

SOCIEDAD ENTOMOLÓGICA D

 **LXI** **CONVENCIÓN NACIONAL D**
NACIONAL D

PREMIO

JOSÉ MARIANO LAMAS CARRERA

 **Universidad Nacional de Piura**
Facultad de Ciencias
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas 

TESIS DE PREGRADO

**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**

AUTORES:

Expositora: Blga. Pamela Milagros Morante Silva

Asesora: Blga. Claudia del Pilar Ruíz González

Asesor: Blgo. Néstor Humberto Atarama Montero




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 son de vida acuática y la fase final es el adulto de vida aérea. Es de hábitos principalmente urbanos domésticos, diurnos, y antropofílicos, y es 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 solo en casos de dengue del 55,6 % del 2016 al año 2017 (Dirección Regional de Salud [DIRESA], 2018).

Actualmente, el MINSA ha tomado medidas para el control de la proliferación de este insecto vector, intensificando las campañas de Vigilancia y Control Vectorial las cuales se basan en la eliminación de los criaderos potenciales de reproducción, el saneamiento y la limpieza de los lugares en donde se encuentren aguas estancadas y cualquier depósito en donde estos puedan crecer; y, el uso de agentes insecticidas (Rodríguez, et al. 2014). Entre los insecticidas utilizados están los insecticidas químicos como el temefós que está siendo reemplazado por el Piriproxyfen.



Ahora, se está evaluando el uso de insecticidas de origen biológico, como el árbol del Neem (*Azadirachta indica*), el cual ha sido usado desde hace siglos en la lucha contra las plagas, y en las dos últimas décadas su interés se ha generalizado por todo el mundo, obteniéndose numerosos preparados a partir de uno o más principios activos. Además, 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).



OBJETIVO

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.



METODOLOGÍA

1. UBICACIÓN DEL INSECTARIO



Sector San Pedro, ciudad de Piura-Perú; de coordenadas 5°12'05"S 80°38'23"O

Acondicionado según normativas nacionales e internacionales de la OPS y OMS en Especificaciones para un insectario (1983).

2. DESCRIPCIÓN DEL INSECTARIO:



Cubículo 1: Adultos y pupas



Cubículo 2: huevos y larvas

TEMPERATURA: $25^{\circ} \pm 3^{\circ}$
HUMEDAD RELATIVA: 60 %

3. PROCEDENCIA DEL MATERIAL BIOLÓGICO Y ESTABLECIMIENTO DE LA COLONIA EXPERIMENTAL



Área de Vigilancia y Control
Vectorial DIRESA-Piura

4. MANEJO CICLO BIOLÓGICO DE *Aedes aegypti*

4.1 LARVAS

Quispe-Pretel et al. (2014)

4.1.1 EL ESPACIO VITAL Y AGUA DEL RECIPIENTE



Bandeja de 750 cm³ con larvas

Pérez et al. (2004), emplea bandejas de 625 cm³ para 500 a 700 larvas en 2 litros de agua.

500 larvas. _____

Así se colocaron como máximo 200 larvas por cada bandeja de 750 cm³ con 800 ml de agua de clorada

4.1.2 LA CANTIDAD DE ALIMENTO

Pérez et al. (2004), menciona 0.3 mg de alimento por larva en los primeros estadios y 0.6 mg en toda su vida larval

$$200 \text{ larvas} \times 0.3 \text{ mg} = 60 \text{ mg}$$

$$200 \text{ larvas} \times 0.6 = 120 \text{ mg}$$



4.2 PUPAS



4.3 ADULTOS:



Tubo capturador



Cajas de crianza



ovitrampas

4.3.1 ALIMENTACIÓN

ALIMENTACIÓN DE MACHOS



Algodones con solución de azúcar

ALIMENTACIÓN DE HEMBRAS



4.4 HUEVOS:



Explorando la ovitrampa



Puesta de huevos



Bandejas con huevos

5. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

1



Colecta de hojas amarillas de *Azadirachta indica* A. Juss 1830

2



Se pesaron 1000g de hojas amarillas, luego se procedió a lavarlas dos veces con agua destilada para remover partículas adheridas.

3



Se dejó secar el material colectado al aire durante 24 horas y posteriormente la muestra fue molinada durante 10 minutos con un equipo Magic Bullet.

4



Se colocó en frascos topacio con 250 ml de etanol, para macerar por 7 días

5



Primer filtrado para retener las partículas más grandes.

6



Segundo filtrado, con sistema al vacío con un filtro de membrana de poro 0.45 μm .

7



Se colocó sobre una placa Petri y por 72 h se dejó evaporar el alcohol.

6. PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN Y BIOENSAYO

1



Extracto solidificado en la placa

2



Pesado en balanza analítica

3



Vertido en el agua declorada de las larvas

Disoluciones en los tres tratamientos de extracto etanólico de "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 ₁)	0.0034 g/ml (C ₂)	0.0051 g/ml (C ₃)

GRUPO		RÉPLICAS	# HUEVOS	# LARVAS
TRATAMIENTOS	C ₁ 0.0017 g/ml	1	20	20
		2	20	20
		3	20	20
	C ₂ 0.0034 g/ml	1	20	20
		2	20	20
		3	20	20
	C ₃ 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			300	300

Control positivo (P) expuesto a 0.1 g de Pyriproxyfen (Pyrilarv 0.5%)



Protocolo para determinar la susceptibilidad o resistencia de *Aedes aegypti* a insecticidas, propuesto por la Red Latinoamericana de control de Vectores (2005)



Bioensayo con Huevos de *Aedes aegypti*

Bioensayo con larvas del IV estadio de *Aedes aegypti*



RESULTADOS

ANALISIS DE VARIANZA

PRUEBA DE TUKEY

HUEVOS

Se cuantificó el N° de huevos viables (Ecllosionados) semanalmente durante 4 semanas.

LARVAS

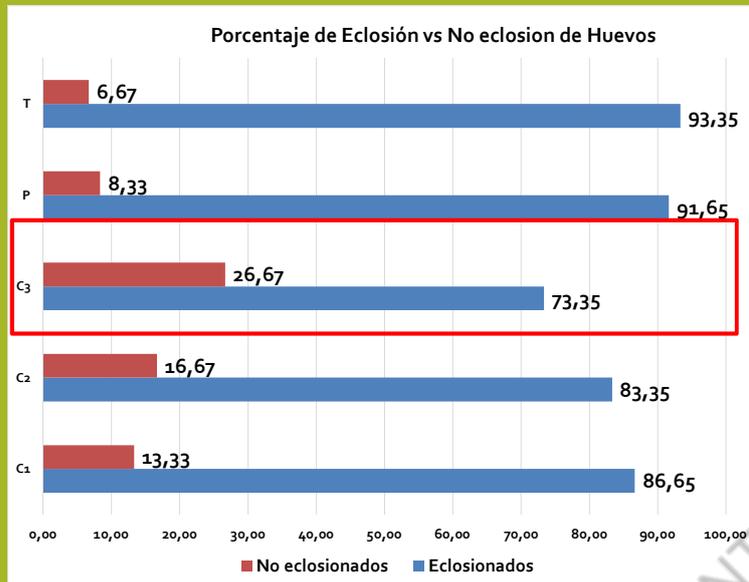
Se cuantificó el N° de larvas no viables (mortalidad) cada 12 horas durante 120 horas.

Promedio acumulado de la ecllosion de huevos de *Aedes aegypti* durante 4 semanas.



La ecllosion con la C3 fue más lenta pues en las primeras semanas tuvo promedio bajo comparada con los demás tratamientos.

Porcentaje de huevos eclosionados y no eclosionados en 4 semanas.



Todos los tratamientos tuvieron % de eclosión mayores del 70%

C3 presentó 26.67% de no eclosión, seguido de C2 con 16.67% y C1 con 13.33%

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 ^a	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)

Diferencia de medias de las Concentraciones estadísticamente NO significativa

Huevos eclosionados de *Aedes aegypti* sometidos a tratamientos.



a) Huevo eclosionado de *Aedes aegypti* del Testigo.



b) Huevo eclosionado de *Aedes aegypti* sometido a Piriproxyfen.



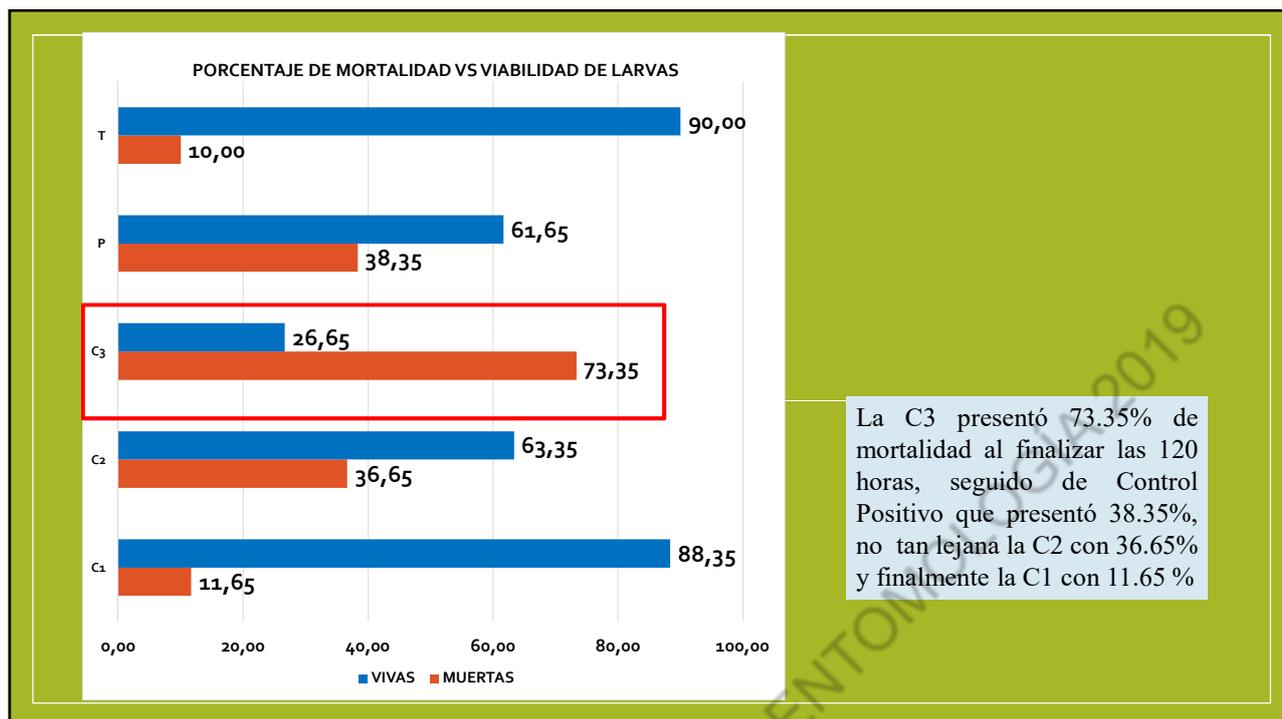
c) Huevo eclosionado de *Aedes aegypti* sometido a la C3 del extracto etanólico de Neem.

LARVAS

Promedio acumulado de la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti*.



Se evidenció mayores promedios de mortalidad con la C3, seguida de la C2. Además C3 presentó muerte a las 24 horas y C2 a las 36 horas de expuestos, mientras que el Control Positivo a las 48 horas



Análisis de Varianza para la mortalidad de larvas de *A. aegypti*

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 ^a	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)

Diferencia de medias de las Concentraciones estadísticamente SI significativa

PRUEBA TUKEY PARA COMPARAR TRATAMIENTOS

Comparaciones múltiples: HSD Tukey						
Variable dependiente: NUMERO DE LARVAS MUERTAS						
(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

DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS ENTRE LARVAS MUERTAS DE *Aedes aegypti* SOMETIDAS A TRATAMIENTOS

a) Larva muerta de *A. aegypti* del testigo.



b) Larva muerta de *A. aegypti* sometida al control positivo.



c) Larva muerta de *A. aegypti* sometida a tratamiento de C3

DISCUSIÓN

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, obtuvo porcentajes de mortalidad en larvas de *A. aegypti* del 35%, 60%, 70% y 85% respectivamente a las 72 horas. Además, **Villamar y Malusin (2015)** con larvas de *A. aegypti* con concentraciones de 0.001 g/mL, 0.002 g/mL y 0.005 g/mL de extracto etanólico de *A. indica*, observaron una mayor mortalidad de las larvas (93%) a las 72 horas en el extracto 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%.

No coincidimos en porcentajes con Muhammad pues tuvo concentraciones mucho mas elevadas. Sin embargo, las concentraciones de Villamar y Malusin son casi las mismas, así se obtuvo a las 72 horas con la C3 de 0.005 g/ml 71.65%, con la C2 de 0.0034 g/ml el 30%, muriendo desde las 24 h y 36 h respectivamente.

Hertlein et al. (2010) evaluaron los efectos ovicidas y larvicidas del bioinsecticida spinosad en *A. aegypti* y *Anopheles stephensi* a Cc 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 efecto ovicida intermedio para Anopheles (no eclosión de 28.6%, 42.3% y 52.9%), Además, la mortalidad de larvas del 100% en las tres Cc demostrando que su potencial reside en su efecto larvicida más que en su actividad ovicida.

Se coincide con la postura del autor, al tratarse de *A. a* en esta investigación se encontró promedios de eclosión bajos sin embargo, hallamos un ligero retraso en el tiempo de eclosión.

Mirsa (2002) 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.

No se observó diferencia en la forma de eclosión de los huevos de *Aedes aegypti*, y si comprobamos que los huevos que no eclosionaban estuviesen fecundados.



Huevo aplastado para demostrar la presencia del embrión

Las 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. **(Rezende et al., 2008)**

Concluimos que dada la misma naturaleza lipídica del neem este pudo ligeramente filtrarse ligeramente por la cutícula del huevo de *Aedes aegypti* de nuestro experimento, mostrándose consecuencias en el transcurso de sus posteriores etapas evolutivas.

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; en 4 semanas de exposición.
- 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; en 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.



ANEXOS

López y Estrada (2011)

Los componentes naturales del neem tienen función de Regulador de Crecimiento con acción insecticida:

- Los insectos retardan o inhiben su alimentación.
- Interfiere en los procesos de mudas
- La exuvia se queda adherida al abdomen y patas, lo que impide el correcto desarrollo del insecto, que muere en el intento de liberarse de su muda.



a) Pupa muerta emergida de huevo expuesta a C3. b) Pupa que no pudo emerger a adulto, procedente de huevo expuesta a C3.

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.

La hembra procedente de huevos expuestos a C3 de Neem no cumple con las condiciones para poder alimentarse, llegando a morir.





RECOMENDACIONES



- Continuar en esta línea de investigación para ampliar y profundizar aún más los resultados sobre el neem, con los estadios de huevo, además de pupa y adulto, ya que es indispensable atacar al vector desde sus principales estadios inmaduros.
- Mejorar la purificación del extracto etanólico y aislar a los terpenos para que su actividad larvicida sea más efectiva
- 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.
- Hacer pruebas primero en laboratorio y luego en campo con el mismo extracto, con otros géneros de culicidos como *Culex* y *Anopheles*, este último vector de la malaria, tanto en estadios inmaduros como con el vector en vuelo.

SOCIEDAD ENTOMOLÓGICA DEL PERÚ



LXI **CONVENCIÓN NACIONAL DE ENTOMOLOGÍA**



Ing. FAUSTO ROBLES RODRÍGUEZ



GRACIAS

Blga. Pamela Milagros Morante Silva
pamela_07_5@outlook.com

LXI CONVENCIÓN NACIONAL DE ENTOMOLOGÍA