

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

Evaluación del efecto de dos concentraciones del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de garrapatas en bovinos.

POR

Idalia Nataly Majano Velis

Ciudad Universitaria 31 de octubre del 2017



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

Evaluación del efecto de dos concentraciones del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de garrapatas en bovinos.

POR

Idalia Nataly Majano Velis

Ciudad Universitaria 31 de octubre del 2017

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

Evaluación del efecto de dos concentraciones del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de garrapatas en bovinos.

POR

Idalia Nataly Majano Velis

REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE:  
Licenciada en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

MSc. Roger Armando Arias Alvarado

---

RECTOR

Lic. Cristóbal Hernán Ríos Benítez

---

SECRETARIO GENERAL

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

Ing. Agr. MSc. Juan Rosa Quintanilla Quintanilla

---

DECANO

Ing. Agr. MSc. Luís Fernando Castaneda Romero

---

SECRETARIO

Ing. Agr. Ludwing Vladimir Leyton Barrientos  

---

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

DOCENTES DIRECTORES

Ing. Agr. Carlos René Platero Montoya

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza

Ing. Agr. Enrique Alonso Alas García  

---

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN

## **Evaluación del efecto de dos concentraciones de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de garrapatas en bovinos**

### **RESUMEN**

Se evaluó el efecto de dos concentraciones del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) al 0.5% y 2% en el control de garrapatas en bovinos. El estudio se realizó en el municipio de Armenia del departamento de Sonsonate con una duración de siete meses que comprende desde enero hasta julio del 2017. Se seleccionaron quince bovinos mestizos con fines productivos de doble propósito divididos en tres grupos. A cada animal le fue establecida la carga parasitaria previa a la aplicación de los tratamientos. A un grupo se le aplicó una solución acuosa del extracto de semilla de Neem con una concentración del 0.5%, al segundo grupo le fue aplicada una solución al 2% y se llevó un grupo control al que se le aplicó únicamente agua desmineralizada, se realizaron dos aplicaciones a intervalos de diez días, la aplicación se realizó en la totalidad del cuerpo del animal con el uso de una bomba de aspersión dirigida. La variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad, se realizaron tres conteos después de cada aplicación del producto a intervalos de veinticuatro horas, las zonas corporales donde se realizaron los conteos de las garrapatas son la tabla del cuello, el área pectoral ventral y la parte medial de los muslos en ambos lados del cuerpo del animal, con marcador se delimitaron 100 cm<sup>2</sup> a cada lado de manera simétrica. Para obtener el extracto se utilizó semilla de Neem recolectada en la Estación Experimental y de Prácticas de la Universidad de El Salvador ubicada en el departamento de La Paz. El proceso de extracción se realizó en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. Este proceso se realizó con el método de reflujo con el uso de etanol como solvente, se filtró y con uso de rotaevaporador se separó el extracto del solvente. El diseño estadístico fue bloques completos al azar con cinco repeticiones. Los datos fueron procesados por medio del Software para análisis estadístico InfoStat estudiantil versión 2016, a estos se les realizó una transformación logarítmica base diez ( $\text{Log}^{10}$ ) y se analizaron con la prueba estadística de Contrastes ortogonales con un nivel de confianza del 5%. Las dos concentraciones de extracto etanólico de semilla de Neem presentaron efectos letales sobre las garrapatas en los bovinos, sin embargo estadísticamente los tratamientos con 0.5% y 2% no produjeron diferencias significativas en su efecto en la mortalidad de garrapatas en bovinos ( $P=0.0941$ ). El tratamiento que presentó el costo más bajo fue el T1 con una concentración del 0.5% del extracto etanólico de semilla de Neem.

Palabras clave: Neem, azadiractina, extracto etanólico, garrapatas, bovinos.

**Evaluation of the effect of two concentrations of ethanolic Neem seed extract  
(*Azadirachta indica* A. Juss) on the control of ticks in cattle.**

**SUMMARY**

The effect of two concentrations of ethanolic extract of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) at 0.5% and 2% in the control of ticks in cattle was evaluated. The study was carried out in the municipality of Armenia, department of Sonsonate whit Seven months from January to July 2017. Fifteen crossbreed cattle were selected for dual-purpose productive purposes, divided into three groups. Each animal was the parasite load was established prior to the application of the treatments. One group was applied an aqueous solution of the ethanolic extract of Neem seed with a concentration of 0.5%, to the second group was applied a solution to the 2% and a control group was taken, to which only demineralized water was applied, two applications were carried out at intervals of ten days, the ap Was performed on the whole body of the animal with the use of a directed spray pump. The response variables were the mortality rate, three counts were made after each application of the product at intervals of twenty four hours, the corporal zones where the counts of the ticks were realized are the table of the neck, the ventral area And the medial part of the thighs on both sides of the animal's body, with a marker 100 cm<sup>2</sup> was delimited on each side in a symmetrical way. To obtain the extract, Neem seed was harvested in the Experimental Station and Of Practices of the University of El Salvador located in the City Tecualuya of the department of La Pa The extraction process was carried out in the Natural Products Research Laboratory of the Faculty of Chemistry and Pharmacy of the University of El Salvador. This process was carried out using the reflux method with the use of ethanol as a solvent, I used a rotavaporator to separate the extract from the solvent. The randomized complete block statistical design was used with five replicates. The data obtained were processed using the Statistical Analysis Software for Student InfoStat version 2016, to the data were made a logarithmic base ten transformation, the data obtained using the statistical test of Orthogonal contrasts were performed and a confidence level of 5% was used. The two concentrations of ethanolic Neem seed extract presented lethal effects on ticks in cattle, however, statistically the treatments with 0.5% and 2% did not produce significant differences in their Effect on tick mortality in cattle with (P=0.0941). Treatment Or that presented the best cost was T1 with a concentration of 0.5% of the ethanolic extract of Neem seed.

Key words: Neem, azadirachtin, ethanolic extract, ticks, cattle.

## ÍNDICE GENERAL

1.	Introducción .....	1
2.	Revisión de bibliográfica .....	3
2.1.	Descripción botánica y ecológica del Neem .....	3
2.2.	Origen y distribución.....	3
2.3.	Descripción de la especie.....	3
2.4.	Requerimientos ambientales .....	3
2.5.	Contenido de tóxicos en el Neem .....	4
2.6.	Uso del Neem como bioinsecticida.....	4
2.7.	Efecto sobre las plagas .....	5
2.8.	Mecanismo de acción.....	6
2.9.	Garrapatas .....	6
2.10.	Importancia .....	7
2.11.	Ciclo de vida.....	7
2.12.	Sistema endocrino de invertebrados .....	8
2.13.	Extracto de plantas.....	8
2.14.	Extracción sólido líquido.....	8
2.15.	Disolvente de extracción .....	9
2.16.	Maceración de una muestra vegetal para extracción.....	9
3.	Materiales y métodos .....	10
3.1.	Metodología de campo I .....	10
3.1.1.	Recolección del material vegetal .....	10
3.2.	Metodología de laboratorio .....	10
3.2.1.	Obtención de los extractos .....	10
3.2.2.	Identificación de la azadiractina por cromatografía de capa fina.....	11
3.2.3.	Determinación de la concentración del extracto de Neem a utilizar .....	11
3.3.	Metodología de campo II .....	12
3.3.1.	Elaboración de las soluciones para el estudio .....	12
3.3.2.	Determinación de la carga parasitaria previo a la primera aplicación.....	13
3.3.3.	Aplicación de las diferentes concentraciones del extracto .....	13
3.3.4.	Conteo de garrapatas post aplicación del producto .....	13
3.4.	Metodología estadística.....	14
4.	Resultados y discusión .....	15
4.1.	Característica del fruto y semilla.....	15
4.2.	Extracto etanólico.....	15
4.3.	Identificación de azadiractina .....	15
4.4.	Carga parasitaria.....	15
4.5.	Efecto de los extractos sobre las unidades experimentales.....	15
4.6.	Análisis económico.....	25

5. Discusión .....	28
6. Conclusiones .....	31
7. Recomendaciones .....	32
8. Bibliografía .....	33
9. Anexos.....	36

#### NDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Rendimiento obtenido y concentración de azadiractina en el Neem determinada por HPLC .....	5
Cuadro 2: Porcentaje de mortalidad de garrapatas tabla del cuello (Primera aplicación) ..	16
Cuadro 3: Porcentaje de mortalidad de garrapatas tabla del cuello (Segunda aplicación)	18
Cuadro 4: Porcentaje de mortalidad de garrapatas área pectoral (Primera aplicación) ....	19
Cuadro 5: Porcentaje de mortalidad de garrapatas área pectoral (Segunda aplicación) ..	21
Cuadro 6: Porcentaje de mortalidad de garrapatas miembros posteriores (Primera aplicación) .....	22
Cuadro 7: Porcentaje de mortalidad de garrapatas miembros posteriores (Segunda aplicación) .....	23
Cuadro 8: Costo de la materia prima .....	25
Cuadro 9: Costo de elaboración del extracto por cada tratamiento (\$)..	26

#### INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de la azadiractina .....	4
Figura 2: Mortalidad de garrapatas en la tabla del cuello (primera aplicación) .....	17
Figura 3: Mortalidad de garrapatas tabla del cuello (segunda aplicación) .....	18
Figura 4: Mortalidad de garrapatas área pectoral (primera aplicación).....	20
Figura 5: Mortalidad de garrapatas área pectoral (segunda aplicación) .....	21
Figura 6: Mortalidad de garrapatas en miembros posteriores (primera aplicación) .....	23
Figura 7: Mortalidad de garrapatas en miembros posteriores (segunda aplicación).....	24
Figura 8: Fluctuación de la población de garrapatas en la tabla del cuello.....	25
Figura 9: Fluctuación de la población de garrapatas en el área pectoral.....	25
Figura 10: Fluctuación de la población de garrapatas en miembros posteriores .....	25
Figura 11: Eficiencia de los tratamientos en cuanto a número de garrapatas .....	27

#### INDICE DE ANEXOS

Cuadro A-1: Carga parasitaria inicial (CPI) y carga parasitaria Final (CPF). .....	36
Cuadro A-2: Matriz de datos recopilados .....	36

Cuadro A-3: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en la tabla del cuello (Primera aplicación) .....	38
Cuadro A-4: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en la tabla del cuello (Primera aplicación).....	38
Cuadro A-5: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en la tabla del cuello (Segunda aplicación).....	38
Cuadro A-6: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en la tabla del cuello (Segunda aplicación) .....	38
Cuadro A-7: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en área pectoral (Primera aplicación) .....	39
Cuadro A-8: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en área pectoral (Primera aplicación) .....	39
Cuadro A-9: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en área pectoral (Segunda aplicación) .....	39
Cuadro A-10: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en área pectoral (Segunda aplicación) .....	39
Cuadro A-11: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable sobre la variable Carga parasitaria en miembros posteriores (Primera aplicación).....	40
Cuadro A-12: Contrastes Ortogonales sobre la variable sobre la variable Carga parasitaria en miembros posteriores (Primera aplicación).....	40
Cuadro A-13: Análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en miembros posteriores (Segunda aplicación) .....	40
Cuadro A-14: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en miembros posteriores (Segunda aplicación).....	40
Figura A-1: Cosecha de la semilla .....	41
Figura A-2: Proceso de elaboración del extracto etanólico de semilla de Neem .....	41
Figura A-3: Identificación de la azadiractina por cromatografía de capa fina.....	41
Figura A-4: Elaboración de las soluciones del extracto .....	42
Figura A-5: Delimitación de las regiones anatómicas para toma de muestras .....	42
Figura A-6: Aplicación de las diferentes concentraciones del extracto .....	42
Figura A-7: Apariencia física del extracto etanólico de semilla de Neem.....	43
Figura A-8: Revelado Cromatográfico para determinación de azadiractina.....	43

## 1. Introducción

En El Salvador existe la problemática del combate a las garrapatas que afecta económicamente a los productores pecuarios debido a que éstas provocan retraso en el crecimiento de los animales y baja en la producción, ya sea de pie de cría, leche, carne, piel (Cruz *et al.* 2009) y trabajo animal, además de servir de vectores del agente causal de enfermedades como anaplasmosis y babesiosis (Hurtado *et al.* 2015), cuya prevalencia induce a los productores a incurrir en gastos para dar tratamiento a los animales enfermos a pesar de que no se garantiza su supervivencia, por lo anterior se incrementan los costos de producción lo cual resulta desalentador para los productores que se ven obligados a sacar al mercado productos más caros. La aplicación de acaricidas químicos es la medida de uso más habitual para la prevención y el control de estos ectoparásitos, lo cual presenta ciertos inconvenientes, como la generación de garrapatas resistentes, la aparición de residuos químicos en la carne y la leche o la contaminación del medio ambiente (Felgueroso 2010). Se considera que resultados positivos de esta investigación podría dar pie a nuevos proyectos agroindustriales para hacer un uso eficiente del recurso que ya se cultiva en el país y así presentar productos que favorezcan el combate contra las garrapatas de forma eficiente, aprovechando el material que se cultiva en el país y sin contaminar el medio ambiente.

Se evaluó el efecto de dos concentraciones del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) al 0.5% y al 2% en el control de garrapatas en bovinos, el extracto utilizado se obtuvo en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de El Salvador usando el método de reflujo y rotaevaporador, en los extractos utilizados se identificó la presencia de azadiractina mediante el método colorimétrico de capa fina, con la finalidad de garantizar la presencia del componente al que se le atribuye la propiedad tóxica sobre los artrópodos, al igual que lo hizo Arias *et al.* (2009), en Venezuela que determinó la presencia de Azadiractina en los aceites esenciales obtenidos del árbol de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) quien lo hizo por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Las unidades experimentales fueron bovinos adultos que, con el respaldo de estudios de toxicidad previos se concluyó que había seguridad en su uso, como lo demostró Berenguer *et al.* (2010), quien realizó un ensayo de toxicidad a dosis repetidas a una decocción de la planta, administrada vía oral a ratas durante 28 días. Se concluyó que no hubo efectos tóxicos asociados a la administración repetida del preparado de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

Se conoce de las propiedades de la planta ya que ha sido estudiada en varios ensayos en insectos y sus efectos sobre la fisiología de estos, como lo hizo Villamil *et al* (2012), quien evaluó el efecto insecticida del extracto etanólico de semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre ninfas de la chinche de los pastos *Collaria scenica* Stal. Determinó que el tratamiento más concentrado (250 ppm) fue el más eficaz presentando una mortalidad del 97%, menor número de exuvias y menor número adultos al final del ensayo. En Estados Unidos USDA (2001), realizó la evaluación del efecto de productos comerciales a base de extracto de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre las actividades biológicas del pulgón negro de los cítricos (*Toxoptera citricida*), y se demostró una reducción en la supervivencia, longevidad, desarrollo de las ninfas y la reproducción en los adultos. Con la finalidad de conocer el efecto garrapaticida del extracto acuoso de la semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) fue realizado un estudio en Ecuador por Hurtado *et al.* (2015) y concluyo que el extracto acuoso de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) al 5% puede ser utilizado como control efectivo de la garrapata en terneros, que además de presentar un bajo costo económico también representa nula incidencia de contaminación ambiental.

Las propiedades del extracto de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) como insecticida han sido demostradas en múltiples estudios, sin embargo ha sido poco estudiado como garrapaticida en campo, razón por la cual se considera de gran importancia llevar a cabo estudios en El Salvador que permitan el conocimiento de la efectividad de las propiedades de este material vegetal en el combate a las garrapatas del ganado bovino bajo las condiciones ambientales propias de nuestro país.

La investigación perseguía como uno de sus objetivos identificar mediante el método de cromatografía en capa fina la presencia de azadiractina en los extractos etanólicos de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) para garantizar la presencia del principal metabolito al que se le atribuye el efecto garrapaticida, y tal como lo hizo Villamil *et al.* (2012), quien de igual manera lo realizó por medio del Método de identificación por cromatografía de capa fina.

Comparando los resultados obtenidos en la investigación se determinó que los extractos en estudio tuvieron resultados iguales estadísticamente es decir que el tratamiento con el 0.5% y el tratamiento con el 2% producen iguales efectos en la mortalidad en garrapatas. El tratamiento que presento la mejor resultado respecto al costo fue el tratamiento uno con el 0.5% del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss), ya que resultó ser el de más bajo costo y con efectividad igual al tratamiento 2.

## **2. Revisión de bibliográfica**

### **2.1. Descripción botánica y ecológica del Neem**

El Neem (*Azadirachta indica* A. juss), pertenece al reino vegetal, subreino *Trachaeophyta*, división *Embriofitas*, subdivisión *Angiospermas*, clase *dicotiledonea* del orden *geraniales*, familia *Meliaceae*, género *Azadirachta*, especie *Azadirachta indica* (Cruz y Sánchez 2004).

### **2.2. Origen y distribución**

El Neem es nativo de la India, Pakistán, Malasia e Indonesia y ha sido plantado en las regiones áridas de la India y África (CATIE 1997).

En la actualidad se encuentra distribuido en más de 78 países, en el continente Asiático, Africano, Oceanía, Centro y Sur América. Se estima que en el mundo existen alrededor de 200 millones de árboles, la mayor parte de ellos en Asia, donde crecen bajo cultivo y en forma silvestre, particularmente en la India, sobre la franja que inicia del sur de Delhi y Lahore hasta Cabo Camorín (Cruz y Sánchez 2004).

### **2.3. Descripción de la especie**

Es un árbol de rápido crecimiento, de tamaño mediano y fuste recto, puede alcanzar entre diez y quince metros de altura y treinta a ochenta centímetros de diámetro, generalmente se encuentra siempre verde, excepto durante un periodo de extrema sequía. La corteza es gris, ligeramente agrietada, hojas peciolada en forma aserrada, con flores blancas, los frutos son drupas oblongas y de color amarillo (CATIE 1997).

Presenta una raíz principal pivotante de rápido crecimiento y desarrollo lo cual es clave para su resistencia a la sequía y alcanza hasta el doble de la altura del árbol lo que le permite extraer nutrientes del subsuelo profundo, la semilla tiene forma elipsoidal y está envuelta en una cáscara color café, puede contener una o dos semillas (Cruz y Sánchez 2004).

### **2.4. Requerimientos ambientales**

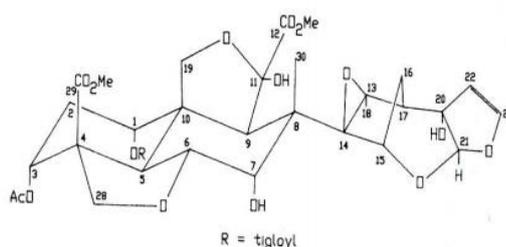
En su hábitat natural se presenta, en condiciones con temperaturas de 0° a 44°C, la precipitación oscila entre 450 y 1150 mm anuales. Sin embargo la especie tolera hasta 130 mm por año. El Neem crece desde el nivel del mar hasta 1500 metros de altitud,

crece bien en la mayoría de suelos; incluyendo arenosos, arcillosos y poco profundos. El PH óptimo es de 6.2 o superior (CATIE 1997).

Uno de los problemas en el cultivo del Neem es la viabilidad de sus semillas, ya que las recién cosechadas germinan bien, pero después de tres semanas la germinación se ve afectada por ello se recomienda establecer un vivero, sembrar las semillas antes de este tiempo (Pérez 2002).

## 2.5. Contenido de tóxicos en el Neem

El Neem contiene ciertas sustancias que lo hace actuar como si fuera una cortisona, alterando o bien el comportamiento, o bien los procesos vitales de los insectos (Pérez 2002), contiene 30 metabolitos insecticidas; de ellos, el más importante es la azadiractina (AZA), que es reconocida como el principal compuesto activo de mayor bioactividad contra los insectos; aun que ha sido encontrada en todas las partes de la planta, es en la semilla donde se almacena hasta cuatro veces más que en la hoja. AZA tiene como formula química C<sub>35</sub> H<sub>44</sub> O<sub>16</sub> (Figura 1), es producida por el metabolismo secundario de la planta, tiene sabor amargo y pertenece al grupo estereoquímico homogéneo de tetranortriterpenoides (Cruz y Sánchez 2004).



**Figura 1: Estructura química de la azadiractina**

FUENTE: Escalante *et al.* 2004.

## 2.6. Uso del Neem como bioinsecticida

La azadiractina tiene un considerable potencial como insecticida comercial para el control de plagas debido a su baja toxicidad en mamíferos. Varias preparaciones conteniendo azadiractina están siendo comercializadas en Norte América e India (Taiz y Zeiger 2006).

**Cuadro 1: Rendimiento obtenido y concentración de azadiractina en el Neem determinada por HPLC**

Técnica de extracción	Material vegetal evaluado	Rendimiento de aceite esencial ( $\pm 0.01\%$ )	Concentración de azadiractina determinada ( $\pm 0.01\%$ ) microg/g de materia vegetal
Solventes	Semilla	8.35	2416.11
	Hoja	2.37	2434.46
	Corteza	2.74	1013.94
Hidrodestilación	Semilla	3.60	152.42
	Hoja	0.68	32.94
	Corteza	0.89	17.39
Fluido superrecrítico	Semilla	2.64	5.68
	Hoja	0.64	6.38
	Corteza	0.07	131.98

Fuente: Arias *et al.* (2009).

## 2.7. Efecto sobre las plagas

La actividad insecticida del Neem afecta de manera significativa el comportamiento, crecimiento, desarrollo y fisiología de los insectos, por lo que resulta en una reducción en los daños cuando se utiliza en cultivos. La azadiractina (AZA) es una sustancia limonoide, terpeno no volátil reconocido como antihervivoros, y es considerada como el más poderoso de los repelentes alimentarios contra insectos, el poder repelente de la AZA se hace notorio a dosis tan bajas como cincuenta partes por billón (Taiz y Zeiger 2006).

La azadiractina no mata en forma inmediata o directa pero actúa de diversas formas: repele y reduce la alimentación de muchas especies de plagas; es un poderoso regulador del crecimiento ya que reduce la síntesis de hormonas de crecimiento (ecdisona y juvenil) y la fecundidad, aumenta la proporción de jebecillo estériles, limita el desarrollo de jebecillos, pupas y tasas de crecimiento, interrumpe la comunicación sexual, inhibe la muda y formación de quitina. Los efectos del Neem son combinados, su grado de acción depende de la especie de insecto y del estado de desarrollo (Cruz y Sánchez 2004).

Las hojas o semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), pueden ser utilizadas con potencial éxito en el control de garrapatas en diferentes especies de animales. Los ensayos in vitro parecen ser predictivos de lo esperado en ensayos in vivo al tener efectos tóxicos dosis-dependientes, letales y directos, sobre garrapatas adultas, ninfas,

larvas y huevos; pero también efectos sobre el ciclo reproductivo, como disminución de la masa de huevos y modificación del número y tiempo de eclosiones. Los extractos con el aceite de la semilla, o extractos de solventes orgánicos de hojas o semillas, parecen tener similar eficacia a concentraciones inferiores al 5 % y los extractos acuosos de hojas frescas o secas han mostrado efectos garrapaticidas (Fernández *et al.* 2012).

Según Pérez (2002), en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes de Sancti Spiritus en Cuba ha reportado mantener la garrapata bajo control con un baño mensual de una solución acuosa de semillas secas, enteras, molidas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Utilizan 20 g/litro de agua, dejándola en reposo 12-14 horas.

## **2.8. Mecanismo de acción**

La azadiractina es el componente principal del NEEM (*Azadirachta Indica* A. Juss) como repelente, actúa interfiriendo en el proceso de producción de ecdisteroides (García y Castro 2012), interfiriendo así en el proceso de muda al presentarse bajos niveles de esta hormona en la hemolinfa y se considera que el efecto se da vía interferencia neuroendocrina, interfiriendo en factores procedentes del sistema nervioso central (Consejo Superior de Investigaciones Científicas 1988).

El extracto parece actuar como inhibidor del desarrollo de las ninfas reduciendo la ecdisis hasta en un 50% y causando alteraciones como mudas incompletas que terminan ocasionando la muerte antes que este pueda completar su desarrollo y reproducirse (Villamil *et al.* 2012).

## **2.9. Garrapatas**

Las garrapatas son artrópodos arácnidos, sistemáticamente próximas a las arañas y escorpiones, y sobre todo, a los ácaros, grupos de los que se considera que forma una rama propia, los *Metastigmata*. Las garrapatas pertenecen al orden *Ixodida*, que consta de tres familias: *Ixodidae*, *Gasidae* y *Nuttalliellidae*. Las primeras se llaman comúnmente “garrapatas duras”, mientras que las segundas reciben el calificativo de “garrapatas blandas”, se conocen unas 600 especies de *Ixodidae* repartidas en unos 12 géneros y alrededor de 190 especies de *Argasidae*. Los ixódidos se caracterizan por la presencia de una gran placa esclerotizada en la superficie dorsal, el escudo, del que reciben su calificativo de “garrapatas duras”. Los argásidos carecen de este escudo esclerotizado y su superficie externa recuerda al aspecto del cuero (Rivera *et al.* 2015).

## **2.10. Importancia**

Las picaduras de garrapatas además de molestas y dolorosas, se convierten en puerta de entrada para infecciones bacterianas secundarias o larvas de mosca. Las infecciones grandes pueden dañar el cuero en el caso de los bovinos y causar anemias. Sin embargo, el riesgo más importante es que pueden ser portadoras de enfermedades. Aunque las garrapatas tienen preferencias con respecto a sus hospedadores según la etapa de vida, la mayoría de las especies se alimentan de una amplia variedad de animales silvestres y domésticos (CFSPH 2010). Suelen encontrarse en el hombre, caninos, bovinos, equino, caprino, porcino doméstico y ovinos (Navarrete *et al.* 2012).

En los animales, las infestaciones por garrapatas pueden ser muy intensas, de manera que no es raro encontrar animales parasitados por cientos, e incluso miles, de ejemplares, lo que multiplica los daños, tanto los directos como los derivados de la transmisión de enfermedades (Manzano *et al.* 2012).

## **2.11. Ciclo de vida**

Las garrapatas, como otros muchos parásitos, pueden diseminarse fácilmente mediante sus hospedadores, puesto que permanecen sobre ellos durante largos periodos, siendo así transportadas a distintos lugares. Cuando, tras alimentarse, se desprenden del hospedador en un nuevo lugar, pueden mudar y reproducirse allí, alimentarse sobre los hospedadores locales y generar una nueva población (Manzano *et al.* 2012).

El ciclo vital de los ixódidos es muy uniforme para casi todas las especies de la familia. Las hembras se alimentan ingiriendo hasta 100 veces su peso en sangre. Esta fase de alimentación lenta en condiciones normales no se extiende más de 6-9 días. Después de la fecundación, que se produce sobre el hospedador excepto en las especies del género *Ixodes*, las hembras terminan su repleción de sangre de forma muy rápida, caen del hospedador y comienzan la puesta de huevos en algún lugar del ambiente que les proporcione protección contra las inclemencias del clima. Estos lugares pueden encontrarse bajo el mantillo, el musgo, en un bosque o en grietas de la pared de las construcciones (Rivera *et al.* 2015).

Los huevos eclosionan en ambiente y las larvas se arrastran por el pasto u otras plantas para encontrar un hospedador. Después de alimentarse las larvas sufren dos mudas y se convierten en ninfas y posteriormente en garrapatas adultas. Las garrapatas macho adultas maduran sexualmente después de la alimentación y se aparean con hembras que

están alimentándose. La garrapata hembra muere después de la ovoposición. Las garrapatas pueden completar su ciclo de vida en un plazo de 3 a 4 semanas (CFSPH, 2007).

## **2.12. Sistema endocrino de invertebrados**

En insectos y en artrópodos mandibulados el sistema neuroendocrino está formado por células neurosecretoras, y muchas de sus funciones biológicas tienen control hormonal, como la muda y la metamorfosis, la diapausa, la reproducción, los niveles de metabolitos en la linfa, la osmorregulación, cambios de coloración, la ovoposición e incubación de huevos. En los artrópodos entre los cuales figuran las garrapatas, el sistema circulatorio es más evolucionado, por lo tanto las hormonas pueden circular de manera más rápida y efectiva (Fanjul *et al* 1998).

Las hormonas son sustancias químicas que actúan como reguladores celulares. En general las hormonas actúan influenciando una serie de procesos fisiológicos tales como la reproducción, comportamientos alimenticios, digestión, síntesis de carbohidratos y lípidos. La hormona juvenil tiene un papel esencial en la morfogénesis, el comportamiento y procesos reproductivos, tales como desarrollo del ovario, producción de vitelogenina y captación de esta dentro de los ovocitos y ovoposición, mientras que la hormona ecdisona presenta actividad inductora a la muda. Esta hormona es convertida en hidroxiecdisona compuesto capaz de activar las células hipodérmicas con restauración de capacidad de crecimiento y síntesis proteica, permitiendo la formación de una nueva cutícula, resultando en la liberación de la cutícula vieja (García y Castro 2012).

## **2.13. Extracto de plantas**

Consiste en poner en contacto un sólido triturado con un líquido en el que son solubles algunas de las sustancias que incorpora el sólido en su composición. Del proceso se obtiene un sólido agotado y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en el (Ortuño 2006).

## **2.14. Extracción sólido líquido**

Tiene por objeto la separación de un componente de una muestra sólida con un disolvente, normalmente orgánico, en el cual los demás componentes son insolubles (Solano *et al.* 1991). Para extraer secuencialmente los componentes de un tejido vegetal, generalmente se parte de material molido deshidratado, para evitar la posible formación

de emulsiones entre el agua contenida en el material y los disolventes orgánicos a utilizar. Luego de la extracción el residuo se separa del disolvente por filtración o centrifugación y se somete a una nueva extracción (Lamarque *et al.* 2008).

### **2.15. Disolvente de extracción**

Los compuestos orgánicos son generalmente mas solubles en disolventes orgánicos que en agua y, por lo tanto, pueden extraerse de soluciones acuosas. La elección del disolvente de extracción depende de la solubilidad del compuesto a extraer, de la volatilidad, inflamabilidad y toxicidad de los posibles disolventes a emplear. Cuanto mayor sea la afinidad de la muestra orgánica por el disolvente de extracción elegido, mas fácilmente se extraerá. El disolvente de extracción no debe alterar la estructura del compuesto a extraer (Lamarque *et al.* 2008).

### **2.16. Maceración de una muestra vegetal para extracción**

El proceso de maceración consiste en remojar el material a extraer, debidamente fragmentado, con un disolvente apropiado, hasta que este penetre en los tejidos ablandando y disolviendo las porciones solubles. En un recipiente que no se ataque con el disolvente (Lamarque *et al.* 2008).

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Metodología de campo I**

##### **3.1.1. Recolección del material vegetal**

La recolección del fruto del árbol de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), se realizó en los meses de julio y agosto en la Estación Experimental y de Practicas de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador, ubicada en el Cantón Tecualuya departamento de La Paz, se encuentra a una elevación aproximada de 61 msnm, dicho lugar cuenta con una temperatura promedio anual de 33° C y una precipitación pluvial anual entre 1600 mm a 1800 mm.

Se recolectó el fruto que presentó un color verde amarillento tenue, se colocó la semilla en un recipiente en el cual se lavó eliminando cualquier residuo que contuviera la semilla, posteriormente se despulpó manualmente, se colocó sobre una manta extendida para iniciar el secado para lo cual se sometió a aireación en sombra (Figura A-1).

#### **3.2. Metodología de laboratorio**

##### **3.2.1. Obtención de los extractos**

El proceso de extracción se realizó por el método de reflujo llevándose a cabo en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Se inició el proceso triturando la semilla en un mortero con el uso de un pistilo, procurando una molienda eficaz que redujera el material vegetal a pequeñas partículas, se proceso la semilla triturada en muestras de 500 gramos, cada muestra fue pesada en una balanza granataria marca Ohaus Triple Beam Balance y colocada dentro de un balón de cuello corto con capacidad de 5,000 mililitros, al balón se le adicionó 2,000 mililitros de alcohol etílico al 90% como solvente y se colocó un condensador de bolas para evitar su evaporación, se colocó el balón en una manta de calentamiento a 60° C durante tres horas, transcurrido el tiempo necesario para la extracción se separó el líquido del residuo sólido haciéndolo pasar por un filtro de algodón colocado en un embudo superpuesto a un erlenmeyer donde quedó depositada la solución alcohólica. La solución alcohólica obtenida se colocó por fracciones en un balón de capacidad de 1,000 mililitros, este balón fue colocado en un rotaevaporador marca Labconco en donde se sumergió en baño maría a 45°C, girando a 250 rpm y con una presión de 300 milibares en la bomba de succión de la marca Buchi V700, el alcohol ya separado del extracto fue colectado con el

uso de un condensador el cual era enfriado con refrigerante proveniente de un Shiler marca PolyScience. De esta manera se llevo el proceso de concentración del extracto, cuando se obtuvo el extracto con una consistencia aceitosa se retiró del balón con el uso de una pera de succión y una pipeta pasteur, fue colocado en un beaker previamente tarado en una balanza semianalítica de la marca Unibloc Shimadzu TW 423L, se rotuló el beaker con el nombre del extracto y número de muestra (Figura A-2).

### **3.2.2. Identificación de la azadiractina por cromatografía de capa fina**

Se identificó la presencia de azadiractina en los extractos obtenidos por el Método de identificación por cromatografía de capa fina. Se peso la cantidad de 0.1 gramos de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en una balanza semianalitica Unibloc Shimadzu TW 423L, se diluyó en dos mililitros de alcohol etílico al 90% y se colocó en un sonicador de la marca Sympony VWR a una temperatura de 20°C, con la ayuda de un tubo capilar se colocó la muestra en la placa de sílica gel y se dejó secar, luego se depositó la placa en posición vertical en el frasco conteniendo el eluyente que constituye la fase móvil diclorometano-acetona (9:1), cuando el eluyente se difundió a través de la placa se retiró y se dejó secar, El revelado cromatográfico se obtuvo con luz UV a una longitud de onda corta (254nm), seguida de aspersion con vainillina al 1% y ácido sulfúrico al 5% en etanol, se calentó a 80°C para acelerar el revelado (Figura A-3).

### **3.2.3. Determinación de la concentración del extracto de Neem a utilizar**

Se realizó un ensayo in vitro con muestras de garrapatas extraídas de un bovino adulto de salud general aceptable, colocando doce garrapatas en cada caja de Petri (cinco en total). A los especímenes contenidos en cada caja de Peri fueron remojados con soluciones de los extractos de la semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) a las concentraciones de 0.5%, 2% y 3%, excepto las últimas dos cajas de Petri que correspondían a dos grupos control (uno con agua y el otro sin ninguna solución) para observar el efecto que estas soluciones ejercían sobre ellas durante 24 horas sucesivas.

El ensayo in vitro reveló que el extracto a las concentraciones de 2 y 3% generó un efecto letal sobre las garrapatas (100% de mortalidad) en un lapso de cuatro horas. Las garrapatas embebidas con la solución del extracto al 0.5% alcanzó una tasa de mortalidad del 84%, es decir que de doce garrapatas sobrevivieron dos.

De esta manera se determinó probar en campo las concentraciones al 0.5% y 2% del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

### **3.3. Metodología de campo II**

El experimento se llevó a cabo en una ganadería ubicada en el municipio de Armenia del departamento de Sonsonate, situada a 550 msnm, con una temperatura promedio anual de 27.7°C, y precipitación anual de 1,888 milímetros, El rumbo del viento predominantemente es del noreste en estación seca y del este en estación lluviosa con una velocidad promedio anual de 10.6 kilómetros por hora. (Cerón *et al.* 2010).

Las unidades experimentales fueron quince bovinos mestizos con fines productivos de doble propósito, de pesos y tallas similares, previamente se verificó que se encontrasen condiciones óptimas de salud para realizar el ensayo, los mismos fueron divididos en tres grupos que constituyeron los tres tratamientos, se manejaron bajo un sistema semiestabulado, fueron alimentados con zacate de corte y concentrado, a cada animal, seleccionado al azar, se le colocó su respectiva identificación por tratamiento y número con crayón marcador.

#### **3.3.1. Elaboración de las soluciones para el estudio**

Se pesó la cantidad exacta de extracto necesaria para preparar diez litros de la solución del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), cantidad necesaria para aplicar a los cinco bovinos de cada tratamiento a las concentraciones del 0.5% y 2%, tal como se describe a continuación.

##### Solución al 0.5%

Al beaker conteniendo 50 gramos de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) se le agita constantemente adicionando agua desmineralizada hasta obtener una pasta homogénea, esta pasta se trasladó a una cubeta y en seguida se le fue adicionando más cantidad de agua desmineralizada por pequeñas cantidades hasta aforar a diez litros manteniendo la homogeneidad de la solución de esta manera se consiguió una solución del extracto etanólico semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

##### Solución al 2%

Al beaker conteniendo 200 gramos de extracto etanólico semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) se le agita constantemente adicionando agua desmineralizada hasta obtener una pasta homogénea, esta pasta se traslado a una cubeta y en seguida se le fue adicionando más cantidad de agua desmineralizada por pequeñas cantidades hasta aforar a diez litros manteniendo la homogeneidad de la solución (Figura A-4).

Los extractos etanólicos puros fueron transportados hasta el lugar donde se realizaría el experimento en beakers cubiertos con papel aluminio y guardados en hielera para mantener una temperatura constante

### **3.3.2. Determinación de la carga parasitaria previo a la primera aplicación**

Los animales fueron sujetos adecuadamente para garantizar la seguridad del operador al realizar los procedimientos pertinentes al ensayo. En cada bovino se delimitó las áreas cutáneas a cada lado del cuerpo en donde se realizaría el muestreo con una medida de 100 cm<sup>2</sup>, se utilizó crayón marcador de ganado y se procedió a marcar en la región anatómica de la tabla del cuello, área pectoral ventral y zona medial de los muslos garantizando la existencia de garrapatas en estas zonas cutáneas (Figura A-5). Después de haber delimitado las zonas de muestreos se procedió a contabilizar el número de garrapatas presentes, recogiendo los datos en un cuadro de doble entrada.

### **3.3.3. Aplicación de las diferentes concentraciones del extracto**

El tratamiento uno consistió en la aplicación de una solución acuosa de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) al 0.5%, en el tratamiento dos se aplicó una solución al 2% y en el tratamiento cero se aplicó únicamente agua desmineralizada. La aplicación de las diferentes concentraciones del extracto se hizo con el uso de una bomba de aspersion dirigida, la solución acuosa ya preparada del extracto se vertió dentro de la misma, con el uso de protección con gabacha y mascarilla se aplicó en toda la extensión del cuerpo de los animales previamente sujetos con sogas, se realizaron dos aplicaciones a intervalos de diez días (Figura A-6), la bomba fue lavada antes y después de la utilización en cada tratamiento.

### **3.3.4. Conteo de garrapatas post aplicación del producto**

Se realizaron tres conteos de garrapatas a intervalo de veinticuatro horas post aplicación de las concentraciones del extracto de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), tomando en cuenta el total de garrapatas presentes en las zonas de muestreo, el conteo se realizó en las zonas previamente establecidas de 100 cm<sup>2</sup> cada una a cada lado del animal y que corresponden al área de la tabla del cuello, área pectoral ventral y las zonas mediales de ambos muslos. Transcurridos diez días post aplicación se realizó nuevamente un conteo de garrapatas.

Los datos que resultaron de los conteos fueron recopilados en un cuadro manera ordenada según bloque y su respectivo tratamiento.

### **3.4. Metodología estadística**

Se utilizó el diseño estadístico de bloques completos al azar, con tres tratamientos y cinco repeticiones. Los datos obtenidos fueron procesados por medio del Software para análisis estadístico InfoStat estudiantil versión 2016. La información en la base de datos originales mediante el programa sufrieron una transformación logarítmica base ( $\text{Log}^{10}$ ), y se analizaron mediante la prueba estadística de Contrastes ortogonales con un nivel de confianza del 5%; los cuadros y gráficos se elaboraron en el programa Microsoft Excel 2003.

El factor de estudio de la investigación fueron las diferentes concentraciones diferentes del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), y la variable respuesta fue el porcentaje de mortalidad de garrapatas.

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Característica del fruto y semilla.**

El fruto del árbol de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) presentó un olor bastante perceptible, con una coloración verde amarillenta, con una forma elipsoidal, coincidiendo con lo reportado por Cruz y Sánchez (2004).

Por otra parte, la semilla presentó un olor similar al fruto, con una coloración amarilla con exocarpio moderadamente duro.

### **4.2. Extracto etanólico**

El extracto etanólico obtenido a partir de la semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) presentó una consistencia aceitosa semisólida, coloración café-verdosa de apariencia viscosa (Figura A-7) con olor similar al del ajo, concordando con lo obtenido por Villamil *et al.* (2012).

### **4.3. Identificación de azadiractina**

Se pudo identificar la azadiractina mediante la reacción de sus grupos cromóforos con la vainillina, revelando una coloración café-rojiza cambiando a morado, tal como fue descrito por Villamil (2012), cuya importancia se establece por ser el componente principal del Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) que actúa como repelente e interfiere en el proceso de producción de ecdisteroides (García y Castro 2012).

También se pudo determinar la presencia de terpenoides mediante el revelado cromatográfico, que permitió observar la aparición de colores rojos, rosa, púrpura o azul (Figura A-8), en concordancia con lo propuesto por Delgado (2011).

### **4.4. Carga parasitaria**

En el momento de realizar la exploración física de los animales se observó la existencia de una mayor población de garrapatas en el área medial de los muslos, y menor en la zona pectoral, en la zona de la tabla del cuello se observó en general que hubo menos cantidad de garrapatas. El cuadro A-1 muestra la carga parasitaria con la cual se inició el estudio y la carga parasitaria que se obtuvo al final de la investigación. El cuadro A-2 muestra los datos recopilados en todo en ensayo y los números transformados.

### **4.5. Efecto de los extractos sobre las unidades experimentales**

La carga parasitaria inicial (CPI), es el número de garrapatas contabilizadas en las diferentes zonas de muestreo previo a la aplicación de los diferentes tratamientos, partiendo de ello se establecieron los porcentajes de mortalidad de garrapatas. Se

observó que en general se obtuvo un incremento de la población de garrapatas cuando se efectuó el muestreo a las 240 horas (diez días), razón por la cual se evaluó el porcentaje de este incremento partiendo del último muestreo ocurrido siete días antes (a las setenta y dos horas después de la primera aplicación).

### Tabla del cuello primera aplicación

El cuadro 2 muestra que en el tratamiento con 0.5% del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) a las veinticuatro horas se observó una tasa de mortalidad del 54.9%, es decir que de 102 individuos que habían inicialmente solo se encontraron vivos 46 y para el tratamiento con el 2% del extracto etanólico de semilla de Neem, presentó una tasa de mortalidad del 57.9%, es decir que de 88 individuos que habían previo a la administración del tratamiento solo se encontraron vivos 37. A las cuarenta y ocho horas después de aplicar los tratamiento se puede observar que el efecto sigue la misma tendencia, el tratamiento con 0.5% del extracto etanólico de semilla de Neem presentó una tasa de mortalidad del 61.7% y el tratamiento con 2% del extracto etanólico de semilla de Neem un 68%. A las setenta y dos horas produjo un porcentaje de mortalidad de 77.45% levemente mayor que el del 2 % extracto con una tasa de mortalidad del 76.2%. El T0 no presentó mortalidad sobre la población de garrapatas contrario a ello se puede observar un pequeño incremento de las misma que corresponde a un 8%.

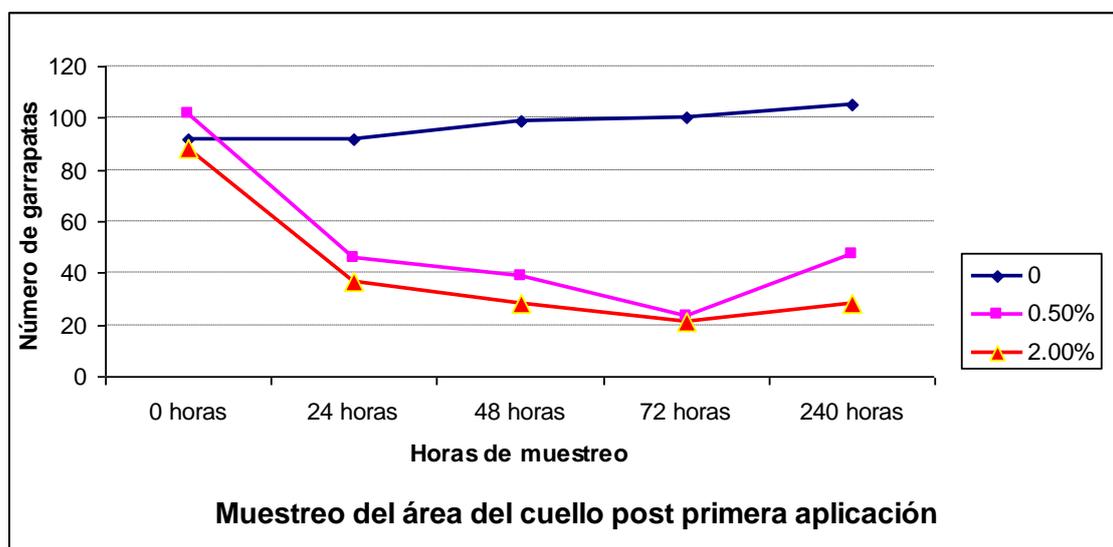
Al transcurrir 240 horas (diez días) existió un incremento en la carga parasitaria que para el tratamiento testigo fue de un 6%, para el tratamiento uno con 0.5% de extracto el incremento de la población de garrapatas fue del 23.53% y para el tratamiento con el 2% de extracto fue de 8%; fenómeno que podría ser debido a la exposición del producto a los rayos ultravioleta cuyas sustancias nocivas que contiene el Neem tienen baja durabilidad bajo esas condiciones, similar a lo descrito por Pérez (2002), razón por la cual nuevas poblaciones de garrapatas invaden el cuerpo de los animales.

**Cuadro 2: Porcentaje de mortalidad de garrapatas tabla del cuello (Primera aplicación)**

TRAT	CPI	Garrapatas (24 h)		Garrapatas (48h)		Garrapatas (72 h)		Garrapatas (240 h)	
		Vivas	Mortalidad (%)	Vivas	Mortalidad (%)	Vivas	Mortalidad (%)	Vivas	Aumento (%).
0.00 %	92	92	0	99	-7.6*	100	-8*	105	6
0.50 %	102	46	54.9	39	61.7	23	77.45	47	23.53
2.00 %	88	37	57.9	28	68	21	76.2	28	8

\* No hubo mortalidad, contrario a ello hubo un incremento de la población, por ello se representa con un símbolo negativo.

La figura 2 muestra el comportamiento de los tratamientos a lo largo de 240 horas (diez días) después de la primera aplicación, denotando un comportamiento muy similar entre los dos tratamientos con extracto, pasadas setenta y dos horas parece que el efecto del extracto se disminuye y empieza un incremento en la población de garrapatas, el T2 se mantiene en el tiempo con mejores resultados al obtener menor incremento de la población.



**Figura 2: Mortalidad de garrapatas en la tabla del cuello (primera aplicación)**

El análisis de varianza demostró que existen diferencias significativas en el modelo ( $P=0.0134$ ) (Cuadro A-3), se evalúa el efecto de el testigo contra los tratamientos ( $P=0.0077$ ) se afirma que el tratamiento testigo y los tratamientos con extracto produjeron diferentes efectos (Cuadro A-4). Estadísticamente los tratamientos en estudio del 0.5% y 2% producen igual efecto sobre la mortalidad en garrapatas ( $P=0.1466$ ) (Cuadro A-4).

### Tabla del cuello segunda aplicación

En el cuadro 3 muestra los datos obtenidos 240 horas (diez días) después de la primera aplicación de los tratamientos, estos datos representan la CPI para el análisis de los resultados obtenidos después de la segunda aplicación. Según los datos obtenidos a las veinticuatro horas se observó que el T1 presentó una tasa de mortalidad del 42.5%, es decir que de 47 garrapatas presentes previo a la aplicación del producto solo sobrevivieron 27, en el T2 se observó un porcentaje mayor con un 78.5%, es decir que de 28 garrapatas sobrevivieron únicamente 6. A las setenta y dos horas el tratamiento con 0.5% de extracto etanólico de de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) presentó una mortalidad del 89.36 %, es decir que de las 47 garrapatas que habían inicialmente ya solo se contabilizaban 5, el tratamiento de 2.0% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), una mortalidad del 96.43% resultando que de 28

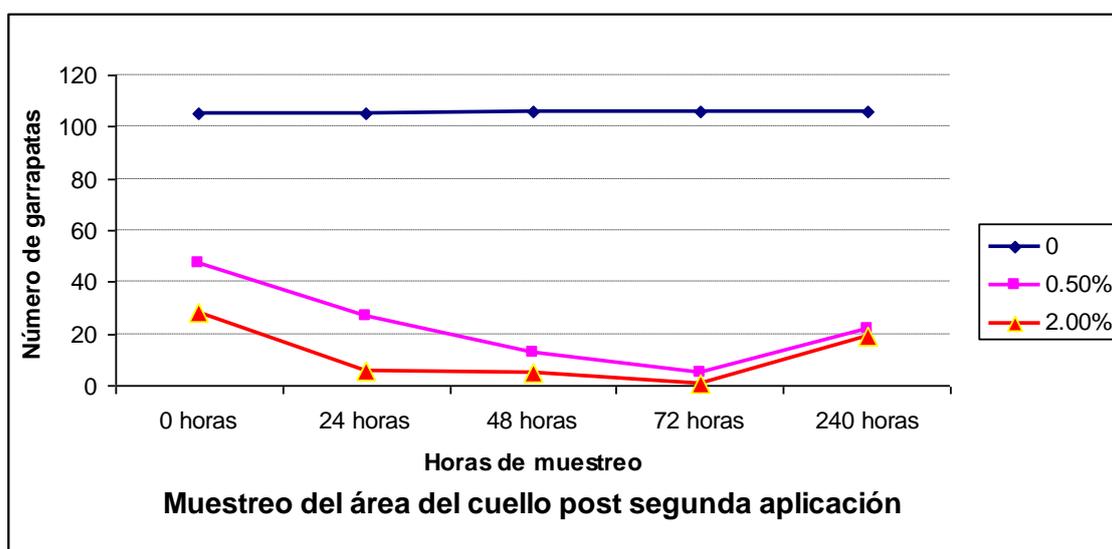
garrapatas que habían inicialmente solo sobrevivió 1, el tratamiento testigo permaneció con una población invariable significativamente. Al realizar el muestreo pasadas 240 horas (diez días) se observó un comportamiento que tiende a la alza por parte de los tratamientos uno y dos obteniendo un incremento en la población de garrapatas considerado a partir del último conteo realizado siete días antes.

**Cuadro 3: Porcentaje de mortalidad de garrapatas tabla del cuello (Segunda aplicación)**

TRAT	CPI	Garrapatas (24 h)		Garrapatas (48h)		Garrapatas (72 h)		Garrapatas (240 h)	
		vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	Vivas	Aumento (%)
0	105	105	0	106	-0.95*	106	-0.95*	106	0
0.50%	47	27	42.5	13	72.3	5	89.36	22	36.16
2.00%	28	6	78.5	5	82	1	96.43	19	63.99

\* No hubo mortalidad, contrario a ello hubo un incremento de la población, por ello se representa con un símbolo negativo.

La figura 3 muestra el comportamiento de los tratamientos a lo largo de la segunda aplicación, determinando que el tratamiento de 2.0% de extracto etanólico de semilla de Neem posee el mejor rendimiento sobre los otros dos tratamientos, denotando que los tratamientos que posee extracto de la semilla se mantuvieron constantes a la baja hasta las 72 horas y mostrando un aumento de la población que para el tratamiento uno fue del 36.16% y para el tratamiento dos fue de 63.99%.



**Figura 3: Mortalidad de garrapatas tabla del cuello (segunda aplicación)**

El análisis de bloques al azar, muestra que existe una diferencia significativa ( $P=0.0050$ ), es decir que los tratamientos producen una acción diferente sobre el control de

garrapatas (Cuadro A-5). Por medio de la prueba de contraste ortogonales se demuestra que los tratamientos de extracto de semilla de Neem poseen mejor rendimiento que el tratamiento con 0%, ( $P=0.0014$ ) (Cuadro A-6), mientras que entre tratamiento con extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) no existen diferencias significativas ( $P=0.7996$ ).

### Área pectoral primera aplicación

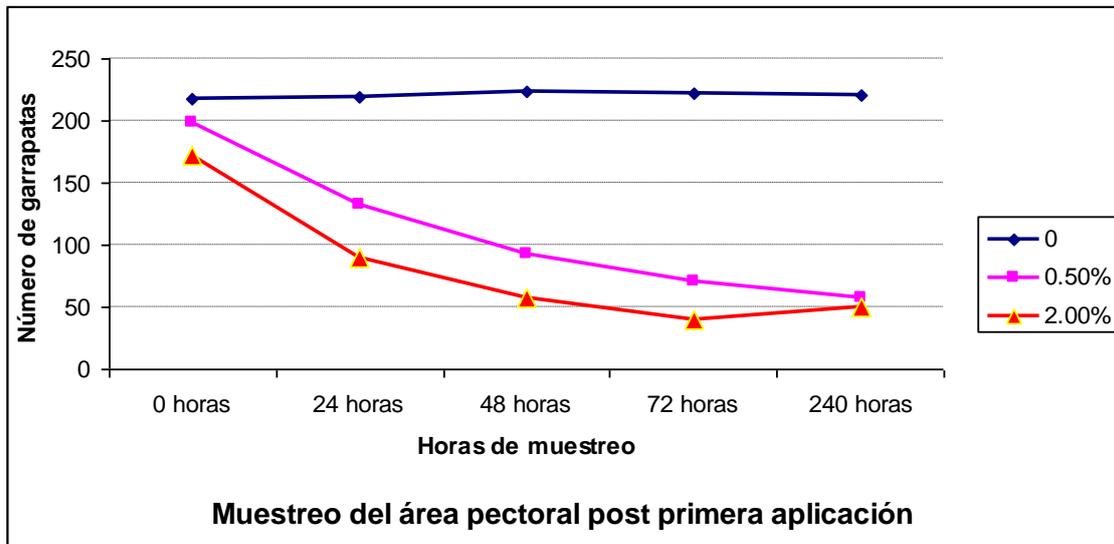
El cuadro 4 muestra el conteo de las garrapatas en la zona pectoral de los bovinos después de la primera aplicación de los tratamientos, obteniendo que el tratamiento con 2% de extracto de semilla de Neem es el que presentó la mayor mortalidad de garrapatas en las primeras veinticuatro horas después de la aplicación con una tasa de mortalidad del 48.2% comparado con el tratamiento con 0.5% que presentó una tasa de mortalidad del 33.16%. El comportamiento a las setenta y dos horas después de la primera aplicación de los tratamientos el testigo experimentó un aumento de la población de garrapatas del 1.8% al mismo tiempo que los tratamientos uno y dos experimentaron una disminución del número de garrapatas, presentando porcentajes de mortalidad del 64.82%, es decir que de 133 garrapatas sobrevivieron 70 que corresponde al T1 y el 77.32%, es decir que de 172 garrapatas con las que se inicio únicamente sobrevivieron 39 correspondiente al T2.

**Cuadro 4: Porcentaje de mortalidad de garrapatas área pectoral (Primera aplicación)**

TRAT	CPI	Garrapatas ( 24h)		Garrapatas ( 48h)		Garrapatas (72h)		Garrapatas (240h)	
		Vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	Vivas	Aumento (%).
0	218	219	-0.4*	223	-2.29*	222	-1.8*	220	0.8
0.50%	199	133	33.16	93	53.2	70	64.82	58	6(disminu.)
2.00%	172	89	48.2	58	66.2	39	77.32	50	6.38

\* No hubo mortalidad, contrario a ello hubo un incremento de la población, por ello se representa con un símbolo negativo.

Como se muestra en la figura 4, pasadas 240 horas se presentó un aumento de la población de garrapatas en el tratamiento testigo del 0.8% y del T2 al que le corresponde una tasa del 6.38%, no así el T1 que hasta ese muestreo siguió presentando una tendencia a la baja mostrando una disminución del 6.38% en la población de garrapatas, estos porcentajes son tomados en base al último muestreo.



**Figura 4: Mortalidad de garrapatas área pectoral (primera aplicación)**

El modelo estadístico mostró que existen diferencias significativas ( $P=0.0001$ ) (Cuadro A-7) entre los tratamientos es decir que al menos uno o más tratamientos poseen porcentajes altos en la mortalidad de garrapatas, mediante la prueba de contrastes ortogonales se demuestra que los tratamientos con extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) poseen los mejores resultados contra los resultados del tratamiento con agua desmineralizada ( $P=0.0001$ ) mientras que el contraste que compara los tratamientos con extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) al 0.5% y al 2% muestra que no hay diferencias significativas entre sí ( $P=0.3722$ ), (Cuadro A-8).

#### Área pectoral post segunda aplicación

El cuadro 5 muestra que los tratamientos con 0.5% y el 2% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss) en las primeras veinticuatro horas presentaron porcentajes de mortalidad que para T1 fue del 72.5%, es decir que de 58 garrapatas únicamente sobrevivieron 16, y para el T2 un 24% en donde se observó que de 50 garrapatas sobrevivieron 38. Cuarenta y ocho horas después se observó que para el T1 de las 58 garrapatas que había inicialmente solo sobrevivían 13, y para el T2 de 50 garrapatas sobrevivían únicamente 11, obteniéndose una tasa de mortalidad del 77.5% y 78% respectivamente. A las setenta y dos horas después de la aplicación de los tratamientos se observó un comportamiento similar presentando 86.2% y 81.57% de mortalidad respectivamente, diferente del tratamiento testigo que no presentó efectos

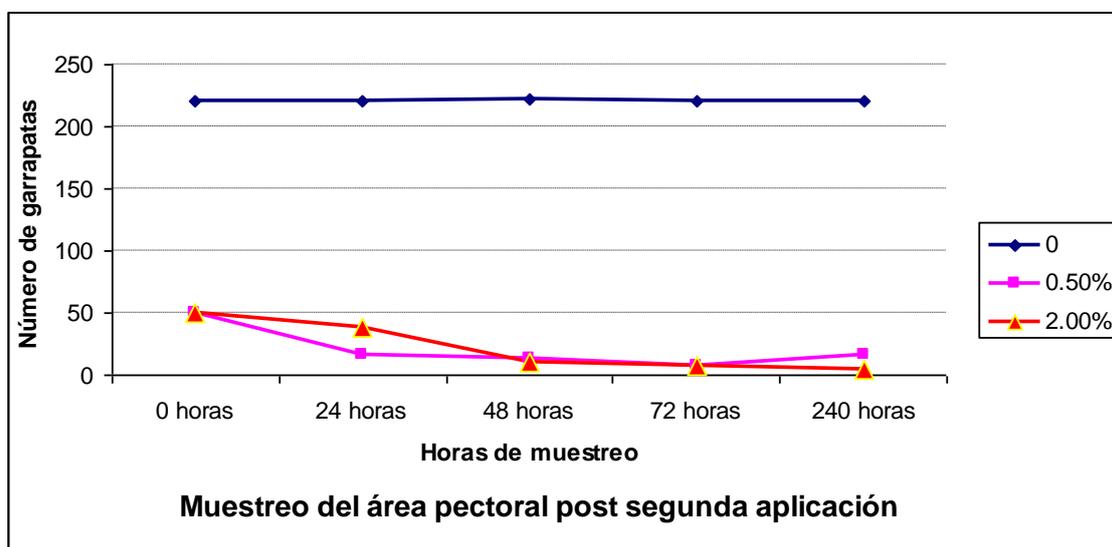
sobre la mortalidad de las garrapatas, sin embargo al pasar el tiempo y en el muestreo realizado a las 240 horas (diez días) se observó un incremento de la población en los tres tratamientos correspondiendo al testigo un aumento de 0.45% y un 13.8% para el T1 el T2 tuvo un incremento de 5.2%.

**Cuadro 5: Porcentaje de mortalidad de garrapatas área pectoral (Segunda aplicación)**

TRAT	CPI	Garrapatas ( 24h)		Garrapatas ( 48h)		Garrapatas (72h)		Garrapatas (240h)	
		vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	Vivas	Aumento (%)
0	220	220	0	222	-0.9	220	0	221	0.45
0.50%	58	16	72.5	13	77.5	8	86.2	16	13.8
2.00%	50	38	24	11	78	7	81.57	5	5.2

\* No hubo mortalidad, contrario a ello hubo un incremento de la población, por ello se representa con un símbolo negativo.

La figura 5 muestra el comportamiento de los tratamientos a lo largo de los muestreos de la segunda aplicación denotando que el tratamiento uno con 2% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) posee el mejor efecto en cuanto a la mortalidad de garrapatas hasta las 240 horas (diez días), mientras que el tratamiento dos con 0.5% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) muestra una actividad constante a la baja hasta las 72 horas, mostrando un ligero aumento en las últimas horas hasta las 240 horas del muestreo.



**Figura 5: Mortalidad de garrapatas área pectoral (segunda aplicación)**

El análisis de varianza bajo el diseño de bloques completos al azar, indicó que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $P= 0.0001$ ), (Cuadro A-9) es decir que los tratamiento producen efectos diferentes. Mediante la prueba de contrastes ortogonales se

determinó que los tratamientos con extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) producen mejores rendimientos que el tratamiento con agua desmineralizada (P=0.0001), mientras que al analizar el efecto que posee los tratamientos con extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) entre sí, la prueba de contrastes ortogonales mostró que no existe una diferencia estadística significativa (P=0.4162) (Cuadro A-10).

### Miembros posteriores primera aplicación

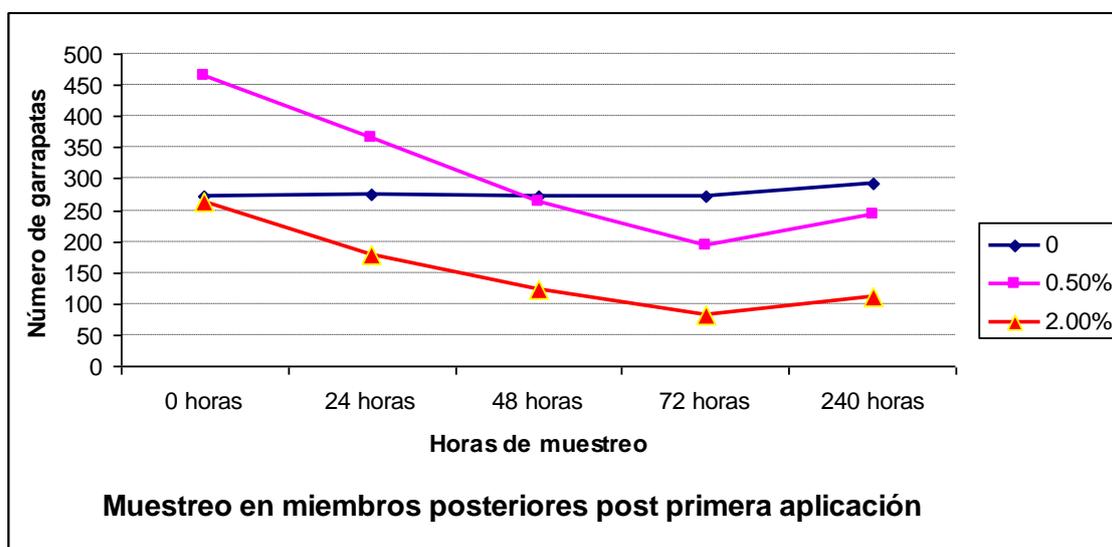
El cuadro 6 muestra una tasa de mortalidad a las veinticuatro horas del 21.6% para el T1 y 32.95% para el T2, a las cuarenta y ocho horas ya existía una mortalidad de 43.7% para el T1 y para el T2 es del 53.4%, ya a las setenta y dos horas se observó que en el T1 de 466 individuos con los que se inicio previo a la aplicación de los tratamientos sobreviven 193 y en el T2 se observó que de 264 garrapatas sobreviven 81.

**Cuadro 6: Porcentaje de mortalidad de garrapatas miembros posteriores (Primera aplicación)**

TRAT	CPI (0h)	Garrapatas ( 24h)		Garrapatas ( 48h)		Garrapatas (72h)		Garrapatas (240h)	
		Vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	Vivas	Aumento (%).
0	271	276	-1.8	272	-0.3	272	-0.36	291	29.2
0.50%	466	365	21.6	262	43.7	193	58.58	244	10.9
2.00%	264	177	32.95	123	53.4	81	69.31	112	11.73

\* No hubo mortalidad, contrario a ello hubo un incremento de la población, por ello se representa con un símbolo negativo.

En la investigación se mostró que en los miembros posteriores hay mayor concentración de garrapatas. En la primera aplicación el tratamiento de 2% de semilla de Neem presentó mayor mortalidad de garrapatas.



### Figura 6: Mortalidad de garrapatas en miembros posteriores (primera aplicación)

El modelo estadístico demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos ( $P=0.0023$ ), mostrando que existe un tratamiento que produce los mejores resultados. (Cuadro A-11). Se demostró que los tratamientos con extracto etanólico están produciendo diferentes efectos en relación al testigo ( $P=0.0096$ ). Al comparar los tratamientos del 0.5% y 2% de extracto estadísticamente están produciendo diferentes efectos ( $P=0.0054$ ) (Cuadro A-12).

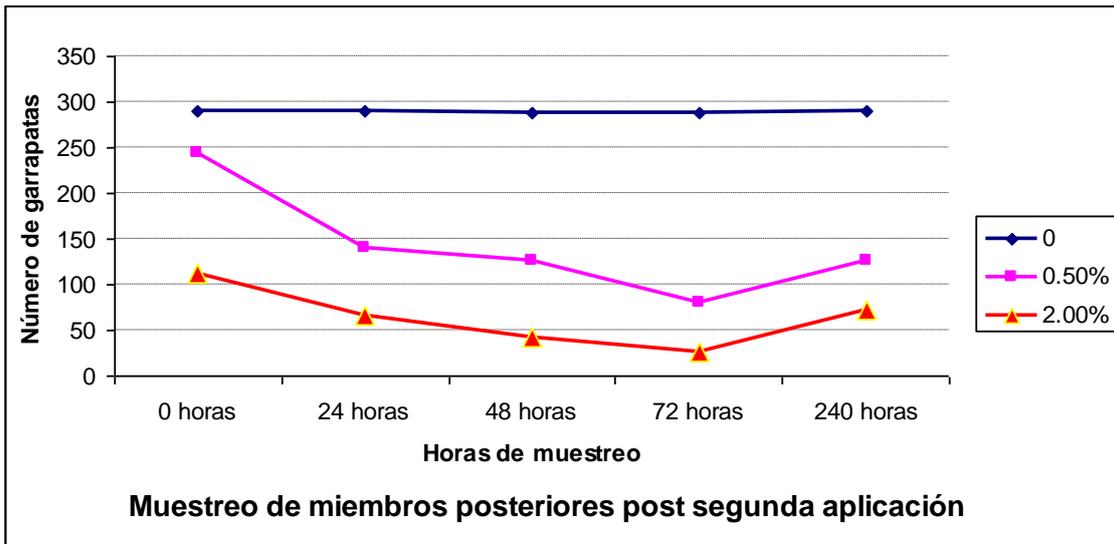
### Miembros posteriores segunda aplicación

El cuadro 7 muestra que el tratamiento con 2.0% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) tuvo un rendimiento superior en relación a los tratamientos 0% y 0.5%, comenzando la segunda aplicación con una población de 112 individuos, y que a las 72 horas reportó una mortalidad de 75.8% sobreviviendo únicamente 27 garrapatas, el tratamiento con 0.5% de extracto presentó una tasa de mortalidad del 66.80% en donde de 244 individuos sobrevivieron 81, el testigo mostró una reducción de la población del 1%.

**Cuadro 7: Porcentaje de mortalidad de garrapatas miembros posteriores (Segunda aplicación)**

TRAT	CPI	Garrapatas ( 24h)		Garrapatas ( 48h)		Garrapatas (72h)		Garrapatas (240h)	
		vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	vivas	Mortalidad (%)	Vivas	Aumento (%).
0	291	290	0.34	288	1	288	1	291	1
0.50%	244	141	42.2	127	47.9	81	66.80	127	18.84
2.00%	112	67	40.17	42	62.5	27	75.89	72	40.17

La figura 7 muestra el comportamiento de los tratamientos en los distintos periodos de muestreo denotando que el tratamiento con 2.0% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) tuvo el mejor efecto en la mortalidad de garrapatas, el cual se mantiene en constante baja hasta las 72 horas mostrando un aumento a las 240 horas (diez días), mientras que el tratamiento de 0.5% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) presentó una disminución leve desde el primer muestreo hasta las 48 horas, obteniendo que a las 72 horas muestra una disminución significativa , aumentando drásticamente a las 240 horas (diez días), y el tratamiento de 0% de semilla se mantiene con una población constante a lo largo del ensayo.

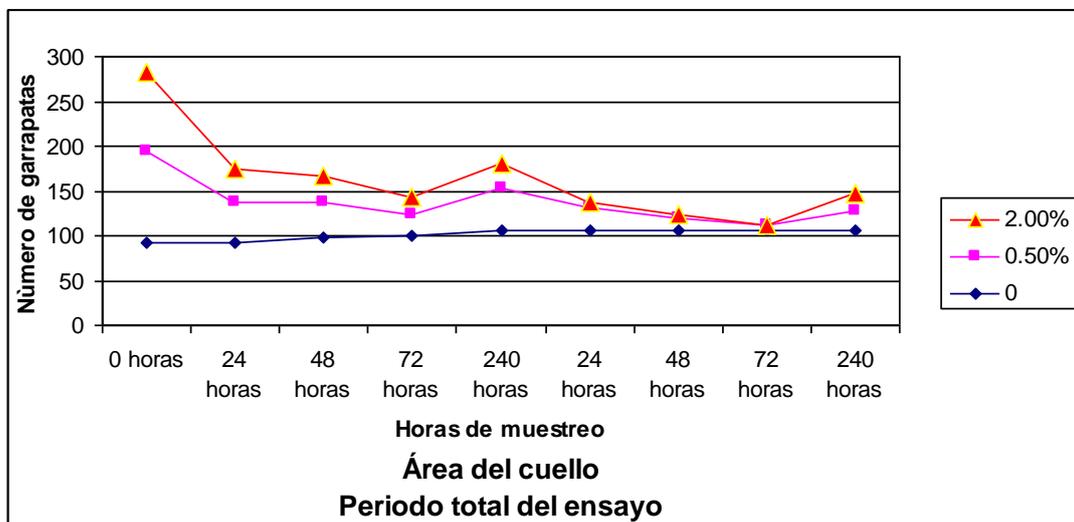


**Figura 7: Mortalidad de garrapatas en miembros posteriores (segunda aplicación)**

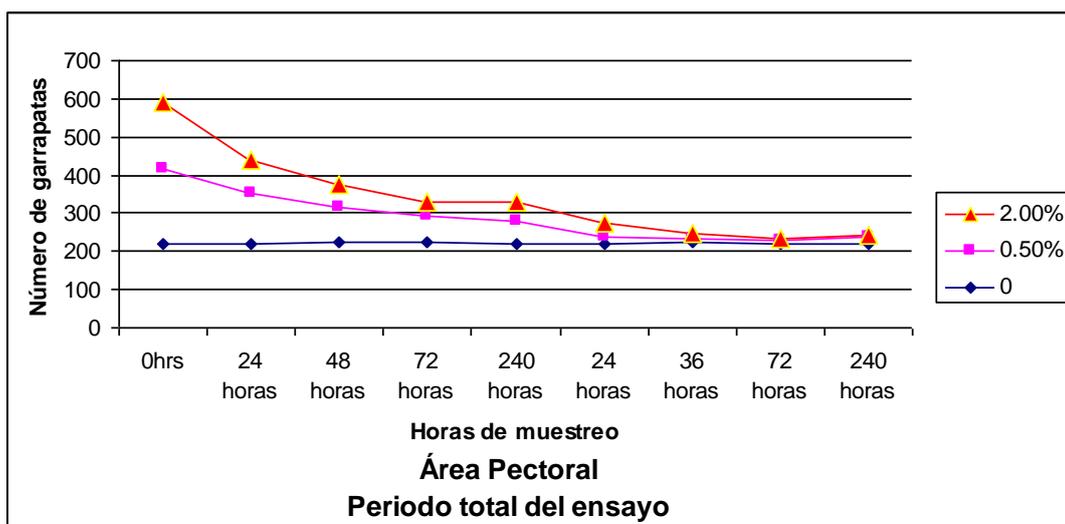
El modelo de bloques completos al azar, muestra que existe una diferencia significativa ( $P=0.0099$ ), es decir que los tratamientos muestran efectos diferentes entre la mortalidad de garrapatas (Cuadro A-13), con la prueba de contrastes ortogonales se mostró que el testigo y los tratamientos con extracto están produciendo diferentes efectos ( $P=0.0075$ ) (Cuadro A-14).

Estadísticamente los tratamientos con el 2% y 0.5% presentaron efectos similares en el control de garrapatas en bovinos ( $P=0.0825$ ) (Cuadro A-14).

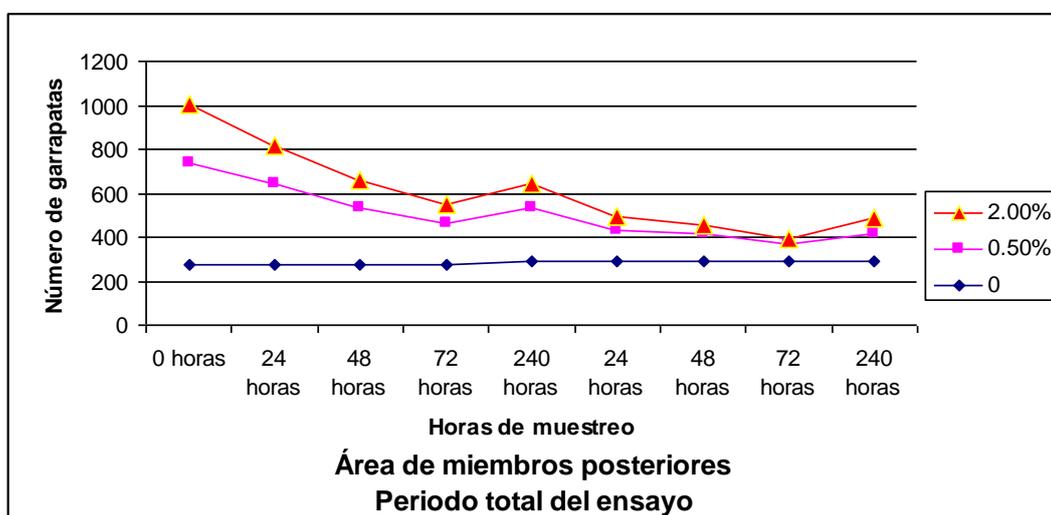
A continuación se presentan las figuras 8, 9 y 10 revela la fluctuación en la población de garrapatas por regiones corporales que se presentó a lo largo del periodo que duro el ensayo que corresponde a veinte días.



**Figura 8: Fluctuación de la población de garrapatas en la tabla del cuello**



**Figura 9: Fluctuación de la población de garrapatas en el área pectoral**



**Figura 10: Fluctuación de la población de garrapatas en miembros posteriores**

#### 4.6. Análisis económico

El cuadro 8 muestra el precio de las materias primas que se utilizaron para elaborar los tratamientos en la investigación, dichos precios estaban vigentes al momento de la fase de laboratorio.

**Cuadro 8: Costo de la materia prima**

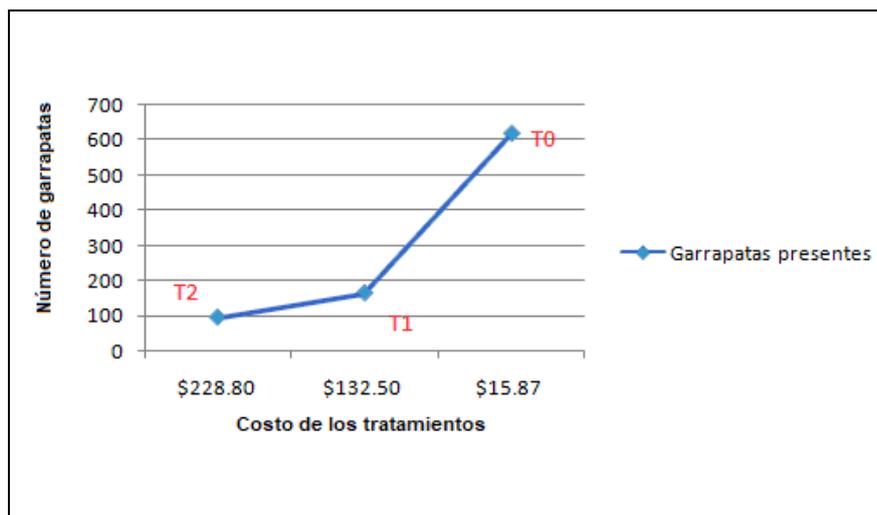
Materia Prima	Precio (\$)	Unidad
Semilla de Neem	\$50.00	kilogramo
Agua Desmineralizada	\$3.65	Litro
Etanol	\$3.12	Litro
Algodón	\$5.00	1,000 gramos

El cuadro 9 muestra el precio de elaboración por cada tratamiento para cinco bovinos, se puede observar, que el tratamiento con el mayor costo es el T2 con 2.0% de extracto etanolico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), ya que para su elaboración se necesita mayor cantidad de semilla, este tratamiento tiene un precio de fabricación de \$228.8 dólares. Seguido del T1 con el 0.5% de extracto de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) con un valor de fabricación de \$ 132.5 dólares, y el T0 ó testigo que solo incluye agua desmineralizada con un valor de \$15.87 dólares. Para los T1 y T2 se incluye el precio de utilización de laboratorio, ya que para los tratamientos se utilizo el extracto de la semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), el costo de este se basa en el arancel que el administrador del laboratorio designe. Para esta investigación el precio que se debió pagar fue de \$25.00 el día. Este costo incluye la utilización de una balanza granataria marca Ohaus Triple Beam Balance, manta de calentamiento, rotaevaporador Labconco, bomba de succión marca Buchi V700, Shiler marca PolyScience. balanza semianalítica marca Unibloc Shimadzu TW 423L, sonicador marca Sympony VWR, además el uso de cristalería de laboratorio como beakers, erlenmeyer, balones, agitadores de vidrio, pipetas Pasteur, cajas de Petri y condensadores de bolas.

**Cuadro 9: Costo de elaboración del extracto por cada tratamiento (\$)**

<b>Materia Prima/ Tratamiento</b>	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>
Semilla de Neem	-	27.50	111
Etanol	-	12.83	25.66
Algodón	-	1.25	1.25
Agua desmineralizada	15.87	15.87	15.87
LABORATORIO (3 días)	-	75.00	75.00
<b>TOTAL</b>	<b>15.87</b>	<b>132.5</b>	<b>228.8</b>

En la figura 11 se hace una relación de la eficiencia de los tratamientos, con respecto al costo de fabricación mediante el número de garrapata encontradas a las 140 horas de la investigación.



**Figura 11: Eficiencia de los tratamientos en cuanto a número de garrapatas**

Como se puede observar en la figura 18, la inversión en la elaboración del T2 produce una reducción significativa de garrapatas comparadas con el tratamiento testigo, ya que posee un 84.45% menos garrapatas, mientras que el tratamiento T1 posee un 73.30% menos que el testigo. Se puede observar que la diferencia entre los tratamientos T1 y T2 es de 26.43% menos garrapatas con un saldo favorable para el T2.

Mediante la figura 18 se puede asumir que económicamente el mejor tratamiento es el T1 ya que la fabricación de este es \$96.30 dólares menos que el T2 y la diferencia en presencia de garrapatas es de 69 individuos, generando resultados similares en las evaluaciones.

Estos valores pueden afirmar que al invertir en la elaboración de garrapaticida genera un aumento de en la calidad de los productos para el ganado de doble propósito, ya que se reduce la posibilidad de contraer enfermedades que se deriven de la infestación de garrapatas.

## 5. Discusión

Estadísticamente el modelo utilizado para la ejecución del ensayo presenta diferencias en los tratamientos en todas las regiones anatómicas estudiadas, así mismo el testigo produjo diferencias significativas en relación a los tratamientos con las dos diferentes concentraciones del extracto. Al analizar los resultados de los tratamientos estadísticamente con el Software informático InfoStat se revela que no existen diferencias significativas respecto a los efectos que tienen los tratamientos que contienen 0.5% y 2% del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en la mortalidad en garrapatas.

Según los gráficos se evidencia un descenso en la población de garrapatas hasta los tres días (setenta y dos horas), al llegar a los diez días (doscientas cuarenta horas) ya hay un incremento en la población de garrapatas, sin embargo no se presenta la misma población de garrapatas que existió sin la aplicación de los diferentes tratamientos.

El tratamiento testigo ha presentado un comportamiento homogéneo a lo largo del tiempo con pequeñas fluctuaciones en la población de garrapatas, dichas fluctuaciones no rebasan el 8% ya sea en el incremento o descenso de la población de garrapatas debido a ciclo biológico (Figura 16, 17 y 18), la digestión se observa en las hembras que están ingiriendo sangre lentamente, proceso que puede durar desde unos días a varias semanas (Estrada 2015), hembras repletas en su momento se desprenden del hospedador a colocar huevos en el suelo, luego de aproximadamente un mes bajo condiciones climáticas favorables con temperaturas del suelo superiores a 25° C y alta humedad relativa aparecen las nuevas larvas (Benavides *et al* 2016).

La dinámica de población en miembros posteriores presenta números mas altos en todos los tratamientos en relación a la reinfestación la las 240 horas (diez días), esto debido a que esta zona es predilecta para estos ectoparásitos (Figura 11), así como lo experimento González *et al* (2009), que según su estudio de las garrapatas que infestan regiones corporales de los bovinos criollo lechero, descubrió y afirmo que el mayor número de garrapatas estuvo en las ingles.

El municipio de Armenia cuenta con una temperatura promedio de 27.7° C optima para el buen desarrollo de las garrapatas ya que estas se desarrollan bien en zonas que presentan temperaturas arriba de los 25° C (Benavides *et al* 2016). Por ello se sustenta la reinfestación de los bovinos en estudio, ya que al pasar el efecto de los tóxicos que posee el Neem ésta ocurre.

La vulnerabilidad de las unidades experimentales juega un papel importante en el desarrollo del experimento y sus resultados siendo este ganado de doble propósito criollo encastado con Holstein, Pardo Suizo y Jersey, con una piel débil al ataque de las garrapatas que representa poca protección natural.

El tratamiento con el 2% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) presento siempre mejores resultados que el tratamiento con el 0.5% evidenciado en los porcentajes de mortalidad una mayoría, pero que estadísticamente no es representativo, por ello se considera que los efectos garrapaticidas de los extractos etanólicos de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) al 0.5% y al 2% presentan muy leves diferencias.

Las predicciones para el efecto de los extractos etanólicos utilizados son que actúa a lo largo del tiempo sobre las garrapatas que sobreviven interrumpiendo su ciclo vital, ya que el Neem afecta el comportamiento, crecimiento, desarrollo y fisiología de los insectos (Taiz y Zeiger 2006), por lo tanto las garrapatas que sobreviven a la aplicación de los extracto perderán su capacidad fisiológica para sobrevivir. El extracto actúa como inhibidor del desarrollo de las ninfas reduciendo la ecdisis hasta en un 50% y causando alteraciones como mudas incompletas que terminan ocasionando la muerte antes que este pueda completar su desarrollo y reproducirse (Villamil *et al.* 2012). Siendo las garrapatas arácnidos, sistemáticamente próximas a las arañas y escorpiones, y sobre todo, a los ácaros (Estrada 2015), se consideran vulnerables a la azadiractina.

Debido a que la mayor parte de las investigaciones sobre el modo de acción de la azadiractina se han hecho en insectos, partimos del conocimiento que el sistema nervioso y hormonal de los arácnidos y los insectos son similares y conociendo que la azadiractina actúa a nivel neurohormonal de los insectos (García y Castro 2012), podemos esperar que teniendo el mismo funcionamiento neuroendocrino este metabolito actuara en la fisiología de la garrapata como en la de los insectos.

En insectos y en artrópodos mandibulados el sistema neuroendocrino está formado por células neurosecretoras, y muchas de sus funciones biológicas tienen control hormonal, como la muda y la metamorfosis, la diapausa, la reproducción, los niveles de metabolitos en la linfa, la osmorregulación, cambios de coloración, la ovoposición e incubación de huevos interfiriendo así en el proceso de muda al presentarse bajos niveles de esta hormona en la hemolinfa y se considera que el efecto se da vía interferencia

neuroendocrina, interfiriendo en factores procedentes del sistema nervioso central (Consejo Superior de Investigaciones Científicas 1988).

La tendencia de la población de garrapatas por regiones se muestran en descenso en el periodo de veinte días con las dos aplicaciones a intervalos de diez días, se mostraron tres figuras (figuras 16, 17 y 18), las cuales coinciden en un descenso considerable en el número de garrapatas expresado a las 72 horas después de aplicar el producto, de igual manera coinciden en un incremento de garrapatas a las 240 horas, lo que nos lleva a la conclusión que la aplicación de los extractos etanólicos de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) deben ser llevadas a cabo antes de ese periodo de tiempo procurando que los animales se mantengan por más tiempo con una infestación mínima. Apoyados en la afirmación que hiciera Pérez (2002), expuestas a los rayos ultravioleta, las sustancias nocivas que contiene el Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) duran unos ocho días, se recomienda la aplicación cada ocho días en el combate de las garrapatas cuando la infestación fuera grande.

En el análisis económico se determinó que el extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) presentó el mejor costo (mas bajo) fue la concentración del 0.5%, por esta razón conviene utilizarla en el combate de las garrapatas en bovinos.

## 6. Conclusiones

Se determinó cualitativamente la presencia de azadiractina en los extractos obtenidos a partir de la semilla de Neem, garantizando de esta manera la presencia de este metabolito al cual se le atribuye el efecto garrapaticida.

Los tratamientos en estudio con el 0.5% y 2% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. juss) produjeron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad en garrapatas en relación al tratamiento testigo, produciendo los mejores efectos los tratamientos que contienen el extracto.

Al comparar estadísticamente el efecto que produjeron el tratamiento uno con 0.5% y en tratamiento dos con el 2% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. juss) se concluyó que estadísticamente no existen diferencias significativas entre ambos tratamientos en la mortalidad de garrapatas.

El tratamiento que presenta un menor costo es el T1 con el 0.5% de extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) ya que sus efectos son similares al T2 con el 2% del extracto y el costo es significativamente menor ya que se utiliza menor cantidad de extracto etanólico concentrado.

Debido a los resultados obtenidos se puede concluir que el Neem puede servir como alternativa natural para el control de garrapatas en bovinos, con la finalidad de reducir el uso de acaricidas químicos dañinos al medio ambiente y fauna silvestre.

## 7. Recomendaciones

Llevar a cabo mas investigaciones respecto a la preparación del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), procurando buscar una metodología que permita generar este producto de una manera más eficiente y de bajo coste económico.

Investigar el efecto garrapaticida del extracto etanólico de semilla de Neem a concentraciones inferiores al 0.5%, para determinar la concentración mínima necesaria para obtener un resultado positivo en el control de garrapatas en bovinos.

Investigar los efectos fisiológicos que se generan en las garrapatas ante la aplicación del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

Investigar y caracterizar los metabolitos que posee el Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y cuantificarlos para conocer las concentraciones presentes en un extracto de esta especie vegetal además de determinar el posible efecto sinérgico entre ellas.

Se recomienda el uso del extracto etanólico de semilla de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) al 0.5% ya que resultó ser el mejor económicamente y estadísticamente no tuvo diferencia significativas en su efecto garrapaticida en relación al tratamiento con el 2% de extracto.

## 8. Bibliografía

**Arias, D; Vázquez, G; Acosta, W; Montañes, L; Álvarez, R; Pérez, V. 2009.** Determinación de Azadiractina de los aceites esenciales del árbol de Neem (*Azadirachta Indica*) (en línea). Carabobo, Venezuela. Consultado 9 mayo. 2016. Revista Ingeniería UC, Vol. 16. N° 3. Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/ingenieria/revista/a16n3/art3.pdf>

**Berenguer, CA; Castillo, AA; Salas, HS; Puente, E; Betancourt, J; Mora, Y. 2010.** Toxicidad a dosis repetidas de *Azadirachta indica* A. Juss. (árbol del Nim) (en línea). La abana, Cuba. Consultado 9 mayo. 2016. 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)

**Benavides, E. Romero, J. Villamil, LC. 2016.** Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático. San Jose, Costa Rica. Universidad de La Salle. 91 P.

**CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR). 1997.** Resultado de 10 años de investigación silvicultural del proyecto Madeleña en Nicaragua. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Turrialba. Costa Rica. p. 103-104.

**Cerón G; Vaquerazo, V; Gonzáles, F; Vargas, J. 2010.** Diagnóstico Situacional de las Mujeres de Armenia Departamento de Sonsonete El Salvador 2011. ORMUSA. El Salvador. p. 17.

**CFSPH (Center for Food Security and Public Health, US). 2007.** *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (en línea). Iowa State University. Ames, Iowa, USA. Consultado: 22 junio. 2016. Factsheets. Disponible en: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus\\_microplus-es.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_microplus-es.pdf)

**CFSPH (Center for Food Security and Public Health, US). 2010.** Enfermedades emergentes y exóticas de los animales. Iowa State University. Ames, Iowa, USA. p. 185-186.

**Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 1988.** Insecticidas biorracionales. Madrid. España. Rascar. p. 207-208.

**Cruz, R; Domínguez García, DI; Rojas Ramírez, E; Ortíz Estrada, M; Martínez Ibañes, F. 2009.** Estrategias para el control de la garrapata *Boophilus microplus* y la mitigación de la resistencia a los pesticidas. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología veterinaria. Cuernavaca, México. p 1.

**Cruz, M. y Sánchez, RA. 2004.** El árbol de Nim: Establecimiento y aprovechamiento en la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. San Luís Potosí. México. 33 p.

**Delgado, BE. 2011.** PROPIEDADES ENTOMOTÓXICAS DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE *Azadirachta indica*, *Piper auritum* Y *Petiveria alliacea* PARA EL

CONTROL DE *Spodoptera exigua*. Tesis Maestro en ciencias en biotecnología agrícola. Chapingo, México, Universidad Autónoma Chapingo. p. 42-43.

**Escalante, A; Gardea, A; Velez, R; García, R; Carrillo, A; Cháidez, C; Partida, J. 2004.** Contenido de azadiractina en semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) colectadas en Sinaloa, México. (en Línea). Chapingo, México. Consultado 17 de agosto. 2016. Revista Fitotecnia Mexicana, vol. 27. núm. 4. p. 306. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61027402>

**Estrada, PA. 2015.** Orden Ixodida: Las garrapatas. España. (en línea). España. Consultado 06 agosto 2017. Revista IDE@ - SEA, nº 13 Disponible en: [file:///C:/Users/PC%20personal/Desktop/TESIS%20NIM/revista\\_13%20Artrópodos.pdf](file:///C:/Users/PC%20personal/Desktop/TESIS%20NIM/revista_13%20Artrópodos.pdf)

**Fanjul, ML; Fernández, F; Fuentes, B; Gonzáles, H; Hiriart, M; Massieu, L; Moreno, E; Pérez, J; Salseda, R. 1998.** Biología funcional de los animales. Siglo veintiuno editores. México. DF. p. 238-239.

**Felgueroso, A. E. 2010.** Las garrapatas como agentes transmisores de enfermedades para los animales y el hombre (en línea). España. Consultada 21 septiembre 2016. Revista Tecnología Agroalimentaria nº 9 Disponible en: <http://www.serida.org/pdfs/4812.pdf>

**Fernández, I. GA; Rodríguez, IE; Hernández Paz, AJ. 2012.** Actividad garrapaticida de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim). (en línea). Zulia, Venezuela. Consultada 26 septiembre 2016. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013;18(2): 327-340 . Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/236944023\\_Actividad\\_garrapaticida\\_de\\_Azadirachta\\_indica\\_A\\_Juss\\_nim](https://www.researchgate.net/publication/236944023_Actividad_garrapaticida_de_Azadirachta_indica_A_Juss_nim)

**García, ES. y Castro, DP. 2012.** Tópicos Avanzados em Entomología Molecular. Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Molecular. Río de Janeiro, Brasil. p. 1-10.

**Gonzáles, F. Becerril, CM. Torres, G. Días, P. 2009.** Garrapatas que infestan regiones corporales del bovino criollo lechero tropical en Veracruz, México. (en línea). Mexico. Consultado 06 agosto 2017. Revista Agrociencia, nº 43. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952009000100002](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952009000100002)

**Hurtado, EA; Bravo, JD; Arteaga, FG; Mejía, MV; García, RL. 2015.** EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLA DE NEEM (*Azadirachta indica*) COMO GARRAPATICIDA EN BOVINO. Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. Artículo científico. 4 p.

**Lamarque, A. Zygadio, J. Labuckas, D. López, L. Torres, M. Maestri, D. 2008.** Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. Córdoba, Argentina. Encuentro. p. 41-44.

**Manzano Román, R; Díaz Martín, V; Pérez Sánchez, R. 2012.** Garrapatas: Características anatómicas, epidemiológicas y ciclo vital. Detalles de la influencia de las

garrapatas sobre la producción y sanidad animal. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA, CSIC), Salamanca, España. 8 P.

**Navarrete Abarca, LR; Rodríguez, EA; Valle, CA; Vargas, MJ; Romero, LE. 2012.** Principales especies de garrapatas (ixodidae) en El Salvador. Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Medicina Veterinaria. San Salvador. ES. p. 56-60.

**Ortuño Sánchez, MF. 2006.** Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. España. AIYANA. p. 223.

**Pérez, R. 2002.** El árbol de Nim. (en línea). Carta Agropecuaria Azucarera. Consultado 14 septiembre 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/search/es/?cx=018170620143701104933%3Aqq82jsfba7w&q=carta+agropecuaria+azucarera+neem&cof=FORID%3A9&siteurl=www.fao.org%2Fabout%2Fmeetings%2Finformation%2Ffaq%2Fes%2F&ref=www.google.com.sv%2F&ss=7245j1966675j33>

**Rivera, I; Meliá, A; Torralba, A. 2015.** Introducción y guía visual de los artrópodos. España. (en línea). España. Consultado 22 agosto 2016. Revista IDE@ - SEA, nº 2 Disponible en: [file:///C:/Users/PC%20personal/Desktop/TESIS%20NIM/IDE@\\_2%20artropodos%20Riveta%20et%20al..pdf](file:///C:/Users/PC%20personal/Desktop/TESIS%20NIM/IDE@_2%20artropodos%20Riveta%20et%20al..pdf)

**Solano Oria, E. Pérez Pardo, E. Tomas Alonso, F. 1991.** Prácticas de laboratorio de química orgánica. Murcia, España. Universidad de Murcia, Secretariado de Publicaciones. p. 35.

**Taiz, L. y Zeiger, E. 2006.** Fisiología Vegetal. Universitat Jaume. Los Ángeles, CA. p.541.

**USDA (U. S. Department of Agriculture). 2001.** Effect of Neem Extract on the Brown Citrus Aphid, *Toxoptera citricida* and it's Parasitoid, *Lysiphlebus testaceipes* (en línea). USA. Agricultural Research Service. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/sp2UserFiles/Place/60340505/EffectofNeamExtract.pdf>

**Villamil Montero, DA. Naranjo, N; Van Strahlen, MA. 2012.** Efecto Insecticida del Extracto de Semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Collaria scenica* Stal (Hemiptera: Miridae) (Artículo). Sao Paulo, Brasil. Copyright © EntomoBrasilis. PDF.

## 9. Anexos

### Cuadro A-1: Carga parasitaria inicial (CPI) y carga parasitaria Final (CPF).

Carga parasitaria inicial (CPI) - carga parasitaria final (CPF)

Tratamiento	Cuello		Pecho		Piernas	
	CPI	CPF	CPI	CPF	CPI	CPF
0	15	13	58	16	76	62
0	16	16	48	42	46	58
0	26	16	36	6	41	32
0	16	11	32	12	54	26
0	19	9	44	11	54	44
1	17	0	55	0	134	23
1	18	1	37	13	88	22
1	33	7	24	0	74	30
1	13	7	44	0	78	13
1	21	7	39	3	92	39
2	19	4	31	0	31	18
2	25	2	34	0	67	9
2	12	2	31	0	68	1
2	15	11	31	0	37	20
2	17	0	45	5	61	24

Fuente: Propia

### Cuadro A-2: Matriz de datos recopilados

Número de garrapatas originales y transformados (Log10).

PRIMERA APLICACION											SEGUNDA APLICACION								
AREA DE LA TABLA DEL CUELLO																			
TRA	(CPI) 0 horas		24 horas		48 horas		72 horas		240 horas		TRA	24horas		48horas		72horas		240horas	
	#	LOG1	#	LOG1	#	LOG1	#	LOG1	#	LOG1		#	LOG1	#	LOG1	#	LOG1	#	LOG1
T	as	0	s	0	s	0	s	0	s	0	T	as	0	as	0	as	0	as	0
0	15	1.20	15	1.20	19	1.30	19	1.30	20	1.32	0	20	1.32	19	1.30	19	1.30	23	1.38
0	16	1.23	16	1.23	18	1.28	18	1.28	24	1.40	0	24	1.40	24	1.40	24	1.40	20	1.32
0	26	1.43	25	1.41	26	1.43	27	1.45	24	1.40	0	24	1.40	25	1.41	25	1.41	28	1.46
0	16	1.23	17	1.26	17	1.26	17	1.26	19	1.30	0	19	1.30	19	1.30	19	1.30	20	1.32
0	19	1.30	19	1.30	19	1.30	19	1.30	18	1.28	0	18	1.28	19	1.30	19	1.30	15	1.20
1	17	1.26	9	1.00	9	1.00	2	0.48	14	1.18	1	7	0.90	4	0.70	0	0.00	0	0.00
1	18	1.28	5	0.78	0	0.00	0	0.00	3	0.60	1	2	0.48	0	0.00	0	0.00	1	0.30
1	33	1.53	10	1.04	10	1.04	7	0.90	16	1.23	1	11	1.08	6	0.85	2	0.48	7	0.90
1	13	1.15	12	1.11	10	1.04	6	0.85	8	0.95	1	1	0.30	1	0.30	1	0.30	7	0.90
1	21	1.34	10	1.04	10	1.04	8	0.95	6	0.85	1	6	0.85	2	0.48	2	0.48	7	0.90

2	19	1.30	2	0.48	1	0.30	1	0.30	5	0.78	2	2	0.48	2	0.48	0	0.00	4	0.70
2	25	1.41	4	0.70	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	2	0.48
2	12	1.11	5	0.78	3	0.60	0	0.00	7	0.90	2	2	0.48	2	0.48	0	0.00	2	0.48
2	15	1.18	13	1.15	12	1.11	10	1.04	14	1.18	2	2	0.48	1	0.30	1	0.30	11	1.08
2	17	1.26	13	1.15	12	1.11	10	1.04	2	0.48	2	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00

**AREA PECTORAL**

TRA	Carga parasitaria		24 horas		48 horas		72 horas		240 horas		TRA	24horas		48horas		72horas		240hora	
T	# garrapatas	LOG1	# garrapatas	LOG1	# garrapatas	LOG1	# garrapatas	LOG1	# garrapatas	LOG1	T	# garrapatas	LOG1						
0	58	1.77	58	1.77	58	1.77	59	1.78	59	1.78	0	59	1.78	59	1.78	57	1.76	60	1.79
0	48	1.69	48	1.69	48	1.69	47	1.68	46	1.67	0	46	1.67	45	1.66	45	1.66	49	1.70
0	36	1.57	36	1.57	39	1.60	39	1.60	37	1.58	0	37	1.58	39	1.60	39	1.60	34	1.54
0	32	1.52	32	1.52	33	1.53	31	1.51	30	1.49	0	30	1.49	31	1.51	31	1.51	34	1.54
0	44	1.65	45	1.66	45	1.66	46	1.67	48	1.69	0	48	1.69	48	1.69	48	1.69	44	1.65
1	55	1.75	22	1.36	11	1.08	6	0.85	8	0.95	1	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
1	37	1.58	22	1.36	15	1.20	10	1.04	8	0.95	1	0	0.00	0	0.00	0	0.00	13	1.15
1	24	1.40	26	1.43	14	1.18	10	1.04	13	1.15	1	1	0.30	0	0.00	0	0.00	0	0.00
1	44	1.65	36	1.57	28	1.46	20	1.32	17	1.26	1	5	0.78	5	0.78	0	0.00	0	0.00
1	39	1.60	27	1.45	25	1.41	24	1.40	12	1.11	1	10	1.04	8	0.95	8	0.95	3	0.60
2	31	1.51	4	0.70	2	0.48	1	0.30	15	1.20	2	16	1.23	3	0.60	2	0.48	0	0.00
2	34	1.54	18	1.28	14	1.18	12	1.11	7	0.90	2	3	0.60	0	0.00	0	0.00	0	0.00
2	31	1.51	24	1.40	15	1.20	4	0.70	2	0.48	2	4	0.70	0	0.00	0	0.00	0	0.00
2	31	1.51	8	0.95	5	0.78	5	0.78	8	0.95	2	3	0.60	3	0.60	0	0.00	0	0.00
2	45	1.66	35	1.56	22	1.36	17	1.26	18	1.28	2	12	1.11	5	0.78	5	0.78	5	0.78

**AREA DE MIEMBROS POSTERIORES**

TRA	Carga parasitaria		24 horas		48 horas		72 horas		240 horas		TRA	24horas		48horas		72horas		240hora	
T	# garrapatas	LOG1	# garrapatas	LOG1	# garrapatas	LOG1	# garrapatas	LOG1	# garrapatas	LOG1	T	# garrapatas	LOG1						
0	76	1.89	80	1.91	77	1.89	77	1.89	87	1.94	0	86	1.94	83	1.92	83	1.92	90	1.96
0	46	1.67	46	1.67	46	1.67	45	1.66	52	1.72	0	52	1.72	54	1.74	54	1.74	53	1.73
0	41	1.62	43	1.64	43	1.64	43	1.64	51	1.72	0	51	1.72	51	1.72	51	1.72	49	1.70
0	54	1.74	53	1.73	51	1.72	52	1.72	44	1.65	0	44	1.65	43	1.64	43	1.64	40	1.61
0	54	1.74	54	1.74	55	1.75	55	1.75	57	1.76	0	57	1.76	57	1.76	57	1.76	59	1.78
1	134	2.13	113	2.06	63	1.81	21	2.35	65	1.82	1	36	1.57	20	1.32	14	1.18	23	1.38
1	88	1.95	56	1.76	44	1.65	26	1.43	72	1.86	1	30	1.49	38	1.59	14	1.18	22	1.36
1	74	1.88	57	1.76	45	1.66	41	1.62	38	1.59	1	22	1.36	21	1.34	13	1.15	30	1.49
1	78	1.90	59	1.78	33	1.53	30	1.49	25	1.41	1	11	1.08	6	0.85	1	0.30	13	1.15
1	92	1.97	80	1.91	77	1.89	75	1.88	44	1.65	1	42	1.63	42	1.63	39	1.60	39	1.60
2	31	1.51	24	1.40	20	1.32	16	1.23	37	1.58	2	14	1.18	13	1.15	8	0.95	18	1.28
2	67	1.83	24	1.40	10	1.04	0	0.00	23	1.38	2	15	1.20	7	0.90	7	0.90	9	1.00
2	68	1.84	35	1.56	21	1.34	18	1.28	21	1.34	2	14	1.18	2	0.48	2	0.48	1	0.30
2	37	1.58	35	1.56	28	1.46	28	1.46	15	1.20	2	12	1.11	8	0.95	3	0.60	20	1.32
2	61	1.79	59	1.78	44	1.65	19	1.30	16	1.23	2	12	1.11	12	1.11	7	0.90	24	1.40

**Cuadro A-3: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en la tabla del cuello (Primera aplicación)**

F. V.	SC	GI	CM	F	p- valor
Modelo	1.14	2	0.57	6.31	0.0134
TRAT	1.14	2	0.57	6.31	0.0134
Error	1.08	12	0.09		
Total	2.22	14			

**Cuadro A-4: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en la tabla del cuello (Primera aplicación)**

TRAT	Contraste	E.E.	SC	GI	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.53	0.16	0.92	1	0.92	10.21	0.0077
Contraste 2	0.29	0.19	0.22	1	0.22	2.41	0.1466
Total			1.14	2	0.57	6.31	0.0134

**Cuadro A-5: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en la tabla del cuello (Segunda aplicación)**

F. V.	SC	GI	CM	F	p- valor
Modelo	1.95	2	0.98	8.52	0.0050
TRAT	1.95	2	0.98	8.52	0.0050
Error	1.38	12	0.11		
Total	3.33	14			

**Cuadro A-6: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en la tabla del cuello (Segunda aplicación)**

TRAT	Contraste	E.E.	SC	GI	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.76	0.19	1.95	1	1.95	16.97	0.0014
Contraste 2	0.06	0.21	0.01	1	0.01	0.07	0.7996
Total			1.95	2	0.98	8.52	0.0050

**Cuadro A-7: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en área pectoral (Primera aplicación)**

F. V.	SC	Gl	CM	F	p- valor
Modelo	1.31	2	0.66	15.31	0.0005
TRAT	1.31	2	0.66	15.31	0.0005
Error	0.51	12	0.04		
Total	1.82	14			

**Cuadro A-8: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en área pectoral (Primera aplicación)**

TRAT	Contraste	E.E.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.62	0.11	1.27	1	1.27	29.76	0.0001
Contraste 2	0.12	0.13	0.04	1	0.04	0.86	0.3722
Total			1.31	2	0.66	15.31	0.0005

**Cuadro A-9: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en área pectoral (Segunda aplicación)**

F. V.	SC	Gl	CM	F	p- valor
Modelo	6.56	2	3.28	24.71	0.0001
TRAT	6.56	2	3.28	24.71	0.0001
Error	1.59	12	0.13		
Total	8.15	14			

**Cuadro A-10: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en área pectoral (Segunda aplicación)**

TRAT	Contraste	E.E.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	1.39	0.20	6.46	1	6.46	48.71	0.0001
Contraste 2	0.19	0.23	0.09	1	0.09	0.71	0.4162
Total			6.56	2	3.28	24.71	0.0001

**Cuadro A-11: Cuadro de análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable sobre la variable Carga parasitaria en miembros posteriores (Primera aplicación)**

F. V.	SC	Gl	CM	F	p- valor
Modelo	0.47	2	0.23	10.47	0.0023
TRAT	0.47	2	0.23	10.47	0.0023
Error	0.27	12	0.02		
Total	0.74	14			

**Cuadro A-12: Contrastes Ortogonales sobre la variable sobre la variable Carga parasitaria en miembros posteriores (Primera aplicación)**

TRAT	Contraste	E.E.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.25	0.08	0.21	1	0.21	9.46	0.0096
Contraste 2	0.32	0.09	0.26	1	0.26	11.48	0.0054
Total			0.59	2	0.23	10.47	0.0023

**Cuadro A-13: Análisis de varianza (SC tipo III) sobre la variable Carga parasitaria en miembros posteriores (Segunda aplicación)**

F. V.	SC	Gl	CM	F	p- valor
Modelo	1.09	2	0.55	6.94	0.0099
TRAT	1.09	2	0.55	6.94	0.0099
Error	0.95	12	0.08		
Total	2.04	14			

**Cuadro A-14: Contrastes Ortogonales sobre la variable Carga parasitaria en miembros posteriores (Segunda aplicación)**

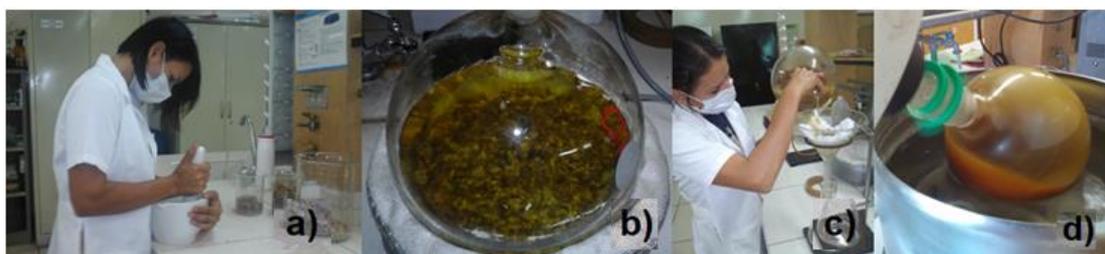
TRAT	Contraste	E.E.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.49	0.15	0.81	1	0.81	10.30	0.0075
Contraste 2	0.34	0.18	0.28	1	0.28	3.59	0.0825
Total			1.09	2	0.55	6.94	0.0099

**Figura A-1: Cosecha de la semilla**



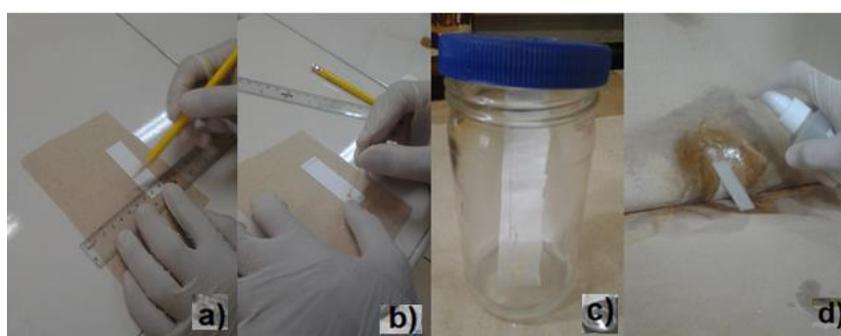
a) Recolección, b) despulpado y c) secado de la semilla de Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss).

**Figura A-2: Proceso de elaboración del extracto etanólico de semilla de Neem**



a) Triturado de la semilla, b) Semilla en reflujo, c) filtrado, d) secado de la muestra en el rotaevaporador.

**Figura A-3: Identificación de la azadiractina por cromatografía de capa fina**



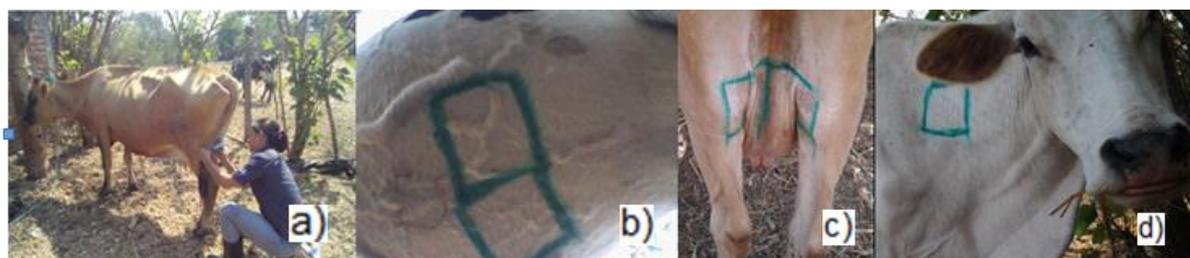
a) y b) colocación de la muestras en la placa, c) fase móvil de la prueba, d) rociado de la placa con vainillina.

**Figura A-4: Elaboración de las soluciones del extracto**



a) y b) dilución del extracto, c) soluciones ya preparadas y listas para ser utilizadas.

**Figura A-5: Delimitación de las regiones anatómicas para toma de muestras**



a), b), c) y d) marcaje de las zonas cutáneas seleccionadas para el muestreo.

**Figura A-6: Aplicación de las diferentes concentraciones del extracto**

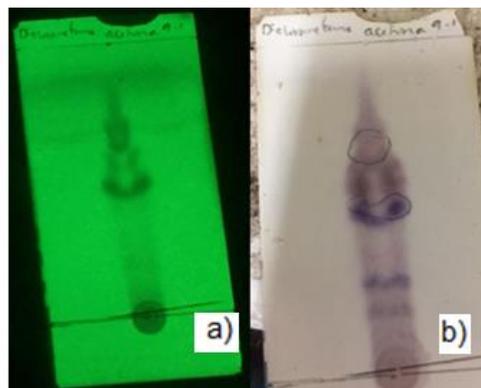


a) Adición del extracto a la bomba, b) bomba utilizada, c) Conteo previo, C) aplicación de las soluciones.

**Figura A-7: Apariencia física del extracto etanólico de semilla de Neem**



**Figura A-8: Revelado Cromatográfico para determinación de azadiractina**



a) Revelado Físico, b) Revelado químico.