P) fue de 7 a la semana 1, 15.7 en la semana 2 y culminó en la semana 3 con 18.3; y para el Testigo se obtuvo 7.3 en la primera semana, 14 en la segunda y finalizó su eclosión en la tercera semana con 18.7. Demostrando que el menor número de eclosión fue para la C<sub>3</sub>, seguida de la C<sub>2</sub> (Fig. 11).





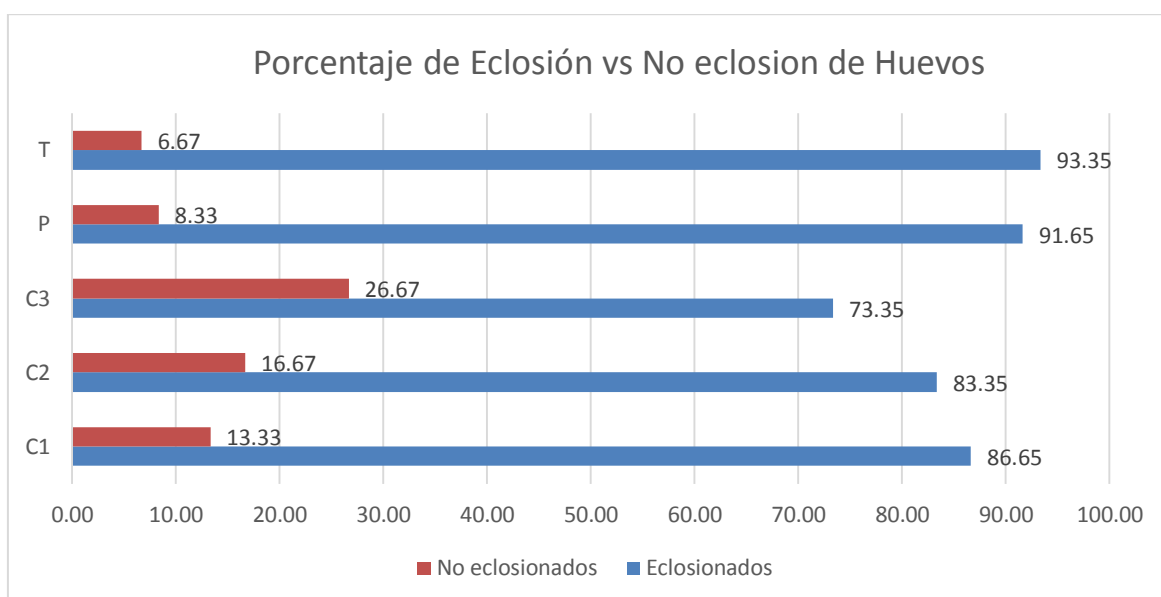
**Fig. 11.** Promedio acumulado por tratamiento de la eclosión de huevos de *Aedes aegypti*.

Con el número de huevos eclosionados, se calculó la diferencia de los 20 individuos puestos por cada concentración, luego se procedió a promediar las tres repeticiones realizadas, obteniéndose así el promedio de huevos eclosionados y no eclosionados al final de las 4 semanas evaluadas (Tabla 06).

**Tabla 06.** Promedio por tratamiento de Eclosión y No eclosión de huevos de *Aedes aegypti*.

TRATAMIENTO	ECLOSIONADOS	NO ECLOSIONADOS
C1	17.33	2.67
C2	16.67	3.33
C3	14.67	5.33
P	18.33	1.67
T	18.67	1.33

Con los promedios obtenidos de la tabla anterior, se calculó los porcentajes de eclosión y no eclosión, encontrándose que todos los tratamientos poseen porcentajes de eclosión mayores al 70%; sin embargo, dentro de los no eclosionados, el porcentaje mayor fue para la C<sub>3</sub> con 26.67 %, seguido de la C<sub>2</sub> con 16.67 % y la C<sub>1</sub> de 13.33 %, finalmente el Pyriproxyfen con 8.33% y el Testigo con 6.67% (Fig. 12).



**Fig. 12.** Porcentaje de Eclosión vs No eclosión de huevos de *Aedes aegypti*.

Se realizó el Análisis de Varianza de dos factores para la eclosión de los huevos, encontrándose que estadísticamente no es significativo para las Concentraciones, pues el valor de la significancia es mayor a 0.05 (Sig.=0,757); por tanto, no fue necesario realizar la prueba estadística de Tukey (Tabla 07).

**Tabla 07.** Análisis de Varianza para la Eclosión de Huevos de *Aedes aegypti*.

Pruebas de efectos Inter sujetos					
Variable dependiente: número de eclosionados					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	430,850 <sup>a</sup>	19	22,676	5,622	,000
Intersección	1100,817	1	1100,817	272,930	,000
Tiempo (semanas)	238,183	3	79,394	19,685	,000
concentraciones	7,600	4	1,900	,471	,757
semanas * concentraciones	185,067	12	15,422	3,824	,001
Error	161,333	40	4,033		
Total	1693,000	60			
Total corregido	592,183	59			

a. R al cuadrado = ,728 (R al cuadrado ajustada = ,598)

#### 4.1.2. LARVAS

En los promedios de larvas muertas para cada una de las horas evaluadas, se evidenció que los promedios más altos de mortalidad lo tuvieron C<sub>3</sub> a las 24 horas (6.33) y la C<sub>2</sub> a las 72 horas (2.67), seguidos de la C<sub>1</sub> a las 72 horas (1.67), Pyriproxyfen a las 72 h (2.33), y el Testigo a las 72 h (1.33) (Tabla 08).

**Tabla 08.** Promedio por tratamiento de larvas muertas de *Aedes aegypti*.

TIEMPO (h)	C1	C2	C3	PYRI	TEST
0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
24	0	0	6.33	0	0
36	0	0.33	0.33	0	0
48	0.33	2.33	2.67	0.67	0
60	0.33	0.67	1.00	0.67	0.33
72	1.67	2.67	4	2.33	1.33
84	0	0.33	0	0.67	0.33
96	0	1	0.33	1.33	0
108	0	0	0	0.67	0
120	0	0	0	1.33	0

De la matriz principal donde se contabilizó el número de larvas muertas en cada una de las tres repeticiones, se halló los promedios acumulados para cada tratamiento cada 12 h durante las 120 h evaluadas; así se encontró que con la C<sub>1</sub> empezaron a morir a partir desde las 48 h (0.33 larvas). Con la C<sub>2</sub> empezaron a morir a las 36 h (0.33 muertas). Con la C<sub>3</sub> empezaron a morir a las 24 h presentando los promedios más altos de muerte. Para el control positivo (P) empezaron a morir a las 48 h (0.67 muertas), a las 60 h (1.34), a las 72 h (3.67), a las 84 h (4.34), a las 96 h (5.67), a las 108 h iban 6.34, y a las 120 h fue de 7.67 larvas muertas, continuando un promedio menor de muerte incluso después de las 120 h. Para el Testigo se contabilizó un promedio de 0.33 muertas a las 60 h, a las 72 h (1.66) y a las 84 h fueron 1.99 muertas (Fig. 13).

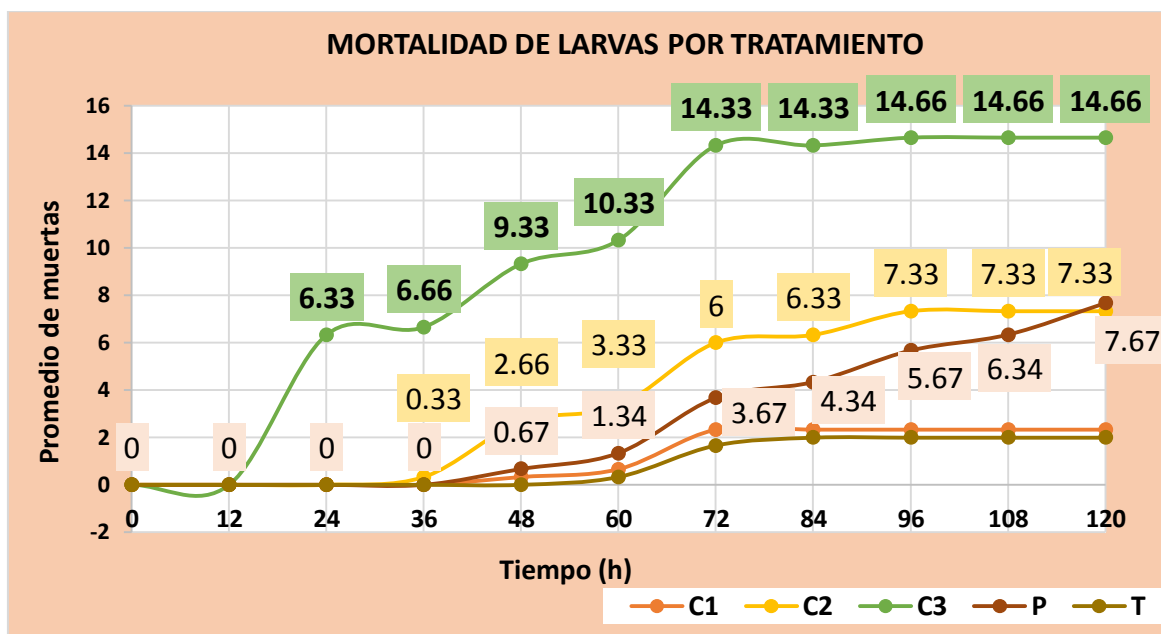


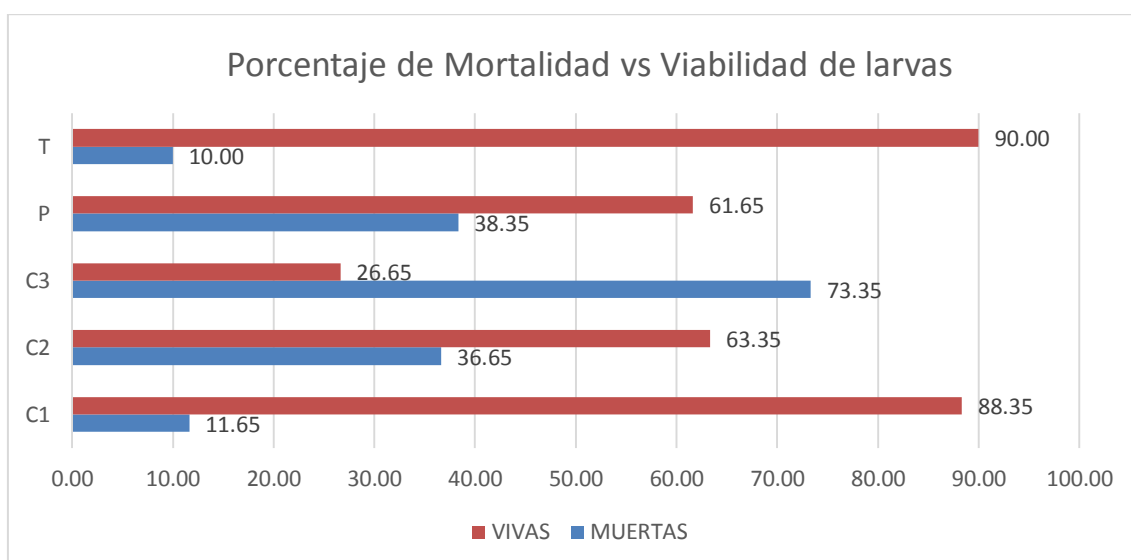
Fig. 13. Promedio acumulado por tratamiento de la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti*.

Al obtener el promedio total de larvas muertas al finalizar las 120 horas evaluadas, se encontró que fue la C<sub>3</sub> presento el mayor promedio de mortalidad (14.67), seguido del control positivo (7.67), posteriormente la C<sub>2</sub> (7.33), y finalmente la C<sub>1</sub> un tanto más alejada (2.33), en tanto el Testigo tuvo un promedio de 2 larvas muertas. Así se deduce que el promedio más bajo de viabilidad lo tuvo la C<sub>3</sub> (5.33) (Tabla 09).

Tabla 09. Promedio por tratamiento de la mortalidad y viabilidad de larvas de *Aedes aegypti*.

Tratamientos	MUERTAS	VIVAS
C1	2.33	17.67
C2	7.33	12.67
C3	14.67	5.33
P	7.67	12.33
T	2	18

Con los promedios de la tabla anterior, se calculó el porcentaje de mortalidad, así el porcentaje más elevado lo obtuvo la C<sub>3</sub> (73.35%), seguido del control Positivo (38.35 %), la C<sub>2</sub> (36.65%), después la C<sub>1</sub> (11.65%) y finalmente el Testigo (10%). En su defecto, el porcentaje más alto de viabilidad lo obtuvo el Testigo (90%), seguido de la C<sub>1</sub> (88.35%), la C<sub>2</sub> (63.35%), el control positivo (61.65%), y finalmente la C<sub>3</sub> (26.65%) (Fig. 14).



**Fig. 14.** Porcentaje de Mortalidad vs. Viabilidad de larvas de *Aedes aegypti*.

Se realizó el Análisis de Varianza de dos factores para la mortalidad de larvas, encontrándose que estadísticamente sí es significativo (Sig.<0,005) para la variable Concentraciones (Sig.=0,000); por tanto, fue necesario realizar la Prueba estadística de Tukey pues se rechazó la hipótesis de la igualdad de las medias de las Concentraciones (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis de Varianza para la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* entre tratamientos.

Pruebas de efectos Inter sujetos					
Variable dependiente: NÚMERO DE LARVAS MUERTAS					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	220,279 <sup>a</sup>	54	4,079	9,220	,000
Intersección	63,055	1	63,055	142,521	,000
Horas	81,345	10	8,135	18,386	,000
concentraciones	28,885	4	7,221	16,322	,000
horas * concentraciones	110,048	40	2,751	6,218	,000
Error	48,667	110	,442		
Total	332,000	165			
Total, corregido	268,945	164			

a. R al cuadrado = .819 (R al cuadrado ajustada = .730)

Al realizar la prueba estadística Tukey de comparaciones múltiples para la variable Concentraciones, se encontró que hay diferencias mínimas entre la C<sub>1</sub> y la C<sub>2</sub>, pues la significancia es igual a 0.05, no obstante, la C<sub>1</sub> tiene mayor diferencia con la C<sub>3</sub> (Sig.=0.00). Estableciendo comparaciones con el Testigo, este tiene mayores diferencias con la C<sub>3</sub> (Sig.=0.00). La C<sub>2</sub> con la C<sub>3</sub> (Sig.=0.01) y por último la C<sub>3</sub> tiene diferencias con todos los tratamientos (Tabla 11).

**Tabla 11.** Prueba estadística de Tukey comparando la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* entre tratamientos.

<b>Comparaciones múltiples</b>						
Variable dependiente: NÚMERO DE LARVAS MUERTAS						
HSD Tukey						
(I) concentraciones	(J) concentraciones	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
C1	C2	-,45*	,164	,050	-,91	,00
	C3	-1,12*	,164	,000	-1,58	-,67
	P	-,48*	,164	,030	-,94	-,03
	T	,03	,164	1,000	-,42	,48
C2	C1	,45*	,164	,050	,00	,91
	C3	-,67*	,164	,001	-1,12	-,21
	P	-,03	,164	1,000	-,48	,42
	T	,48*	,164	,030	,03	,94
C3	C1	1,12*	,164	,000	,67	1,58
	C2	,67*	,164	,001	,21	1,12
	P	,64*	,164	,002	,18	1,09
	T	1,15*	,164	,000	,70	1,61
P	C1	,48*	,164	,030	,03	,94
	C2	,03	,164	1,000	-,42	,48
	C3	-,64*	,164	,002	-1,09	-,18
	T	,52*	,164	,018	,06	,97
T	C1	-,03	,164	1,000	-,48	,42
	C2	-,48*	,164	,030	-,94	-,03
	C3	-1,15*	,164	,000	-1,61	-,70
	P	-,52*	,164	,018	-,97	-,06
Se basa en las medias observadas.						
El término de error es la media cuadrática (Error) = .442.						
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.						

## 4.2 DISCUSIÓN

En la investigación realizada por Muhammad et al. (2014) con extracto etanólico de las hojas del Neem a concentraciones de 0.05 g/ml, 0.1 g/ml, 0.15 g/ml y 0.2 g/ml, se obtuvo porcentajes de mortalidad a las 72 horas en larvas de *A. aegypti* de 35%, 60%, 70% y 85% respectivamente. Estos resultados son superiores a los del presente trabajo, pues las concentraciones son mayores, sin embargo, sí coincide en la acción larvicida del neem.

Villamar y Malusin (2015) realizaron un ensayo con larvas de *Aedes aegypti* sometidas a concentraciones de 0.001 g/mL, 0.002 g/mL y 0.005 g/mL de extracto etanólico de hojas verdes de *A. indica*. Observando una mayor mortalidad de las larvas (93%) a las 72 horas de incubación en el extracto etanólico a 0.005 g/mL de concentración, y en los extractos a 0.001 g/mL y 0.002 g/mL un 47 % y 70% respectivamente, además en el análisis del extracto etanólico por CG-EM se evidenció que el fitol fue el principal componente del extracto etanólico (14.4% área), el cual sería uno de los metabolitos responsables de la actividad larvicida. En este trabajo, la concentración máxima ( $C_3 = 0.005$  g/ml) es igual a la que el autor toma como máxima; sin embargo, 93% difiere del 73.35% que se halló hasta las 120 horas (71.65% a las 72 h), así los porcentajes de mortalidad hallados por Villamar y Malusin fueron mayores; esto debido quizá al método de extracción mucho más elaborado, y que la hoja amarilla posea menos combinaciones entre principios activos que la hoja verde, no obstante la hoja amarilla es mejor en cuanto a olor y tiempo de descomposición.

*Phthorimaea operculella* (Lepidóptera: Gelechiidae) es una plaga clave en el cultivo de papa en el Perú. Se evaluaron sobre huevecillos y larvas de primer estadio, tres extractos de origen botánico: acuoso de *Azadirachta indica* A. Juss [Meliaceae], hexánico de *Lantana camara* L. [Verbenaceae] y acetónico de molle *Schinus molle* L. [Anacardiaceae]. La eclosión de los huevos se vio afectada por el extracto de *Lantana camara* y el extracto de molle. La mortalidad de las larvas en los ensayos de ingestión fue afectada por el neem (100% a las 32 horas), por la *Lantana camara*, y por molle (Lannacone y Lamas, 2003). En la presente investigación coincidimos en la acción larvicida del neem sobre la larva IV en este caso de *Aedes aegypti*, aunque con un porcentaje menor de 73.35% con la  $C_3$ , y de igual forma encontramos que no tuvo efecto ovicida. Sin embargo, el solvente que se usó fue etanol y no agua destilada como en el estudio, metodología apoyada en un estudio realizado por Cruz et al. (2013) donde indican que el extracto etanólico y acuoso de *A. indica* causa mortalidad del 95 a 100% en los huevos de *Bemisia tabaci*, y dice que no hay diferencia significativa en la mortalidad entre los tipos de extracto. Además, al trabajar con hoja amarilla, esta tendría una mayor cantidad del compuesto activo Azadiractina, la cual al extraerse solo con agua emana un olor bastante fuerte parecido al

de una mezcla de ajo-maní (Morgan, 2009), lo que no sucedió con la extracción realizada con etanol.

Se evaluaron los efectos ovicidas y larvicidas del bioinsecticida spinosad (Tracer 480SC) en *Aedes aegypti* y *Anopheles stephensi* a concentraciones de 0, 1, 5 y 10 ppm, en 4 semanas de exposición en condiciones controladas de temperatura ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ). Se observó un efecto ovicida intermedio (promedio de no eclosión de 28.6%, 42.3% y 52,9%). Por otra parte, la mortalidad de larvas fue del 100% en las tres concentraciones de spinosad para ambas especies durante las primeras semanas del experimento, demostrando que su potencial reside en su efecto larvicida más que en su actividad ovicida (Hertlein et al., 2010). En otro estudio realizado por Pérez et al. (2007) no observaron diferencias significativas en el porcentaje de eclosión de huevos de *A. aegypti* de la cepa Rockefeller expuestos en condiciones controladas a 5 y 20ppm de spinosad.

Neem al igual que el spinosad tiene efecto larvicida, sin embargo, este último si generó efecto ovicida intermedio en *Anopheles stephensi*, lo que nos lleva a pensar como menciona Rezende et al. (2008) que es posible que estas poblaciones de mosquitos difieren en el grosor o consistencia de las capas de protección de los huevos como la cutícula serosa, el exocorión y el endocorión, las cuales les confieren diferente susceptibilidad. La cutícula serosa de huevos en culícidos está compuesta por quitina y está asociada con la resistencia a la desecación y su impermeabilidad, esto puede impedir el paso del spinosad en *A. aegypti*, pero no en *Anopheles*, así el neem por su condición lipídica pudo ingresar en *Aedes*, sin embargo, no mató al embrión, pero generó dificultades y rezagos en los posteriores estadios.

Los huevos de una misma postura, sumergidos en agua no eclosionan al mismo tiempo y la diferencia entre el primer nacimiento y el último oscila hasta en un mes y más. Los huevos fecundados al eclosionar realizan una rotura transversal en el extremo ancho del huevo, en cambio los no fecundados se abren los vástagos por el otro extremo, pero también es posible encontrar huevos no fecundados sin haberse abierto (Mirsa, 2002). Se confirma la información de Mirsa, ya que ciertamente el grupo de huevos del testigo demoraron hasta 21 días para eclosionar todos; además los huevos testigo contabilizados como no eclosionados vistos al estereoscopio permanecían cerrados, se presionaron y se vieron al microscopio, pero algunos no estaban fecundados, de igual forma algunos huevos bajo tratamiento que no eclosionaron si estaban fecundados, lo que confirma el ligero alargamiento del tiempo de eclosión.

Canyon y Müller (2008), citan que el estado larval con frecuencia comprende de 4 a 10 días, en condiciones favorables de temperatura entre  $25\text{-}29^\circ\text{C}$ . Así mismo otros autores, citan el tiempo en estado de larva, en función del alimento y la temperatura encontrando que las larvas criadas en aguas residuales no tratadas a  $25.7^\circ\text{C}$  necesitaron 6.3 días; agua de lluvia a  $25^\circ\text{C}$ , 9.5 días y en agua no clorada a  $25.8^\circ\text{C}$ , 9.7 días. Así mismo menciona que el tiempo que permanece cada individuo en este estado depende en gran medida de la disponibilidad de alimento, temperatura



y de la densidad larvaria del criadero. Esto pudo ser comprobado en el laboratorio, porque el estado de larva desde su eclosión duró aproximadamente entre 7 a 9 días en larvas en agua de clorada y que no fue sometida a ningún tratamiento, además disponían de condiciones óptimas de alimento, temperatura y densidad en el recipiente.

Los componentes naturales del neem tienen función de Regulador de Crecimiento con acción insecticida y repelencia contra insectos. Los insectos tratados con extractos retardan o inhiben su alimentación, como regulador de crecimiento, interfiere en los procesos de cambios de la larva (mudas), se producen fallas morfogénicas, y es frecuente que la exuvia se quede adherida al abdomen y patas, lo que impide el correcto desarrollo del insecto, que muere en el intento de liberarse de su muda (López y Estrada, 2011). Esto se pudo observar con los adultos que emergieron de huevos tratados con la C<sub>3</sub>, los cuales se desarrollaron normalmente hasta el estadio de pupa, cuando quisieron emerger no pudieron pues no pudieron liberarse por completo de la exuvia y llegaron a morir en estado pupal; de la misma forma pasó con algunas de las larvas sometidas a tratamiento que murieron en pupas; además es por ello que se utilizó como control positivo al Pyriproxyfen, pues este es considerado como un regulador de crecimiento con acción larvicida, así lo demuestra un estudio sobre la Eficacia del Pyriproxyfen para el control de *A. aegypti* en cepas con diferentes niveles de resistencia a Temefos, ya que a concentraciones mayores tuvo una acción larvicida, sin embargo a concentraciones más bajas evidencio la inhibición de la emergencia de los adultos, con mortalidades entre 18,6 y 96 % (Leyva et al., 2010).

Galun (2009) menciona que la ingesta de sangre ocurre principalmente en horas diurnas, y además el proceso de toma de sangre del mosquito debe cumplir con 4 condiciones: Reconoce el huésped y reposa sobre él, explora la zona y pica, succiona la sangre y retira la probóscide de la piel.

En los adultos emergidos de huevos bajo tratamiento, se logró apreciar que las hembras eran débiles pues no cumplían con las condiciones que menciona Galun, al no poder fijar su probóscide no succionaban sangre y llegan a morir por inanición.

## CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Azadirachta indica* “neem” no disminuye significativamente la viabilidad del huevo de *Aedes aegypti*, presentando porcentajes de eclosión de 86.65% a 0.0017 g/ml, de 83.35% a 0.0034 g/ml y de 73.35% a 0.0051 g/ml.
- El extracto etanólico de *Azadirachta indica* “neem” sí disminuye significativamente la viabilidad de la larva de *Aedes aegypti*, siendo el porcentaje de mortalidad de 11.65% a 0.0017 g/ml, de 36.65% a 0.0034 g/ml y de 73.35% a 0.0051 g/ml; a las 120 horas de exposición.
- La concentración mínima del extracto de *Azadirachta indica* que reduce la viabilidad de larvas de *Aedes aegypti* es la de 0.0034 g/ml.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar en esta línea de investigación para ampliar y profundizar aún más los resultados sobre el neem con el estadio de huevo, además de pupa y adulto, ya que es indispensable atacar al vector desde sus principales estadios inmaduros.
- Es recomendable mejorar la purificación del extracto etanólico y aislar a los terpenos para que su efecto larvicida sea más efectivo.
- Debido a que el extracto obtenido es una alternativa ecoamigable y podría servir como parte del programa de vigilancia y control de *Aedes aegypti*, se recomienda buscar la metodología correspondiente para hacerlo un producto comercial para que pueda ser aplicado al agua doméstica.
- Se recomienda hacer pruebas primero en laboratorio y luego en campo con otros géneros de culícidos como Culex y Anopheles, este último vector de la malaria, tanto en estadios inmaduros como con el vector en vuelo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADÁN, A., SORIA, J., DELESTAL, P., SÁNCHEZ, C., y VIÑUELA, E. (2011). Acción Diferencial de las formulaciones de Azaradictina sobre los estados de desarrollo de Ceratitis Capitata. *Ministerio de agricultura y Alimentacion MAGRAMA*. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/plagas.pdf> [accesado el 4 de febrero del 2012]
- BERENGUER, C., ALFONSO, A., FONG, O., DOMÍNGUEZ, A., BETANCOURT, J., LARAMENDI, D., Y WAWOE, N. (2010). Toxicidad a dosis repetidas de Azadirachta indica. *Revista cubana de Plantas Medicinales*. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962010000300006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962010000300006). [accesado el 3 de marzo del 2015]
- BILAL, H. (2012). Larvicidal activity of selected plant extract against Aedes albopictus Skuse (Diptera: Culicidae). *African Entomology*, 20(1), 8-12.
- BOBADILLA, M., MOSTACERO, J., ZAVALA, F., CASTILLO, F., y GONZALES, J. (2007). Control de larvas y pupas de Aedes aegypti L. con extractos foliares biocidas, Trujillo-Perú. *Libro de Resúmenes del IV congreso Peruano de Ecología*. Arequipa, Perú.
- BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO (2013). *Situación epidemiológica del dengue en el Perú*. Lima; 22(2): 29-35. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/boletines/2013/02.pdf> [accesado el 15 de julio del 2015]
- CANYON, D.V Y MÜLLER, R (2008). *Hábitat de larvas de Aedes aegypti en áreas urbanas*. WHO. 36:586
- CÁRDENAS, W. (2017). *Obtención de aceite de semillas de neem (Azadirachta indica), mediante el método de prensado en frío para determinar su concentración en Azadiractina*. Tesis de pregrado de Ingeniería Química. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Facultad de Ingeniería Química e Industrias alimentarias. Lambayeque, Perú.
- CESPEDES, H. (2013). La química verde como fuente de nuevos compuestos para el control de plagas agrícolas. *Revista Ciencia en Desarrollo*, 4(2), pp.83-91.
- CORBILLÓN, C., GONZÁLEZ, A., MENENDEZ, Z., COMPANIONI, A., BRUZON, R., DIAZ, M., Y GATO, R. (2012). Influencia de factores bióticos sobre la eficacia de Bacillus thuringiensis contra Aedes aegypti. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 235-243. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602012000300004&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602012000300004&script=sci_arttext) [accesado el 26 de febrero del 2013]
- CRUZ, A., GAMBOA-ANGULO, M., BORGES, R., Y RUIZ, L. (2013). Cruz E Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly Bemisia tabaci Genn. (Hemiptera: Aleyroidea). *Journal of Biotechnology*, 717-3458. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0717-34582013000100006> [accesado el 13 de junio del 2016]
- DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD - DIRESA PIURA. (2017). *Boletín epidemiológico de la situación de Dengue en Piura*. Disponible en: [http://diresapiuraoite.blogspot.pe/p/blog-page\\_4.html](http://diresapiuraoite.blogspot.pe/p/blog-page_4.html)

- EIMAN, M., INTROINI, M., Y RIPOLL, C. (2008). *Directrices para la prevención y control de Aedes aegypti. Argentina.* Disponible en: [http://www.msal.gob.ar/dengue/images/stories/pdf/botoninstitucional/directrices/guia\\_%20acciones%20prevencion\\_control\\_aedes%20\\_aegypti.pdf](http://www.msal.gob.ar/dengue/images/stories/pdf/botoninstitucional/directrices/guia_%20acciones%20prevencion_control_aedes%20_aegypti.pdf) [accesado el 27 de agosto del 2010]
- ETCHEVERRY, N. (2003). Neem, la planta asombrosa. *Revista Tlahui-Medic.* México. Disponible en: <http://www.tlahui.com/medic/medic18/neem.htm>
- GALUN (2009) *Efecto de la dieta en la ovoposición y supervivencia de Aedes aegypti.* Revista médica entomológica. 36: 301-308
- GARCIA, J. (2013). Neem The Divine Tree *Azadirachta indica.* En *Medicinal and Aromatic Plants* (Vol. 5).
- GARCÍA-GUTIÉRREZ, C., Y HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. (2012). Procesos biotecnológicos de producción de bioplaguicidas: hongos entomopatógenos. *Biotecnología Financiera Aplicada a Bioplaguicidas.*
- GONZÁLES, R., Y DARSIE, R. (1996). *Clave ilustrada para la determinación genérica de culícidos de Colombia y el nuevo mundo.* Cali, Colombia. Valle. 4(1):21-37
- HERTLEIN, M., MAVROTAS, C., JOUSSEAUME, C., LYSANDROU, M., THOMPSON, G., JANY, W., RITCHIE., S. (2010). *A review of spinosad as a natural product for larval mosquito control.* Journal of the American Mosquito Control Association. 26 (1): 67-87
- HIDALGO, P. (2011). *El Neem: insecticida fabricado por la naturaleza.* Disponible en: [www.envio.org.ni/articulo/877](http://www.envio.org.ni/articulo/877)
- LANNACONE, J., LAMAS, G. (2003) *Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos sobre la polilla de la papa Phthorimaea operculella (Zeller) (Lepidóptera: Gelechiidae), en el Perú.* Revista Entomotrópica. Escuela de Post Grado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 18(2): 95-105
- LEYVA, P.; RODRÍGUEZ, M.; BISSET, J.; PÉREZ, O.; SÁNCHEZ, L. (2010) *Eficacia del Pyriproxyfen para el control de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) en cepas con diferentes niveles de resistencia a Temefos.* Revista cubana Medicina Tropical. (3):62. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602010000300010](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000300010)
- LOPEZ, M., Y ESTRADA, J. (2011). *Los bioinsecticidas de nim en el control de plagas de insectos en cultivos económicos.* FCA Uncuyo, La Habana, Cuba.
- MARAGATHAVALLI, S., BRINDHA, S., Y KAVIYARASI, N. (2012). Mosquitoes larvicidal activity of leaf extract of Neem (*Azadirachta indica*). *Society for Science and Nature*, 138-142. Disponible en: [http://scienceandnature.org/IJABR\\_Vol2\(1\)2012/](http://scienceandnature.org/IJABR_Vol2(1)2012/) [accesado el 3 de octubre del 2014]
- MARQUETTI, M. D. (2008). *Aspectos bioecológicos de importancia para el control de Aedes aegypti y otros culícidos en el ecosistema urbano.* La Habana, Cuba. Disponible en: <http://tesis.repo.sld.cu/49/1/9789591607546.pdf>
- MENDEZ, L. (2015). *Determinación del efecto larvicida de seis concentraciones de neem (Azadirachta indica) contra el Aedes aegypti (Diptera: Culicidae).* Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/889Azadirachta%20indica.pdf>

- MINISTERIO DE SALUD - MINSA (2017). Casos de Dengue según departamentos desde el año 2000 hasta la SE 32 del 2017. Obtenido de <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2017/SE32/dengue.pdf>
- MIRSA (2002). *Datos experimentales sobre aspectos bioecológicos de Aedes aegypti desarrollados en el laboratorio*. Revista de sanidad y asistencia social. Instituto Nacional de Higiene. Venezuela. 341p
- MORGAN, E.D (2009). *Azadirachtin, a scientific gold mine*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17: 4096–4105
- MUHAMMAD, I. U., MOHD, Z. A., AMIRIN, S., ABDUL, M., ITEM, J. A., MOHAMED B., K. A. (2014). *Multi-constituent synergism is responsible for antiinflammatory effect of Azadirachta indica leaf extract*. Pharmaceutical Biology, 2: 11-14
- NOUR, A. H., Y SANDANASAMY, J. (2012). Larvicidal activity of extracts from different parts of Neem (Azadirachta indica) against Aedes Aegypti mosquitoes larvae. *Scientific Research and Essays*, 2810-2815.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD - OMS. (2014). *Boletín epidemiológico N° 9 de la situación del dengue en el mudo*. Disponible en: <http://www.salud.gob.ec/tag/dengue/> [accesado el 1 de enero del 2016]
- OMS. (2015). *Boletín epidemiológico de la situación del dengue en el Perú 2015*. Disponible en: <http://www.salud.gob.pe/tag/dengue-peru/>
- OMS/OPS. (1983). *Especificaciones generales para un insectario*. Bogotá. Colombia.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD - OPS. (2010). *Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de dengue*. Colombia.
- PARROTTA, J. (1994). *Azadirachta indica A. Juss. Neem, margosa*. Departamento de Agricultura. New Orleans. LA: USA
- PÉREZ, O., RODRÍGUEZ, J., BISSET, J., LEYVA, M., DIAZ, M., GONZALES, R., Y GARCÍA, I. (2004). *Manual de indicaciones técnicas para insectarios*. Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
- PÉREZ, C.; MARINA, C.; BOND, J.; ROJAS, J.; VALLE, J.; WILLIAMS, T. (2007). *Spinosad, a naturally-derived insecticide, for control of Aedes aegypti (Diptera: Culicidae): Efficacy, persistence and elicited oviposition response*. Journal of Medical Entomology. 44 (4): 631-638
- QUISPE-PRETEL, E., CARBAJAL-VILLAVARDE, A., GOZZER-FERNANDEZ, J., Y MORENO, B. (2014). Ciclo biológico y Tabla de Vida de Aedes aegypti, en laboratorio: Trujillo, Perú. *REBIOLEST*, 1(3).
- RAMOS, R. (2011). *Aceite de neem. Un insecticida ecológico para la Almería-España*. Disponible en: <http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/Neem/neem01.htm>
- RED LATINOAMERICANA DE CONTROL DE VECTORES. (2005). *Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie Aedes aegypti. Ciudad de Iguazú*. Disponible en: <https://www.mundosano.org/download/bibliografia/Protocolo%20para%20determinar%20susceptibilidad%20de%20insecticidas%20pa.pdf>

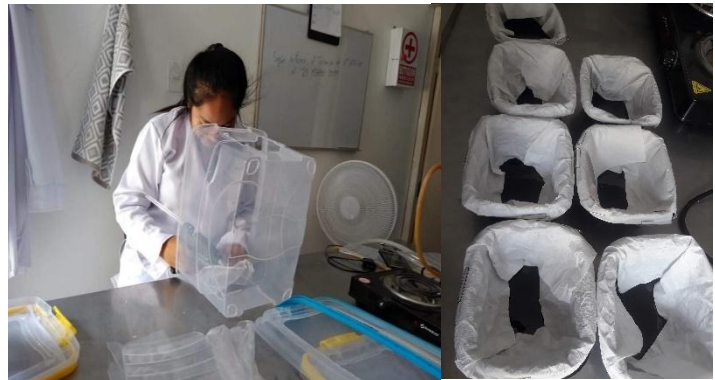
- REZENDE G.; MARTINS, A.; GENTILE, C.; FARMESI, L.; PELAJO-MACHADO, M.; PEIXOTO A.; VALLE, D (2008). *Embryonic desiccation resistance in Aedes aegypti: presumptive role of the chitinized serosal cuticle*. BMC Developmental Biology 8: 82.
- RODRÍGUEZ, M., BISSET, J., FERNANDEZ, D., Y PEREZ, O. (2014). Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54-60
- ROMERO, C., Y VARGAS, F. (2005). Extracción del aceite de la semilla de neem (*Azadirachta indica*). Disponible en: [http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S131520762005000400007&lng=es&nrm=i](http://www2.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131520762005000400007&lng=es&nrm=i). [accesado el 12 de abril del 2011]
- SANTACOLOMA, L., CHAVES, B., Y BROCHERO, H. (2012). Estado de la susceptibilidad de poblaciones naturales. *Biomédica*. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-41572012000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572012000300004&lng=es&nrm=iso&tlng=en)
- SOARES-PINHEIROA, V., DASSO-PINHEIROB, W., TRINDADE-BEZERRAC, J., Y TADEI, W. (2017). *Eggs viability of Aedes aegypti Linnaeus (Diptera, Culicidae) under different environmental and storage conditions in Manaus, Amazonas, Brazil*. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v77n2/1519-6984-bjb-1519-698419815.pdf>
- VALAREZO, O. (2012). Alternativas de manejo vectorial con *Azadirachta indica*. *Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)*. Disponible en: [http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Utilizacion\\_nim\\_Azadirachta\\_indica\\_generacion\\_transferencia\\_alternativas\\_manejo\\_Spoptera\\_f rugi](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Utilizacion_nim_Azadirachta_indica_generacion_transferencia_alternativas_manejo_Spoptera_f rugi)
- VILLAMIL, D., NARANJO, N., Y VAN, M. (2012). *Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (Azadirachta indica A. Juss) sobre Collaria scenica Stal (Hemiptera: Miridae)*. Entorno Brasiliis. Disponible en: <http://www.periodico.ebras.bio.b>
- VILLAMAR, J., Y MALUSIN, J. (2015). *Estudio de la acción larvicida del extracto etanólico de la Azadirachta indica contra el Aedes aegypti*. Tesis de pregrado de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Guayaquil. Facultad de Química. Guayaquil, Ecuador.

## ANEXOS

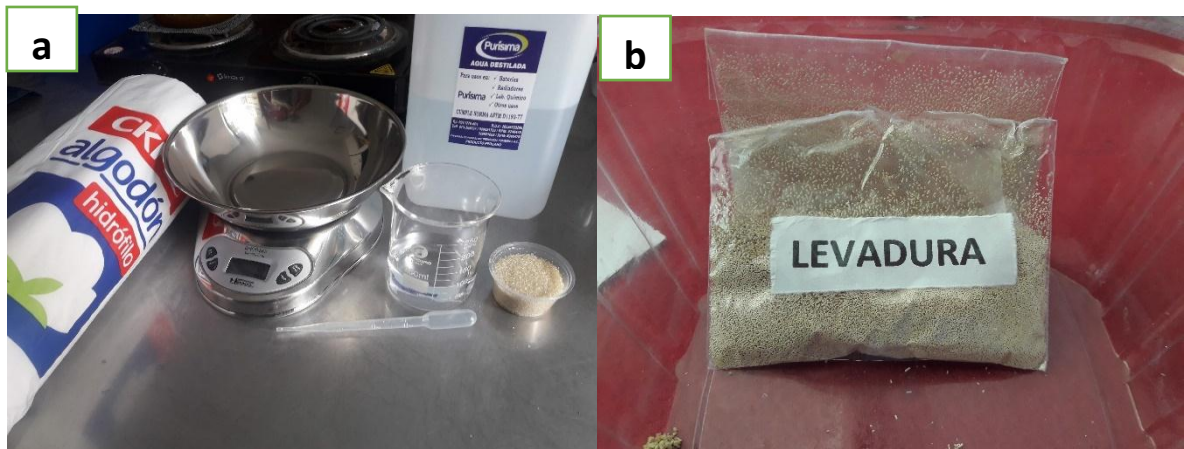
### Anexo 1: Galería de fotos



**Fig. 15:** Recolección de hojas de árboles de Neem

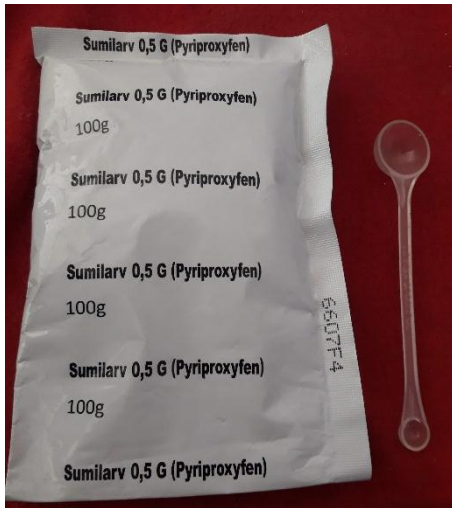


**Fig. 16:** Confección de cajas de crianza y ovitrampas

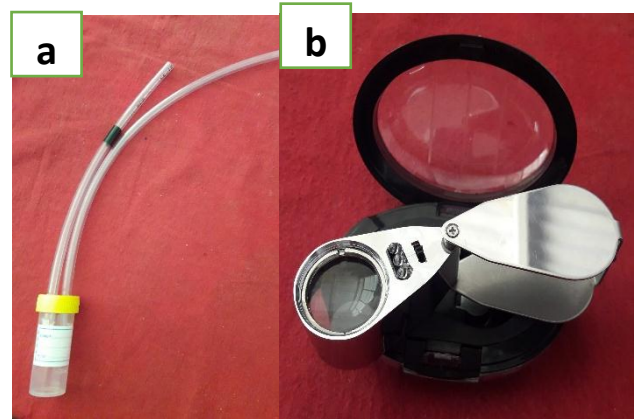


**Fig. 17. a)** Materiales e ingredientes para preparar el alimento de machos adultos de *A. aegypti*.  
**b)** Levadura para alimentar a las larvas.

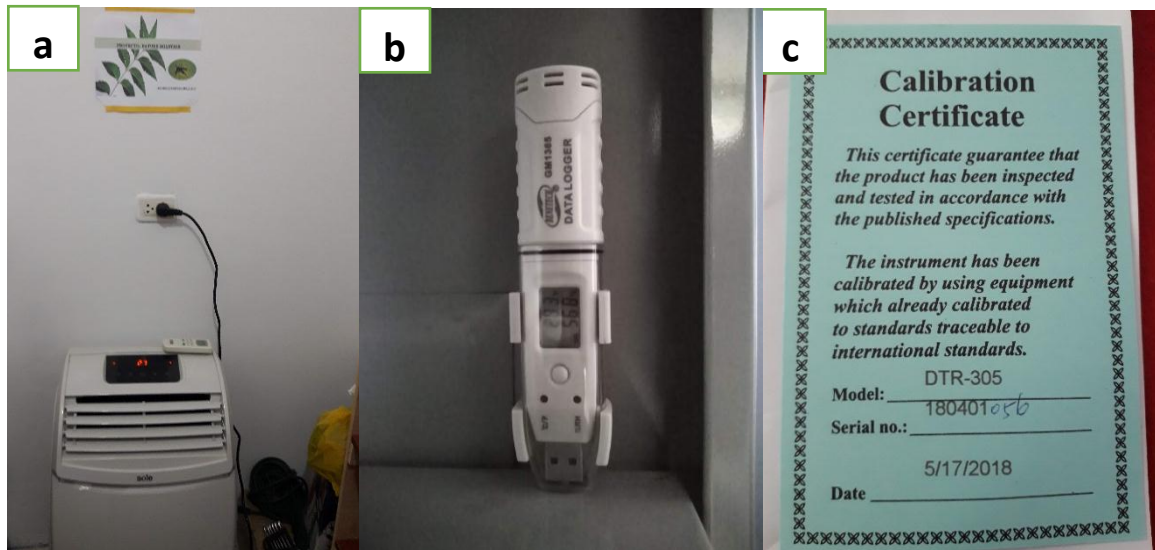




**Fig. 18.** Control positivo: Pyriproxyfen (Pyrilarv 0.5%) con su cucharita medidora de 0.1 g para aplicar a depósitos menores de 50 L



**Fig. 19.** a) Aspirador entomológico. b) Lupa entomológica



**Fig. 20.** a) Aire acondicionado marca Soler. b) RH/Temp Datalogger modelo DTR-305. c) Certificado de calibración del RH/Temp Datalogger modelo DTR-305.



**Fig. 21.** Hembra de *Aedes aegypti* después de alimentarse de sangre humana.



**Fig. 22.** Hembra de *A. aegypti* seleccionando el lugar para ovopositar



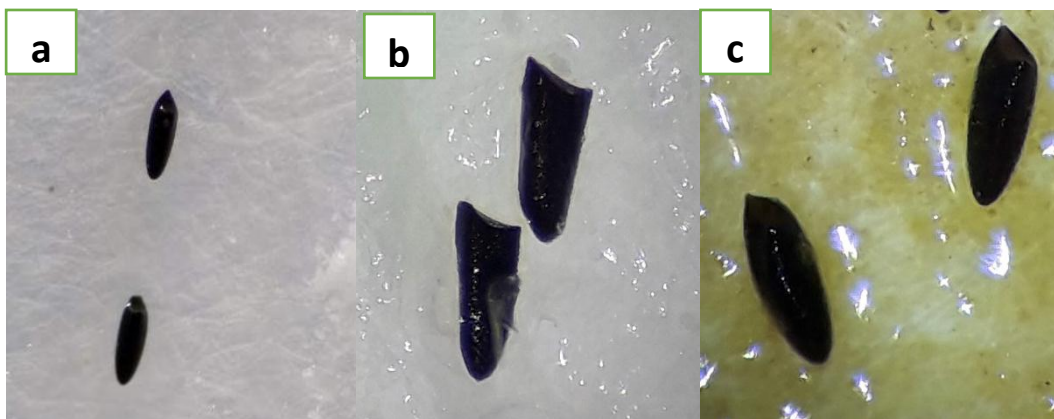
**Fig. 23** Huevos de *A. aegypti* en la ovitrampa colocados en las paredes del recipiente al borde de la superficie del agua.



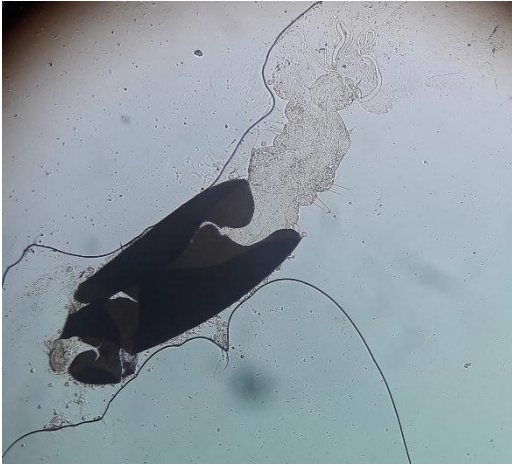
**Fig. 24:** Bioensayo con Huevos de *Aedes aegypti*



**Fig. 25:** Bioensayo con larvas del IV estadio de *Aedes aegypti*



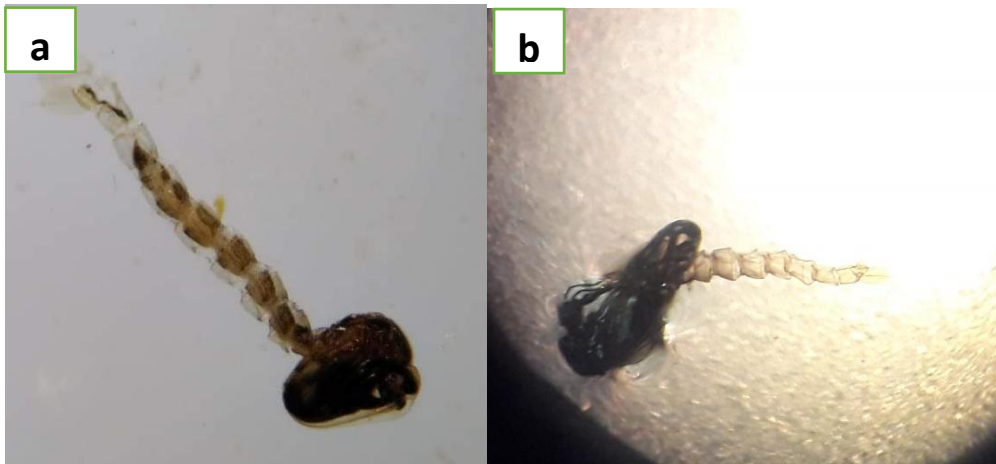
**Fig. 26.** a) Huevo eclosionado de *Aedes aegypti* del testigo. b) Huevo eclosionado de *Aedes aegypti* cometido a Piriproxyfen. c) Huevo eclosionado de *Aedes aegypti* sometido a la C<sub>3</sub> del extracto etanólico de Neem.



**Fig. 27.** Huevo aplastado para demostrar la presencia del embrión



**Fig. 28:** Pupas y adultos muertos que no emergieron procedentes de huevos que fueron expuestos al extracto de Neem de  $C_2$  Y  $C_3$



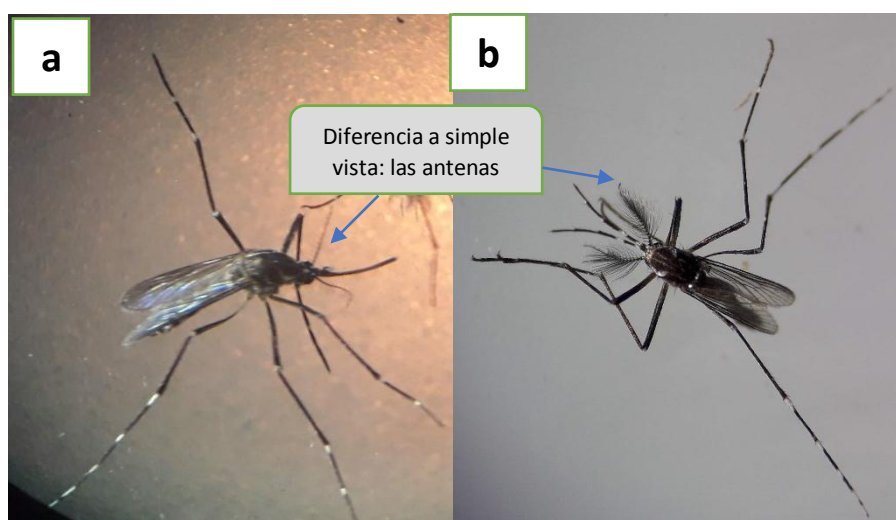
**Fig. 29.** a) Pupa muerta emergida de huevo expuesto a tratamiento  $C_3$ . b) Pupa que no pudo emerger a adulto, procedente de huevo expuesta a  $C_3$ .



**Fig.30.** Larvas muertas expuestas a tratamiento



**Fig. 31.** a) Larva de *A. aegypti* del testigo, b) Larva de *A. aegypti* sometida al control positivo. c) Larva de *A. aegypti* sometida a tratamiento de C<sub>3</sub>



**Fig. 32.** a) *A. aegypti* hembra adulto b) *A. aegypti* macho adulto

## Anexo 2

**Tabla 12.** Diseño experimental para evaluar el efecto del extracto etanólico de *Azadirachta indica* “neem” sobre la viabilidad del huevo y larva de *Aedes aegypti*.

GRUPO		RÉPLICAS	# HUEVOS	# LARVAS
TRATAMIENTOS	C <sub>1</sub> 0.0017 g/ml	1	20	20
		2	20	20
		3	20	20
	C <sub>2</sub> 0.0034 g/ml	1	20	20
		2	20	20
		3	20	20
	C <sub>3</sub> 0.0051 g/ml	1	20	20
		2	20	20
		3	20	20
CONTROL		1	20	20
		2	20	20
		3	20	20
TESTIGO		1	20	20
		2	20	20
		3	20	20
TOTAL			<b>300</b>	<b>300</b>

### Anexo 3

**Tabla 13.** Prueba estadística Tukey comparando Tiempo de eclosión de huevos de *Aedes aegypti*.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: número de huevos eclosionados						
HSD Tukey						
(I) semanas	(J) semanas	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Semana 1	Semana 2	-,93	,733	,585	-2,90	1,03
	Semana 3	,80	,733	,697	-1,17	2,77
	Semana 4	4,33*	,733	,000	2,37	6,30
Semana 2	Semana 1	,93	,733	,585	-1,03	2,90
	Semana 3	1,73	,733	,101	-,23	3,70
	Semana 4	5,27*	,733	,000	3,30	7,23
Semana 3	Semana 1	-,80	,733	,697	-2,77	1,17
	Semana 2	-1,73	,733	,101	-3,70	,23
	Semana 4	3,53*	,733	,000	1,57	5,50
Semana 4	Semana 1	-4,33*	,733	,000	-6,30	-2,37
	Semana 2	-5,27*	,733	,000	-7,23	-3,30
	Semana 3	-3,53*	,733	,000	-5,50	-1,57
Se basa en las medias observadas.						
El término de error es la media cuadrática (Error) = 4,033.						
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.						

Debido a que se rechazó la hipótesis de igualdad de medias entre cada una de las 4 semanas evaluadas, se realizó la prueba Tukey para compararlas entre ellas, hallándose diferencias significativas en la eclosión de huevos entre la semana 4 con la semana 1, la semana 2 y la semana 3, con un nivel de significancia de 0.000 entre todas ellas, demostrando que el mayor número de huevos eclosionados se produce en las tres primeras semanas.

**Tabla 14.** Prueba estadística de Tukey comparando el Tiempo de mortalidad de larvas de *Aedes aegypti*.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: NÚMERO DE LARVAS MUERTAS						
HSD Tukey						
(I) horas	(J) horas	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
0	12	,00	,243	1,000	-,80	,80
	24	-1,27*	,243	,000	-2,07	-,47
	36	-,13	,243	1,000	-,93	,67
	48	-1,20*	,243	,000	-2,00	-,40
	60	-,60	,243	,333	-1,40	,20
	72	-2,40*	,243	,000	-3,20	-1,60
	84	-,27	,243	,990	-1,07	,53
	96	-,53	,243	,513	-1,33	,27
	108	-,13	,243	1,000	-,93	,67
	120	-,27	,243	,990	-1,07	,53
12	0	,00	,243	1,000	-,80	,80
	24	-1,27*	,243	,000	-2,07	-,47
	36	-,13	,243	1,000	-,93	,67
	48	-1,20*	,243	,000	-2,00	-,40
	60	-,60	,243	,333	-1,40	,20
	72	-2,40*	,243	,000	-3,20	-1,60
	84	-,27	,243	,990	-1,07	,53
	96	-,53	,243	,513	-1,33	,27
	108	-,13	,243	1,000	-,93	,67
	120	-,27	,243	,990	-1,07	,53
24	0	1,27*	,243	,000	,47	2,07
	12	1,27*	,243	,000	,47	2,07
	36	1,13*	,243	,000	,33	1,93
	48	,07	,243	1,000	-,73	,87
	60	,67	,243	,194	-,13	1,47
	72	-1,13*	,243	,000	-1,93	-,33
	84	1,00*	,243	,003	,20	1,80
	96	,73	,243	,102	-,07	1,53
	108	1,13*	,243	,000	,33	1,93
	120	1,00*	,243	,003	,20	1,80
36	0	,13	,243	1,000	-,67	,93
	12	,13	,243	1,000	-,67	,93
	24	-1,13*	,243	,000	-1,93	-,33
	48	-1,07*	,243	,001	-1,87	-,27
	60	-,47	,243	,702	-1,27	,33



	72	-2,27*	,243	,000	-3,07	-1,47
	84	-,13	,243	1,000	-,93	,67
	96	-,40	,243	,858	-1,20	,40
	108	,00	,243	1,000	-,80	,80
	120	-,13	,243	1,000	-,93	,67
48	0	1,20*	,243	,000	,40	2,00
	12	1,20*	,243	,000	,40	2,00
	24	-,07	,243	1,000	-,87	,73
	36	1,07*	,243	,001	,27	1,87
	60	,60	,243	,333	-,20	1,40
	72	-1,20*	,243	,000	-2,00	-,40
	84	,93*	,243	,009	,13	1,73
	96	,67	,243	,194	-,13	1,47
	108	1,07*	,243	,001	,27	1,87
	120	,93*	,243	,009	,13	1,73
	60	0	,60	,243	,333	-,20
12		,60	,243	,333	-,20	1,40
24		-,67	,243	,194	-1,47	,13
36		,47	,243	,702	-,33	1,27
48		-,60	,243	,333	-1,40	,20
72		-1,80*	,243	,000	-2,60	-1,00
84		,33	,243	,953	-,47	1,13
96		,07	,243	1,000	-,73	,87
108		,47	,243	,702	-,33	1,27
120		,33	,243	,953	-,47	1,13
72		0	2,40*	,243	,000	1,60
	12	2,40*	,243	,000	1,60	3,20
	24	1,13*	,243	,000	,33	1,93
	36	2,27*	,243	,000	1,47	3,07
	48	1,20*	,243	,000	,40	2,00
	60	1,80*	,243	,000	1,00	2,60
	84	2,13*	,243	,000	1,33	2,93
	96	1,87*	,243	,000	1,07	2,67
	108	2,27*	,243	,000	1,47	3,07
	120	2,13*	,243	,000	1,33	2,93
	84	0	,27	,243	,990	-,53
12		,27	,243	,990	-,53	1,07
24		-1,00*	,243	,003	-1,80	-,20
36		,13	,243	1,000	-,67	,93
48		-,93*	,243	,009	-1,73	-,13
60		-,33	,243	,953	-1,13	,47
72		-2,13*	,243	,000	-2,93	-1,33

	96	-,27	,243	,990	-1,07	,53	
	108	,13	,243	1,000	-,67	,93	
	120	,00	,243	1,000	-,80	,80	
96	0	,53	,243	,513	-,27	1,33	
	12	,53	,243	,513	-,27	1,33	
	24	-,73	,243	,102	-1,53	,07	
	36	,40	,243	,858	-,40	1,20	
	48	-,67	,243	,194	-1,47	,13	
	60	-,07	,243	1,000	-,87	,73	
	72	-1,87*	,243	,000	-2,67	-1,07	
	84	,27	,243	,990	-,53	1,07	
	108	,40	,243	,858	-,40	1,20	
	120	,27	,243	,990	-,53	1,07	
	108	0	,13	,243	1,000	-,67	,93
		12	,13	,243	1,000	-,67	,93
24		-1,13*	,243	,000	-1,93	-,33	
36		,00	,243	1,000	-,80	,80	
48		-1,07*	,243	,001	-1,87	-,27	
60		-,47	,243	,702	-1,27	,33	
72		-2,27*	,243	,000	-3,07	-1,47	
84		-,13	,243	1,000	-,93	,67	
96		-,40	,243	,858	-1,20	,40	
120		-,13	,243	1,000	-,93	,67	
120	0	,27	,243	,990	-,53	1,07	
	12	,27	,243	,990	-,53	1,07	
	24	-1,00*	,243	,003	-1,80	-,20	
	36	,13	,243	1,000	-,67	,93	
	48	-,93*	,243	,009	-1,73	-,13	
	60	-,33	,243	,953	-1,13	,47	
	72	-2,13*	,243	,000	-2,93	-1,33	
	84	,00	,243	1,000	-,80	,80	
	96	-,27	,243	,990	-1,07	,53	
	108	,13	,243	1,000	-,67	,93	
Se basa en las medias observadas.							
El término de error es la media cuadrática (Error) = .442.							
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.							

Al comparar las medias de la variable Tiempo (horas), se encontraron diferencias significativas (Sig.=0,000) entre las 0 h y las 24h, y entre las 48h y 72h; así mismo, la mayor cantidad de diferencias significativas (Sig.=0,000) se encontraron en las 24h, 48 h y 72 h, siendo las 72 h la que tiene diferencias significativas con todas las demás (Sig.=0,000).

## Anexo 4

**Tabla 15.** Fecha de ejecución de los tratamientos testeados

<b>HUEVOS</b>		<b>LARVAS</b>	
<b>REPETICIÓN</b>	<b>FECHA</b>	<b>REPETICIÓN</b>	<b>FECHA</b>
1era repetición	01/03/2019	1era repetición	13/03/2019
2da repetición	12/03/2019	2da repetición	25/03/2019
3era repetición	15/04/2019	3era repetición	15/04/2019
4ta repetición	02/05/2019	4ta repetición	06/05/2019

## **Anexo 5: Documentos utilizados**

### **5.1. Especificaciones para un insectario OMS, 1983.**

En esta guía se ha resumido la experiencia para presentar con practicidad, los puntos sobre la cría y reproducción de la especie *Aedes aegypti*. Asimismo, se presentan recomendaciones para un mejor aprovechamiento del material biológico colectado a través de ovitrampas, considerando las necesidades e insumos usados actualmente por los programas de control.

Disponible en:

<http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/GuiaInstalacionMantenimientoInsectario.pdf>

### **5.2. Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia a insecticidas de mosquitos de la especie *Aedes aegypti*, propuesto por la Red Latinoamericana de control de Vectores, 2005.**

Este documento es un protocolo para la determinación de susceptibilidad o resistencia a insecticidas discutido en un Taller de expertos de Colombia, Cuba, Brasil, Argentina y de la Organización Mundial de la Salud realizado en la Ciudad de Iguazú el 23 de octubre de 2004. Este Taller fue convocado por la RELCOV (Red Latinoamericana en Control de Vectores) y su objetivo fue definir un protocolo que aúne criterios para la evaluación de la susceptibilidad y resistencia a insecticidas en *Aedes aegypti* en América Latina. Como consecuencia de dicha reunión se elaboró el Protocolo basado en las metodologías existentes para la evaluación de efectividad de insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti* establecidas por OMS y/o en uso en Argentina, Brasil y Cuba.

Disponible en:

<https://www.mundosano.org/download/bibliografia/Protocolo%20para%20determinar%20susceptibilidad%20de%20insecticidas%20pa.pdf>