



Uso de Azadirachta indica como control larvario del Anopheles albimanus.
Pruebas in vitro.

ENSAYO EXPERIMENTAL

PRESENTADO POR:

Msc Antonio Vásquez Hidalgo
Microbiólogo Medico Salubrista
Docente Universidad de El Salvador

SAN SALVADOR MAYO DE 1999

INDICE

3.	<i>Resumen</i>
4.	<i>Abstract</i>
5.	<i>Introducción</i>
7.	<i>Objetivos</i>
8.	<i>Marco Teórico</i>
14.	<i>Material y Métodos</i>
17.	<i>Resultados</i>
31.	<i>Discusión</i>
34.	<i>Conclusiones</i>
35.	<i>Recomendaciones</i>
36.	<i>Referencias Bibliográficas</i>
	<i>Anexos</i>

R

ESUMEN

Uso de la solución acuosa de *Azadiractha indica* en el Control de larvas *Anopheles albimanus*. 1999

OBJETIVO. Determinar la eficacia del extracto acuoso *Azadiractha indica* para el control vectorial del *Anopheles albimanus* en áreas endémicas.

El estudio tiene como propósito investigar ¿ Cual es la eficacia y concentración adecuada del extracto acuoso de *Azadiractha indica* en el control de vectores de *Anopheles albimanus* realizados en pruebas *in vitro* durante los meses de marzo y abril de 1999? .

METODO. Se utilizó un diseño experimental *in vitro*, con una significancia estadística del 5 % y un nivel de confianza 95 %. La muestra fue de 1000 larvas de *Anopheles albimanus* tratados con concentraciones de 2.5 %, 5 % y 10 %, durante 8 semanas, clasificando taxonómicamente la especie y estadio larvario.

RESULTADO. Al utilizar la concentración del 10 % se obtuvo una dosis letal (DI_{100}), observando “desintegración” de las larvas a las 24 hrs evitando el desarrollo a la fase adulta.

CONCLUSION. La utilidad de *Azadiractha indica* para controlar el vector del Paludismo en pruebas *in vitro* tiene un efecto larvicida.

PALABRAS CLAVE. Solución acuosa, *Azadiractha indica*, *Anopheles albimanus*, larvicida.

**BSTRAC**

Use of the watery solution of *Azadirachta indica* in the control of *Anopheles albimanus*. 1999.

OBJETIVE. Determinate the efficacy of the extract watery *Azadirachta indica* in the endemic areas for the vectorial control of the *Anopheles albimanus*.

¿Does the study have like purpose investigate which is it the efficacy and concentration adapted it of the watery extract of *Azadirachta indica* in the control of vectores of *Anopheles albimanus* carried out in tests in vitro during the months of march and april of 1999?.

METHOD. I am used a design experimental in vitro, with a statistical significance of the 5 % and level of trust of 95 %, the sample was from 1000 larvas of *Anopheles albimanus* tried with concentrations of 2.5 %, 5 % and 10 % for 8 weeks, classifying taxonomical the species and condition larvas.

RESULT. Upon using the concentration of the 10 % a lethal dose (DI_{100}) was obtained, observing the larvas “ desintegration” to the 24 hrs avoiding the development the mature phase.

CONCLUSION. The utility of the *Azadirachta indica* in order to control the vector of Paludism in test in vitro has and effect larvicida.

KEYS WORDS. Watery solution, *Azadirachta indica*, *Anopheles albimanus*, larvicide.

INTRODUCCION

A nivel mundial la Malaria o Paludismo se considera como una de las Enfermedades que ha ocupado algún lugar en las diez primeras causas de morbilidad y mortalidad, de los reportes epidemiológicos del Ministerio de Salud. Localizado en áreas endémicas y epidémicas con un alto riesgo en todas las regiones del planeta.¹

Se hacen esfuerzos mundiales auspiciados o dirigidos por la OMS, OPS y otros, para controlar y erradicar el vector, pero que hasta el momento ha sido imposible de lograr resultados prometedores. Se han utilizado diversos métodos de control, en las que se destaca el uso de químicos en las plantaciones y áreas domiciliarias, con el consiguiente riesgo de causar intoxicaciones en el ser humano.²

Al momento la malaria es un problema de salud Pública y de gobiernos, debido a que se invierten millones de dólares en erradicar el vector y tratar la enfermedad, derivados del presupuesto nacional asignado a salud.

El Salvador no es la excepción, debido a que por su climatología y densidad poblacional, hace favorable la transmisión palúdica, con predominio en la estación seca y lluviosa con temperaturas entre 22⁰C a 30⁰C en zonas costeras o sabanas tropicales y desplazamiento en alturas menores de 300 mts hacen propicio condiciones ideales para su estancia y propagación.

El 80-90% del total de casos del país según reporte de Malaria del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), se ubica en áreas hiperendémicas (principalmente en la costa del Pacífico). (Anexo 1) Las tasas reportadas con mayor números de casos han sido en los años: 1996,1968,1975,1976,1978,1980,1981,1992 y 1996, con un rango entre 5000 a 96,000 casos infectados con Malaria y una tasa de 200 a 2,600 X 10.000 hab. ³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El control de la Malaria en El Salvador se hace imprescindible la búsqueda sistemática y pragmática de investigaciones hacia el control vectorial, de tal manera que al identificar el problema, se puede formular de la siguiente manera: ¿ Es la utilización del extracto acuoso de *Azadirachta indica* en el control larvario del *Anopheles albimanus* realizado por pruebas in vitro, puede controlar a disminuir la incidencia y prevalencia de la Malaria en El Salvador en zonas endémicas?.

JUSTIFICACION.

Al utilizar este tipo de planta como ovocida y larvicida pueden ser una alternativa de solución a nivel de plantaciones (cultivos) y de ríos o aguas estancadas, pilas etc. Debido a que el producto es natural no tóxico al ser humano y biodegradable, así como es factible económicamente de administrar a concentraciones viables de tratar. Evitando en lo posible la importación de millones de kg en insecticidas.

OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar la eficacia del extracto acuoso de *Azadiractha indica* en el control vectorial del *Anopheles albimanus* como transmisor del Paludismo en áreas endémicas.

ESPECIFICOS:

1. Determinar la dosis letal en grupos de población larvaria.
2. Realizar pruebas in vitro para determinar concentraciones con efecto larvicida.
3. Conocer y observar el efecto larvicida a nivel experimental de la planta sobre el vector.

MARCO TEORICO

ANTECEDENTES HISTORICOS.

En El Salvador desde hace varias décadas, se han realizado esfuerzos con diversos métodos de vigilancia, control y erradicación entomológica de los vectores en zonas endémicas ya identificadas en las comunidades urbano marginales y rurales de nuestro país por el MSPAS.

└ En el **año 1900** se creó el primer “ cuerpo de Inspectores Sanitarios” limitado solamente al control físico de los criaderos de zancudos.

└ De **1900 a 1937** se registra un incremento en la morbilidad y mortalidad registrados en los establecimientos de salud, ocupando las primeras diez causas epidemiológicas.

└ En **1938** se crea la “ Sección de Malariología y lucha Antipalúdica “ con el objeto de conocer la Epidemiología del Paludismo y realizar mejores intervenciones.

└ En **1942** se inician los primeros drenajes en seis departamentos del país, entre ellos San Miguel, Usulután, Ahuachapan, La Unión, Sonsonate, Santa Ana, principalmente en las zonas costeras.

└ En **1945 a 1946** se inician “ rociados” intradomiciliarios por métodos químicos (DDT) con efectos adversos a la salud de la población, pero con un nivel de control parcial hasta la fecha, debido a que el vector a creado una resistencia por su uso indiscriminado.

└ En **1954** se anuncia la erradicación de la Malaria por el uso de insecticidas de acción residual.

└ En **1955** se hace “ la Campaña Nacional Antipalúdica” integrado por las áreas de: Educación Sanitaria y Administrativa.

└ En **1956** se decreta la ley “Defensa contra el Paludismo “ e integrando los colaboradores voluntarios al programa de malaria.

└ De **1957 a 1980** la incidencia y prevalencia disminuyó sin llegar a Epidemias, con una incidencia Parasitaria anual (IPA) a niveles bajos de 3.0 a 14.8, con una tasa de 1,2 x 100,000 hab.

└ De **1980 a 1998** se han introducido nuevos métodos químicos de control más agresivos derivados de peritroides; métodos físicos como eliminación de rellenos, aguas estancadas, uso de mosquiteros; métodos biológicos como uso de *Bacillus thuringiensis* que esta en fase de estudio por el MSPAS pero por su alto costo y presencia de larvas muertas, no se ha implementado su uso a gran escala.

└ En **1993** la OMS tomó el liderazgo en la “ Declaración Mundial en la lucha Antipalúdica” en coordinación con los estados miembros para crear sistemas eficaces de Vigilancia y control epidemiológico local.

I. Macromorfología del Vector. ^{1,5-10}

En El Salvador son frecuentes las especies de *P. vivax* y *P. falciparum*, con mayor incidencia a *P. vivax*. Las otros especies como *P. ovale* y *P. malarie* no se han reportado casos en el país, a excepción en otras áreas Centroamericanas.

Se han reportado mas de 150 especies a nivel mundial, de estas las especie de *Anopheles albimanus* es la principal responsable de la transmisión palúdica.

La especie se divide en macho y hembra, pero que solamente la hembra es la principal transmisora del paludismo por ser hematofaga el macho no, e intradomiciliar. Su

mayor frecuencia se encuentra en charcos, pilas, zanjas y cultivos agrícolas. La prevalencia es mayor en la estación lluviosa. (anexo 2)

1.1 Estadíos.

El **vector** comprende cuatro estadíos: huevo, larva, pupa y adulto. (anexo 2)

Huevo: están envueltos por una cápsula denominada corión, con una envoltura externa e interna, son alargados en forma de “canoas”, presentando una cara cóncava, ventral y una cara convexa, dorsal. Los huevos se encuentran localizados en la superficie del agua, manteniéndose a flote por medio de cámaras de aire denominados flotadores. El flotado varía de especie a especie. Se encuentran agrupados entre 75 a 150 y eclosionan a los 2-3 días a temperaturas de 25 a 30 C.

Larvas: se distinguen por la ausencia de sifón utilizado como aparato de respiración, se posan en ángulo horizontal, tiene un movimiento característico en movimiento alterno y no en ocho, su desarrollo a adulto es a los 7 a 10 días. (anexo 2)

Pupas: tienen por característica flotar en la superficie, respirando por las estructuras denominadas “trompetillas”. No se alimentan en esta fase, duran de 2-3 días.

Adultos: existen diferencias estructurales entre el macho y la hembra, se diferencian por que la hembra tiene pelos largos, así como palpos maxilares más grandes que otras especies. Las hembras necesitan de 2.4 mm³ de sangre para iniciar la maduración de los huevos, tiene periodicidad nocturna, se posa en ángulo de 45 grados. (anexo 2)

1.2 Ciclo de Vida

Presenta dos ciclos de vida: 1. Ciclo esporogónico que se realiza en el mosquito. El mosquito al picar a una persona infectada con malaria ingiere los

microgametocitos y macrogametocitos que se encuentran circulando en sangre, es en el estómago del mosquito los gametocitos sufren un proceso de exflagelación convirtiéndose en células sexuales. El microgametocito fecunda a un macrogameto para formar el huevo o cigoto. El huevo se transforma en ooquineto y penetra la pared intestinal del mosquito transformándose en ooquiste aproximadamente a los 7 días, luego se forman los esporozoitos que al madurar liberan hasta 10,000 esporozoitos por ooquiste según la especie, estos migran a las glándulas salivales hasta que el mosquito “pique” a otra persona.

2. Ciclo Esquizogónico. Se realiza en el hombre y se inicia con la inoculación de los esporozoitos infectantes por la picadura de la hembra *Anopheles albimanus*. Este ciclo comprende dos fases: a) fase pre-eritrocítica. En esta fase los esporozoitos circulan en sangre entre media a una hora, penetrando a las células hepáticas evolucionando a esquizonte exoeritrocítico a las 6 a 12 días, cuando maduran rompen la célula hepática y liberan miles de merozoitos que invaden los glóbulos rojos. La cantidad de merozoitos liberados depende de cada especie. B) fase Eritrocítica. En esta fase los trofozoitos se transforman en esquizontes eritrocíticos formando merozoitos que al romper el glóbulo rojo se liberan para ir a invadir a otros eritrocitos, cuando se liberan producen el cuadro clínico de malaria. (**anexo 2**)

1.3 Características Micromorfológicas.

Existen características diferenciales de las especies del género Plasmodium que parasitan al hombre por frotis coloreados. En el caso del *Plasmodium vivax* su período de incubación es 8-31 días, el trofozoito y esquizonte es grande, con cromatina abundante, el número de merozoitos es de 10 a 24 , el microgametocito es esférico con citoplasma azul

pálido, el macrogametocito es grande, período de desarrollo en el mosquito es de 30 días o más, duración fase asexual es 48 hrs.

En el *Plasmodium falciparum* su período de incubación es 7-27 días, el trofozoito es pequeño, causa infección múltiple en el eritrocito, el trofozoito es mediano, el esquizonte es pequeño, número de merozoitos de 8-26, el microgametocito es en forma de salchicha, macrogametocito es en forma de media luna, su período de desarrollo en el mosquito es de 10-23 días, duración fase asexual 36-48 hrs.

El *Anopheles albimanus* se clasifica en: Reino: Animal, Phylum: Artrópodo, Clase: insecta, Orden: Diptera, Suborden: Nematocera, Familia: Culicidae, subfamilia: Anophelidae, Género: anopheles y especie: *vivax*, *falciparum*, *ovale* y *malariae*.

La identificación de los parásitos intracelulares en sangre se hace por extendidos de sangre periférica o gota gruesa, con tinción de Giemsa o Wright.

II. Cuadro Clínico de Malaria.

2.2 Períodos clínicos.

Existen tres períodos característicos de la enfermedad, a saber: 1. Período de escalofrío. Dura de 15 minutos a 1 hora, el paciente sufre temblores con bajas temperaturas, piel fría y cianótica, en niños pueden presentarse convulsiones. 2. Período febril. La fiebre dura de 3-4 hrs, puede presentarse cada 2,3,4 días, de ahí el nombre terciana o cuartana, el período febril coincide con la ruptura de los eritrocitos parasitados, 3. Período de

Sudoración. Dura de 2-3 hrs, luego posteriormente cede, el paciente se siente mejorado hasta que aparece otro episodio.

Existen otros síntomas que son concomitantes al cuadro, como son: cefalea, lumbalgias, vómitos, osteomiasias, palidez y otros.

Entre las formas de malaria más predominante están: fiebre terciana benigna, fiebre terciana maligna, malaria latente, malaria congénita, recaídas y recrudescencias. Los casos de Paludismo pueden deberse a: congénito, introducido, transfusional e importado.

III. Patogenia.

- 3.1. Eritrocito. Los cambios que sufren los eritrocitos principalmente son: pérdida de electrolitos, aumento fragilidad capilar, anoxia, ruptura del globulo, hemolisis, bloqueo capilar, aumento de la adhesividad capilar, alteraciones de la coagulación.
- 3.2. Daño anatómico. Se producen principalmente hepatoesplenomegalia, encefalopatía cerebral, glomerulonefritis, miocarditis entre otros.

IV. Principales Métodos de Control.

Entre los principales métodos de control utilizados a nivel mundial,¹¹⁻²¹ están: 1. Método químico. Se han descrito dos: insecticida y hervicida, derivados de organofosforados y organoclorados, peritroides y otros. Son considerados como métodos temporales. En la última década se han reportado casos de resistencia especialmente a los organofosforados, organoclorados y peritroides.²²⁻²⁵ También se ha encontrado transmisión hereditaria por genes a nuevas generaciones de **Anopheles** e incluso se ha encontrado resistencia al calor.²⁶ , 2. Control físico, 3. Control Patógeno, 4. Control Personal, 5. Control Cultural, 6. Control Biológico, 7. Control Natural y 8. Control legal. (**anexo 3**)

V. **Descripción Botánica de la Planta.** ²⁷⁻³⁰

Taxonómicamente la planta se clasifica en: Reino: plantae, División: Magnoliophyta, Clase: Dicotiledonea, Familia: Meliaceae, Genero: Azadirachta, especie: indica, Nombre científico: *Azadirachta indica*. La planta esta formada por hojas compuestas, alternas y aserradas, flores de color blanco, actinomorfas, hermafroditas, pequeñas, contiene 5 pétalos libres, con estambres soldados, con 5 carpelos, ovarios supero frutos números globulosos de 12 a 20 mm, verdes y amarillos al madurar, es un árbol de raíces profundas de tamaño mediano. (**anexo 4**)

Por estudios bromatológicos esta formado por moléculas pentameras y hexagonales, conteniendo compuestos cetónicos, alcoholes, carboxilicos, éteres y otros. ³¹

La planta no necesita condiciones optimas para su crecimiento y desarrollo, se adapta con facilidad a cualquier tipo de suelo o clima, pero preferentemente en condiciones semiáridas. El fruto es de sabor amargo.

MATERIAL Y METODOS.

El trabajo de investigación en parte se realizó en Trabajo de campo y bioterio de la facultad de medicina, durante un periodo de dos meses de marzo a abril de 1999. Para el estudio se utilizó un diseño experimental o diseño por bloques al azar, con un nivel de confianza del 95 % y un error de estimación de un 0.05 %, para una población de 1000 larvas y una muestra de 600 larvas de *Anopheles albimanus*.

Se plantearon dos hipótesis de investigación: **Ho nula:** la eficacia en el uso del extracto de *Azadiractha indica* difiere en el control del *Anopheles albimanus* en las pruebas in vitro.

H1 de Investigación: la eficacia en el uso del extracto de *Azadiractha indica* no difiere en el control de larvas del *Anopheles albimanus* en pruebas in vitro.

Se recolectaron las larvas provenientes de pilas, charcos en el área del departamento de Libertad y otras en la zona urbana de Soyapango. Las larvas se almacenaron en unos frascos de 1 litro, conteniendo agua y nutrientes, renovándolas periódicamente por la transformación a fase de adulto a los 7 a 10 días, dependiendo en cual etapa de transición de crecimiento larvario se encuentre.

METODOLOGIA.

- A. Concentración.** Se utilizaron concentraciones de peso 25 gr, 50 gr y 100 gramos de la semilla del producto para determinar dosis letal. Para preparar el extracto se siguieron los siguientes pasos: 1. Recolectar la semilla madura, 2. Despulpas la semilla con suficiente agua, 3. Se deja secar la semilla por 2-3 días, 4. Se pesa la cantidad necesaria, 5. Se tritura o se macera, 6. Se coloca en un beaker de 1000 ml para volumen peso, 7. Se utiliza un colador y manta, 8. Se aplica directamente a los recipientes que contenían los criaderos.
- B. Larvas.** En cada bloque se agregó el extracto a las 4 vasijas de 400 ml excepto al testigo, no se tapan los recipientes sino que se les coloca una gasa. El total de larvas fueron 30 en cada vasija. Los bloques contienen las diferentes concentraciones de 2,5 %, 5 % Y 10 %, contruidos con malla o “saranda” para “zancudos” con una medida de 20 cm de alto por 20 cm de largo. (**anexo 5**)

Para identificar las larvas se utilizaron clasificaciones taxonómicas (**anexo 2**) y se montaron en laminas al fresco para observar en un microscopio compuesto con el objetivo panorámico 4X. El testigo se utilizó para determinar tipo de especie.

C. **Método estadístico.** Se utilizó la Prueba de Duncan y Prueba de Tukey, las tablas de Fisher, análisis de varianza, tabla de ANVA utilizando el método por diseños de bloques al azar. Estadística descriptiva como histogramas, polígono de frecuencias etc.e inferencial. ³²⁻³⁴

D. **Area de Estudio.** El ensayo se realizó en Trabajo de campo y una parte en el Bioterio de la Facultad de medicina.

E. **Criterios de selección.** Para la selección de la muestra, se utilizaron los siguientes **criterios de inclusión:** 1. Muestra en estado larvario cada semana, 2. Misma especie de *Anopheles albimanus*, 3. Igual numero de larvas en cada recipiente, 4. Concentración homogénea del extracto x ml, 5. Peso en libras del producto natural, 6. Testigo de la misma especie, 7. Igual observación a las 24 hrs, 8. Igual numero de tratamientos, 9. Condición ambiental adecuada. Entre los **criterios de exclusión**, están: 1. Muestra de diferentes estadios. 2. Diferente especie en los recipientes, 3. Mal dilución o concentración del producto, 4. Mayor numero de larvas por recipiente, 5. Testigo de diferente especie, 6. Desigualdad en las observaciones, 7. Tratamiento inadecuado, 8. Condiciones ambientales inadecuadas.

F. **Control de sesgos.** En el estudio experimental entre los sesgos que se controlaron, están: a. Sesgo Instrumental. Se calibro el peso de la balanza digital, el porcentaje de concentración del principio activo del producto por estudio bromatológico, medida correcta del peso volumen, b. Sesgo de Observación. Se utilizó la misma escala de medida para la observación posterior al control del extracto, verificación post mortem de

la larva a una determinada concentración, descarte de especies diferentes, c. Sesgo Ambiental. Se mantuvo la temperatura y humedad por calibración, d. Sesgo de edad. Por clasificación taxonómica, e. Sesgo estadístico. Se verificó correctamente el método estadístico, f. Sesgo de información. Se verificó fuente bibliográfica actualizada, g. Sesgo de preparación y uso. Se evitó usar compuestos químicos de absorción en el medio para evitar turbidez.

RESULTADOS.

El estudio midió la eficacia del extracto sobre las larvas, con el objeto de obtener una dosificación adecuada a diferentes concentraciones para el control de las larvas de *Anopheles albimanus*. Al preparar el extracto se deben tener precauciones, como usar guantes y mascarilla, estar en lugar abierto con ventilación, porque produce olor intenso, cefalea, asterixis, sudoración, mareos, lagrimeo ocular, rinorrea, nauseas, vómitos. Posterior a las 24 hrs si se mantiene el producto en un lugar húmedo produce vómitos y mal olor al preparar el producto.

Al macerar el extracto se obtiene un color verde acuoso o lechoso, al aplicarlo al recipiente conteniendo las larvas, excepto al testigo . Al inicio se torna turbio con residuos al fondo sin olor, pero se pueden apreciar las larvas en movimiento, aumentando de intensidad, luego disminuye paulatinamente, manteniéndose al fondo del recipiente y disminuyendo su capacidad de oxígeno, raras vez suben a la superficie, luego mueren paralizadas desintegrándose a las 24 hrs. Posteriormente a la semana no sé

observaron nuevas poblaciones ni movimiento de nuevas especies con los recipientes al descubierto.

De las Pruebas realizadas posterior al tratamiento se tiene que durante las 8 semanas, a las concentraciones de 2.5 %, 5 % y 10 %, resulta que la concentración del 10 % él número de larvas muertas es alto. El promedio de larvas que mueren a 2.5 % es de un rango de 10 a 17 larvas, a 5 % es de 16 a 19 larvas y de 10 % es de 23 a 25 larvas, con un promedio total de 0 a 15. El efecto letal es evidente sobre las poblaciones de *Anopheles albimanus*. (**Tabla I**)

El total de larvas por diferencia y concentración fue: de 2.5 % es 65 (32 %), 5% es 58 (29%), y 10 % es 12 (0.06%). El total de larvas muertas por concentración es: 2.5% es de 117 (58%), 5% es 139 (69.5%), 10 % es 188 (94 %). (**gráfico 1**)

La media de tratamientos realizados según concentraciones, él número de larvas muertas es variable es decir la media al 10 % es de 23.5, a 5 % es de 17.37 y de 2.5% es de 14.62. El rango promedio de larvar muertas como indicador principal es variable de acuerdo al tratamiento a las diferentes concentraciones entre 10 a 24 por semana. (**Tabla 2**)

La población de larvas en el estudio disminuyó a las 24 hrs después de la aplicación del tratamiento, por semanas el rango promedio fue de 18.5 larvas muertas, presentando la concentración del 10 % la media mas alta, con un porcentaje de mortalidad al 10 % de 42 %, 5 % de 31 % y 2.5% de 26 %.

Se observó además que al dejar en reposo durante 15 días los recipientes al descubierto no se encontraron huevos o larvas de nuevas poblaciones.

Por recuento de larvas muertas por semana según tratamiento y observación del estadio larvario, la mayor mortalidad fue en las semanas II, III, V y VI. (Tabla 3)

La significancia estadística del 5% a diferentes concentraciones el factor calculado fue de 8,88 y 6.13, para una concentración del 10 %, lo cual es altamente significativo estadísticamente. (Tabla 4)

En la tabla de ANVA la efectividad del extracto acuoso por bloques, tratamiento y error, se encontró que la suma de cuadrados totales fue de 739.34, la suma de cuadrados de tratamientos fue de 330.25; factor calculado 66.04, suma de cuadrados de repeticiones fue de 8.66 y la suma de cuadrados de error fue de 35.09. Por valor de F_t 5 % en bloques fue de 2.77 y F_t 5 % en tratamiento fue de 3.74. (Tabla 5)

Al efectuar el análisis de varianza se encontraron diferencias en los ocho tratamientos con un nivel de confianza del 95 % con 23 grados de libertad y un valor límite de $F=0.05$ %. Resultando una F_c de 66.04 en el tratamiento y una F_c de 21.36 en los bloques, con 2 y 7 grados de libertad respectivamente, concluyendo que $F_c > F_t$.

La Prueba de Tukey reportó que a las 24 hrs, el mejor tratamiento fue del 10%, el resto no presentó diferencias altamente significativas, por lo que estadísticamente

se acepta el de mayor concentración con una significancia del 5 % correspondiente a 4.41 y de la Prueba de Duncan a 3.33, concluyendo $F_c > \text{Pruebas}$.

Entre las principales características del estudio en el vector *Anopheles albimanus*, se encuentra que el método de observación fue el más utilizado y por laboratorio de microscopía el indicador más frecuente fue la especie larvaria y Epidemiológicamente el índice de mortalidad. (**Tabla 6**).

En el bioterio de la facultad de Medicina se encontró una temperatura promedio de 21 C, humedad relativa de 85 C, Radiación de 20 y una elevación de 710 mts sobre el nivel del mar. (**Gráfico 2**)



TABLA No 1.

Resultado de Pruebas realizadas en 8 semanas sobre el control de larvas de *Anopheles albimanus*.1999

Semana	2.5 %			5%			10 %		
	+	-	Total	+	-	Total	+	-	Total
1	25	15	10	25	17	8	25	23	2
2	25	16	9	25	18	7	25	23	2
3	25	14	11	25	19	6	25	25	0
4	25	16	9	25	16	9	25	23	2
5	25	15	10	25	18	7	25	23	2
6	25	17	8	25	17	8	25	23	2
7	25	14	11	25	16	6	25	24	1
8	25	10	15	25	18	7	25	24	1

+ larva viva - larva muerta

FUENTE: Resultado pruebas in vitro. 1999.



TABLA 2.
Tratamiento realizado a Poblaciones de *Anopheles albimanus* según concentración por semanas. 1999

TRATAMIENTO	2.5 %	5 %	10 %	TOTAL	MEDIA
SEMANAS					
1	15	17	23	55	18.33
2	16	18	23	57	19.00
3	14	19	25	58	19.33
4	16	16	23	55	18.33
5	15	18	23	56	18.66
6	17	17	23	57	19.00
7	14	16	24	54	18.00
8	10	18	24	52	17.33
TOTAL	117	139	188	444	18.5
MEDIA	14.62	17.37	23.5	-.	-

FUENTE: Pruebas de estudio experimental. 1999.



TABLA No 3

Cuadro Resumen. Tratamiento realizado a Poblaciones de *Anopheles albimanus* según número de larvas muertas.1999.

OBSERVACIONES																				
Sem	I					II					III					IV				
TX	M1	M2	M3	M4	T	M1	M2	M3	M4	T	M1	M2	M3	M4	T	M1	M2	M3	M4	T
1	4	5	3	3	15	4	4	3	5	16	4	3	4	3	14	4	3	5	4	16
2	5	4	4	4	17	5	4	5	4	18	5	4	5	5	19	4	5	4	3	16
3	6	5	6	6	23	6	5	6	6	23	7	6	6	6	25	6	6	5	6	23
T	15	12	15	13	55	15	13	14	15	57	16	13	15	14	58	14	14	14	13	55



... CONTINUACION TABLA 3

OBSERVACIONES																				
Sem	V					VI					VII					VIII				
TX	M1	M2	M3	M4	T	M1	M2	M3	M4	T	M1	M2	M3	M4	T	M1	M2	M3	M4	T
1	4	3	4	4	15	4	5	4	4	17	4	4	3	3	14	3	3	2	2	10
2	5	5	4	4	18	5	5	4	3	17	4	4	4	4	16	5	4	4	5	18
3	7	6	6	4	23	4	7	7	5	23	7	7	6	4	24	6	5	7	6	24
T	16	14	14	12	56	13	17	15	12	57	15	15	13	11	54	14	12	13	13	52

FUENTE: Resultado de observaciones en el estudio experimental. 1999.

Sem: semana

Tx: tratamiento. 1: 2.5 %, 2: 2.5 % , 3: 10 %

Mi: Muestra

T: total.

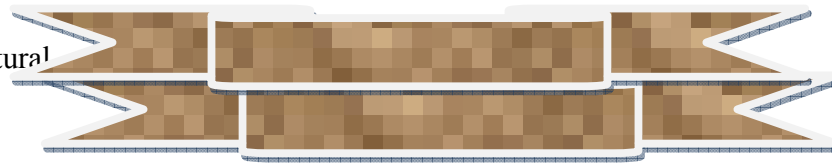


TABLA 4

Significancia del 5 % en las diferentes concentraciones en la Prueba de Tukey. Año 1999.

		10 %	5 %	2.5 %
%	TX	23.50	17.37	14.62
2.5	14.62	8.88 *	2.75 ns	0.00
5.0	17.37	6.13 *	0.00	
10.0	23.50	0.00		

FUENTE: Resultado de pruebas de investigación. 1999.

* : diferencia significativa



TABLA 5
TABLA DE ANVA

Efectividad del extracto acuoso *Azadiractha indica* en el control larvario de *Anopheles albimanus* por diseño de bloques al azar. Año 1999.

F de V	GL	SC	CM	FC	Ft 1 %	Ft 5 %
Bloques	7	374.00	53.42	21.36	4.28	2.77
Tratamiento	2	330.25	165.12	66.04	6.51	3.74
Error	14	35.09	2.5			
TOTAL	23	739.34				

Fuente: Resultado de Pruebas Estudio experimental. 1999

Fc > F t para significancia

F de V = Fuente de Variación

GL= Grados de Libertad

SC= Suma de Cuadrados

CM= Cuadrado Medio

Ft 1-5 %= Factor de tablas

***= significativo**

ns= no significativo



Tabla 6

Características de Identificación simple del vector *Anopheles albimanus*. 1999.

<i>Característica</i>	<i>Variable de estudio</i>	<i>Indicador</i>
1. Tipo de especie	<i>Especie</i>	<i>Plasmodium vivax</i> <i>Plasmodium ovale</i>
2. <i>Morfología</i>	<i>Macro-micro</i>	<i>Macho-hembra</i>
3. <i>Diagnóstico de Lab.</i>	<i>Microscopia</i>	<i>Macho-hembra</i>
4. <i>Epidemiología</i>	<i>Comunidad</i>	<i>Incidencia-prevalencia</i>
5. <i>Periodicidad</i>	<i>Nocturnidad</i>	<i>No de picaduras</i>
6. <i>Endofagia</i>	<i>Especie</i>	<i>No. de picaduras</i>
7. <i>Antropofilia</i>	<i>Hombre</i>	<i>Muestra serica +</i>
8. <i>Criaderos</i>	<i>Larvas</i>	<i>% larvas</i>

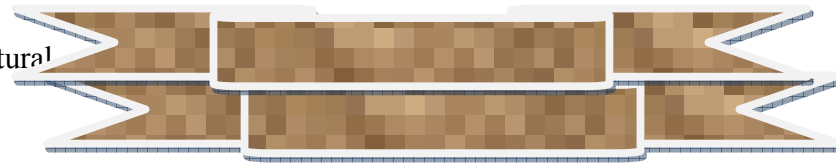
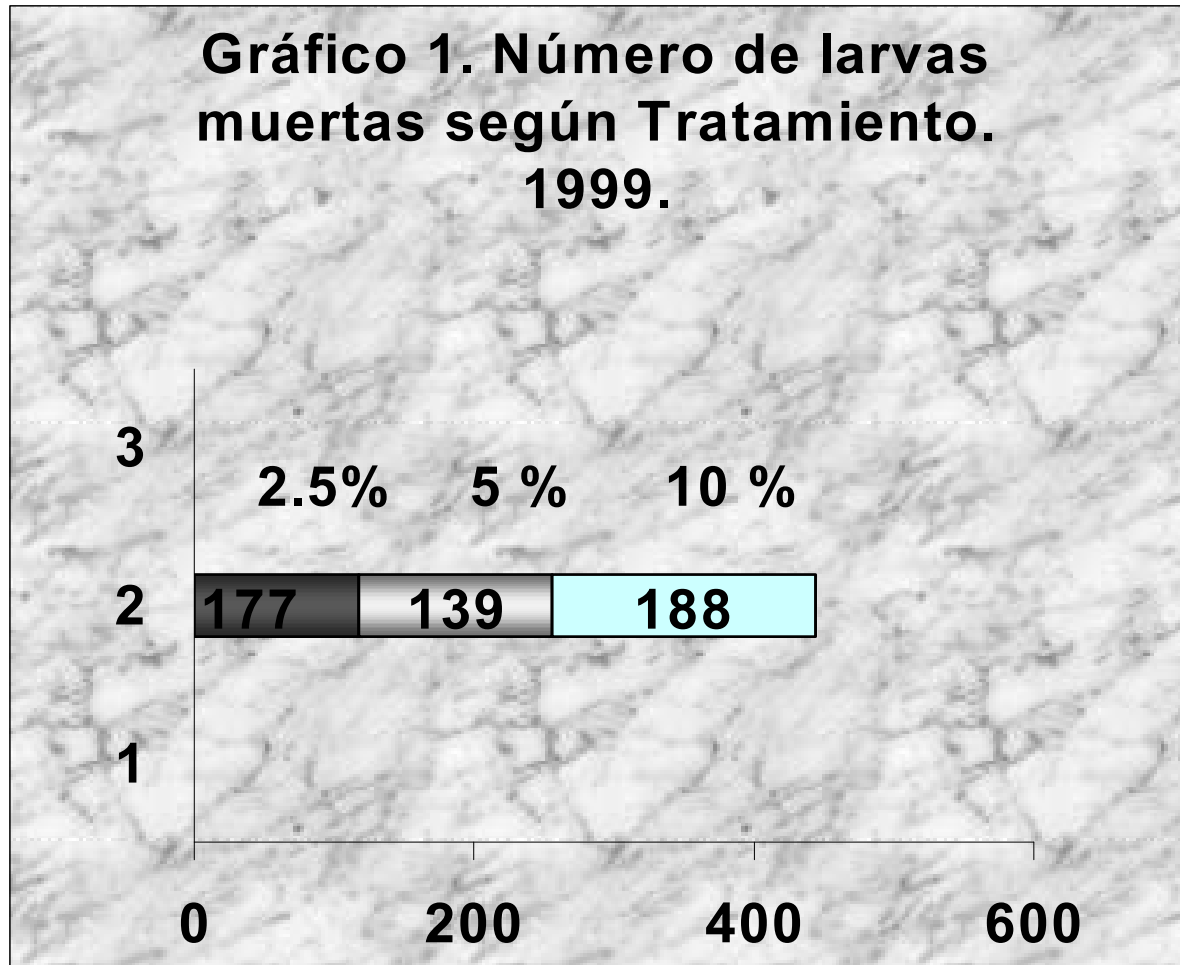
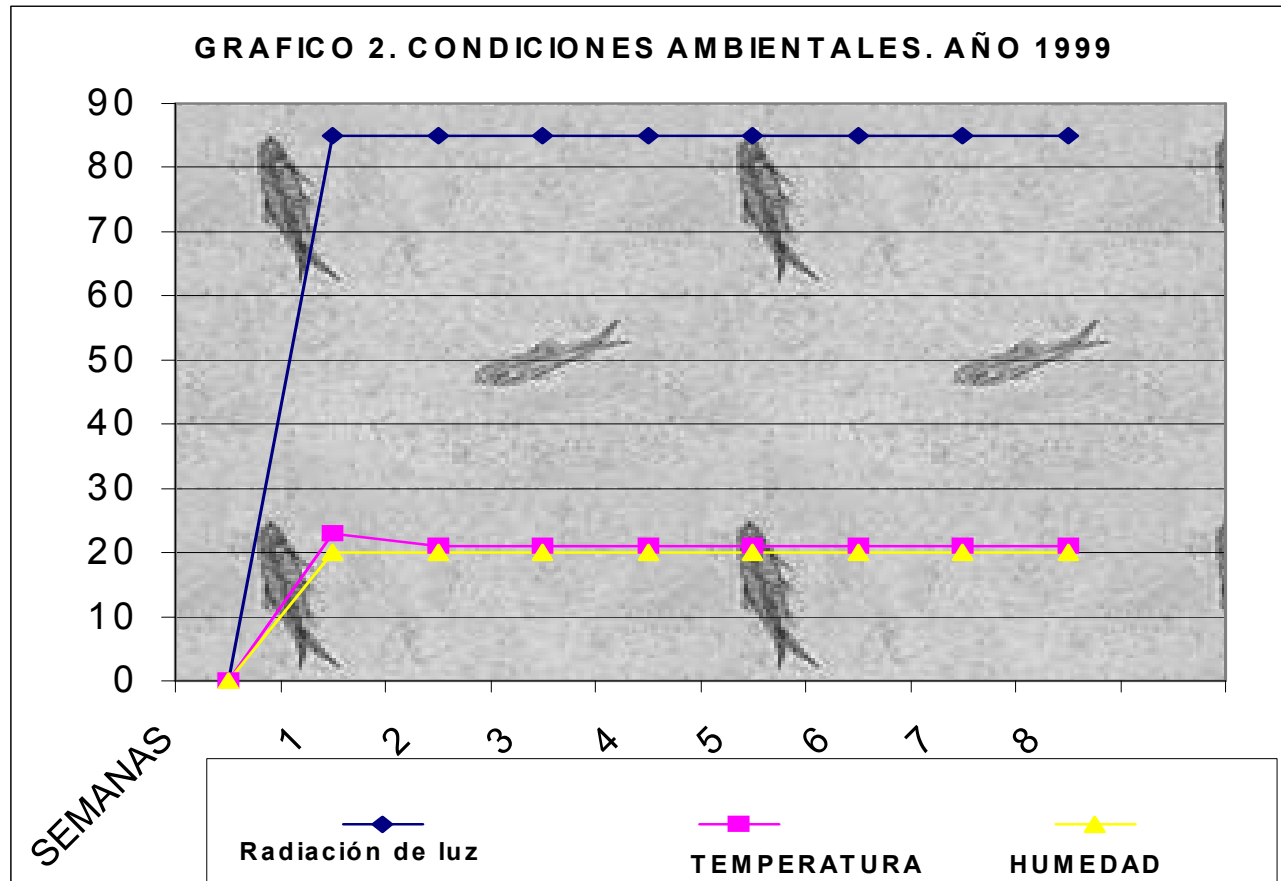
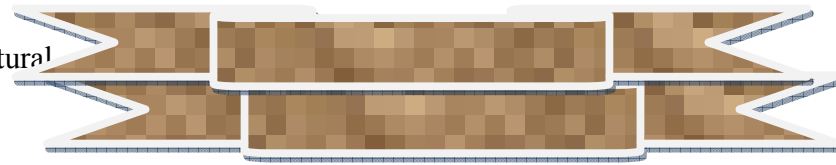


Gráfico 1. Número de larvas muertas según Tratamiento. 1999.





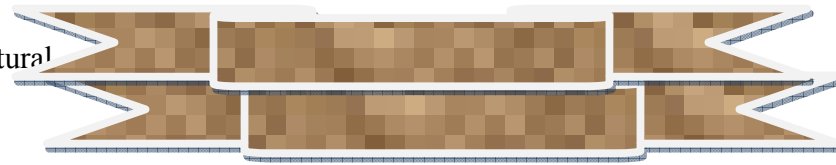
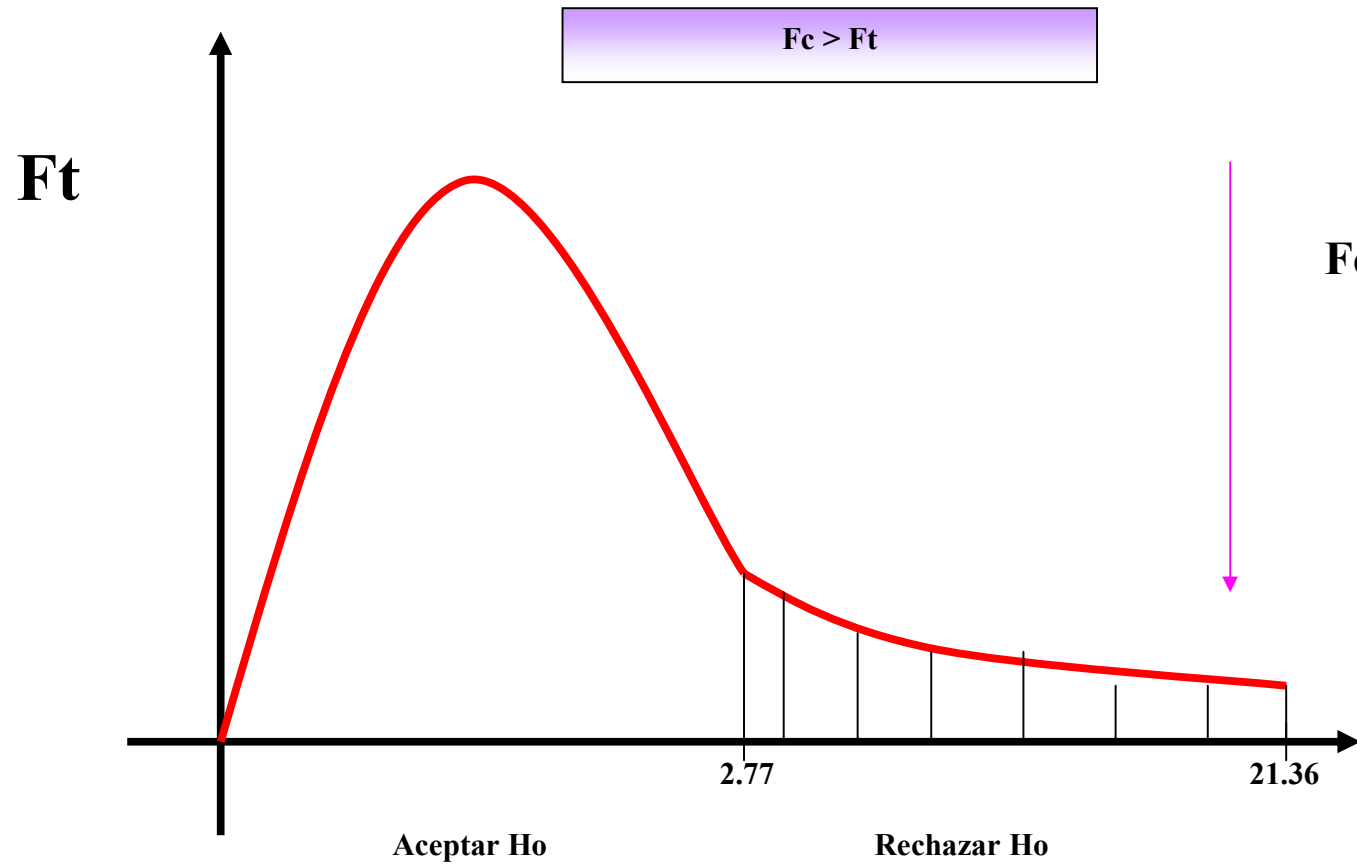


GRAFICO. 3.

Distribución de valores según aceptación o rechazo de la Hipótesis en el estudio. Año 1999.



FUENTE: Resultados de Pruebas de estudio. 1999.

DISCUSION

En este estudio se observó que las poblaciones de *Anopheles albimanus* son muy sensibles al utilizar el extracto de *Azadirachta indica* .

Los resultados obtenidos de la investigación demuestran que a mayores concentraciones del producto la eficacia es directamente proporcional al numero de muertes del vector. Se puede inferir que si el producto es un plaguicida puede ejercer control sobre el *Aedes aegyptii* y otros vectores por ser ovocida y larvicida.

En un estudio efectuado en 1985 sobre las propiedades de la Planta descubrieron que tiene efectos en enfermedades de la piel, heridas sépticas, materia prima para fabricación de jabones, repelente de insectos, leña y fabricación de muebles.

En los estudios de García y Saxena en 1984 y 1988, refieren que la *Asadirachta indica* ya era utilizada en la práctica antigua de la India, para el combate de plagas en cultivos agrícolas de frijol, arroz y maíz. Refieren que desde el año 1982 en la región latinoamericana en países de Suramerica, Africa y Centroamerica se han realizado investigaciones sobre el empleo de la planta en plantaciones agrícolas.

Por lo que se importó en El Salvador en el año 1985 por el Proyecto “Madeleña CATIE-CENREN”. Hasta el momento no se ha encontrado ningún documento o artículo sobre la Planta fuese utilizado a vectores transmisores en el Hombre, sino limitado a especies de: *Diabrotica sp.* (tortuguilla), *Cerotoma spp* (tortuguilla), *Bemisia tabaci* (mosca blanca), *Empoasca kraemeri* (lorito verde), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero) y otros. Todas las variedades de especies anteriores son plagas de cultivos

agrícolas, se reitera ninguna se ha estudiado a enfermedades del ser humano debidas a especies del genero *Plamodium*.

El estudio encontró que las concentraciones del 10 % son eficaces para el control larvario, es decir relación concentración-larva resulto proporcional. En las primeras horas del tratamiento las larvas aumentaban la motilidad manteniéndose variablemente en la superficie del agua para “tomar” oxigeno del medio, luego descendían al fondo disminuyendo su motilidad, quedando algunos de ellos “paralizados” sin evidencias de ningún tipo de movimiento, y sin llegar a la fase adulta.

Al final de las 24 hrs se “desintegraban” a dosis expuestas mayores. Al inicio él liquido se torna de color verde lechoso, esto debido a la pigmentación por la clorofila luego a los 15 días se vuelve claro con formación de una capa en la superficie.

En el laboratorio se pudo haber utilizado carbono como medio para absorber la clorofila, pero en nuestro caso no se utilizó debido a que puede crear sesgo de observación, ya que el carbono también tiene propiedades de control larvario.³⁵

La población de larvas muertas se incrementó debido a la planta posee toxicidad, lo afectando la metamorfosis, así como la “toma” de nutrientes para su crecimiento su motilidad e inhibición al estadio a la fase adulta.

La mayor tasa de mortalidad fue de 740 x 1000 larvas, encontrando una mayor relación directa entre dosis letal y estadio larvario con marcada sensibilidad en las semanas II,III y VI. La media de muertes fue 42 %, debido a mayores cantidades del principio activo de la planta.

Estadísticamente se encontró que $F_c > F_t$ demostrando una diferencia significativa en el tratamiento, por lo que se rechaza la hipótesis nula (la eficacia en el uso del extracto acuoso de *Azadiractha indica* no difiere en el control del *Anopheles albimanus* in vitro) y se acepta la hipótesis de investigación. Es decir que su uso en las aplicaciones in vitro puede controlar las poblaciones de los vectores en su hábitat natural.

La curva de significancia nos indica que la probabilidad de que una larva caiga en cualquier valor mayor de 2.77 la eliminación es eficaz, por lo que rechazamos la hipótesis nula y aceptamos que la dosis letal encontrada ejerza control sobre la población larvaria.

(**gráfico 3**)

Ambas demostradas con las pruebas de Tukey y Duncan. Por lo que se sugiere utilizar la concentración del producto e implementarlo por el MSPAS en el Plan de Vigilancia y control Entomológico.

En **resumen** el estudio demuestra que al utilizar el extracto de la Planta Natural a una dosis letal 100 (10 %) es eficaz causando un 95 % de mortalidad en las larvas. El resultado fue mejor a la aplicación inmediata del extracto en los criaderos y en una observación posterior a las 24 hrs. Ocasiona una toxicidad a la larva muriendo por privación de nutrientes, parálisis y en otros destrucción de la misma.

El estudio se complemento con pruebas estadísticas, resultando una $F_c > F_t$ por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de investigación, con un nivel de significancia del 1-5 % y un nivel de confianza del 95% al 99 %. Por las pruebas de Duncan y Tukey resultó que el factor calculado fue mayor que las Pruebas, sugiriendo que el tratamiento tiene significancia estadística para ser utilizado el producto en el control de vectores por bloques en hectáreas.

CONCLUSIONES

- La eficacia en el uso de la *Azadirachta indica* es eficaz como larvicida para el control de larvas del *Anopheles albimanus*.
- La dosis letal 100 a una concentración del 10 % es la ideal como control larvario a las 24 hrs.
- Al utilizar la solución acuosa de la semilla como larvicida botánico, los resultados a diferentes aplicaciones se observaron mejor posterior a las 24 hrs en un medio líquido.
- El extracto acuoso de la planta es una alternativa para ser comercializada en el país.
- Las pruebas in vitro realizadas demuestran que el número de larvas mueren a mayores concentraciones arriba del 10 %.
- El efecto larvicida es debido a una alteración de la metamorfosis que afecta su motilidad y captación de nutrientes.
- Estadísticamente se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de investigación con resultados de F_c mayores que F_t .
- Las Pruebas de Duncan y Tukey por el método de diseño por bloques al azar resultó con diferencias de medias significativas, es decir las diferencias observadas entre los bloques y tratamiento son debidas a diferencias reales y no al azar.

RECOMENDACIONES

- Entre las medidas de intervención derivadas del vector, a utilizar están: 1. Incrementar campañas de Educación en Salud continuas y sistemáticas a grupos expuestos y no expuestos, 2. Mejorar la calidad de vida y vivienda de los grupos, 3. Realizar estudios epidemiológicos locales, 4. Coordinación con el MSPAS (Malaria) para medidas e intervenciones eficaces, 5. Elaboración sistemática de un Plan de vigilancia y control epidemiológico del vector, 6. Incrementar el uso de métodos físicos simples como mosquiteros a la población, así como la protección de la vivienda.

- Programar actividades de reforestación masiva de la planta para comercializar el producto.

- Coordinar con el Departamento de Malaria del MSPAS para el uso y empleo de la planta natural en Atención Primaria en Salud.

- Utilizar la dosis del extracto en áreas urbanas y rurales endémicas como control natural.

- Comercializar el producto a gran escala, utilizando métodos adecuados en la presentación y preparación del producto.

- Experimentar el producto con algún aspersor en coordinación con el MSPAS, para el tratamiento de aguas estancadas y residuales en el campo por hectáreas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Frederickson, E. Christian. 1993. Bionomía y control de *Anopheles albimanus*. OPS Publicación Científica No 34.
2. O.M.S. 1987. Vector control in Primary Health Care. No 765. Geneva.
3. MSPAS. Reportes Epidemiológicos de 1980-1996
4. Rubio Moran, R. 1994. Parasitología y Entomología Médica. 1ª edic. México. 65: 439-437.
5. OPS. 1974. Fiebre viricas transmitidas por artrópodos. 11 edic. Washington.
6. López, F.J. 1990. Microscopic diagnosis of malaria parasites in the blood. "Diagnosis in Malaria" Public. Cientif. 512: 37-47
7. Koneman, Allen. 1996. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edic. 15: 746-747
8. Jawetz. 1996. Microbiología Médica. 15 edic.
9. Breeland, S. 1972. Studies on the ecology of *Anopheles albimanus* based in reduced sensitivity of acetyl cholinesterase. J. Entomology 68: 295-297.
10. Brow, A.W. 1972. Beingolea, O. 1977. Consideraciones sobre control biológico y predación. Revista Peruana de Entomología Agrícola. 20 : 33-47
11. Brown, A. W. 1972 .Alternative Methods of vector control. Vector control and the recrudescence of vector-Borne. Diseases. Washington. D.C. PP 59-63
12. Brown, H.W. 1991. Protozoarios de la sangre y tejido del hombre-mosquito. Parasitología clínica. 5ª edic. nueva Interam. México. 84: 278-287
13. OPS. 1992. Guías técnicas de control físico y Aplicación de insecticidas en los programas de Malaria. Nicaragua.
14. MSPAS. 1992. Aspectos generales del Programa de Malaria.
15. De Bach, P. 1987. Control Biológico de las Plagas de insectos y malas hierbas. 13 edic. edit. Continental.

16. King, A. S. 1984. Las plagas de invertebrados de cultivos anuales alimenticios en América central. Costa Rica.
17. Melgar, M. 1996. Tendencias modernas en el control de vectores y problemas asociados al uso de insecticidas en el control de vectores de malaria y dengue en El Salvador.
18. Zavaleta Gonzalez, M. 1997. Utilización de *Bacillus thuringiensis* como controlador biológico en *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio. El Salvador.
19. OMS. 1994. Aplicación de la estrategia mundial de lucha antipalúdica. Managua. Informe técnico. No 839.
20. Bruce, J. 1987. Malaria and its control. Annual review of publica health 8: 75-100.
21. OMS. 1987. Weekly epidemiological Record. Geneva.
22. Brow, A. 1986. Insecticide resistance in mosquitoes: a Pragmatica review, J. Mosquitos control Assoc.
23. Georghiou, G. 1972. Studios on resistance to carbamate and organophosphate insecticides in *Anopheles albimanus* :J.A. Trop Medicine. 21: 790-806
24. Lowe, R. & others. 1980- Field and laboratory assessment of tempfos for larval control of *Anopheles albimanus* in El Salvador and evidence for resistance. Mosqu. News 40: 418-423.
25. Ayad, H. % others. 1975. Resistance to organophosphates and carbamates in *Anopheles albimanus* based on reduced sensivity of acethyl cholinesterase. J. Entomology. 68: 295-297.
26. Asman. S. & others. 1981. Field studies of the genetic control systems of mosquitoes annual review entomology. 26: 289-318.
27. Ventura, Portillo. B y Matamoros, D.1997. Dosificación de A. Indica para el control del “Gusano cogollero” en el cultivo de maíz. UES.
28. García, E.M. 1988. Estudio y desarrollo y aplicación de extractos acuosos en el combate de plagas y enfermedades de cultivos agrícolas.
29. Munch, E. L. 1988. Plantas con propiedades plaguicidas. Posibilidades para el Departamento de Choluteca. Honduras.

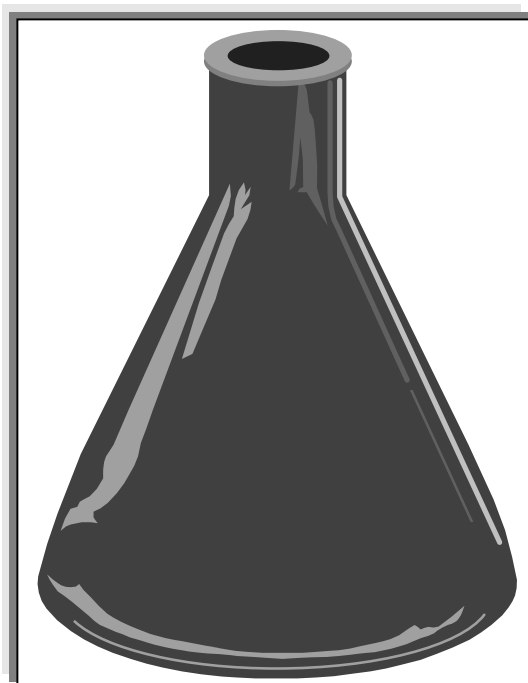
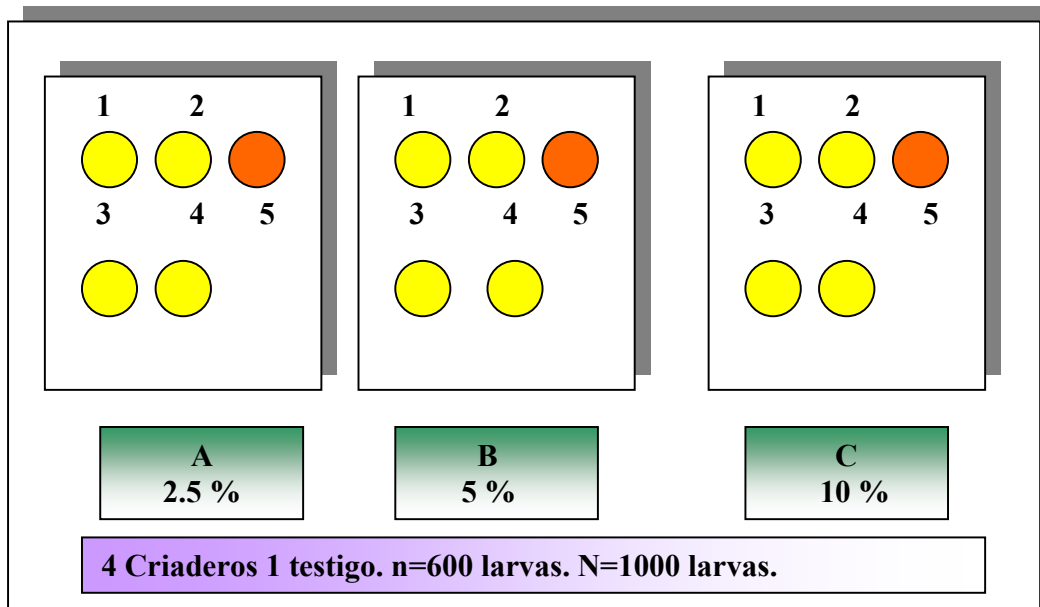
30. Saxena, R.C. & others. 1984. Evaluations and utilizations of Neem againsts the rice brown. Planthopper. 77: 502-507.
31. Chumutterer, H. 1984. Natural Pesticides from the Neen tree and other tropical plants. Germany.
32. Little, M.T. & Hills. 1987. Métodos Estadísticos para la Investigación de la Agricultura.
33. Mejía, M.A y otros. 1990. Manual de Diseños Experimentales con aplicación a la Agricultura y Ganadería. Agronomía. UES.
34. Reyes Castañeda, P. 1982. Bioestadística Aplicada.
35. Fajardo, N. y otros. 1997. Utilización del Carbón Vegetal como controlador biológico de larvas de *Anopheles y Aedes*. UES.



ANEXOS

ANEXO 5

GRAFICO METODOLOGICO DE EXPERIMENTACION



400 ML