

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	27 MAR 2009
Hora	11:20
Nº Ingreso	3108

## **INFORME FINAL**

**PROYECTO:**

**“Desarrollo de un sistema de control de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans* (L.)) mediante la utilización del extracto del árbol *Azadirachta indica* (Neem) en rebaños productores de carne bovina”**

**CODIGO: PI-C-2004-1-P-025**

**Ejecutor**

**CENTRO DE EDUCACIÓN Y TECNOLOGIA**

**Empresa asociada**

**AGRÍCOLA PALOMAR LTDA.**

## I. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del Proyecto; Código; Región

### SECCIÓN I : ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

**NOMBRE DEL PROYECTO:** “Desarrollo de un sistema de control de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans* (L.)) mediante la utilización del extracto del árbol *Azadirachta indica* (Neem) en rebaños productores de carne bovina”

**CODIGO:** PI-C-2004-1-P-025

#### **REGION(ES) y PERIODO DE EJECUCIÓN:**

Regiones: V-VI-Región; Región Metropolitana

Fecha de aprobación o adjudicación; forma de Ingreso al FIA (Concurso, Ventanilla)

Fecha de Aprobación : 20/12/2004

Forma de Ingreso: Concurso de Innovación Agraria

Agente Ejecutor y Asociados

#### **AGENTE POSTULANTE o EJECUTOR**

- Nombre : CENTRO DE EDUCACIÓN Y TECNOLOGIA
- RUT : 71787200-2
- Dirección : Nueva Amunátegui 1405 Of. 402.
- Región : Región Metropolitana.
- Ciudad : Santiago.
- Fono : 6979543
- Fax : 6979563
- E-mail : admcet@terra.cl
- Web : WWW.cet.cl

• **AGENTES ASOCIADOS**

- **Nombre** : **Agrícola Palomar S.A.**
- **RUT** : **76952570-k**
- **Dirección** : **Fundo Huechún Camino a Catillo, Parral**
- **Región** : **VII**
- **Ciudad** : **Parral**
- **Fono** : **73-462726**
- **Fax** : **73-462726**
- **E-mail** : **Agricolapalomar@entelchile.net**
  
- **Web** :

**REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE**

- **Nombres y Apellidos** : **Patricia Méndez Urrutia**
- **Dirección y Comuna** : **Nueva Amunátegui 1405 Of. 402  
Santiago Centro**
  
- **Región** : **Metropolitana**
- **Ciudad** : **Santiago**
- **Fono** : **6979543**
- **Fax** : **6979563**
- **E-mail** : **admcet@terra.cl**

**REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE ASOCIADO**

- **Nombres y Apellidos** : **Fernando Urrutia García.**
- **Dirección y Comuna** : **Fundo Huechún Camino a Catillo, Parral**
- **País** : **Chile**
- **Región** : **VII**
- **Ciudad** : **Parral**
- **Fono** : **73-462726**
- **Fax** : **73-462726**
- **E-mail** : **Agricolapalomar@entelchile.net**

Coordinador del Proyecto

**Coordinador del proyecto: Andrés Yurjevic Marshall**

Costo Total Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total)

<b>COSTO TOTAL DEL PROYECTO</b> <i>(Valores Reajustados)</i>	: \$	<b>154114992</b>		
<b>FINANCIAMIENTO SOLICITADO A FIA</b> <i>(Valores Reajustados)</i>	: \$	<b>87882583</b>	<b>57,02</b>	%
<b>APORTE DE CONTRAPARTE</b> <i>(Valores Reajustados)</i>	: \$	<b>66232409</b>	<b>42,98</b>	%

Período de Ejecución

Fecha de Inicio	20/12/2004
<b>Fecha de termino :</b>	30/01/09
<b>DURACIÓN :</b>	48 meses

## II. RESUMEN EJECUTIVO

La iniciativa de investigación que se describe en el presente informe tuvo como objetivo el desarrollo de un método de control del parásito hematófago *Haematobia irritans* (L.), mediante la utilización del extracto del árbol del Neem, azaditachtin, formulado como bolos intrarruminales de liberación lenta en el aparato gastrointestinal en bovinos de carne. Para el logro de este objetivo se ha establecido una relación de trabajo entre la empresa Agrícola Palomar Ltda., productora y comercializadora de bovinos de carne; la empresa Indú The Dharamsi Morarji Chemical Co. Ltd. con la Corporación Centro de Educación y Tecnología. La empresa agrícola Palomar aportó al proyecto infraestructura, animales y un área de praderas para el establecimiento de los ensayos a nivel de campo. La empresa Indú The Dharamsi Morarji Chemical Co. Ltd. produce y comercializa a nivel mundial productos químicos e insumos orgánicos entre ellos Azadirachtin y aportó este producto para su evaluación en el control de la mosca de los cuernos. La finalidad de este tipo de propuesta, es lograr en la empresa nacional productora de carne, la utilización de elementos para el manejo sanitario de los animales, aceptados por los mercados internacionales que sean compatibles con un manejo conservador de la flora y fauna de los ecosistemas.

En el proyecto se evaluó un extracto botánico (azadirachtin) de bajo impacto ambiental y se diseñó un dispositivo (cápsulas) para su aplicación en bovinos de carne, que permite su lenta liberación a nivel intrarruminal. Se debe desarrollar a partir de estos resultados un método industrial de producción de los dispositivos de efecto regulador de *H. irritans*.

Como producto final se logró una presentación de cápsulas que introducidas en el retículo-rumen, permiten una liberación lenta del regulador de *H. irritans*, de manera de alcanzar una concentración activa en las fecas animales, con acción sobre los estados juveniles de *H. irritans* inhibiendo la emergencia y desarrollo de los estados adultos del díptero. El dispositivo rebaja en un 66.81% las poblaciones de *H. irritans* durante su periodo de liberación que alcanza hasta 70 días

En la primera etapa del proyecto se estableció una crianza de *Haematobia irritans* de modo de obtener los diferentes estados de desarrollo del insecto, que

permitió evaluar en laboratorio el efecto de diferentes dosis de Azadirachtin y conocer la sensibilidad de los distintos estadios a las concentraciones del principio activo en estudio.

Etapa fundamental del trabajo fue el establecimiento de la factibilidad de uso distintos niveles de azadirachtin tanto en suspensión en una primera etapa como en cápsulas de liberación intrarruminal, finalmente este capítulo, constituyó un área de relevancia de este trabajo, tanto en su evaluación experimental in vitro como en su evaluación in vivo. Las distintas etapas de la investigación se realizaron en la Central demostrativa de la Corporación Centro de Educación y Tecnología y en ensayos de campo, que se llevaran a cabo en el predio los Huechún, de propiedad de Agrícola Palomar S.A.

Como una necesidad para conocer el efecto de azadirachtin en la calidad de la carne, por su potencial efecto contaminante, se estableció a través de una tesis de grado con la Facultad de Química y Farmacia de la U de Chile, un método para determinar la presencia de residuos de azadirachtin a nivel muscular en bovino, estableciéndose, través de este procedimiento, que azadirachtin utilizado como regulador de las poblaciones d *H. irritans*, en las dosis evaluadas y establecidas por investigación, no se acumula ni es demostrable, como residuo, en el tejido muscular.

Este proyecto abre una importante línea de generación de dispositivos o matrices farmacológicas de uso intrarruminal, de entrega lenta, utilizables en producción de rumiantes, aplicables a la administración de antibióticos, vitaminas, minerales y controladores biológicos, entre otros elementos, con una gran proyección tecnológica y económica. Esta potencialidad tiene relación tanto con sus posibilidades en el campo de los insumos destinados a la producción animal, como con la apertura de mercados de nicho que demandan productos pecuarios, originados en sistemas productivos de bajo impacto ambiental.

### III. TEXTO PRINCIPAL

1. **Cumplimiento de los objetivos del proyecto:** descripción del cumplimiento de los objetivos en función de los resultados e impactos obtenidos.

#### Objetivos Generales

Diseño de un sistema de control de la mosca de los cuernos (**Haematobia irritans** (L.)) mediante la implementación y evaluación de la administración oral de extracto de Neem, (azadirachtin) para regular las poblaciones de **H. irritans** en sistemas de producción de carne bovina.

#### Objetivos Específicos

- 1) **Desarrollar una crianza artificial del díptero hematófago *H.irritans*, que proporcione los distintos estadios biológicos del parásito, para realizar la evaluación in vitro del extracto de Neem.**

Se estableció un sistema de crianza a través de la incubación de huevos de *H. irritans* a partir de poblaciones de campo, alimentadas de manera artificial con sangre bovina citratada, los adultos se deponen en jaulas de apareamiento y alimentación por 4 a 5 días, iniciándose posteriormente la postura de huevos y nuevamente el ciclo. Las posturas de huevos de estas hembras se manejaron en cámara de incubación sobre potes de 100 gramos con material fecal de bovino, a 27 C°, con fotoperíodo luz oscuridad de 16:8 horas, respectivamente, por 14 días, lográndose las emergencias de adultos establecidas para la especie. (Aprox. 50% de emergencia). La crianza se mantuvo de manera continua, en la medida en que se introducían periódicamente al sistema, ejemplares desde del campo, sin embargo, cuando se trabajó sólo con ejemplares producidos en laboratorio, su mantención en el tiempo se logró durante las tres primeras generaciones. A partir de la tercera generación se reintroducen nuevos ejemplares al sistema, a partir de poblaciones de insectos del campo.

**2) Evaluar in vitro, el efecto de distintas dosis del extracto de *A. indica*, sobre estados juveniles de *H. irritans*, para establecer la DL50 y DL90.**

Las evaluaciones in vitro no arrojaron los resultados esperados, debidos a que las dosis con las que se trabajaron; 0.01, 0.02, 0.03 ppm de azadirachtin para 100 gramos de fecas rectales, resultaron ser muy pequeñas y muy difíciles de homogenizar con las fecas, por lo tanto los resultados fueron inconsistentes entre tratamientos y control, situación que cambió al evaluar dosis más elevadas desde 0.1 a 0.5ppm/100g fecas.

Como consecuencia de esta dificultad se realizó el experimento y la evaluación inicial se realizó in vivo, administrándole a los animales, el insecticida botánico en suspensión, en relación al peso de los bovinos en experimentación (0.02; 0.03; 0.05 ppm), evaluando el efecto directo del producto sobre la eclosión de insectos a partir de colectas de fecas rectales y siembra de huevos sobre ella. De tal manera, se estableció la DL50 y DL90 las que se ubicaron en los 0.0632 mg. y 0.03637 mg. Con límites para DL50 de 0.000119 y 0.01207 mg/Kpv. Para DL90 los límites inferior y superior fueron 0.03637 y 0.07469 respectivamente

**3) Evaluación in vitro del efecto de los procesos digestivos de bovinos, sobre el principio activo Azadirachtin.**

La evaluación del efecto de los proceso digestivos sobre azadirachtin, mediante la introducción de una muestra conocida del extracto en el sistema de Tylley Terry y posteriormente mezclando una cantidad de este producto con fecas deshidratadas y estériles, donde se sembraron huevos de *H. irritans*. Indica que en la segunda fase del proceso de simulación de la digestión abomasal, con la aplicación directa de ácido clorhídrico, el principio activo azadirachtin se degrada, en consecuencia no se observó control sobre la emergencia de los adultos de *H. irritans*. en las pruebas realizadas sobre las fecas Esta situación determinó la realización de ensayos directos, sobre bovinos en experimentación

**4) Evaluación en novillos de experimentación, el efecto de azadirachtin administrado en cápsulas de gelatina, sobre *H. irritans* a nivel fecal.**

Se administraron diversas dosis del extracto del árbol del Neem, azadirachtin, a grupos de bovinos en estudio, para luego utilizar muestras fecales de estos animales y establecer el impacto sobre la emergencia de adultos de *H. irritans*. Las dosis evaluadas fueron, 0.02, 0.03, 0.04 ppm/Kilo peso vivo de los animales en experimentación (promedio 354K), éstas fueron administradas directamente en suspensión, y no a través de cápsulas de gelatina, opción considerada inicialmente, este procedimiento no se incluyó en el protocolo experimental, concluyéndose que era poco práctico de realizar dado el tamaño pequeño de las cápsulas; además se estimó que no permitían una mezcla homogénea; que era poco representativo del mecanismo final que se estaba buscando y que flotarían a nivel ruminal introduciéndose con dificultad en la mezcla de alimentos. En consecuencia, mediante el suministro en suspensión se logró establecer que el efecto de azadirachtin alcanza a un 93% de inhibición de la emergencia de adultos en dosis de 0.05 y su efecto es de un 79.3 y 88.57 % cuando se administró 0.02 y 0.03 mg/Kpv respectivamente.

**5) Diseñar y evaluar in vitro, mediante el método de Tilley Terry, e in vivo mediante el método de digestibilidad in vivo (nylon bags), el comportamiento de bolos intrarruminales de baja digestibilidad, que permitan su uso posterior en la entrega gradual del principio activo en evaluación.**

Se diseñaron diversas matrices farmacológicas en base a compuestos grasos de alto punto de fusión denominados gelucires, junto a excipientes asociados a hierro metálico, elemento de alto peso molecular de modo de obtener densidades de a lo menos 1.6 g/cc para asegurar que la formulación no resulte expulsada del rumen y de baja digestibilidad, las proporciones de cada elemento se ajustaron por ensayo y error de manera de establecer la tasa de digestión intrarruminal, necesaria de acuerdo a los objetivos del proyecto. Por medio de bolos intrarruminales, evaluados en animales

fistulados, se determinó que la composición más resistente, al medio intrarruminal correspondió a las fabricadas en base de Gelucire 50/02, Compitrol 888, y Hierro, con un peso de  $105,73 \pm 0.8$  gramos y una duración de 70 días a una tasa media de liberación de 26 mg. de azadirachtin por día.

**6) Establecer in vivo el comportamiento y la aparición a nivel fecal de Azadirachtin incorporado en bolos de uso intrarruminal, a través del efecto sobre larvas del díptero *H.irritans*.**

Esta evaluación permitió establecer el nivel de control a nivel fecal de Azadirachtin, sobre la emergencia de los insectos, a partir de evaluaciones en fecas rectales y en fecas depositadas directamente en el campo, a partir de animales que ingirieron el principio activo.

La administración de azadirachtin y evaluación de los tratamientos se realizó tanto con capsulas de uso intrarruminal de digestión lenta, establecido en la propuesta, como con bloques minerales, administrados para consumo ad-libitum, solamente regulado por la dureza de estos dispositivos. Los resultados indican que bajo condiciones de tratamiento con Neem en bolos intrarruminales, el nivel de emergencia de los insectos sigue una tendencia clara con una relación positiva, dosis-respuesta, produciéndose una reducción de las poblaciones de *H. irritans*, en relación al aumento de la dosis del principio activo

En tanto para los bloques minerales los resultados muestran una menor consistencia, influenciado por la aleatoriedad del consumo de los bloques minerales en primavera/verano

- 7) **Establecer a nivel de campo, dosis y frecuencia de aplicación de extracto de *A. indica*, en bolos intrarumiales para obtener poblaciones de *H. irritans* en niveles tolerables para los bovinos.**

Se estableció la frecuencia y dosis de los bolos intraruminales en su uso en bovinos a nivel de campo, definiendo finalmente la aplicación de 1 bolo con duración de 70 días, y 0,04 mgs por kilogramo de peso vivo.

- 8) **Escalamiento y definición de la presentación del producto controlador obtenido.**

Se está trabajando cual es la forma de financiar el proceso de importación del principio activo y la forma de desarrollar de manera industrial las capsulas intraruminales.

- 9) **Capacitación de productores de carne bovina en el uso de bolos de Azadirachtin como controlador del parásito *H. irritans*.**

Se realizó un seminario final, sobre los resultados obtenidos en el proyecto con técnicos del área, académicos y productores

- 10) **Desarrollo de un estudio en el laboratorio de Cinética de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, que permita la implementación de un método para establecer trazas de Azadirachtin en la carne de los animales tratados.**

a) Se desarrolló una tesis que permitió establecer el método para la evaluación de trazas de azadirachtin en carne bovina.

b) Con el método desarrollado en la tesis de grado realizada en la Facultad de Química y farmacia de la Universidad de Chile se estableció claramente, que no aparecen residuos en el tejido muscular de bovinos rumiantes sometidos a tratamiento con Azadirachtin, aun en dosis de 10,2 mgrs por cada 100

kilogramos de peso vivo, administrados durante 14 días a un novillo de 200 Kg.  
la dosis normal evaluada es de 4 mgs/100kgs.de peso vivo

## **2. Aspectos metodológicos del proyecto: Metodología utilizada.**

- 1) Desarrollar una crianza artificial del díptero hematófago *H.irritans*, que proporcione los distintos estadios biológicos del parásito, para realizar la evaluación in vitro del extracto de Neem.**

La Crianza de *H.irritans* se basó en lo descrito por Lockwood et al. (1985); Lysyk (1991); Miller et al. (1986)

Se colectan adultos de *H.irritans* desde bovinos en pastoreo y se mantienen en jaulas de PVC de 1500ml y malla mosquitera e incuban a  $27^{\circ} C \pm 1^{\circ} C$  con fotoperíodo de 16:8 (luz: oscuridad) y >50% HR por 48 hrs. alimentándolas con sangre de bovino citratada, para prevenir la coagulación (5g de citrato de sodio en 5ml de agua por litro de sangre), sobre trozos de esponja dispuestos en la parte superior de las jaulas, adicional a éstas se colocaban esponjas mas pequeñas con solución azucarada.

Las jaulas se depositaban sobre bandejas con género negro húmedo, los huevos ovipositados en el piso, sobre la bandeja, eran colectados con pincel y dispuestos sobre cuadrados de papel absorbente (100 huevos por cuadrado) Estos huevo se disponían sobre fecas frescas de bovinos (100g) a razón de 100 huevos en recipientes. Luego se incuban por 14 días a  $27^{\circ} C \pm 1^{\circ} C$  >50% HR bajo un fotoperiodo de 16:8 (L:O). Los adultos emergidos eran retirados, con aspirador, a medida que eclosionaban, se depositaban en jaulas, se alimentaban con sangre de bovino citratada, para iniciar nuevamente el ciclo.

**2) Evaluar in vitro, el efecto de distintas dosis del extracto de *A. indica*, sobre estados juveniles de *H. irritans*, para establecer la DL50 y DL90.**

**2.0)** Se evaluaron ocho concentraciones del principio activo, azadirachtin, en fecas bovinas. El método a desarrollar y las concentraciones del principio activo son las recomendadas por Miller y Chamberlain (1989).

A 300 gramos de fecas, se aplicaron ocho niveles conocidos (ppm) del principio activo. Las concentraciones fueron 0.01, 0.02, 0.03, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ppm. de azadirachtin, las que se mezclaron con fecas rectales, cada muestra de 300g se dividió en 3 submuestras de 100g, sobre los que se depositaron 100 huevos de la mosca, obtenidos de la colonia mantenida en laboratorio.

Las fecas depositadas en envase de 250ml, se cubrieron con gasa e incubaron a 27° C y 50% HR por 14 días y el número de adultos para cada muestra registrados

Debido a la inconsistencia de los resultados obtenidos con las dosis más pequeñas (0.01, 0.02 y 0.05, no así con las dosis mayores, en relación a la dificultad para lograr una adecuada homogenización del principio activo en las fecas y a los efectos sobre la emergencia de los insectos, se optó por realizar una ampliación de este ensayo en animales de experimentación, cuyo objetivo fue:

**2.1) Evaluación y obtención de la dosis letal de Azadirachtin (LD50 y LD90) sobre *H. irritans*, mediante la aplicación directa a novillos, de una suspensión de diferentes concentraciones del principio activo**

Se realizaron 4 niveles de aplicación de azadirachtin (0.0 (testigo), 0.02, 0.03 y 0.05 ppm/ kilogramo de peso vivo. Los animales con un peso promedio de 354 Kg., fueron tratados diariamente por vía oral, con 30cc/día de una solución acuosa de azadirachtin y de acuerdo al peso del animal. Cada dosis fue entregada diariamente a dos animales por 4 días, terminado con la colecta de fecas rectales (seis por dosis) las que fueron incubadas (tres repeticiones por animal) con huevos del díptero como se indica en el punto anterior. Los resultados en los niveles de emergencia de los insectos adultos

fueron usados para análisis Probit (Finney 1971).

(Todos los animales se tratarán contra parásitos gastrointestinales y pulmonares antes y en cada etapa de evaluación del insecticida botánico).

### **3.0) Evaluación *in vitro* del grado de actividad del principio activo azadirachtin luego de ser sometido al método de Tilley Terry.**

Esta evaluación permite conocer el grado de actividad de los residuos de azadirachtin post digestión *in vitro*, sobre los estados juveniles de *H.irritans*. En este sistema, se empleó una suspensión pura del compuesto, en solución isotónica, correspondiente a la dosis letal más efectiva de azadirachtin (ppm), obtenida en el punto anterior (0.03ppm), conjuntamente se usaron tres dos concentraciones más del principio activo, 0.02; 0.030 y 0.04 (ppm), referenciadas en la literatura como eficientes para el control de la mosca en bovinos, Miller y Chamberlain (1989).

Con el compuesto puro, se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones indicadas y requeridas para el volumen empleado en el Tilley Terry. El volumen final del proceso, aproximadamente 50ml, se utilizó en los ensayos, mezclando este volumen con fecas deshidratadas y estériles para evitar diluir la concentración del compuesto luego del proceso digestivo.

A) Cada suspensión, en el volumen final (50ml) se mezcló con 10g de fecas deshidratadas y estériles, incorporando sobre ellas 60 huevos del insecto, luego se incubaron a 27° C y 50% HR por 15 días. El número de adultos emergidos se registró para cada muestra.

B) El tratamiento testigo, sin pasar por Tilley Terry, e igual volumen anterior (50ml), se mezcló con fecas secas estéril donde se colocarán los huevos de *H.irritans*, siguiendo el mismo procedimiento que en el punto anterior.

Se realizaron tres réplicas por tratamiento y los datos se someterían a análisis de varianza.

**Digestibilidad «in vitro. (Tilley Terry).** Este método se refiere a una técnica biológica de laboratorio que pretende simular las condiciones existentes en el rumen. Para ello se somete una muestra de peso conocido, a incubación conteniendo licor ruminal extraído de un animal provisto de una cánula ruminal, de donde se extrae el contenido ruminal que se decanta para obtener el licor ruminal con su contenido de microorganismos. Este se mezcla con una cantidad conocida de muestra, en donde se burbujea CO<sub>2</sub> y se cierra con un tapón Bunsen. Este posee una válvula que permite que salga el exceso de gas que se produce en la digestión ruminal en el interior del tubo. A partir del residuo decantado y luego de ser incubado por un cierto tiempo se determina la fracción insoluble, que correspondería a la porción indigestible.

En este caso se tendrá la información sobre el efecto de una dosis conocida de azadirachtin, evaluando la pérdida de efecto de la suspensión de Azadirachtin por el efecto de la digestión ruminal sobre larvas de *H. irritans*, las que serán tratadas posteriormente con el líquido remanente de la fermentación in vitro con licor ruminal.

En el caso de la técnica «in vitro» lo que no es digerido durante la incubación con el licor ruminal es considerado como no digestible. Por ello se hicieron modificaciones a esta técnica que dio origen a la llamada digestibilidad «in vitro» de dos etapas. La técnica consiste en extraer una cierta cantidad de fluido ruminal que se mezcla con la muestra de alimento en la primera etapa de digestión. Esta es seguida por una segunda etapa donde se solubiliza el residuo de la primera etapa con una solución ácido-pepsina que simula la digestión en el abomaso e intestino delgado del alimento y de las proteínas microbiales.

Como sucede con la mayoría de los métodos de evaluación de forrajes, esta técnica no está diseñada para duplicar o simular completamente las condiciones del rumen, sino para tener una estimación que permita predecir los parámetros «in vivo». El método de dos etapas propuesto por Tilley y Terry (1963) se considera el precursor de la fermentación in vitro dividido en dos etapas y generalmente usado como estándar de excelencia para confrontar otros métodos.

### **Digestión Ruminal.**

Se fermenta por 48 hrs. el alimento a analizar, en licor ruminal (inoculo de microorganismos del rumen). El alimento debe estar molido con un tamiz de 1 mm para facilitar la acción de los microorganismos y contar con un contenido de materia seca no menor al 88%. Esta mezcla de alimento con el licor ruminal y saliva artificial, que no contiene enzimas, y por lo tanto es una solución tampón, debe permanecer en baño María a 39°C con una agitación suave y continua (para simular las condiciones anaeróbicas del rumen).

### **Digestión Abomasal.**

Luego de la fermentación se procede a realizar una digestión con ácido clorhídrico y pepsina. La diferencia medida entre ambas muestras (pre y post digestión in vitro) corresponde al nutriente o materia orgánica digerida.

Los resultados obtenidos con las dosis indicadas, fueron inconsistentes, debido al efecto inactivador del ácido clorhídrico sobre el azadirachtin, en consecuencia no se observó ningún control del principio activo sobre la emergencia de los insectos, por lo tanto esta metodología de Tilley Terry, no es la adecuada para evaluar in vitro, el nivel de actividad del principio activo producto de la actividad ruminal, situación que fue resulta mediante evaluaciones directas sobre animales en experimentación.

#### **4) Evaluación en novillos de experimentación, el efecto de azadirachtin administrado en cápsula de gelatina sobre *H irritans*, a nivel fecal**

Debido al efecto inactivador del ácido clorhídrico sobre el azadirachtin observados, a través de este método, se realizó la evaluación de estas dosis de manera directa sobre novillos en experimentación, suministrando vía oral el principio, en una suspensión de 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 ppm por peso vivo de animal.

**4.0) Para evaluar el efecto de los procesos digestivos en bovinos sobre el principio**

activo y en su efecto sobre los estados de desarrollo de la mosca, a nivel fecal. Se administraron cuatro dosis conocidas de azadirachtin en la dieta animal, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 ppm por peso vivo de animal, más un testigo sin azadirachtin, vía suspensión acuosa, cada concentración fue suministrada en 30cc por animal, dos animales por dosis, por cuatro días, a través de una jeringa por el hocico. No se emplearon las cápsulas de gelatina debido a la dificultad de suministrarla a los animales, por su tamaño y debido a su tendencia a flotar y no mezclarse en el rumen.

Al cabo de 96 horas de haber ingerido el producto, se tomaron muestras de fecas rectales, se dividieron en submuestras de 100g y a cada una se sembró con 100 huevos de *H. irritans*, se incubaron a 27°C por 15 días evaluando el número de insectos emergidos para cada dosis y repetición (tres repeticiones por animal, dos animales por cada dosis y dos repeticiones por tratamiento).

Los datos se evaluaron a través de análisis de varianza y prueba de rangos múltiples de Duncan`s

**5) Diseñar y evaluar in vitro, mediante el método de Tilley Terry, e in vivo mediante el método de digestibilidad in vivo (nylon bags), el comportamiento de bolos intrarruminales de baja digestibilidad, que permitan su uso posterior en la entrega gradual del principio activo en evaluación.**

**5.0) Desarrollo de cápsulas intrarruminales que permitan la liberación lenta del extracto de *A. indica*.**

La facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, diseñó diversas matrices farmacológicas en base a compuestos grasos de alto punto de fusión denominados gelucires, asociados a hierro, elemento de alto peso molecular de modo de obtener densidades adecuadas. La permanencia de los productos en el rumen está condicionada por la densidad que tenga la formulación y de acuerdo con la revisión bibliográfica, es necesario alcanzar densidades de a lo menos 1,6 g/cc para asegurar que la formulación no sea expulsada del rumen o por los movimientos inherentes a su

actividad.

Las proporciones de cada elemento se ajustaron por ensayo y error de manera de establecer la tasa de digestión intrarruminal, necesaria de acuerdo a los objetivos del proyecto obteniendo píldoras de alto peso específico y con prolongada permanencia en el retículo-rumen. Los bolos desarrollados inicialmente presentaron un peso promedio de 19 – 20 gramos cuya composición fue en base a un excipiente graso que proporciona una lenta liberación del producto, además de un conjunto de elementos que proporcionan un adecuado balance hidrofílico/lipofílico. La composición definitiva de las píldoras fue: Gelucire 50/02 sólido ceroso, propilenglicol, hierro y compitrol como excipiente para regular la liberación desde la matriz de gelucire. Estas píldoras finales para bovinos, resultaron con un peso de  $103,73 \pm 08$  gramos y una duración en retículo- rumen de 70 días.

### **5.1) Evaluación in vitro de los bolos de uso intrarruminal mediante el método de Tilley Terry**

Las cápsulas con un peso aproximado de 5grs., se evaluaron respecto de su resistencia a la digestión ruminal con el sistema de digestión de Tilley –Terry, de manera de establecer el tiempo que esas cápsulas resisten la acción digestiva de la biología del rumen.

Las cápsulas con diferentes porcentajes de ingredientes, (gelucire, alcohol, propilenglicol, hierro y compitrol) se pusieron en frascos de 50ml de licor ruminal manteniéndolos a 39°C a baño maría, evaluando cada 48 horas la reducción de peso de las mismas.

Este método de evaluación resultó ser muy ineficiente porque las cápsulas no experimentaban reducción de peso en el tiempo, en consecuencia se determinó hacer las evaluaciones directo sobre animales

## **5.2) Evaluación in vivo de los bolos de uso intrarruminal mediante el método de las bolsas de nylon en novillos fistulados.**

En una segunda etapa se realizó un proceso de digestión de las cápsulas desarrolladas (30g), en bolsas intrarruminales en un animal fistulado, ovino, introduciendo las cápsulas al interior del rumen amarradas con hilo plástico al tapón de la cánula y pesadas periódicamente, cada tres días, eran extraídas, secadas a temperatura ambiente por 24 horas, pesadas y nuevamente introducidas en las bolsas. Los comprimidos evaluados en ovino, correspondieron a los de la Fase I del ensayo, para luego utilizar dispositivos de mayor tamaño y peso (103 gramos) en novillos fistulados. Bajo esta modalidad, en bolsas de nylon, las píldoras presentaron una lenta tasa de entrega, no reflejando la verdadera tasa de desintegración que se observa en sistemas directos, donde los movimientos y contracciones ruminales juegan un rol importante en la degradación de los elementos incorporados en ellos. Situación que determinó que las evaluaciones se realizaran en una segunda etapa, depositando los bolos directamente en la cavidad rumino-reticular del animal.

A través de este procedimiento se estableció la tasa de entrega de los preparados en el animal vivo y dependiendo de la tasa de decaimiento de las cápsulas se pudo definir la frecuencia de uso y aplicación de ellas con el extracto en estudio.

a) Las primeras evaluaciones se realizaron con cápsulas de aproximadamente 30 gramos, compuestas de tres diferentes formulaciones cuya matriz era gelucire y diferentes excipientes para controlar la liberación desde la matriz, como: compitrol, precirol, avicel, lactosa, afrechillo y hierro estas cápsulas que se introdujeron en un ovino fistulado, evaluando su cambio de peso semanalmente. Esta primera etapa de desarrollo de los bolos se realizó en un ovino fistulado

b) La evaluación de las cápsulas que dieron los mejores resultados en el punto anterior y modificadas en sus dosis fueron evaluadas en un novillo fistulado por medio de bolsas ruminales e introducción directa en el piso del retículo del animal, pesando el contenido remanente cada tres días, hasta obtener una adecuada tasa de degradabilidad

que permita una lenta y sostenida entrega del principio activo en el tiempo.

**6) Establecer in vivo el comportamiento y la aparición a nivel fecal de Azadirachtin incorporado en bolos de uso intrarruminal, a través del efecto sobre larvas de díptero *H.irritans*.**

Este objetivo se desarrollo en dos etapas, se implementó un sistema de administración de Azadirachtin en bloques minerales, para evaluar in vitro e in vivo el efecto sobre la emergencia de *H. irritans*, previo a la obtención final de cápsulas intrarruminales. La administración y evaluación de los tratamientos se realizó en una primera etapa, con bloques minerales, administrados para consumo ad-libitum, solamente regulado por la dureza de estos dispositivos. Posteriormente, cuando existió una evaluación consistente de la formulación y duración de las cápsulas intrarruminales, se ensayaron directamente sobre los animales.

El empleo de bloques minerales se derivó de una experiencia adquirida en el grupo de trabajo, a partir de otra iniciativa financiada por FIA, con introducción de esporas de hongos controladores de nemátodos.

En ambos ensayos se uso la concentración de azadirachtin, referenciada por la literatura como de alta eficiencia de control, y que coincidió con la de mejor resultado, obtenida en las etapas previas de evaluación (0.03 Mg por Kg. de peso vivo)

## **I - ETAPA**

### **6.0) Implementación de un sistema de administración de Azadirachtin en bloques minerales y evaluación in vitro e in vivo del efecto sobre la emergencia de *H. irritans***

El tratamiento contó con cuatro grupos de vacas, de 15 animales cada uno, en un rebaño productor de carne, a cada grupo se le entregó vía oral una oferta de bloques minerales con cuatro concentraciones de azadirachtin, estimando un consumo de 150

gramos por día, lo que permitirá una ingestión de 0.03 mgs de Azadirachtin por kilogramo de peso vivo, dato previamente establecido en novillos en confinamiento. A un grupo de animales de cada tratamiento se les extrajo fecas para evaluar el efecto sobre la eclosión de huevos y emergencia de los insectos.

#### **6.0.1) Evaluación in vitro del efecto de Azadirachtin incorporado en bloques minerales, sobre la emergencia de adultos de *H. irritans***

Para evaluar el efecto directo del principio activo azadirachtin incorporado en los bloques minerales sobre la eclosión y desarrollo de los huevos del insecto, se tomaron muestras de bloques minerales y se establecieron tres dosis de azadirachtin en cantidades crecientes de 1.25 mgs.; 2.50 y 5.0 mgs. y un testigo sin Azadirachtin. Las muestras de los bloques se disgregaron y se mezclaron con fecas rectales de bovino sin ningún tratamiento. La mezcla total por aplicación fue de 1, 2 y 4 gramos de bloque para 100 gramos de fecas, sobre esta mezcla se depositaron 100 huevos frescos de *H. irritans* y se incubaron a 27°C hasta la emergencia de los adultos. Se realizaron *tres* repeticiones para cada ensayo y tres para cada tratamiento.

Los bloques minerales utilizados tuvieron la siguiente composición:

<b>Composición proximal y digestibilidad de los bloques minerales</b>			
<b>Análisis</b>	<b>Unidad</b>	<b>MS*</b>	<b>SA**</b>
<b>Humedad</b>	%	-	10,5
<b>Materia seca</b>	%	89.5	-
<b>Ceniza</b>	%	39.7	35.6-
<b>Fibra Cruda</b>	%	3.1	2.7
<b>Extracto Etéreo</b>	%	1.1	1.0
<b>Proteína Cruda</b>	%	6.7	6.0
<b>Fibra detergente Acido</b>	%	10.5	9.4
<b>Fibra detergente Neutro</b>	%	16.3	14.6
<b>Energía Bruta</b>	cal/g.	2578.6	2309.0
<b>Energía Digestible</b>	Kcal/k	1832.4	1640.7
<b>Energía Metabolizable</b>	Kcal/k	1502.6	1345.4
<b>Calcio</b>	%	9.53	8.54
<b>Fósforo</b>	%	3.16	2.83

**6.0.2) Diseño y evaluación a nivel de campo de tres diferentes dosis de Azadirachtin, de mayor eficiencia en el control de *H.irritans*, incorporadas en bloques minerales para obtener poblaciones de niveles tolerables para los bovinos**

El ensayo se realizó con 40 animales con un peso medio de 511.5 Kg. Estos se distribuyeron de manera aleatoria en cuatro potreros de 3 ha cada uno, 10 hembras bovinas mestizas Angus x Belgian blue con sus respectivas crías en cada potrero. A cada grupo se le suministró una dosis diferente de Azadirachtin incorporado en el dispositivo mineral.

Grupos de trabajo:

Grupo 1A: recibió 1,25 gramos de Azadirachtin en cada bloque de 10 kilogramos por 4 semanas

Grupo 3B: recibió 2,5 gramos de Azadirachtin en cada bloque de 10 kilogramos por 4 semanas

Grupo 4D: recibió 10 gramos de Azadirachtin en cada bloque de 10 kilogramos por 4 semanas

Grupo 2T: Testigo sin suministro de bloques con azadirachtin.

Con el objeto de que los animales aprendieran a consumir los dispositivos minerales se realizó un período pre experimental, de dos semanas, donde se les dio a consumir bloques minerales

Se esperaba un consumo homogéneo de la mezcla mineral de aproximadamente 150 grs. por día lo que permitirá una ingestión de: 0.03 mgs de Azadirachtin por kilogramo de peso vivo, lo que significa para cada tratamiento un consumo de las siguientes dosis por animal y por día:

Grupo A: 18,75 mgs de Azadirachtin.

Grupo B: 37,5 mgs de Azadirachtin.

Grupo D: 150 mgs de Azadirachtin.

Grupo T: 0 mgs de Azadirachtin.

Estos bloques se entregaron en comederos especialmente contruidos para el ensayo.

En cada tratamiento y a seis animales por tratamiento, se les extrajeron muestras transrectales semanalmente. Estas muestras fecales fueron distribuidas en tres submuestras de 100 gramos cada una, sobre las que se depositaron 100 huevos de *H. irritans*. Las muestras se incubaron a 27°C por 7- 8 días, luego de los cuales se obtienen las pupas por flotación, las que se mantienen en recipientes hasta la emergencia de los adultos. Obteniendo el número de adultos y pupas viables para determinar el porcentaje de mortalidad.

**6.0.3) Evaluación a nivel de campo del efecto de diferentes dosis de Azadirachtin incorporadas en bloques minerales, mediante la colecta de fecas retiradas de la pradera y contaminadas naturalmente por la mosca.**

La metodología empleada se basa en lo descrito por Madeiros (2002), Thomas et al (1987). Semanalmente se colectaron seis masas fecales de seis animales, las que fueron retiradas del campo en recipientes de plástico, después de 48 a 72 horas de ser depositadas en el campo y luego llevadas al laboratorio. Cada masa fecal se depositó sobre una bandeja de 60 x 60 x 30cm con una fina capa de suelo húmedo y cubierta con una malla fina, hasta la emergencia de los adultos. Las bandejas con las masa fecales se manejaron a temperatura ambiente por una periodo de 25 días, colectando diariamente los insectos emergidos.

**6.0.4) Evaluación periódica de la ganancia de peso de los animales bajo consumo de bloques con diferentes dosis de Azadirachtin.**

Se realizaron evaluaciones del peso de los animales al inicio y final del ensayo, para conocer las ganancias diarias de peso durante el desarrollo del ensayo.

**6.0.5) Recuento del número de ejemplares adultos de *H. irritans* posados sobre los animales bajo consumo de diferentes dosis de Azadirachtin en bloques minerales.**

El recuento del número de adultos de *H. irritans*, se realizó en 6 animales de cada grupo, contando el número aproximado de ejemplares presentes en la zona dorsolateral retroescapular de cada uno. Esta actividad se realizó semanalmente entre las 11 a.m. y 12:30 p.m. del día.

Los datos de las diferentes evaluaciones se analizaron estadísticamente a través de análisis de varianza

## II - ETAPA

### 6.1) Evaluación in vivo del comportamiento y aparición a nivel fecal del principio activo incorporado en bolos intrarruminales, en su efecto sobre *H. irritans*

Esta evaluación se desarrolló de acuerdo a la pauta establecida por el Servicio Agrícola y Ganadero para ensayos de campo, en el control de la mosca de los cuernos, en ella se define el "n" adecuado de 15 animales en cada tratamiento.

En este ensayo no se considera un testigo químico, ya que se trata de medir la eficiencia respecto del efecto de Azadirachtin sobre las poblaciones de *H. irritans*, específicamente sobre los estados juveniles. Los químicos actúan sobre los adultos del parásito, por lo cual se utilizará solamente un testigo absoluto.

Esta etapa del trabajo se realizó con cápsulas que contenían 0.03 ppm/ Kg. peso vivo, las que fueron suministradas a cada animal por medio de un lanza bolos

#### Descripción del ensayo

Se diseñó un ensayo con dos grupos de 15 animales cada uno, asignados aleatoriamente:

En este ensayo se evaluó la cápsula con mejor comportamiento en las etapas previas. que correspondía a la cápsula F9. con una concentración de 0.03 (ppm) establecida en la literatura, y en la mejor dosis y tiempo para dicha concentración, obtenido en el ensayo de la estación experimental.

**Grupo A:** 15 bovinos hembra, mestizos angus x belgian blue con un peso medio de 404±35 kilogramos de peso cada uno asignados a potreros de 2. Estos animales se manejaron con pastoreo rotativo con un sistema de cerco eléctrico de acuerdo a la disponibilidad de forraje

Los animales se pesaron al inicio del tratamiento, 12 de Diciembre de 2007, a los 35 días, 15 de Enero de 2008 y finalmente el día 4 de febrero de 2008 luego de 17 días del primer pesaje.

A cada animal tratado se le administró un bolo intrarruminal de  $125.7 \pm 8.1$  gramos, con un contenido de 10 gramos del extracto botánico con de azadirachtin 17%,

**Grupo B:** 15 bovinos hembra, mestizos angus x belgian blue con un peso medio de  $497 \pm 85$  kilogramos de peso cada uno asignados a potreros de 2 ha. Estos animales se manejaron con pastoreo rotativo con un sistema de cerco eléctrico de acuerdo a la disponibilidad de forraje

Los animales se pesaron al inicio del tratamiento, 12 de Diciembre de 2007, a los 35 días, 15 de Enero de 2008 y finalmente el día 4 de febrero de 2008 luego de 17 días del primer pesaje.

Los testigos recibieron bolos de administración intrarruminal sin azadirachtin.

En esta etapa del trabajo, se trataron los animales y en paralelo se introdujo el mismo tipo de cápsula en un animal fistulado para controlar la evolución del dispositivo. En esta replica, se produjo una desintegración a los 27 días, por lo tanto se decidió introducir una nueva cápsula en los animales de campo. Continuándose la evaluación hasta el día 47 del ensayo., o 4 de febrero de 2008.

A cada grupo de animales y semanalmente se realizaron evaluaciones sobre el efecto del principio activo sobre el control de las poblaciones de moscas

a) Al inicio y luego semanalmente a partir de la administración de las cápsulas con azadirachtin, se colectaron en ambos grupos, fecas transrectales de seis animales en cada grupo, elegidos al azar, las que fueron llevadas al laboratorio, de cada muestra por animal se dividieron tres submuestras fecales de 100 gramos, sobre las que se sembraron 100 huevos de la mosca, se incubaron a  $27^{\circ}\text{C}$ , 50%HR y fotoperiodo de 16:8, por un periodo de 15 día evaluando el número de insectos emergidos para cada tratamiento

b) Fecas retiradas del campo y contaminadas naturalmente por la mosca.

La metodología empleada se basa en lo descrito por Madeiros (2002), Thomas et al(1987). Semanalmente se retiraron seis masas fecales (aproximadamente 2 kilos) de seis animales, desde los potreros de cada tratamiento, las que se depositaron en

bandejas de 60x60x30 cm. con suelo húmedo y cubierta por malla fina, de mantuvieron a temperatura ambiente por un periodo de 25 día evaluando el número de adultos emergidos. Las colectas de los dípteros emergidos se realizaron diariamente por la mañana, con un aspirador. Los datos fueron analizados a través de análisis de varianza.

En los dos grupos de animales se establecieron las siguientes variables:

- c) N° de adultos de *H. irritans*, ubicados dorsolateralmente en el animal. El conteo de los adultos se realizó semanalmente, a seis animales en cada grupo, esta medición se practicó entre las 11 a.m. y 12:30 pm. del día. Los datos se analizarán por medio del test de Student.
- d) Peso: Mensualmente para conocer las ganancias diarias de peso durante el desarrollo del ensayo. La evaluación estadística del peso se realizará a través de análisis de varianza.
- e) Número de insectos emergido en muestras fecales obtenidas de fecas depositadas en la pradera y de muestras obtenidas transrectalmente y contaminadas con huevos obtenidos de crianza artificial de laboratorio. Los valores obtenidos se analizarán a través de análisis de varianza para grupos de datos según Lysyk y Colwell (1996).

**7) Evaluación de campo de las dosis Azadirachtin de mayor eficiencia en el control de *H. irritans*, aplicadas en bolos intrarruminales para obtener poblaciones de niveles tolerables para los bovinos.**

Esta evaluación se desarrolló de acuerdo a la pauta establecida por el Servicio Agrícola y Ganadero para ensayos de campo, y de igual manera a lo descrito en el ensayo anterior (punto 6.1)

En esta temporada se repitió la estructura del ensayo descrito en el punto anterior, pero con una dosis mayor de azadirachtin, 0.04ppm/ Kg. peso vivo y suministrada por

única vez en la etapa del ensayo. Se emplearon 15 animales de  $602,23 \pm 44,86$  peso promedio. El testigo consistió en igual número de animales y con un peso medio de  $495,43 \pm 74,42$  kg.

Las evaluaciones se realizaron de igual manera que lo previamente descrito para la temporada anterior y para cada tratamiento

a) Fecas retiradas transrectalmente llevadas al laboratorio y contaminadas con un número conocido de huevos, posteriormente incubadas y evaluadas para conocer el efecto sobre los estados juveniles de *H. irritans* según el método entregado anteriormente.

b) Fecas retiradas del campo y contaminadas naturalmente por la mosca igual a lo descrito en el punto anterior

c) Evaluación del número de adultos de *H. irritans*, ubicados dorso lateralmente en el animal. El conteo de los adultos se realizó semanalmente, nueve animales en cada grupo, esta medición se practicó entre las 11 a.m. y 12:30 pm.

d) Evaluación periódica del peso de los animales en cada tratamiento

#### **8.) Escalamiento del producto controlador obtenido**

Se definirá la tecnología para la producción masiva del producto final, en conjunto con empresas que potencialmente se incorporarían al proyecto de desarrollo tecnológico. Se ha trabajado para definir la estrategia de financiamiento del proceso de importación del principio activo y las condiciones para desarrollar de manera industrial dispositivos intrarruminales.

#### **9) Capacitación de productores de carne bovina en el uso de bolos de azadirachtin como controlador del parásito *H. irritans***

Se realizó un seminario final con profesionales, productores y técnicos del área

**10) Desarrollo de un estudio en el laboratorio de Cinética de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, que permita la implementación de un método para establecer trazas de Azadirachtin en la carne de los animales tratados.**

Se desarrollo una tesis que permitió establecer el método para la evaluación de trazas del principio activo en carne bovina

Determinación de residuos de azadirachtin desde músculo de vacuno.

A 5 g de músculo de vacuno se le agregan 5 ml de agua bidestilada. Se homogeniza a 24.000 rpm por 1 minuto. Se agregan 10 ml de una mezcla de diclorometano/isopropanol 95/5. Se agita a 24.000 rpm por 1 minuto. Se centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos y se separa la fase orgánica, la que se recibe en un tubo cónico. Se repite la extracción 3 veces bajo las mismas condiciones y se juntan los extractos orgánicos, se filtran por filtro separador de fases y se evaporan a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 37 °C.

Se disuelve el extracto seco con una mezcla de metanol/agua 90/10 y se inyectan 20 ul al HPLC según las condiciones siguientes.

Condiciones cromatográficas.

Columna: Waters® Symmetry® C18-e 250 x 4,6.

Fase móvil: Acetonitrilo: H2O (27,5:72,5)

Velocidad de flujo: 1,00 mL/min.

Longitud de onda: 215 nm.

Temperatura: 45 °C.

Límite de detección del método: 10 ug/g de carne

- **principales problemas metodológicos enfrentados**

- Las principales dificultades metodológicas del proyecto estuvieron determinadas por la complejidad de estructurar la matriz farmacológica adecuada de las cápsulas o bolos, esto porque el conocimiento de esta manufactura es privado y no está disponible en papers de uso habitual (journals de producción animal o farmacología), por lo tanto este punto se transformó en un objetivo fundamental del trabajo.

- También se trabajó con bloques minerales que contenían el principio activo, si bien no se encontraba planteado en el proyecto original, se emplearon por la experiencia previa adquirida a través de otro proyecto FIA, así como por la demora en la evaluación de la formulación final de las cápsulas intrarruminales. Con estos bloques se pudo entregar de forma regular y en un rango adecuado el principio activo, sin embargo, de todas maneras se presentó un grado de aleatoriedad del consumo animal, de tales dispositivos, en consecuencia los bolos intrarruminales resultaron ser los más adecuados, asegurando la liberación de un rango apropiado del principio activo utilizado.

- La otra dificultad metodológica enfrentada tuvo relación con la duración de la crianza de las moscas en laboratorio, la permanencia en el tiempo de la crianza sólo se sostenía por varias generaciones si se introducían periódicamente insectos silvestres del campo, pero si esta era mantenida sólo con los insectos emergidos en laboratorio, ésta se mantenía sólo hasta F3 obteniendo finalmente una menor cantidad de huevos e infértiles. Las causas de esta reducción en la viabilidad de los insectos en el tiempo no fue posible determinarla, quizás, como se plantea en la literatura, existen algunas razas de insectos que no se adaptan a las condiciones de cautiverio, como sucede con algunas otras especies de dípteros

- adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.

### Crianza del insecto

Las adaptaciones más importantes estuvieron en el ámbito de la crianza del díptero *H. irritans*, en particular por las demandas de alimentación del insecto que permitían la obtención de huevos para la evaluación del extracto del árbol del Neem. En este sentido se utilizó, sangre citratada en goteros dispensadores ubicados en el interior de jaulas de alimentación; sobre toallas de algodón y esponjas de alta densidad; alimentación directa en cámaras dispuestas sobre un bovino adulto y alimentación con suspensiones azucaradas. Los mejores resultados, de estas modificaciones, fueron la alimentación sobre trozos de esponjas con sangre citratada y suspensión azucarada. Este sistema nos permitió mantener las crianzas en laboratorio por sólo tres generaciones, con una fuerte declinación en la ovipostura y fertilidad, razón por la que debíamos nuevamente introducir poblaciones de moscas silvestres para reactivar la crianza, las causas de esta declinación en la tasa de fertilidad de las moscas y la incapacidad para adaptarse a las condiciones de cautiverio, las desconocemos.

### Determinación de LD50 y LD90

La obtención del LD50 y LD90 se realizó por medio de la aplicación del principio activo directamente en suspensión en animales de experimentación y no a través del sistema propuesto, mediante el cual se mezclarían diferentes dosis del principio activo con fecas rectales y depositando sobre ellas un número conocidos de huevos del díptero, evaluando posteriormente el número de insectos emergidos por cada dosis.

La razón de esta modificación fue debido a que las dosis a evaluar resultaron ser muy pequeñas, dificultando una adecuada homogenización en las fecas, por lo tanto, los resultados fueron erráticos e inconsistentes, en consecuencia se determinó realizar las

evaluaciones directamente sobre los animales, suministrándoles las concentraciones del principio activo en suspensión y en relación al peso vivo de cada animal y luego evaluando a nivel fecal el número de insectos emergidos a partir de un número conocido de huevos.

### Evaluaciones in vitro mediante Tilley Terry

La evaluación del nivel de degradación o tasa de entrega de las cápsulas elaboradas con diferentes matrices, no se realizó a través del método de Tilley Terry propuesto, sino que directamente en animales fistulados, debido a que el método está hecho para evaluar los sistemas en un periodo corto de tiempo, cuatro días, durante el cual, no se observó ningún tipo de cambio en las cápsulas evaluadas, razón que determinó realizar los ensayos directamente en animales fistulados, evaluando periódicamente los cambios de peso experimentados por diferente formulaciones de bolos en el tiempo.

### Evaluación del principio activo a través de bloques minerales

Las primeras evaluaciones a nivel de campo, sobre el efecto de las cápsulas con el principio activo, en la emergencia de las moscas, no se realizaron de igual manera a lo formulado, debido a que no se contaban con los resultados finales de las cápsulas formuladas y evaluadas in vitro, en consecuencia, se determinó efectuar una primera evaluación del efecto de azadirachtin, en el control de la mosca, mediante el empleo de bloques minerales a los que se les incorporó diferentes dosis del principio activo, bloques que se dieron a consumir por los animales, previa evaluación del nivel de consumo diario por animal, si bien se logró el objetivo en el sentido de establecer el comportamiento del principio activo a nivel fecal, sobre el efecto controlador en las larvas del díptero, no se pudo establecer una tasa de consumo parejo y homogéneo para cada animal, que determinará a su vez un control sobre la mosca igualmente constante. Situación que fue revertida al emplear posteriormente las cápsulas intraruminales.

### Evaluación a nivel de campo de las cápsulas intrarruminales

Se realizaron dos evaluaciones de campo de las cápsulas elaboradas, con dos dosis diferentes de azadirachtin. En la primera temporada se evaluó la dosis de 0.03 ppm incorporada en las cápsulas, sin embargo, debido a una degradación más acelerada de las cápsulas, que la esperada de acuerdo a las evaluaciones preliminares efectuadas, fue necesario volver a realizar un segundo tratamiento con los dispositivos en la misma temporada, razón por la cual para la siguiente temporada se mejoró la formulación de la cápsula, logrando una degradabilidad más lenta y conjuntamente se evaluó la segunda mejor dosis obtenida en las evaluaciones anteriores, de 0.04 ppm.

- **Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.**

1) **Desarrollar una crianza artificial del díptero hematófago *H.irritans*, que proporcione los distintos estadios biológicos del parásito, para realizar la evaluación in vitro del extracto de Neem.**

1.0) Crianza de *H.irritans* se basó de acuerdo al método descrito por Lockwood et al. (1985); Lysyk (1991); Miller et al. (1986)

a) Captura constante de adultos de *H.irritans* en el campo para mantener las características reproductivas y conductuales de las moscas silvestres en el laboratorio.

Se implementó un sistema de captura de individuos silvestres en un rebaño parasitado por *H.irritans*, éste se mantuvo sin tratamiento químico para permitir la obtención del número necesario de insectos para el desarrollo del experimento. Estos se colectaron con red entomológica sobre los animales afectados y se introdujeron en frascos con tapón de algodón. Luego se trasladan al laboratorio, donde se separan de otras especies de dípteros y se introducen en jaulas de crianza. Esto se realizó semanalmente a partir del mes de Octubre

b) Desarrollo de un sistema de alimentación de las moscas adultas, mantenidas en jaulas, con sangre citratada de bovino.

Se diseñó e implementó un sistema de alimentación de *H. irritans*, en base a sangre de bovino citratada, estableciéndose una frecuencia de alimentación, cada 12 horas. La sangre de bovino fue colectada por punción yugular, en Erlenmeyer de 500 ml de capacidad. Al momento de colectar la sangre se mezclaron 2.5 gramos de citrato de sodio como anticoagulante, en 2.5 ml de agua estéril por cada 500 ml de sangre, la mezcla fue refrigerada a 4° C y cada vez que fue utilizada se dejó a temperatura ambiente por 20 minutos.

Se probaron diferentes sistemas de alimentación para las moscas, (alimentación directa en potes, sobre algodón, con dispensadores por goteo, a través de alimentación directa sobre el animal mediante dispositivos que se adhieren en ambos lados en la parte superior del tórax del animal de modo que los insectos se pueden alimentar directamente a través de la piel), sin embargo, el mejor sistema de los evaluados correspondió a la utilización de una esponja sintética de baja densidad, la que era embebida con 100 ml de sangre y depositada sobre cada jaula y cubierta con vidrio reloj para conservar la humedad. Esta última modalidad fue la que dio mejor resultado, por una mayor aceptación por parte de los insectos, alimentándose por periodos más prolongados de manera homogénea y también una menor desecación de la sangre.

c) Desarrollo de cámara de postura de las hembras

Las moscas capturadas en el campo, sobre bovinos fueron confinados en jaulas de PVC, cilíndricas de 1500 ml de capacidad y cubiertas con malla mosquitera. En cada jaula se introdujeron 100-120 adultos. El techo y piso de las jaulas, también cubierta con malla y fijadas con cinta autoadhesiva, permitió la alimentación, colecta de huevos, limpieza y remoción de los cadáveres. Cada jaula fue depositada sobre una bandeja cubierta con esponja y tela negra, previamente humedecida, para estimular la

ovipostura. El material fue manejado en cámara de crecimiento, mantenido en estufa a  $27^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ , humedad relativa de 60-80% y fotoperíodo de 16:8 (luz: oscuridad)

d) Diseño de sistema de colecta de huevos y desarrollo en fecas para la obtención de pupas y adultos.

La colecta se realizó diariamente, recogiendo los huevos depositados en el piso de las jaulas sobre la malla mosquitera y tela negra húmeda donde se ubican las jaulas, los huevos son retirados con pincel y depositados sobre papel húmedo. Este último método resultó más eficiente, porque la manipulación de los huevos es menor. Por último, los trozos de toalla húmeda con los huevos, a razón de 100 huevos por papel, se depositan invertidos sobre fecas rectales (recipientes de plástico de 250ml con 100 a 120 gramos de fecas), se cubren con gasa y se incuban por 15 días hasta eclosión e las moscas,

Las moscas que se obtuvieron o que eclosionaron bajo este sistema, se dispusieron en jaulas en la cámara de crianza, se alimentaron de acuerdo al sistema descrito y después de 72 horas, periodo en que se ocurre la cópula e inicio de ovipostura, las jaulas se dispusieron sobre tela negra húmeda y placas con fecas frescas para estimular la postura y con igual régimen de temperatura, humedad y fotoperíodo, antes descrito. Sólo se obtuvo una mantención de la crianza hasta F3, cuyos huevos resultaron ser infértiles.

**2) Evaluar in vitro, el efecto de distintas dosis del extracto de *A. indica*, sobre estados juveniles de *H. irritans*, para establecer la DL50 y DL90.**

**2.0)** Se evaluaron tres concentraciones del principio activo, azadirachtin, en fecas bovinas.

a) A 300 gramos de fecas, se aplicaron cuatro niveles conocidos (ppm) del principio activo. Mediante diluciones seriadas se obtuvieron las concentraciones iniciales 0.01, 0.02, 0.03 ppm. de azadirachtin y un testigo sin principio activo, las que se mezclaron

con fecas rectales, cada muestra de 300g se dividió en 3 submuestras de 100g, sobre los cuales se depositarán 100 huevos de la mosca, obtenidos de la colonia mantenida en laboratorio

Las fecas depositadas en envase encerados de 250ml se cubrieron con género e incubaron a  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y 50% HR por 7 días. Las pupas son extraídas por flotación y el número de pupas y adultos emergidos se registraran para cada muestra.

Se realizaron 3 replicas para cada dosis y tres submuestras dentro de cada dosis.

b)Producto de lo dificultad para la homogenización del principio activo con las fecas, lo que se reflejó en la falta de consistencia en los resultados, se realizó la misma evaluación pero con concentraciones mayores del producto, estas fueron ( 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ppm /100gramos de fecas y un testigo sin Azadirachtin) Las muestras se incubaron y evaluaron bajo las mismas condiciones indicadas en el punto anterior, esto nos permitió determinar la respuesta del producto a nivel fecal sobre la emergencia del insecto.

Dada la dificultad para obtener una adecuada homogenización del compuesto con las fecas, dosis pequeñas, se amplió el ensayo a animales de experimentación para la concreción del objetivo.

### **2.1) Evaluación y obtención de la dosis letal de Azadirachtin (LD50 y LD90) sobre *H. irritans*, mediante la aplicación directa a novillos, de una suspensión de diferentes concentraciones del principio activo**

Se emplearon 4 niveles de aplicación de azadirachtin (0.0 (testigo), 0.02, 0.03 y 0.05 ppm/ kilogramo de peso vivo, los que fueron suministrados directamente a los animales.

- a) A dos animales por dosis con peso promedio de 354 Kg. se les dio a ingerir, diariamente por 4 días, vía oral, 30cc/día de una solución acuosa de azadirachtin y de acuerdo al peso de cada uno.
- b) Al término del tratamiento, se colectaron muestras fecales de cada animal, seis por cada dosis. Las fecas de cada muestra, se dividieron en submuestras de 100 gramos en envases de 250 ml y sobre las cuales se sembraron 100 huevos frescos del insecto, se cubrieron con gasa y se incubaron a  $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y 50% HR por 15 días. Registrando el número de adultos emergidos para cada muestra.

Se realizaron 3 replicas para cada dosis y tres submuestras dentro de cada dosis.

Los resultados en los niveles de emergencia de los insectos adultos fueron usados para análisis Probit (Finney 1971).

(Todos los animales se trataron contra parásitos gastrointestinales y pulmonares antes de cada etapa de evaluación del insecticida botánico)

### **3.) Evaluación *in vitro* del efecto de los procesos digestivos de bovinos, sobre el principio activo Azadirachtin.**

**3.0)** Evaluación *in vitro* del grado de actividad del principio activo azadirachtin luego de ser sometido al método de Tilley Terry.

Se empleó una suspensión pura del compuesto, en solución isotónica, correspondiente a 0.02; 0.03 y 0.04 (ppm) de azadirachtin.

A partir del compuesto puro, se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones establecidas y requeridas para el volumen empleado en el Tilley Terry. El volumen final del proceso junto al compuesto, fue de 50ml, este volumen se mezcló con fecas deshidratadas y estériles para evitar diluir la concentración del compuesto luego del proceso digestivo.

- a) A partir de un animal fistulado se extrae licor ruminal, se mezcló con las diferentes concentraciones del principio activo, para un volumen final de 50ml por dosis y repetición (tres repeticiones por dosis). A esta mezcla se le incorporó CO<sub>2</sub> y se cerró con tapón bunsen y se incubó a baño María a 39°C por 48 horas, en agitación

suave y continua

b) En una segunda etapa, luego de la incubación se solubiliza el residuo con una solución ácido-pepsina, se tapa e incuba por 48 horas más.

c) Cada una de las suspensiones antes indicadas, en el volumen final (50ml) se mezclaron con 10g de fecas deshidratadas y estériles, incorporando sobre ellas 60 huevos del insecto, luego se incuban a 27° C y 50% HR por 7 días. Se extraen las pupas por flotación, su número y el de adultos emergidos se registraran para cada muestra.

d) Como tratamiento testigo, sin pasar por Tilley Terry, se usó el mismo volumen anterior (50ml), se preparó las concentraciones conocidas de azadirachtin en agua estéril y se mezcló con fecas secas estéril, sembrando los huevos de *H.irritans*, siguiendo el mismo procedimiento que en el punto anterior.

#### **4.) Evaluación en novillos de experimentación, el efecto de azadirachtin administrado en cápsula de gelatina sobre *H irritans*, a nivel fecal**

**4.0).** Se administraron dosis conocidas de azadirachtin en la dieta animal, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 ppm por peso vivo de animal, vías suspensión acuosa, cada concentración fue suministrada en 30cc por animal por vía oral a través de una jeringa. No se emplearon las cápsulas de gelatina debido a la dificultad de suministrarla a los animales, por su tamaño y debido a su tendencia a flotar y no mezclarse en el rumen.

##### **Grupo 1:**

a) Se administró a dos animales, una suspensión acuosa, de una concentración de conocida de azadirachtin (0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 ppm/Kg. de peso vivo por animal) en un volumen de 30cc por animal por un periodo de 4 días y por medio de una jeringa introducida en el hocico del animal,

b) Al cabo de 96 horas de ingerido el producto, se colectaron 300 g de fecas rectales

por animal, las que se dividieron en submuestras de 100g y se les depositaron 100 huevos de *H. irritans* cada muestra se incubó a 27° C, 50% HR, fotoperiodo de 16:8, por 15 días y el número de pupas y adultos emergidos se registraran para cada submuestra y dosis.

**Grupo 2 (Testigo):** A un número de dos animales se administró la suspensión sin el principio activo, colectando las fecas en igual período y siguiendo la misma metodología anterior.

Cada tratamiento se realizó dos veces, con tres repeticiones cada vez y los datos fueron evaluados por análisis de varianza

**5.) Diseño de cápsulas de uso intrarruminal y evaluación in vitro mediante el método de Tilley Terry y de digestibilidad in vivo (nylon bags), de las cápsulas obtenidas.**

**5.0) Desarrollo de cápsulas intrarruminales que permitan la liberación lenta del extracto de *A. indica*.**

El desarrollo de las cápsula intrarruminales, fue realizado por la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, elaborando dispositivos cilíndricos de  $105.73 \pm 0.8$  g, conformados por una matriz lipídica más un conjunto de excipientes que regulan la liberación del producto desde la matriz, permitiendo obtener un producto final con baja hidrofiliidad y una liberación controlada.

Se desarrollaron comprimidos con diferentes porcentajes de tales sustratos, las que se evaluaron en un animal fistulado. Para finalmente definir un tipo de cápsula de matriz grasa de alta densidad, determinada por el hierro y un adecuado balance hidrófilo/lipofílico que proporcione una liberación lenta y controlada del fármaco.

La elaboración de los comprimidos se realizó en una primera etapa con resinas acrílicas, denominadas comercialmente como Eudragit®, en mezcla con hierro, tal formulación no resultó ser resistente a la acción de los medios de disolución en

pruebas in vitro.

La Formulación final empleada como matriz para la elaboración de las cápsulas, fueron sustancias de origen graso conocidas bajo el nombre comercial de Gelucire®.

Los Gelucire® o glicéridos poliglicólicos saturados son una familia de excipientes lipídicos semisólidos e inertes, que corresponden a una mezcla de glicéridos y ésteres polioxietilénicos, estos dos componentes les confieren características hidrofóbicas e hidrofílicas, respectivamente.

Cada Gelucire® se caracteriza por dos números, el primero se refiere al punto de fusión (aproximado) de la base y el segundo al valor del BHL (Balance Hidrófilo-Lipófilo), por lo tanto, es posible tener una idea razonable de las propiedades de cada base a partir de la nomenclatura.

La composición química de las diferentes bases puede ser controlada modificando las materias primas y las condiciones de manufactura. En general, mientras mayor sea la proporción de ésteres polioxietilénicos en el producto final, más hidrófila será la base, asimismo, a mayor longitud de la cadena del polietilenglicol y ácido graso, más alto es el punto de fusión del excipiente.

Junto a los gelucire®, se usaron diferentes excipientes para regular la liberación del producto desde la matriz, los excipientes evaluados fueron:

### **Precirol**

Palmitoestearato de Glicerilo, es un material semisintético, compuesto por una mezcla de mono - di - y triglicéridos de cadena C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub> de ácidos grasos. Se presenta como un polvo fino (diámetro 40μ), insoluble en agua, con una temperatura de fusión entre 53,0-57,0 °C y un BHL de 2. Para el desarrollo de comprimidos de liberación controlada, se utiliza en una proporción entre un 10 - 50% del peso final del comprimido

### **Compritol**

Glicerol Dibehenato. El dibehenato de glicerol es una mezcla de diacilgliceroles, principalmente dibehenoilglicerol, junto a cantidades variables de mono- y triacilgliceroles. Contiene del 13,0 por ciento al 21,0 por ciento de monoacilgliceroles,

del 40,0 por ciento al 60,0 por ciento de diacilgliceroles y del 21,0 por ciento al 35,0 por ciento de triacilgliceroles, obtenido por esterificación del glicerol con ácido behénico.

Se presenta como masa sólida cerosa, o bien polvo o copos de tacto untuoso, blanco o casi blanco insoluble en agua, soluble en cloruro de metileno y parcialmente soluble en alcohol caliente.

### **Avicel y Lactosa Spray Dried**

El Avicel corresponde a celulosa microcristalina. Ambos productos son utilizados en preparados de liberación controlada cuando quiere mejorarse la penetración de líquidos acuosos dentro del producto de liberación controlada, por lo que suelen asociarse a una mayor liberación del producto de interés.

El Gelucire 50/02 fue seleccionado por su bajo BHL, lo que indica una baja hidrofiliidad, con lo que se pretendía obtener una erosión lenta. De acuerdo con los resultados que se obtuvieron, se usó Compritol, Precirol, Avicel y lactosa spray dried para fabricar las diferentes formulaciones y modular la entrega del producto.

La fabricación de las formulaciones se basó en un proceso de fusión, donde las materias grasas se fundieron a una temperatura de 5°C, superior a su punto de fusión, agregándole los componentes que le otorgaban densidad, la que se logró utilizando hierro metálico en polvo y posteriormente se le adicionó el principio activo. Luego que la masa fundida comenzara a tomar consistencia se vació en moldes de 4cm de diámetro y 9cm de alto hasta su solidificación.

### **Evaluación de las formulaciones**

La selección preliminar de las formulaciones, antes de realizar los ensayos con Tilley Ferry y en vivo, se realizaron pruebas en Aparato 2 (paleta) del equipo de disolución oficial de la Farmacopea Norteamericana (USP). Como medio de disolución se utilizaron 900ml de un medio que contenía agua, lipasa y sales biliares, con un pH de 6.8.

Posteriormente, las formulaciones que resistieron al ensayo descrito, se evaluaron in vitro en líquido ruminal.

### **5.1) Evaluación in vitro de los bolos de uso intrarruminal mediante el método de Tilley Terry**

Cápsulas con un peso aproximado de 5gr, se evaluaron respecto de su resistencia a la digestión ruminal con el sistema de digestión de Tilley –Terry. A través de este método se deseaba establecer el tiempo que esas cápsulas resisten la acción digestiva de la biología del rumen.

a) A un animal fistulado, se le extrajo una cantidad de licor ruminal, que se distribuyó en frascos de vidrio. Cada frasco con 50ml de licor se le introdujo una cápsula con formulación conocida.

b) Cápsulas con diferentes porcentajes de ingredientes (*gelucire, alcohol, propilenglicol, hierro y compitrol*), se mantuvieron a 39°C a baño maría, evaluando cada 48 horas la reducción de peso de las mismas.

Este método de evaluación resultó ser muy ineficiente porque las cápsulas no experimentaban reducción de peso en el tiempo, en consecuencia se determinó hacer las evaluaciones directo sobre animales

### **5.2) Evaluación in vivo de los bolos de uso intrarruminal mediante el método de las bolsas de nylon en novillos fistulados.**

En una segunda etapa se realizó un proceso de digestión de las cápsulas desarrolladas, en un animal fistulado, introduciendo las cápsulas al interior del rumen en bolsas de nylon y unidas por un hilo sintético a la tapa de la cánula, periódicamente se extraían estas bolsas, se limpiaban las cápsulas, secaban por 24 horas y se pesaban, de manera de establecer la tasa de degradación experimentada por cada formulación en el animal vivo.

a) Las primeras evaluaciones se realizaron en un ovino fistulado con cápsulas de aproximadamente 30 gramos, con una matriz gelucire y diferentes excipientes para controlar la liberación desde la matriz, como: compitrol, precirol, avicel, lactosa,

afrechillo y hierro, evaluando su cambio de peso semanalmente

b) Las cápsulas que arrojaron los mejores resultados en el punto anterior y modificadas en sus dosis, fueron evaluadas en un novillo fistulado por medio de bolsas ruminales, cada 96 hr. se extraían, secaban y pesaban, para ser introducidas nuevamente.

c) Producto de la lenta degradación observada con esta modalidad, las evaluaciones de los diferentes comprimidos se realizaron depositando los bolos directamente en la cavidad rumino-reticular del animal fistulado, donde estarían expuestas a los movimientos y contracciones ruminales. Cada tres días se extraían las cápsulas y se pesaban.

A través de este procedimiento se estableció la tasa de entrega de los preparados en el animal vivo y dependiendo de la tasa de decaimiento de las cápsulas se pudo definir la frecuencia de uso y aplicación de ellas con el extracto en estudio.

**6.) Establecer in vivo el comportamiento y la aparición a nivel fecal de Azadirachtin incorporado en bolos de uso intrarruminal, a través del efecto sobre larvas de díptero *H.irritans*.**

**6.0)** Se implementó un sistema de administración de Azadirachtin en bloques minerales, para evaluar in vitro e in vivo el efecto sobre la emergencia de *H. irritans*., previo a la obtención final de cápsulas intrarruminales.

Se realizó un tratamiento con la concentración de azadirachtin, referenciada por la literatura como de alta eficiencia de control, y que coincidió con la de mejor resultado, obtenida en las etapas previas de evaluación (0.03 mg. por Kg. de peso vivo) El tratamiento contó con cuatro grupos de vacas en rebaño productor de carne a cada grupo se le entregó vía oral una oferta de bloques minerales con una de cuatro concentraciones de azadirachtin en evaluación, incluido un testigo sin el principio activo.

Los tratamientos fueron:

**6.0.1) Evaluación in vitro del efecto de Azadirachtin incorporado en bloques minerales, sobre la emergencia de adultos de *H. irritans***

- a) Se elaboraron bloques minerales que contenían cantidades crecientes del principio activo 1.25 mgs.; 2.50 y 5.0 mgs. y un testigo sin Azadirachtin.( ver cuadro N°1)
- b) Para evaluar el efecto directo del principio activo azadirachtin incorporado en los bloques sobre la eclosión y desarrollo de los huevos del insecto, se tomaron muestras de los bloques minerales se ralaron y mezclaron con fecas rectales de bovino sin ningún tratamiento, 1, 2 y 4 gramos de bloque, previamente molido, para 100 gramos de fecas, sobre esta mezcla se depositaron 100 huevos frescos de *H. irritans* y se incubaron a 27°C, 50% HR, fotoperiodo 16:8, por 15 días hasta la emergencia de los adultos. Se realizaron dos repeticiones para cada ensayo y tres para cada tratamiento.

Cuadro N° 1

Los bloques minerales utilizados tuvieron la siguiente composición:

<i>Composición proximal y digestibilidad de los bloques minerales utilizados</i>			
<i>Análisis</i>	<i>Unidad</i>	<i>MS*</i>	<i>SA**</i>
<i>Humedad</i>	%	-	10,5
<i>Materia seca</i>	%	89.5	-
<i>Ceniza</i>	%	39.7	35.6-
<i>Fibra Cruda</i>	%	3.1	2.7
<i>Extracto Etéreo</i>	%	1.1	1.0
<i>Proteína Cruda</i>	%	6.7	6.0
<i>Fibra detergente Acido</i>	%	10.5	9.4
<i>Fibra detergente Neutro</i>	%	16.3	14.6
<i>Energía Bruta</i>	cal/g.	2578.6	2309.0
<i>Energía Digestible</i>	Kcal/k	1832.4	1640.7
<i>Energía Metabolizable</i>	Kcal/k	1502.6	1345.4
<i>Calcio</i>	%	9.53	8.54
<i>Fósforo</i>	%	3.16	2.83

**6.0.2) Diseño y evaluación a nivel de campo de tres diferentes dosis de Azadirachtin, de mayor eficiencia en el control de *H.irritans*, incorporadas en bloques minerales para obtener poblaciones de niveles tolerables para los bovinos.**

El ensayo se realizó con 40 animales con un peso medio de 511.5 Kg. Estos se distribuyeron de manera aleatoria en cuatro potreros de 3 ha cada uno, 10 hembras bovinas mestizas Angus x Belgian blue con sus respectivas crías en cada potrero. A cada grupo se le suministró una dosis diferente de Azadirachtin incorporado en el

dispositivo mineral.

Con el objeto de que los animales aprendieran a consumir los dispositivos minerales se realizó un período pre experimental, de dos semanas, donde se les dio a consumir bloques minerales.

Grupos de trabajo:

Grupo 1A: recibió 1,25 gramos de Azadirachtin en cada bloque de 10 kilogramos por 4 semanas

Grupo 3B: recibió 2,5 gramos de Azadirachtin en cada bloque de 10 kilogramos por 4 semanas

Grupo 4D: recibió 10 gramos de Azadirachtin en cada bloque de 10 kilogramos por 4 semanas

Grupo 2T: Testigo sin suministro de bloques con azadirachtin.

Se espera un consumo homogéneo de la mezcla mineral de aproximadamente 150 grs. por día, evaluación realizada en animales estabulados, lo que permitirá una ingestión de: 0.03 mgs de Azadirachtin por kilogramo de peso vivo, esto significa para cada tratamiento un consumo de las siguientes dosis por animal y por día:

Grupo A: 18,75 mgs de Azadirachtin.

Grupo B: 37,5 mgs de Azadirachtin.

Grupo D: 150 mgs de Azadirachtin.

Grupo T: 0 mgs de Azadirachtin.

Estos bloques se entregaron en comederos especialmente contruidos para el ensayo.

Semanalmente a seis animales por tratamiento, se les extrajeron muestras transrectales, las que fueron distribuidas en tres submuestras de 100 gramos cada una, sobre las que se depositaron 100 huevos de *H. irritans*. Las muestras se incubaron a 27°C por 7- 8 días, luego de los cuales se obtienen las pupas por flotación, las que se mantienen en recipientes hasta la emergencia de los adultos. Obteniendo el número de adultos y pupas viables para determinar el porcentaje de mortalidad.

**6.0.3) Evaluación a nivel de campo del efecto de diferentes dosis de Azadirachtin incorporadas en bloques minerales, mediante la colecta de fecas retiradas de la pradera y contaminadas naturalmente por la mosca.**

a) Semanalmente se colectaron directamente del campo, seis masas fecales a las 48 a 72 horas de deposición, de seis animales al azar, las muestras se retiran individualmente del campo en recipientes de plástico de 60 x 60 x 30cm con una fina capa de suelo húmedo. Las bandejas con las masas fecales y cubierta con una malla fina se manejaron a temperatura ambiente por un periodo de 25 días, hasta la emergencia de los adultos, los que eran retirados con aspirados y contabilizados.

**6.0.4) Evaluación periódica de la ganancia de peso de los animales bajo consumo de bloques con diferentes dosis de Azadirachtin.**

Se realizaron evaluaciones del peso de los animales al inicio y final del ensayo, para conocer las ganancias diarias de peso durante el desarrollo del ensayo.

**6.0.5) Recuento del número de ejemplares adultos de *H. irritans* posados sobre los animales bajo consumo de diferentes dosis de Azadirachtin en bloques minerales.**

El recuento del número de adultos de *H. irritans*, se realizó en 6 animales de cada grupo, contando el número aproximado de ejemplares presentes en la zona dorsolateral retroescapular de cada uno. Esta actividad se realizó semanalmente entre las 11 a.m. y 12:30 p.m. del día.

Los datos de las diferentes evaluaciones se analizaron estadísticamente a través de análisis de varianza

### **6.1) Evaluación in vivo del comportamiento y aparición a nivel fecal del principio activo incorporado en bolos intrarruminales, en su efecto sobre *H. irritans***

Para este ensayo se emplearon cápsulas que contenían 0.03 ppm/ Kg. peso vivo, las que fueron suministradas a cada animal por medio de un lanza bolos.

Cada grupo de 15 animales se ubico a 700 metros de distancia uno de otro, para evitar la contaminación cruzada con las distintas poblaciones de moscas.

Las aplicaciones de Azadirachtin se realizaron a comienzo de primavera, cuando las pupas invernantes salen de su estado de diapausa y en Enero antes que se produzca el Peak de verano en las poblaciones de *H. irritans*. Producto de una brusca reducción del peso de las cápsulas evaluadas en paralelo en la parcela de experimentación en un animal fistulado, se realizó una segunda aplicación de cápsulas, de manera que nos permitiera la finalización del periodo previsto para el ensayo.

(todos los animales se trataron contra parásitos gastrointestinales y pulmonares antes e cada etapa de evaluación del insecticida botánico)

#### **Descripción del Ensayo**

**Grupo A. (Testigo)** 15 animales: Este grupo estará compuesto por 15 animales de un peso medio de  $404 \pm 35$  cada uno tratados con bolos sin principio activo.

**Grupo B.** 15 animales: Este grupo estuvo compuesto por 15 animales con un peso medio de  $497 \pm 85$  cada uno, tratados con bolos con una concentración de 0,03 ppm/Kg. peso vivo de azadirachtin y que mejor efecto alcanzó en las prueba de la estación experimental.

a) Semanalmente se retiraron al azar fecas rectales de seis animales por tratamiento. Las fecas fueron separadas en tres submuestras de 100 gramos, por animal y sembradas con 100 huevos frescos de *H. irritans*, posteriormente incubadas a 27°C, 50% HR, fotoperiodo luz-oscuridad (16:8) por 15 días y evaluadas para conocer el número de adultos emergidos en cada tratamiento.

b) En ambos grupos se retiraron fecas del campo, de 48 a 72 horas post deposición, depositadas por los animales y contaminadas naturalmente por *H.irritans*.

Las masas fecales, seis por tratamiento, fueron retiradas en recipientes de plástico y llevadas al laboratorio. Donde se depositaron individualmente en bandejas de 60x60x30 cm. con suelo húmedo y cubierta por una malla fina, se mantuvieron por 25 días a temperatura ambiente, colectando con aspirador los insectos adultos emergidos. Los datos fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza.

c) Se evaluó semanalmente el número de de *H. irritans*, ubicados lateralmente en los animales. El conteo de los adultos se realizó en seis animales en cada grupo, este se practicó semanalmente entre las 11 a.m. y 12.30 pm. del día. Los datos se analizaron por medio de análisis de varianza.

d) Se pesaron mensualmente los animales en ambos tratamientos para determinar la ganancia de peso en el tiempo.

#### **7) Evaluación de campo de las dosis Azadirachtin de mayor eficiencia en el control de *H.irritans*, aplicadas en bolos intrarruminales para obtener poblaciones de niveles tolerables para los bovinos.**

Esta evaluación, al igual que la anterior, se desarrolló de acuerdo a la pauta establecida por el Servicio Agrícola y Ganadero para ensayos de campo, en el control de la mosca de los cuernos, en ella se define el “n” adecuado es de 15 animales en cada tratamiento.

En este ensayo no se considera un testigo químico, ya que se trata de medir la eficiencia respecto del efecto de Azadirachtin sobre las poblaciones de *H.irritans*, específicamente sobre los estados juveniles. Los químicos actúan sobre los adultos del parásito, por lo cual se utilizará solamente un testigo absoluto.

#### **a) Descripción del Ensayo**

**Grupo A. (Testigo)** 15 animales: Este grupo estará compuesto por 15 animales de un peso medio de  $495,43 \pm 74,42$  Kg. cada uno tratados con bolos sin principio activo.

A partir del segundo día de administración de las cápsulas sin azadirachtin, se colectarán fecas que serán llevadas al laboratorio y mantenidas en frío hasta su uso

**Grupo B.** 15 animales: Este grupo estará compuesto por 15 animales de  $602,23 \pm 44,86$  Kg. cada uno tratados con bolos con la concentración, de 0,04 ppm/Kg. peso vivo de azadirachtin y que mejor efecto alcanzó en las prueba de la estación experimental. Semanalmente se colectaron fecas transrectales que fueron incubadas para evaluación.

b) En ambos grupos, se colectaron semanalmente fecas transrectales, las que fueron incubadas con un número conocido de huevos del insecto y evaluada en relación al número de insectos desarrollado, siguiendo la metodología descrita para la primera etapa.

c) Se contabilizó semanalmente el número de insectos adultos de *H. irritans*, ubicados lateralmente en el animal. El conteo de los adultos se realizará en seis animales en cada grupo, este se practicó entre las 11 am. y 12.30 p.m. Los datos se analizaron por medio de análisis de varianza.

d) Se colectaron 9 masas fecales del campo, en los potreros de cada tratamiento e infestadas naturalmente por la mosca. Las masas se dispusieron en bandejas con una cubierta de tierra como sustrato, se dispusieron a temperatura ambiente, cubiertas con una gasa, por 25 días, evaluando y colectando los insectos emergidos, de igual manera que lo descrito en la primera etapa.

e) Se evaluó periódicamente en los animales el peso, para conocer las ganancias diarias de peso durante el desarrollo del ensayo.

#### **8.) Escalamiento del producto controlador obtenido**

Se definirá la tecnología para la producción masiva del producto final.

Se realizará la formulación definitiva del producto comercial, así como las gestiones

tendientes a obtener el registro sanitario otorgado por el Servicio Agrícola Ganadero y patente de dicho producto

**9.) Capacitación de productores de carne bovina en el uso de bolos de azadirachtin como controlador de *H irritans***

Se realizó un seminario para difundir las experiencias y resultados obtenidos en relación al uso de bolos intrarruminales de azadirachtin y su efecto en el control de la mosca de los cuernos en bovinos en pastoreo.

**10.) Establecimiento de una metodología para detectar residuos de azadirachtin en carne, LMR.** Este es un estudio que se solicitó al departamento de tecnología farmacéutica de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile. Se entrega en anexo I.

**3. Descripción de las actividades y tareas ejecutadas para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias.**

**1) Desarrollar una crianza artificial del díptero hematófago *H.irritans*, que proporcione los distintos estadios biológicos del parásito, para realizar la evaluación in vitro del extracto de Neem.**

a) Desarrollo y mantención de una crianza artificial de *H.irritans*. bajo condiciones controladas ( 27°C, 50% HR, fotoperiodo 16:8 Luz-oscuridad)

b) Captura constante de adultos de *H.irritans* en el campo, con red entomológica, para mantener las características reproductivas y conductuales de las moscas silvestres en el laboratorio

c) Desarrollo de un sistema de alimentación de las moscas adultas, mantenidas en jaulas, con sangre citratada de bovinos en esponjas de alta densidad

d) Desarrollo de cámaras de postura de las hembras, con cilindros de PVC y mallas mosquiteras

e) Diseño de sistema de colecta de huevos y desarrollo en fecas para la obtención de pupas y adultos

**2) Evaluar in vitro, el efecto de distintas dosis del extracto de *A. indica*, sobre estados juveniles de *H. irritans*, para establecer la DL50 y DL90.**

a) Evaluación in vitro del efecto de diferentes concentraciones de azadirachtin (0.01, 0.02, 0.03ppm), sobre el desarrollo de los estados juveniles de *H irritans*, a través de la mezcla de estas dosis con fecas animales, sembrando un número conocido de huevos del insectos y evaluando su emergencia.

b) Evaluación de dosis mayores de azadirachtin por 100 gramos de fecas animales (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ppm) sobre la emergencia de 100 huevos de insectos en estas dosis. El aumento en las dosis fue para establecer el efecto el compuesto en los insectos, debido a que las dosis originalmente planteadas, fueron difíciles de homogenizar en las fecas para lograr resultados consistentes.

c) Obtención de la dosis letal de azadirachtin (LD50 y LD90) sobre *H irritans*, mediante la aplicación de tres concentraciones del principio activo (0.02, 0.03, 0.05 ppm), mas un testigo sin el compuesto, mediante la administración vía oral, en suspensión, de cada dosis, en animales estabulados. En reemplazo de la metodología original, debido a la dificultades antes mencionada, en el punto b

### **3) Evaluación *in vitro* del efecto de los procesos digestivos de Bovinos sobre el principio activo azadirachtin**

a) Evaluación *in vitro* del efecto de los procesos digestivos, por medio del test de Tilley Terry, sobre el principio activo azadirachtin, mediante la incorporación de 0.02, 0.03 y 0.04 ppm del principio activo en 50ml de licor ruminal y mezclado con fecas deshidratada, para evaluar la acción controladora sobre un número conocido de huevos de la mosca, a través de su incubación.

Esta evaluación no fue posible efectuarla, porque al aplicar el ácido en la segunda fase del método Tilley Terry, éste inactivó al azadirachtin no pudiendo determinar su efecto sobre el insecto. Situación que definió la realización del ensayo *in vivo*, directamente sobre animales.

### **4.) Evaluación en novillos de experimentación, el efecto de azadirachtin administrado en cápsula de gelatina sobre *H irritans*, a nivel fecal**

a) Se evaluaron tres dosis de azadirachtin en novillos de experimentación (0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 ppm/Kg. peso animal), en relación al efecto a nivel fecal sobre un número conocido de huevos del insectos. Esta evaluación no se realizó con cápsulas, por su dificultad para ser ingerido por loa animales y porque tendían a flotar en el rumen, por lo tanto, las dosis se administraron en suspensión acuosa, 30cc por animal por cuatro días. Luego se colectaron fecas, a las 72 horas y se evaluó el efecto controlador de cada dosis en la eclosión de insectos adultos.

### **5) Diseño y evaluación del comportamiento de bolos intrarruminales de baja digestibilidad, mediante el método *in vivo* Tilley Terry y el método de digestibilidad *in vivo* (nylon bags), de manera que permitan su uso posterior en la entrega gradual del principio activo.**

a) Diseño de los bolos intrarruminales, con proporciones variables de componentes de baja reactividad a la reactividad de la flora ruminal.

Se elaboraron comprimidos a base de sustancias de origen graso denominadas Gelucire que conforman la matriz del comprimido a partir del cual se libera el compuesto deseado, a esta matriz de Gelucire 50/02, se le adicionó una variedad de excipientes, en diferentes proporciones, de manera de determinar el grado de liberación desde la matriz (se evaluó Precirol, Compitro, Avice y Lactosa Spray Dried y hierro metálico en polvo)

Los productos que contenían Gelucire, Compitrol y Precirol, fueron fundidos a 5°C superior a su punto fusión, se les agregó los componentes que determinaban densidad, esta debía alcanzar a lo menos 1,6g/cc para asegurar que no fuera expulsado del rumen del animal, el componente mas adecuado para este fin resultó ser hierro metálico en polvo y finalmente se agregó el principio activo. La masa fundida al tomar consistencia se vació en moldes inicialmente de 2cm diámetro y 4cm largo. Las cápsulas empleadas en novillos se elaboraron en cilindros de 4cm de diámetro y 9 cm. de largo.

b) Evaluación inicial de las formulaciones elaboradas. Se realizaron ensayos en un equipo de disolución oficial de la Farmacopea Norteamericana (USP), empleando como medio de disolución 900 ml de un medio que contenía agua lipasa y sales biliares, con pH 6.8. Aquellos comprimidos que resistieron la acción del medio de disolución, pasaron a la etapa de evaluación in vitro e in vivo.

c) Evaluación de las cápsulas diseñadas, con un peso aproximado de 5g, en relación a su resistencia a la digestión ruminal in vitro, mediante el método de Tilley Terry. Este sistema no nos permitió determinar la tasa de degradación de las cápsulas, por lo corto del período que comprende este método y por la falta de movimientos de acción mecánica similares a los observados en el sistema gastrointestinal de un animal vivo, que determinan un desgaste y degradación de los comprimidos de manera constante.

d) Evaluación in vivo de los bolos de uso intrarruminal, de diversas formulaciones mediante el uso de bolsas de nylon bags, que fueron introducidas, en una primera etapa en ovino fistulado y posteriormente en un novillo, en ambos casos fueron pesadas

periódicamente, para determinar su tasa de decaimiento en el tiempo

e) Evaluación de los bolos mediante la incorporación directa en el retículo rumen, sin las bolsas, esta modificación se debió a la dificultad y lentitud con la que los bolos de disolvían en el tiempo, en cambio al usar este sistema, los comprimidos quedaban expuestos directamente a la mecánica propia del sistema digestivo, con tasa de gradación reales a las condiciones del animal

**6) Evaluación in vivo del comportamiento y la aparición a nivel fecal de azadirachtin incorporado en bolos de uso intrarruminal, en dos concentraciones y dosis, a través de su efecto controlador sobre *H.irritans***

**6.0)** a) Se evaluó el comportamiento del azadirachtin incorporado en bloques minerales, en su efecto a nivel fecal sobre la emergencia y control de los insectos. No se emplearon los bolos en esta etapa inicial, por la falta de una evaluación definitiva sobre su degradabilidad en el tiempo, en el rumen de los animales. Se emplearon bloques minerales a los que se les introdujo diferentes concentraciones de Azadirachtin y fueron ofrecidos e ingeridos por los animales en pastoreo. Semanalmente a los animales se les colectaron fecas transrectales y sobre ellas se colocaron huevos del insecto, en número conocido, evaluando el nivel de emergencia para cada dosis.

b) Fabricación de bloques minerales con diferentes dosis del principio activo, evaluando su consumo diario por los animales, lo que determinó una ingesta diaria de 150 g de bloque por animal.

c) Evaluación in vitro del efecto del azadirachtin incorporado en bloques, sobre la emergencia de los insectos adultos. Se tomaron muestras de bloques con diferentes dosis del producto, se mezclaron con fecas y se sembraron huevos del insecto, evaluando el número de insectos emergidos para cada dosis

d) Evaluación in vivo de diferentes dosis de azadirachtin incorporado en bloques, sobre los estados juveniles del insecto. Se dieron a ingerir a cuatro grupo de animales en pastores, bloques de 10 kilos, con dosis distintas del compuesto (1.25, 2.50, 10 y 0.0 gramos por bloque). Se tomaron muestras de fecas rectales de cada grupo, se sembraron huevos de *H. irritans*, se incubaron y evaluaron los niveles de control en la eclosión y emergencia del insecto.

e) Evaluación periódica del peso de los animales en cada tratamiento.

f) Recuento semanal del número de adultos presente en un número de animales de cada grupo, en la zona dorsolateral de los animales.

#### **Uso de bolos intrarruminales**

6.1) a) Evaluación del comportamiento del azadirachtin incorporado en cápsulas intrarruminales, de  $103,73 \pm 08$  Kg. de peso y concentración de 0.03 ppm/Kg. peso vivo. Las cápsulas con azadirachtin se le entregaron a un grupo de 15 animales en pastoreo, el grupo control, con cápsulas sin azadirachtin, correspondió a 15 animales. Ambos grupos recibieron las cápsulas en primavera y semanalmente se evaluó el efecto del principio activo a nivel fecal sobre la emergencia y control de los insectos.

b) Administración de un segundo dispositivo con el principio activo, en la mitad del periodo del ensayo, por la degradación de las cápsulas de manera más acelerada a la esperada, y una reducción en el efecto controlador de los insectos.

c) Evaluación periódica del peso de los animales en cada tratamiento.

d) Recuento semanal del número de adultos presente en seis animales de cada grupo, en la zona dorsolateral de los animales.

e) Evaluación de la infestación natural del insectos sobre masas fecales del campo en

cada grupo en estudio, a través de la colecta de 6 masas fecales de 48 a 72 horas de defecadas, llevadas a laboratorio, incubadas y evaluadas en relación al número de emergencias observadas.

**7) Evaluación de campo de las dosis de azadirachtin, de mayor eficiencia en el control de *H.irritans* aplicadas en bolos intrarruminales, para obtener poblaciones del insecto en niveles tolerables para los bovinos.**

a) La evaluación de campo se realizó con dos grupos de animales (15 por grupo) y dos tratamientos. A un grupo de animales se les suministraron bolos intrarruminales con dosis de azadirachtin, 0.04ppm/Kg. peso vivo. El segundo grupo es el testigo con suministro de bolos sin el principio activo. A cada animal se le dio a consumir un único bolo durante la temporada.

b) Se evaluó en los dos tratamientos el número de insectos emergidos luego de sembrar un número conocido de huevos del insecto sobre muestras de fecas réctales, colectadas en ambos grupos de animales, determinándose el porcentaje de adultos en cada caso.

c) Se realizó semanalmente el recuento de adultos de *H.irritans* sobre los animales, en la zona dorsolateral del cuerpo de 9 animales por tratamiento.

d) Se evaluó en número de insectos emergidos a partir de masas fecales infestadas naturalmente en los dos grupos de animales, se colectaron 9 masas fecales por tratamiento a las 48-72 horas de defecadas en el campo, se dispusieron en bandejas con tapa de malla y se mantuvieron a temperatura ambiente por 25 días durante su evaluación.

e) Se evaluó la ganancia de peso de los animales, en ambos tratamientos.

### **8.0 Escalamiento, definición de la presentación del producto comercial y patentación.**

- a. Se definirá en conjunto con empresas interesadas en el tema las formas comerciales del producto obtenido.
- b. Se han iniciado gestiones para establecer las condiciones de importación comercial del principio activo, azadirachtin que tienen como objetivo obtener el registro sanitario del producto comercial obtenido.
- c. En conjunto con los participantes del proyecto se establecerá el procedimiento y la participación proporcional en la patente del dispositivo elaborado.

### **9.0 Desarrollo de 1 seminario para productores de carne en las zonas de influencia del proyecto.**

Se realizó un seminario de entrega de los resultados finales del proyecto a un conjunto de académicos, productores y técnicos.

### **10) Establecimiento de una metodología para detectar residuos de azadirachtin en carne, LMR.**

Esta información se entrega en información anexa.

#### 4.- Resultados:

##### 1. Resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto

##### 1) **Desarrollar una crianza artificial del díptero hematófago *H. irritans*, que proporcione los distintos estadios biológicos del parásito, para realizar la evaluación in vitro del extracto de Neem.**

a) Se estableció la crianza de la mosca de los cuernos utilizando moscas capturadas en el campo, sobre bovinos. Los adultos en número de 100-120 fueron confinados en jaulas de PVC, cilíndricas de 1500 ml de capacidad y cubiertas con malla mosquitera. La alimentación se realizó por la parte superior de las jaulas con esponjas de alta densidad, empapadas en sangre citratada (2.5 gramos de citrato de sodio como anticoagulante, disuelto en 2.5 ml de agua estéril por cada 500 ml de sangre)

b) La colecta de los huevos, para la realización de los ensayos, se realizó diariamente, los huevos depositados en el piso de las jaulas, eran retirados con pincel y depositados sobre trozos de papel toalla húmedo y depositados, antes de su eclosión sobre fecas rectales frescas de bovinos, 100g de fecas para 100 huevos, en recipientes de plásticos de 250ml e incubadas a 27°C bajo fotoperiodo de 16:8 (L: O) por 15 días hasta la emergencia de los adultos.

c) El número promedio de huevos colectados por jaula era de 1200 huevos

d) Por cada 100 huevos depositados en las fecas se obtuvo una emergencia promedio de un 44.34%, valores acordes con la eclosión natural de la especie.

e) Los adultos emergidos depositados en jaulas, alimentados con sangre citratada y la introducción permanente de insectos del campo al sistema, permitió tener una crianza constante y permanente en el tiempo.

f) La mantención de la crianza sólo con los insectos emergidos en laboratorio, permitió una prolongación de las poblaciones de insectos hasta la tercera generación, luego se producía una brusca declinación en las oviposturas y fertilidad de los huevos.

2) **Evaluar in vitro, el efecto de distintas dosis del extracto de *A. indica*, sobre estados juveniles de *H.irritans*, para establecer la DL50 y DL90.**

2.0) a) Evaluación in vitro del efecto de diferentes concentraciones de azadirachtin (0.01, 0.02, 0.03 ppm) incorporados en las fecas, sobre el desarrollo de los estados juveniles de *H irritans*.

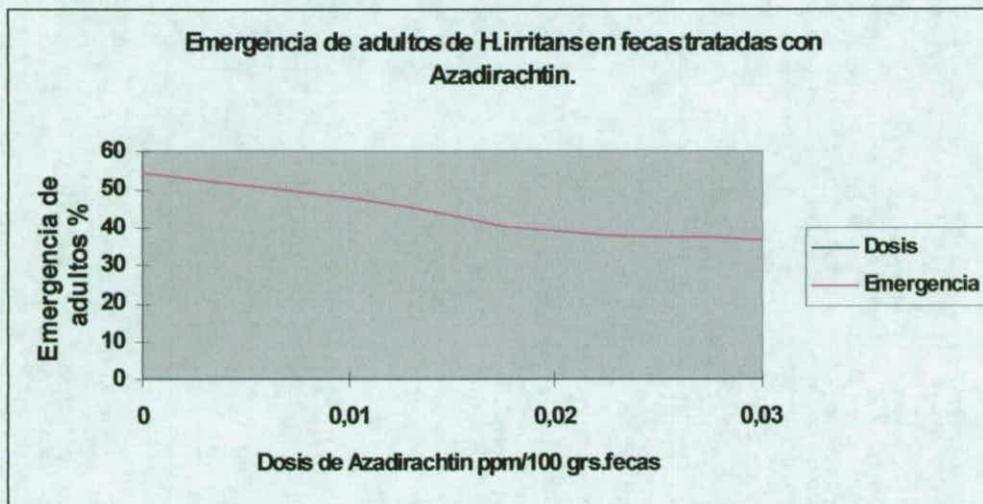
En el siguiente cuadro se aprecia la respuesta a la aplicación directa de cuatro dosis de Azadirachtin sobre la emergencia de 100 huevos de *H. irritans*, dispuestos sobre fecas bovinas que se incuban a 27 C ° durante 15 días. En este cuadro se puede apreciar que hay una respuesta baja o una supresión deficiente de la emergencia de adultos de *H. irritans*. No hay diferencia significativa entre los distintos tratamientos. La causa de la baja respuesta al Azadirachtin se debería a la baja cantidad que se utilizó cada 100grs de fecas tratadas manualmente, lo que llevó a una difícil y deficiente homogenización de las muestras fecales en cada tratamiento.

Cuadro N°2

<b>Emergencia de Adultos de <i>H.irritans</i> en fecas bovinas tratadas con Azadirachtin.</b>		
<b>Dosis ppm/100gr. fecas</b>	<b>Emergencia</b>	<b>±DS</b>
<b>0.00</b>	<b>54,33 a</b>	<b>7,19</b>
<b>0,01</b>	<b>48.00 a</b>	<b>2,62</b>
<b>0,02</b>	<b>39,00 a</b>	<b>2,68</b>
<b>0,03</b>	<b>36,83 a</b>	<b>5,50</b>

**p>0.05, Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos.**

Grafico N°1



En el grafico anterior se expresan los resultados de la aplicación de azadirachtin en dosis de 0.01ppm; 0.02ppm y 0.03ppm. no presentando diferencias entre el testigo y los tratamientos con el extracto botánico de Neem.

b) Como resultado de los primeros valores obtenidos con las dosis de Azadirachtin introducidas en los ensayos con fecas, **se incrementó la dosis utilizada**, (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ppm) basándose en la hipótesis de que los resultados no significativos se deben a la difícil homogenización de las muestras, obteniéndose los resultados que se entregan a continuación.

Cuadro N° 3

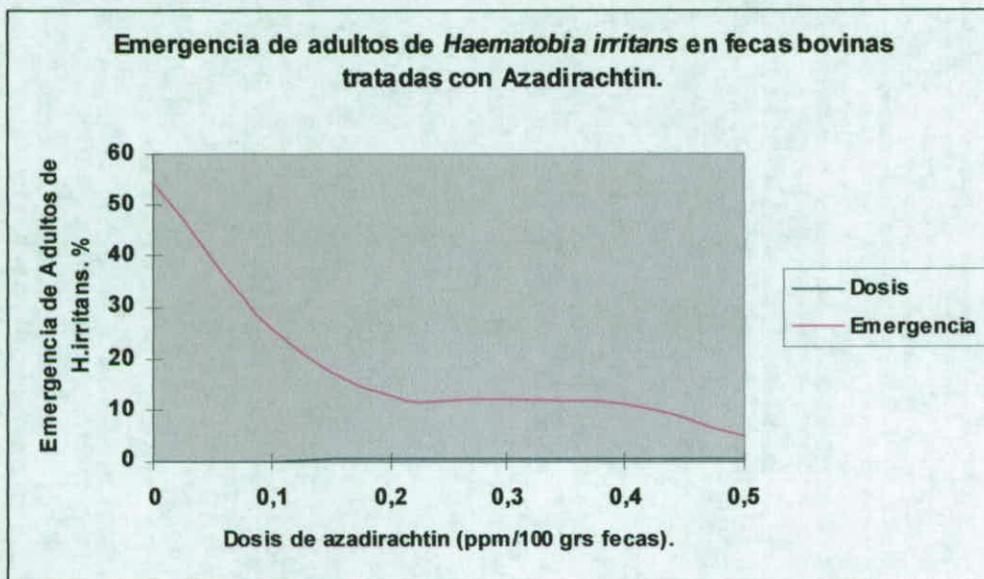
Emergencia de Adultos de H.irritans en fecas bovinas tratadas con Azadirachtin.		
Dosis ppm/100gr. Fecas	Emergencia adultos	±DS
0	54,33 a	7,19
0,1	25,67 b	5,33
0,2	12,67 c	4,54
0,3	12,25 c	0,88
0,4	11,33 c	6,95
0,5	5,08 c	1,45

Duncan Test

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (p<005)

Como resultado del mayor nivel de aplicación de Azadirachtin, se comprueba que el bajo control obtenido en el experimento anterior, se debería principalmente a la difícil homogenización del producto en el medio fecal. Se aprecian en el cuadro precedente las diferencias estadísticas que existen entre el testigo y los tratamientos con 5 niveles de Azadirachtin. Se aprecia también que la respuesta en la medida que se incrementa la dosis tiene menor variabilidad.

Gráfico N° 2



En el gráfico anterior se aprecia la curva de respuesta del díptero hematófago a la introducción gradual del extracto de Neem en el medio fecal. Se observa la disminución en la emergencia de adultos de *H. irritans* en la medida que se aumenta la concentración del principio activo en el medio fecal en que se incubaron los huevos del parásito,

**2.1) Evaluación y obtención de la dosis letal de Azadirachtin (LD50 y LD90) sobre *H. irritans*, mediante la aplicación directa a novillos, de una suspensión de diferentes concentraciones del principio activo**

Obtención de la dosis letal de Azadirachtin (LD50 y LD90) sobre *H. irritans*, mediante la aplicación directa a novillos de una suspensión de diferentes concentraciones del principio activo ( 0.00, 0,02; 0,03 y 0,05 ppm).

Efectos de la Aplicación de 4 niveles de azadirachtin, 0,00 (testigo) ppm; 0,02ppm; 0,03ppm y 0,05 ppm/kilogramo de peso vivo, sobre la emergencia de adultos de *H. irritans* en fecas de bovinos con peso vivo entre 320 y 400 Kg. y un peso promedio de 354 Kg., tratados por vía oral con 30 cc/día de una solución acuosa de Azadirachtin formulada de acuerdo al peso animal y que se aplicó diariamente por vía oral durante 4días.

En cada periodo de aplicación se ajustó el nivel de administración de Azadirachtin en función del peso vivo. En el cuadro siguiente y como ejemplo se indican los niveles de aplicación y la forma de obtención de este.

Cuadro N° 4

<b>Estructura de aplicación de Azadirachtin para cada experimento realizado</b>							
N° animal	Ppm/K pv	Peso Vivo	mgr. Ppio activo	mg. producto comercial	Días tratamiento	Producto comercial total /animal	Tratamiento diario Grs.
N°1	0,02	400	8	47,06	4	188,24	0,0471
N°5	0,02	335	6,7	39,41	4	157,65	0,0394
N°2	0,03	345	10,35	60,88	4	243,53	0,0609
N°6	0,03	375	11,25	66,18	4	264,71	0,0662
N°4	0,05	362	18,1	106,47	4	425,88	0,1065
N°8	0,05	320	16	94,12	4	376,47	0,0941
N°3	0.0	350	0	0,00	4	0,00	0,0000
N°7	0.0	345	0	0,00	4	0,00	0,0000

En el cuadro N°5 se incluyen los resultados obtenidos en 7 ensayos realizados con animales de experimentación, bovinos angus, con un peso promedio de 354 k. Cada valor se obtiene del procesamiento de 6 muestras fecales obtenidas de 2 animales que

recibieron la solución acuosa de Azadirachtin durante 4 días.

En cada uno de los experimentos se aprecia la reducción en la emergencia de adultos de *H. irritans* luego de incubar 100 huevos en cada muestra fecal obtenida de animales tratados.

Las reducciones de mayor relevancia se encuentran entre los animales tratados con dosis de 0,03 y 0,05 ppm/kpv. La literatura indica una dosis efectiva de 0,03 ppm/kpv por animal de Azadirachtin, para lograr el control de los insectos, sin embargo en el presente trabajo el control de *H. irritans* se logra con 0,05 ppm, esto se debería a pureza de los extractos en uso.

Cuadro N° 5

Emergencia de adultos de <i>H. irritans</i> en fecas de animales tratados por vía oral con 3 niveles de azadirachtin ppm/Kpv.		
Dosis ppm/Kpv	N° adultos	DS
0 (Testigo)	42,67a	±10,43
0,02	20,70b	±5,50
0,03	11,43b	±3,91
0,05	7,00b	±3,30

Duncan Test

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (p<005)

En el cuadro N° 6 se aprecia la respuesta general a la aplicación de Azadirachtin por vía oral en bovinos con un peso promedio de 354 K.

A medida que la dosis alcanza valores de 0,05ppm/kpv, se reduce la variabilidad de la respuesta, lográndose una reducción de un 83,59 % de la emergencia de adultos respecto del testigo.

Cuadro N° 6

Evaluación del efecto de Azadirachtin sobre la emergencia de adultos de <i>H. irritans</i> en fecas de bovinos tratados							
Dosis ppm/Kpv	02/12/05	08/12/05	29/12/05	04/02/06	10/02/06	17/03/06	24/03/06
N° adultos							
0	37,50	45,00	59,17	40,17	31,50	33,50	32,83
0,02	26,50	23,00	19,17	17,83	17,00	19,67	22,00
0,03	7,00	17,50	10,50	9,50	12,67	12,83	12,33
0,05	3,50	11,33	10,50	4,50	5,17	9,17	8,50

## Determinación de DL50 y DL90

Cuadro N° 7

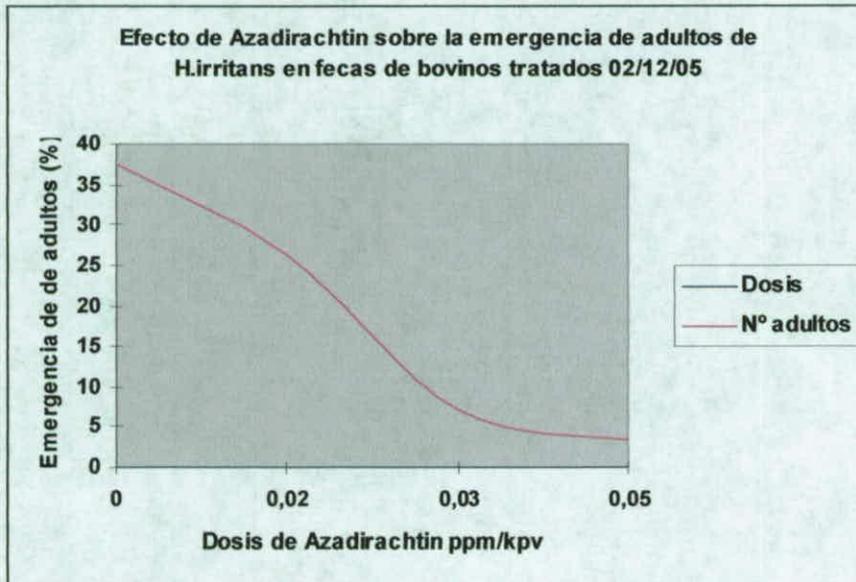
	Concentración ppm/Kpv	Limites inferior y superior al 95% confianza	
		Limite inferior	Limite superior
<b>DL 50</b>	0.00632	0.000119	0.01207
<b>DIL90</b>	0.03637	0.02832	0.07469

Con la información obtenida de la administración de azadirachtin a los novillos de experimentación se obtuvo la DL50 y DL90 utilizando el Método Probit, con el Programa de estadística SPSS 13.0.

La obtención de DL50 y DL90 se efectuó con la información obtenida del tratamiento de bovinos con Azadirachtin y no con los datos derivados de la aplicación manual de Azadirachtin directamente a las fecas, considerando que existe un problema de homogenización de las muestras, con las cantidades establecidas para cada dosis, que corresponden a cantidades considerablemente bajas.

En los gráficos siguientes (3-7) se aprecia la forma en que se produce la disminución de la emergencia de adultos de *H.irritans* en fecas bovinas, en cada experimento en función del aumento de la dosis/concentración de azadirachtin administrada por kilogramo de peso vivo a los animales tratados.

Gráfico N° 3



En el grupo testigo (0ppm/Kpv) se aprecia una emergencia de adultos de *H. irritans*, en las fecas, que corresponde a la considerada normal para la especie, sin embargo a partir de la introducción del extracto botánico en dosis de 0,02 ppm se genera el efecto deseado con una disminución constante de la emergencia de adultos, en las siguientes dosis de 0,03 y 0,05 ppm/Kpv por animal.

El efecto expresado en el gráfico N°3 se puede también observar en los 4 gráficos siguientes. La tendencia que manifiestan las poblaciones de *H. irritans* bajo el efecto de Azadirachtin es muy consistente.

Gráfico N°4

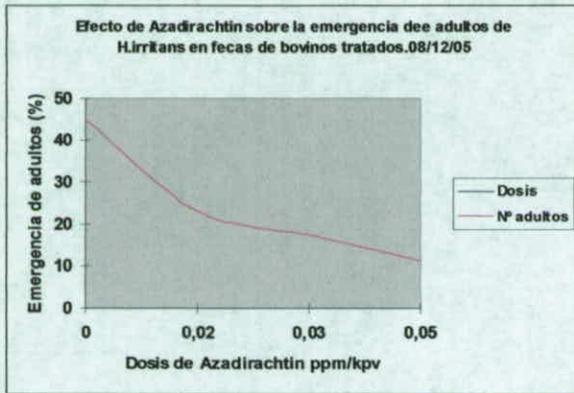


Gráfico N°5

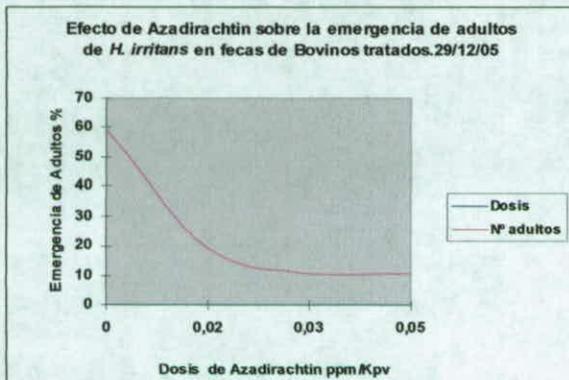


Gráfico N°6

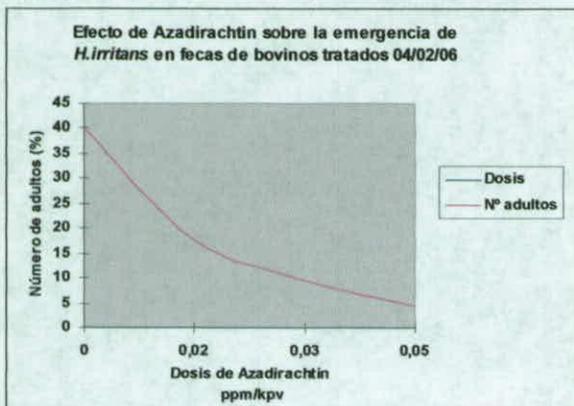
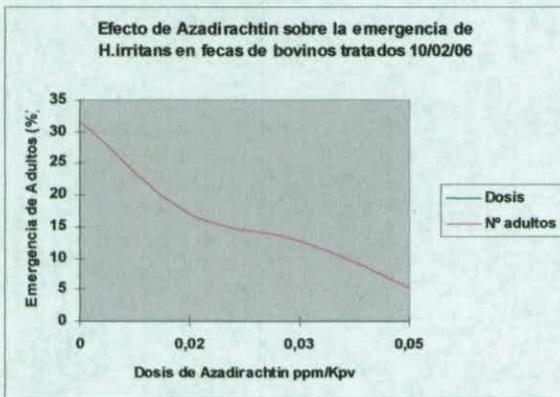


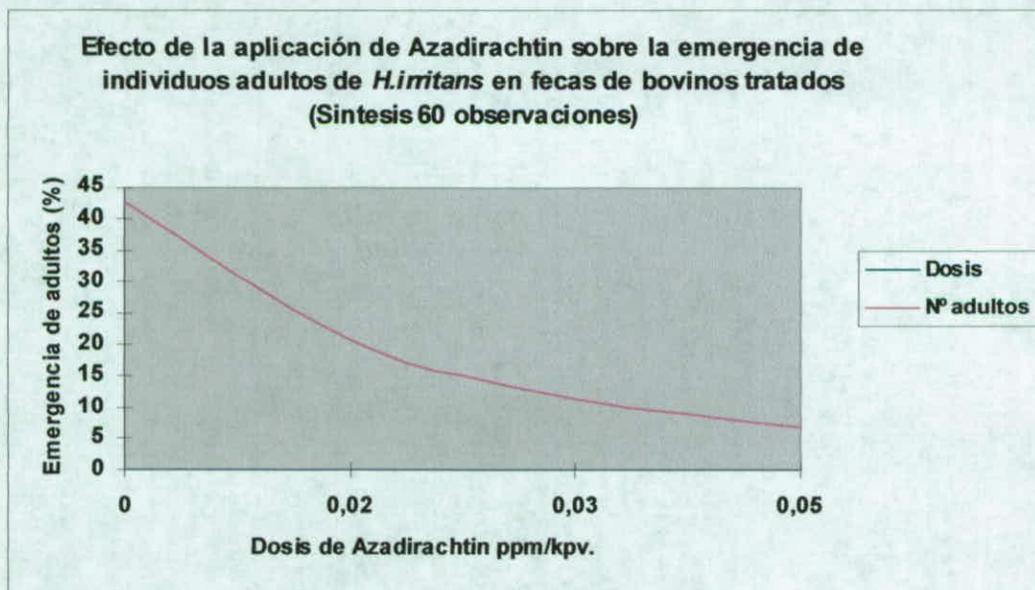
Gráfico N°7



Se observa en los gráficos anteriores (3-7) que el control permite reducir la emergencia de los adultos a menos de un 7% de los huevos incubados.

### Tendencia general en la reducción de la emergencia de *H. irritans*

Gráfico N° 8



En el gráfico N°8 se aprecia el efecto general de Azadirachtin sobre la emergencia de adultos de *H. irritans* en fecas de bovinos tratados con el extracto de Neem durante 4 días. Este conjunto de resultados permite asegurar que el extracto en experimentación permite el control de la mosca de los cuernos a un nivel de un 7% , en consecuencia un 93% de los huevos expuestos al tratamiento es controlado evitándose la emergencia

del insecto adulto.

### **3 ) Evaluación *in vitro* del efecto de los procesos digestivos de Bovinos sobre el principio activo azadirachtin.**

**3.0)** Evaluación in vitro del efecto de los procesos digestivos, por medio del test de Tilley Terry, sobre el principio activo azadirachtin, en su acción controladora sobre estados juveniles de *H.irritans*

Durante la evaluación in vitro con el método de Tilley Terry, se observó que la aplicación de ácido clorhídrico durante la segunda fase del desarrollo de la prueba, en la cual se simula la digestión abomasal, produce la degradación del principio activo Azadirachtin. Esto determinó que en las pruebas donde se utilizaba el residuo de la segunda fase del método Tilley Terry para frenar la emergencia de adultos de *H. irritans*, no presentara resultados de inhibición sobre los adultos, este fenómeno no se presenta in vivo al entregar las dosis necesarias a los distintos grupos de animales. Esta constatación determinó la realización de manera directa con los bovinos de experimentación, de las pruebas para evaluar el efecto del azadirachtin.

### **4) Evaluación en novillos de experimentación del efecto de diferentes concentraciones de Azadirachtin administrado en suspensión sobre *H.irritans* a nivel fecal.**



**4.0)** La evaluación de la acción de los procesos digestivos en bovinos sobre el principio activo y en su efecto sobre los estados de desarrollo de la mosca, a nivel fecal, se realizó administrando vía oral, cuatro dosis conocidas de azadirachtin en la dieta animal, 0.02, 0.03, 0.04 y 0.05 ppm por peso vivo de animal, más un testigo sin azadirachtin, a través de una suspensión acuosa, cada concentración fue suministrada en 30cc por animal.

En el cuadro N° 8 se observa la emergencia de adultos de *H.irritans* en dos ensayos en los que se evaluó una nueva concentración (0,04 ppm) del extracto botánico.

Cuadro N° 8

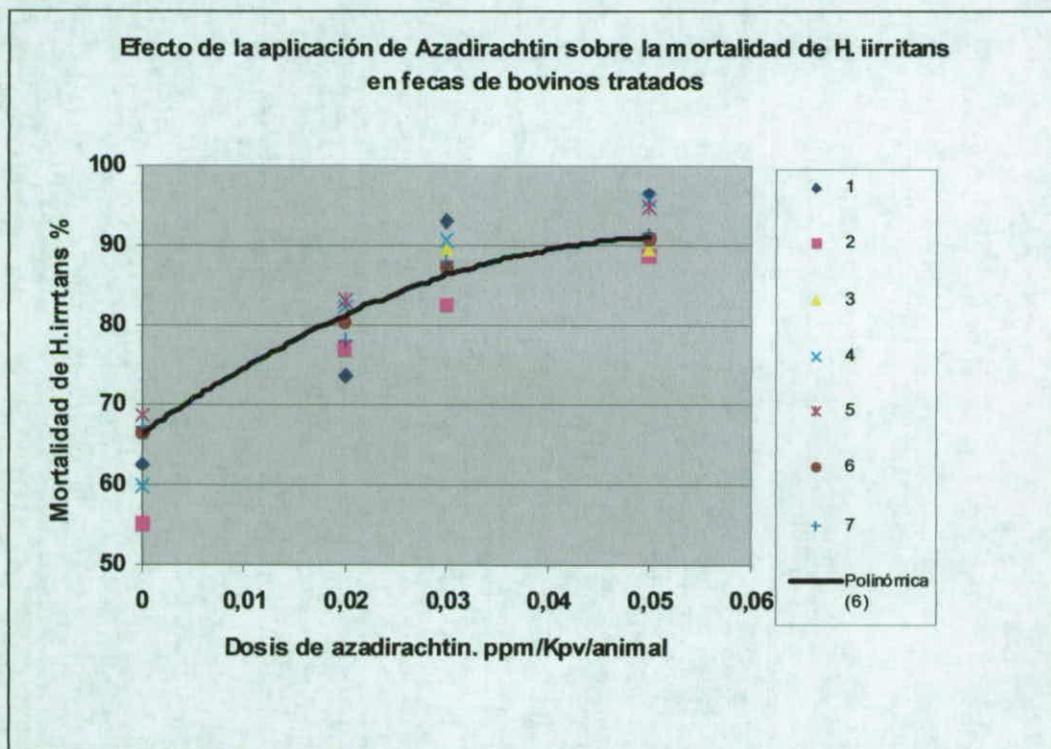
Evaluación del efecto de Azadirachtin sobre la emergencia de adultos de <i>H. irritans</i> en fecas de bovinos tratados	
Dosis ppm/Kpv	Emergencia de adultos (24/03/06)
0.00	33,165 ± 0.47 a
0.03	20.83 ± 1.5 b
0.04	12,58 ± 0.35 c
0.05	8.83 ± 0.47 c

**Duncan Test**

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (p<005)

Teóricamente la introducción de una concentración intermedia 0.04 ppm,(entre 0.03 ppm y 0.05 ppm) debería generar valores intermedios de emergencia de adultos de *H.irritans*,

Gráfico N° 9



Con los valores de respuesta de mortalidad de *H.irritans* en fecas de bovinos tratados obtenidos en 7 experimentos, se construyó la curva general de respuesta a l insecticida

botánico que corresponde a una línea polinomial que se presenta en el gráfico N° 9.

**5) Diseño y evaluación del comportamiento de bolos intrarruminales de baja digestibilidad mediante el método in vitro Tilley Terry e in vivo ( Nylon Bags) , de las cápsulas obtenidas**



**5.0) Desarrollo de cápsulas intrarruminales que permitan la liberación lenta del extracto de *A. indica***

La Facultad de Química y Farmacia de la U de Chile fue la encargada de diseñar cápsulas intrarruminales de liberación controlada que permita la entrega lenta y sostenida de productos biológicos o sustancias químicas. Las cápsulas de un peso inicial de 19-20 gramos fueron elaboradas bajo formulaciones con Gelucire 50/02 y Precirol y Compritol cuadro N° 10, y evaluadas inicialmente en un ovino fistulado

**5.2) Formulación y evaluación de dispositivos intrarruminales.**

**a) Fase I Evaluación de diferentes formulaciones en un ovino fistulado**

Cuadro N° 9

<b>Composición porcentual de las formulaciones utilizadas en la estructuración de los dispositivos intrarruminales de digestión lenta ( Fase I)</b>									
<b>Componente</b>	<b>Formulación (%)</b>								
	Fo	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Gelucire 50/02	35.8	34.6	39	37	31.8	31.8	36.5	36.3	39
Compritol 888	4.5	7	4.5	4.5	10.3	10.3	4.5	5.7	3.8
Gelucire 64/02	6.9	6.9	4.5	4.5	7.4	6.9	8	7	6.2
PEG 6000	2.2	1.5	2	1.5	0.5	1	1	1	1
Hierro	50.6	50	50	50	50	50	50	50	50

Las formulaciones expuestas en el cuadro N°9 presentaron degradabilidades inadecuadas ya sea por exceso o por defecto, los comentarios a ella están en los informes parciales, a continuación se revisarán os resultados más relevantes en este ámbito del proyecto.

## b) Fase II

### Tasas de degradación de los diferentes formulados evaluados en bovinos.

En el cuadro siguiente se entregan los componentes utilizados en la formulación de los dispositivos diseñados para su uso en rumiantes mayores, estas mezclas aporten diferentes resistencias a los comprimidos frente al efecto de la biología ruminal en tanto impiden la infiltración en función de su condición o relación hidrófoba/hidrófila. En función de esta relación dada por sus componentes tendrán mayor o menor resistencia y por lo tanto durabilidad.

Cuadro N°10

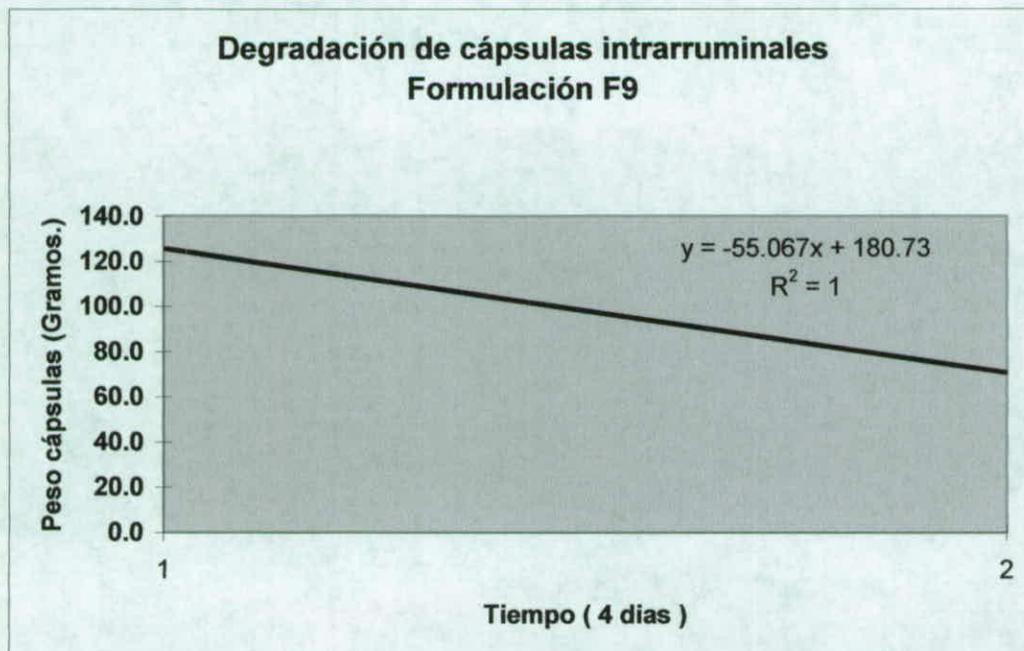
<b>Composición porcentual de las formulaciones utilizadas en la estructuración de los dispositivos intrarruminales de digestión lenta ( Fase II) Evaluación con Neem</b>			
Componente	Formulación (%)		
	F9	F10	F11
Gelucire 50/02	34.8	30	30.8
Compritol 888	13.4		
Alcohol cetílico		18.2	
Alcohol estearílico			18.2
PEG 6000	1.8	1.8	1.0
Hierro	50	50	50

En el cuadro N°11 se observa la tasa de degradación de la formulación F9 evaluada en un novillo fistulado. Esta cápsula presenta un nivel de degradación acelerado que no permite su uso para los objetivos del proyecto, que requiere óptimamente 60 días de entrega del extracto botánico

Cuadro N° 11

Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F9		
Fecha/evaluación	28/01/2008	02/02/2008
Cápsula	Peso inicial grs.	Peso final grs.
A	132	85
B	127	64
C	118	62.8
<b>Pesos totales</b>	<b>125.7±8.1</b>	<b>70.6±12.8</b>

Gráfico N°10



En el gráfico anterior se aprecia la tasa de degradación del dispositivo F9.

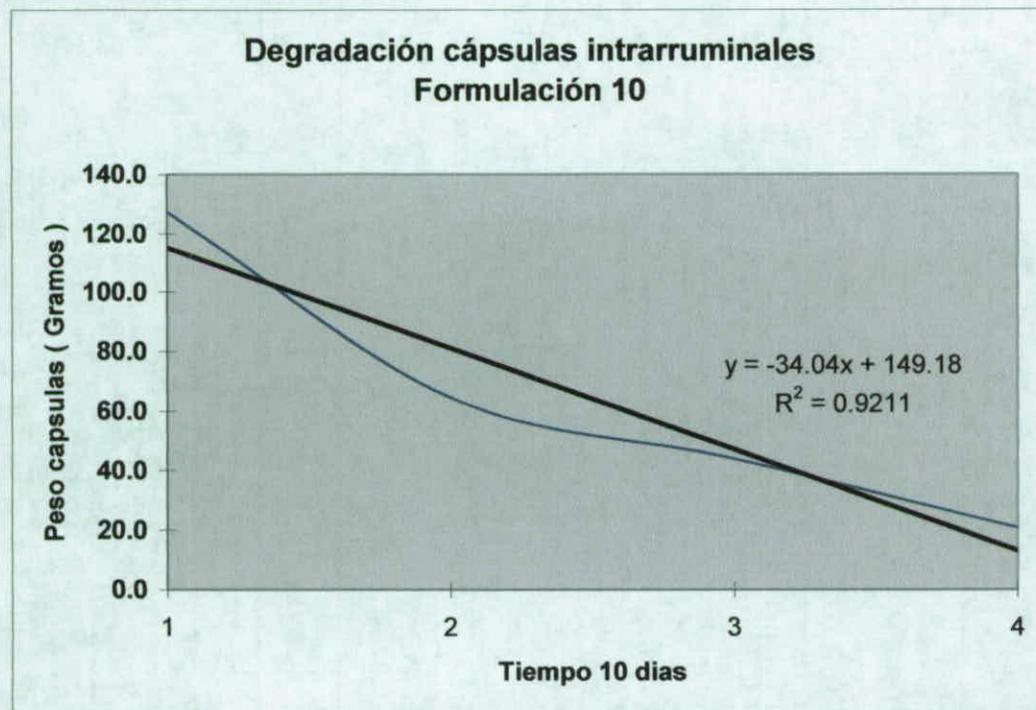
En el cuadro N°12 se observa la tasa de degradación de la formulación F10. Esta cápsula presenta un nivel de degradación aún acelerado, que tiene posibilidades de uso para los objetivos del proyecto.

Cuadro N°12

<b>Degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Peso grs.</b>				
<b>Formulación F10</b>				
<b>Fecha/evaluación</b>	<b>02/02/2008</b>	<b>06/02/2008</b>	<b>10/02/2008</b>	<b>14/02/2008</b>
<b>Cápsula</b>	<b>grs.</b>	<b>grs.</b>	<b>grs.</b>	<b>grs.</b>
<b>A</b>	124	62	49	13.4
<b>B</b>	132	69.2	49.9	19.3
<b>C</b>	126	62.1	32.6	29.5
<b>Pesos totales grs.</b>	<b>127.3±1.2</b>	<b>64.4±0.1</b>	<b>43.8±9.5</b>	<b>20.7±9.3</b>

En el grafico siguiente se observa la tasa de degradación de las cápsulas con la formulación F10.

Gráfico N°11

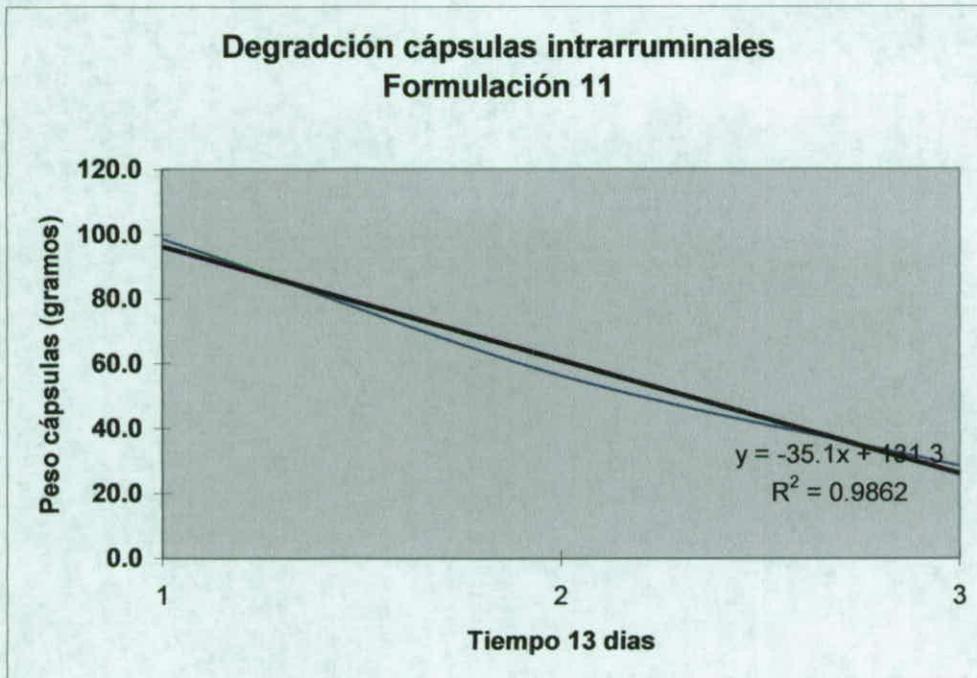


En el cuadro N°13 se observa la tasa de degradación de la formulación F11. Esta cápsula se ha modificado respecto de la anterior, pero solo se aumentó levemente la resistencia al efecto de la digestión ruminal, al modificar los componentes de la formulación como se precia en el cuadro respectivo.

CuadroN°13

<b>Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F11</b>			
<b>Fecha/evaluación</b>	<b>12/03/2008</b>	<b>19/03/2008</b>	<b>25/03/2008</b>
<b>Cápsula</b>	grs.	grs.	grs.
<b>A</b>	96.4	54.4	29.6
<b>B</b>	99.2	57.3	27.8
<b>C</b>	<b>100.2</b>	<b>57.2</b>	<b>27.8</b>
<b>Pesos totales</b>	<b>98.6±2.2</b>	<b>56.3±1.6</b>	<b>28.4±1.0</b>

Gráfico N°12



### Fase III

Cuadro N° 14

<b>Composición porcentual de las formulaciones utilizadas en la estructuración de los dispositivos intrarruminales de digestión lenta ( Fase III) Evaluación con Neem.</b>							
<b>Componente</b>	<b>Formulación (%)</b>						
	<b>F12</b>	<b>F13</b>	<b>F14</b>	<b>F15</b>	<b>F16</b>	<b>F17</b>	<b>F18</b>
<b>Gelucire 50/02</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>26</b>	<b>23</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>13.5</b>
<b>Compritol 888</b>	<b>18.2</b>	<b>19</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>31.3</b>
<b>PEG 6000</b>	<b>1.6</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>2</b>	<b>0</b>
<b>Hierro</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>55.2</b>

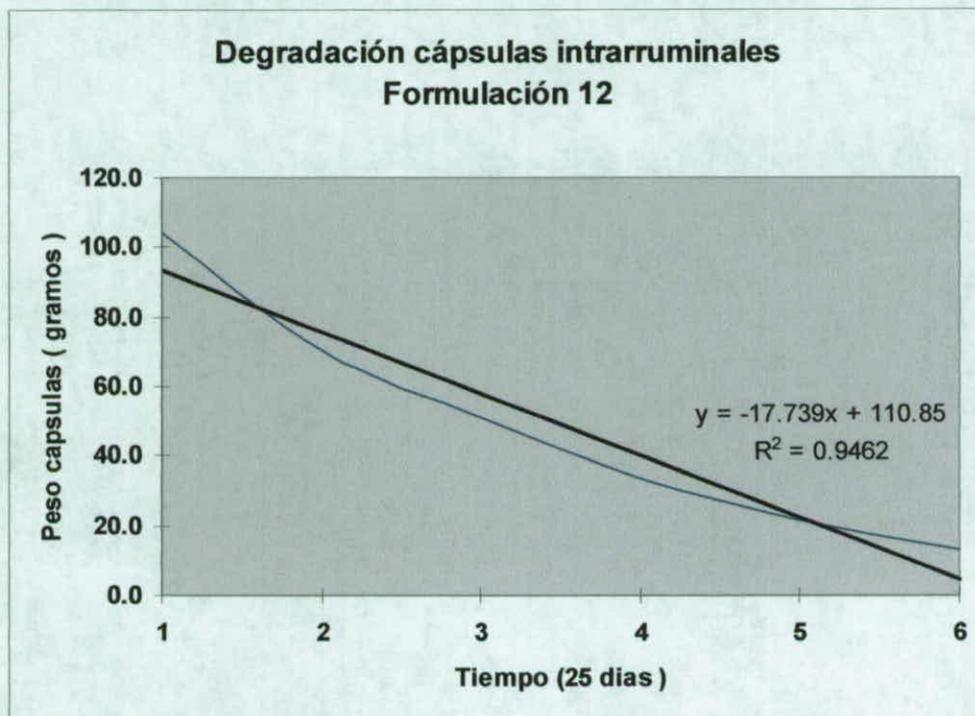
En el cuadro N° 15 se observa la tasa de degradación de la formulación F12. Esta cápsula presenta un incremento ostensible respecto de la anterior resistiendo hasta 25 días de la actividad ruminal, se ha modificado respecto de la serie anterior de formulaciones en su porcentaje de gelucire, se retiró el alcohol estearílico, se rebajo el porcentaje de compritol y se redujo el PEG 6000



Cuadro N°15

<b>Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta.</b>						
<b>Dispositivo F12</b>						
<b>Fecha/evaluación</b>	<b>05/04/08</b>	<b>11/04/08</b>	<b>19/04/08</b>	<b>26/04/08</b>	<b>03/05/08</b>	<b>10/05/08</b>
<b>Cápsula</b>	<b>grs.</b>	<b>grs.</b>	<b>grs.</b>	<b>grs.</b>	<b>grs.</b>	<b>grs.</b>
<b>A</b>	102.4	71	53.9	32.3	26.8	12.2
<b>B</b>	108.4	67.2	49.1	32.5	21.2	15.1
<b>C</b>	101.9	72.2	49.3	35	16.2	11.1
<b>Pesos totales</b>	<b>104.2±0.3</b>	<b>70.1±0.7</b>	<b>50.8±2.7</b>	<b>33.3±1.6</b>	<b>21.4±6.1</b>	<b>12.8±0.6</b>

Gráfico N° 13



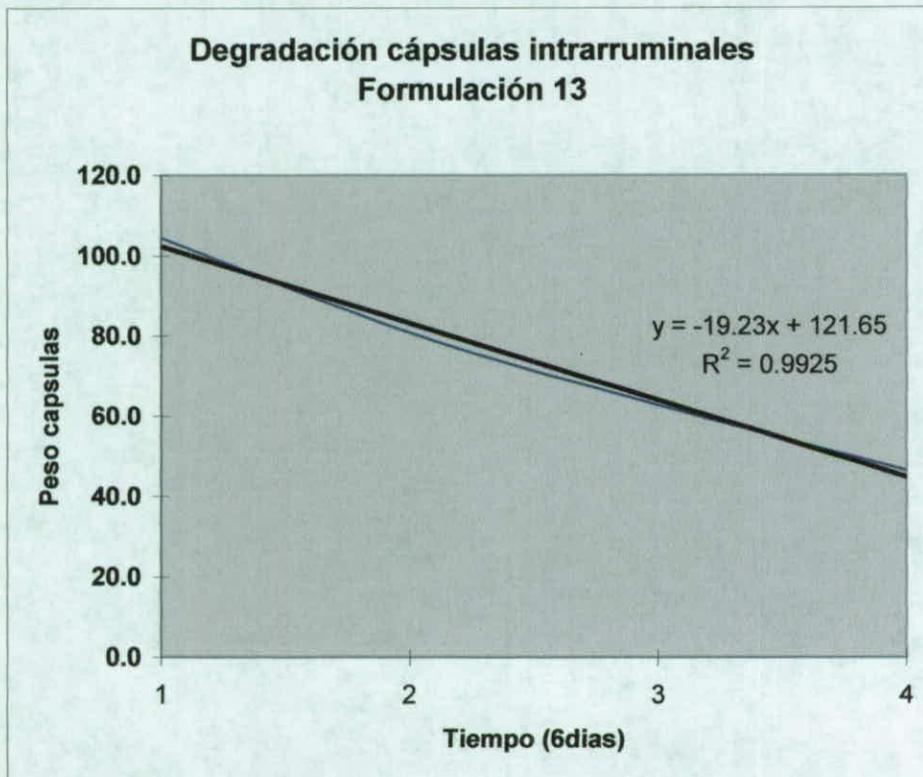
En el gráfico anterior se aprecia la evolución de la formulación F12, destacándose la mayor duración de este formulado, aun sin cumplir con las necesidades del proyecto.

En el cuadro N°16 se observa la tasa de degradación de la formulación F13. Esta cápsula presenta una reducción notable respecto de la anterior resistiendo solamente 4 días la actividad ruminal, se ha modificado respecto de la serie anterior de formulaciones principalmente en su porcentaje de PEG 6000 que aumenta su hidrofiliicidad. Se debe destacar que pequeñas modificaciones de la proporción de los compuestos hidrofílicos desencadenan una gran reducción de la resistencia a la acción de los mecanismos ruminales de digestión.

Cuadro N°16

Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F13				
Fecha/evaluación	10/05/2008	12/05/2008	14/05/2008	16/05/2008
<b>Cápsula</b>	grs.	grs.	grs.	grs.
<b>A</b>	105.2	82.1	61	48.2
<b>B</b>	104.2	80.6	62.2	43.9
<b>C</b>	103.9	79.7	64.9	47
<b>Pesos totales</b>	104.4±0.8	80.8±1.4	62.7±2.3	46.4±0.7

Gráfico N°14



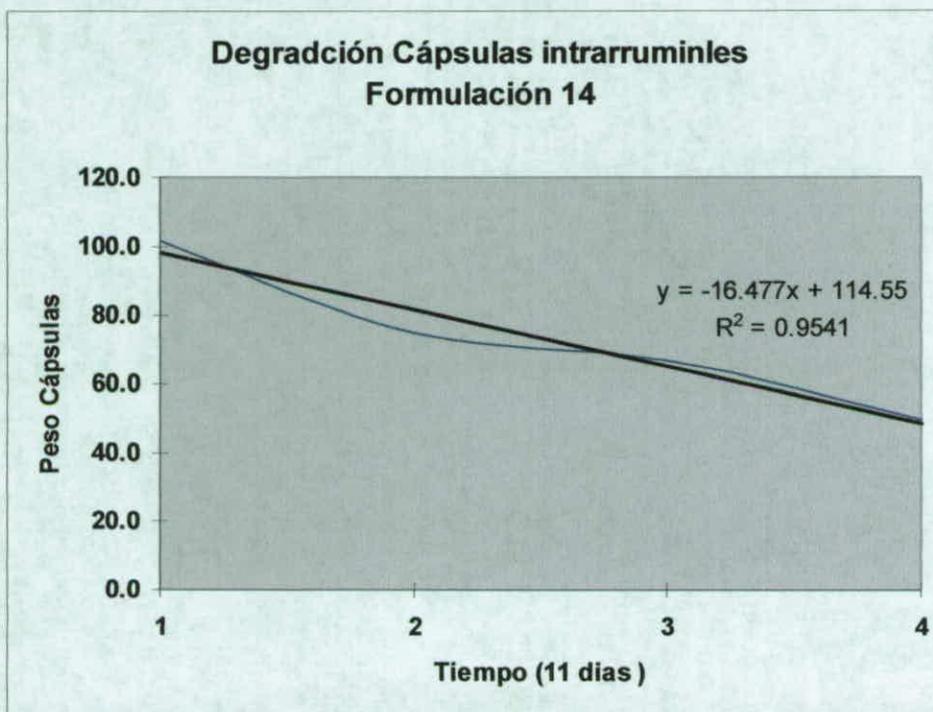
En el gráfico anterior se aprecia la evolución de la cápsula F13 a nivel ruminal, aumento su tasa de degradación reduciendo su tiempo de resistencia a la actividad ruminal.

En el cuadro N°17 se observa la tasa de degradación de la formulación F14. Esta cápsula presenta un leve incremento de la durabilidad a nivel ruminal, alcanzando 11 días con una alta tasa de liberación diaria, que la inhabilita en función de los objetivos que se buscan en el proyecto. Este cambio se produce luego de reducir el porcentaje de Gelucire e incrementar levemente el aporte de Compitrol y de reducción del PEG 6000. Nuevamente comprobamos que pequeñas modificaciones de la proporción de los componentes hidrofílicos y/o hidrofóbicos generan cambios de la resistencia a acción de los mecanismos ruminales de digestión.

Cuadro N° 17

Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F14				
Fecha/evaluación	30/05/2008	03/06/2008	06/06/2008	11/06/2008
Cápsula	grs.	grs.	grs.	grs.
A	101.5	76	68.3	58
B	101.5	73.9	65.3	45
C	102.9	74.6	67.3	46
<b>Pesos totales</b>	<b>102.0±0.8</b>	<b>74.8±0.8</b>	<b>67.0±0.6</b>	<b>49.7±6.9</b>

Gráfico N°15



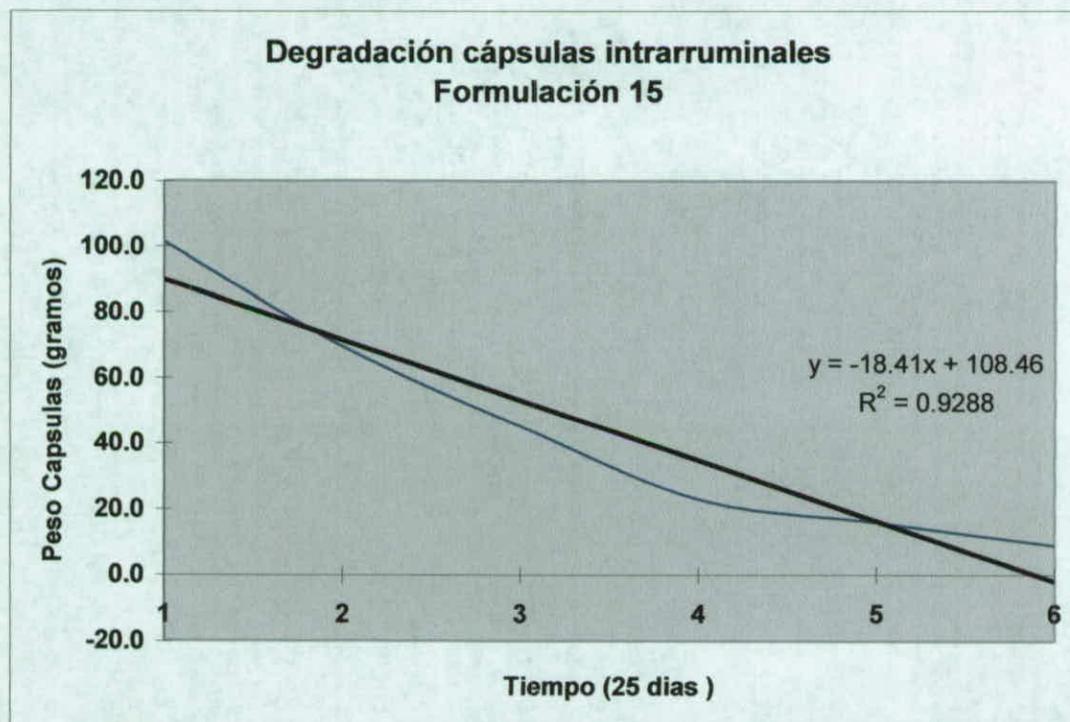
En el gráfico anterior se aprecia la evolución de la cápsula F14 a nivel ruminal, disminuyó su tasa de degradación reduciendo su tiempo de resistencia a la actividad ruminal.

En el cuadro N°18 se presentan los niveles de pérdida de peso de la formulación F15. Esta cápsula presenta un notable incremento de la durabilidad a nivel ruminal, respecto de la fórmula anterior, alcanzando 25 días de liberación, que la acerca a los objetivos propuestos en la investigación. Este cambio se produce luego de reducir el porcentaje de Gelucire e incrementar nuevamente el aporte de Compitrol, conservando el nivel de PEG 6000

Cuadro N°18

Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F15						
Fecha/evaluación	11/06/08	12/06/08	14/06/08	20/06/08	25/06/08	05/07/08
Cápsula	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.
A	101.9	68.3	38.8	24	15	13.2
B	100	75.9	50.3	18	11.1	8.3
C	101.9	64.7	46.6	27	22	5.5
<b>Pesos totales</b>	<b>101.3±0.0</b>	<b>69.6±2.1</b>	<b>45.2±4.5</b>	<b>23.0±1.7</b>	<b>16.0±4.0</b>	<b>9.0±4.4</b>

Gráfico N° 16



En el gráfico anterior se aprecia la evolución de la pérdida de peso del dispositivo F15. Aunque mejora el comportamiento del dispositivo es insuficiente su aporte.

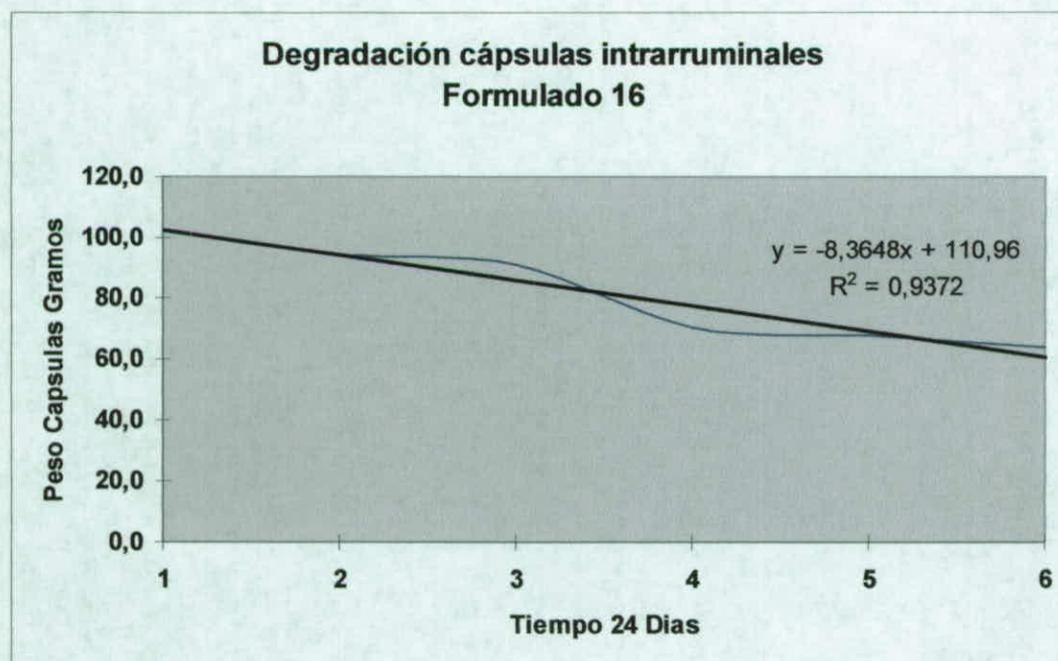
En el cuadro N°19 se presentan los niveles de pérdida de peso de la formulación F16. Esta cápsula presenta un notable incremento de la durabilidad a nivel ruminal,

respecto de la formula anterior alcanzando 24 días de liberación, perdiendo solamente menos de la mitad de su contenido, lo que la aproxima a los objetivos que propuestos en la investigación. Este cambio se produce luego de reducir el porcentaje de Gelucire e incrementar nuevamente el aporte de Compitrol, eliminando el PEG 6000 de la mezcla. Esta cápsula no se continuó evaluando en esta etapa por cuanto se extravió, el animal la regurgitó, dado su comportamiento se fabricó nuevamente para su posterior evaluación.

Cuadro N° 19

Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F16						
Fecha/evaluación	18/07/08	21/07/08	24/07/08	18/08/08	21/08/08	25/07/08
Cápsula	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.
A	102.8	95.3	91.1	68.4	65.5	62.1
B	101.5	95.8	90.5	71.7	69.3	64.8
C	104.2	91	90.5	71.7	69.3	64.8
<b>Pesos totales</b>	<b>102.8±0.8</b>	<b>94.0±2.5</b>	<b>90.7±0.3</b>	<b>70.6±1.9</b>	<b>68.0±2.2</b>	<b>63.9±1.6</b>

Gráfico N°17



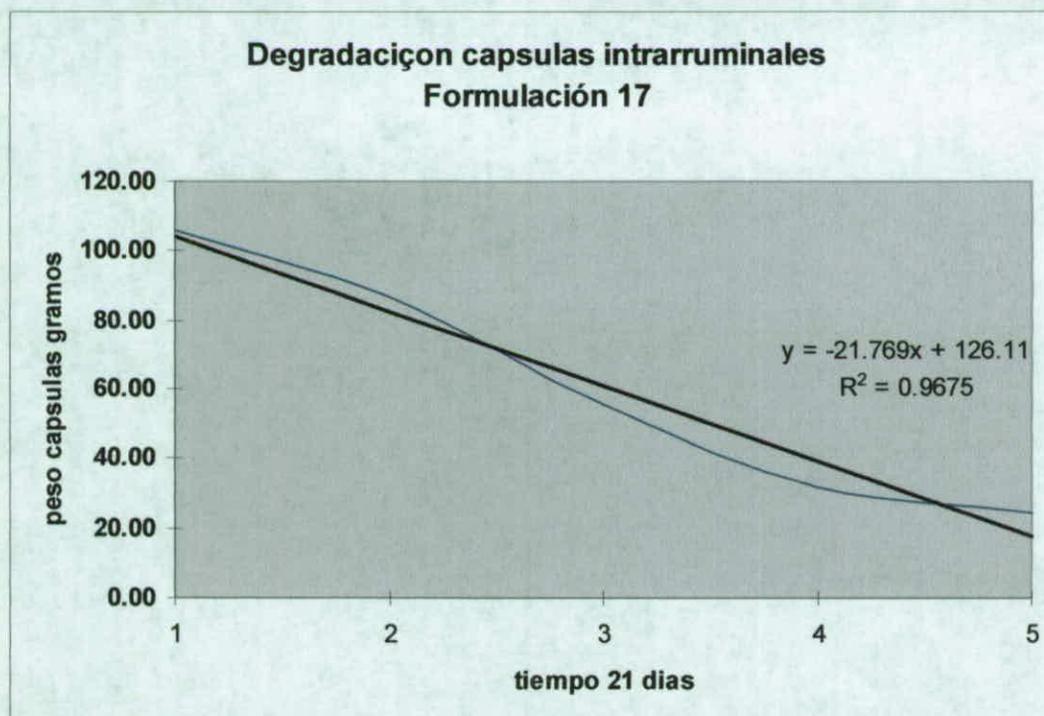
En el grafico N° 17 se entrega a evaluación grafica el comportamiento de la formulación F16

En el cuadro siguiente se presentan los niveles de pérdida de peso de la formulación F17. Esta cápsula presenta un aumento en la tasa de pérdida de peso, por lo tanto llega a los 21 días con mucho menos peso que la capsula anterior lo que determina que se aleja de los objetivos de la investigación, lo que ocurre luego de bajar el porcentaje de gelucire e incrementar el PEG.6000.

Cuadro N° 20

Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F17					
Fecha/evaluación	28/07/2008	01/08/2008	07/08/2008	13/08/2008	18/08/2008
Cápsula	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.
A	108.3	87.25	50.7	43.1	27.2
B	102	88.76	56.8	34.8	19.4
C	107	84.56	58.2	17	27
<b>Pesos totales</b>	<b>105.77±0.8</b>	<b>86.86±1.6</b>	<b>55.23±4.3</b>	<b>31.63±15.1</b>	<b>24.53±0.1</b>

Gráfico N° 18



En el gráfico anterior se aprecia el cambio de pendiente del proceso de cambio de peso del dispositivo F17.

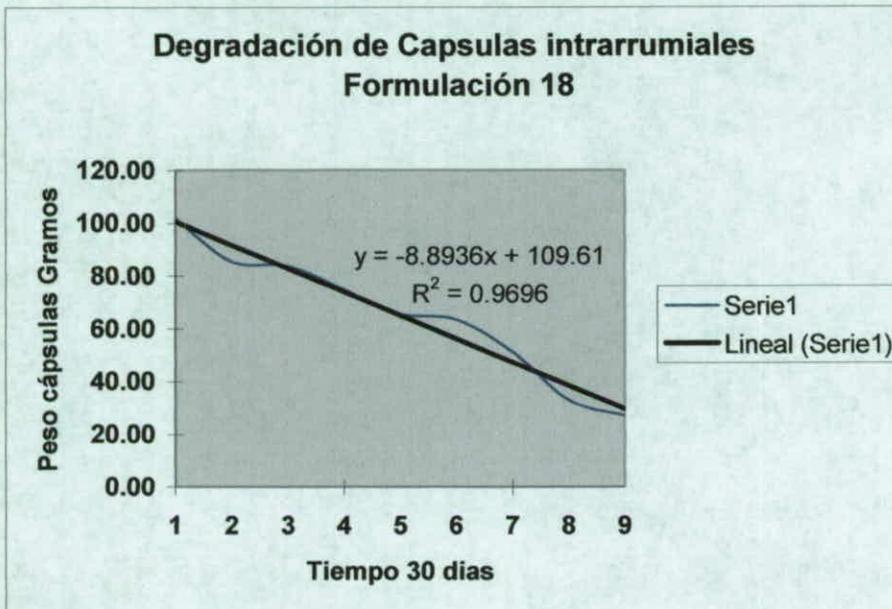
En el cuadro N° 21 se presentan los niveles de pérdida de peso de la formulación F18. Esta cápsula presenta un aumento en la tasa de pérdida de peso, por lo tanto llega a los 30 días con menos peso que la capsula anterior lo que determina que se acerca a los objetivos de la investigación, que ocurre luego de reducir porcentaje de gelucire y compritol, incrementar el hierro metálico en polvo, eliminando el PEG.6000. (ver cuadro 14)

Cuadro N° 21

<b>Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F18</b>									
<b>Fecha/eval</b>	25/08/08	26/08/08	29/08/08	02/08/08	06/09/08	10/09/08	14/09/08	17/09/08	24/09/08
<b>Cápsula</b>	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.
<b>A</b>	100.2	87.6	82.6	71.1	66.8	64.8	64	34.1	32.8
<b>B</b>	102.8	82.6	82.6	77.1	69.5	62.1	50.5	31.7	10.6
<b>C</b>	102.8	86.2	86.2	76.1	60.5	0	39.6	32.9	10.6
<b>P. totales</b>	101.93±1.5	85.47±0.8	83.80±2.1	74.77±2.9	65.60±3.6	63.45±37.4	51.37±14.1	32.90±0.7	27.00±12.8

En el próximo gráfico N° 19 se puede ver el comportamiento en términos de pérdida de peso de la formulación F18.

Gráfico N°19



En el cuadro N° 22 y N°23 se presenta el comportamiento final de la pérdida de peso de la formulación F16. Esta cápsula es la que presentó la menor degradabilidad a nivel ruminal. Este cambio se produce luego de reducir el porcentaje de Gelucire e incrementar el aporte de Compitrol, eliminando el PEG 6000 de la mezcla. Los dos primeros se incorporaron en un 15 y 35% respectivamente, manteniéndose el hierro en polvo de manera constante en un 50% en todas las formulaciones.

Esta cápsula presentó una durabilidad de 70 días.

Cuadro N° 22

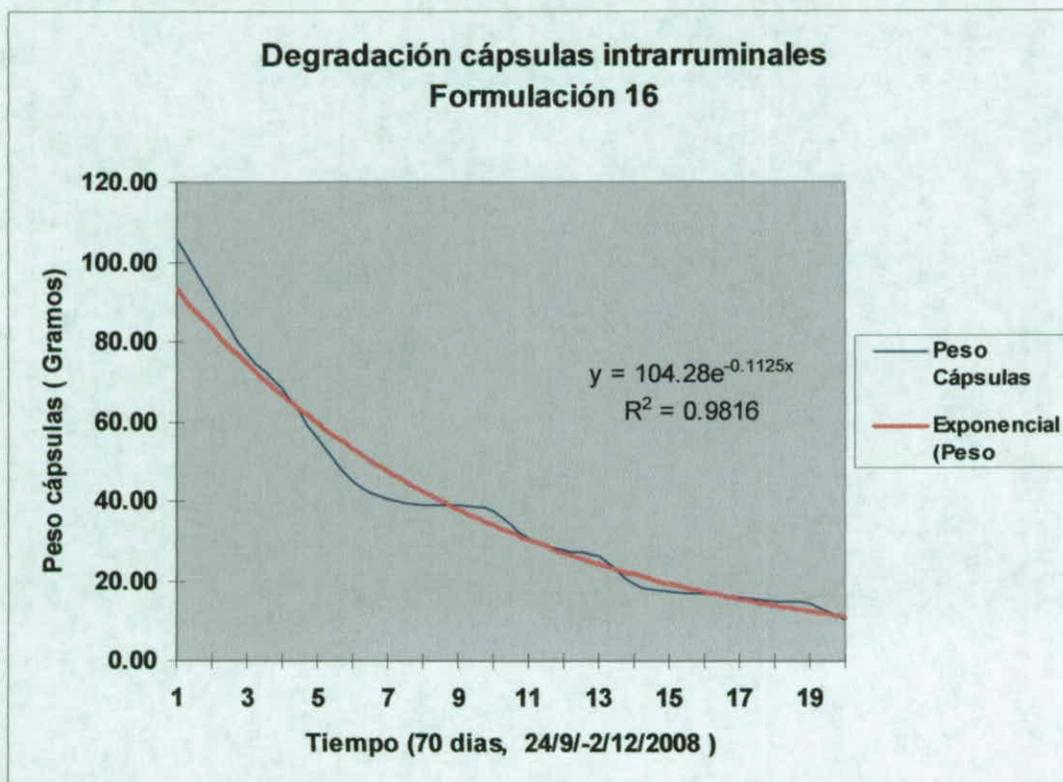
<b>Dispositivo Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. F16</b>										
<b>Fecha/eval</b>	24.09.08	29.09.08	03.10.08	07.10.08	10.10.08	14.10.08	17.10.08	21.10.08	24.10.08	28.10.08
<b>Cápsula</b>	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.
<b>A</b>	105.8	90.4	81.3	72.2	54.4	48.9	37.5	36	36	35.6
<b>B</b>	104.2	90.8	81.7	72	47.5	44.5	44.2	41.9	40.2	41.7
<b>C</b>	107.2	91.7	68.5	60	65.9	41.8	39.8	41.2	40.7	35.1
<b>P. totales</b>	105.73±0.8	90.97±0.8	77.17±7.4	68.07±7.0	55.93±6.6	45.07±4.1	40.50±1.3	39.13±3.0	38.97±2.7	37.47±0.3

Cuadro N°23

<b>Tasa de degradación de dispositivos intrarruminales de degradación lenta. Dispositivo F16</b>										
<b>Fecha/eval</b>	31.10.08	04.11.08	07.11.08	11.11.08	14.11.08	18.11.08	22.11.08	23.11.08	28.11.08	02.12.08
<b>Cápsula</b>	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.
<b>A</b>	26.9	38.9	38.8	28.2	24	23.3	22.1	10.1	19.5	15.5
<b>B</b>	24.3	24.1	19.7	14.6	15	15	15	20.5	13.5	7
<b>C</b>	40.6	20.3	19.8	15.1	13	11.4	10.7	13.6	9.4	9
<b>P. totales</b>	30.60±7.9	27.77±10.7	26.10±11.0	19.30±7.6	17.33±6.4	16.57±6.9	15.93±6.6	14.73±2.0	14.13±5.8	10.50±3.8

En el gráfico siguiente se observa el comportamiento a nivel ruminal, en términos de pérdida de peso del dispositivo F16

Gráfico N°20



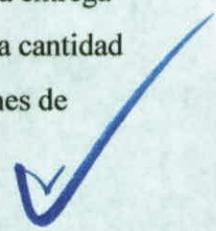
Esta cápsula tiene una pérdida de peso que permite un aporte de azadirachtin durante un periodo de 70 días sometida a la actividad intrarruminal..

En el cuadro siguiente se indican los valores estimados de pérdida diaria de peso del dispositivo y aportes de azadirachtin considerando una capsula con un peso de 105.73±08 conteniendo 12 gramos de extracto botánico de Neem con un 17% de azadirachtin.

Cuadro N° 24

<b>Perdida de peso y aportes de azadirachtin de dispositivo intrarruminal                      formulación F16. con una durabilidad de 70 días.                      Aporte considerado 0.04 mgs./kg.pv</b>				
<b>Peso Cápsulas</b>	<b>Perdida diaria de peso</b>	<b>Gramos Extracto Neem</b>	<b>Mgs. Azadirachtin</b>	<b>Demanda Diaria Mínima</b>
105.73	2.95	0.34	58.24	24
90.97	3.45	0.40	68.03	24
77.17	2.28	0.26	44.86	24
68.07	3.03	0.35	59.82	24
55.93	3.62	0.42	71.43	24
45.07	1.14	0.13	22.51	24
40.50	0.46	0.05	9.01	24
39.13	0.04	0.00	0.81	24
38.97	0.50	0.06	9.86	24
37.47	1.72	0.20	33.85	24
30.60	0.94	0.11	18.62	24
27.77	0.42	0.05	8.22	24
26.10	2.27	0.26	44.70	24
19.30	0.49	0.06	9.70	24
17.33	0.26	0.03	5.04	24
16.57	0.16	0.02	3.12	24
15.93	0.30	0.03	5.92	24
14.73	0.20	0.02	3.94	24
14.13	0.91	0.11	17.91	24
10.50				
Aporte promedio /dia mgs.				<b>26</b>

Se debe resaltar que si bien las cápsulas como tal, pierden diariamente una cantidad de gramos de su estructura, este material en pequeñas partículas se mantiene en una proporción en el piso del retículo rumen, estabilizando durante todo el periodo la entrega del principio activo, lo que explica que a pesar que en determinados momentos la cantidad entregada del material es pequeña aun se mantenga el efecto sobre las poblaciones de *H.irritans*.



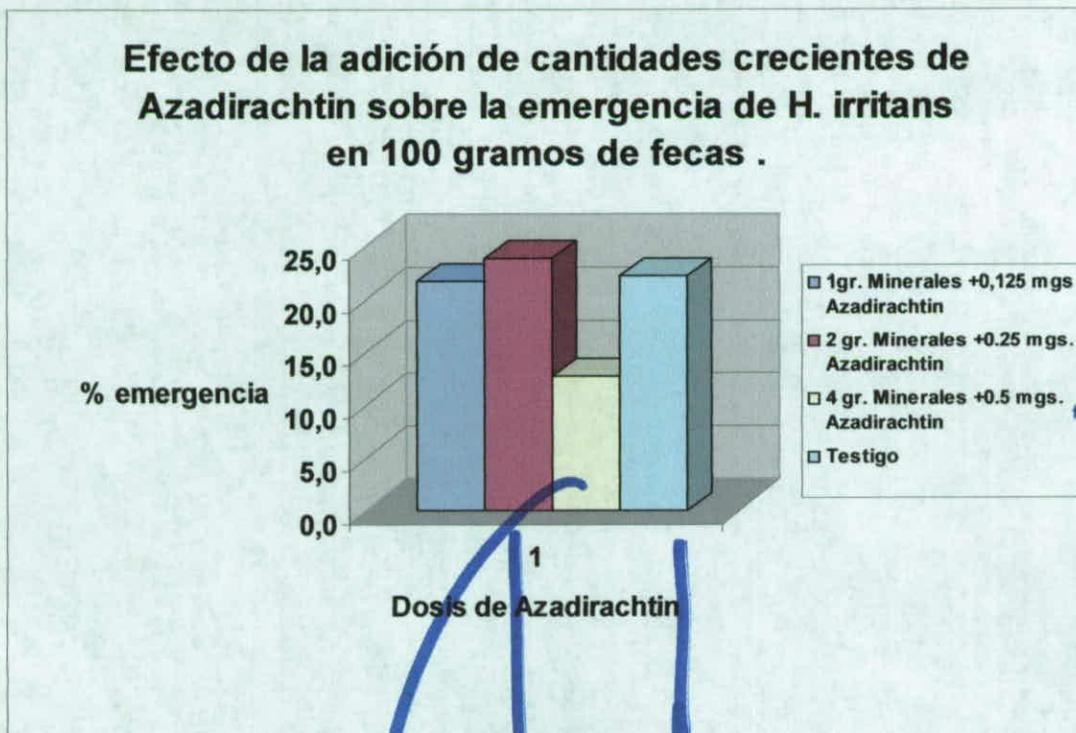
6) Establecer in vivo el comportamiento y la aparición a nivel fecal de Azadirachtin incorporado en bolos de uso intrarruminal, a través del efecto sobre larvas de díptero *H.irritans*.

6.0) Diseño y evaluación a nivel de campo de tres diferentes dosis de Azadirachtin, de mayor eficiencia en el control de *H.irritans*, incorporadas en bloques minerales para obtener poblaciones de *H. irritans* en niveles tolerables para los bovinos

La primera etapa de este ensayo se desarrollo con bloques minerales, a los que se les incorporó dosis diferentes de azadirachtin, evaluando su aparición a nivel fecal y control sobre los estados juveniles del insecto

6.0.1) Evaluación in vitro del efecto de Azadirachtin incorporado en bloques minerales, sobre la emergencia de adultos de *H. irritans*

Gráfico N° 21



en 100g

✓

Para determinar el efecto directo del compuesto azadirachtin incorporado en bloques minerales sobre la emergencia de adultos del insecto, se pusieron en contacto huevos de la mosca *H. irritans*, con una mezcla mineral proveniente de los bloques, con tres niveles de Azadirachtin, 0,125 mgs; 0,25 mgs, 0,5 mgs y testigo sin la mezcla. En el gráfico N°21 se observa el porcentaje de emergencia del insecto bajo tres dosis de azadirachtin, apreciándose la tendencia general del efecto del extracto de Neem sobre la emergencia del insecto hematófago

**6.0.2) Evaluación in vitro, del efecto de las diferentes dosis de Azadirachtin incorporadas en bloques minerales, sobre los estados juveniles de *H. irritans* a nivel fecal en animales en pastoreo-**

Cuadro N° 25

<b>Estimación del consumo real, medio de Bloques minerales y Azadirachtin de bovinos en pastoreo.</b>				
	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo D</b>	<b>Grupo T</b>
<b>Kilogramos de mezcla consumidos</b>	100	100	90	0
<b>N° de Bloques Kg.</b>	10	10	9	0
<b>Consumo medio por grupo</b>	3,3	3,3	3,0	0
<b>Consumo minerales por animal adulto. Kg.</b>	0,220	0,220	0,200	0
<b>Consumo Medio minerales terneros. Kg.,</b>	0,100	0,100	0,100	0
<b>Consumo Medio Azadirachtin adultos. mgs.</b>	27.5	55	200	0

En el cuadro anterior se entregan los valores estimados de consumo de bloques minerales en el sistema de producción bovina en pastoreo, apreciándose que son mayores a los valores teóricos que se determinaron para esta etapa del trabajo, por lo tanto el consumo de Azadirachtin para el periodo es también mayor.

Se debe destacar por otra parte que la distribución de la ingesta a través del tiempo fue irregular a causa de una estructura inadecuada de los bloques que determino una menor

resistencia y por lo tanto mayor competencia e ingesta de una parte de los animales en desmedro de otra que no logra competir.

En el cuadro N°26, se aprecia el efecto de Azadirachtin sobre *H.irritans* administrado en un ensayo de campo bajo cuatro concentraciones. Se aprecia que a partir de la segunda semana de aplicación del extracto, es posible evidenciar una diferencia en la emergencia de los insectos adultos desde las fecas de animales tratados con bloques minerales conteniendo Azadirachtin, esa diferencia se hace máxima durante la cuarta semana de consumo de azadirachtin desde los bloques.

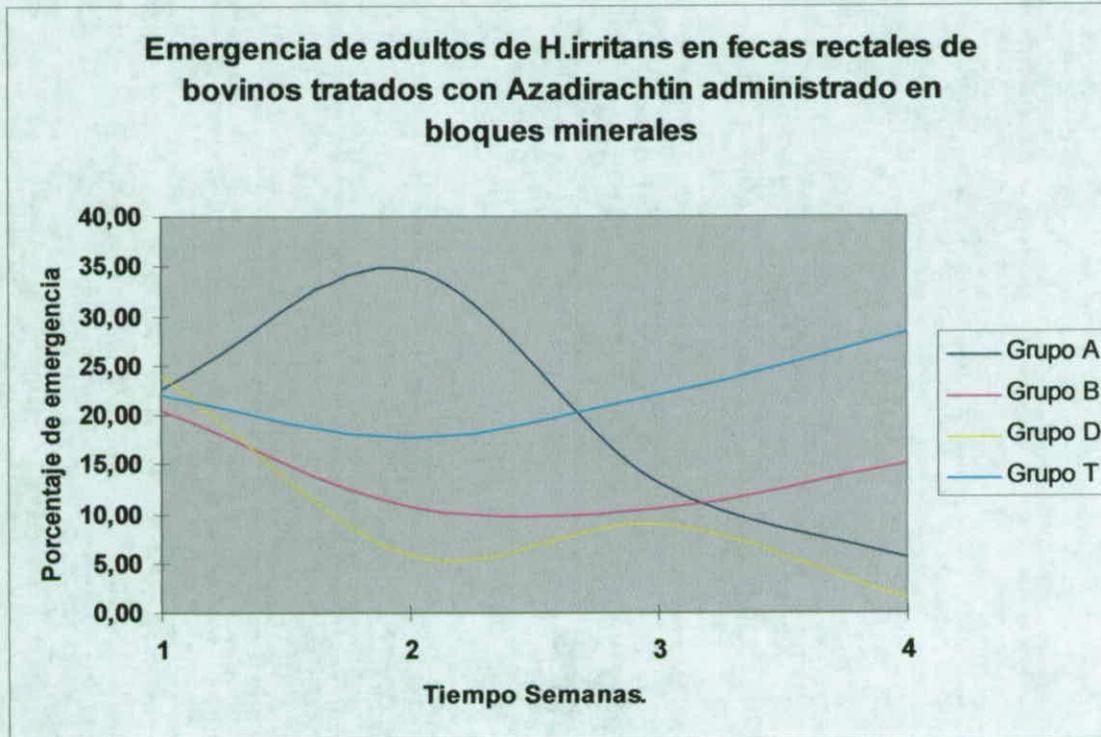
Se estableció una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0.05$ , entre el nivel más alto de aplicación y los otros tratamientos, en particular del grupo testigo que no recibió el extracto.

Cuadro N°26

<b>Efecto de Azadirachtin, entregado en bloques minerales sobre la emergencia de <i>H. Irritans</i> en 100 gr. Fecas bovinas inoculadas con 100 huevos fértiles. (N° de adultos y % de emergencia)</b>				
	<b>GRUPO 1 A</b>	<b>GRUPO 3 B</b>	<b>GRUPO 4 D</b>	<b>GRUPO 2 T</b>
<b>I Semana</b>	22.67±6.8	20.33±9.8	24.00±7.8	22.00±3.6
<b>II Semana</b>	34.67±16.26	10.78±0.86	5.83±1.61	17.56±4.10
<b>III Semana</b>	13.00±5.56	10.50±5.56	8.83±5.56	22.00±5.56a
<b>IV Semana</b>	5.2±3.80c	14.98±11.23c	1.33±1.02a	28.39±7.91b

**Test de Duncan  $P < 0.05$**

Gráfico N° 22



En la figura anterior se grafica la evolución de la emergencia de adultos de *H. irritans* desde fecas de animales tratados con azadirachtin. En este gráfico se aprecia la reducción consistente de la emergencia de los dípteros hematófagos en los animales que consumieron la dosis más alta del extracto botánico, complementariamente con ello, también se observa la mayor emergencia de insectos desde las fecas de los animales del grupo testigo (T), que no recibieron Azadirachtin. Se deduce de estos datos, que la dosis de mayor efectividad que debe ser validada es la utilizada con el grupo D o superior a esta.

**6.0.3) Evaluación a nivel de campo del efecto de diferentes dosis de Azadirachtin incorporadas en bloques minerales, mediante la colecta de fecas retiradas de la pradera y contaminadas naturalmente por *H. irritans*.**

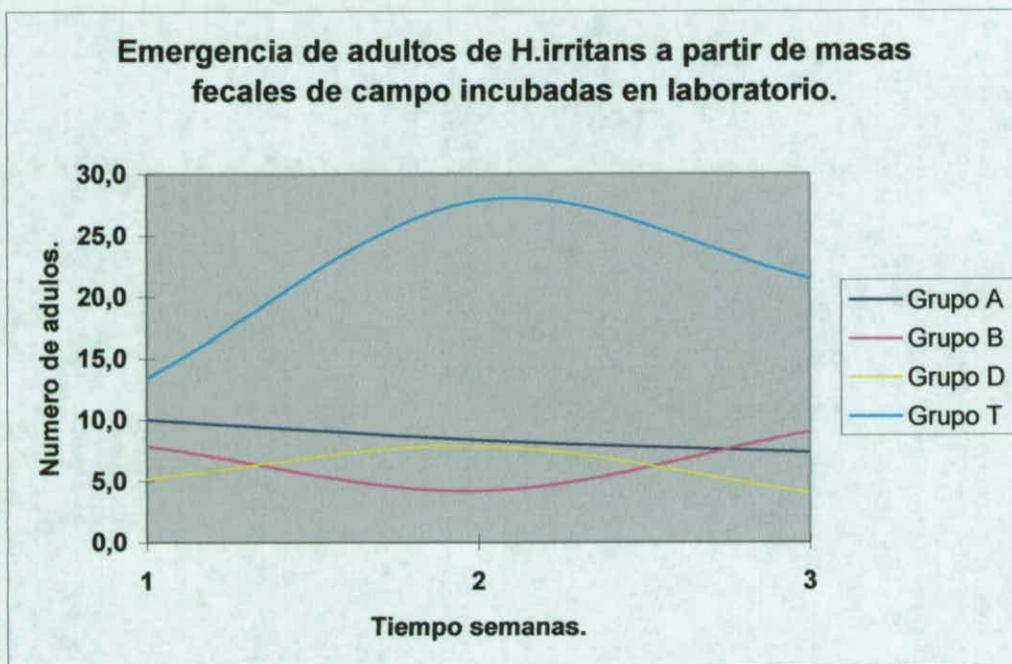
En el cuadro N°27 se observa el número de adultos de *H.irritans* que emergen a partir de masas fecales colectadas en el campo en los diferentes potreros de experimentación. Se observa que el mayor nivel de Azadirachtin presenta el menor número de insectos emergentes y que el testigo, sin tratamiento presenta 5 veces mas individuos adultos de *H. irritans* de cada masa fecal evaluada.

Cuadro N° 27

<b>Emergencia de adultos de <i>H.irritans</i> a partir de masas fecales de campo, de animales tratados con Azadirachtin en tres dosis, administrados en bloques minerales.</b>				
	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>	<b>Grupo D</b>	<b>Grupo T</b>
<b>II Semana</b>	<b>10.0</b>	<b>7.8</b>	<b>5.2</b>	<b>13.3</b>
<b>III Semana</b>	<b>8.33</b>	<b>4.17</b>	<b>7.83</b>	<b>27.83</b>
<b>IV Semana</b>	<b>7.33</b>	<b>9.00</b>	<b>4.00</b>	<b>21.50</b>

En el Gráfico siguiente se observan las tendencias en términos del control que produce el extracto de Neem a nivel de las masas fecales en el campo.

Gráfico N°23



**6.0.4) Evaluación periódica de la ganancia de peso de los animales bajo consumo de bloques con diferentes dosis de Azadirachtin**

Cuadro N°28

<b>Peso inicial y final de 4 grupos de bovinos hembras mestizo Angus/ belgian Blue tratados con Azadirachtin en bloques minerales.</b>				
	<b>GRUPO 1 A</b>	<b>GRUPO 2 T</b>	<b>GRUPO 3 B</b>	<b>GRUPO 4 D</b>
	<b>PESO KG.</b>	<b>PESO KG.</b>	<b>PESO KG.</b>	<b>PESO KG.</b>
<b>Peso inicial</b>	<b>497</b>	<b>501</b>	<b>518</b>	<b>530</b>
<b>Peso final</b>	<b>502</b>	<b>431</b>	<b>441</b>	<b>501</b>
<b>Cambio de peso</b>	<b>+5Kg</b>	<b>-70Kg</b>	<b>-77</b>	<b>+29Kg</b>

En el cuadro N°28 se aprecia cambio de peso en los 4 grupos de animales tratados (incluyendo el testigo), estas variaciones se explican principalmente por la producción láctea de las vacas empleadas en el ensayo y por la evolución de la pradera en esta época del año en que se implementó el trabajo. A pesar de que el grupo D que recibió mayor dosis de azadirachtin presenta una baja de peso menor, respecto de los otros grupos no se puede establecer que relación existe entre este cambio y el tratamiento.

**6.0.5) Recuento semanal del número de ejemplares adultos de *H. irritans* posados sobre los animales bajo consumo de diferentes dosis de Azadirachtin en bloques minerales.**

Cuadro N° 29

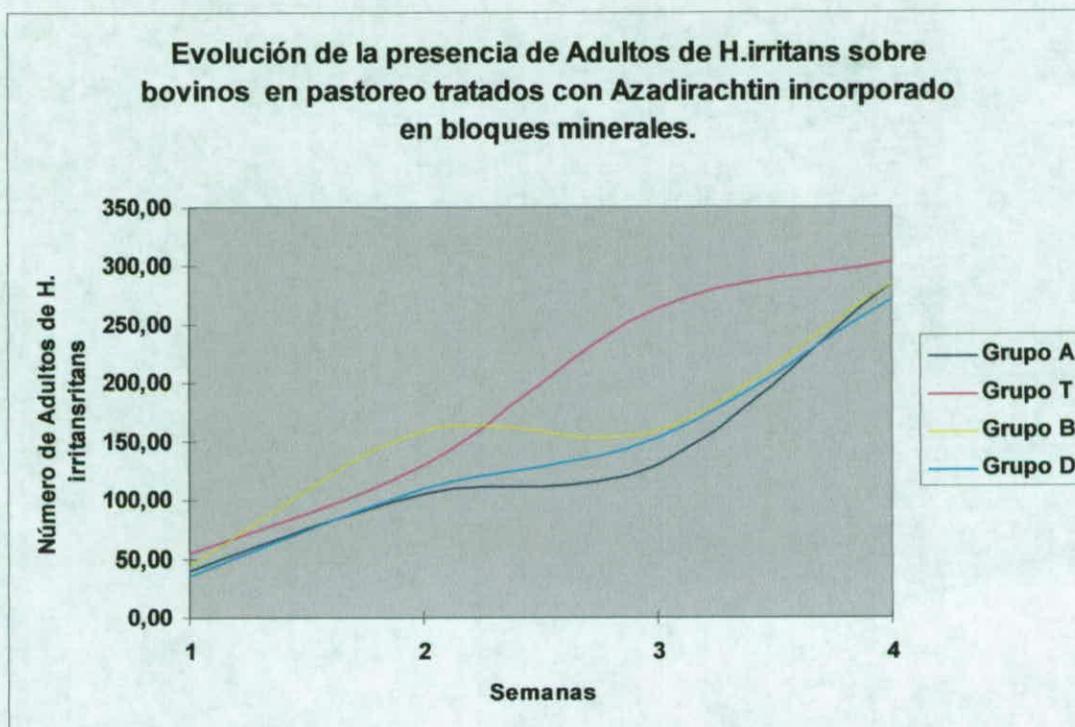
<b>Efecto de Azadirachtin, entregado en bloques minerales sobre la población de individuos adultos de <i>H. irritans</i> presentes sobre la zona dorso escapular de animales en pastoreo.</b>			
<b>GRUPO 1 A</b>	<b>GRUPO 2 T</b>	<b>GRUPO 3 B</b>	<b>GRUPO 4 D</b>
<b>40.80</b>	<b>53.60</b>	<b>43.88</b>	<b>35.89</b>
<b>105.00</b>	<b>130.14</b>	<b>159.43</b>	<b>109.00</b>
<b>129.11</b>	<b>263.89</b>	<b>158.43</b>	<b>152.29</b>
<b>285.11</b>	<b>303.71</b>	<b>286.00</b>	<b>270.67</b>

En el cuadro N°29 se aprecia el recuento de insectos adultos sobre animales en pastoreo, éste excede los niveles aceptables como inocuos para bovinos, a pesar de que en la evaluación fecal se produce una reducción de la emergencia de insectos, esta situación se debe a dos causas; a) consumo irregular de los animales y b) La estructura de los bloques, esta no fue la adecuada, de manera de adquirir la dureza que permite un consumo estable a lo largo del tiempo y que homogeniza el consumo del rebaño. Cuando los dispositivos presentan menor dureza los animales compiten por el sustrato de manera permanente ya que el bloque tiene alta palatabilidad, esta situación se combina con otra condición, la época en que se hizo el ensayo en que decae la condición de la pradera, situación que también contribuye a esta mayor competencia.

La menor dureza de los bloques se debió a dos situaciones: 1) el cambio de la tecnología industrial para el desarrollo y compactación de los bloques minerales y

2) periodo de almacenamiento de los dispositivos, la cual es directamente proporcional a la compactación de los dispositivos.

Gráfico N° 24



En el gráfico anterior se aprecia la evolución de la carga de insectos hematófagos sobre bovinos en pastoreo tratados con Azadirachtin administrado en bloques minerales. En este gráfico se observa que a nivel de campo y sobre los animales no hay una diferencia en la carga parasitaria y que todos los grupos presentan la misma tendencia. Esta homogeneidad en los grupos se produce por el consumo heterogéneo de los animales respecto de los bloques, lo que permite que aun cuando a nivel de fecas réctales se produce un control con diferencias significativas en los grupos, esta desaparece a nivel de campo en donde los insectos adultos pueden migrar de un animal a otro, esta heterogeneidad en el consumo del preparado también determina que en el campo se encuentran masas fecales sin el efecto del controlador.

6.1) Establecer in vivo el comportamiento y la aparición a nivel fecal de Azadirachtin incorporado en bolos de uso intrarruminal a través del efecto sobre larvas de díptero *H. irritans*.

a) Emergencia de insectos adultos a partir de fecas rectales de animales con y sin tratamiento

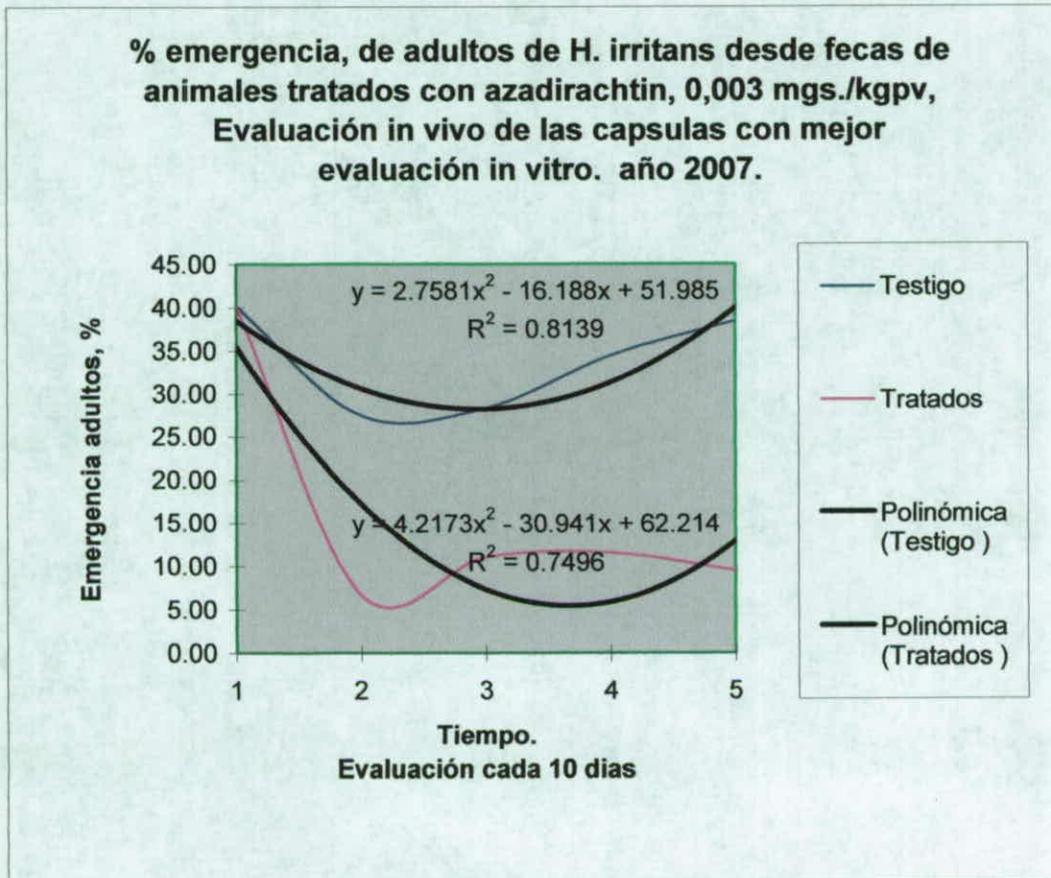
Cuadro N° 30

% emergencia de Individuos adultos de <i>H. irritans</i> , desde fecas transrectales de bovinos tratados con bolos intrarruminales con 0,03 mgs de Azadirachtin/Kg. de peso vivo y testigos sin tratamiento 2007-2008					
	28/12/2007	04/01/2008	15/01/2008	24/01/2008	04/02/2008
Testigos	40.14±10a	27.44±14a	28.33 ±4a	34.44 ±10a	38.44±8a
Tratados	40.14±10a	3.33±1.92b	5.52±1.87b	5.76 ±1.69b	4.76 ±3.19b

Duncan test  $p < 0.05$ , letras distintas indican diferencias significativas.

En el cuadro N° 30 se aprecia la emergencia de individuos adultos de *H. irritans*, a partir de fecas bovinas de animales tratados e incubadas en conjunto con huevos del parásito, permanentemente en estas evaluaciones, se produjo un nivel de emergencia menor en los animales tratados, estadísticamente diferentes respecto de los animales sin tratar con los dispositivos intrarruminales de degradación lenta.

Gráfico N° 24



**b) Evolución de la emergencia de adultos de *H. irritans* en fecas de campo, de bovinos tratados con *Azadirachtin*, incubadas en cámara húmeda, masas fecales de 2.0 Kg.**

En el cuadro siguiente se aprecia la emergencia de adultos de *H. irritans* desde fecas de campos de animales tratados con bolos intrarruminales con *Azadirachtin* y testigos sin tratamiento, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos tratamientos.

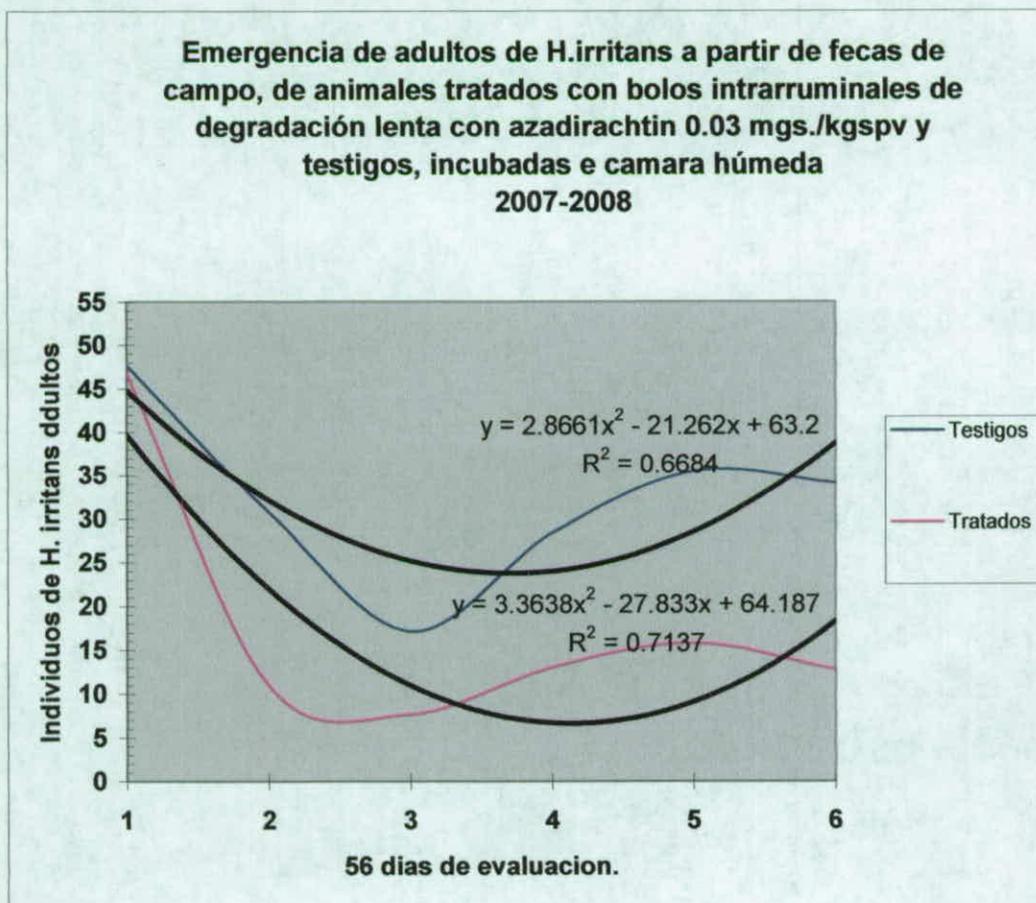
Cuadro N° 31

Evolución de la emergencia de adultos de <i>H.irritans</i> en fecas de campo, de bovinos tratados con <i>Azadirachtin</i> , incubadas en cámara húmeda, masas fecales de 2.0 Kg. 2007-2008						
	28-Dic	03-Ene	15-Ene	25-Ene	04-Feb	15-Feb
Testigos	47.2±10.43a	30.75±5.9a	17.13 ±6.0a	28.38 ±9.2a	35.5 ±7.0a	34.13 ±7.2a
Tratados	47.2 ±10.43a	10.90 ±5.1b	7.63 ±2.6b	13 ±2.2b	15.75 ±3.9b	12.80 ±3.4b

Duncan test,  $p < 0.05$  letras distintas indican diferencia significativa

En el grafico N°25 se observa la evolución de la emergencia de adultos de *H.irritans* a partir de fecas de campo de animales tratados con azadirachtin.

Gráfico N° 25



En el grafico N°25 se aprecia la evolución de la emergencia de adultos de *H. irritans*, desde fecas tratadas con Azadirachtin.

**c) Número de Individuos adultos de *H. irritans* sobre zona dorso escapular en bovinos tratados con Azadirachtin, 0,03 mgs/Kg. de peso vivo, en bolos intrarruminales de lenta degradación, durante 56 días.**

En esta etapa se realizó un ensayo para evaluar a nivel de campo la implementación del método de control a partir de bolos intrarruminales de digestión lenta, para esto se desarrolló un instrumento de aplicación de las cápsulas, a la medida de éstas y con un sistema de retención que impidiera la pérdida ellas antes de su introducción a nivel del esófago. En paralelo se evaluó el mismo dispositivo en animales fistulados, como consecuencia de esto último se constató la desintegración temprana de los dispositivos y se realizó una segunda aplicación, por lo tanto como resultado de esta condición se estableció para el próximo ciclo la necesidad de formular dispositivos de mayor dureza que fueran menos influenciados por las condiciones de manejo y alimentación que son las de mayor influencia en la degradación e estos elementos.

En el cuadro N° 32 se apresa la evolución de la población de *H. irritans* en la primera evaluación de campo con las capsulas de mejor evaluación in vitro, durante los estudios previos.

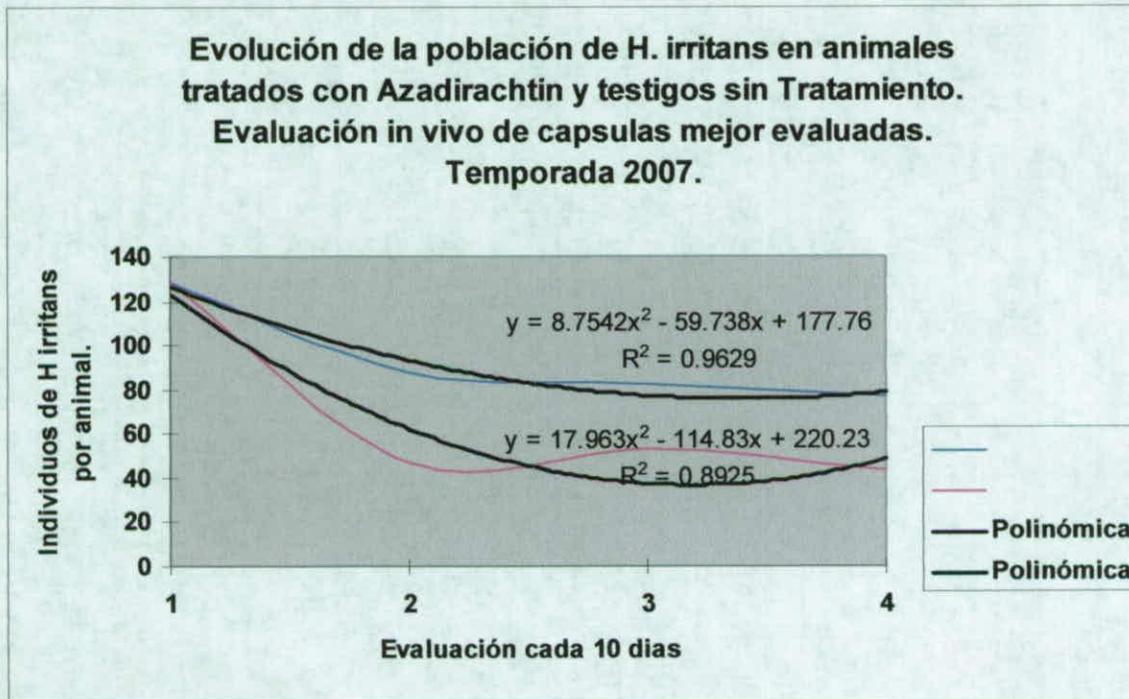
En esta condición se aprecia que ya existía una carga importante de adultos en los animales y que el extracto botánico tiene un efecto significativo, rebajándola, pero aun insuficiente en esta etapa del trabajo.

Cuadro N°32

<b>N° de Individuos adultos de <i>H. irritans</i> sobre zona dorso escapular en bovinos tratados con Azadirachtin, 0,03 mgs/Kg. de peso vivo, en bolos intrarruminales de lenta degradación, durante 31 días.</b>				
	<b>04-Ene</b>	<b>15-Ene</b>	<b>24-Ene</b>	<b>04-Feb</b>
Testigos	133±58.3a	88±42.4a	83±39.6a	77±17.9a
Tratados	124±30.8a	47±21.6b	53±27.4b	43±19.1b

p<0.05 K-S Test.

Gráfico N°26



En el cuadro anterior se aprecia la evolución de la carga de *H. irritans* en animales tratados con Azadirachtin en bolos intrarruminales.

**d) Cambio de peso en bovinos tratados con azadirachtin administrado en bolos intraruminales de 130 grs. ( 2 Grupos de 15 vacas adultas)**

Cuadro N°33

<b>Cambio de peso en bovinos tratados con azadirachtin administrado en bolos intraruminales de 130 grs. ( 2 Grupos de 15 vacas adultas)</b>				
Fecha	12.12.07	15.01.08	04.02.08	Cambio de peso kgs.
Testigos	404±35	407±37	388±40	-16
Tratados	497±85	494±80	459±91	-38

En el cuadro anterior se aprecia el cambio de peso de los animales, este estuvo fuertemente influenciado por las condiciones de la pradera, con caída de la disponibilidad y pérdida de peso.

**7) Evaluación de campo de las dosis Azadirachtin de mayor eficiencia en el control de *H. irritans*, aplicadas en bolos intraruminales para obtener poblaciones de niveles tolerable para los bovinos. 2008-2009**

**a) Emergencia de insectos adultos de *H. irritans* desde fecas transrectales de animales con y sin tratamientos**

Cuadro N° 34

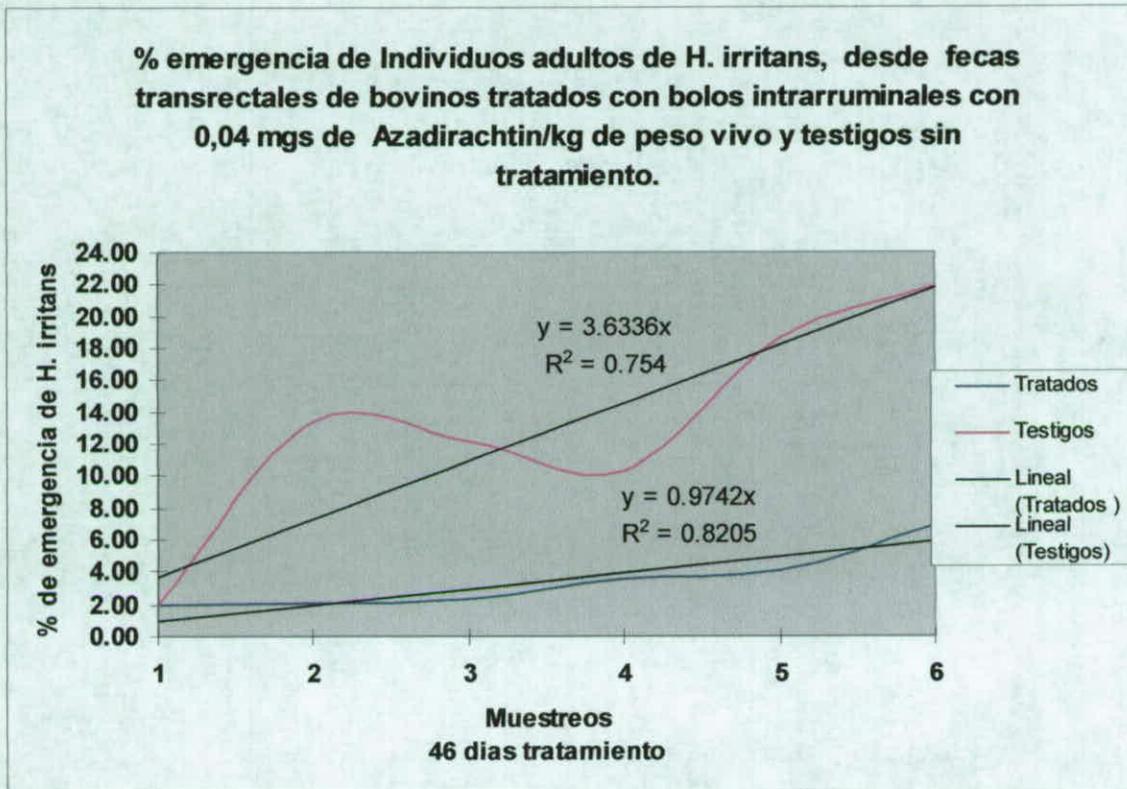
<b>% emergencia de Individuos adultos de <i>H. irritans</i>, desde fecas transrectales de bovinos tratados con bolos intraruminales con 0,04 mgs de Azadirachtin/Kg. de peso vivo y testigos sin tratamiento</b>						
Fecha	24.11.08	4.12.08	11.12.08	18.12.08	03.01.09	10.01.09
Tratados	1.93±1.2	2.10±1a	2.36±0,1a	3.61±3.5a	4.00±1.9a	6.83±2.5a
Testigos	1.93±1,2	13.33±2.3b	12.18±2.9b	10.33±3.9b	18.57±3.3b	21.89±4.9b

Andeva, Duncan test P<0.05

En el cuadro anterior se aprecia la emergencia de individuos adultos de *H. irritans*, a partir de fecas bovinas de animales tratados incubadas en conjunto con huevos del parásito, permanentemente en estas evaluaciones se produjo un nivel de emergencia

con diferencias estadísticamente diferentes respecto de los animales sin la administración de los dispositivos intrarruminales de degradación lenta

Cuadro N° 27

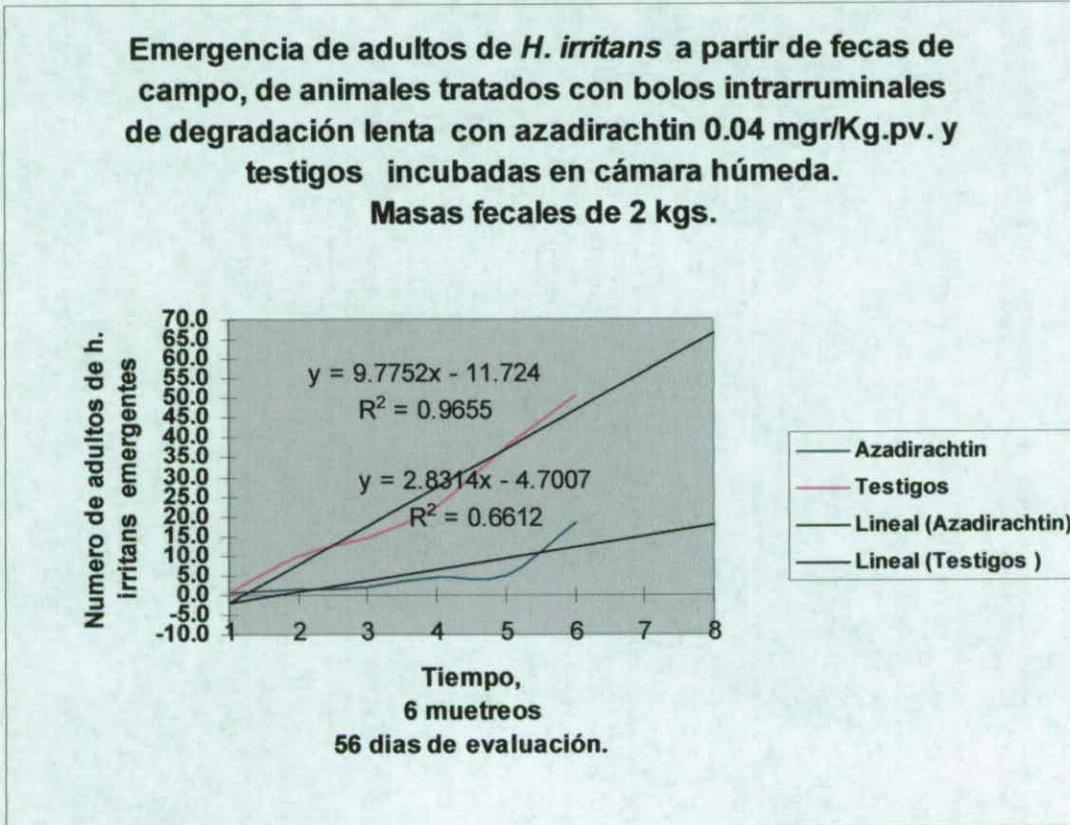


En el gráfico N°27 muestra la linealización de las respuestas a la aplicación de azadirachtin en bolos intrarruminales observando la diferencia en las pendientes de ambas rectas. Esta evaluación se realizó permanentemente en los trabajos de campo para detectar la presencia del principio activo a nivel fecal.

**b) Emergencia de adultos de *H. irritans* a partir de fecas de campo**

En el gráfico N° 28 se aprecia la emergencia de individuos adultos de *H. irritans* a partir de masas fecales (2kgrs.) recolectadas a nivel de campo luego de 48 a 72 horas de su depositación en la pradera, se aprecia la diferencia en las pendientes de las rectas.

Gráfico N° 28



Esta evolución está influenciada por el tratamiento inicial de los animales para llevar a 0 la cuenta de insectos, por lo tanto la evolución de la población se inicia desde niveles cercanos a 0. Esta población emergente se incrementa rápidamente a lo largo del ensayo, poblando nuevamente el sistema alcanzando niveles de emergencia en el laboratorio de 50, 6 adultos por cada 2 kilogramos de fecas incubadas, se debe destacar que aún este potencial, obtenido en condiciones artificiales, que reducen la emergencia del díptero, puede determinar el desarrollo de 1.265 individuos cada 25 Kg. de fecas en el campo, volumen aproximado de fecas producido en un día por un bovino adulto.

c) N° de Individuos adultos de *H. irritans* sobre zona dorso escapular en bovinos tratados con Azadirachtin, 0,04 mgs/kg de peso vivo, en bolos intrarruminales de lenta degradación, durante 56 días.

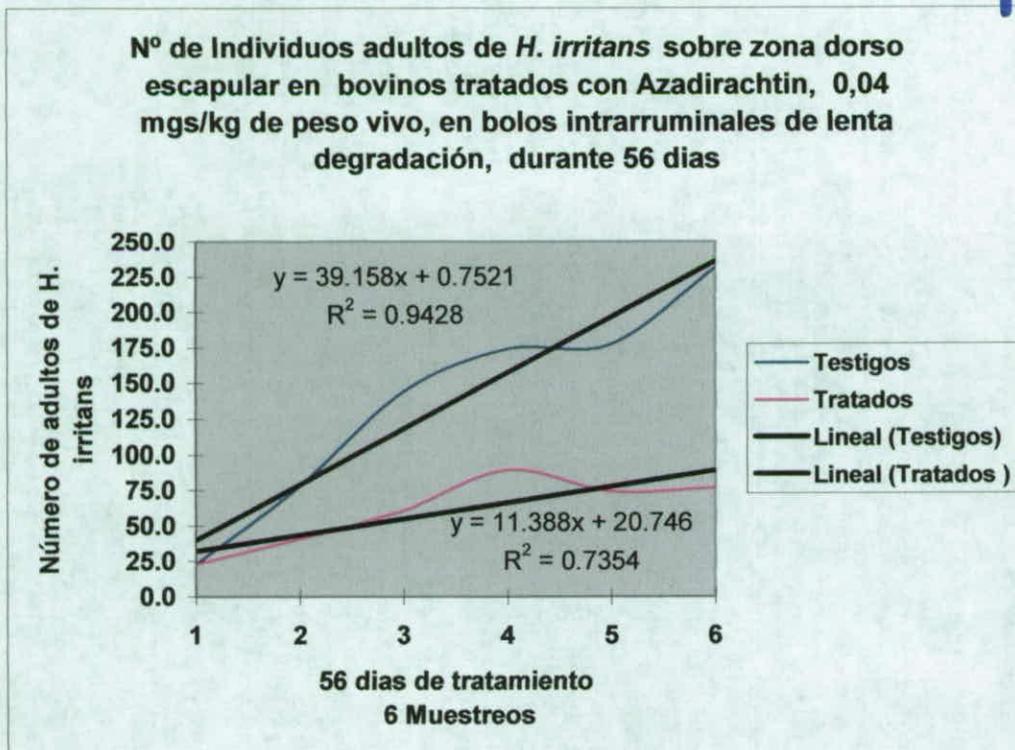
En el cuadro N° 35 se aprecia el número de individuos adultos de *H. irritans* sobre animales tratados con azadirachtin en capsulas intrarruminales y testigos sin tratamiento, lográndose una efecto sobre las poblaciones durante el periodo de aplicación que alcanza un máximo de regulación de 66.81% respecto de los animales no tratados

Cuadro N° 35

N° de Individuos adultos de <i>H. irritans</i> sobre zona dorso escapular en bovinos tratados con Azadirachtin, 0,04 mgs/kg de peso vivo, en bolos intrarruminales de lenta degradación, durante 56 días.						
	24/11/2008	04/12/2008	11/12/2008	18/12/2008	02/01/2009	10/01/2009
Tratados	22,57±12.29a	40.7±20.42a	60.70±26.27a	89.00±33.82a	74.00±17.13a	76.64±42.68a
Testigos	22,57±12.29a	77.86±33.16b	144±76.71b	174±74.11b	177,5±40.01b	230.89±71.93b
Eficiencia %	0.00	47.7	57.85	48.85	58.31	66.81

Andeva p<0.05

Gráfico N° 29



En el grafico N°29 se aprecia el nivel de regulación de las poblaciones de adultos de *H.irritans* sobre la zona dorso escapular de bovinos tratados con Azadirachtin en bolos intraruminales y testigos sin tratar. Se observa el valor de la pendiente de la recta ajustada a los valores alcanzados por la población de *H.irritans* sobre los animales.

**d) Cambio de peso en bovinos tratados con azadirachtin administrado en bolos intraruminales de 130 grs. ( Grupos de 15 vacas adultas)**

En el cuadro N° 36 se aprecia el cambio de peso de animales tratados con Azadirachtin en bolos intraruminales y testigos sin tratar, se aprecia en los animales tratados un cambio en la condición corporal, llegando a un incremento de peso en el periodo de 15,62 kgs. Se debe considerar que las vacas en ensayo eran animales lactantes. Por su parte los animales sin tratamiento perdieron 12.50 kgs. Es probable, de acuerdo a la bibliografía sobre azadirachtin y en general a los diversos extractos del árbol del neem, que éste también tenga efectos sobre nematodos gastrointestinales, efecto que contribuiría a la mejoría de la condición general de los animales

Cuadro N° 36

<b>Cambio de peso en bovinos tratados con azadirachtin administrado en bolos intraruminales de 103.73±0.8 grs. ( Grupos de 15 vacas adultas)</b>			
	<b>Peso Inicial Kg.</b>	<b>Peso Final Kg.</b>	<b>Cambio de peso Kg.</b>
<b>Testigos</b>	<b>495.43±74.42</b>	<b>482.93±68.81</b>	<b>-12.50</b>
<b>Tratados</b>	<b>602.23±44.86</b>	<b>617.85±49.72</b>	<b>15.62</b>

**9.) Capacitación de productores de carne bovina en el uso de bolos de azadirachtin como controlador de *H irritans***

Se realizó un seminario para difundir las experiencias y resultados obtenidos en relación al uso de bolos intrarruminales de azadirachtin y su efecto en el control de la mosca de los cuernos en bovinos en pastoreo.

**10) Desarrollo de un estudio en el laboratorio de Cinética de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, que permita la implementación de un método para establecer trazas de Azadirachtin en la carne de los animales tratados.**

Resultados obtenidos del procesamiento de 2 muestras de 5 g de carne provenientes de un ternero de 200 kgs. que recibió una formulación de liberación controlada de Neem, con 20.4 mgs. por día, de Azadirachtin por 14 días. En tanto que la dosis que se puede indicar como normal es de 8 mgr/200 kgs.

En ninguna de las 2 muestras se detectó alguna señal cromatográfica coincidente con los tiempos de retención de Azadiractina A y Azadiractina B

**2. Hitos:** Se deberá hacer un completo y detallado análisis y reflexión en cuanto al avance, cumplimiento o eventual atraso del hito definido para el periodo.

Dentro de los hitos del proyecto, el más relevante fue desarrollar los dispositivos intrarruminales ajustados a un periodo de funcionamiento superior a 45 días. Este desarrollo se dilató en el tiempo dada su complejidad e impidió terminar en los plazos establecidos inicialmente por el proyecto. Este debió prolongarse y determinó que se

debiera aplazar la finalización del trabajo en seis meses, solicitándose a la Fundación para la Innovación Agraria una reorganización y prolongación de las actividades del trabajo, con una duración adicional de 6 meses

### **3. Actualización del análisis económico**

#### **3.1. Actualizar análisis de mercado.**

El producto desarrollado no tiene competencia dado que los actuales fármacos administrados con la modalidad pour-on, spot-on o como elementos depositados en autocrotales de polímetros sintéticos, impregnados con insecticidas, cada vez tienen menor efecto residual, con periodos de efectividad que están, dependiendo de la zona, entre los 15 y los 30 días, Por otra parte no pueden ingresar al mercado de la producción orgánica campo en que el producto desarrollado no tiene ningún elemento de control de insectos hematófagos que puede competir con el.

#### **3.2. Actualizar criterios y supuestos utilizados en la formulación del análisis económico del proyecto.**

#### **3.3.**

Los valores supuestos al evaluar el proyecto se entregan en el cuadro respectivo y tienen que ver con la curva de adopción de la tecnología, el costo de producción de esta cápsula y el número de aplicaciones por año del dispositivo intrarruminal.

## 16.2. II-FLUJO DE FONDOS DEL PROYECTO E INDICADOPRES DE RENTABILIDAD

PROYECCIÓN SITUACION CON PROYECTO  
FLUJO DE CAJA ANUAL PROYECTO PURO

ITEM	Año						
	0	1	2	3	4	5	6
<b>INGRESOS</b>							
Venta de antiparasitario		104517140	223965300	268758360	268758360	268758360	268758360
<b>Ingresos Totales</b>		<b>104517140</b>	<b>223965300</b>	<b>268758360</b>	<b>268758360</b>	<b>268758360</b>	<b>268758360</b>
<b>EGRESOS</b>							
Costos Fijos de Producción		54720000	54720000	54720000	54720000	54720000	54720000
Costos Variables de Producción		25542135	45375366	53122289	53439689	54006351	54637848
Gastos de Adm. y Ventas		4180686	8956612	10750334	10750334	10750334	10750334
<b>Egresos Totales</b>		<b>84442821</b>	<b>109053978</b>	<b>118592623</b>	<b>118910023</b>	<b>119476686</b>	<b>120108183</b>
<b>UTILIDAD ANTES IMPUESTO</b>		<b>20074319</b>	<b>114911322</b>	<b>150165737</b>	<b>149848337</b>	<b>149281674</b>	<b>148650177</b>
<b>FLUJO NETO CAJA (M\$)</b>		<b>84442821</b>	<b>114911322</b>	<b>150165737</b>	<b>149848337</b>	<b>149281674</b>	<b>148650177</b>

**DESGLASE DETALLADO DEL FLUJO DE CAJA**

**FLUJO DE INGRESOS**

Venta de Controladores H.irritians(capsulas/año )

	año-1	año-2	año-3	año-4	año-5	año-6
	52259	111983	134379	134379	134379	134379

**FLUJO DE EGRESOS**

**COSTOS FIJOS**

	\$/mensual	año-1	año-2	año-3	año-4	año-5	año-6
Gerente producción	2000000	24000000	24000000	24000000	24000000	24000000	24000000
Biólogo de producción	1500000	18000000	18000000	18000000	18000000	18000000	18000000
Técnicos (2 obreros)	700000	8400000	8400000	8400000	8400000	8400000	8400000
Personal administrativo (1)	360000	4320000	4320000	4320000	4320000	4320000	4320000

**SubTotal CF**

	<b>54720000</b>	<b>54720000</b>	<b>54720000</b>	<b>54720000</b>	<b>54720000</b>	<b>54720000</b>
--	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

**COSTOS VARIABLES**

Valor materiales Capsulas	7838786	16797398	20156877	20156877	20156877	20156877
Producción nCapsulas	3658100	7838786	9406543	9406543	9406543	9406543
Mantencción y recambio activos	1500000	1500000	1500000	1500000	1500000	1500000
Energía para producción	3658100	3841005	4033055	4033055	4234708	4446443
Fletes	1800000	1800000	1800000	1800000	1800000	1800000
Material de vidrio	1100000	1265000	1454750	1672963	1923907	2212493
Desinfectantes	500000	575000	661250	760438	874503	1005679
Envases	1829050	3919393	4703271	4703271	4703271	4703271
Electricidad	3658100	7838786	9406543	9406543	9406543	9406543
<b>SubTotal CV</b>	<b>25542135</b>	<b>45375366</b>	<b>53122289</b>	<b>53439689</b>	<b>54006351</b>	<b>54637848</b>

**GASTOS ADM Y VTAS**

Personal (2)	3135514	6718959	8062751	8062751	8062751	8062751
Imprevistos (1.5% de ingresos brutos)	1045171	2239653	2687584	2687584	2687584	2687584
<b>SubTotal Gros.Adm y Vtas.</b>	<b>4180686</b>	<b>8958612</b>	<b>10750334</b>	<b>10750334</b>	<b>10750334</b>	<b>10750334</b>

SUPUESTOS UTILIZADOS.

INDICES DE CORRECCION	
Precio capsulas \$/capsula	2000
Kgs.material por capsulas	0.1
Valor materiales capsulas \$	1500
Costo medio de producción de capsulas	70
Costo de envases Capsulas \$	35
Energia, Electricidad. \$	70
Número de bovinos totales en las áreas (V-VII-X)	748551
Dosis mensual bovinos (capsulas /antiparasitario)	1
Periodo de uso en bovinos (meses/año)	2
<b>% de adopción de la tecnología</b>	<b>10</b>
Año 2010	35
Año 2011	75
Año 2012	90
Número de bovinos totales (año 2010)	26129
Número de bovinos totales (año 2011)	55991
Número de bovinos totales (año 2012)	67190

III-Flujo de fondos del proyecto  
INDICADORES DE RENTABILIDAD  
EVALUACIÓN PROYECTO PURO (\$/AÑO)

	A Ñ O S						
	0	año -1	año -2	año -3	año -4	año -5	año -6
Flujo de caja situación proyecto puro		84442821	114911322	150165737	149848337	149281674	148650177
INVERSIONES PARA:							
Proyecto Innovación Tecnológica (Aporte FIA)	87882583						
Inversiones para escalamiento	110000000						
Capital de Trabajo para la Producción	42221410						
FLUJO NETO CAJA (\$)	-240103993	84442821	157132732	150165737	149848337	149281674	148650177
VAN (12%)	\$ 288,116,254						
TIR	48.3%						

4. Análisis de impacto logrado a la fecha, midiendo y diferenciando al menos los siguientes aspectos:

4.1. Ventas y/o ingresos anuales (\$),

Es un producto que aún no se comercializa.

4.2. Nivel de empleo anual (JH),

El proyecto ha generado un insumo nuevo que aún no ingresa al mercado, por lo tanto no ha generado nuevos puestos de trabajo.

4.3. Número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado, y generación de nuevas ventas y/o servicios.

Aun es un producto que no ingresa al mercado nacional

4.4. Nuevos empleos generados por efecto del proyecto,

El proyecto por la naturaleza de investigación no ha generado nuevos empleos.

4.5. Nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas (número de tesis o residentes, nivel o grado).

-Se realizó una tesis con el Departamento de Tecnología Farmacéutica de la facultad de Química y farmacia de la Universidad de Chile, para desarrollar un método cromatográfico de análisis de Azadirachtin en tejido muscular.

- Se validó un método cromatográfico de detección de residuos Azadirachtin en tejido muscular.

4.6. Número de publicaciones científicas y ranking de la revista (por ejemplo ISI).

No se han realizado publicaciones.

4.7. Número de patentes generadas.

Aun no se han generado patentes y es una gestión que se iniciará próximamente.

5. Antecedentes completos y detallados del número y tipo de usuarios que solicitó, solicita y solicitará los servicios y/o productos generados.

Las compañías que se han interesado en articularse con el proyecto en un escenario futuro de desarrollo de procesos de escalamiento, usos y comercialización de esta tecnología, son empresas relacionadas con la producción ganadera en distintos ámbitos de esta actividad como: Ecofos Limitada, Santa Isabel de Cato S.A., Agrícola Catemu Ltda. La primera de ellas es comercializadoras de minerales e insumos para la ganadería y las dos ultimas productoras de animales de carne con relaciones en el mercado norteamericano e involucradas en desarrollar un proyecto de exportación de estas carnes.

6. Resultados e impactos probables al cierre del proyecto.

Como ya se estableció en la entrega de resultados, se logro desarrollar una tecnologia que regula la población de la mosca de los cuernos, *H. irritans*, de acuerdo a los objetivos planteados inicialmente en la investigación.

En el presente informe se entrega toda la información generada por el proyecto.

7. En la medida que los resultados obtenidos permitan la elaboración de una ficha técnica (ejemplo ficha de cultivo o procedimientos, protocolos de laboratorio, etc.), ésta debe ser adjuntada al informe.

Se entrega el protocolo de las actividades en el punto respectivo.

4. **Fichas** técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto. Se deberá incorporar toda la información relativa a la participación e identificación del sector productivo.

Se entrega evaluación económica en el punto respectivo.

5. **Impactos** del proyecto: descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias. Algunos indicadores de impacto son mencionados en el instructivo del informe de avance técnico.

### Económicos

a) El principal impacto es contar con un dispositivo que libera un insecticida botánico de bajo impacto ambiental en cantidad y calidad adecuadas para actuar sobre un parasitismo de efectos relevantes sobre ganadería de carne bovina en Chile. Esto permitirá en lo económico, tanto la incorporación de la producción de carne bovina de la empresa que participa en el proyecto, como de otras empresas de la zona, en un mercado de demanda de productos pecuarios con un bajo nivel de residuos.

b) Reducción o eliminación de la aplicación en producciones futuras de insumos o insecticidas químicos de alto efecto sobre el ambiente, al contar con elementos de bajo impacto ambiental y sin incorporación de residuos en el animal.

c) Ampliar las posibilidades para la producción de carne nacional al colonizar nichos específicos para este producto, Mercado orgánico, Mercado de alta exigencia en términos de Buenas prácticas tanto agrícolas como pecuarias.

d) Generación de una unidad de producción de reguladores biológicos tanto vegetales como para la producción animal, que sea sustentable en el tiempo y que abastezca la demanda de empresas exportadoras de productos agropecuarios a nivel nacional.

e) Diversificación de la producción ganadera bovina con la obtención de productos ecológicos.

f) Generación de un insumo que puede ser comercializado en el mercado nacional e internacional.

6. **Problemas** enfrentados durante la ejecución proyecto (legal, técnico, administrativo, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

La dificultad principal que se presentó fue de tipo técnica y estuvo radicada en la complejidad tanto de formulación como de evaluación de los dispositivos de uso intrarruminal con entrega lenta.

7. **Difusión** de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

Se realizó un seminario en el centro de extensión de la Universidad Católica, para la entrega de los resultados finales del proyecto, con participación de académicos, productores y técnicos.

## **8. Conclusiones, desde el punto de vista técnico, económico y de gestión.**

1. Se desarrolló un regulador de las poblaciones de *H. irritans* en base a Azadirachtin con una eficiencia de hasta un 66.81%. (importante en sistemas orgánicos que no tienen otra herramienta de control.)
2. La dosis de mayor eficiencia en el control de *H. irritans* correspondió a 0.04 mgs/Kg. pv.
3. Se desarrolló una matriz farmacológica de lenta degradación a nivel ruminal en base a gelucire 15%, compritol 35% y hierro 50% con un alto potencial de aplicación a otras áreas de la producción animal.
4. Se desarrollo un sistema de reproducción de *H.irritans* que permite la obtención de sus diferentes estadíos biológicos.
5. Se estableció una metodología para la detección de azadirachtin en Músculo.
6. Se estableció que azadirachtin es un principio activo que no incorpora residuos detectables a nivel muscular aun en dosis de 0.102mgs/Kg. de peso vivo.
7. El producto desarrollado tiene un alto potencial económico en el ámbito de la producción e carnes orgánicas que se pueden exportar a EEUU y que no pueden recibir tratamientos químicos durante el proceso productivo.

**9. Recomendaciones**, desde el punto de vista técnico, económico y de gestión.

Este tipo de insumos junto a otros generados en investigaciones financiadas por la Fundación para la innovación agraria, constituyen una base para el planteamiento de un proyecto regional con productores de carne bovina orientado al mercado norteamericano de carnes orgánicas , pudiéndose establecer un prototipo regional en una zona prioritaria, que constituya un centro validación del sistema de producción así como de capacitación y adiestramiento de productores medianos y pequeños, con un sistema de instrucción progresivo en este tipo de emprendimiento. Esta iniciativa podría involucrar una cadena regional con producción, faenamiento y distribución tanto nacional como de exportación

**10. Otros aspectos de interés**

Este proyecto abre una importante línea de generación de dispositivos o matrices farmacológicas de uso intrarruminal, de entrega lenta, utilizables en producción de rumiantes, aplicables a la administración de antibióticos, vitaminas, minerales y controladores biológicos entre otros elementos, con una gran proyección tecnológica y económica.

11. **Anexos**, como fue indicado para los informes de avance técnico, pero en este caso la información no corresponde sólo a la actualización sino a la histórica. Como por ejemplo cambios en el equipo técnico, se debe adjuntar la ficha de todos los participantes que participaron en alguna de las etapas del proyecto aunque hayan sido reemplazados.

## ANEXOS – FICHAS CURRICULARES

### 1. Ficha Representante (s) Legal (es) de Ejecutor (Entidad Responsable)

(Esta ficha debe ser llenada por cada uno de los representantes legales de la Entidad Responsable)

Nombres	Patricia		
Apellido Paterno	Méndez		
Apellido Materno	Urrutia		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro de Educación y Tecnología		
RUT de la Organización	71.787.200-2		
Tipo de Organización	Pública		Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Tipo Entidad (C)	Corporación sin fines de lucro		
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente de Administración		
Dirección (laboral)	Nueva Amunategui 1402 Oficina 402		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	6979543		
Fax	6979563		
Celular	08-2992745		
E-mail	Admcet @terra.cl		
Web	www. cet.org		
Género	Masculino		Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (A)			
Tipo (B)			

**2. Ficha Representante (s) Legal (es) Agente (s) Asociado (s)**

Nombres	Fernando		
Apellido Paterno	Urrutia		
Apellido Materno	García		
RUT Personal	[REDACTED]		
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Agrícola Palomar Ltda.		
RUT de la Organización	76952570-k		
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
XTipo Entidad (C)			
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente General		
Dirección (laboral)	Fundo huechun camino a catillo parral		
País	Chile		
Región	VII		
Ciudad o Comuna	Parral		
Fono (laboral)	73-462726		
Fax (laboral)	73-462726		
Celular	09-3201863		
E-mail	Agricolapalomar@entelchile.net		
Web			
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (A)			
Tipo (B)			

### 3. Fichas Coordinadores

Coordinador Principal			
Nombres	Andrés		
Apellido Paterno	Yurjevic		
Apellido Materno	Marshall		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro de Educación y Tecnología		
RUT de la Organización	71787200-2		
Tipo de Organización	Pública		Privada <b>x</b>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Presidente		
Profesión	Ingeniero Comercial		
Especialidad	Economista PhD.		
Dirección (laboral)	Amunátegui 1405 oficina 402		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago centro		
Fono	6979543		
Fax	6979563		
Celular	-		
E-mail	<a href="mailto:admcet@terra.cl">admcet@terra.cl</a>		
Web	<a href="http://www.cet.org">www.cet.org</a>		
Género	Masculino	<b>x</b>	Femenino
Etnia (A)			
Tipo (B)			

Investigador			
Nombres	Raúl Alberto		
Apellido Paterno	Venegas		
Apellido Materno	Valdebenito		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro de Educación y Tecnología		
RUT de la Organización	71787200-2		
Tipo de Organización	Pública		Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Director de investigación		
Profesión	Medico Veterinario		
Especialidad	Producción animal Mg. Dr. ©		
Dirección (laboral)	Amunátegui 1405 oficina 402		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago centro		
Fono	7455009		
Fax	7455009		
Celular	08-2883770		
E-mail	<a href="mailto:rvenegas@interactiva.cl">rvenegas@interactiva.cl</a>		
Web	<a href="http://www.cet.org">www.cet.org</a>		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (A)			
Tipo (B)			

#### 4. Fichas Equipo Técnico

Profesional 1			
Nombres	Patricia		
Apellido Paterno	Palazuelos		
Apellido Materno	Faúndez		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro de Educación y Tecnología		
RUT de la Organización	71787200-2		
Tipo de Organización	Pública		Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Dirección laboratorio de control Biológico		
Profesión	Profesora de Biología y Ciencias naturales		
Especialidad	Magíster en entomología		
Dirección (laboral)	Amunátegui 1405 oficina 402		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago centro		
Fono	7455009		
Fax	7455009		
Celular	08-2883773		
E-mail	admcet @terra.cl		
Web	www. cet.org		
Género	Masculino		Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (A)			
Tipo (B)			

Técnico administrativo			
Nombres	Alejandra		
Apellido Paterno	Nova		
Apellido Materno	Vásquez		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro De Educación y Tecnología		
RUT de la Organización	71787200-2		
Tipo de Organización	Pública		Privada <b>x</b>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Dirección oficina contabilidad		
Profesión	Contadora		
Especialidad	Contabilidad de costos		
Dirección (laboral)	Amunátegui 1405 oficina 402		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago centro		
Fono	7455009		
Fax	7455009		
Celular	-		
E-mail	admcet @terra.cl		
Web	www. cet.org		
Género	Masculino		Femenino <b>x</b>
Etnia (A)			
Tipo (B)			

Técnico			
Nombres	Pamelita Beatriz		
Apellido Paterno	Muñoz		
Apellido Materno	Muñoz		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro de Educación y Tecnología		
RUT de la Organización	71787200-2		
Tipo de Organización	Pública		Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Asistente laboratorio Control Biológico		
Profesión	Técnico Agrícola		
Especialidad	Agricultura Orgánica		
Dirección (laboral)	Amunátegui 1405 oficina 402		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago centro		
Fono	7455009		
Fax	7455009		
Celular	08-1651173		
E-mail	admcet @terra.cl		
Web	www. cet.org		
Género	Masculino		Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (A)			
Tipo (B)			

Personal que trabajo en el proyecto que ya no está en la Corporación CET.

Tipo trabajo que desarrolló	Laboratorista		
Nombres	Sonia		
Apellido Paterno	Soto		
Apellido Materno	Carrizo		
RUT Personal	[REDACTED]		
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro de Educación y Tecnología		
RUT de la Organización	71787200-2		
Tipo de Organización	<input type="checkbox"/> Pública	<input type="checkbox"/> Privada	<input checked="" type="checkbox"/> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Laboratorio		
Profesión	Técnico Agrícola		
Especialidad	Nutrición Animal		
Dirección (laboral)	Nueva amunátegui 1405 of 402.		
País	Chile		
Región	Región Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	7455009		
Fax	7455009		
Celular	09-6758400		
Email	<a href="mailto:admctet@terra.cl">admctet@terra.cl</a>		
Web			
Género	<input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Femenino	<input checked="" type="checkbox"/> x
Etnia (B)	Sin Clasificar		
Tipo (C)	Profesional.		

Tipo trabajo que desarrolló	Auxiliar Laboratorio		
Nombres	Teresita		
Apellido Paterno	Lara		
Apellido Materno	Cordero		
RUT Personal	[REDACTED]		
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Centro de Educación y Tecnología		
RUT de la Organización	71787200-2		
Tipo de Organización	<input type="checkbox"/> Pública	<input type="checkbox"/> Privada	<input checked="" type="checkbox"/> X
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Auxiliar Laboratorio		
Profesión			
Especialidad	Auxiliar Laboratorio		
Dirección (laboral)	Mueva Amunátegui 1405 of. 402		
País	Chile		
Región	Región Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Santiago		
Fono	7455009		
Fax	7455009		
Celular			
Email	<a href="mailto:admctet@terra.cl">admctet@terra.cl</a>		
Web			
Género	<input type="checkbox"/> Masculino	<input type="checkbox"/> Femenino	<input checked="" type="checkbox"/> x
Etnia (B)	Sin Clasificar		
Tipo (C)	Profesional.		

ANEXOS – FICHAS TECNOLOGICAS



**Universidad de Chile.**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéutica.

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA  
ANALÍTICA POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA  
DE ALTA RESOLUCIÓN PARA RESIDUOS DE  
AZADIRACTINA EN MÚSCULO DE VACUNO.**

Profesor patrocinante:

Dra. María Nella Gai Hernández.

Químico Farmacéutico.

Director de memoria:

Dra. María Nella Gai Hernández.

Químico Farmacéutico.

Memoria de pregrado para optar al título profesional de Químico  
Farmacéutico.

Alumno: Christian Enrique Álvarez Barraza.

**Santiago, Chile.**

**Junio de 2006.**

## **FINANCIAMIENTO**

Este trabajo de investigación fue financiado por la Fundación para la Innovación Agraria a través del Proyecto FIA FIA-PI-C-2004-I-P-025, “Desarrollo de un sistema de control de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) mediante la utilización del extracto del árbol *Azadirachta indica* (Neem) en rebaños productores de carne bovina “

## Agradecimientos.

Gracias al Dr. Raúl A. Venegas V., Medico Veterinario, quien detectó la falta de información en el campo de estudio y permitió el desarrollo de esta memoria.

Agradezco a la Fundación para la Innovación Agraria que financio este trabajo a través del Proyecto FIA FIA-PI-C-2004-I-P-025, “Desarrollo de un sistema de control de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) mediante la utilización del extracto del árbol *Azadirachta indica* (Neem) en rebaños productores de carne bovina. “, sin su aporte no hubiera sido posible la materialización de este trabajo.

Gracias a mis profesores, en especial a Alejandro Álvarez y María Nella Gai, que con sus conocimientos y paciencia contribuyeron enormemente al desarrollo de esta memoria y de mi formación profesional.

A mi familia, que con su cariño incondicional me animaron en los momentos de dudas e incertidumbres siendo mi apoyo y fortaleza.

A mis amigos que supieron regalar la necesaria dosis de descanso.

Finalmente agradecer a Dios y a María por no soltar mi mano mientras recorríamos este camino.

## Tabla de contenidos.

	Pág.
Dedicatoria.	
Agradecimientos.	3
Tabla de contenidos.	4
Índice de ilustraciones y cuadros.	6
Resumen.	8
Summary.	10
Introducción.	11
Objetivos.	14
Objetivos Generales.	14
Objetivos Específicos.	14
Materiales y métodos.	15
Materiales.	15
Métodos.	16
Desarrollo de la metodología analítica.	17
Estudio de parámetros cromatográficos.	19

Desarrollo de la metodología de extracción.	21
Resultados.	25
Desarrollo de la metodología analítica	25
Estudio de parámetros cromatográficos	25
Desarrollo de la metodología de extracción.	30
Conclusiones.	57
Bibliografía.	61
Glosario.	63

## Índice de ilustraciones y cuadros.

	Pág.
Figura 1. Estructura de Azadiractina.	12
Figura 2: Esquema de extracción desde solución stock.	30
Figura 3: Porcentajes de recuperación con DCM y Hexano.	31
Figura 4: Tabla de resultados porcentajes de extracción por número de ciclos.	31
Figura 5: Cromatograma de una solución de CBZ.	32
Figura 6: Cromatograma de una solución de CBZ y AZD MP.	33
Figura 7: Esquema de extracción y filtrado solución stock de CBZ y AZD.	34
Figura 8: Esquema general de purificación de muestras en cartuchos OASIS <sup>®</sup> .	35
Figura 9: Esquema de extracción desde carne 1.	36
Figura 10: Esquema de extracción desde carne 2.	37
Figura 11: Cromatografía de solución stock en tubos de polipropileno.	38
Figura 12: Cromatograma solución stock vs. extracción matriz blanco.	39
Figura 13: Cromatograma de MeOH: H <sub>2</sub> O evaporado a sequedad.	40
Figura 14: Cromatograma de sellos de goma vs. solución stock.	41
Figura 15: Cromatograma de extracción con cloroformo vs. DCM <sup>1</sup> .	42

Figura 16: Cromatograma de extracción con cloroformo vs. DCM <sup>II</sup> .	43
Figura 17: Cromatograma de extracción H <sub>2</sub> O vs. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>I</sup> .	44
Figura 18: Cromatograma de extracción H <sub>2</sub> O vs. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>II</sup> .	45
Figura 19: Porcentajes de extracción 16mL×3 vs. 10mL×4.	45
Figura 20: Esquema de extracción de AZD desde músculo de vacuno.	46
Figura 21: Áreas matriz blanco, muestra zero y extracción.	47
Figura 22: Cálculo del porcentaje de recuperación.	48
Figura 23: Áreas curva de calibración y puntos control.	48
Figura 24: Áreas extracción concentración 6 diluida.	49
Figura 25: Relación de áreas curva calibración y puntos control.	50
Figura 26: Curva de calibración para AZD A y B.	50
Figura 27: Evaluación de resultados, puntos control.	51
Figura 28: Evaluación del error en la interpolación en la curva de calibración.	51
Figura 29: Cromatograma carne blanco.	52
Figura 30: Cromatograma carne zero.	53
Figura 31: Cromatograma extracción concentración 1.	54
Figura 32: Cromatograma extracción concentración 3.	55
Figura 33: Cromatograma extracción concentración 6.	56

## Resumen.

El crecimiento y descanso saludable del ganado son fundamentales en animales de producción, siendo necesaria la administración de fármacos, en algunos casos, para evitar la aparición de plagas de moscas.

Azadiractina ha demostrado ser un quimioterápico eficaz en el control de algunas plagas de moscas, interrumpiendo el crecimiento de éstas. Es por ello que se está evaluando la dosis de Azadiractina que debe ser administrada al ganado para lograrlo.

Al no existir una metodología analítica que permita la cuantificación precisa y exacta de residuos de Azadiractina en músculo de vacuno, se hace necesaria la creación de ésta.

Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar una metodología analítica y una de extracción que permitiera identificar y cuantificar de manera precisa y exacta los residuos de Azadiractina en músculo de vacuno.

Se utilizó cromatografía líquida de alta resolución como método analítico, una de extracción líquido – líquido como método de extracción y se evaluó la utilidad de purificar las muestras con cartuchos de purificación en fase sólida.

Se desarrolló una metodología analítica por HPLC utilizando una columna C<sub>18</sub> de 250 mm de largo, ACN: H<sub>2</sub>O (27.5:72.5) como fase móvil, velocidad de flujo de 1 mL/min, 45 °C como temperatura de trabajo y detector UV a 215 nm.

Se determinó que Azadiractina no puede estar en contacto con tubos de polipropileno por mucho tiempo pues se adsorbe sobre éste. Las jeringas, puntas de micropipetas, Swinnex<sup>®</sup>; filtros separadores de fase y solventes no ceden interferentes a la matriz. Sin embargo, los sellos de goma de los tubos tapa rosca de vidrio de 50 mL para centrifuga no pueden estar en contacto con el solvente de extracción pues contaminan la muestra.

La metodología de purificación desarrollada se aplica a un homogenizado acuoso de carne el que es extraído con Diclorometano: Isopropanol con agitación en Ultraturrax<sup>®</sup>. Este extracto es filtrado y redisolto en MeOH: H<sub>2</sub>O para inyección a HPLC.

Estas metodologías de extracción y análisis permiten identificar y cuantificar de manera precisa y exacta Azadiractina tomando como límite inferior de cuantificación la inyección de 4,5 ng de Azadiractina A extraídos desde la matriz biológica.

## Summary.

### DEVELOPMENT OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY ANALYTIC METHOD FOR AZADIRACHTIN RESIDUES IN CATTLE MEAT

The aim of this study was the development of an analytic and extraction method for Azadirachtin from cattle meat.

High performance liquid chromatography was used for developing the analytical method. Liquid – liquid extraction and solid phase purification was used for the clean-up of the biological matrix.

HPLC conditions were: C<sub>18</sub> 4,5×250 mm column, Acetonitrile: Water (27.5:72.5) as mobile phase, 1 mL/min as flow rate, 45 °C column temperature and UV detector at 215 nm.

The use of polypropylene tubes must be avoided, since it was demonstrated that Azadirachtin is adsorbed by this material. Syringes, micropipette tips, Swinnex<sup>®</sup>, phase separator filters and solvents did not show interferences with biological matrix. However rubber seals of glass tubes give a wide range of interferences so it can't be in contact with the extraction solvent.

The extraction method was set as follows: from an aqueous homogenized of cattle meat, the extraction with Dichloromethane: Isopropanol was made by stirring up with Ultraturrax<sup>®</sup>, filtered by phase separator and redissolved in MeOH: H<sub>2</sub>O for injection in HPLC.

The extraction and analytical method developed in this work allows the quantitation of Azadirachtin with precision and accuracy, establishing a lower limit of quantification of 4,5 ng of Azadirachtin A, extracted from the biological matrix.

## Introducción.

Se sabe que la ausencia de moscas hace más saludable el crecimiento y descanso del ganado de consumo. Éstos son dos parámetros de importancia en los animales de producción por lo que en ocasiones se hace necesaria la administración de fármacos al ganado bovino para estos fines.

Azadiractina ha demostrado ser un agente quimioterápico eficaz en el control de algunas plagas de moscas como la de los caballos, de los establos, de los cuernos y de la fruta, por nombrar algunas (Ruiz, 1996).

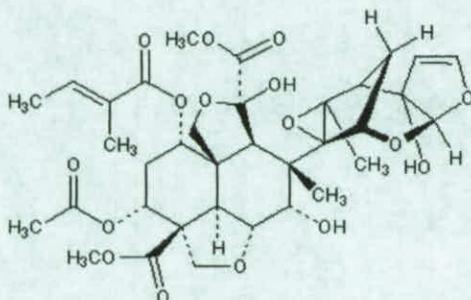
Este fármaco es eficaz en el control de estas plagas pues interrumpe el ciclo vital de las moscas en dos puntos: en primer lugar impide el crecimiento de los huevos a larvas y en segundo lugar impide el paso de larvas a moscas (Miller, 1998).

Azadiractina pertenece a la familia de los triterpenos siendo, más específicamente, un tetranortriterpenoide de carácter neutro e insoluble en agua (Miller, 1998).

Se encuentra en hojas, semillas, tallos, raíces, tronco y frutos de *Azadirachta indica* también conocido como *Melia indica*, *Melia azadirachta*, nim, margosa, limba, mimba, nimba, kohomba, y lila india (Ruiz, 1996).

Azadiractina posee dos estructuras químicas diferentes, siendo ambas tetranortriterpenoides, y se denominan Azadiractina "A" y "B" (Fortune bio-tech, 2005).

Figura 1. Estructura de Azadiractina (Cambridgesoft, 2002).



En la antigüedad, los aborígenes de la India trituraban las hojas de nim y las aplicaban sobre las heridas para eliminar las larvas que habían crecido en éstas (Farries, 2000).

En la actualidad se administra un triturado de semillas en el alimento del ganado bovino para prevenir el crecimiento de moscas en las heces del ganado, pues es ahí donde las moscas ponen los huevos (Farries, 2000).

También se ha aplicado el extracto oleoso del nim (aceite de nim) sobre la piel de ganado ovino como medida precautoria y de control de ataques de moscas a la producción (Farries, 2000).

Por disposición del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) de Chile y de ciertas entidades internacionales se debe declarar la cantidad de residuos de fármacos contenidos en las carnes y/o vísceras que se importan o exportan al y del país. Si bien para algunos de los fármacos administrados a los animales no existen especificaciones de límites máximos, todos los fármacos administrados al ganado deben ser declarados y especificada la cantidad de éste contenida en el producto a ser exportado o importado.

Considerando que no existe una metodología analítica para cuantificar los residuos de Azadiractina en músculo de vacuno, que los animales de producción están siendo tratados con este fármaco y que el producto cárneo está pensado para ser exportado y, por lo tanto, debe declarar la cantidad de residuos de Azadiractina contenidos, se hace necesario el desarrollo de una metodología analítica que permita la extracción, identificación y cuantificación de los residuos de Azadiractina contenidos en músculo de vacuno.

## Objetivos.

### **Objetivos Generales.**

- Desarrollar una metodología analítica vía cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para cuantificar Azadiractina (AZD).
- Desarrollar una metodología de extracción de Azadiractina desde tejido muscular de vacuno.

### **Objetivos Específicos.**

- Estudiar los parámetros cromatográficos que permiten identificar y separar Azadiractina "A" y "B" del resto de los componentes de la matriz biológica.
- Estudiar los parámetros que permiten una extracción selectiva y cuantitativa de Azadiractina "A" y "B" desde músculo de vacuno.

## Materiales y métodos.

### Materiales.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución Merck-Hitachi.
- Acetonitrilo grado HPLC.
- Hexano grado HPLC.
- Diclorometano grado HPLC.
- Metanol grado HPLC.
- Cloroformo grado p.a.
- Isopropanol grado p.a.
- Agua bidestilada.
- Homogenizador Ultraturrax<sup>®</sup>.
- Tubos de vidrio de centrifuga de 50 mL.
- Centrifuga.
- Papel filtro separador de fases.
- Tubos de ensayo de vidrio.
- Pipetas Pasteur.
- Micropipetas.
- Baño termo regulado.
- Filtros GVWP Millipore<sup>®</sup>.
- Cartuchos para purificación en fase sólida OASIS<sup>®</sup> HLB<sup>®</sup> 3 mL.

## **Métodos.**

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Extracción líquido – líquido. Se ensayaron diferentes solventes para la extracción seleccionándose el que presente el mayor porcentaje de recuperación del analito.
- Purificación por fase sólida. Se ensayó para reducir la interferencia de la matriz biológica en el cromatograma.

## Desarrollo de la metodología analítica.

Para desarrollar una metodología analítica que permita identificar y separar Azadiractina A y B de la matriz biológica, carne de vacuno, se tomó como base la metodología que se utiliza para el análisis de Azadiractina como materia prima.

Ésta establece los siguientes parámetros:

Columna:	Waters <sup>®</sup> Spherisorb <sup>®</sup> ODS2 250 x 4,6 mm.
Fase móvil:	Acetonitrilo: Agua (35:65)
Velocidad de flujo:	1,00 mL/min.
Longitud de onda:	215 nm.
Tiempo de retención:	Azadiractina A 12,134 min, Azadiractina B 12,959 min.
Concentración de solución estándar:	4 µg/mL
Volumen de inyección:	20 µL.

Cuando la solución estándar se prepara con materia prima de Azadiractina se debe conocer la pureza de ésta para preparar una solución que contenga 4 µg/mL.

Al no disponer de Azadiractina estándar, se trabajará con Azadiractina materia prima. La pureza de esta materia prima es 14,32% de Azadiractina A y 2,73% de Azadiractina B, es decir 17,05% de Azadiractina según certificado de análisis.

Al no disponer de una columna Waters<sup>®</sup> Spherisorb<sup>®</sup> ODS2 250 x 4,6 mm, se evalúan algunas de las distintas columnas C<sub>18</sub> existentes en el mercado nacional. Se busca información de columnas Merck<sup>®</sup> LiChrospher<sup>®</sup>, Merck<sup>®</sup> LiChrosorb<sup>®</sup> y Merck<sup>®</sup> Superspher<sup>®</sup>, Agilent<sup>®</sup> ZORBAX<sup>®</sup> Eclipse XDB<sup>®</sup>, Agilent<sup>®</sup> ZORBAX<sup>®</sup> Stable Bond<sup>®</sup>, Agilent<sup>®</sup> ZORBAX<sup>®</sup> SB 300<sup>®</sup>, Fisher Sci.<sup>®</sup> Wacosil II<sup>®</sup>, Waters<sup>®</sup> Novapack<sup>®</sup>, Waters<sup>®</sup>

$\mu$ Bondapak<sup>®</sup>, Waters<sup>®</sup> Symmetry 300<sup>®</sup> y Waters<sup>®</sup> Symmetry<sup>®</sup>. Todas estas columnas corresponden a columnas de fase reversa, C<sub>18</sub> y de 250 mm de largo. La comparación de estas columnas se realiza en función de: diámetro y forma de partícula, tamaño de poro, actividad de silanol, si son columnas EndCapped o no y el costo de la columna.

Se decide trabajar con una columna Waters<sup>®</sup> Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 250 x 4,6 mm, diámetro de partícula de 5  $\mu$ m, partículas esféricas, poro de 100 Å, baja actividad silanol, columna EndCapped, por costos y ventajas comparativas entre diferentes columnas de distintos proveedores y del mismo proveedor.

La velocidad de flujo de la fase móvil se mantendrá en 1,00 mL/min y la longitud de onda de detección se fijará en 215 nm inicialmente. Se trabajó a temperatura ambiente sin estar ésta regulada.

## **Estudio de parámetros cromatográficos.**

### **Polaridad de la fase móvil.**

Se evaluó el efecto de cambios en la polaridad de la fase móvil, variando la proporción de acetonitrilo y agua y adicionando metanol.

### **pH de la fase móvil.**

La fase móvil constituida por ACN: H<sub>2</sub>O (33:67) presenta un pH levemente ácido, cercano a 6.

Cabe destacar que el rango operativo de pH para la columna Waters<sup>®</sup> Symmetry<sup>®</sup> C<sub>18</sub> es entre 2 y 8. Si se trabajase con un pH superior a 8, la vida útil de la columna se reduciría considerablemente.

Es por estos motivos que se evaluó la influencia del pH en la separación de los peaks de AZD A y B a pH 3, 5 y 8.

### **Fuerza iónica.**

Se decidió evaluar un Buffer Bifalato de K 0,02M a pH 3 y un Buffer Citrato de Na 0,02M a pH 3.

### **Temperatura.**

Hasta este punto se ha trabajado con el sistema a temperatura ambiente, estando sujetos a los cambios en la presión del equipo debidos a las variaciones de temperatura de la fase móvil.

Como la temperatura de trabajo puede ser un parámetro importante en la separación de los peaks de AZD A y B, se ensayaron aumentos en la temperatura del sistema con delta de 5 °C comenzando en 25 °C y terminando en 45 °C.

### **Modificación de fase móvil por posible cambio de detector.**

Cabe la posibilidad de que el sistema de detección UV no sea suficientemente sensible y/o específico para cuantificar residuos en concentraciones muy bajas. Si éste fuera el caso la solución podría ser cambiar el sistema de detección.

El sistema de detección más factible para esta metodología sería un detector de masa. El inconveniente de utilizar este detector es la fase móvil, que no puede contener sales.

### **Longitud de onda de detección.**

Cuando se ensayaron las extracciones desde una solución de materia prima y desde la matriz biológica se presentó el inconveniente de interferencia en la zona cercana a los peaks del estándar interno y analito.

Como una forma de disminuir la interferencia en el cromatograma se decidió variar la longitud de onda de detección. Se ensayó a dos longitudes diferentes más: 230 y 240 nm.

## Desarrollo de la metodología de extracción.

Para desarrollar una metodología de extracción de AZD desde el tejido muscular de vacuno, se partió evaluando la viabilidad de una extracción líquido – líquido.

Se sabe que AZD es una molécula de carácter ácido – base neutro, insoluble en agua y soluble en cloroformo y metanol. Por experiencia empírica se sabe que es soluble en ACN, Diclorometano y Hexano.

### **Esquema de extracción en solución stock.**

Se propuso un esquema de extracción desde una solución hidroalcohólica de AZD que contenía alrededor de 27 µg/ml de AZD A.

### **Influencia del pH.**

Luego se procedió a evaluar la influencia del pH de la fase acuosa en la extracción del analito. Se evaluó la extracción desde una solución stock a pH 10, 8, 6, 4 y 2.

### **Estimación del porcentaje de extracción desde solución stock.**

Se decidió evaluar cuantos procesos de extracción son necesarios para recuperar el 100% de AZD, o la cantidad más cercana posible a este valor.

### **Elección de estándar interno.**

Una vez que se establecieron las líneas generales del proceso de extracción se hizo necesaria la elección de un estándar interno para poder minimizar los errores en la metodología una vez que se comenzara a trabajar con la matriz biológica.

Para la elección de este estándar se deben considerar sus propiedades fisicoquímicas y evaluar sus propiedades cromatográficas. Las propiedades fisicoquímicas deben ser

semejantes a las del analito y sus propiedades cromatográficas deben permitir su identificación y cuantificación sin interferir con los peaks del analito.

#### **Purificación en fase sólida de solución stock.**

Para evaluar los beneficios de la purificación en fase sólida se utilizaron los cartuchos OASIS<sup>®</sup> HLB<sup>®</sup> de la empresa Waters. Se eligieron los cartuchos de 3 mL por su volumen que permite una manipulación más conveniente de las muestras.

#### **Extracciones de carne blanco (matriz).**

Se hizo una comparación entre la dosis administrada de enrofloxacino y las concentraciones de éste en la carne de un vacuno, para extrapolar los resultados a la dosis administrada de AZD. El límite inferior de cuantificación (LIC) de AZD en materia prima para la metodología analítica ensayada sería cercano a inyectar 80 µg de AZD. Suponiendo que éste es el LIC de AZD en carne de vacuno y, extrapolando con los datos de enrofloxacino, la cantidad de carne necesaria para realizar el análisis de una muestra sería de 5 g. Es por ello que para los ensayos sucesivos se tomaron 5 g de carne de vacuno para cada muestra.

#### **Purificación en fase sólida de carne blanco.**

Se ensayó la purificación en fase sólida de una muestra extraída de carne blanco bajo el esquema general de purificación de muestras que proporciona el fabricante de los cartuchos.

#### **Extracción desde la matriz biológica adicionada con solución stock de AZD y CBZ.**

Se evaluó la extracción de AZD y CBZ desde la matriz biológica trabajando con muestras que representaran el 100% (las que fueron extraídas, evaporadas y al momento de su redisolución se adicionó la solución stock que contiene AZD y CBZ) y muestras a ser extraídas (que fueron adicionadas con solución stock antes de la homogenización en Ultraturrax<sup>®</sup>).

### **Variación de solventes de homogenización y extracción.**

Se cambiaron algunos parámetros del esquema de extracción y luego se procedió a realizar la extracción desde la matriz biológica.

Basándose en una metodología de extracción de CBZ desde plasma humano, en vez de utilizar buffer fosfato a pH 6 para homogenizar la muestra se decidió probar con una solución saturada de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y comparar la eficiencia ante  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada.

Además se ensayó en paralelo extracciones con DCM: IPOH (95:5), Cloroformo: IPOH (95:5) pues la literatura describe que AZD es soluble en cloroformo.

### **Estimación del porcentaje de extracción desde la matriz biológica.**

Utilizando la información adquirida se diseñó un nuevo esquema de extracción para realizar la estimación del porcentaje de extracción.

Las muestras que representarán el 100% fueron extraídas y, antes de su evaporación se les adicionó la solución stock que contiene AZD y CBZ en las concentraciones y cantidades requeridas.

Las muestras a ser extraídas se les adicionó solución stock antes de la homogenización en Ultraturax<sup>®</sup>.

### **Selectividad, recuperación, precisión, exactitud y linealidad de la relación concentración respuesta de la metodología.**

Para evaluar estos parámetros se ensayaron las siguientes extracciones desde la matriz biológica: matriz blanco (carne blanco), muestra zero (carne blanco que fue adicionada con una solución de estándar interno antes de ser extraída), muestras al 100% de tres concentraciones (baja, media y alta) que servirán para calcular la recuperación, y extracciones a seis concentraciones crecientes.

Para evaluar la selectividad de la técnica se procesaron seis muestras de carne blanco provenientes de diferentes animales.

Para evaluar la recuperación se prepararon muestras a las que después de la extracción se les agregó solución stock. Se ensayaron tres concentraciones.

Para evaluar la relación que existe entre la respuesta del equipo y la concentración de la muestra se preparó una curva de calibración con las siguientes concentraciones: 57, 114, 228, 457, 857 y 1715  $\mu\text{g}$  de AZD A/mL.

Para evaluar la precisión y exactitud de la muestra se realizaron duplicados de las muestras para cada punto de la curva.

## Resultados.

### **Desarrollo de la metodología analítica**

Al ensayar la metodología analítica para materia prima, es decir, fase móvil compuesta por ACN: H<sub>2</sub>O (35:65), velocidad de flujo 1,00 mL/min y longitud de onda de detección de 215 nm, no hubo una separación adecuada de los peaks de AZD "A" y "B", los que salen superpuestos alrededor de los 16 min. Frente a esta dificultad se decide evaluar como influyen los parámetros cromatográficos en la separación de los peaks.

### **Estudio de parámetros cromatográficos**

#### **Polaridad de la fase móvil.**

Lo primero que se intentó fue aumentar en un 5% la proporción de agua, ACN: H<sub>2</sub>O (30:70). Como resultado se obtuvo un desplazamiento del peak hacia la derecha, es decir un aumento en el tiempo de retención. El nuevo tiempo de retención es cercano a los 28 minutos. Los peaks de AZD A y B no se separan.

Luego se probó con una fase móvil constituida por ACN: H<sub>2</sub>O (37:63). Esto produjo una disminución en los tiempos de retención, cercana a los 14 min, y una pequeña separación de los peaks de AZD A y B.

Posteriormente se trabajó con una fase móvil formada por ACN: H<sub>2</sub>O (33:67). Los tiempos de retención llegaron cerca de los 19 min pero con una separación incompleta de los peaks.

En seguida se evaluó una fase móvil constituida por ACN: H<sub>2</sub>O (40:60). El resultado fue una disminución en los tiempos de retención, cercanos a 11 min, y una separación incompleta de los peaks.

Después se probó una fase móvil formada por ACN: H<sub>2</sub>O (50:50). Nuevamente los tiempos de retención bajaron a cerca de 6 min, pero los peaks no se separaron del todo.

Es entonces cuando se decidió evaluar el efecto de un tercer solvente en la fase móvil: metanol. Se ensayó con una fase constituida por ACN: MeOH: H<sub>2</sub>O (30:3:67). El tiempo de retención llegó a los 31 min pero no se logró separar completamente los peaks de AZD A y B.

A continuación se probó una fase móvil formada por ACN: MeOH: H<sub>2</sub>O (23:10:67). El resultado fue poco satisfactorio, un tiempo de retención de 50 min y un solo peak para ambas Azadiractinas.

Antes de evaluar la influencia del pH en la separación de los peaks se decidió trabajar con la fase ACN: H<sub>2</sub>O (33:67) ya que dio tiempos de retención aceptables para ensayos con matrices biológicas.

#### **pH de la fase móvil.**

Para evaluar la influencia del pH básico de la fase móvil en la separación de los peaks de AZD se ajustó a pH 8 con NaOH 1N. La separación de los peaks no presenta un cambio importante.

Para probar la influencia de un pH ácido, se ajustó a pH 5 con ácido fosfórico 1N la mencionada fase. Si bien se logró una mayor separación de éstos, no llegó a ser completa.

Luego se procedió a llevar la fase hasta pH 3 con ácido fosfórico 1N. Se logró una mayor separación de los peaks sin ser completa.

Siendo a pH 3 cuando se logró una mejor separación de los peaks, se decidió trabajar a este pH para evaluar el parámetro cromatográfico siguiente.

### **Fuerza iónica.**

La fase móvil ensayada estaba compuesta por ACN: Buffer Biftalato de K 0,02M a pH 3 (33:67). Al preparar la fase móvil no se apreciaron incompatibilidades y, para asegurar la integridad de los pistones, se filtró la fase. Cuando se ambientó el cromatógrafo con esta fase móvil, el equipo no fue capaz de compensar línea base presentando una absorbancia de 1,700 U.A. Se midió la absorbancia a 215 nm de la fase móvil con Buffer Biftalato de K utilizando como blanco ACN: H<sub>2</sub>O (33:67) el equipo entregó una lectura que varió entre 2,8 y 3,0 U.A.

Como conclusión se determinó que el Buffer Biftalato de K 0,02M a pH 3 no es viable como constituyente de la fase móvil.

Luego se cambió el tamponante y la fase móvil quedó constituida por ACN: Buffer Citrato de Na 0,02M a pH 3 (33:67). Nuevamente no se observaron incompatibilidades pero para mayor seguridad del equipo y la columna se filtró.

Al trabajar con esta fase móvil no se observó un aumento significativo en la separación de los peaks de AZD A y B pero se siguieron evaluando los parámetros cromatográficos utilizando esta solución.

### **Temperatura.**

Cuando se aumentó la temperatura, aumentó la separación de los peaks de AZD A y B, encontrándose a 45 °C una separación completa de los peaks permitiendo una identificación y cuantificación de ambas Azadiractinas a esta temperatura.

Se decidió trabajar a 45 °C para evaluar los parámetros restantes.

### **Modificación de la fase móvil por posible cambio de detector.**

Pensando en un posible cambio de detector y, como habiendo probado ya la extracción desde la matriz biológica se ha encontrado interferencia de ésta con los peaks del analito y del estándar interno, se evaluó la separación de los peaks de AZD A y B en una fase móvil compuesta por ACN: H<sub>2</sub>O (30:70) a 45 °C.

Se utilizó esta fase móvil pues permitirá cambiar de detector sin mayores inconvenientes y aumentó los tiempos de retención de CBZ y AZD lo que permitió una mejor separación de los interferentes propios de la matriz biológica.

Cuando se ensayó esta fase móvil a la temperatura indicada se logró una separación total de los peaks de AZD A y B con tiempos de retención cercanos a 29 min.

### **Longitud de onda de detección.**

Los cromatogramas ensayados a 240 nm muestran una reducción de área muy grande: sólo exhibe un 40% del área a 215 nm.

Los cromatogramas ensayados a 230 nm presentan una reducción de área menor, muestran áreas de un 70% del área a 215 nm.

Sin embargo, los peaks de interferencia no disminuyen significativamente por lo cual se decidió mantener la longitud de onda en 215 nm.

### **Variación de la fase móvil por presencia de interferentes.**

Como los cromatogramas exhibieron peaks de interferencia en la zona cercana al estándar interno y analitos se decidió modificar la fase móvil para aumentar los tiempos de retención y distanciar los analitos de los interferentes. Se varió a una proporción ACN: H<sub>2</sub>O (27,5:72,5)

**Condiciones cromatográficas finales.**

Después de haber realizado una evaluación de los parámetros cromatográficos, se fijaron las condiciones analíticas para la metodología de cuantificación de Azadiractina:

Columna:	Waters® Symmetry® C <sub>18-c</sub> 250 x 4,6.
Fase móvil:	Acetonitrilo: H <sub>2</sub> O (27,5:72,5)
Velocidad de flujo:	1,00 mL/min.
Longitud de onda:	215 nm.
Temperatura:	45 °C.

## Desarrollo de la metodología de extracción.

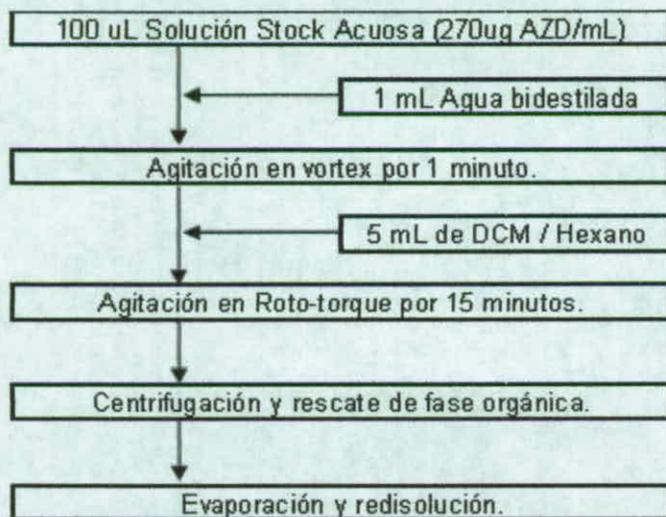
Lo primero fue evaluar la eficiencia de los posibles solventes de extracción desde una solución stock de AZD en agua bidestilada. Los solventes evaluados fueron diclorometano, hexano y cloroformo.

Se preparó una solución stock de AZD en MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10) de tal manera que contuviera alrededor de 270 µg/ml de AZD A. Esta fue llamada solución A.

### Esquema de extracción en solución stock.

Se propuso el siguiente esquema de extracción.

Figura 2: Esquema de extracción desde solución stock.



Se debe tomar una solución hidroalcohólica de AZD pues el analito es insoluble en agua. Se adicionaron 5 mL de diclorometano, a un grupo, y 5 mL de hexano, a otro. El extracto seco se redisolvió con 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtró por Swinnex<sup>®</sup> e inyectó al cromatógrafo.

Si bien se apreció una mayor recuperación con diclorometano, el trabajar con hexano también es factible por lo que se decidió evaluar la influencia del pH en la extracción con ambos solventes.

Figura 3: Porcentajes de recuperación con DCM y Hexano.

Solvente	% de Extracción
DCM	74,0%
Hexano	70,0%

#### **Influencia del pH de la fase acuosa.**

La solución acuosa de AZD presenta pH 6, por lo cual no fue necesario modificarlo para su evaluación. Para llevar a pH 8 y 10 se utiliza una solución de NaOH 0,1 N y para llevar a pH 2 y 4 se utiliza una solución de HCl 0,1 N.

Una vez ajustado el pH de la solución acuosa de AZD se procedió a la extracción con diclorometano y hexano utilizando en esquema antes mencionado.

Al no haber una diferencia significativa en los porcentajes de extracción a los diferentes pH se decidió trabajar a pH 6. Se realizaron ensayos con una solución buffer fosfato a pH 6 y finalmente se optó por trabajar solo con H<sub>2</sub>O bidestilada que, junto con la matriz biológica, presenta pH 6.

#### **Estimación del porcentaje de extracción desde solución stock.**

Para la evaluación de este parámetro se probó la recuperación con un ciclo de extracción, con dos ciclos y finalmente con tres ciclos.

Figura 4: Tabla de resultados porcentajes de extracción por número de ciclos.

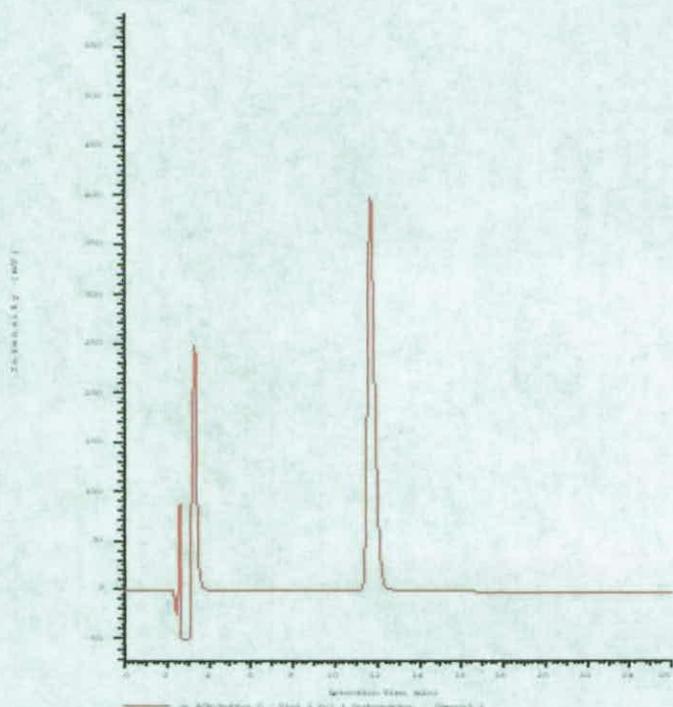
Nº de ciclos	% de Extracción
1	74,0%
2	92,5%
3	98,0%

Cuando se llega a tres ciclos de extracción se obtuvo un porcentaje de extracción de 98%.

#### **Elección del estándar interno.**

Considerando las propiedades fisicoquímicas del analito se pensó en utilizar Carbamazepina (CBZ) como estándar interno por ser una molécula de carácter ácido – base neutro, insoluble en agua y soluble en MeOH.

Figura 5: Cromatograma de una solución de CBZ 200 µg/mL.

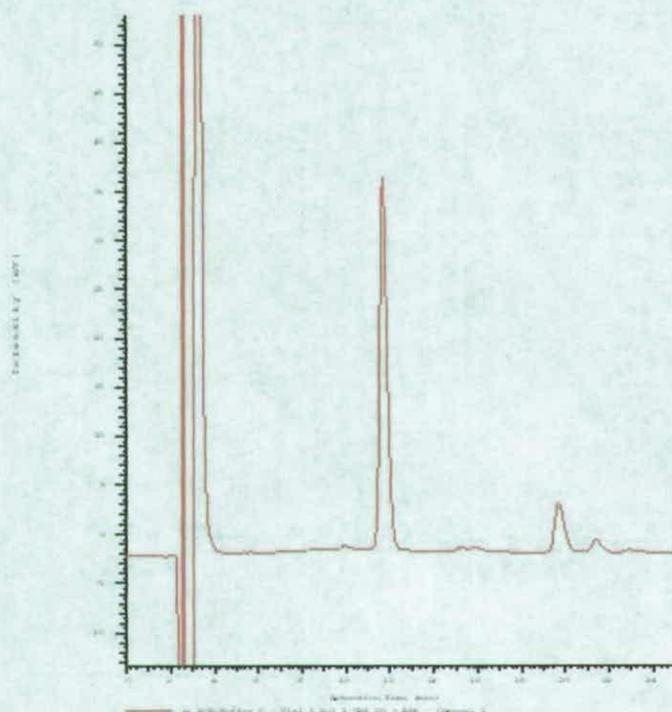


Para la evaluación de sus propiedades cromatográficas se preparó una solución que contenía 30 µg/mL de CBZ. Se tomaron 10 mL de ésta, se adicionaron 10 mL de una solución que contenía 280 µg/mL de AZD A y se llevó a un volumen final de 50 mL con MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10).

Cuando se realizó una cromatografía de la solución así preparada, en las condiciones cromatográficas establecidas para el análisis de AZD, CBZ presenta un peak bien

definido y en un tiempo de retención cercano a los 16 minutos, que no interfiere con AZD.

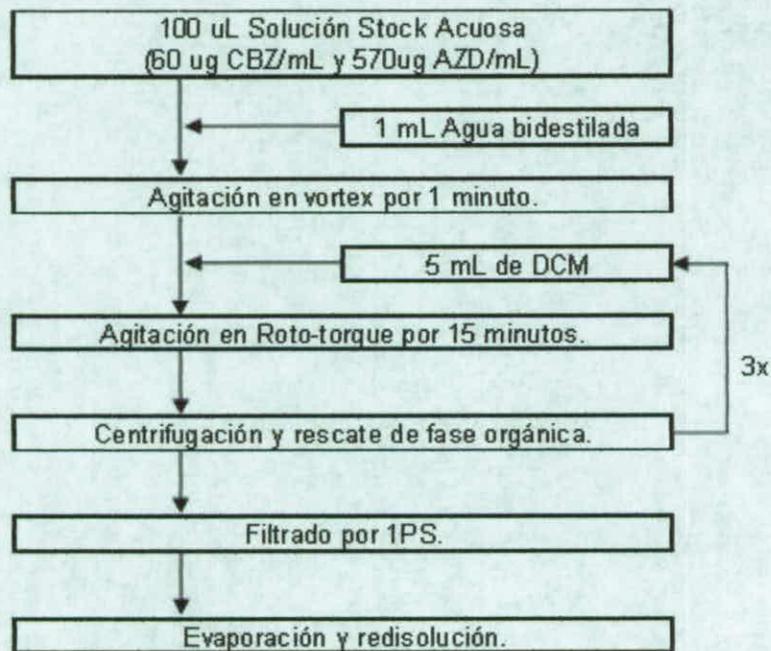
Figura 6: Cromatograma de una solución de CBZ 20  $\mu\text{g/mL}$  y AZD MP 200  $\mu\text{g/mL}$ .



Sin embargo, por estar trabajando con AZD MP en vez de estándar de AZD, el cromatograma exhibió varios peaks de interferencia. Se decidió evaluar si esta interferencia persistía después del proceso de extracción.

Para ello se realizó el siguiente procedimiento:

Figura 7: Esquema de extracción y filtrado de una solución stock de CBZ y AZD.



El extracto seco fue redisolto con 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtrado por Swinnex<sup>®</sup> e inyectado al cromatógrafo.

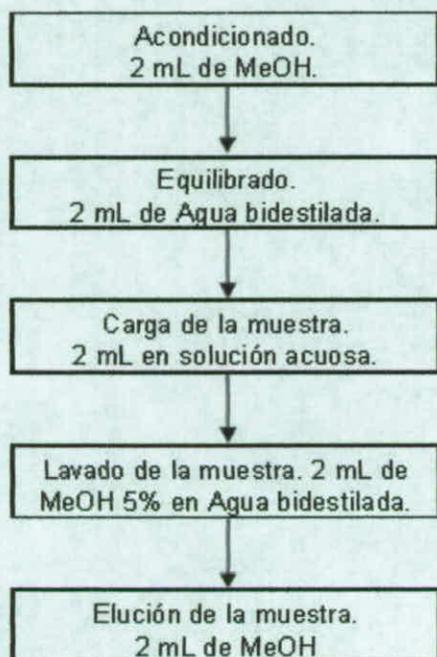
Como la solución presentó varios peaks de interferencia se decidió evaluar la viabilidad de la purificación en fase sólida.

#### **Purificación en fase sólida de solución stock.**

Para purificar las muestras se tomaron éstas una vez evaporado el extracto orgánico. Luego fueron redisueltas en 250 µL de MeOH el que luego es concentrado a una gota. Después se adicionaron 2 mL de H<sub>2</sub>O para luego pasar esta solución por el cartucho de purificación.

La muestra fue tratada según la metodología general de purificación de los cartuchos:

Figura 8: Esquema general de purificación de muestras en cartuchos OASIS®.



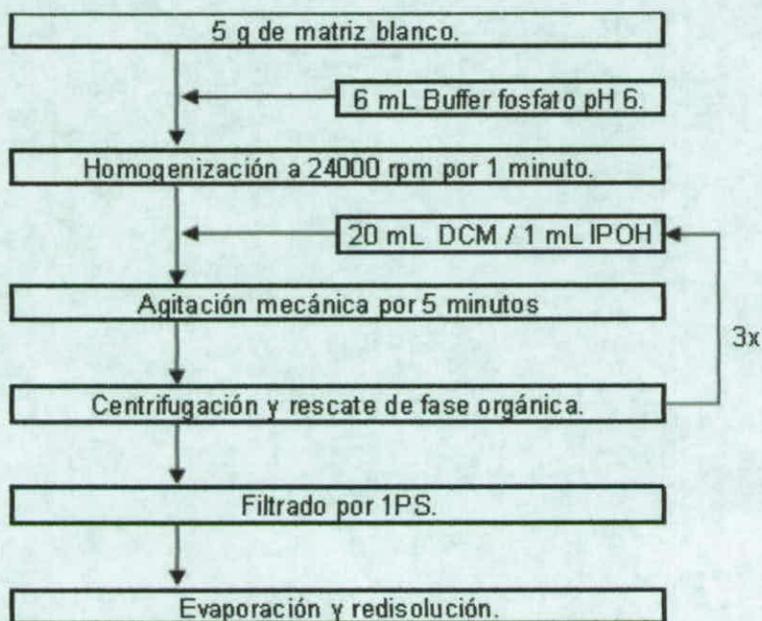
El eluido fue llevado a sequedad en baño termostático a 40 °C con corriente de nitrógeno, redissuelto en 1 mL de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtrado por Swinnex® e inyectado al cromatógrafo.

Una vez que se hubo comprobado una recuperación satisfactoria del analito y estándar interno, junto con una remoción de los interferentes de la materia prima, se procedió a realizar la extracción desde carne para ver las interferencias de la matriz.

### Extracción de carne blanco (matriz).

La extracción desde la matriz blanco se realizó de la siguiente manera:

Figura 9: Esquema de extracción desde carne 1.



Las muestras fueron redisueltas en 500  $\mu$ L de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtradas por Swinnex® e inyectadas al cromatógrafo.

### Purificación en fase sólida de carne blanco.

En paralelo se trabajó la purificación de la matriz blanco. Se realizó el mismo proceso de extracción antes descrito hasta la evaporación del extracto orgánico. Luego el extracto seco se disolvió en 1 mL de MeOH, se concentró hasta una gota en baño termostático a 40 °C con corriente de nitrógeno, se adicionaron 2 mL de H<sub>2</sub>O y se purificó la muestra con el protocolo general de purificación de los cartuchos OASIS® HLB®. La muestra purificada se llevó a sequedad en baño termostático a 40 °C con corriente de nitrógeno y se redisolvió en 500  $\mu$ L de MeOH: H<sub>2</sub>O (90:10), filtró por Swinnex® e inyectó al cromatógrafo.

El resultado de la purificación no fue satisfactorio, la muestra saturó el cartucho a tal punto que apenas fue posible eluirlo.

### **Estimación del porcentaje de extracción desde la matriz biológica.**

Para realizar esta evaluación se utilizó el siguiente protocolo de extracción:

Figura 10: Esquema de extracción desde carne 2.

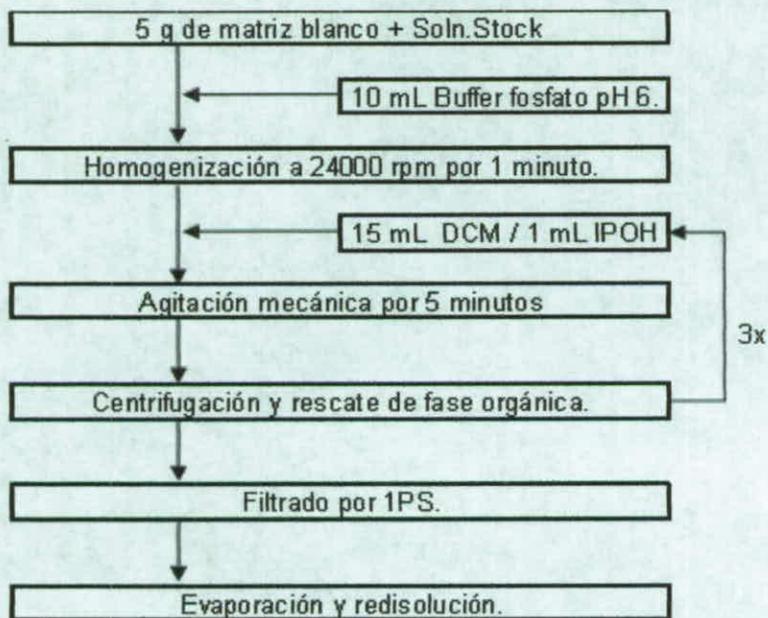
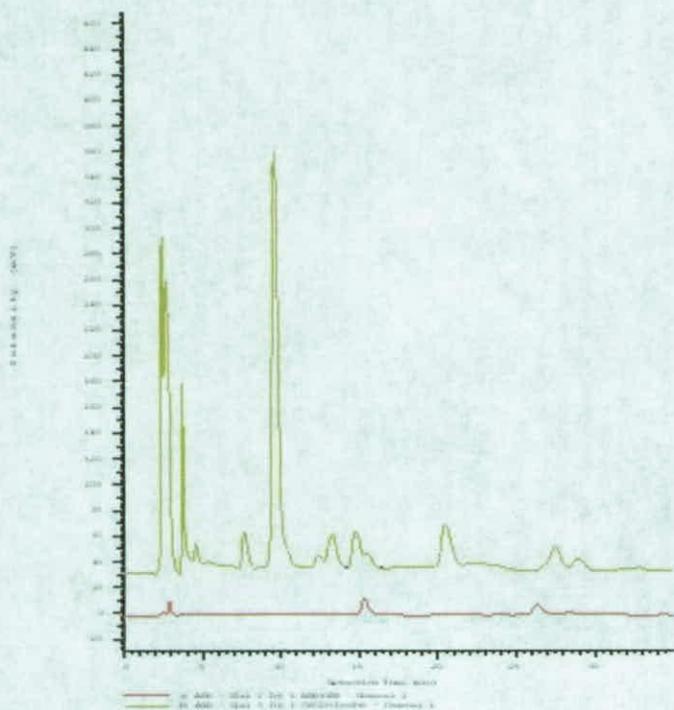




Figura 12: Cromatograma comparado de solución stock (abajo) vs. extracción matriz blanco (arriba).







### Variación de solventes de extracción y homogenización.

Utilizando el equipo Ultraturrax® para realizar la agitación durante la extracción, se evaluó DCM: IPOH (95:5) versus Cloroformo: IPOH (95:5) como solventes de extracción y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> versus H<sub>2</sub>O bidestilada como solvente de homogenización.

Cuando se compararon las extracciones con cloroformo versus extracciones con DCM, todas las extracciones refirieron el mismo porcentaje de recuperación para los analitos. Sin embargo, las extracciones con DCM presentaron menor cantidad de interferentes comparada con cloroformo.

Figura 15: Cromatograma comparado de extracción con cloroformo vs. DCM utilizando como solvente de homogenización NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Solución stock (abajo), DCM (centro) y Cloroformo (arriba).

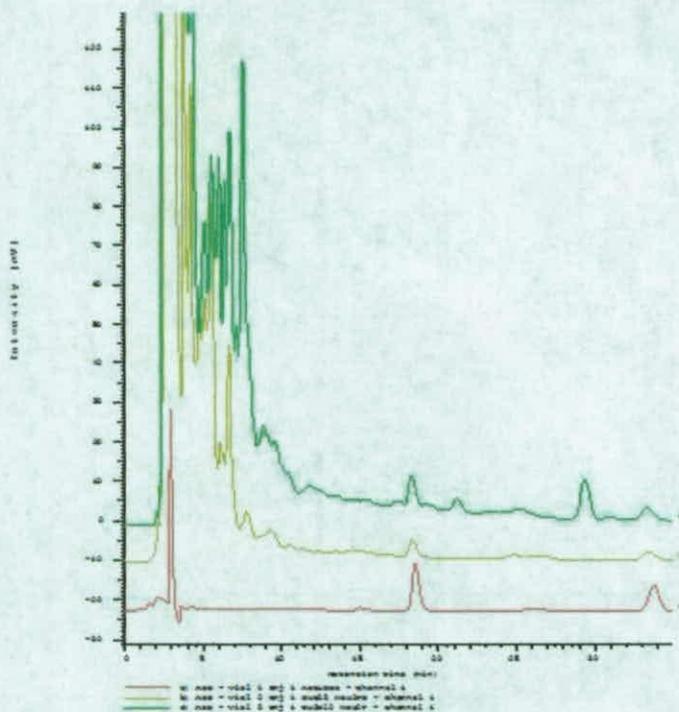
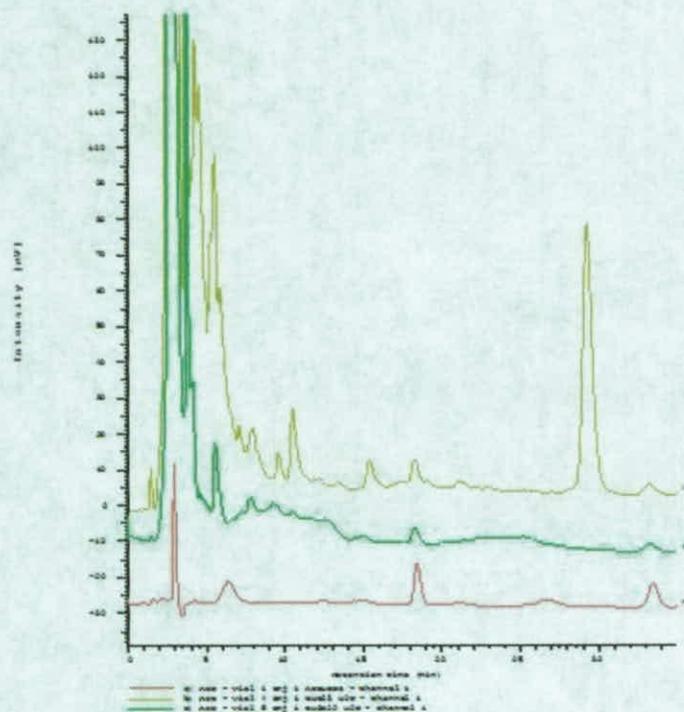


Figura 16: Cromatograma comparado de extracción con cloroformo vs. DCM utilizando como solvente de homogenización H<sub>2</sub>O. Solución stock (abajo), DCM (centro) y Cloroformo (arriba).



Cuando se compararon las extracciones realizadas con la solución saturada de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  versus las extracciones realizadas con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, la solución saturada de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  no ofreció ventajas comparativas en cuanto a la eficiencia de la extracción.

Figura 17: Cromatograma comparado de extracción con DCM utilizando como solvente de homogenización  $\text{H}_2\text{O}$  (arriba) vs.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (abajo).

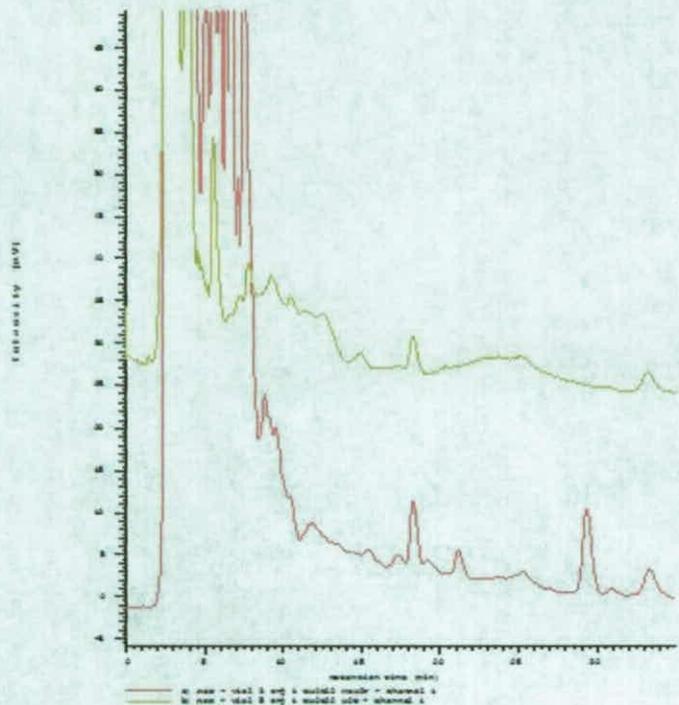
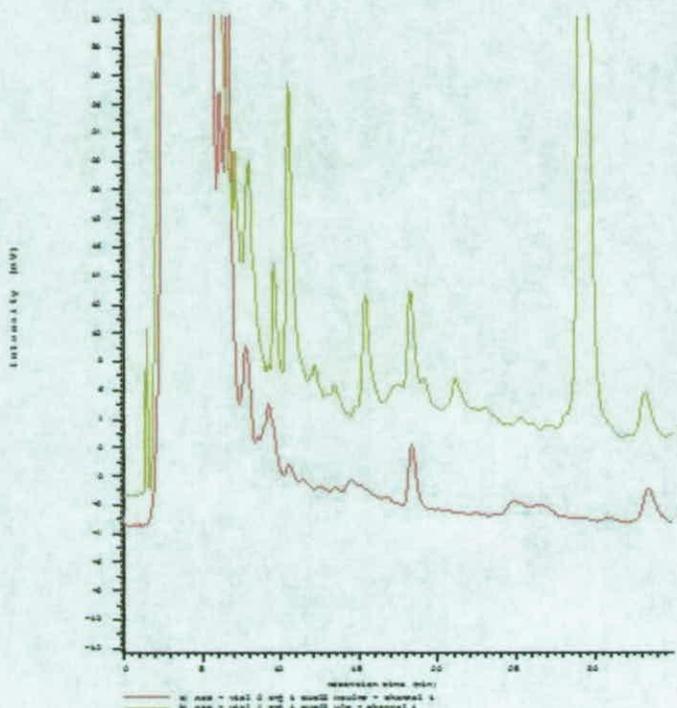


Figura 18: Cromatograma comparado de extracción con cloroformo utilizando como solvente de homogenización H<sub>2</sub>O (arriba) vs. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (abajo).



Finalmente se evaluaron tres extracciones con 16 mL de DCM versus cuatro extracciones con 10 mL de DCM, siendo esta última la más eficiente.

Figura 19: Comparación de los porcentajes de extracción de 16 mL × 3 extracciones vs. 10 mL × 4 extracciones.

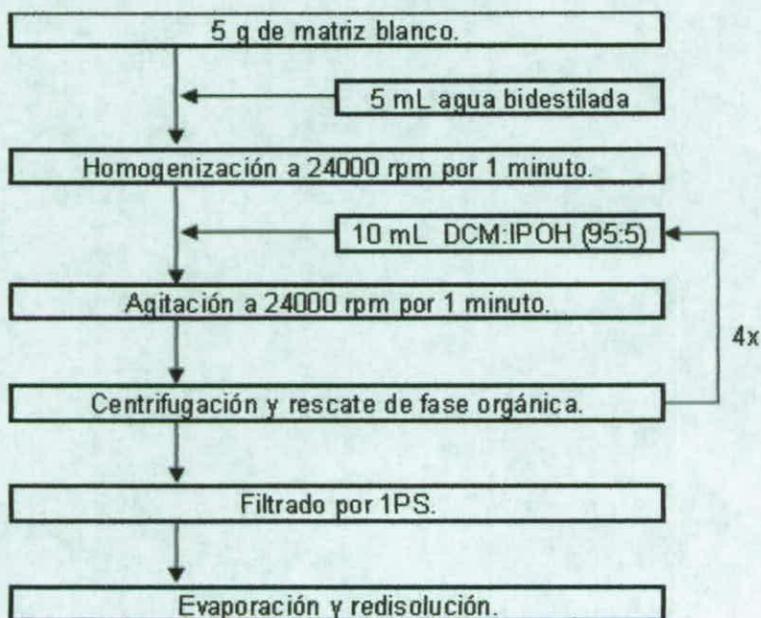
Extracciones	% de Extracción
16 mL × 3	96,0%
10 mL × 4	99,0%

Como ventaja adicional, el realizar la homogenización y agitación con el mismo equipo permitió disminuir el volumen de agua adicionado a la muestra, siendo suficiente 5 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada.

### Esquema final de extracción desde la matriz biológica.

A la luz de la información adquirida fue necesario modificar el esquema de extracción para AZD desde músculo de vacuno. El nuevo esquema de extracción fue:

Figura 20: Esquema de extracción de AZD desde músculo de vacuno.



Las muestras blanco fueron tratadas utilizando el esquema antes presentado. Las muestras al 100% fueron extraídas y antes de su evaporación se adicionó 50  $\mu$ L de solución stock. Las muestras extraídas fueron adicionadas con 50  $\mu$ L de solución stock antes de la homogenización.

Las muestras así preparadas fueron utilizadas para construir una curva de calibración y evaluar selectividad, recuperación, precisión, exactitud y la relación concentración respuesta de ésta metodología.

**Selectividad, recuperación, precisión, exactitud y linealidad de la relación concentración respuesta de la metodología.**

Para asegurar la selectividad de la metodología, basándose en los criterios de la FDA para validación de metodologías bioanalíticas, es necesario evaluar si los compuestos propios de la matriz interfieren con el(los) analito(s) y/o con el estándar interno. Este ensayo se recomienda hacerlo a lo menos con seis matrices diferentes.

Al evaluar seis matrices distintas, se compró posta rosada de vacuno en seis lugares diferentes. Se encontró que la matriz posee los siguientes peaks en los tiempos de retención de los analitos y estándar interno:

Figura 21: Áreas de los peaks endógenos de la matriz que podrían interferir con la metodología, muestra zero y extracción a la menor concentración.

	BLANCO		Zero		CONC. 1	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
CBZ	20,67	53410	20,11	283451	19,98	219810
	20,60	28623	20,07	251269	19,93	255193
	20,57	14741	20,04	278765	19,89	285288
	20,49	7862			19,87	281902
	20,44	10522			19,83	267102
	20,43	77557				
AZDA	38,19	301860			37,88	243483
	38,08	56823			37,75	248028
	38,08	11305			37,63	278115
	37,97	127836			37,45	322757
	37,99	71071			37,31	306041
	37,91	5523				
AZD B	40,99	8613			40,40	37106
	40,63	15609			40,21	40286
	40,47	13020			40,09	58616
	40,25	6172			39,96	49179
	40,15	5883			39,76	52221

Los datos en gris corresponden a los datos de la matriz con que se realizó el resto de los ensayos.

Si bien existen peaks de interferencia que podrían alterar los resultados, no existe interferencia sobre AZD B, la interferencia sobre AZD A no es significativa y la interferencias sobre CBZ fue restada para el análisis de los datos pues CBZ posee la misma concentración en todas las muestras y se tiene el valor del peak de CBZ solo.

Los resultados para el cálculo de la recuperación son:

Figura 22: Cálculo del porcentaje de recuperación.

	CONC. 1			CONC 3			CONC 6		
	100%	Extracción	% Recup.	100%	Extracción	% Recup.	100%	Extracción	% Recup.
CBZ	342106,00	261859,00	77%	312483,33	315042,50	101%	375750,00	397168,00	106%
AZD A	252562,33	279884,80	111%	1120238,67	1254684,00	112%	9584700,33	10159819,00	106%
AZD B	22137,33	47481,80	214%	329017,00	373396,00	113%	3010995,00	3169158,50	105%

Al evaluar la relación concentración respuesta se encontraron los siguientes resultados:

Figura 23: Áreas curva de calibración y puntos control.

		Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6
CBZ	CC	217798	246065	183855	216341	233133	266181
	Control	192639	214533	252300	252461	161146	306589
	Control	190321	203368	222468	268371	213990	269007
	Promedio	200252,67	221322,00	219541,00	245724,33	202756,33	280592,33
	Des. Est.	15238,84	22143,31	34316,25	26661,16	37285,10	22558,07
	C.V.	7,61%	10,01%	15,63%	10,85%	18,39%	8,04%
AZD A	CC	188297	461329	720489	1721911	3443271	6454697
	Control	169913	397144	1008313	2051454	2110826	7575484
	Control	154375	430353	901880	2159630	2723337	6908272
	Promedio	170861,67	429608,67	876894,00	1977665,00	2759144,67	6979484,33
	Des. Est.	16980,89	32098,97	145529,68	227998,01	666943,82	563776,79
	C.V.	9,94%	7,47%	16,60%	11,53%	24,17%	8,08%
AZD B	CC	18979	104952	199175	573835	1157254	2105980
	Control	12863	89760	329305	681037	698896	2461488
	Control	12662	107445	243318	720045	898134	2247768
	Promedio	14834,67	100719,00	257266,00	658305,67	918094,67	2271745,33
	Des. Est.	3590,50	9572,28	66176,77	75709,16	229830,01	178962,76
	C.V.	24,20%	9,50%	25,72%	11,50%	25,03%	7,88%

Además se decidió evaluar la estabilidad de las muestras en el AutoSampler. Para ello se realizo una extracción de la solución más concentrada, se redisolvió en un volumen mayor y se inyectó un volumen menor, los resultados fueron los siguientes:

Figura 24: Áreas extracción concentración 6 diluida.

	Conc. 6 Diluida	
	RT	Area
CBZ 1	20,21	149449
CBZ 2	19,59	173754
Promedio	19,90	161601,50
Des. Est.	0,44	17186,23
C.V.	2,20%	10,63%

AZD A 1	38,75	4754046
AZD A 2	36,12	5277449
Promedio	37,44	5015747,50
Des. Est.	1,86	370101,81
C.V.	4,97%	7,38%

AZD B 1	41,27	1476316
AZD B 2	38,55	1593962
Promedio	39,91	1535139,00
Des. Est.	1,92	83188,28
C.V.	4,82%	5,42%

Como se puede apreciar, por el largo tiempo que demora una corrida cromatográfica, las muestras tienden a concentrarse. Además para evitar problemas de manejo de las muestras, sobre todo al momento de rescatar la fase orgánica, se decidió trabajar en función de la relación de áreas.

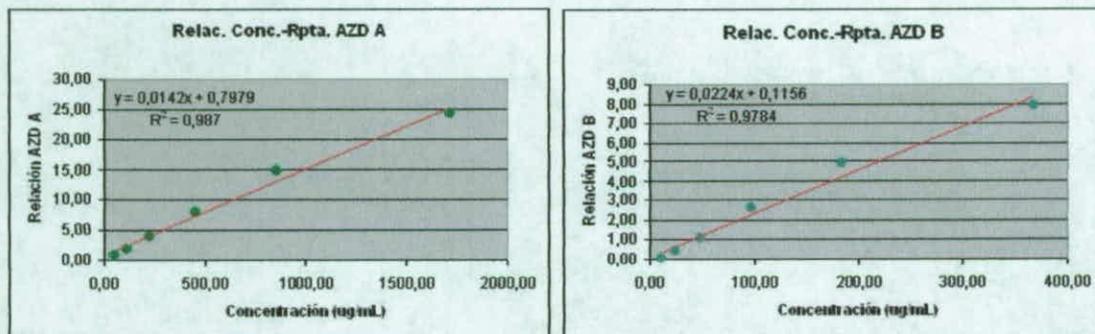
Los resultados fueron:

Figura 25: Relación de áreas curva calibración y puntos control.

		Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5	Conc. 6
AZD A	CC	0,86	1,87	3,92	7,96	14,77	24,25
	Control	0,88	1,85	4,00	8,13	13,10	24,71
	Control	0,81	2,12	4,05	8,05	12,73	25,68
	Promedio	0,85	1,95	3,99	8,04	13,53	24,88
	Des. Est.	0,04	0,15	0,07	0,08	1,09	0,73
	C.V.	4,33%	7,53%	1,70%	1,04%	8,04%	2,94%
AZD B	CC	0,09	0,43	1,08	2,65	4,96	7,91
	Control	0,07	0,42	1,31	2,70	4,34	8,03
	Control	0,07	0,53	1,09	2,68	4,20	8,36
	Promedio	0,07	0,46	1,16	2,68	4,50	8,10
	Des. Est.	0,01	0,06	0,13	0,02	0,41	0,23
	C.V.	16,10%	13,38%	10,79%	0,86%	9,08%	2,84%

Luego la curva de calibración fue:

Figura 26: Curva de calibración para AZD A y B



Para evaluar la precisión y exactitud de la metodología se realizó el análisis de los duplicados de cada punto y la concentración teórica que posee cada muestra al interpolar los datos en la ecuación de la recta que describe la relación concentración-respuesta del equipo.

Figura 27: Evaluación de resultados, puntos control.

Azadiractina A						Azadiractina B					
Concentración Real	Relación de Área	Concentración Calculada	Promedio	D.S.	C.V.	Concentración Real	Relación de Área	Concentración Calculada	Promedio	D.S.	C.V.
57,2	0,88	5,9				12,3	0,07	-2,2			
57,2	0,81	0,9	3,4	3,5	102,99%	12,3	0,07	-2,2	-2,2	0,0	-0,35%
114,3	1,85	74,2				24,5	0,42	13,5			
114,3	2,12	92,8	83,5	13,2	15,8%	24,5	0,53	18,4	16,0	3,5	21,73%
228,7	4,00	225,3				49,0	1,31	53,1			
228,7	4,05	229,3	227,3	2,9	1,3%	49,0	1,09	43,7	48,4	6,7	13,80%
457,3	8,13	516,1				98,0	2,70	115,3			
457,3	8,05	510,5	513,3	3,9	0,8%	98,0	2,68	114,6	114,9	0,5	0,40%
857,5	13,10	866,3				183,8	4,34	188,5			
857,5	12,73	840,0	853,2	18,5	2,2%	183,8	4,20	182,2	185,3	4,4	2,38%
1715,1	24,71	1683,9				367,5	8,03	353,3			
1715,1	25,68	1752,3	1718,1	48,4	2,8%	367,5	8,36	367,9	360,6	10,3	2,86%

Figura 28: Evaluación del error en la interpolación de datos en la curva de calibración.

AZD A						
Real	57,2	114,3	228,7	457,3	857,5	1715,1
Teórico	5,9	74,2	225,3	504,3	866,3	1683,9
Error	0,9	92,8	229,3	510,5	840,0	1752,3
	-89,64%	-35,13%	-1,50%	10,27%	1,02%	-1,82%
	-98,37%	-18,81%	0,27%	11,62%	-2,04%	2,17%
AZD B						
Real	12,3	24,5	183,8	98,0	183,8	367,5
Teórico	-2,2	13,5	53,1	115,3	188,5	353,3
Error	-2,2	18,4	43,7	114,6	182,2	367,9
	-117,79%	-44,83%	-71,10%	17,62%	2,56%	-3,88%
	-117,88%	-24,80%	-76,24%	16,95%	-0,84%	0,10%

Finalmente los cromatogramas para carne blanco, carne zero, extracción de concentración 57 µg/mL, extracción de concentración 228 µg/mL y extracción 1715 µg/mL serian:

Figura 29: Cromatograma carne blanco.

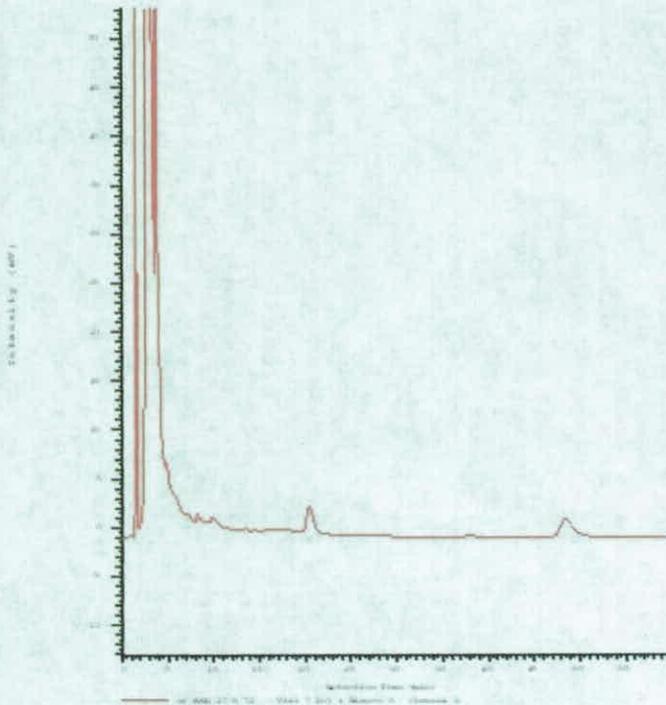


Figura 30: Cromatograma carne zero.

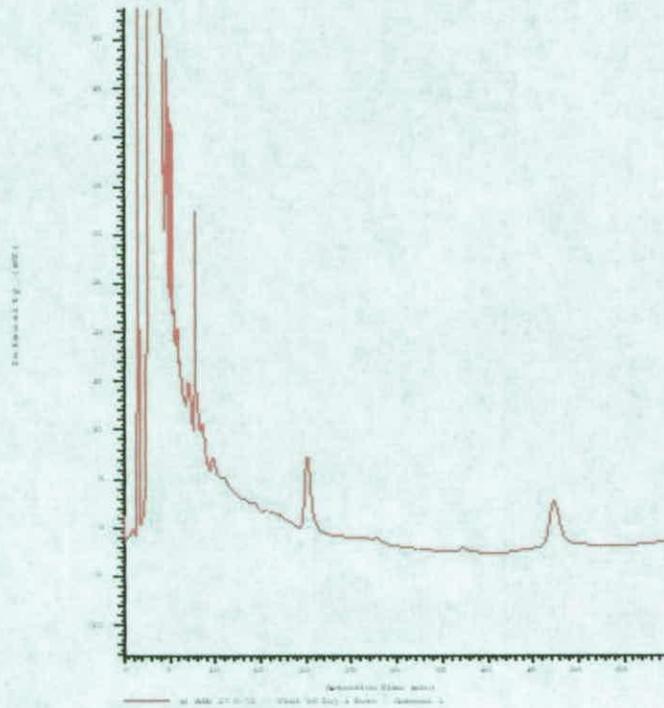


Figura 31: Cromatograma extracción concentración 1.

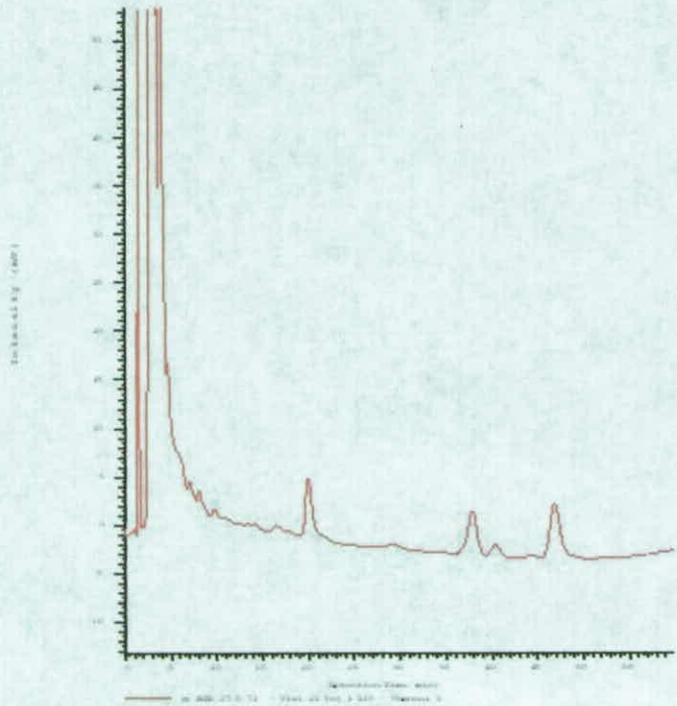


Figura 32: Cromatograma extracción concentración 3.

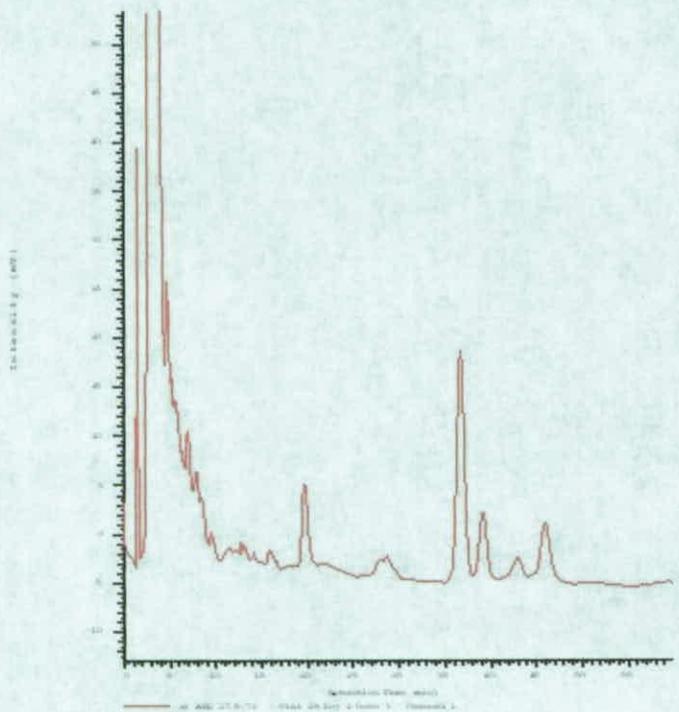
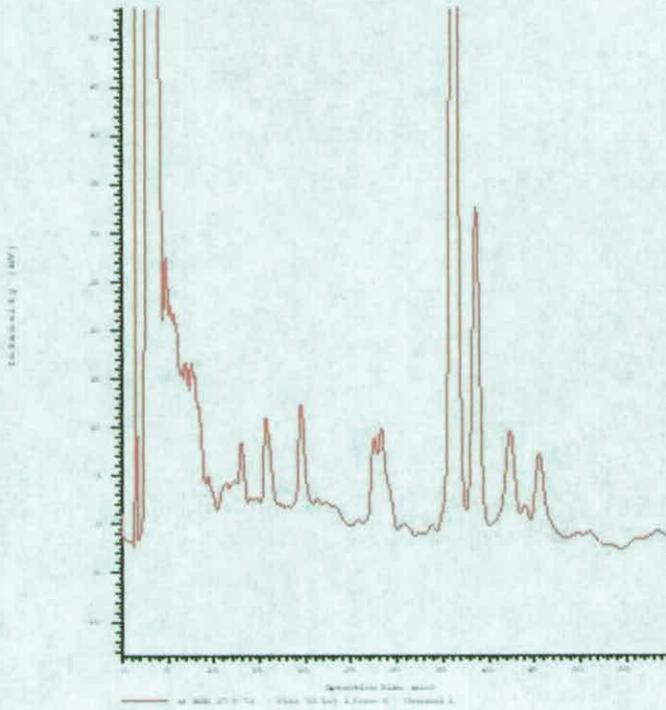


Figura 33: Cromatograma extracción concentración 6.



## Conclusiones.

### **Metodología analítica.**

Durante este estudio se desarrolló una técnica analítica que permite identificar y cuantificar Azadiractina en músculo de vacuno de manera precisa y exacta.

Se determinó que existen tres puntos que son críticos para esta metodología: La polaridad de la fase móvil, la temperatura de trabajo y la longitud de onda de detección, siendo este último punto el menos relevante de los tres.

La polaridad de la fase móvil es muy importante en esta metodología pues el analito es muy sensible a los cambios de polaridad de ésta. Una pequeña variación en la proporción de ACN en la fase móvil genera grandes cambios en los tiempos de retención de los analitos (AZD A y B).

Trabajar a una temperatura de 45° C es fundamental para esta técnica pues es a esta temperatura que se logra una separación satisfactoria de los peaks de AZD A y B. No obstante, se debe tener presente que al aumentar la cantidad de AZD inyectada al HPLC, aumentan las áreas de ambos peaks y, por lo tanto, se disminuye la separación de éstos.

La longitud de onda también es importante pues al aumentarla, disminuyen las áreas de los peaks de los analitos.

También se estableció que el pH de la fase móvil y la fuerza iónica de ésta no son parámetros determinantes para la técnica analítica. Si bien esto era lo esperable, por las propiedades fisicoquímicas de los analitos, se debía asegurar que fuera así.

Este conocimiento permite realizar modificaciones al pH y fuerza iónica de la fase móvil para eliminar peaks de interferencia del cromatograma sin alterar la señal de los analitos.

### **Metodología de extracción.**

En este estudio se desarrolló una técnica de extracción que permite recuperar alrededor de 100% de Azadiractina desde músculo de vacuno.

Cuando se realizaron las pruebas de extracción sobre la solución stock, se tenía por finalidad caracterizar el comportamiento de los analitos frente a diferentes pH y establecer si los cartuchos OASIS<sup>®</sup> HLB<sup>®</sup> prestaban alguna utilidad para purificar la muestra.

Se estableció que variar el pH de la solución acuosa no presentaba ventajas comparativas durante el proceso de extracción. Si bien esto era lo esperado, por la característica ácido – base neutra del analito, debía ser confirmado para una eventual aplicación práctica tendiente a eliminar interferentes.

La purificación en fase sólida es viable para las extracciones desde una solución stock pero no para extracciones desde la matriz biológica, pues obstruye los cartuchos impidiendo la elusión de las muestras.

Al realizar los ensayos con la matriz biológica, se encontraron algunos puntos interesantes:

- La muestra no debe ser trabajada en tubos de polipropileno pues el analito se adsorbe sobre este material.
- Las jeringas, Swinnex<sup>®</sup> y puntas de micropipetas no adsorben el analito.
- Al trabajar la muestra en tubos de vidrio se debe agitar la muestra con Ultraturrax<sup>®</sup> para realizar la extracción y así evitar poner en contacto el solvente de extracción con los sellos de las tapas rosca de los tubos, pues contaminan la muestra.
- Las puntas de las micropipetas, jeringas, Swinnex<sup>®</sup>, filtros IPS y solventes de extracción, homogenización y disolución, no ceden interferentes.

- Al trabajar con DCM se obtienen cromatogramas con menos interferencias que al trabajar con cloroformo.
- Utilizar una solución saturada de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  no presenta ventajas comparativas a trabajar con agua bidestilada como solvente de homogenización.

Al ensayar una curva de calibración se encontró:

- Las muestras blanco no presentan peaks de gran interferencia en la zona del estándar interno.
- Algunas muestras blanco presentan peaks de interferencia importante en la zona de AZD A. Esto podría indicar que el ganado está siendo suplementado con AZD.
- Ninguna muestra blanco exhibe peaks en la zona de AZD B.
- Al evaluar la eficiencia del proceso de extracción, los valores de porcentaje de extracción en la concentración más baja, son superiores al 100%. Estos resultados se explican por estar trabajando dentro del límite de detección de la técnica pero bajo el límite de cuantificación. Cuando se estudian estos resultados a concentraciones más altas ( 3 y 6) se observa una recuperación completa de los analitos y del estándar interno.
- Las muestras a inyectar, por encontrarse disueltas en  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (90:10), tienden a concentrarse. Es por esto y por los errores de manipulación al rescatar la fase orgánica, que se debe trabajar en función de la relación de áreas.

$$RA = \frac{\text{Área Analito}}{\text{Área Estándar Interno}}$$

- La respuesta del equipo a las concentraciones ensayadas es lineal tanto para AZD A como para AZD B.
- Se logra trabajar con precisión y exactitud a concentraciones superiores a 228  $\mu\text{g/mL}$  de AZD A y 49  $\mu\text{g/mL}$  de AZD B. A esas mismas concentraciones se

obtiene un bajo error de interpolación de resultados. Es por ello que este punto se establece como límite inferior de cuantificación.

Es importante señalar que aún no está clara la dosis de extracto de *Azadirachta indica* que se administrará al ganado bovino, la cantidad de AZD que se encontrará en el tejido muscular de los vacunos ni el límite máximo de residuos que se fijará para este quimioterápico.

La técnica de extracción y analítica desarrollada en el transcurso de esta tesis es una metodología validable y fue desarrollada pensando en un posible cambio de equipo de detección.

Una vez que se establezca la dosis de extracto a ser administrada, se podrá evaluar la viabilidad de la técnica aquí expuesta para realizar la cuantificación de AZD A y B en músculo de vacuno, para realizar los ajustes necesarios y someterla a la validación definitiva.





**“Desarrollo de un sistema de control de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans* (L.)) mediante la utilización del extracto del árbol *Azadirachta indica* (Neem) en rebaños productores de carne bovina”**

Centro de Educación y Tecnología  
Facultad de Química y Farmacia U de Chile  
Agrícola Palomar  
Marzo 2009

**Objetivo General**

■ “Diseño de un sistema de control de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans* (L.)) mediante la implementación y evaluación de la administración oral de extracto de Neem, (azadirachtin) para regular las poblaciones de *H. irritans* en sistemas de producción de carne bovina.”

**Objetivos Específicos**

1. Desarrollar una crianza artificial del díptero hematófago *H. irritans*, que proporcione los distintos estadios biológicos del parásito, para realizar la evaluación in vitro del extracto de Neem.
2. Evaluar in vitro, el efecto de distintas dosis del extracto de *A. indica*, sobre estados juveniles de *H. irritans*, para establecer la DL50 y DL90.
3. Evaluación in vitro del efecto de los procesos digestivos de bovinos, sobre el principio activo Azadirachtin.
4. Evaluación en novillos de experimentación, el efecto de azadirachtin administrado en cápsulas de gelatina, sobre *H. irritans* a nivel fecal.

- 5) Diseñar y evaluar in vitro, mediante el método de Tilley Terry, e in vivo mediante el método de digestibilidad in vivo (nylon bags), el comportamiento de bolos intrarruminales de baja digestibilidad, que permitan su uso posterior en la entrega gradual del principio activo en evaluación.
- 6) Establecer in vivo el comportamiento y la aparición a nivel fecal de Azadirachtin incorporado en bolos de uso intrarruminal, a través del efecto sobre larvas del díptero *H. irritans*.
- 7) Establecer a nivel de campo, dosis y frecuencia de aplicación de extracto de *A. indica*, en bolos intrarruminales para obtener poblaciones de *H. irritans* en niveles tolerables para los bovinos.
- 8) Desarrollo de un estudio en el laboratorio de Cinética de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de Chile, que permita la implementación de un método para establecer trazas de Azadirachtin en la carne de los animales tratados.

**Introducción**

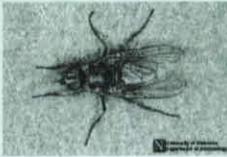
■ *Haematobia irritans* (Linnaeus 1758), “mosca de los cuernos”, es un díptero hematófago, originario de Europa Central, se describe en Francia en 1830. En 1886 llegó a Estados Unidos de Norteamérica desde Francia (Bulman, 2001). Algunos años más tarde se había expandido a gran parte del territorio de Estados Unidos y Canadá; luego a través de México y Centroamérica llegó a Colombia y Venezuela en 1937, (Rodríguez, 1995).

■ En Chile, la mosca de los cuernos aparece por primera vez en el año 1968 en el valle del río Lluta en la I Región (Arica). Luego en septiembre de 1993 aparecen focos en la I Región y a fines de Noviembre del mismo año, se observaron focos en los valles precordilleranos de la VII Región (Cisternas, 1999). Una vez en Chile la mosca se difundió rápidamente. En un plazo de pocos meses afectó desde la IV Región en el norte hasta la X Región en el sur de Chile (Romano, 1994).

**La clasificación de *Haematobia irritans* fue descrita por Linnaeus 1758 y taxonómicamente pertenece a:**

■ Reino	:	Animal	
■ Tipo	:	Arthropoda	
■ Clase	:	Insecta	
■ Subclase	:	Phtiraptera	
■ Orden	:	Díptera	
■ Suborden	:	Cyclorrhapha	
■ Familia	:	Muscidae	
■ Género	:	<i>Haematobia</i> (Sinónimo: <i>Lyperostia</i> , <i>Siphona</i> )	
■ Especie	:	<i>Irritans</i>	

<b>Dentro de la clasificación taxonómica de <i>Haematobia irritans</i> existen a nivel mundial 5 subespecies:</b>	
1.	<i>Haematobia irritans irritans</i> (Linnaeus, 1758), Europa y América
2.	<i>Haematobia irritans exigua</i> (De Meijares, 1903) Australia y Malasia
3.	<i>Haematobia irritans thiraxi potans</i> o <i>minuta</i> (Bezzi, 1892) de Africa
4.	<i>Haematobia irritans stimulans</i> (Meigen, 1824) Reino Unido
5.	<i>Haematobia irritans Titillans</i> (Skidmore, 1985) costas del mar mediterráneo (Servicio Agrícola y Ganadero, 2000).

<b>CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Longitud: mide entre 4,5 y 5,5 mm de largo, cuerpo angosto y de color oscuro</li> <li>Cabeza corta y tan ancha como el tórax, con ojos grandes, aparato bucal picador, con una larga probosis, más grueso en la mitad basal, palpos grandes que casi alcanzan el ápice de la probosis y antena con arista plumosa sólo en la parte dorsal (Artigas, 1994).</li> <li>Tórax sin manchas ni marcas longitudinales; patas largas provistas de cerdas y alas transparentes, casi blancas (Borchert, 1964).</li> <li>Antenas con arista con pelos no ramificados y alas con vena anal que sobrepasa la mitad del margen posterior (Rodríguez, 1994).</li> </ul>	

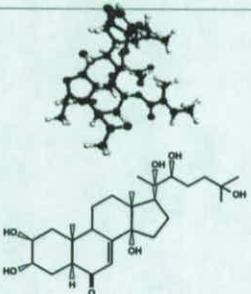
<b>Ciclo biológico de <i>H. irritans</i></b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li><i>H. irritans</i> presenta cuatro estados metamórficos: huevo, larva, pupa y adulto (Jerome, 1997).</li> <li>Los huevos de 1,5 mm de largo, de color rojizo castaño y difícilmente distinguibles en el excremento (Artigas, 1994).</li> <li>Cada hembra deposita grupos de 10-20 huevos bajo los bordes de la masa fecal (Mock, 1998).</li> <li>12-24 hrs de oviposición, primer estadio larval, la temperatura más adecuada para su desarrollo es de 27 a 33°C (Gaete y Hazard, 1994).</li> <li>Periodo larva hasta pupa toma entre 3 a 5 días.</li> <li>La pupa se transforma en adulto entre 6 a 8 días (Gaete y Hazard, 1994)</li> <li>Ciclo de desarrollo, puede ser muy corto, 10 a 14 días en condiciones favorables (Mock, 1998).</li> <li>La longevidad de la hembra varía de 4 a 8 semanas alcanzando a oviponer desde 80 hasta casi 400 huevos (Jerome, 1997).</li> </ul>	

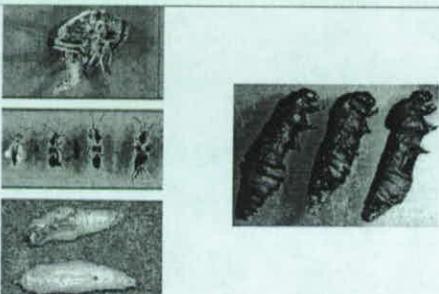
<b>Árbol del Neem <i>Azadirachta Indica</i></b>	
	

<b><i>Azadirachta indica</i></b>	
Familia Meliaceae Origen: Asia meridional Árbol siempre verde Contiene alta concentración de aceite en la semilla Base para formulaciones comerciales	
	

<b><i>Azadirachta indica</i> contiene limonoides biológicamente activos</b>	
1.	Azadirachtina
2.	Meliantriol
3.	Salannina
4.	Nimbina
5.	Nimbidina
6.	Deacetylazadirachtina
7.	3-deactylsalannina
8.	Salannol

<b>Azadirachtin</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Aislado desde el árbol del Neem, <i>Azadirachta indica</i> en 1968</li> <li>■ Su estructura no fue dilucidada hasta 1987</li> <li>■ 90% de los efectos en la mayoría de las plagas.</li> <li>■ Causa disrupción en el crecimiento y reproducción del insecto.</li> <li>■ Efecto anti-alimentario</li> <li>■ Bloquea la Síntesis de Ecdisona.</li> </ul>

<b>Características estructurales azadirachtin</b>	
Regulador origen botánico	
Azadirachtin	
Hormona insectil ecdisona	

<b>Azadirachtin:</b>	
Azadirachtin actúa como un "bloqueador de la ecdysona", bloquea la producción y liberación de esta hormona, impidiendo que los insectos muden, interrumpiendo su ciclo de vida.	
	

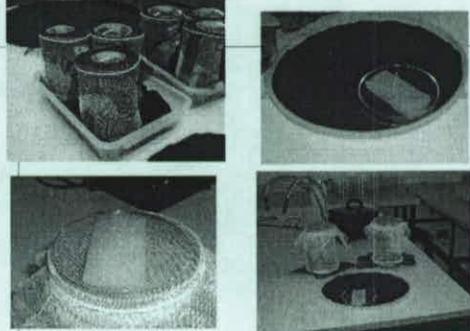
<b>Usos de azadirachtin en agricultura</b>	
	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Regulador de crecimiento.</li> <li>2. Efecto anti-alimentario.</li> <li>3. Disuasivo de la Oviposición.</li> <li>4. Reductor de Fecundidad.</li> <li>5. Efecto de Repelencia.</li> </ol>

<b>Métodos biológicos</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Parasitoides: Microhimenopteros: Muscidifurax.</li> <li>■ Depredadores:</li> <li>■ Competidores por el sustrato: Scarabaeidae y Aphodiidae.</li> <li>■ Desecadores del sustrato:</li> <li>■ Hongos Entomopatógenos.</li> </ul>

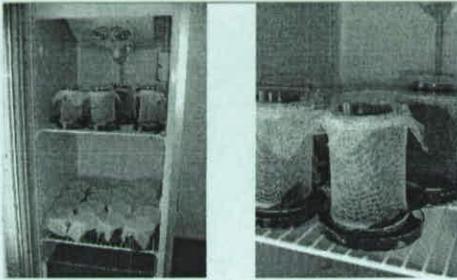
<b>Métodos químicos</b>	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ El control químico se realiza mediante insecticidas . <b>químicos sintéticos o extractos botánicos:</b></li> <li>■ <b>Tratamientos de aspersion:</b> Se hacen periódicamente aplicando suspensiones o emulsiones.</li> <li>■ <b>Tratamientos de derrame dorsal de un insecticida</b> (método pour-on y método spot on)</li> <li>■ <b>Tratamientos de espolvoreo o bolsa colgante (dust-bag):</b> bolsa especial que se cuelga en un lugar de paso obligado de los animales. (Anziani y col., 1997).</li> <li>■ <b>Autocrotales con insecticidas:</b> matriz de un polímero, generalmente de PVC, a partir del cual un insecticida es liberado lentamente.</li> <li>■ <b>Dispositivos intrarruminales de lenta digestión</b></li> </ul>

**Desarrollo de una crianza artificial de *H.irritans* para la obtención de todos los estadios del parásito *H.irritans***

**Sistema de crianza**

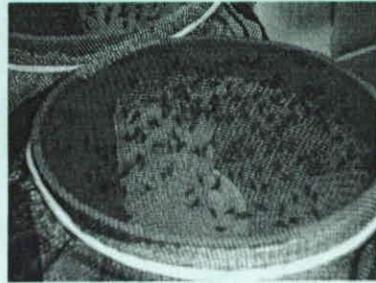


**Crianza de *H. irritans* y evaluación de la emergencia de adultos desde fecas de animales tratadas.**



**Jaulas de postura y Alimentación de Adultos de *H.irritans***

**Batería alimentación de *H.irritans* y obtención de huevos**



**Jaula para crianza y alimentación de *H.irritans***



**Vista Frontal Jaula**

**Zona lateral de jaula para Crianza y alimentación**

**Vista Interior Jaula**

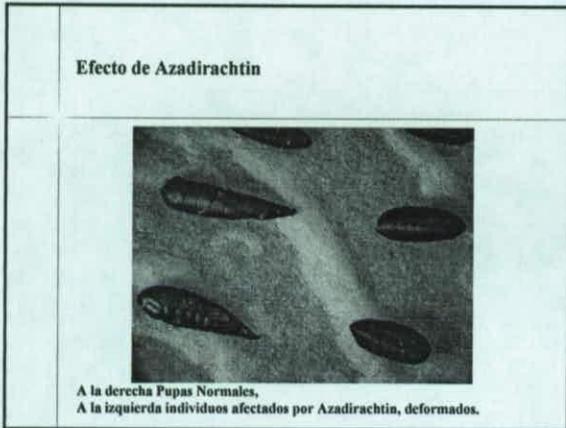
**Establecimiento de la capacidad de Transito del principio activo azadirachtin a través del aparato digestivo en función del efecto sobre *H.irritans***

Evaluación del efecto de Azadirachtin sobre la emergencia de adultos de <i>H. irritans</i> en fecas de bovinos tratados	
Dosis ppm/Kpv	Emergencia de adultos
0,00	33,165 ± 0,47 a
0,03	20,83 ± 1,5 b
0,04	12,58 ± 0,35 c
0,05	8,83 ± 0,47 c

P<0,05

Evaluación de distintas dosis a nivel fecal		
Emergencia de Adultos de <i>H.irritans</i> en fecas bovinas tratadas con Azadirachtin. %		
Dosis ppm/100gr. fecas	Emergencia adultos	±DS
0	54,33 a	7,19
0,1	25,67 b	5,33
0,2	12,67 c	4,54
0,3	12,25 c	0,88
0,4	11,33 c	6,95
0,5	5,68 c	1,45

Duncan Test  
Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (p<005)



**DL50 / DL90**

DL 50/DL90

	Concentración mgs/Kpv	Límites inferior y superior al 95% confianza.	
		Límite inferior	Límite superior
DL 50	0.00632	0.000119	0.01207
DL 90	0.03637	0.02832	0.07469

Análisis probit

Evaluación en novillos de experimentación, el efecto de azadirachtin administrado en cápsulas, sobre *H. irritans* a nivel fecal.

### Niveles de aplicación de azadirachtin in vivo

Estructura de aplicación de Azadirachtin para cada experimento realizado							
Nº animal	Ppm/k	P. Vivo	mgr. Ppo activo	mgr. producto comercial	Días Trat	Producto comercial	Crs.
Nº1	0,02	400	8	47,06	4	188,24	0,0471
Nº5	0,02	335	6,7	39,41	4	157,65	0,0394
Nº2	0,03	345	10,35	60,88	4	243,53	0,0609
Nº6	0,03	375	11,25	66,18	4	264,71	0,0662
Nº4	0,05	362	18,1	106,47	4	425,88	0,1065
Nº8	0,05	320	16	94,12	4	376,47	0,0941
Nº3	0,0	350	0	0,00	4	0,00	0,0000
Nº7	0,0	345	0	0,00	4	0,00	0,0000

### Respuesta a la aplicación de Azadirachtin in vivo

Dosis ppm/Kpv	Evaluación del efecto de Azadirachtin sobre la emergencia de adultos de <i>H. irritans</i> en fecas de bovinos tratados, siembra e 100 huevos/100 gs. de fecas						
	02/12/05	08/12/05	29/12/05	04/02/06	10/02/06	17/03/06	24/03/06
	Nº adultos						
0	37,50	45,00	59,17	40,17	31,50	33,50	32,83
0,02	26,50	23,00	19,17	17,83	17,00	19,67	22,00
0,03	7,00	17,50	10,50	9,50	12,67	12,83	12,33
0,05	3,50	11,33	10,50	4,50	5,17	9,17	8,50

Incubación de fecas 27° C, 60% HR, Fotoperiodo 16:8

### Evaluación de distintos niveles de Azadirachtin

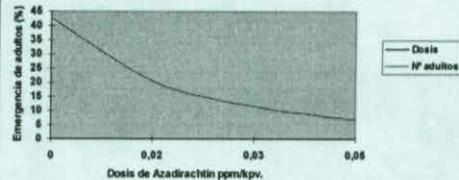
Emergencia de adultos de *H. irritans* en fecas de animales tratados por vía oral con 3 niveles de azadirachtin ppm/Kpv.

Dosis ppm/Kpv	Nº adultos	DS
0 (Testigo)	42,67a	±10,43
0,02	20,70b	±5,50
0,03	11,43c	±3,91
0,05	7,00c	±3,30

Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre las tratamientos (p < 0,05)

### Disminución de la emergencia de adultos de *H. irritans* en fecas bovinas, en función del aumento de la dosis/concentración de azadirachtin (60 observaciones)

Efecto de la aplicación de Azadirachtin sobre la emergencia de individuos adultos de *H. irritans* en fecas de bovinos tratados (Síntesis 60 observaciones)



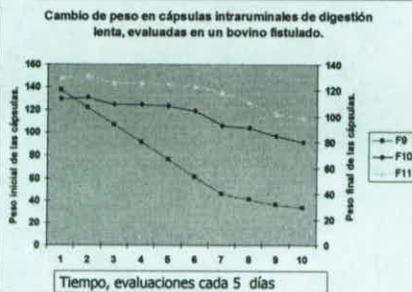
Se observa en los gráficos anteriores que el control permite reducir la emergencia de los adultos a menos de un 7% de los huevos incubados.

Diseñar y evaluar in vitro, mediante el método de Tilley Terry, e in vivo mediante el método de digestibilidad in vivo (nylon bags), el comportamiento de bolos intrarruminales de baja digestibilidad, que permitan su uso posterior en la entrega gradual del principio activo en evaluación.

### Cambio de peso en cápsulas intrarruminales de digestión lenta, evaluadas en un bovino fistulado.

DÍA	0	5	11	16	21	28	34	39	44	50
Cápsula.	gr.	gr.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.	grs.
F9	137,2	122,4	107,6	95,3	83,0	65,7	50,9	38,6	36,1	33,5
F10	131,3	130,1	125	124,8	124	119,7	106,2	104,2	96,8	91,3
F11	130,7	130	125,8	125,5	125	123,3	118,3	110,9	102	99

### Cambio de peso en cápsulas intrarruminales de digestión lenta, evaluadas en un bovino fistulado.



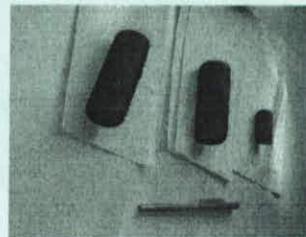
### Extracción de capsulas intrarruminales



### Bolsas intrarruminales extraídas para establecer el cambio de peso de las cápsulas



### Capsulas extraídas del sistema de bolsas ruminales.



Composición porcentual de las formulaciones utilizadas en la estructuración de los dispositivos intrarruminales de digestión lenta ( Fase I)

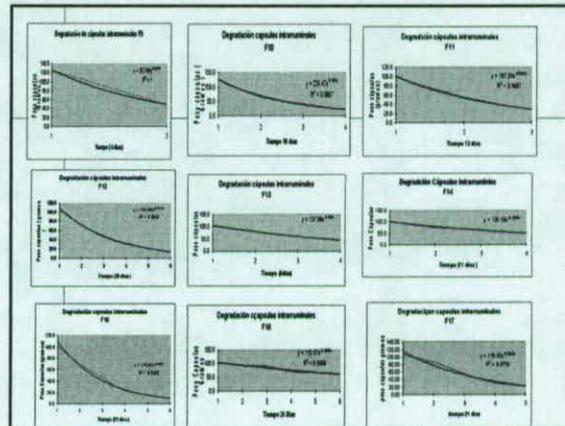
Componente	Formulación (%)								
	F0	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Gelucire 50/02	35.8	34.6	39	37	31.8	31.8	36.5	36.3	39
Compritol 888	4.5	7	4.5	4.5	10.3	10.3	4.5	5.7	3.8
Gelucire 64/02	6.9	6.9	4.5	4.5	7.4	6.9	8	7	6.2
PEG 6000	2.2	1.5	2	1.5	0.5	1	1	1	1
Hierro	50.6	50	50	50	50	50	50	50	50

Composición porcentual de las formulaciones utilizadas en la estructuración de los dispositivos intrarruminales de digestión lenta evaluados con el método de "Nylon bags" ( Fase II)

Componente	Formulación (%)		
	F9	F10	F11
Gelucire 50/02	34.8	30	30.8
Compritol 888	13.4		
Alcohol cetílico		18.2	
Alcohol estearílico			18.2
PEG 6000	1.8	1.8	1.0
Hierro	50	50	50

Composición porcentual de las formulaciones utilizadas en la estructuración de los dispositivos intrarruminales de digestión lenta ( Fase III) Evaluación con Neem

Componente	Formulación (%)							
	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	
Gelucire 50/02	30	30	26	23	15	14	13.5	
Compritol 888	18.2	19	23	26	35	35	31.3	
PEG 6000	1.6	2	1	1		2	0	
Hierro	50	50	50	50	50	50	55.2	

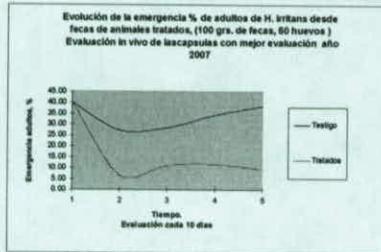


Rebaño de trabajo

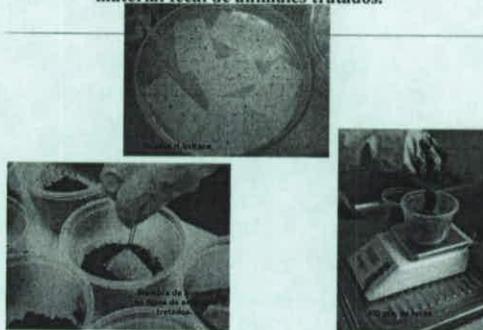


Establecer in vivo el comportamiento y la aparición a nivel fecal de Azadirachtin incorporado en bolos de uso intrarruminal, a través del efecto sobre larvas del díptero *H. irritans*.

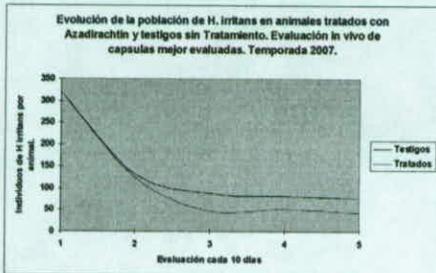
**Emergencia de adultos de *H. irritans* a partir de fecas rectales de animales tratados con azadirachtin en bolos intrarruminales. Cápsulas mejor evaluadas in vitro.**



**Evaluación de la emergencia de *H. irritans* desde material fecal de animales tratados.**



**Evolución de la carga de hematófagos sobre animales tratados con azadirachtin en bolos intrarruminales de digestión lenta, 0.03 mgs/kg.pv Cápsulas mejor evaluadas in vitro. (15 animales por grupo)**

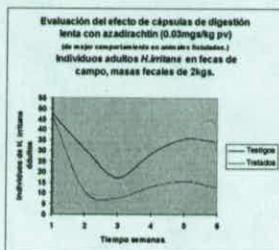


**Evolución de la emergencia de adultos de *H. irritans* en fecas de campo, de bovinos tratados con Azadirachtin, incubadas en cámara húmeda, masas fecales de 2.0 kgs.**

Testigos	47.2±10.43	30.75±5.9	17.13±6.0	26.38±9.2	35.5±7.0	34.13±7.2
Tratados	47.2±10.43	10.90±5.1	7.63±2.6	13±2.2	15.75±3.9	12.80±3.4

Anova P<0.05

**Evolución de la emergencia de individuos adultos de *H. irritans* en fecas de campo de animales tratados con azadirachtin en bolos intrarruminales de digestión lenta.**



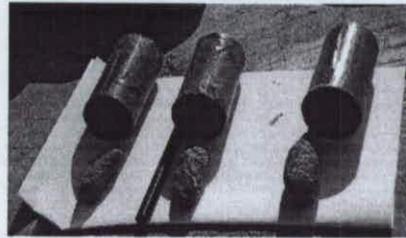
Establecer a nivel de campo, dosis y frecuencia de aplicación de extracto de *A. indica*, en bolos intrarruminales para obtener poblaciones de *H. irritans* en niveles tolerables para los bovinos.

**Evolución del peso de bolos intrarruminales de digestión lenta y del contenido de Azadirachtin a nivel ruminal.**

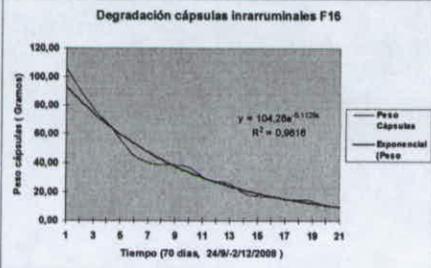
Peso Cápsulas	pérdida peso cápsula gr./Día	Gramos Extracto Neem	Mgs. Azadirachtin	Demanda Diaria Mínima
105,73	3,95	0,34	99,34	24
95,87	3,45	0,40	89,89	24
77,17	3,28	0,38	44,86	24
88,07	3,03	0,39	88,82	24
88,83	3,82	0,42	71,43	24
48,07	1,14	0,13	32,81	24
40,50	0,48	0,08	9,01	24
38,13	0,04	0,00	0,81	24
38,87	0,09	0,06	0,86	24
37,47	1,73	0,20	35,88	24
36,80	0,84	0,11	18,82	24
37,77	0,42	0,06	8,32	24
35,10	3,27	0,36	44,70	24
18,30	0,48	0,06	8,70	24
17,33	0,28	0,03	5,04	24
18,87	0,18	0,02	5,12	24
15,83	0,30	0,02	3,82	24
14,73	0,20	0,02	3,84	24
14,13	0,91	0,11	17,81	24
10,80			28	

Aporta promedio 80a mgs.

**Reducción del tamaño de los dispositivos intrarruminales**



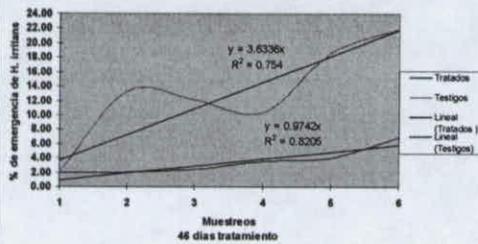
**Pérdida de peso de cápsulas intrarruminales de 105,73 grs. con degradación lenta y 12.3 gramos de extracto de Neem. (17% azadirachtin) \* grupos animales 15 bovinos adultos, 0.04mgs/kg.pv**



**Introducción de cápsulas en animales fistulados**



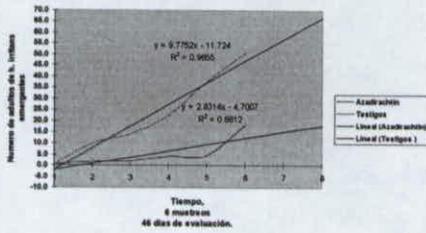
**% emergencia de Individuos adultos de H. Iritians, desde fecas transrectales de bovinos tratados con bolos intrarruminales con 0,04 mgs de Azadirachtin/kg de peso vivo y testigos sin tratamiento.**



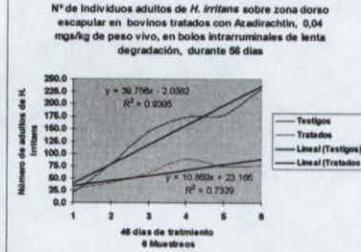
**Introducción de cápsulas intrarruminales**



Emergencia de adultos de *H. irritans* a partir de fecas de campo, de animales tratados con bolos intraruminales de degradación lenta con azadirachtin 0.04 mgr/kg.pv. y testigos incubadas en cámara húmeda. Masas fecales de 2 kgs.



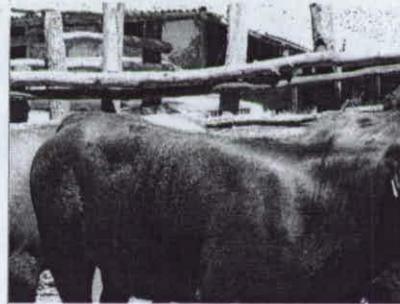
Número de individuos adultos de *H. irritans* sobre zona dorso escapular en bovinos tratados con Azadirachtin 0,04 mgr/kg de peso vivo, en bolos intraruminales de lenta degradación, durante 66 días



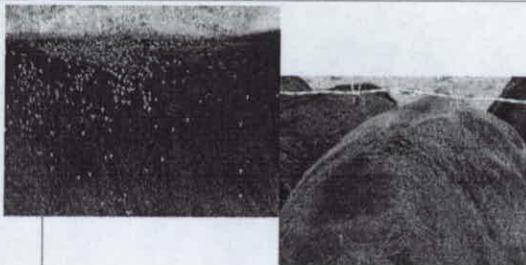
Cambio de peso en bovinos tratados con azadirachtin administrado en bolos intraruminales de 130 grs. ( Grupos de 15 vacas adultas)

	Peso Inicial Kg	Peso Final Kg	Cambio de peso Kg
Testigos	495.43±75.18	482.93±68.81	-12.50
Tratados	602.23±44.86	617.85±49.72	15.62

Animales tratados con azadirachtin, bajo nivel de parasitismo.



Animales sin tratamiento y alta carga de *H. irritans*



Metodología para detección de Azadirachtin

- Determinación de residuos de azadiractina desde músculo de vacuno.
- A 5 g de músculo de vacuno se le agregan 5 ml de agua bidestilada. Se homogeniza a 24,000 rpm por 1 minuto. Se agregan 10 ml de una mezcla de diclorometano/isopropanol 95/5. Se agita a 24,000 rpm por 1 minuto. Se centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos y se separa la fase orgánica, la que se recibe en un tubo cónico. Se repite la extracción 3 veces bajo las mismas condiciones y se juntan los extractos orgánicos, se filtran por filtro separador de fases y se evaporan a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 37 °C.
- Se disuelve el extracto seco con una mezcla de metanol/agua 90/10 y se inyectan 20 ul al HPLC según las condiciones siguientes.

## Metodología para detección de Azadirachtin

### ■ Condiciones cromatográficas.

- Columna: Waters® Symmetry® C18-e 250 x 4,6.
- Fase móvil: Acetonitrilo: H2O (27,5:72,5)
- Velocidad de flujo: 1,00 mL/min.
- Longitud de onda: 215 nm.
- Temperatura: 45 °C.
- Límite de detección del método: 10 ug/g de carne

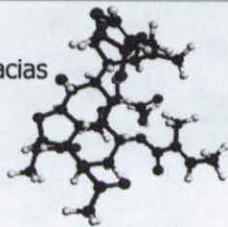
■ Resultados obtenidos del procesamiento de 2 muestras de 5 g de carne provenientes de un ternero de 200 kgs. que recibió una formulación de liberación controlada de Neem, con 20.4 mgs. por día, de Azadirachtin por 14 días. En tanto que la dosis que se puede indicar como normal es de 8 mgr/200 kgs.

■ En ninguna de las 2 muestras se detectó alguna señal cromatográfica coincidente con los tiempos de retención de Azadiractina A y Azadiractina B.

## Conclusiones

1. Se desarrolló un regulador de las poblaciones de *H. irritans* en base a Azadirachtin con una eficiencia de hasta un 66.81% (importante en sistemas orgánicos que no tienen otra herramienta de control.)
2. La dosis de mayor eficiencia en el control de *H. irritans* correspondió a 0.04 mgs/Kg. pv.
3. Se desarrolló una matriz farmacológica en base a gelucires con un alto potencial de aplicación a otras áreas de la producción animal.
4. Se desarrolló un sistema de reproducción de *H. irritans* que permite la obtención de sus diferentes estadios biológicos.
5. Se estableció una metodología para la detección de azadirachtin en Músculo.
6. Se estableció que azadirachtin es un principio activo que no incorpora residuos detectables a nivel muscular aun en dosis de 0.102 mgs/kg de peso vivo.

Gracias



The Dharamsi Morarji  
Chemical Company  
Limited

A company with innovative products and focus on specialty chemicals and agri-inputs.

DMCC offers customized products and thoughtful solutions to our global customers.

We take pride in maintaining healthy relationship with the environment. We extend our responsibility to the society and focus on sustainable development.

## Bibliografía.

1. CAMBRIDGESOFT Corporation. The Merck Index CD. 13<sup>th</sup> ed. Whitehouse station. New Jersey. USA. 2002.
2. COYNE, Rosie, BERGH, Oivind and SAMUELSEN, Ole Bent. One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle. Journal of chromatography B 810: 325-328. 2003.
3. Documento técnico emitido por FORTUNE BIO-TECH LIMITED<sup>®</sup> (India) de Polvo de semillas de Lilia india.
4. FARRIES, John. A study on the effect of neem oil extract to control external cattle parasite. Agriculture and natural resources series. VSO working papers in development.
5. GAABOUB, Ibrahim and HAYES, Dora K. Biological activity of Azadirachtin, component of the neem tree inhibiting molting in the face fly, *Musca autumnalis* De Geer (Diptera: Muscidae). Environmental Entomology 13(3): 803-812. 1984.
6. GAABOUB, Ibrahim and HAYES, Dora K. Effect of larval treatment with Azadirachtin, a molting inhibitory component of the neem tree, on reproductive capacity of the face fly, *Musca autumnalis* De Geer (Diptera: Muscidae). Environmental Entomology 13(6): 1639-1643. 1984.
7. KUMAR, A. et al. Azadirachtin use efficiency in commercial neem formulations. Current Science 84(11): 1459-1464. 2003.
8. MILLER, J. Allen and CHAMBERLAIN, William F. Azadirachtin as a larvicide against the horn fly, stable fly, and horse fly (Diptera: Muscidae). J. Economic Entomology 82 (5): 1375-1378. 1989.
9. PENA, Angelina et al. Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using Post-column derivatization with fluorescence detection. Journal of the AOAC International 86 (5): 925-928. 2003.

10. RUIZ, A., et al. ALGIN<sup>®</sup> un bioinsecticida de origen vegetal, biodegradable, compatible con el medio ambiente y los enemigos naturales de las plagas. Agricultura ecológica y desarrollo rural, II congreso de la sociedad española de agricultura ecológica. 211-224. 1996.
11. SINGH, Shivendra and SINGH, R.P. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and Azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and the oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). Phytoparasitica 26 (3): 1-6. 1998.

## Glosario.

IPS: Filtro tratado con silicona, permite separar la fase orgánica de la acuosa.

ACN: Acetonitrilo.

AZD: Azadiractina.

CBZ: Carbamazepina.

DCM: Diclorometano.

H<sub>2</sub>O: Agua.

IPOH: Isopropanol.

MeOH: Metanol

Swinnex<sup>®</sup>: Sistema de sujeción de filtros con tamaño de poro de 0,22 µm.

Ultraturrax<sup>®</sup>: Sistema de agitación de alta fuerza de corte.

## 12. Bibliografía Consultada

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Anindo, D., F. Toe., S. Tembely., E. Mugerwa., A.Lahlou and S. Sovan. 1998. Effects of malasses-urea block (MUB) on dry matter intake, growth, reproductive performance and control of gastrointestinal nematode infection of grazing merine ram lambs. *Small Ruminant Research.* 27:1, 63-71
- Araque, C.H. 1995. Los bloques multinutricionales en la alimentación Bovina. Fonaiap Divulga. N°47 Enero-Marzo
- Bawasakar, V.S., D.A.Mane., D.G.Hapse and G.K. Zende 1980. Use of Neem (*Azadirachta indica*) cake as a blending material for economy in sugarcane Coop, Sugar. 11(8):1-7
- Bruce, W.G. 1940. A cattle fly trap for the control of horn flies. U.S. Dep. Agric. Circ. E498.
- Butler, J.F., and J.S. Okine. 1999. The horn fly, *Haematobia irritans* (L): review of programs on natural history and control, pp 625-646. In J.Burge (ed) contributions to the knowledge of diptera. Association Publisher, Gainesville, FL.
- Byford, R.L., S.S. Quisenberry, T.C. Sparks and J.A. Lockwood. 1985. Spectrum of insecticide cross-resistance in pyrethroid-resistant populations of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) *J. Econ. Entomol.* 78:768-773.
- Campbell, J.B., 1976. Effect of horn fly control on cows as expressed by increased weaning weights of calves. *J. Econ. Entomol.* 69:711
- Campbell, W.C., M.H. Fischer, E.O. Stapley, G. Albers-Schonberg . & T.A. Jacob. 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221: 823-828.
- De Sousa, M.A. and M. Palmério. 2001. Practice oriented results on use and production of plant extracts and pheromones in integrated and biological pest control. Abstracts of the 1 workshop "Neem and Pheromones". University of Uberaba, Brazil.
- Drummond, R.O., G. Lambert, H.F. Smalley, Jr., and G.E. Terrill. 1981. Estimated losses of livestock to pest, pp.317-346 In. D. Pimentel (ed), *Handbook of pest management in agriculture*, vol.1. CRC, Boca Raton, FL.

- Finney, D.J. 1971. Probit analysis, 3 rd. ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gaaboub; I.A., and Hayes, D.K. 1984 a. Biological activity of Azadirachtin, component of the neem tree inhibiting molting in the face fly. *Musca autumnalis* De Geer (Diptera : Muscidae). Environ. Entomol. 13: 803-812.
- Gaaboub; I.A., and Hayes, D.K. 1984 b. Effect of larval treatment with azadirachtin a molting inhibitory component of the neem tree on reproductive capacity of the face fly *Musca autumnalis* De Geer (Diptera: Muscidae). Environ Entomol. 13: 1639-1643.
- Guglielmone, A., G.Zimmermann., M. Volpogni., O. Anziani., A. Mangold and M. Castelli. 2000. Efecto de una formulación inyectable de ivermectina al 3, 15% para el control de adultos de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) sobre bovinos. Rev. Fac: Agr. Vet. Univ. Nac: Litoral.
- Guglielmone, A., E Gimeno., J.Idiart., W.Fisher., M.Volopogni y O.Anziani. 1999. Lesiones en la piel y daño a los cueros de bovinos por infestación natural con *Haematobia irritans*. Medical and Veterinary Entomology 13: 324-329
- Hall, R.D. and Doisy, K.E. 1989. Walk through trap for control of horn flies (Diptera: Muscidae) on pastured cattle. J. Econ. Entomol. 82(2) 530-534.
- Harvey, T.L., and J.L. Launchbaugh. 1982. Effect of horn flies on behavior of cattle. J. Econ. Entomol. 75: 25-27.
- Haufe, W.O. 1982. Growth of range cattle protected from horn flies (*Haematobia irritans*) by ear tags impregnated with fenvalerato. Can. J. Anim. Sci. 62:567.
- Haufe, W.O. 1986 Productivity of the cow calf unit in range cattle protected from horn flies, *Haematobia irritans* (L) by pesticidal ear tags. Can. J. Anim. Sci. 66:575-589
- Haufe, W.O. 1979. Reduced productivity of beef cattle infested with horn flies. Agr. Can. Res. 61-63.
- Hogsett, J.A., D.L. Prichard, and J.P.Ruff. 1991. Economic effects of horn fly (Diptera: Muscidae) populations on beef cattle exposed th three pesticide treatment regimes. J. Econ. Entomol. 84: 1240-1274
- Immaraju, J., S. Well., W. Ruggero., R. Nelson & B.Selby. 1994 Relative residual activites of Azadirachtin, Dihydroazadirachtin and tetrahydroazadirachtin. Brighton Crop Protection Conference-Pest and Disease. Proceedings Volumen I; 53-58
- Kinzer, H.G., W.E. Houghton, J.M. Reeves, S.E.Kunz, J.D. Wallace and S. Urquhart. 1984. Influence of horn flies on weight loss in cattle, with notes on prevention of loss by insecticide tratment. Southwest. Entomol. 9:212-217.

Koul, O., M.B.Isman.,C.M. Ketkar. 1990 Properties and uses of Neem, Azadirachtin indica. Canadian Journal of Botany 68, 1-11

Kumar, A.R.V., H.C. Jayadevi., H.J. Ashoka and K. Chandrashekara. 2003. Azadirachtin use efficiency in commercial neem formulations. Current Science. (84) 11, 1459-1464.

Kunz, S.E., J.A. Miller, P.L. Sims, and D.C. Meyerhoeffer. 1984. Economics of controlling horn flies (Diptera: Muscidae) in range cattle management. J.Econ. Entomol. 77: 657

Kunz, S.E., K.D. Murruell, G.Lambert, L.f. James and C.E. Terrill. 1991. Estimated losses of livestock to pests, pp 69-98. In D. Pimentel (ed), Handbook of pest management in agriculture, vol.1. CRC, Boca Raton, FL.

Lancaster, J.L., J.R. Kilgore, J.S. Simco, R. W. Parkham, D.Hubber, and J.L. Cox. 1991. Efficacy of topical ivermectin formulation against naturally occurring adult horn flies on cattle. Southwest Entomol. 16: 339-345.

Legner, E.F. 1995. Biological control of diptera of medical and veterinary importance J. Vector. Ecol. 20(1), 59-120

Lockwood, J.A., R.L.Byford., R.N.Story. ,T.C.Sparks., & S.S. Quisenberry. 1985. behavoiiral resistance to the pyrethroides in the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera:Muscidae). Environ. Entomol. 14: 873-880

Loera, J.G., D.S. Moreno., M.Waldon y A.M.Rodríguez. 2000. Mortalidad de la mosca de los cuernos *Haematobia irritans* (L) causada por el pigmento floxin B<sup>a</sup>. Tec. Pecu. México. 38(3) 211-217.

Lysyk, T.J. 1992. Use of life history parameters to imptove a rearing method for horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (diptera: Muscidae) on bovine hosts. Can. Ent. 123: 1199-1207.

Lysyk, T.J., and D.C. Cowell. 1996. Duration of efficacy of diazinon ear tags and ivermectin pour-on for control of horn fly (Diptera: Muscidae). J. Econ:Entomol. 89: 1513-1520.

Lysyk, T.J. 1999. Effect of temperature on time to eclosion and spring emergence of postdiapausing horn flies (Diptera: Muscidae). Environmental Entomology. 28 (3): 387-397.

Marley, S.E., R.D. Hall, and R.M. Corwin. 1993. Ivermectin cattle pour-on: duration of single latespring treatment against horn fly *Haematobia irritans* (L) (Diptera:Muscidae) in Missouri, USA. Vet.Parasitol. 51: 167-172

Meyer, J.A., J.S. Simco & J.L.Lancaster. 1981. Control of face fly larval development in bovine feces with daily injections of the ivermectin. Southwest Entomol. 6: 269-271.

Miller, J.A., Oehler, D.D., and Kunz, S.E. 1983. Release of pyrethroids from insecticidal ear tags. *J. Econ. Entomol* 76: 1335-1340.

Miller, J.A., Oehler, D.D., Siebenaler, A.J. and Kunz, S.E. 1986. Effect of ivermectin on survival and fecundity of horn flies and stable flies. (Diptera: Muscidae). *J. Econ.Entomol.* 79:1564-1469.

Miller, J.A., S.E. Kunz., D.d. Oehler &R.W.Miller. 1981. Larvicidal activity of Merck MK-933, an avermectin, against the horn fly, stable fly, face fly and house fly. *J.Econ. Entomol.*74: 608-611

Miller; J.A., and W.F. Chamberlain. 1989. Azadirachtin as a larvicide against the horn fly, stable fly, and house fly (Diptera: Muscidae). *J. Econ. Entomol.* 82(5) 1375-1378.

Penman, D.R. . & R.D. Chapman. 1983. Fenvalerate-induced distributional imbalance of the two-spotted spider mite on bean plants. *Entomol. Exp. Appl.* 33: 71-78.

Pietrosemoli. S., R. Olavez., T. Montilla., Z. Campos. 1999. Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A.Juss) en control de nemátodos gastrointestinales de bovinos a pastoreo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 1: 220-225

Presley, S.M., F.W. Knapp., J.A. Boling and J.G. Burg. 1996. Effects of the horn fly (Diptera: Muscidae) on physiological and nutritional responses of beef steers: continuous fly population levels. *J. Econ. Entomol.* 89(1): 138-143.

Quisenberry, S.S., J.A. Lockwood,R.L. Byford;H.K. Wilson & T.C. Sparks. 1984. Ptrethroid resistance in the horn fly, *Haematobia irritans* (l) (Diptera: Muscidae). *J.Econ. Entomol.* 77:1095-1098.

Redfern, R.E., J.D. Warthen, E.C. Uebel &G.D. Mills. 1981. The antifeedant and growth-disrupting effects of azadirachtin on *Sodoptera frugiperda* and *Oncopeltus fasciatus*, pp. 129-136. In H.Schmutterer, K. R.S. Ascher & H. Rembold (eds) *Natural pesticides from the neem tree, Azadirachta indica* German Agency for Technical Cooperation (GTZ), Eschborn, Federal Republic of Germany.

Rembold, H., H. Forser, C. Czoppelt, P. J. Rao & K.P. Sieber. 1984. Azadirachtin a group of insect growth regulators from the neem tree *Azadirachta indica* A.Juss. pp. 153-161. In H.Schmutterer, K. R.S. Ascher & H. Rembold (eds) *Natural pesticides from the neem tree, Azadirachta indica* German Agency for Technical Cooperation (GTZ), Eschborn, Federal Republic of Germany.

Rice, M.J., S. Sexton & A.M.Esmail. 1985. Antifeedant Phytochemical blocks oviposition by sheep blowfly. *J. Aus. Entomol.* 24:16.

**Roth, J. P., G.T. Fincher, and J.W. Summerlin. 1983. Competition and predation as mortality factors of the horn fly *Haematobia irritans* (L) (Diptera: Muscidae) In a central texas pasture habitat. *Environ. Entomol.* 12:106-109.**

Roth, J.P. 1983. Compatibility of coprophagous scarabs and fimicolous Staphylinids biological control agents of the horn fly *Haematobia irritans* (L) (Diptera: Muscidae) *Environ. Entomol.* 12: 124-127.

Rovesti, L. & Katalin V.Deseo, 1990. *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) e sue potenzialita nella lotta contra gli insetti . *Informatore Fitopatologico* 11:27-32

Rust, M.R. & D.A. Reiersen. 1978. Comparasion of the laboratory and flies efficacy of insecticides used for German cockroach control. *J.Econ.Entomol.* 71:704-708.

Ruiz, A.J.,J.P.Latorre., C. Calderaro and A. Nevot. 1996. ALIGN® un biopesticida de origen vegetal, biodegradable, compatibles con el medio ambiente y los enemigos naturales de las plagas. *Agricultura Ecológica y Desarrollo Rural II Congreso de La Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Pamplona-Iruña.* pp:220-224

Schmidt, C.D., S.E. Kunz., H.D. Petersen, and J.L. Robrtson. 1985. Resistance of horn flies (Diptera: Muscidae) to permethrin and fenvalerate. *J. Econ. Entomol.* 1:305-310.

Schreiber, E.T., J.B campbell, S.E., Kunz, D.C. Clanton, and D.B. Hudson. 1987. Effects of horn fly (Diptera: Muscidae) control on cows and gastrointestinal worm (Nematode: Trychostrongylidae) treatment for calves on cow and calf weight gains. *J. Econ. Entomol.* 78:402-406.

Schwinghammer, K.A., F.W. Knapp, and J..A. Boling. 1987. Physiological and nutritional response of beef steers to combined infestations of horn fly and stable fly (Diptera:Muscidae). *J.Econ entomol.* 80:120-125.

Schwinghammer, K.A., F.W. Knapp, J.A. Boling, and K.K. Schillo. 1986. Physiological and nutritional response of beef steers to infections of the horn fly (Diptera: Muscidae). *J.Econ:Entomol.* 79: 1010-1015.

Schulter, W., H.J.Bidomn & S.Grewe. 1985. Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J.insect Physiol.* 31: 773-777

Senrayan, R., In National conference on biopesticides with emphasis on Neem, Surabaya, Indonesia, 1998, pp. 18-22

Sheppard, D.C. 1984. Fenvalerato and flucythrinate resistance in horn fly population. *J. Econ. Entomol.* 1:305-310.

Sheppard, D.C., and J.A.Joyce. 1992. 1992. Hig levels of pyrethroid resistance in horn flies(Diptera: Muscidae) selected with cyhalothrin. *J. Econ. Entomol* 85: 1587-1593.

Singh, S., and R.P. Singh. 1998. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and Azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and oriental fruit fly (*Bactrocera dorsalis*). *Phytoparasitica* 26: 3.

Skidmore, P. 1985. *The biology of the muscidae of the world*. Junk. Dordrecht. Netherlands.

Sparks, T.C., S.S. Quisenberry, J.A. Lockwood, R.L. Byford, and R.L. Roush. 1985. Insecticide resistance in the horn fly, *Haematobia irritans*. *J. Agr. Entomol.* 2: 217-233.

Steelman, D.C., H. Brown., E. Grub and G. Tolley. 1991. Interactive response of the horn fly (Diptera: Muscidae) and selected breeds of cattle. *J. Econ. Entomol.* 84(4): 1275-1282.

Steenberg, T.C., J.B. Jesperen, K.N. Jensen., B.O. Nielsen and R.A. Humbert. 2001. Entomopathogenic fungi in flies associated with pastured cattle in Denmark. *J. Invert. Pathol.* 77, 186-197.

Thomas, G.D., R.D. Hall I.L. Berry. 1987 Diapause of the horn fly (Diptera: Muscidae) in the field. *Environ. Entomol.* 16: 1092-1097.

Waller, P.J., M.R. Knox., M. Faedo. 2001. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. *Vet. Parasitol.*, 102, 321-330.

*Watson, D.W., S.M. Stringham, S.S Denning, S.P. Washburn, M.H. Poore and A. Meler. 2002. Managing the horn fly (Diptera: Muscidae) using an electric walk through fly trap. J. Econ. Entomol. 95(5) 1113-1118*

Zebitz, C. P. W. 1984. Effect of some crude and azadirachtin enriched neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on larvae of *Aedes aegypti*. *Entomol. Exp. Appl.* 35: 11-16.