



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

Eficacia antiparasitaria *in vitro* del extracto acuoso de *Azadirachta indica* contra *Áscaris lumbricoides*, comparado con albendazol.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

AUTOR:

Díaz Pinedo, Luis Martín Alejandro (ORCID: 0000-0002-3407-2489)

ASESORES:

Dra. Llaque Sánchez, María Rocío del Pilar (ORCID: 0000-0002-6764-4068)

Mg. Polo Gamboa, Jaime Abelardo (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

Lic. Yupari Azabacha, Irma Luz (ORCID: 0000-0002-0030-0172)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades infecciosas y transmisibles

TRUJILLO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A MI MADRE

Siendo uno de los pilares en todos los momentos de mi vida, gracias por siempre estar ahí, este sueño no se hubiera cumplido sin ti.

A MI PADRE

Por darme el aliento, la tranquilidad, el apoyo, el cariño y por la gran paciencia que tuvo en estos años, gracias papá, lo cumplimos...

A MIS ABUELOS JOB Y GEMMA

Por haberme brindado tiempo, cariño, amor y paciencia en todos estos años de mi vida y mi carrera, siendo los pilares de mi vida.

A MIS HERMANOS

Esto es por ustedes.

Luis Martín Alejandro Díaz Pinedo

AGRADECIMIENTO

A mi familia

Por haber creído en mí, por darme el apoyo necesario en este largo camino.

A mis asesores

Quienes con preocupación, paciencia, apoyo, conocimiento y palabras me permitieron llegar a esta etapa tan importante de mi vida profesional.

A la universidad

La cual por medio de su gran equipo de docentes y las oportunidades que me brindó, gracias por ayudarme a cumplir mi sueño.

Luis Martín Alejandro Díaz Pinedo

PÁGINA DEL JURADO

	ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS	Código : F07-PP-PR-02.02 Versión : 09 Fecha : 23-03-2018 Página : 1 de 1
---	------------------------------------	---

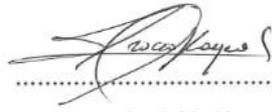
El jurado encargado de evaluar la tesis presentada por don (a)
Díaz Polo Luis Martín
 cuyo título es: *Eficacia antiparasitaria in vitro del extracto acuoso de Azadirachta indica contra ascaris lumbricoides, comparado con albendazol.*

Reunido en la fecha, escuchó la sustentación y la resolución de preguntas por el estudiante, ortográficamente calificado de: *17* (número)
Diecisiete(letras)

21 de Noviembre del 2019



 MG. Rodríguez Díaz Ángela M.
 PRESIDENTE



 María Rocío del P. Llaque Sánchez
 SECRETARIO



 MG. Polo Gamboa Jaime A.
 VOCAL

Elaboró	Dirección de Investigación	Revisó	Responsable del SGC	Aprobó	Vice Rectorado de Investigación
---------	----------------------------	--------	---------------------	--------	---------------------------------

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, Luis Martín Alejandro Díaz Pinedo con DNI N° 70618881, estudiante de la escuela de medicina de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina, declaro bajo juramento que toda la información, datos y documentación que acompañan a la tesis titulada:

“Eficacia antiparasitaria in vitro del extracto acuoso de Azadirachta indica contra Áscaris lumbricoides, comparado con albendazol”, son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes.
3. La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 21 de noviembre del 2019



Luis Martín Alejandro Díaz Pinedo

PRESENTACIÓN

Señores miembros del jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “Eficacia antiparasitaria in vitro del extracto acuoso de *Azadirachta indica* contra *Áscaris lumbricoides*, comparado con albendazol”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

Luis Martín Alejandro Díaz Pinedo

ÍNDICE

Dedicatoria	ii
Agradecimiento.....	iii
Página del Jurado	iv
Declaratoria de Autenticidad	v
Presentación.....	vi
ÍNDICE	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Hipótesis:	17
1.2. Objetivo general:	17
1.3. Objetivo específico:	18
II. MÉTODO	19
2.1. Diseño de investigación y tipo de investigación:	19
2.2. Variables y operacionalización	19
2.3. Operacionalización de variables:.....	20
2.4. Población y muestra.....	21
2.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	21
2.6. Métodos de análisis de datos.....	22
2.7. Aspectos éticos:	22
III. RESULTADOS.....	23
IV. DISCUSIÓN.....	29
V. CONCLUSIONES	32
VI. SUGERENCIAS	33
REFERENCIAS	34
ANEXOS.....	39

RESUMEN

Se determinó la eficacia antiparasitaria *in vitro* del extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta indica* “Neem” al 50 y 100%, sobre huevos fecundados de *Áscaris lumbricoides* comparado con Albendazol. Se evaluaron 40 muestras, divididas en 4 grupos, G1: tratado con extracto acuoso de hojas de *Azadirachta indica* al 50%, G2: extracto acuoso de hojas al 100%, G3: con albendazol y G4: NaCl al 0,09%. Se observó la evolución de los huevos durante 28 días. Se evidenció que el extracto de la planta, al 50 y 100% posee efecto antiparasitario sobre los huevos fecundados de *Áscaris lumbricoides* al igual que el albendazol; la diferencia se da en la velocidad de efectividad y la inhibición de la eclosión de los huevos. El albendazol a las 24 horas generó la lisis total de los huevos, y con los extractos de las plantas hasta los 28 días, se observó inhibición en la maduración de los huevos, quedando estacionarios en el estadio L1-I el 14.12% al 50% y 24,56% al 100% de concentración del extracto, al finalizar el experimento ningún huevo tratado con los extractos eclosionó. Se concluye que el extracto acuoso de *Azadirachta Indica* tiene efecto antiparasitario contra *Áscaris lumbricoides* en ambas concentraciones, siendo aún el albendazol más efectivo en relación al tiempo.

Palabras claves: *Efecto antiparasitario, extracto acuoso, neem, Azadirachta indica, Áscaris lumbricoides, Albendazol.*

ABSTRACT

The *in vitro* anti-parasitic efficacy of *Azadirachta indica* "Neem"-leaf aqueous extract in concentrations of 50% and 100% on *Ascaris lumbricoides* fertilized eggs was determined and compared to Albendazole. 40 samples divided into 4 groups were evaluated, G1: treated with *Azadirachta indica* leaf aqueous extract at 50%, G2: treated with *Azadirachta indica* leaf aqueous extract at 100%, G3: treated with albendazole, and G4: treated with NaCl at 0.09%. The evolution of the eggs was observed during 28 days. It was shown that the plant extract at 50% and 100% has the same anti-parasitic effect as Albendazole on *Ascaris lumbricoides* fertilized eggs, with the only difference being in the speed of effectiveness and the inhibition of hatching eggs. Albendazole became effective after 24 hours, generating total lysis of eggs, while the plant extracts became effective after 28 days. Inhibition was observed in the maturation of the eggs, remaining static in stage L1-I, 14.12% in the 50% concentration and 24.56% in the 100% concentration. At the end of the experiment, no eggs treated with the extracts hatched. It is concluded that the *Azadirachta indica* aqueous extract has an anti-parasitic effect on *Ascaris lumbricoides* in both concentrations; however, Albendazole is more effective in terms of time.

Keywords: *Anti-parasitic effect, aqueous extract, neem, Azadirachta indica, Ascaris lumbricoides, Albendazole.*

I. INTRODUCCIÓN

La helmintiasis siempre ha sido problema de salud global, actualmente se estima que alrededor de 1.5 millones de personas están infectadas por helmintos, con una estimación de infección del 24% de la población mundial. Transmitida por contacto con el suelo que posee huevos fecundados proveniente de heces de personas infectadas con helmintos gastrointestinales, siendo esta considerada el tipo de infección por parásitos más frecuente en el planeta. Posee gran distribución a nivel mundial, tanto en zonas tropicales como subtropicales, teniendo mayor incidencia en el África subsahariana, América, China y Asia oriental. Dentro del continente americano la helmintiasis está presente en toda la región y se estima que una de cada tres personas está infectada por helmintos. Actualmente se consideran 3 especies de helmintos más comunes en infectar al ser humano por medio del contacto con el suelo, estas son la Ascáride (*Áscaris lumbricoides*), el Tricocéfalo (*Trichuris trichiura*) y el Anquilostoma (*Necator americanus* y *Ancylostoma duodenale*). Un promedio de 267 millones de niños en edad preescolar y alrededor de 568 millones de niños en edad escolar poseen alta probabilidad de ser infectados por estos parásitos.¹

Así también como mujeres en edad fértil, se incluye a los grupos considerados de alto riesgo, ya que se encuentran en zonas con déficit de saneamiento y falta de educación en salud, además de encontrarse en una etapa de crecimiento y de demanda nutricional. En Perú se estima que 992,649 preescolares y 2,470,914 de escolares están en riesgo de sufrir infecciones por geohelmintos. En el continente americano se estima que alrededor de 46 millones de niños entre 1 y 14 años se encuentran en riesgo de sufrir una infección por helmintos. El Perú, es uno de los países de Latinoamérica que posee una alta prevalencia de helmintiasis.² Dentro del país en zonas rurales y urbano-marginales donde la población por condiciones de salubridad inadecuadas, una población que carece de niveles aceptables de saneamiento básico y que se encuentra en un nivel socioeconómico bajo, sumado a la falta de agua y desagüe apropiado, siendo estos factores que favorecen la transmisión.³

Las plantas han sido desde los inicios de la humanidad un método de tratamiento para muchos problemas de salud, desde hace siglos a la actualidad, el hombre ha probado y aprendido a utilizar las plantas que lo rodean por sus propiedades buscando, probando y aprendiendo de ellas en su lucha de sobrevivir ante las adversidades que

se le fueron presentando, por medio del ensayo y error este ha llegado a distinguir entre las beneficiosas y las que no suman a su bienestar. Entre estas plantas encontramos a la *Azadirachta Indica*, llamada también “Neem” o “Nim”. Una planta que durante siglos ha sido conocida en el subcontinente indio por sus múltiples propiedades medicinales, teniendo actualmente importancia en el contexto global por su variedad de usos beneficiosos para el ser humano, animales, la ciencia y agricultura. Esta planta provee una lista considerable de efectos favorables para la salud del ser humano en muchos países, sin casi importar su forma de administración, personas que utilizan esta planta y sus partes, como en estudios que resaltan los componentes activos relacionados a sus efectos, partes de la misma tales como: hojas, tallo, semillas, frutos, raíces.⁴

Existe una tendencia que crece con el pasar de los años, esta es de encontrar alternativas de tratamiento no farmacológico para diferentes problemas de salud, entre los cuales encontrar un tratamiento para la parasitosis intestinal y esta incluye a la geohelmintiasis en el Perú y Latinoamérica. Existen investigaciones con resultados satisfactorios con respecto a la efectividad de diferentes plantas y semillas dentro de las cuales se distingue la *Azadirachta indica* como método de primera línea en muchas partes del mundo para el tratamiento de helmintiasis, con múltiples beneficios para el hombre y animales.^{4,5}

Teniendo como antecedentes el notable desempeño de las partes de esta planta, encontramos estudios enfatizando los efectos de las hojas de “Neem”, las cuales son empleadas para el control de parasitosis intestinal, producida por helmintos infectando cabras, ovejas, aves, y ganado vacuno. Actualmente, no existen estudios que evalúen y determinen su efecto antiparasitario en humanos, pero si *in vitro*, así como reportes del uso de esta planta en poblaciones aisladas en muchos países.

En estos estudios para determinar el efecto antiparasitario de los extractos de la planta se implementó: el test de inhibición de la eclosión de huevos (EHT) y el desarrollo de migración larvaria, así como la de inhibición de la motilidad de parásitos adultos, ya que estos métodos son rápidos y económicos para su desarrollo.^{6,7,8,9}

Teniendo en cuenta que existe un manejo establecido a nivel mundial predicado por la OMS y otras investigaciones en caso de diagnóstico de parasitosis intestinal por geohelmintos, en especial causadas por *Áscaris lumbricoides*, el albendazol en 400mg en dosis única es el tratamiento de primera línea para la infección por este parásito en

particular, mostrando una tasa de efectividad excelente para la desparasitación.¹⁰

López et al (México, 2015), evaluaron la eficacia antiparasitaria de extractos hidroalcohólicos de un grupo de plantas sobre nemátodos gastrointestinales en ovinos de pelo en comparación con el Levamisol, *in vitro*. Utilizaron las hojas de *Azadirachta indica*, el cual aplicaron sobre huevos y larvas infectantes de nematodos gastrointestinales provenientes de ovinos infectados que tuvieron conteos fecales mayores a 1000hpg (huevos por gramo). Mediante la prueba de eclosión de huevos, concluyeron que los extractos de *Azadirachta indica* fueron poco eficaces en la inhibición de la eclosión de huevos de nematodos gastrointestinales.¹¹

Sindhu et al (Pakistán, 2014) evaluaron la actividad antiparasitaria *in vitro* de seis extractos de plantas paquistaníes, entre ellas *Azadirachta indica* comparadas con el Oxfendazol, en concentraciones de 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/ml. El estudio buscó determinar la efectividad antiparasitaria por medio de la motilidad parasitaria en parásitos adultos (AMA) y por medio de la prueba de eclosión de huevos (EHT). Se observó un grado variable de actividad antihelmíntica en las diferentes concentraciones. Concluyendo que el efecto de la *Azadirachta indica* fue similar al de Oxfendazol.¹²

M. Shah Alam, et al (Bangladesh, 2014) evaluaron la eficacia antiparasitaria *in vitro* del extracto acuoso y extracto etanólico de *Azadirachta indica*, sobre larvas de *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinae* y *Capillaria spp.* en comparación con Levamisol y Piperazina. Se utilizaron concentraciones de 25, 50 y 100mg/ml para el extracto acuoso, y concentraciones de 10, 25 y 50mg/ml para los extractos etanólicos. Concluyeron que tanto el extracto etanólico fue 100% efectivo en una concentración de 50mg/ml comparado con los fármacos, a diferencia de una eficacia del 92% que brindó el extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta indica* comparado con el Levamisol y Piperazina que dieron un resultado del 100%.¹³

Shweta Dongre, (India, 2014) evaluaron el efecto antihelmíntico del polvo de las hojas crudas de *Azadirachta indica* en comparación con Closantel sobre *Strongiles*. Se seleccionaron 24 cabras adultas infectadas naturalmente por *Strongiles* con una carga

> 1000 EPG (huevo por gramo) las cuales fueron divididas en 4 grupos I, II, III y IV, se trataron cabras del grupo II con polvo de hojas de neem a 0,5 g y 1,0 g/kg por vía oral junto con alimentos. Se examinaron muestras fecales de cada animal a los días 0, 7, 15 y 30 posteriores al tratamiento y se determinó la presencia de huevos por gramo de heces. Se concluyó que el polvo de las hojas secas del Neem tienen efecto antihelmíntico, demostrando una reducción de la carga de huevos por gramo de heces en el análisis de la materia fecal de las cabras tras 15 días de tratamiento en los 3 primeros grupos.¹⁴

S. Feroza, et al (Pakistan, 2017) evaluaron la eficacia antiparasitaria del extracto etanólico de semillas de papaya (*Carica papaya*) y *Azadirachta indica* sobre *Ascaridia galli* en pollos. Las aves fueron infectadas artificialmente con *Ascaridia galli* (2000 huevos/ave). Los extractos etanólicos de papaya y Neem se aplicaron al grupo B y C, respectivamente, siendo el grupo A el que no recibió tratamiento, el cual sirvió como control. El recuento de huevos fecales (FEC) se realizó semanalmente. Los valores previos al tratamiento de FEC en todos los tres grupos fueron negativos desde el día 0 al 14 después de inducir artificialmente la infección. El día 21, los valores de pretratamiento de FEC en el grupo A, B y C se registraron respectivamente. Los valores FEC posteriores al tratamiento de los grupos B y C disminuyeron significativamente en comparación con el grupo A). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el grupo B y C. Se concluyó que el extracto etanólico de las semillas de papaya y las de *Azadirachta indica* fueron efectivos para controlar la infección por *Ascaridia galli*.¹⁵

Szwako A. et al (Paraguay, 2017) determinaron el efecto antiparasitario de las hojas deshidratadas de *Azadirachta indica* mezclado con sal mineral durante 60 días sobre la carga parasitaria fecal en bovinos, en comparación con Ivermectina al 1%. Se estudiaron las cargas parasitarias de las heces de 30 bovinos divididos en dos grupos de 15 (Grupo 1 y 2). Se realizó el análisis de muestras fecales en ambos grupos previos al inicio del tratamiento, con intervalos de 15 días hasta completar 5 muestras por medio del método Mc Master (Técnica de conteo de huevos). Se concluyó que no existía diferencia entre ambos tratamientos con respecto a la disminución de los huevos en las muestras fecales, demostrando una disminución significativa de la carga de

huevos en las heces de los bovinos con ambos tratamientos.¹⁶

La parasitosis intestinal es la infección intestinal por parte de parásitos, producida por la ingesta de quistes de protozoos, huevos o larvas de gusanos o el ingreso de larvas a través de la piel, por el contacto de la persona con el suelo conteniendo los huevos, quistes o gusanos en estado infectante. Este a su vez realizará por medio de la vía de ingreso un recorrido dentro del huésped y afectará uno o varios órganos, según sea el recorrido que este tome. La parasitosis intestinal se clasifica en 2 tipos: protozoos o helmintos los cuales pueden ser patógenos para el ser humano.

Dentro del grupo de los helmintos encontramos al *Áscaris lumbricoides*, el cual genera la ascariasis, este nemátodo de la familia: Ascaridae, genero: *Ascaris* especie: *lumbricoides*, necesita tener sus huevos en la tierra para entrar en fase infectante y así poder infectar al ser humano; esta es la fase en la que el huevo contiene a la larva infectante. Este parasito tanto el macho como la hembra atraviesa por una fase de huevo, cuatro fases en etapa larvaria y una etapa adulta. La hembra posee una forma recta en su extremo posterior, a diferencia del macho que posee forma curva. El macho es más pequeño y presenta de 15 a 30 cm de longitud a diferencia de la hembra que en etapa adulta posee una longitud de entre 15 a 45 cm siendo esta más grande que el macho.^{17,18}

El contagio ocurre por medio de la ingesta de huevos conteniendo la larva infectante, que se encuentran contenidos en la tierra, infectada con heces del ser humano, estas maduran hasta formar el tercer estadio (J3), esta ocurre en algunas semanas, según las condiciones climáticas apropiadas (21 – 35°C y una media de 25°C). Los huevos son muy resistentes a altas temperaturas y la desecación, pudiendo sobrevivir por años en ambientes húmedos y templados.^{17,18}

El lugar predilecto y definitivo del parásito es el intestino delgado. Macho y hembra copulan en la luz intestinal, tras lo cual y días después, la hembra libera sus huevos, estos a su vez permanecerán en la luz intestinal y se transportarán hacia el exterior de la persona infectada por medio de las heces en la defecación. En este período los huevos no son infectantes; ya que estos requieren 15 a 21 días para formar una larva infectante dentro, una vez alojados en la tierra surge una transformación: formándose una larva dentro del huevo que produce el primer estadio; 5 a 10 días después la larva se transforma en larva de segundo estadio, todo este proceso ocurre dentro del huevo.

Es aquí en donde se vuelve infectante para el ser humano. Este puede permanecer viable durante meses en condiciones apropiadas. Después que la persona ingiere los huevos junto con los alimentos o por otros mecanismos, estos pasan por el estómago; sin ser afectados por los jugos gástricos y enzimas que están en contacto con el huevo, al arribar al duodeno, la larva de segundo estadio sale del huevo y se desarrolla hasta alcanzar la madurez sexual, 50 días después de la infección; para luego efectuarse la copulación y fecundación entre machos y hembras, 10 días después de este suceso se pueden encontrar huevos en las heces de la persona infectada, y de esta manera se cierra el ciclo biológico del parásito.¹⁸

Teniendo en cuenta que el tratamiento en caso de diagnóstico de parasitosis por helmintiasis por *Áscaris lumbricoides* es de 400mg de Albendazol en dosis única o 500mg de Mebendazol en tres dosis. Se recomienda una media dosis de Albendazol, es decir, 200 mg para niños menores de 24 meses de edad.^{10,19}

El “Nim” o “Neem” como es nombrado y conocido comúnmente, o *Azadirachta indica* escrita en latín como su nombre científico, es un árbol perteneciente a la familia *Meliaceae*, cuyo origen viene de la India y Birmania, suele crecer en regiones tropicales y subtropicales. El Neem es un árbol de crecimiento rápido, generalmente de 15 a 20 m de altura, a veces hasta 40 m de altura, con un diámetro de copa de hasta 20 m. El Neem es de hoja perenne, pero puede arrojar la mayoría de sus hojas en condiciones secas. Las hojas compuestas (pinnadas) son alternas, de 20 a 40 cm de largo, con 20 a 30 hojuelas serradas de color verde oscuro, cada una de aproximadamente 3 a 8cm de largo. Las hojas nuevas son de color rojizo a púrpura. Los pecíolos tienen 70–90 mm de largo.²⁰ La corteza está profundamente fisurada. Las flores son de color crema, perfumadas y dispuestas en grupos axilares (cada grupo se llama inflorescencia). Cada inflorescencia tiene 15–25 cm de largo y comprende 150–250 flores individuales. Cada flor mide aproximadamente 1 cm de diámetro con cinco pétalos, diez estambres y un estilo. El fruto es similar a la aceituna, de 1–3 cm de diámetro, que varía en forma de ovalada alargada a redondeada. Es amarillo cuando está maduro y comprende una pulpa dulce que encierra una sola semilla (rara vez 2–3 semillas). Neem está adaptado a áreas subáridas y subhúmedas con climas tropicales y subtropicales, a altitudes entre el nivel del mar y 700 msnm. Temperaturas anuales

medias rodean el rango típicamente de 21–32 °C (rango de temperatura preferido de alrededor de 9.5–37 °C). Neem puede tolerar altas temperaturas de verano (hasta 50 °C) pero no tolera las heladas o temperaturas inferiores a 4 °C que pueden producir la caída de las hojas y la muerte. Neem crece mejor en áreas donde la lluvia anual es moderada.²⁰

Esta planta contiene en casi todas sus estructuras propiedades medicinales conocidas desde hace muchos años atrás y actualmente juega un papel importante en el tratamiento de diferentes problemas de salud. Partes del árbol poseen componentes que han sido aislados e identificados, entre los cuales, el componente antiparasitario más importante es la “*Azadirachtina*”. Un limonoide descubierto por Butterworth and Morgan en 1968, con múltiples efectos, así también como la *Quercetina* y la *Nimbidina*. Este metabolito encontrado en sus semillas, en el extracto acuoso de sus hojas posee un efecto antihelmíntico eficaz en dosis de 50mg/ml, como también el extracto metanólico de las semillas que reduce el conteo larvario y conteo de huevos de *H. Contortus* y especies de *Trichostrongylus* en heces de animales. La efectividad de Neem contra los parásitos se debe a compuestos que imitan las hormonas. Esta actividad interrumpe el ciclo de vida de los parásitos al inhibir la capacidad para alimentarse, y evitando que los huevos de parásitos eclosionen. Además, la *Azadiractina* interfiere con el sistema nervioso central del parásito mediante la inhibición de la transmisión colinérgica excitadora y bloquea parcialmente el canal de calcio, resultando en la expulsión de parásitos del cuerpo del huésped.^{4, 12, 20, 21, 22}.

En el presente estudio se planteó estudiar si: ¿Tiene efecto antihelmíntico el extracto acuoso de *Azadirachta indica* sobre *Áscaris lumbricoides*, comparado con Albendazol en un estudio *in vitro*?

Actualmente se presenta una creciente aceptación y uso de plantas como método alternativo para el tratamiento de distintas enfermedades, tanto por sus mínimos efectos secundarios, como por su precio accesible y disponibilidad.

Cabe recalcar que no todos estos métodos alternativos poseen la misma eficacia de los productos farmacológicos actuales, pero, en el caso que se pueda disponer de estos fármacos. Sea por la zona en la que se radica o se vive o la disponibilidad económica

de cada individuo, podemos utilizar estos métodos naturales, los cuales podrían llegar a aliviar ciertas patologías o síntomas de alguna enfermedad, estas pueden ser utilizadas en cantidades suficientes, sin necesidad de alterar el espacio natural, ni el medio ambiente en el que se encuentran, así como afectar la salud del que la consume.

Se han desarrollado estudios relacionados al uso de plantas y sus extractos para combatir infecciones parasitarias, siendo estas extraídas de zonas rurales o zonas sin intervención del ser humano, dentro de estos estudios podemos recalcar que los más actuales promueven el uso de *Azadirachta indica* como un método alternativo antiparasitario, efectivo y de amplio espectro cuyos componentes activos actúan en la eliminación de una cantidad considerable de especies de parásitos intestinales tanto en animales domésticos como en cautiverio.

Por tal motivo se eligió desarrollar el presente estudio con el fin de determinar el efecto antiparasitario del componente activo contenido en el extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta Indica*, sumado a la falta de información y estudios hechos en el Perú que demuestren su efecto sobre la parasitosis intestinal. Con el fin de poder fomentar futuras investigaciones, teniendo como antecedentes este y trabajos anteriores en otros países y de esta manera poder dar a su componente activo (*Azadirachtina*) un uso beneficioso y alternativo, sin la necesidad de ser un reemplazo para el tratamiento actual para la geohelmintiasis. Siendo de esta manera útil y así poder estudiar más sobre el uso que podemos darle en el campo de la salud, creando la posibilidad de que, en un futuro posible, se puedan desarrollar fármacos que contengan el componente activo de esta planta y así poder usarla contra la helmintiasis en nuestro país.

1.1. Hipótesis:

El extracto acuoso de *Azadirachta indica* es eficaz como antiparasitario contra *Ascaris lumbricoides*, comparado con Albendazol, en estudio *in vitro*.

1.2. Objetivo general:

Evaluar la eficacia antiparasitaria del extracto acuoso de *Azadirachta indica* sobre los huevos de *Ascaris lumbricoides*, comparado con Albendazol, *in vitro*.

1.3. Objetivo específico:

Determinar la eficacia del extracto acuoso de Azadirachta indica al 50% sobre la inhibición de la eclosión de huevos de Ascaris lumbricoides In vitro.

Determinar la eficacia del extracto acuoso de Azadirachta indica al 100% sobre la inhibición de la eclosión de huevos de Ascaris lumbricoides In vitro.

Determinar la eficacia del Albendazol 40mg/ml sobre la inhibición de la eclosión de huevos de Ascaris lumbricoides.

II. MÉTODO

2.1. Diseño de investigación y tipo de investigación:

Tipo de investigación: Básica.²³

Diseño de investigación fue: Experimental, con repeticiones múltiples y post prueba, donde se consideraron 4 grupos de experimentación (RG1 - RG4), considerando el tipo de estímulo (X). Diluciones del extracto etanólico de *Azadirachta indica* a las concentraciones del 50 y 100%, un grupo control positivo con albendazol y un grupo control negativo con NaCl al 0,009%.²³ (Anexo 01). Se considerará el esquema siguiente:

RG ₁	X ₁	O ₁
RG ₂	X ₂	O ₂
RG ₃	X ₃	O ₃
RG ₄	X ₄	O ₄

En donde:

RG₁₋₄: Grupos de huevos de *Áscaris lumbricoides*.

X₁: Extracto acuoso de *Azadirachta indica* al 50%.

X₂: Extracto acuoso de *Azadirachta indica* al 100%

X₃: Control positivo (Albendazol a 40mg/mL)

X₄: Control negativo (NaCl 0.9%)

O₁₋₄: Efecto antiparasitario (Inhibición de la eclosión de huevos).

2.2. Variables y operacionalización

Identificación de las variables:

Variable independiente: Agente antiparasitario

- **No farmacológico:** Extracto acuoso de *Azadirachta indica*
- **Farmacológico:** Albendazol a 40 mg/mL

Variable dependiente: Eficacia antiparasitaria

Eficaz: Inhibición >50% de los huevos

No eficaz: Inhibición <50% de los huevos

2.3. Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V.I Agente antiparasitario	Compuesto o medicamento antiparasitario orientado al tratamiento de humanos y animales. ²⁴ Agente antiparasitario no farmacológico: <i>Azadirachta indica</i> Agente antiparasitario farmacológico: Albendazol. ²⁵	<i>Azadirachta indica</i> “Neem” será evaluado a las siguientes concentraciones: 50 y 100mg/mL Albendazol (40mg/ml) NaCl 0.9%.	RG1 RG2 RG3 RG4	Cualitativa nominal
Eficacia antiparasitaria	Capacidad para controlar, combatir o eliminar a los parásitos en un determinado momento y con dosis ya establecida. ²⁵	Se considera la eficacia antiparasitaria según sea el porcentaje de inhibición de eclosión de huevos sea mayor al 50% de huevos no eclosionados.	Eficaz >50%. ⁶ No eficaz <50%. ⁶	Cualitativa nominal

2.4. Población y muestra

Población: La población estuvo constituida por todos los huevos contenidos dentro de especímenes de *Áscaris lumbricoides* alojados en intestinos de cerdos (*Sus scrofa*) del camal municipal de la Esperanza, Trujillo, La libertad, Perú.^{26,27}

Muestra:

Tamaño de muestra: Se aplicó la fórmula estadística que nos permita calcular la diferencia de dos proporciones. Se obtuvo una muestra de 10 repeticiones para cada grupo a experimentar. Dejándonos un total de 40 observaciones.^{23,31} (Anexo 01)

Unidad de análisis: Cada uno de los huevos fecundados de *Áscaris lumbricoides* del estudio.

Unidad muestral: Cada uno de los tubos conteniendo los huevos de *Áscaris lumbricoides* viables seleccionados aleatoriamente.

Muestreo:

Se estudiaron todos los huevos de *Áscaris lumbricoides* viables seleccionados aleatoriamente, aplicando muestreo aleatorio simple. (Ver anexo 05)

Criterios de selección:

Criterios de inclusión:

- Todos los huevos de *Áscaris lumbricoides* embrionados.

Criterios de exclusión:

- Huevos de *Áscaris lumbricoides* defectuosos o no fecundados.

2.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

La técnica: consistió en la observación de los huevos de *Áscaris lumbricoides* en sus diferentes estadios.^{7, 8, 9}

Procedimiento: En el estudio se siguieron los siguientes pasos. (Ver anexos)

- a. La planta fue taxonómicamente identificada y certificada por el Herbarium Truxillense de la Universidad nacional de Trujillo (Ver anexo 02)
- b. Se obtuvo el extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta Indica* por el método de decocción (Ver anexo 03)

- c. Inoculación de los huevos de *Áscaris lumbricoides* en los contenedores Ependorff por medio del método de Coles (Ver anexo 04)
- d. Evaluación de la efectividad antihelmíntico por medio del método de Egg Hatch Test al 1er, 2do, 7mo, 14vo, 21vo y 28vo día. (Ver anexo 05)

Instrumento:

El instrumento utilizado fue la ficha de recolección de datos que fue elaborada por el autor de la investigación (Ver anexo 06, 07).

Validación y confiabilidad: la ficha de recolección de la información fue validada por 03 profesionales especialistas en parasitología.²³

2.6. Métodos de análisis de datos

Los datos obtenidos fueron tabulados en una ficha de Microsoft Excel 2019, para luego ser procesados en el Software estadístico IBM SPSS vs. 25. Se contrastó los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, comprobándose que los datos tienen un comportamiento normal y sus varianzas son homogéneas, por lo cual se aplicaron las pruebas estadísticas de análisis de varianza (ANOVA) y prueba post hoc de Tukey. Asimismo, se utilizó el Diagrama de Cajas y bigotes para representar la comparación de la efectividad del extracto acuoso, además de complementar con estadísticas descriptivas como la media y desviación estándar.²³

2.7. Aspectos éticos:

El estudio se realizó respetando los criterios de bioseguridad en el laboratorio con las personas y con el medio ambiente. Se considerará los protocolos de tratamiento de material potencialmente infeccioso y no exposición al peligro de las personas.²⁸

²⁹ .

III. RESULTADOS

TABLA 01: Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de nematodos intestinales a los 28 días. Estudio comparativo entre Azadirachta indica y albendazol.

N° repet	Extracto acuoso de Azadirachta indica		Control positivo	Control negativo
	100%	50%	Albendazol	Nacl 0.9%
1	100%	100%	100%	0%
2	100%	100%	100%	0%
3	100%	100%	100%	0%
4	100%	100%	100%	0%
5	100%	100%	100%	0%
6	100%	100%	100%	0%
7	100%	100%	100%	0%
8	100%	100%	100%	0%
9	100%	100%	100%	0%
10	100%	100%	100%	0%

TABLA 02: Evolución del proceso de inhibición del desarrollo larvario de los huevos de nematodos intestinales a los 28 días según estadio de desarrollo. Estudio comparativo entre *Azadirachta indica* y albendazol (expresado en porcentajes).

N° repet	Extracto acuoso de Neem		Control Positivo		Control Negativo	
	Estado del desarrollo larvario					
	Inhibición en el estadio L1-I		Inhibición en el estadio L1 - II		Lisis	Inhibición
	100%	50%	100%	50%	Albendazol	NaCl 0.9%
1	75.8%	27.8%	24,2%	72.2%	100%	%
2	5.7%	7.1%	94.3%	92.9%	100%	0%
3	29.3%	10%	70,7%	90%	100%	0%
4	15.6%	7.7%	84.4%	92.3%	100%	0%
5	9.7%	36.7%	90.3%	63.3%	100%	0%
6	66.7%	9.7%	33.3%	90.3%	100%	0%
7	10%	7.1%	90%	92.9%	100%	0%
8	13.8%	12.5%	86.2%	87.5%	100%	0%
9	6.7%	8.2%	93.3%	91.8%	100%	0%
10	16%	20%	84%	80%	100%	0%
PROMEDIO	24.93%	14.68%	75.07%	85.32%	100%	0%

TABLA 03: Evolución del proceso de inhibición del desarrollo larvario de los huevos de nematodos intestinales a los 28 días según estadio de desarrollo L1- I. Estudio comparativo entre *Azadirachta indica* y albendazol.

	<i>N</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Error estándar</i>	<i>95% del intervalo de confianza para la media</i>		<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
					Límite inferior	Límite superior		
<i>ALBENDAZOL</i>	10	100.0000	0.00000	0.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
<i>NaCl 0,09%</i>	10	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
<i>Azadirachta indica al 50%</i>	10	14.6800	10.23282	3.23590	7.3599	22.0001	7.10	36.70
<i>Azadirachta indica al 100%</i>	10	24.9300	25.38425	8.02720	6.7712	43.0888	5.70	75.80
<i>Total</i>	40	34.9025	41.25727	6.52335	21.7078	48.0972	0.00	100.00

TABLA 04: Evaluación del ANOVA del Efecto antihelmíntico in vitro de la inhibición del desarrollo L1 - I de la eclosión de huevos de *Áscaris lumbricoides* con extracto acuoso de *Azadirachta indica* y Albendazol, a los 28 días pos administración.

	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Entre grupos</i>	59642.693	3	19880.898	106.163	.000
<i>Dentro de grupos</i>	6741.637	36	187.268		
<i>Total</i>	66384.330	39			

TABLA 05: Evaluación POST ANOVA de HSD TUKEY, del Efecto antihelmíntico in vitro de la inhibición del desarrollo L1 - I de la eclosión de huevos de *Áscaris lumbricoides* con extracto acuoso de *Azadirachta indica* y Albendazol, a los 28 días pos administración.

TRATAMIENTO	N	SUBCONJUNTO PARA ALFA = 0.05		
		1	2	3
NACL 0,09%	10	0.0000		
AZADIRACHTA INDICA AL 50%	10	14.6800	14.6800	
AZADIRACHTA INDICA AL 100%	10		24.9300	
ALBENDAZOL	10			100.0000
SIG.		.095	.351	1.000

FIGURA 01: EFECTO ANTIHELMÍNTICO IN VITRO DE LA INHIBICIÓN DEL DESARROLLO L1 - I de la eclosión de huevos de *Áscaris lumbricoides* con extracto acuoso de *Azadirachta indica* y Albendazol, a los 28 días pos administración.

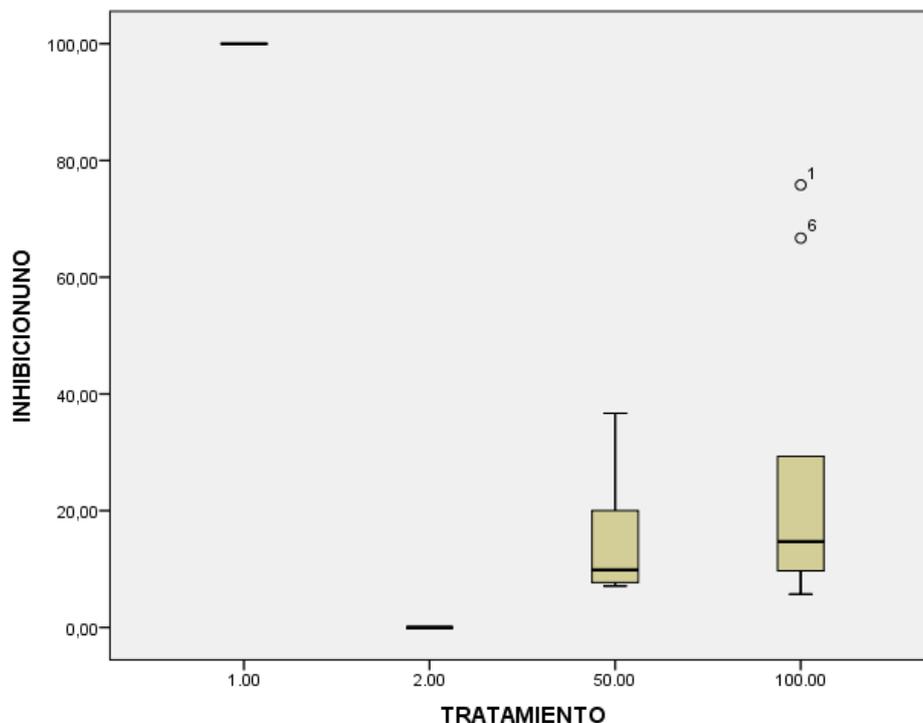


TABLA 06: Evolución del proceso de inhibición del desarrollo larvario de los huevos de nematodos intestinales a los 28 días según estadio de desarrollo L1- II. Estudio comparativo entre *Azadirachta indica* y albendazol.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
ALBENDAZOL	10	100.0000	0.00000	0.00000	100.0000	100.0000	100.00	100.00
NaCl 0,09%	10	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
<i>Azadirachta indica</i> al 50%	10	85.3200	10.23282	3.23590	77.9999	92.6401	63.30	92.90
<i>Azadirachta indica</i> al 100%	10	75.0700	25.38425	8.02720	56.9112	93.2288	24.20	94.30
Total	40	65.0975	41.25727	6.52335	51.9028	78.2922	0.00	100.00

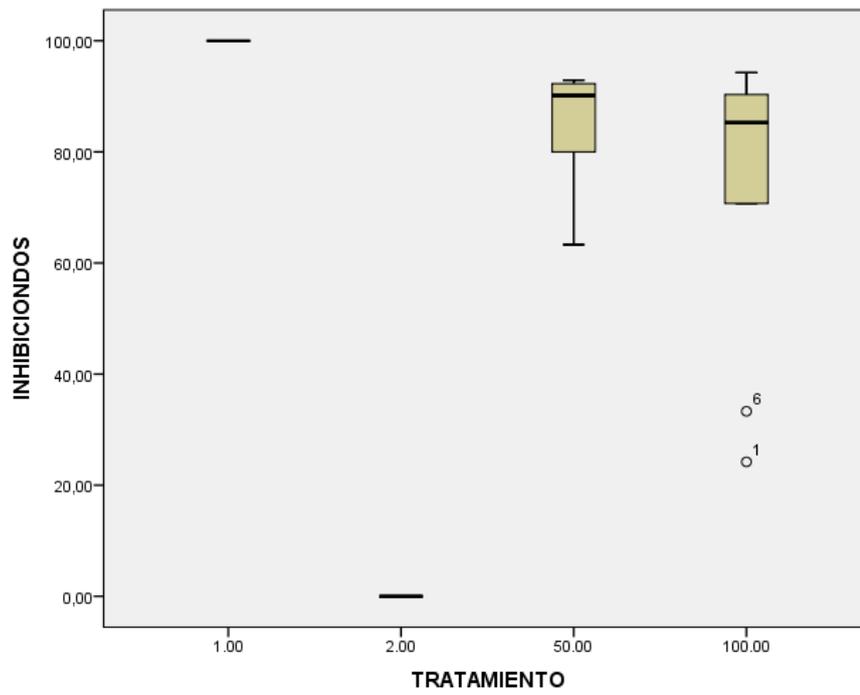
TABLA 07: Evaluación del ANOVA del Efecto antihelmíntico in vitro de la inhibición del desarrollo L1 - II de la eclosión de huevos de *Ascaris lumbricoides* con extracto acuoso de *Azadirachta indica* y Albendazol, a los 28 días pos administración.

	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Entre grupos</i>	59642.693	3	19880.898	106.163	.000
<i>Dentro de grupos</i>	6741.637	36	187.268		
<i>Total</i>	66384.330	39			

TABLA 08: Evaluación POST ANOVA de HSD TUKEY, del Efecto antihelmíntico in vitro de la inhibición del desarrollo L1 - II de la eclosión de huevos de *Ascaris lumbricoides* con extracto acuoso de *Azadirachta indica* y Albendazol, a los 28 días pos administración.

<i>TRATAMIENTO</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto para alfa = 0.05</i>		
		1	2	3
<i>NaCl 0,09%</i>	10	0.0000		
<i>Azadirachta indica al 100%</i>	10		75.0700	
<i>Azadirachta indica al 50%</i>	10		85.3200	85.3200
<i>ALBENDAZOL</i>	10			100.0000
<i>Sig.</i>		1.000	.351	.095

FIGURA 02: EFECTO ANTIHELMÍNTICO IN VITRO DE LA INHIBICIÓN DEL DESARROLLO L1 - II de la eclosión de huevos de *Ascaris lumbricoides* con extracto acuoso de *Azadirachta indica* y Albendazol, a los 28 días pos administración.



IV. DISCUSIÓN

Se evaluó el efecto antiparasitario del extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta indica* sobre los huevos de *Áscaris lumbricoides* comparado con Albendazol, se desarrolló un estudio *in vitro* donde se analizaron las muestras de 40 tubos Eppendorf conteniendo los huevos fecundados del parásito junto a las soluciones del extracto de *Azadirachta indica* en las concentraciones de 50 y 100%, el control positivo que consta de Albendazol y el control negativo de NaCl 0,09%. La técnica de obtención de datos fue la observación de los huevos tomados de todos y cada uno de los tubos Eppendorf a las 24, 48 horas, 7, 14, 21 y 28 días de tratamiento. Tras la recolección de datos podemos ver que:

En la tabla 1 se puede observar que tras el tratamiento con el extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta indica* al 50% y 100%, además del control positivo (Albendazol) se observó una inhibición de la eclosión en el 100% de todas las muestras, a excepción del control negativo con NaCl 0,09% en la cual se encontraron la formación de larvas de *Áscaris lumbricoides* y su eclosión en los días posteriores.

En la tabla 2 observamos que en promedio tras el tratamiento de 28 días, el extracto acuoso de *Azadirachta indica* al 100% obtuvo un promedio de 24.93% de huevos que no solo no eclosionaron, si no también detuvieron su evolución en el estadio L1-I; y el 75.07% evolucionaron al estadio L1-II, por otro lado el extracto acuoso de las hojas *Azadirachta indica* al 50%; inhibió en promedio solo el 14.68% en el estadio L1-I y en 85.32% en estadio L1-II. Sin embargo, al final de los 28 días de observación, ningún huevo de *Áscaris Lumbricoides* eclosionó con ambas concentraciones de la planta. El Albendazol generó lisis de todos los huevos en todas las muestras en un período de 24 horas. Por el contrario, la solución salina (NaCl 0,09%) no presentó inhibición del desarrollo de los huevos, los cuales eclosionaron a los 21 días aumentando incluso de tamaño a los 28 días de observación en todas las muestras con el control negativo.

En la tabla 3 podemos apreciar que la media de inhibición mayor está presente en el tratamiento con Albendazol (100% en todas las muestras), seguido del extracto de *A. indica* al 100% con un promedio de 24.93% en el estadio L1 - I y el extracto de *Azadirachta indica* al 50% con un promedio de 14.68% en estadio L1 - I, a diferencia

del tratamiento con el NaCl 0,09% que no presento ningún efecto antiparasitario. Dándonos a conocer que el extracto de *A. indica* al 100% es el más eficaz al 50%.

En la tabla 4 observamos que el valor de ANOVA es 0,000, el cual indica que los valores obtenidos son significativos, en caso del tratamiento con el extracto acuoso de las hojas de *A. indica* tanto al 50 como al 100% y el albendazol.

En la tabla 5 podemos apreciar que, dentro de los tratamientos, el Albendazol ocupa claramente el primer lugar seguido del tratamiento con el extracto acuoso al 100% seguido del extracto acuoso de *A. indica* al 50% apreciando que poseen un efecto similar. En la figura 1 podemos evidenciar objetivamente que el tratamiento con Albendazol presenta una eficacia del 100% provocando lisis a las primeras 24 horas del tratamiento, seguido del tratamiento con el extracto de *A. indica* al 100% teniendo un promedio del 24%, observándose claramente que en existen dos muestras en las cuales el porcentaje de inhibición supera el 60% acercándose al 80% tras el tratamiento a los 28 días, acompañado del extracto de *A. indica* al 50%, que no generan lisis pero si detienen la formación larvaria.

En la tabla 6 en relación con la evolución de los huevos, el tratamiento del extracto de la *A. indica* al 50% presenta un efecto menor ya que se observa un mayor porcentaje de huevos en fase L1 – II a diferencia del tratamiento con el extracto a 100% por presentar una media de inhibición en L1- II menor con 75.03% demostrando que la presencia de huevos en L1 – II es mayor con el tratamiento del extracto al 50% y la mayor efectividad se demuestra con una presencia mayor de huevos en L1 – I con el extracto al 100%. En la tabla 7 se puede observar que el valor ANOVA es 0.00 lo cual demuestra una alta significancia entre los 3 tratamientos.

En la tabla 8 podemos apreciar que el extracto de hojas de *A. indica* presenta un mayor porcentaje de inhibición con un 85.32% a diferencia del extracto al 100% que obtuvo un 72.07%, esto no quiere decir que el extracto al 50% sea más efectivo, al contrario, pues, permite un desarrollo mayor de los huevos permitiendo llegar a un estadio más avanzado, pero aun así inhibe la formación de larvas y la posterior eclosión de los huevos. En la figura 2 corrobora el efecto de cada tratamiento, demostrando que el Albendazol posee el mayor porcentaje de inhibición junto al extracto al 50% con respecto a la inhibición de huevos en el estadio L1 – II, seguido del extracto al 100%.

Tras la interpretación de los gráficos y tablas, podemos encontrar valores similares de efectividad antiparasitaria como Sindhu et al¹², quienes observaron que el extracto de *A. indica* tenía un efecto similar al compararlo con el Oxfendazol en la prueba de eclosión de huevos y motilidad larvaria de *Haemonchus contortus*. M. Shah Alam, et al¹³ encontraron que tanto el extracto acuoso como etanólico de las hojas de *Azadirachta indica* tienen similar efecto antihelmíntico que Levamizol y Piperazina sobre larvas de *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinae* y *Capillaria spp.*

De la misma manera con Shweta Dongre¹⁴ encuentran que las hojas molidas de *A. indica* comparada con Closantel en cabras, disminuyeron la carga de huevos por gramo de heces en un 24%. S. Feroza¹⁵, también al usar los extractos etanólicos de hojas de *A. indica* en comparación con el extracto etanólico de semillas de papaya, observaron disminución de la carga de huevos por gramo de heces de pollos infectados artificialmente, con una efectividad del 97 y 95% en la disminución del conteo de huevos por gramo de heces. Szwako A. et al¹⁶ al comparar el efecto antiparasitario de las hojas secas de *Azadirachta indica* con Ivermectina al 1% en bovinos, encontrado similar eficacia.

Estos resultados nos dan a conocer que las hojas de *A. indica* en sus diferentes formas de tratamiento, sean: Hojas secas, extracto etanólico, extracto hidroalcohólico o extracto acuoso, presentan un alto grado de efectividad sobre nematodos intestinales, disminuyendo la carga de huevos por gramo de heces, disminución de la motilidad larvaria, y la inhibición de la eclosión de huevos de nematodos intestinales. Este efecto se debe a la presencia del “*Azadirachtin*” o “*Azadirachtina*” la cual inhibe el glutatión S-transferasa y reduce la actividad glutatión y UDP-glucuronil transferasa las cuales son enzimas catalizadoras de sustratos para la formación de componentes celulares y energía (Radhakrishnan et al., 2007)³⁰. La efectividad de la “*Azadirachta indica*” contra los parásitos se debe a compuestos que imitan las hormonas. Esta actividad interrumpe el ciclo de vida de los parásitos al inhibir la capacidad de los parásitos para alimentarse y evitar que los huevos de parásitos eclosionen. Además, la “*Azadirachtin*” la cual interfiere con el sistema nervioso central del parásito mediante la inhibición de la transmisión colinérgica excitadora y bloquea parcialmente el canal de calcio. (Qiao et al. 2013).²¹

V. CONCLUSIONES

- Se concluyó que el extracto acuoso de las hojas de *Azadirachta indica* en ambas concentraciones (50% y 100) posee un efecto antiparasitario significativo. Ya que esta inhibió tanto la evolución, como la eclosión de huevos fértiles de *Áscaris lumbricoides*. Sin embargo, el albendazol continúa teniendo mayor y mejor efecto antiparasitario en relación al menor tiempo de acción.
- El efecto antiparasitario del extracto de hojas de *Azadirachta indica* que a la concentración del 100%, la inhibición del desarrollo de los huevos en el estadio L1-I es casi del 30%
- El efecto antiparasitario del extracto de hojas de *Azadirachta indica* que a la concentración del 50%, la inhibición del desarrollo de los huevos en el estadio L1-I fue < 15%
- El Albendazol generó lisis de los huevos en las primeras 24 horas del tratamiento.
- El NaCl 0,09% no posee ningún efecto antiparasitario permitiendo la evolución, formación de larvas y posterior eclosión en todas sus muestras tras los 28 días de tratamiento.

VI. SUGERENCIAS

- Al apreciar los resultados positivos del efecto antiparasitario del extracto de las hojas de *Azadirachta indica* sobre los huevos de *Áscaris lumbricoides*, sería recomendable y sugerente realizar estudios en otro tipo de parásitos, así como en otras especies de geohelminos y así determinar su efecto sobre ellos.
- Así también sería sugerente realizar más estudios experimentales sobre animales vivos para verificar sus efectos tanto antiparasitarios como la determinación de su dosis tóxica.
- Buscar otros métodos de preparación y/u obtención de los extractos de la planta y sus estructuras, ya sean hojas, tallo, semillas, raíces para así poder comparar y determinar que estructura de la planta tiene un mayor porcentaje de componente activo “*Azadirachtina*”.

REFERENCIAS

1. Alam MD, et al. Comparative efficacy of different herbal and modern anthelmintics against gastrointestinal nematodiasis in fowl. *International Journal of Biological Research*. ISSN: 2012-578X. 2. 145. 10.14419/ijbr.v2i2.3584. [Consultado: 17 de diciembre de 2018] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/280719900_Comparative_efficacy_of_diferent_herbal_and_modern_anthelmintics_against_gastrointestinal_nematodiasis_in_fowl
2. Bauri Rk, Tigga MN, Kullu SS. A review on use of medicinal plants to control parasites. *Indian J Nat Prod Resour* [Internet]. Diciembre 2015 [Consultado: 4 de setiembre de 2018]; 6(4): 268-277. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/292161550_A_review_on_use_of_medicinal_plants_to_control_parasites
3. Becerril M. *Parasitología médica*. 4ta ed. México, D. F. McGraw Hill. 2014.
4. Brito E, et al, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum*, or “*Ascaris lumbricoides*”? , *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 213, Issue 8, 15 April 2016, Page 1355,) [Internet] [Consultado: 11 de octubre del 2018] <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw027>
5. Csurhes S. *Neem tree Azadirachta indica*. [Internet]. 2da ed. Queensland, Australia: Queensland Government; 2016 [Consultado: 30 de setiembre de 2018]. Disponible en: https://www.daf.qld.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/63168/IPA-Neem-Tree-Risk-Assessment.pdf
6. Dongre S. et Al. (2015). Anthelmintic efficacy of *Azadirachta indica* (Neem) against strongyles in goats. *The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*. ISSN: 23940247. 10. 18-21. [Consultado: 9 de diciembre del 2018] Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/301328265_Anthelmintic_efficacy_of_Azadirachta_indica_Neem_against_strongyles_in_goats
7. Dongre, Shweta & Das, et al. Anthelmintic efficacy of *Azadirachta indica* (Neem) against strongyles in goats. *The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*. ISSN: 23940247. 10. 18-21. [Consultado: 9 de diciembre del 2018] Disponible en:

- https://www.researchgate.net/publication/301328265_Anthelmintic_efficacy_of_Azadirachta_indica_Neem_against_strongyles_in_goats
8. Feroza, S. et al. (2017). Effect of papaya and neem seeds on *Ascaridia galli* infection in broiler chicken. *Pakistan Journal of Nematology*. 35. 105-111. ISSN: **2313-1942** [Consultado: 16 de diciembre del 2018] Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18681/pjn.v35.i01.p105-111>
 9. G. Katzung. Bases y Clínica farmacológica. 13ª edición. Mc-Graw Hill. 2016.
 10. García-García José Antonio, Reding-Bernal Arturo, López-Alvarenga Juan Carlos. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación educ. médica* [revista en la Internet]. 2013 dic [citado 2019 enero 21]; 2(8): 217-224. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-50572013000400007&lng=es
 11. Goodman, L. S., Bunton, L. L., Hilal-Dandan, R., Knollmann, B. C., Gilman, A. G., & Baldi, C. T. (2019). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (14ª ed.). México, México: McGraw-Hill.
 12. Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014). *Metodología de la investigación: Roberto Hernández Sampieri, Carlos Fernández Collado y Pilar Baptista Lucio* (6a. ed. --.). México D.F.: McGraw-Hill.
 13. L. Radhakrishnan, et al., 2007. Evaluation of Anthelmintic Effect of Neem (*Azadirachta indica*) Leaves on *Haemonchus contortus* in Goats. *Research Journal of Parasitology*, 2: 57-62. [Internet] [Consultado: 11 de octubre del 2018] en: <https://scialert.net/abstract/?doi=jp.2007.57.62>
 14. Leles et al.: Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasites & Vectors* 2012 5:42. [Internet] [Consultado: 11 de octubre del 2018] <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-42>
 15. López JT, et al. Efecto antihelmíntico in vitro de extractos vegetales en nematodos gastrointestinales de ovinos de pelo. *PAYDS* [Internet]. Septiembre 2015 [Consultado: 21 de noviembre de 2018]; 4(1): 11-25. SSN 2305-1744 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/317255126_Efecto_antihelmintico_in_vitro_de_extractos_vegetales_en_nematodos_gastrointestinales_de_ovinos_de_pelo
 16. López JT, et al. Efecto antihelmíntico in vitro de extractos vegetales en nematodos

- gastrointestinales de ovinos de pelo. PAYDS [Internet]. Septiembre 2015 [Consultado: 21 de noviembre de 2018]; 4(1): 11-25. SSN 2305-1744 Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/317255126_Efecto_antihelmintico_in_vitro_de_extractos_vegetales_en_nematodos_gastrointestinales_de_ovinos_de_pelo
17. M. Shah Alam, et al. (2014). Comparative efficacy of different herbal and modern anthelmintics against gastrointestinal nematodiasis in fowl. International Journal of Biological Research. ISSN: 2012-578X. 2. 145. 10.14419/ijbr.v2i2.3584. [Consultado: 17 de diciembre de 2018] Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/280719900_Comparative_efficacy_of_different_herbal_and_modern_anthelmintics_against_gastrointestinal_nematodiasis_in_fowl
18. Ministerio de salud del Perú. Plan de desparasitación preventiva contra geohelminthos – La libertad, julio 2017 [Internet] [Consultado: 16 de diciembre del 2018] Disponible en:
<http://app.diresalalibertad.gob.pe/imagenes/campanas/PARASITOSIS/Plan-Regional-Desparasitacion2017.pdf>
19. Ministerio de salud. Instituto nacional de salud. Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3ra edición. 2005. Lima-Perú. [Consultado: 16 de febrero de 2019]; Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1669.pdf>
20. OMS. Preventive chemotherapy to control soil-transmitted helminth infections in at-risk population groups preventive chemotherapy to control soil-transmitted helminth infections in at-risk population groups, 2017. ISBN: 978 92 4 155 011 6. [Consultado: 16 de febrero de 2019], Disponible en:
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258983/9789241550116-eng.pdf;jsessionid=A0D9E133ABD8CC92BBC9EC43B8DA131D?sequence=1>
21. Organización Mundial de la Salud – OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005. [Internet] [Consultado: 12 de octubre del 2018] http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
22. Organización Mundial de la Salud. Helminthiasis transmitidas por el suelo. Nota descriptiva OMS [Internet]. 20 de febrero de 2018. [Consultado: 5 de setiembre de 2018]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/soil->

[transmitted-helminth-infections](#)

23. Organización Panamericana de la Salud. Geohelmintiasis: Más información. Notas descriptivas OPS/OMS [Internet]. Enero de 2015. [Consultado: 22 de setiembre de 2018]. Disponible en:
https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5747:2011-informacion-general-geohelmintiasis&Itemid=4138&lang=es
24. Qiao, J., et. al, H. (2014), Azadirachtin blocks the calcium channel and modulates the cholinergic miniature synaptic current in the central nervous system of *Drosophila*. *Pest. Manag. Sci.*, 70: 1041-1047. [Consultado: 4 de setiembre de 2018] Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ps.3644>
25. Rahmani AH, et al. Pharmacological and therapeutic potential of neem (Azadirachta indica). *Phcog Rev* 2018;12:250-5 ISSN: 0973-7847 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/328233489_Pharmacological_and_Therapeutic_Potential_of_Neem_Azadirachta_indica
26. Sindhu ZUD, et al. *In vitro* Ovicidal and Wormicidal Activity of Six Medicinal Plants against *Haemonchus contortus*. *Int. J. Agric. Biol.* [Internet]. 2014 [Consultado: 9 de octubre de 2018]; 16(6): 1199-1203. ISSN 1814–9596 Disponible en: http://www.fspublishers.org/published_papers/61957_..pdf
27. Sindhu, et al. *In vitro* Ovicidal and Wormicidal Activity of Six Medicinal Plants against *Haemonchus contortus*. *Int. J. Agric. Biol.* [Internet]. 2014 [Consultado: 9 de octubre de 2018]; 16(6): 1199-1203. ISSN 1814–9596 Disponible en: http://www.fspublishers.org/published_papers/61957_..pdf
28. Szwako A, et al. Estudio comparativo del efecto del neem (azadirachta indica) y la ivermectina al 1% sobre la carga parasitaria gastrointestinal en bovinos. *Compend. cienc. vet* [Internet]. 2017 June ISSN 2226-1761 [Citado el 10 de enero del 2019]; 7(1): 25-28. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2226-17612017000100025&lng=en
29. Ticona, J. (2015). Determinar la prevalencia y factores de riesgo del parasitismo intestinal en escolares del distrito de cabanaconde, provincia de caylloma-arequipa (Tesis). Bachiller. Universidad nacional de San Agustín. [Internet]. 2015 [Consultado: 28 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/462/M->

[21638.pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)

30. Werner AB. Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo. Rev. Med. Clin. Condes [Internet]. 2014 [Consultado: 8 de noviembre de 2018]; 25(3): 485-528.

Disponible en:

https://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2014/3%20abril/12-Dr.Apt.pdf

31. Zeenat, F. et al. (2018). Therapeutic, Phytochemistry and Pharmacology of

Azadirachta indica: A Review. 2. ISSN: 2616-4558. [Internet]. 2018 [Consultado:

28 de noviembre de 2018] Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/323846722_Therapeutic_Phytochemistry_and_Pharmacology_of_Azadirachta_indica_A_Review

ANEXOS

ANEXO 01 TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 [p_1(1 - p_1) + p_2(1 - p_2)]}{(p_1 - p_2)^2}$$

31

Donde:

- $Z_{\alpha} = 1.64$
- $Z_{\beta} = 0.84$
- $P_1 = 1$
- $P_2 = 0.94$
- $N = 10$

PROCEDIMIENTO

A. CERTIFICACIÓN DE LA PLANTA



ANEXO 03

- **Obtención del extracto acuoso de *Azadirachta indica* “Neem”**

La planta de *Azadirachta indica* “neem” se colectará en el distrito de Catacaos, Región Piura – Perú, y se llevará al laboratorio de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se deshidratarán dentro de una estufa a 45°C por 3-4 días. Después, se estrujarán las hojas secas y se reservarán almacenándolas herméticamente en bolsas negras.

El extracto de Neem se hará por el método de decocción, considerando los pasos siguientes:

- Se colocará 20 g de Neem seco y estrujado en un frasco estéril de 500ml.
- Se le adicionará 200ml de agua destilada
- Se calentará en una cocina hasta hervir, moviendo constantemente, por 15 minutos.
- Después, se dejará enfriar y se hará una doble filtración, primero a través de gasa estéril y luego con papel filtro Whatman 41.



Se prepararán las concentraciones a 500, 400, 300, 200, 100 y 50 mg/ml a partir del extracto de Neem y se almacenarán en frascos de vidrio ámbar, envueltos en papel aluminio, a 4°C hasta su utilización.



ANEXO 04

PRUEBA DE ECLOSIÓN DE HUEVOS (Egg Hatch Test - EHT)

(Según Coles et al, 2006)

Obtención de huevos de nematodos.

- Las hembras adultas se recogerán después de realizar una incisión longitudinal a lo largo de la curvatura mayor de los abomasos o cuajares de ovejas o del duodeno de cerdos infectados naturalmente.
- Los nemátodos presentes en ingesta o adheridos a la superficie de las tripas se toman manualmente con pinzas y se colocan en un frasco conteniendo Solución salina fosfato tamponada (PBS) fría (4°C) (pH 7,2) y luego se trituran en mortero.
- La suspensión se filtra a través de tamices de diferentes tamaños basados en las especies de nematodos en un recipiente.
- El filtrado se centrifuga en tubos Falcon durante 2 min aproximadamente y se descarta el sobrenadante.
- Los tubos se agitan para aflojar el sedimento y luego se añade una solución saturada de cloruro de sodio hasta que se forme un menisco sobre el tubo.
- Se coloca una cubierta (laminilla o papel celofán) al tubo con la muestra y se vuelve a centrifugar durante 2 minutos aproximadamente.
- La cubierta se separa cuidadosamente de los tubos y los huevos se lavan en un tubo de centrifuga de vidrio cónico.
- El tubo se llena con agua y se centrifuga durante 2 minutos a aproximadamente.
- El sobrenadante se decanta y los huevos se vuelven a suspender en agua. Los huevos se lavan tres veces en agua destilada y se ajustan a 500 huevos/ml usando la técnica de McMaster.

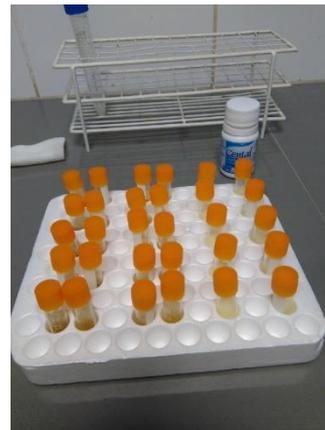


ANEXO 05

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA.

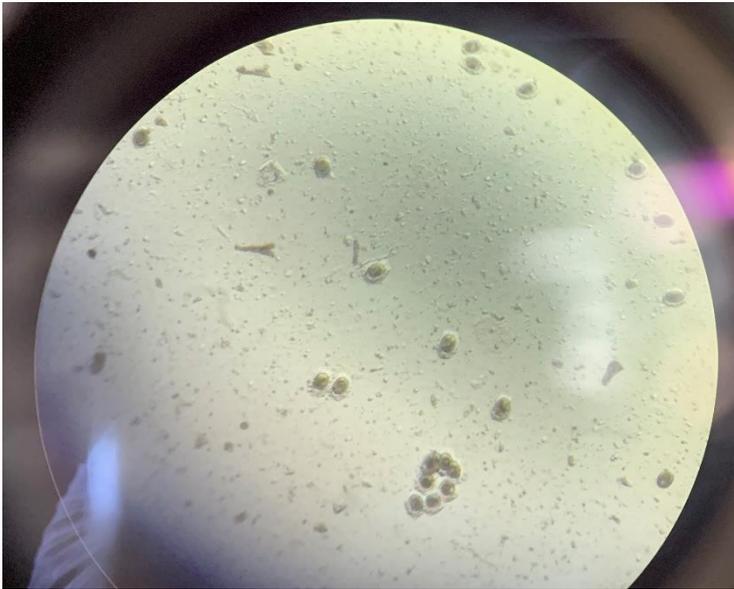
- La suspensión de huevos (0,2 ml, 100 huevos) se distribuye en una placa de microtitulación de 40 pocillos de fondo plano y se mezcla con el mismo volumen de diferentes concentraciones (de 0,15 a 5 mg/ml) del extracto de la planta en estudio.
- Los pocillos de control positivo reciben diferentes concentraciones (desde 3.0 a 0.0058 µg/ml) de albendazol, en lugar del extracto de planta
- Los pocillos de control negativo deben contener el diluyente (DMSO o agua destilada) y la solución con huevos de nemátodos.
- Los huevos con los agentes antihelmínticos en estudio, se incuban a 27°C por 48 horas.
- Después, se añade una gota de solución de Lugol para evitar que los huevos eclosionen.
- Se lleva al microscopio a 4X y se cuentan todos los huevos y las larvas de la primera etapa (L1) en cada placa.
- Debe hacerse tres réplicas para cada tratamiento con extracto de la planta y controles.
- Lectura e interpretación:

Se realizaron observaciones microscópicas a los 2; 7; 15; 21 y 28 días. Las observaciones mostraron que, hasta los 21 días, hubo inhibición total en la evolución y maduración en la minoría de huevos en relación a las diluciones, 14.12% al 50% y 24,56% al 100%, con el extracto acuoso del “Neem”

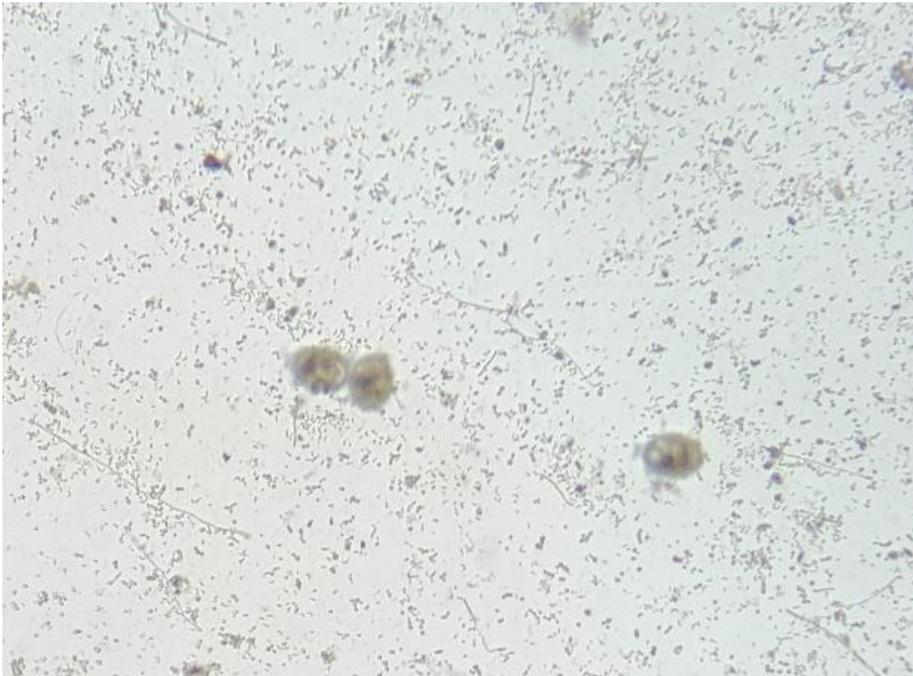


Huevos a las 48 horas:

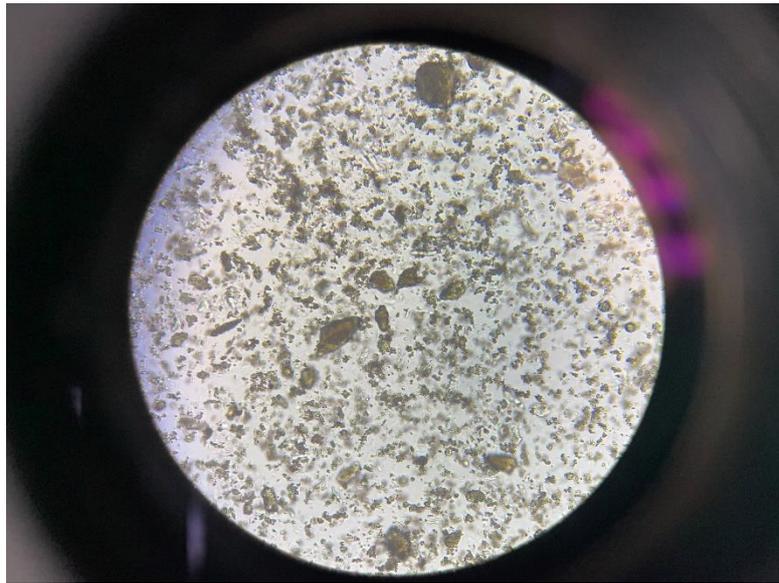
Huevos suspendidos sobre el extracto acuoso al 100% de *Azadirachta indica*:



Huevos suspendidos sobre el extracto acuoso al 50% de *Azadirachta indica*:



Huevos suspendidos en la solución de albendazol a las 48 horas:



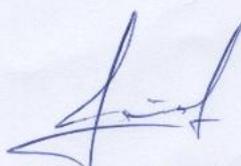
ANEXO 06

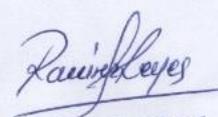
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

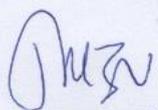
INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE HUEVOS DE NEMATODOS INTESTINALES

(expresado en porcentaje)

Nº repet	Extracto acuoso de Neem		Control Positivo	Control Negativo
	100%	50%	Albendazol	NaCl 0.9%
1	100%	100%	100%	0%
2	100%	100%	100%	0%
3	100%	100%	100%	0%
4	100%	100%	100%	0%
5	100%	100%	100%	0%
6	100%	100%	100%	0%
7	100%	100%	100%	0%
8	100%	100%	100%	0%
9	100%	100%	100%	0%
10	100%	100%	100%	0%


Jaime Polo Gamboa
Jaime A. Polo Gamboa
MICROBIOLOGO
CBP 6551


C.B.P 3866.


CBP 4567

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS
INHIBICIÓN DE LA ECLOSIÓN DE HUEVOS DE NEMATODOS INTESTINALES
SEGÚN ETAPA DE EVOLUCIÓN DE HUEVOS

Nº repet	Extracto acuoso de Neem		Control Positivo		Control Negativo	
	Estado del desarrollo larvario					
	Inhibición en el estadio L1 I		Inhibición en el estadio L1 II		Lisis	Inhibición
	100%	50%	100%	50%	Albendazol	NaCl 0.9%
1	75.8%	27.8%	24.2%	72.2%	100%	0%
2	5.7%	7.1%	94.3%	92.9%	100%	0%
3	29.3%	10%	70.7%	90%	100%	0%
4	15.6%	7.7%	84.4%	92.3%	100%	0%
5	9.7%	36.7%	90.3%	63.3%	100%	0%
6	66.7%	9.7%	33.3%	90.3%	100%	0%
7	10%	7.1%	90%	92.9%	100%	0%
8	13.8%	12.5%	86.2%	87.5%	100%	0%
9	6.7%	8.2%	93.3%	91.8%	100%	0%
10	16%	20%	84%	80%	100%	0%
PROMEDIO	24.93%	14.68%	75.07%	85.32%	100%	0%

Jaime Polo Gamboa
 Jaime A. Polo Gamboa
 MICROBIOLOGO
 CSP 4251

Raúl Reyes
 C.B.P. 3866

Ortiz
 C.B.P. 4567

FICHA DE EVALUACIÓN DE INSTRUMENTO POR EXPERTO



ANEXO N° 0

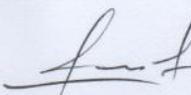
FICHA DE EVALUACIÓN INSTRUMENTO POR EXPERTO

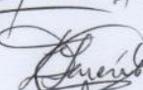
ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3												
4												
5												

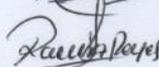
CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES	SI	NO	OBSERVACIONES
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos	X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación	X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial	X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir	X		
VALIDEZ			
APLICABLE	X	NO APLICABLE	APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN

Validado por:

Fecha: 12/06/2019

Jaime Polo Gamboa  CBP 6951 Firma y sello

DAVID GARCÍA CEDRÓN  CBP: 5827

Roxana Ramírez Reyes  C.B.P 3866

ANEXO 9

ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

	ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS	Código : F06-PP-PR-02.02
		Versión : 09
		Fecha : 23-03-2018
		Página : 1 de 1

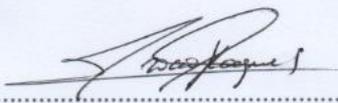
Yo MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ, docente de la Facultad de Ciencias Médicas y Escuela Profesional de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, revisor (a) de la tesis titulada:

"Eficacia antiparasitaria in vitro del extracto acuoso de *Azadirachta indica* contra *ascaris lumbricoides*, comparado con albendazol."

del (de la) estudiante Luis Martín Díaz Pinedo constato que la investigación tiene un índice de similitud de 24% verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin.

El/la suscrito (a) analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

Lugar y fecha Trujillo 21 de noviembre del 2019.



Firma

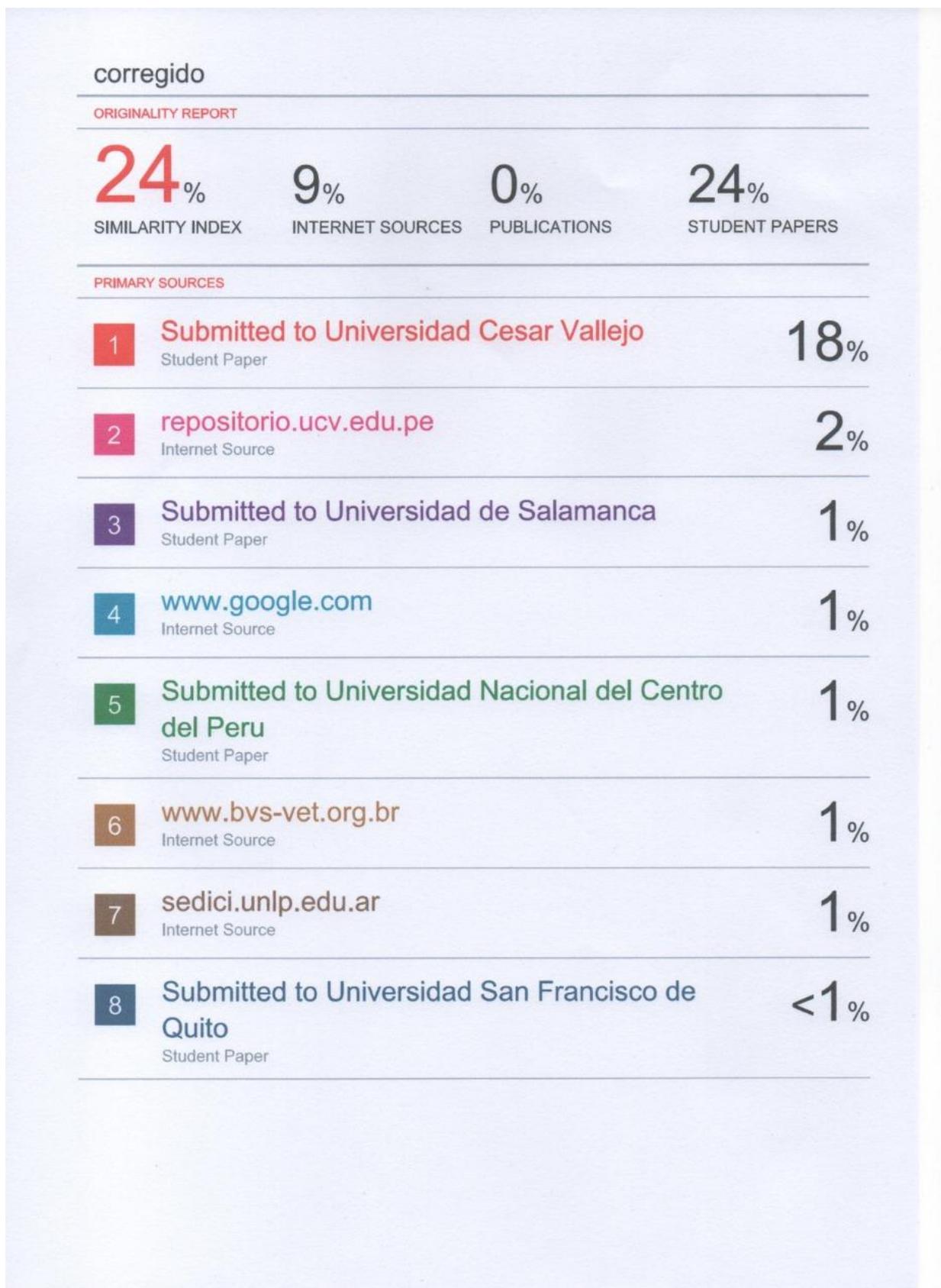
Dra. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

DNI: 17907759

Elaboró	Dirección de Investigación	Revisó	Responsable de SDC	Aprobó	Vice Rectorado de investigación
---------	----------------------------	--------	--------------------	--------	---------------------------------

ANEXO 10

REPORTE DE ORIGINALIDAD DE TURNITIN



9 165.158.1.110 <1%
Internet Source

10 bvs.sld.cu <1%
Internet Source

11 www.forsalud.org.pe <1%
Internet Source

Exclude quotes Off

Exclude matches < 10 words

Exclude bibliography Off

ANEXO 11

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS EN REPOSITORIO UCV

 UCV UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO	AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS EN REPOSITORIO INSTITUCIONAL UCV	Código : F08-PP-PR-02.02 Versión : 09 Fecha : 23-03-2018 Página : 1 de 1
--	--	---

Yo Díaz Pinocho Luis Martín, identificado con DNI N° 70618881 egresado de la Escuela Profesional de Medicina de la Universidad César Vallejo, autorizo (X), No autorizo () la divulgación y comunicación pública de mi trabajo de investigación titulado "Eficacia antiparasitaria in vitro del extracto acuoso de Anacardium occidentale contra acaris lumbricoides, comparado con albendazol"; en el Repositorio Institucional de la UCV (<http://repositorio.ucv.edu.pe/>), según lo estipulado en el Decreto Legislativo 822, Ley sobre Derecho de Autor, Art. 23 y Art. 33

Fundamentación en caso de no autorización:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....


FIRMA

DNI: 70618881

FECHA: 21 de noviembre del 2019.

Elaboró	Dirección de Investigación	Revisó	Responsable del SGC	Aprobó	Vice Rectorado Investigación
---------	----------------------------	--------	---------------------	--------	------------------------------