

**Universidad Católica del Trópico Seco  
“Pbro. Francisco Luis Espinoza Pineda”**



**Informe final de tesis para optar al título profesional de Médico  
Veterinario Zootecnista**

**Evaluación de concentraciones (35%-70%) de *Azadirachta  
indica*, como antiséptico en la higiene de pezón de vacas lecheras,  
Los Chilamates, Estelí, 2020**

**Autores**

Melitina Mondragón Andrade  
Freddy Antonio Duarte Mejía

**Tutor**

MV. Medardo de Jesús Moreno Castellón

**Asesor**

M.Sc. José Leonardo Rodríguez Benavides

Estelí, Agosto del 2020

Esta tesis fue aceptada en su presente forma por el departamento de investigación de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA) de la Universidad Católica del Trópico Seco (UCATSE) y aprobada por el honorable sínodo evaluador nombrado para tal efecto, como requisito parcial para optar al título profesional de **MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Tutor**

MV. Medardo de Jesús Moreno Castellón

**Asesor**

M.Sc. José Leonardo Rodríguez Benavides

**Sínodo Evaluador**

M.Sc. Jaime Antonio Landero Amaya.

MV. Carlos Alonzo Robles García

MVZ. Reina Isabel Ruíz Morales

**Sustentantes:**

Br. Melitina Mondragón Andrade

Br. Freddy Antonio Duarte Mejía

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página.</b>
ÍNDICE DE TABLAS .....	iii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	iv
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	viii
RESUMEN.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	2
III. HIPÓTESIS .....	3
IV. MARCO TEÓRICO .....	4
4.1. La higiene en el ordeño.....	4
4.2. Instalaciones limpias.....	4
4.3. Principales agentes patógenos presentes en la ubre.....	5
4.4. Origen y distribución del Neem.....	8
4.5. Clasificación y descripción botánica .....	8
4.6. Propiedades químicas .....	10
4.7. Beneficios del Neem.....	10
4.8. Contraindicaciones y posibles efectos secundarios .....	12
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
5.1. Ubicación geográfica .....	13
5.2. Población y muestra.....	14
5.3. Definición de variables con su operacionalización.....	14
5.12. Diseño experimental.....	19
5.15. Descripción del experimento.....	20
5.16. Manejo del ensayo.....	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
VII. CONCLUSIONES.....	28
VIII. RECOMENDACIONES.....	29

IX. BIBLIOGRAFÍA.....	30
X. ANEXOS.....	34

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Contenido</b>	<b>Página.</b>
<b>Tabla 1.</b> Variables.....	15
<b>Tabla 2.</b> Tratamientos a evaluar .....	19
<b>Tabla 3.</b> Tratamiento 1 .....	19
<b>Tabla 4.</b> Tratamiento 2 .....	20
<b>Tabla 5.</b> Tratamiento 3 .....	20
<b>Tabla 6.</b> Tiempo del crecimiento bacteriano.....	25

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Contenido</b>	<b>Página.</b>
<b>Anexo 1.</b> Mapa de ubicación del estudio .....	34
<b>Anexo 2.</b> Tabla de tratamiento 1 .....	34
<b>Anexo 3.</b> Tabla de tratamiento 2 .....	35
<b>Anexo 4.</b> Tabla de tratamiento 3 .....	35
<b>Anexo 5.</b> Hoja de campo .....	35
<b>Anexo 6.</b> Neem ( <i>Azadirachta indica</i> ) .....	37
<b>Anexo 7.</b> Pesaje de hojas para extracto.....	37
<b>Anexo 8.</b> Preparación del extracto .....	38
<b>Anexo 9.</b> Extracto .....	38
<b>Anexo 10.</b> Extracto listo.....	39
<b>Anexo 11.</b> Tubos de ensayo con gel .....	39
<b>Anexo 12.</b> Animales a muestrear .....	40
<b>Anexo 13.</b> Aplicación de antiséptico .....	40
<b>Anexo 14.</b> Toma de muestra .....	41
<b>Anexo 15.</b> Toma de muestra en campo finalizada.....	41
<b>Anexo 16.</b> Fase en campo finalizada .....	42
<b>Anexo 17.</b> Siembra de bacterias.....	42
<b>Anexo 18.</b> Muestras en plato petri .....	43
<b>Anexo 19.</b> Muestras en incubadora.....	43
<b>Anexo 20.</b> Siembra de cultivos Finalizada .....	44
<b>Anexo 21.</b> Muestras de colonias .....	44
<b>Anexo 22.</b> Resultado de colonias .....	45
<b>Anexo 23.</b> Conteo de colonias .....	46
<b>Anexo 24.</b> Colonias Bacterianas .....	46

<b>Anexo 25.</b> Tinción de gram para identificación de bacterias .....	47
<b>Anexo 26.</b> Resultados al microscopio.....	47
<b>Anexo 27.</b> Bacterias gram negativas.....	48
<b>Anexo 28.</b> Bacterias gram positivas.....	48
<b>Anexo 29.</b> Base de resultado de datos .....	49
<b>Anexo 30.</b> Resultado ANOVA .....	49
<b>Anexo 31.</b> Resultado de coeficientes .....	49
<b>Anexo 32.</b> Número de colonias.....	50
<b>Anexo 33.</b> Etiqueta del producto .....	52
<b>Anexo 34.</b> Nombre y marca del producto .....	53

## **DEDICATORIA**

A mis padres que me han dado la existencia; y en ella la capacidad por superarme y desear lo mejor en cada paso por este camino difícil y arduo de la vida, gracias por ser como son, porque su presencia y persona han ayudado a construir y forjar la persona que ahora soy.

A mis maestros y amigos quiero agradecerles a los cuales me enseñaron que la amistad es la esencia propia de la vida, los recuerdos siempre con mucho cariño y donde quiera que yo esté siempre estarán ustedes conmigo.

Obviamente no se pueden olvidar aquellos que siempre estuvieron presentes en cada una de mis etapas y que en el andar por la vida nos hemos ido encontrando; porque cada uno de ustedes ha motivado mis sueños y esperanzas en consolidar un mundo más humano y con justicia. No los menciono a todos porque la lista sería muy extensa, sin embargo, gracias a todos ustedes, me convierto en la consecuencia de aquella confianza que fue depositada en mí, gracias por creer en mí.

*Freddy Antonio Duarte Mejía*

## **DEDICATORIA**

Con mucho amor...

A José Mondragón y Elena Andrade, mis padres. Por darme vida, amor y apoyo para lograr este sueño, porque mi triunfo es más de ellos que mío. Por su duro trabajo, sacrificio y sustento a lo largo de los años para hacerme una persona de bien, por inculcarme valores que hoy en día ponen en alto y con mucho orgullo, mis apellidos.

De manera muy especial a mi ángel en el cielo, Sergio Edgardo Andrade Zepeda (Q.E.P.D) porque desde allá arriba me envió aliento y palabras de apoyo, por bajar a mis sueños a darme un abrazo y ánimo cuando más lo necesité, porque a pesar de todo me enseñó a disfrutar de la vida y a apreciar lo que tengo y recordarme cada día, en cada momento el valor de la familia.

A mis abuelos, tíos, tías y primos, porque siempre tuvieron palabras de ánimo y aliento para mí, por hacer de mis días más bonitos, alegres y llenos de amor. Por darme motivación para no rendirme por cada enseñanza invaluable a mi vida y formación.

*Melitina Mondragón Andrade*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer primero a Dios todopoderoso por darme la fortaleza para no dejarme vencer ante las diferentes pruebas que la vida me ha presentado, demostrándome que siempre está conmigo y que nunca me dejara porque sé que soy su hijo, a ti sea toda la gloria y la honra. Gracias Dios por el don de la perseverancia para alcanzar mis metas

Gracias a esas personas que de una u otra manera han sido claves en mi vida profesional y por extensión en lo personal, mis familiares mi madre Rosaura Marisela Mejía Murillo, mi padre Freddy Antonio Duarte Aceituno y hermanas Rocío Sarahí Duarte Mejía, Marisela Abigail Duarte Mejía y Adriana Rocío Castellanos Duarte. Gracias porque me empujaron a esta aventura en seguir mis sueños.

Gracias de todo corazón a mis tutores, asesores y amistades por su apoyo brindado, gracias por su paciencia, dedicación, motivación, criterio y aliento. Han hecho fácil lo difícil, ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

De igual forma agradezco a mi compañera de tesis Melitina Mondragón Andrade quien me devolvió la fe para seguir adelante luchando por mis sueños sin importar lo difícil que sea el camino que tengamos por delante.

Infinitas Gracias a todos los que han recorrido conmigo este camino, porque me han enseñado a ser más humano.

*Freddy Antonio Duarte Mejía*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios, padre celestial por ser mi sustento, mi fortaleza y mi guía de vida. Por no dejarme caer, por darme fuerza y sabiduría para poder culminar con éxito esta etapa de mi vida que con mucho esfuerzo y sacrificio llega a su fin.

Gracias a Dios por permitirme tener y disfrutar a mi familia, a mis padres José Ballardo Mondragón Laínez y Elena Marietha Andrade Zepeda, por todo el apoyo incondicional en cada decisión de este hermoso proceso. Infinitas gracias por su amor y aliento en todo momento y de igual manera a mi hermano Francisco José Mondragón Andrade. Sin su ayuda y apoyo, nada de esto sería posible.

A mi tutor MV. Medardo Moreno y mi asesor M. Sc. Leonardo Rodríguez por todo el apoyo, guía y aliento en todo momento, a mis maestros que a lo largo de estos cinco años de aprendizaje formaron parte fundamental tanto académica como profesional y de manera especial a quienes más que un maestro fueron amigos.

A mis amigos y compañeros de clase por ser una segunda familia para mí, por cada risa, locura y tristeza compartida y de manera especial, a mi fiel amigo y compañero de tesis Freddy Antonio Duarte Mejía, por ser una mano derecha, un compañero de lucha y un hermano más, sin su apoyo, este proyecto no tendría sentido, por ser una luz al final del túnel.

A mi segunda patria; Nicaragua, tierra de lagos y volcanes por acogerme y darme oportunidad de formarme y educarme hoy en día como Médico Veterinario Zootecnista.

A todos, GRACIAS.

*Melitina Mondragón Andrade*

## RESUMEN

El estudio se realizó en la finca Los Chilacates, Y en el laboratorio general de la Universidad Católica del Trópico Seco. Con el objetivo de evaluar el efecto de *Azadirachta indica* a diferentes concentraciones (35%-70%), como antiséptico en la higiene de pezón de vacas lecheras. Esta investigación es de tipo experimental, Se realizó con un diseño completamente al azar (DCA). Se tomaron muestras mediante la técnica de hisopado en la superficie del pezón de la ubre y piel de la glándula mamaria de vacas lecheras, se agregó solución salina sobre al hisopo para preservar la muestra y los microorganismos, se guardó en tubos de ensayo estériles con gel especial para cultivos mientras se llevaba al laboratorio para incorporarlos en medios de cultivo MacConkey. Las variables a medir fueron; Las bacterias presentes en el pezón, efecto antiséptico, tiempo y relación costo beneficio. Los resultados demostraron que las bacterias encontradas en los medios de cultivo donde se aplicó el antiséptico son en su mayoría gram negativas, en el cual refiere que la efectividad del producto corresponde a una lógica de eliminación de bacterias gram positivas ya que las presentes fueron E. coli y Klebsiella, siendo estas poco comunes en la piel de los pezones de la ubre. la mejor efectividad la obtuvo el tratamiento T3 (*Azadirachta indica* al 70 %) En el tiempo se determinó que hubo crecimiento después de las 16 horas con el testigo, seguido del T2 (35%) a las 24 horas y para finalizar con el T3 con (70%) donde hubo crecimiento a las 72 horas. Se determinó que las concentraciones (35% y 70%) del antiséptico a base de (*Azadirachta indica*) utilizado en el sellado y desinfección del pezón, fueron efectivos mostrando la eliminación de carga bacteriana presente en los tratamientos evaluados.

**Palabras claves:** Efecto, Antiséptico, Neem, Bacteria, Pezón

## I. INTRODUCCIÓN

La mastitis es considerada una enfermedad compleja o multifactorial, resumidos en el animal, el medio ambiente y el hombre (Cano, 2002), que en la actualidad, continua siendo un enigma para la industria lechera (Yamagata, 1987). Se estima que un tercio de todas las vacas lecheras del mundo están afectadas por cualquier forma de mastitis en uno o más cuartos (Philpot, 1992).

Esta enfermedad puede presentarse en forma clínica, sub-clínica o crónica (Wellenberg, 2002) y según lo planteado, se estima que casi el 90% pertenece a la mastitis sub-clínica. Por ende, las grandes pérdidas en producción láctea son ocasionadas, fundamentalmente, en su forma subclínica (OEA, 2003). Según Wellenberg et al. (2002), actualmente las pérdidas originadas por ambos tipos de mastitis clínica y subclínica pueden ascender a 20% de la producción potencial.

Así, la leche contaminada pone en peligro la salud de quienes la consumen, en el caso del hombre cobra gran importancia la diseminación de bacterias causantes de enfermedades. En cambio, la salud animal se ve afectada no solo presentando una considerable disminución de la producción de leche, sino también en la pérdida glandular y hasta la muerte de la vaca.

La parte primordial para contrarrestar esta enfermedad es la prevención, al garantizar una higiene adecuada sobre la ubre de las vacas y aún más el uso de la medicina alternativa como una herramienta práctica que favorece a los productores, debido a que muchas de estas sustancias provienen de plantas presentes en sus terrenos, como es el caso del Neem, especialmente la hoja en el cual es utilizada para eliminar agentes microbianos que colonizan el cuerpo del animal. El presente trabajo investigativo tiene como propósito evaluar dos concentraciones (35% y 70%) de *Azadirachta indica* como antiséptico para la prevención de mastitis subclínica en vacas lecheras.

## **II. OBJETIVOS**

### **Objetivos General**

Evaluar el efecto de *Azadirachta indica* a diferentes concentraciones (35-70), como antiséptico en la higiene de pezón de vacas lecheras en Los Chilamates.

### **Objetivos Específicos**

Identificar las bacterias presentes en los pezones de las vacas destinadas al estudio.

Determinar la efectividad de la aplicación del antiséptico sobre el pezón, a diferentes concentraciones, mediante el método de conteo de colonias bacterianas.

Estimar la relación beneficio-costos para cada una de las concentraciones del antiséptico a usarse.

### **III. HIPÓTESIS**

Una de las concentraciones de Neem (*Azadirachta indica*) ya sea al 35 ó 70 % reducirá el contenido de bacterias presentes en el pezón luego de su aplicación post- ordeño en comparación al testigo.

## **IV. MARCO TEÓRICO**

### **4.1. La higiene en el ordeño**

En la actualidad los consumidores exigen productos lácteos de buena calidad que duren bastante tiempo fresco y que estén producidos por vacas sanas y en granjas con buena higiene.

### **4.2. Instalaciones limpias**

La mayoría de la contaminación de los pezones con patógenos ambientales ocurre fuera de las salas de ordeño. El ambiente en el que viven las vacas está relacionado con la calidad de leche que producen. En las fincas en las que las vacas están en corrales exteriores, hay que pasar un rastrillo de cadenas por el suelo de cada corral, para esparcir el estiércol y la tierra y que así se sequen mejor. También se debe prestar atención a todas las zonas que están bajo los árboles o a la sombra como son techados y bebederos, ya que a las vacas les gusta reposar en estas áreas en épocas de calor, lo que puede causar una acumulación excesiva de heces que actúan como una fuente de infección de bacterias ambientales. (Barkema, 1998)

Así mismo hay que asegurar que los corrales tengan un buen drenaje y se debe evitar que se encuentren superpoblados ya que con un número excesivo de animales es más difícil mantener un entorno limpio. En el caso de las granjas con áreas de descanso libre, se debe prestar mucha atención a la limpieza de las camas. El material de cama y su limpieza tiene un impacto muy grande sobre la salud de la ubre y la calidad de la leche. El contacto entre los pezones y las zonas de descanso sucias aumentara la probabilidad de que las bacterias invadan la ubre. Los altos niveles de materia orgánica y la humedad favorecen el crecimiento bacteriano. De igual manera el tipo de bacterias encontradas en el tanque de la leche suele estar relacionado con el tipo de bacterias ambientales, mantener una buena práctica de manejo reducirá la colonización microbiana de las puntas de los pezones, la posibilidad de infección bacteriana de la ubre y la incidencia de mastitis. (Reneau, 2005)

### **4.3. Principales agentes patógenos presentes en la ubre**

Según (Pizon, 1989) las alteraciones en la ubre y glándula mamaria son ocasionadas por organismos microscópicos que penetran la ubre a través del canal del pezón. La penetración puede ocurrir por multiplicación, movimiento mecánico, propulsión durante el ordeño o por una combinación de factores.

Aproximadamente del 90 al 95% de los casos son provocados por cuatro microorganismos. Estos son: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*.

Según (Kirk, 1984), los gérmenes más importantes de la inflamación de la ubre son los estreptococos, los estafilococos, los *coliformes*, *Corynebacterium pyogenes*, las pseudomonas y levaduras. Los gérmenes menos frecuentes son los micoplasmas, clostridios, klebsiellas, aerobacter, bacilo céreo, nocardias, hongos, etc.

#### ***Staphylococcus aureus***

Aunque varios patógenos bacterianos pueden causar la mastitis, el *Staphylococcus aureus* es el primer agente etiológico en la mayor parte del mundo (Tollersrud, 2000.)

Está permanentemente en el medio ambiente de la vaca y su depósito principal en las vacas adultas lo constituyen las ubres y pezones afectados. Este organismo no progresa en la piel de los pezones sanos, pero rápidamente forma colonias en los canales de los pezones, especialmente si existe lesión cerca de las puntas de los mismos, lo cual facilita su penetración al interior de la ubre y la invasión de los tejidos de la misma, ocasionando la formación de un tejido cicatrizal. Este tejido impide que los medicamentos penetren en los lugares infectados, haciendo que el tratamiento en la lactancia sea a menudo ineficaz. (Pizon, 1989) Llegando a ocasionar la muerte celular; sin embargo, no puede sobrevivir grandes periodos en el medio ambiente (Hogan, y otros, 1999.)

#### ***Streptococcus agalactiae***

Este microorganismo es considerado un parásito intramamario obligado de los bovinos (Dismore, 2002.), el cual puede sobrevivir por largos períodos de tiempo dentro de la glándula mamaria pero muy poco fuera de ella (Mellenberguer & Roth, 2002)

Pizon, (1989) Argumenta que es el único organismo susceptible de ser erradicado de todo un rebaño lechero y puede vivir hasta 3 semanas en el medio.

Las fuentes de infección para *Streptococcus agalactiae* son las vaquillas y vacas infectadas. El 50 u 80% de un hato puede estar infectado por *Streptococcus agalactiae*, aunque la mayoría son casos leves y por lo general no causan mastitis agudas ni provocan la muerte del animal. Sin embargo, algunos de los cuartos infectados cesaran de producir leche (Mellenberguer & Roth, 2002)

La infección de los animales sanos con este tipo de estreptococos suele producirse tras la compra de animales enfermos (Kleinschroth, 1991)

### ***Streptococcus dysgalactiae***

La fuente principal son las ubres infectadas, amígdalas y lesiones en la piel (Pizon, 1989) Puede ser contagiado de una vaca a otra durante el ordeño y las vacas pueden también llegar a ser infectadas por el medio ambiente (Hogan, et.al, 1999.)

Este patógeno es muy capaz de sobrevivir en la boca, vagina y piel de los animales saludables que pastan. Debido a su situación medioambiental, los métodos de higiene normales y la terapia del antibiótico son menos eficaces previniendo las infecciones por *Streptococcus dysgalactiae* que las infecciones por otro patógeno contagioso. (Vasi, 2000)

### ***Streptococcus uberis***

*Streptococcus uberis* tiene gran capacidad para adherirse a las células epiteliales de la Glándula mamaria, evitando que los microorganismos salgan de ella.

Se puede aislar de numerosos sitios tanto del propio cuerpo de la vaca (Principalmente piel y ubre de los pezones) como de su entorno, por ejemplo: paja, estiércol, suelo, pasto, etc... Por lo tanto, *Streptococcus uberis* tiene la habilidad de sobrevivir y multiplicarse tanto dentro como fuera de la ubre, el *Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae* son responsables también por la mayoría de las mastitis que se presentan ya sea al comienzo o al final del período de secado. Además de estas dos especies de bacterias, existen muchos otros estreptococos ambientales (*Streptococcus bovis*, *Streptococcus fecalis*) que pueden causar mastitis (Adams M, 2005)

### ***Coliformes***

Las bacterias *coliformes* son habitantes normales del suelo e intestino de las vacas. Se acumulan y multiplican en la materia fecal y en la cama. Los *coliformes* pueden causar mastitis solamente si las partículas contaminadas del medio ambiente entran en contacto con la ubre. Estos microorganismos no se adhieren a los conductos y alvéolos de la ubre pero se multiplican rápidamente en la leche.

La temperatura corporal de la vaca puede elevarse a 40°C y el cuarto infectado se inflamará y se volverá sensible al tacto. Los mecanismos de defensa de la vaca pueden eliminar las bacterias de la ubre, pero las toxinas permanecen y la vaca puede llegar a morir (Acuña, 2008)

### ***Pseudomonas***

La pseudomona es un bacilo delgado Gram negativo que también es fitopatógeno. Se caracteriza por emanar de fuentes de aguas contaminadas o de la tierra (Kirk, 1984)

*Pseudomona aeruginosa* no crece en medios aerobios y tiene la capacidad de coagular la leche por las enzimas que produce, hidrolizando lentamente la caseína. Este microorganismo tiene propiedad bacteriolítica por sus enzimas (piosinasa, alfa-hidroxifenazina y una sustancia oleosa) y una proteína termoestable (Ávila, Gutiérrez, G.J.I, Canizal, & Torres, 2001)

Ha sido aislada tanto de los animales infectados como del agua utilizada para lavar el equipo de ordeño, considerándose ésta la fuente de contaminación. La mastitis producida por *P. aeruginosa*, puede en ocasiones ser confundida con mastitis gangrenosa por *Staphylococcus aureus* por los síntomas (Las Heras, Lopez, E, Dominguez, & Fernandez., 2002)

### ***Corynebacterium***

*Corynebacterium bovis* frecuentemente se aísla de la leche de glándulas mamarias de vacas infectadas por mastitis (Hommez, 1999)

El microorganismo puede ser transmitido por material o equipo contaminado de una glándula mamaria enferma a otra durante la práctica de ordeño, por moscas portadoras del microorganismo que coloniza a la glándula mamaria a nivel del conducto del pezón o por traumatismos en la misma (Ávila, Gutiérrez, G.J.I, Canizal, & Torres, 2001)

## ***Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* es considerado responsable de la presentación de cuadros clínicos de mastitis hemorrágicas y ocasionalmente gangrenosas. Es un microorganismo aeróbico, formador de esporas, alargado con terminales redondeadas o cuadradas, que se aprecia formando cadenas (Ávila, Gutiérrez, G.J.I, Canizal, & Torres, 2001)

### **4.4. Origen y distribución del Neem**

El neem es una planta cuyo origen exacto es incierto, la mayoría coincide en que es originario de zonas secas de la montaña Siwalik de la India y Birmania, ubicados en la región tropical del sureste Asiático, otros lo ubican en el subcontinente Indo-Pakistani, en las áreas secas del sur y sureste asiático, incluyendo Pakistan, Sri Lanka, Birmania, Tailandia, Malasia e Indonesia. (Baley, 1977)

En la actualidad se encuentra distribuido en más de 78 países, en el continente asiático, africano, Oceanía, centro y sur América. Se estima que en el mundo existen alrededor de 200 millones de árboles, la mayor parte de ellos en Asia, donde crecen bajo cultivo y en forma silvestre, particularmente en la india, sobre la franja que inicia del sur de Delhi y Lahore hasta cabo Camorin. (Conrick, 1994)

En África se encuentran árboles en Nigeria y Sudan, sobre la costa este de Etiopía, Somalia, Kenia, Tanzania y Mozambique en la región oeste, Mauritania, Togo, costa de marfil y Camerún. (Conrick, 1994)

En Europa, se encuentran principalmente árboles experimentales en Alemania y en la costa oeste de Francia. En América se encuentra en países como Trinidad y Tobago, Jamaica, Puerto Rico, Islas Vírgenes, Surinam, Guyana, Barbados, Cuba, República Dominicana, Haití, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Bolivia, Ecuador, Argentina y Brasil. A México fue introducido en 1989 por la universidad autónoma de Nuevo León.

### **4.5. Clasificación y descripción botánica**

El neem tiene como nombre científico *Azadirachta indica* y pertenece a la familia meliaceae a la cual también pertenece el “cedro, la caoba entre otros. La clasificación del neem la describe como sigue:

Reino: Vegetal

Subreino: Trachaeophyta

División: Embriofitas

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledónea

Orden: Geraniales

Familia: Meliáceas

Género: Azadirachta

Especie: Azadirachta indica

El neem es un árbol de crecimiento rápido, robusto, de hoja perenne, siempre verde y frondosa. Sus características botánicas se describen a continuación:

**El árbol.** El tronco del neem crece recto y alcanza un grosor hasta de 2.5m; la corteza es de color gris rojizo y de un espesor hasta de 2.5cm; el árbol puede alcanzar una altura de 30m y un diámetro de copa de 25m; puede vivir por más de 200 años. (Cruz, 1998)

**La raíz.** Se presenta pivotante de rápido crecimiento y desarrollo, clave para resistir la sequía, lo que permite vivir en suelos muy pobres, alcanza hasta el doble de la altura del árbol, con esto permite extraer nutrientes del subsuelo profundo. (Cruz, 1998)

**Hoja.** Es peciolada de forma aserrada y alrededor de 7 a 10cm de largo y de 3-4cm de ancho; cuando son jóvenes (retoños) son de color rojo cobrizo, al madurar cambian a color verde oscuro. Las hojas se agrupan en folículos de 35cm de largo, las hojas son compuestas imparipinadas más de una terminal. La caída de hojas del árbol ocurre solo bajo extrema sequía o después del daño por heladas. (Cruz, 1998)

**Flor.** Es pequeña, blanca, crema o amarillenta, bisexual, actinomorfa, que crece en racimos de hasta 22cm de largo de manera axilar; en plena floración su aroma y néctar facilitan su polinización. La floración depende de las condiciones edafoclimáticas de cada región y su fecundidad depende de la cantidad de iluminación recibida así como de la humedad del suelo, las que estimulan e inhiben el aborto floral. (Cruz, 1998)

En la zona huasteca, de clima tropical, la floración inicia desde el segundo año de plantado y ocurre durante los meses de abril y mayo, pero se prolonga en forma intermitente hasta diciembre en menor porcentaje. (Cruz, 1998)

**Fruto.** Es una drupa elipsoidal, lisa de 1.4 a 2.4cm de largo, producido en racimos; el color de la cascara al inicio de su formación es verde con endocarpio blanco y duro; al madurar la cascara se torna amarillenta. La pulpa es jugosa y dulce, consumible por humanos, aves y otros animales; además encierra a la semilla. El fruto tiene maduración desuniforme, no simultánea (ya que es posible ver en una misma rama, flores, frutos inmaduros y maduros), debido al brote secuencial de flores; en México maduran la mayoría de los frutos entre los meses de julio y septiembre. (Cruz, 1998)

**Semilla.** Tiene forma elipsoidal, mide alrededor de 1.4cm de largo y 6.5mm de ancho, está envuelta de una cascara color café que contiene una semilla y algunas veces hasta dos. Esta es la parte más importante del árbol porque en ella se almacenan todas sus propiedades. (Cruz, 1998)

#### **4.6. Propiedades químicas**

Las semillas del neem contienen alrededor del 10% de aceite, compuesto principalmente de glicéridos. Tiene un olor a ajo y contiene un 2% más de 50 tetranortriterpenoides:

Azadirachtina, nimbólido, ácido nimbidínico, azadirona, nimbina, nimbidol, nimbinin, margolene, mahmoodin, salanin, meldenin: (IARI, 1983)

La azadiractina es el componente insecticida más potente de este árbol.

El nimbidol combate la tuberculosis y los protozoos.

La nimbidina tiene propiedades antibacteriales y ayuda a tratar las úlceras y la arritmia, teniendo también propiedades analgésicas.

La nimbina es antiinflamatoria, antimicótica y antihistamínica.

La quercetina es antiinflamatoria, antioxidante y antibacterias.

Las hojas contienen quercetina, ácido gálico, catequina, caroteno y ácido ascórbico.

#### **4.7. Beneficios del Neem**

**Diabetes:** En la India se lleva usando mucho tiempo para reducir el azúcar en sangre; lo toman tanto en cápsulas como masticando su hoja. Si se toma después de una comida, puede reducir el azúcar hasta en un 50%. Aunque no está claro cómo actúa, se cree que puede incrementar la secreción de insulina, lo que permite la entrada del azúcar en las células y reducirlo en sangre. Por tanto, si hay diabetes y se usa, puede causar que la sangre descienda

a niveles demasiado bajos. Tendrás que monitorear con especial atención tus niveles de azúcar y puede que tengas que cambiar la dosis de tu medicación. (Council, 1992)

**Fortalece el sistema inmunológico:** El neem contiene compuestos que aumentan la capacidad del organismo para eliminar virus y bacterias, Incrementa el número de leucocitos y activa las células NK, También es un buen remedio para el resfriado común. (Salazar, 1992)

**Prevención de cáncer y SIDA:** Se cree que debido a su capacidad de fortalecer el sistema inmune, puede ayudar a prevenir cáncer o SIDA.

**Enfermedades cardiovasculares:** Junto con la diabetes, las enfermedades cardiovasculares son unas de las principales causas de muertes en todo el mundo. Uno de sus componentes, la nimbidina, es un dilataador vascular, lo cual permite disminuir la hipertensión arterial. También puede prevenir accidentes cardiovasculares ya que previene la acumulación de plaquetas. (Salazar, 1992)

**Plaguicida/insecticida:** Es un remedio natural para repeler mosquitos y otros insectos como las garrapatas o las pulgas.

**Salud oral:** El aceite y el extracto de neem contiene fuertes componentes antisépticos que pueden eliminar las bacterias que provocan halitosis, caries y enfermedades de las encías. Es un excelente remedio natural para lavar dientes y enjuagarse la boca. (Salazar, 1992)

**Ansiedad y estrés:** Debido a que el neem puede incrementar los niveles de serotonina en el cerebro, puede ayudar a combatir estrés, ansiedad y depresión.

**Antifúngico:** El neem puede eliminar el hongo cándida, el cual plorifera en un medio ácido y azucarado.

**Malestares estomacales:** Puede reducir las náuseas y mejorar la digestión, estimulando los jugos digestivos. (Salazar, 1992)

**Problemas de piel:** Las hojas se puede usar como pasta para tratar enfermedades de la piel como acné, erupciones, psoriasis o eczema. El aceite se emplea en la India para la caspa, piel reseca y prevenir arrugas.

**Antibacterial y antiviral:** Es eficaz contra las infecciones bacteriales como salmonella, E.coli y estafilococos. (Baley, 1977)

**Anticonceptivo y salud sexual:** Se conoce que el neem reduce la fertilidad de hombres y mujeres sin afectar a la libido. Funciona como espermicida y puede prevenir infecciones sexuales.

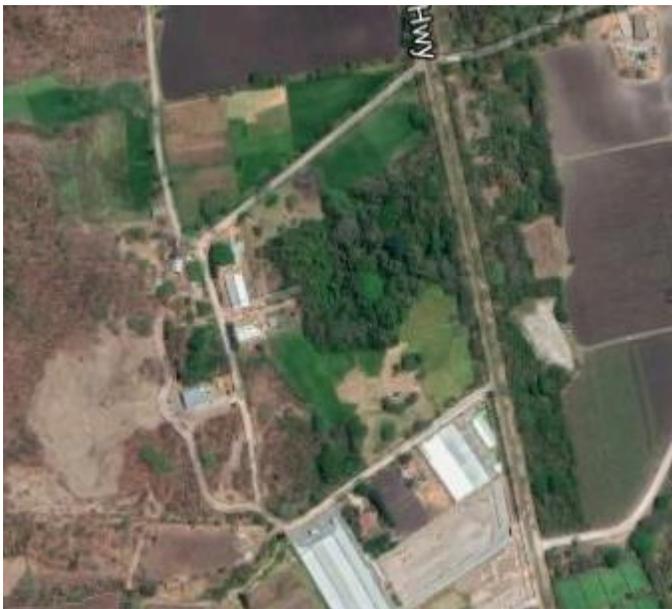
#### **4.8. Contraindicaciones y posibles efectos secundarios**

Es seguro para la mayoría de adultos, aunque si se toma durante demasiado tiempo puede dañar hígado y riñones. Hay que tener especial precaución en: (Warthen, 1989)

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Ubicación geográfica

El estudio se realizó en la finca Los Chilamates, en el área bovina, ubicada entre las coordenadas  $13^{\circ} 19' 15.62''$  y  $86^{\circ} 10' 58.20''$  ubicada a 6km de la ciudad de Estelí. Y en el laboratorio general de la Universidad Católica del Trópico Seco, situada en el kilómetro 166.5 carretera norte. Estelí, Nicaragua dicha zona presenta una precipitación anual de 800mm, con una temperatura promedio de 26-28 grados Celsius, localizada a una altura de 810msnm, entre las coordenadas  $13^{\circ} 14' 50''$  latitud norte y  $86^{\circ} 22' 29''$  longitud oeste. En la zona el clima que predomina es tipo tropical, con humedad relativa de 58% a 79% y una velocidad de viento que oscila entre 0.6 – 0.7m/seg, datos proporcionados por el Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales (INETER, 2019)



**Ilustración 1. Mapa de ubicación del estudio**

## 5.2. Población y muestra

El experimento estará compuesto por un total de 12 unidades experimentales constituidas por 48 muestras de hisopados para la siembra de los platos Petri, estas muestras fueron provenientes directamente del pezón de la ubre y piel de la glándula mamaria de doce vacas lecheras usando las concentraciones 35%, 70% y el testigo.

### Tipo de estudio

Esta investigación es de tipo experimental, debido que se evaluó la actividad bacteriana de un antiséptico a base de Neem (*Azadirachta indica*) en diferentes concentraciones.

## 5.3. Definición de variables con su operacionalización

Matriz de conceptualización y operacionalización de las variables incluidas en el estudio

Variable	Definición conceptual	Indicadores	Medidas de expresión	Fuentes	Instrumentos
Bacterias presentes en el Pezón.	Microorganismo s procariotas unicelulares presentes en la ubre, según morfología.	Características de las colonias. Tamaño Forma	Crecimiento De colonias	Medio de cultivo.	Hoja de laboratorio. Plato petri Microscopio
Efecto antiséptico.	Reacción de las bacterias ante la Sustancia antibacteriana que se utiliza para reducir la infección.	Número de colonias.	UFC (Unidades formadoras de colonias)	Medio de cultivo.	Hoja de recuento de colonias.
Tiempo	Periodo determinado durante el que se realiza el cultivo bacteriológico	Número de colonias a las 24 horas posterior a la muestra	Colonias	Medio de cultivo	Hoja de registro
Relación costo-beneficio.	La relación costo- beneficio toma los ingresos y egresos presentes netos de resultados, para determinar cuáles son los beneficios por	Resultaos del IOR <1o 1> mayor o menor a uno.	.Numérico	Formula	Tabla de costo

cada córdoba  
invertido.

---

## **Tabla 1. Variables**

### **Selección de las técnicas o instrumentos para la recolección de datos**

Para la recopilación de datos se utilizó la técnica de la observación haciendo uso de una hoja de campo y hoja de laboratorio ya que el experimento está dividido en dos etapas, la primera en campo que consiste en la toma de muestras del pezón y piel de glándula mamaria en una vaca y la segunda en el laboratorio para valorar la efectividad de producto a nivel de colonias bacterianas.

### **Aplicación de la técnica o instrumento para la recolección de los datos**

#### **Preparación de medios**

Se prepararon medios de cultivos para muestras obtenidas del pezón de la ubre de las vacas, los medios de cultivo se realizan con agar, pesando en la balanza los gramos requeridos, los medios utilizados son los siguientes:

MacConkey: es un medio de cultivo selectivo y diferencial utilizado para el aislamiento de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, particularmente del género gram positivas y gram negativas.

Composición del Agar MacConkey:

- Peptona (digerido pancreático de gelatina)
- Peptona de proteasa (carne y caseína)
- Lactosa monohidratada
- Sales biliares
- Cloruro de sodio
- Rojo neutro
- Violeta cristal
- Agar
- Agua destilada (Aryal, 2015)

Mueller Hinton: Medios de cultivo nutritivos no selectivo que promueve el desarrollo microbiano.

Composición de Agar Mueller Hinton:

- Peptona
- Hidrosilato de caseína
- Agar
- pH final
- Agua destilada (Raisa Zhurbenko, 2010)

El conteo de colonias bacterianas se llevó a cabo con un contador de colonias, el cual determina la cantidad de células vivas encontradas, este método es efectivo si se cumplen con las horas establecidas que requiere para desarrollarse de forma correcta el cultivo.

### **Toma de muestras**

Se tomaron muestras mediante la técnica de hisopado en la superficie del pezón de la ubre y piel de la glándula mamaria de vacas lecheras, se le agrega solución salina sobre al hisopo para preservar la muestra y los microorganismos y se guardó en tubos de ensayo estériles con gel especial para cultivos mientras se llevaba al laboratorio para incorporarlos en medios de cultivo.

### **Técnica de extracción Soxhlet**

La extracción Soxhlet ha sido (y en muchos casos, continua siendo) el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción. Además de muchos métodos de la EPA (U.S. Environmental Protection Agency) y de la FDA (Food and Drugs Administration) utilizan esta técnica clásica como método oficial para la extracción continua de sólidos.

La extracción con Soxhlet presenta las siguientes ventajas:

La muestra está en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente.

La extracción se realiza con el disolvente caliente, así se favorece la solubilidad de los analitos.

No es necesaria la filtración después de la extracción.

La metodología empleada es muy simple.

Es un método que no depende de la matriz.

Se obtienen excelentes recuperaciones, existiendo gran variedad de métodos oficiales cuya etapa de preparación de muestra se basa en la extracción con Soxhlet.

### **Materiales para extracción de extracto**

1 Manta calefactora

1 Pieza Soxhlet

1 Matraz redondo de 500 ml

1 Refrigerante a reflujo dotado de sus 2 gomas para conexión a red de agua y desagüe.

1 Probeta de 250 ml

1 Trozo de porcelana pie de bureta

1 Soporte de corcho, 1 tijera, 1 embudo, 1 clip (para sujetar el matraz redondo)

1 Cronómetro

1 Soporte de altura regulable

Papel de filtro

Semillas de moringa

Disolvente (etanol)

### **Procedimiento de la técnica de Soxhlet**

En primer lugar, una vez que se haya llevado a cabo el reconocimiento del material, se pesan unos 5g de muestra homogeneizada con una precisión de  $\pm 1$  mg (anotamos la cantidad exacta pesada en la balanza), en un cartucho de extracción que fabricaremos en el laboratorio con papel de filtro cortando un cuadrado de aproximadamente unos 10 cm de lado. Tras haber sido cerrado, plegándolo hasta formar el pequeño cartucho, se coloca en la pieza media del dispositivo de extracción Soxhlet o compartimento de muestra.

El matraz redondo que se encuentra en el desecador a principio de la práctica se provee del trozo de porcelana y se pesa exactamente sobre su soporte de corcho (llevaremos a cabo al menos tres pesadas). Se pesará siempre con el mismo soporte de corcho a lo largo de toda la práctica para no introducir un error adicional debido a la variación de masa entre los distintos soportes de corcho. Se monta la parte inferior del dispositivo (con el pie de bureta, la manta calefactora, el matraz y el soxhlet, pero sin el reflujo). Es conveniente que la manta calefactora repose sobre un soporte estable pero removible para que al finalizar el

enfriamiento sea más rápido. Se llena por la parte de arriba del soxhlet con una cantidad suficiente de disolvente (éter) que en este caso serán unos 200 ml (es necesaria una cantidad tal que llene el asa de la parte intermedia para que durante el proceso de extracción sifone y recircule, más las pérdidas eventuales) y se acopla al dispositivo.

Se procede entonces a completar el montaje del dispositivo de extracción en la campana extractora siguiendo las indicaciones dadas por el profesor responsable y teniendo presente la parte superior del reflujo se tapona con desecante (sulfato sódico anhidrido) envuelto en algodón para evitar la entrada y condensación de vapor de agua.

Tras el montaje se pone en marcha la manta calefactora y se regula el caudal de agua del reflujo. El éter, una vez que alcanza su temperatura de ebullición, se evapora y llega al refrigerante condensándose y cayendo en el compartimento del cartucho de muestra.

Durante la extracción, que en caso de que se complete totalmente dura unas 4-6 horas, se observará como se vacía regularmente el espacio de extracción (compartimento de muestra), es decir, la pieza media del dispositivo, a través del conducto ascendente (asa) con lo que el disolvente va recirculando completándose lo que llamamos ciclos de extracción. En nuestro caso, daremos por finalizada la extracción una vez que se han completado 4 ciclos (transcurrirá aproximadamente 1.5 h).

### **Preparación para el lavado del laboratorio**

Lavar la sala de forma completa, lo cual incluye suelo, techo y paredes.

Comenzar por la parte superior de la sala hasta las paredes.

Prestar atención especial a las esquinas, bordes, bordillos, parte inferior de las áreas eliminando toda la materia orgánica visible.

Aplicación del desinfectante dejando un tiempo de contacto mínimo de 5-10 minutos.

Una vez que aplicamos y dejamos hacer efecto al desinfectante, procedemos a refregar durante 5 minutos y después enjuagar con suficiente agua.

El mismo procedimiento debe incluir materiales y objetos de la sala (tolvas, comederos, separadores, recipientes, etc).

### 5.12. Diseño experimental

Esta investigación se realizó con un diseño completamente al azar (DCA) el cual se conformará de dos tratamientos a diferentes concentraciones y un testigo, cada tratamiento tendrá 12 unidades experimentales que representan cada repetición, siendo un total de 48 unidades experimentales.

#### Descripción de los tratamientos

Los tratamientos a evaluar son:

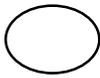
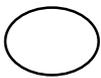
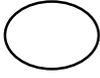
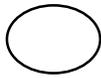
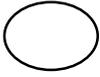
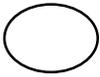
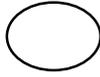
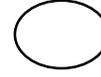
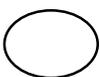
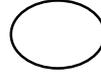
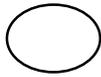
Tratamientos	Descripción	Tiempo de aplicación	Frecuencia de aplicación
T1	Extracto de Neem al 70% de concentración.	1 min.	Una sola aplicación
T2	Extracto de Neem al 35% de concentración.	1 min.	Una sola aplicación.
T3	Agua	1 min.	Una sola aplicación.

**Tabla 2. Tratamientos a evaluar**

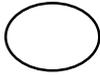
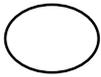
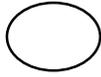
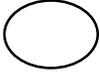
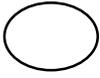
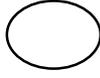
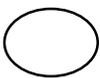
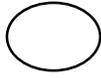
#### Distribución de los tratamientos

Tratamiento 1: Extracto de Neem al 70% de concentración				
PEZON VACA 1	P1	P2	P3	P4
				
VACA 2				
VACA 3				
VACA 4				

**Tabla 3. Tratamiento 1**

<b>Tratamiento 2: Extracto de Neem al 35% de concentración</b>				
<b>PEZON</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
<b>VACA 1</b>				
<b>VACA 2</b>				
<b>VACA 3</b>				
<b>VACA 4</b>				

**Tabla 4. Tratamiento 2**

<b>Tratamiento 3: testigo (agua)</b>				
<b>PEZON</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
<b>VACA 1</b>				
<b>VACA 2</b>				
<b>VACA 3</b>				
<b>VACA 4</b>				

**Tabla 5. Tratamiento 3**

### **5.15. Descripción del experimento**

El estudio tuvo como propósito la evaluación de un antiséptico a base de Neem (*Azadirachta indica*), donde se realizaron pruebas a diferentes concentraciones, para determinar cuál es más efectivo de manera tópica respecto a cultivos bacterianos establecidos, realizando un conteo de colonias bacterianas.

### **5.16. Manejo del ensayo**

Determinados los grupos experimentales (Medios de cultivos) se tomaron muestras del pezón y piel de glándula mamaria de una vaca lechera con un hisopo estéril, después de aplicado el producto en sus concentraciones de Neem (*Azadirachta indica*) (Sumergido el

pezón y aspersión sobre la piel de la glándula), posteriormente el hisopo se introducirá en un tubo con gel especializada para transporte de muestras microbiológicas, para transportarse al laboratorio y se realizó la siembra en cada uno de los medios de cultivos asignados para el crecimiento de bacterias, después de la siembra se debe esperar 24 horas para realizar el conteo de colonias mediante un contador de colonias especializados .

### **Procedimiento para el análisis de resultados**

Los datos obtenidos en el levantamiento de la información fueron introducidos en el paquete estadístico INFOSTAT versión 10, donde inicialmente se realizó una prueba normalidad mediante el test de Shapiro Wilk y posteriormente se aplicó un análisis de varianza ANOVA utilizando la prueba de separación por medio de regresión lineal.

Con el modelo estadístico lineal siguiente:

$$\gamma_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ijk}$$

$i = t$ . tratamiento.

$j =$  Repeticiones.

$\gamma_{ij}$  = La  $j$ . ésima observación del  $i$  – ésimo tratamiento.

$\mu$  = Es la medida poblacional a estimar a partir de los datos del experimento.

$\tau_i$  = Efecto del  $i$ . ésimo tratamiento a estimar a partir de los datos del experimento.

$\varepsilon_{ijk}$  = Efecto aleatorio de variación.

### **Elaboración de la etiqueta del producto**

La etiqueta (Ver anexo 7 y 8) se elaboró siguiendo las normas de la ley FPLA (Ley de embalaje y etiquetado correctos) una ley de los Estados Unidos que se aplica a las etiquetas de muchos productos de consumo internacionales con visión a ser exportados a otros países. (Kasterine, 2011)

Es una guía que trata de la certificación de sostenibilidad y los requisitos de los etiquetados de productos de acabados naturales en los Estados Unidos. Cubre todas las categorías de productos naturales, cosméticos, suplementos dietéticos a base de hierbas, alimentos saludables, y las drogas a base de hierbas, presenta una tipología de las etiquetas utilizadas en el mercado de los Estados Unidos de productos naturales y cómo encajan en un número de diferentes marcos regulatorios; describe la FPLA (Ley de Envasado y Etiquetado Correctos); explica cómo se regula el contenido de sitios web y las jurisdicciones de la FDA

(Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos) y de la FTC (Comisión Federal de Comercio); ofrece la información básica sobre los requisitos de los programas de certificación privados y voluntarios relativos al etiquetado de productos naturales. (Kasterine, 2011)

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de haber realizado los análisis estadísticos correspondientes al estudio se plantea los siguientes resultados acortes a las variables planteadas.

### Identificación de bacterias

La tabla 1 expresa que las bacterias encontradas en los medios de cultivo donde se aplicó el antiséptico son en su mayoría son gram negativas, en el cual refiere que la efectividad del producto corresponde a una lógica de eliminación de bacterias gram positivas ya que las presentes fueron E. coli y Klebsiella, siendo estas poco comunes en la piel de los pezones de la ubre y por ende poco comunes en la formación mastitis clínica y subclínica en vacas lecheras.

**Tabla 6. Descripción de bacterias encontradas en el estudio.**

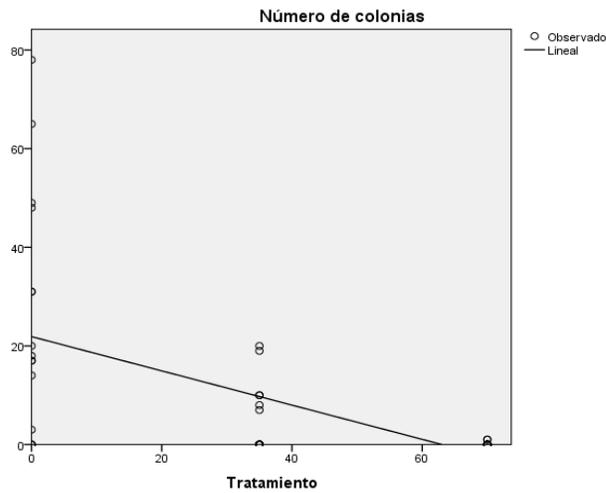
Concentraciones	Tipo muestra	de Análisis laboratorio realizado	de Bacterias encontradas	Clasificación
35 %	Hisopado	Cultivo McConkey Tinción Gram	E.coli Klebsiella	Gram negativas
70%	Hisopado	Cultivo McConkey Tinción Gram	E. coli	Gram negativa
0 %	Hisopado	Cultivo McConkey Tinción Gram	Cocos Bacilos	Gram positivas

Un hecho aceptado por toda la comunidad científica por (Jimenez, 2018) afirma que las interacciones existentes entre el hospedador y los microorganismos, se denomina microbiota y está en perfecta armonía con el huésped. (Jimenez, 2018) Menciona que se ha considerado que la glándula mamaria era estéril, aunque se han aislado grupos de muestras para análisis de cultivos.

Entre 1874 & 1878 (Roberts) presentaron una teoría de que la ubre sana estaba libre de gérmenes, pero luego se aceptó que leche recogida de manera aséptica de ubres sanas contenía microorganismos que se denominaban micrococos. En cambio, (Evans, 1916) Aisló en leche de ubres sanas un 58.8% de micrococos, los que hoy se conocen como gérmenes causantes de mastitis.

### Efecto del antiséptico

Según la figura 2 expresa que la mejor efectividad la obtuvo el tratamiento T3 (*Azadirachta indica* al 70 %), donde existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ) (Ver anexo 29), siendo muy efectivo para el control de bacterias gram positivas y gram negativas, en comparación a las otras concentraciones utilizadas.



### Ilustración 2. Efecto del antiséptico

A diferencia del estudio de (Jaime, 2013) se evaluó productos a base de alcoholes frente a *E. coli* en la desinfección al 1% con alcohol isopropílico, tomando muestras de diferentes áreas con un resultado del 90% de eliminación de bacterias.

(Gonzales R. , 2012) Evaluó la actividad bactericida y acción residual de desinfectantes a base de etanol en *E. coli*, lo utilizó al 0.7% comenzando con un número de colonias de 110, reduciendo a 9.17 con tres horas de efecto.

(Guerra, 2013) Estimo que el gluconato de clorhexidina al 4 % Es un antiséptico de amplio espectro, bactericida eficaz contra gérmenes Gram positivos y Gram negativos. Su efecto

germicida es rápido y prolongado. Tiene una importante acción residual sobre la piel, entre tres y seis horas.

### **Tiempo del crecimiento bacteriano**

Durante el seguimiento que se realizó al crecimiento bacteriano (UFC) en cuanto al tiempo se determinó que hubo crecimiento después de las 16 horas de incubación, inicialmente con el grupo testigo, seguido del grupo al 35% a las 24 horas y para finalizar con el grupo con la concentración al 70% donde hubo crecimiento a las 72 horas.

**Tabla 6. Tiempo del crecimiento bacteriano**

<b>Hora</b>	<b>T1 70%</b>	<b>T2 35%</b>	<b>T3 0%</b>
12 Horas	--	--	--
16 Horas	--	--	Si
24 Horas	--	Si	Si
72 Horas	Si	Si	Si

En un estudio (Bartlett, 2002) relata que el crecimiento bacteriano implica la división celular, llevando a un aumento exponencial del número de células iniciales de una población, por tanto los tiempos de generación varían mucho de una especie a otra, dependiendo también del medio de crecimiento y de las condiciones de cultivo. Posteriormente, a un aumento muy rápido, resultando en un elevado número de células. Es decir, no hay un tiempo establecido para el crecimiento de bacterias sobre medios de cultivo.

Por otra parte, (Madigan, 2010) afirma que existen factores que pueden afectar el tiempo de crecimiento en de las bacterias en cada cultivo, como ser; pH, temperatura, presión y radiación, que logran alterar el tiempo de crecimiento de las bacterias, retrasándolo y/o bloquearlo por completo.

### **Relación Costo Beneficio**

A través de una serie de cuadros comparativos realizados en el programa Excel se estudió la variable costo- beneficio en el cual se muestra diferencia significativa en los tratamientos, en cuanto al resultado que se obtuvo, se observa que el T1 es el que tiene mayor rentabilidad económica.

**Tabla 8. Ingresos**

Concepto	2020	2021	2022	2023	2024	2025
<b>Ingresos por ventas</b>	\$0.00	841,536.00	953,251.20	1130,445.90	1407,738.00	1783,593.91
<b>Costos Inversión</b>	\$20,000.00					
Costos Inversión fija	\$20,000.00					
Costos Inversión diferida	\$0.00					
Capital de trabajo	\$24,107.26					
<b>Costos de operación</b>						
Costos fijos		\$0.00	\$0.00	\$24,107.26	\$0.00	\$0.00
Costos variables		\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
Depreciación *		\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
<b>Intereses</b>		\$0.00	-\$44,107.26	\$0.00	\$24,107.26	\$0.00
<b>Utilidad Bruta</b>		\$841,536.00	\$997,358.46	\$1106,338.64	\$1383,630.74	\$1783,593.91
Impuesto (30%)		\$252,460.80	\$299,207.54	\$331,901.59	\$415,089.22	\$535,078.17
<b>Utilidad Neta</b>	\$44,107.26	\$1093,996.80	\$1296,566.00	\$1438,240.23	\$968,541.52	\$1248,515.74
Depreciación*		\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00	\$0.00
<b>Prestamo</b>	\$24,107.26					
Amortización deuda		\$252,460.80	\$39,632.84	\$45,577.77	\$52,414.44	\$60,276.60
<b>Capital de trabajo</b>						\$24,107.26
<b>Flujo de caja</b>	\$20,000.00	\$841,536.00	\$1256,933.15	\$1392,662.46	\$916,127.08	\$1212,346.39

En el caso de la relación beneficio-costos nos muestra cuánto dinero obtenemos por cada córdoba invertido, en este caso es de \$9.14 a una ganancia por la inversión. El periodo de recuperación de la inversión, según el flujo de caja sería de -0.80 años para lograr una

recuperación de ingresos económicos. Tomando en cuenta los valores adquiridos por medio del flujo de caja, los cuales nos ayudan a determinar la rentabilidad de nuestra iniciativa de negocio. Al obtener un valor actual neto de \$294,462.4 nos indica que el negocio puede llegar a ser rentable porque lograría generar rendimientos positivos, ya que las indicaciones muestran que para que sea posible debe ser mayor que cero, por lo tanto, el valor al día de hoy es de \$294,462.4 representado en términos absolutos. En el caso de la tasa interna de rendimiento, el valor que el flujo de caja nos muestra es de 50%.

**Tabla 9. Costo para un lote de x cantidad del producto 1**

Insumo/Materia prima	U/M	Cantidad	P/U	Total (\$)
Alcohol	Litro	60	213	12,780
Neem	Lb	140	50	7000
Gas	UN	50lb	290	290
		Sub - total	20,070	20,070
		Imprevistos	5%	1003.5
		Total	21,073.5	21,073.5

Costo unitario del producto 1:

$$C.U = \frac{CVT}{\# \text{ DE UNIDADES}} \quad C.U = 21,073.5 / 100 = 210 \text{ córdobas}$$

## VII. CONCLUSIONES

Se determinó que las concentraciones (35% y 70%) del antiséptico a base de Neem (*Azadirachta indica*) utilizado en el proceso de sellado y desinfección del pezón de la ubre, fueron efectivos mostrando la eliminación de carga bacteriana presente a través de los tratamientos evaluados, mediante la técnica de conteo de colonias y de igual manera determinando el desempeño positivo del antiséptico en uso y así evaluar los porcentajes utilizados en el laboratorio y valorando su efectividad contra bacterias.

A partir de los resultados obtenidos se concluye que:

En lo que respecta a la economía se pudo determinar que estos recursos naturales son mucho más baratos que los desinfectantes químicos y antibióticos, lo que se traduce en una mayor ganancia para las ganaderías, reduciendo las pérdidas en lo que a producción se refiere y alargando la vida productiva de la glándula y de la vaca.

Sabiendo e implementando buenas prácticas de higiene, tanto al ordeño como a la hora de instaurar una terapia, estos tratamientos que se estudiaron son completamente eficaces ante la gran diversidad bacteriana que se determinó en la investigación.

El Neem (*Azadirachta indica*) presentó una efectividad del 100% de los casos tratados, con la diferencia en el número de dosis por tratamiento. El tipo de manejo y el sellado del pezón de vacas lecheras, queda a decisión del encargado de la ganadería en cuanto a qué alternativa implementar, sabiendo que las dos dan excelentes resultados.

El Neem (*Azadirachta indica*) es un valioso recurso natural, muy eficaz para la prevención y el tratamiento de enfermedades vinculadas con la biología de las infecciones y los procesos inmunológicos de las glándulas mamarias a. Su empleo beneficiario directamente al sector Pecuario Nacional y a Salud Pública.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

Las combinaciones de estos ingredientes alcohol al 100% y *Neem* (*Azadirachta indica*) aplicado sobre la ubre, pueden contribuir a reducir la carga bacteriana en el pezón de vacas lecheras y así evitar la infección debido a su efecto antibiótico.

El sustrato de *Neem* se utilice como una propuesta terapéutica contra la gran diversidad etiológica productora de mastitis, considerándose que acciona como inhibidores para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Se deben seguir las buenas prácticas de ordeño higiénico para prevenir y reducir las mastitis producidas por bacterias contagiosas y ambientales, ser responsable en la aplicación de productos naturales a la hora de instaurar una terapia.

Además, realizar los tratamientos por el tiempo pertinente para no producir ningún efecto de resistencia o de lesión al parénquima glandular usando las dosis y concentraciones indicadas.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, V. L. (2008). En V. L. acuña, *Aislamiento, identificación, y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis*. Quito.
- Adams M, y. M. (2005). Food Microbiology . En y. M. Adams M, *Food Microbiology* (págs. 187-253). Guildford, UK.
- Aryal, S. (30 de septiembre de 2015). Microbiology Info.com. Obtenido de <https://microbiologyinfo.com/macconkey-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>.
- Ávila, T. S., Gutiérrez, C., G.J.I, S., Canizal, J. E., & Torres, U. (2001). En T. S. Ávila, C. Gutierrez, S. G.J.I, J. E. Canizal, & U. Torres, *Prevalencia de mastitis y glándulas improductivas en hatos pequeños de bovinos* (págs. 15-18). Xochimilco, DF.
- Baley, L. (1977). *Manual of cultivated plants*. New York: Mc. Millan publishing, Co, Inc. Recuperado el 17 de Agosto de 2019, de Manual of cultivated plants.
- Barkema, H. W. (1998). Management practices associated With low, medium and high somatic cell count in bulkmilk. *Dairy*, 81.
- Bartlett, D. (5 de Diciembre de 2002). *Pressure effects on in vitro microbial processes*. Obtenido de Biochimica et biophysica acta (BBA)- protein structure and molecular enzymology.
- Breteler, P. (9 de Octubre de 2007). Mastitis, tratamiento sin antibiótico. *Lechería*, 1-3.
- Cajina, L. (1993). *Producción y comercialización de productos lácteos*. Managua. Managua: NI.
- Cajina, L. (1993). *Producción y Comercialización de Productos Lácteos*. Managua. Managua: NI.
- Cano, P. (28 de Mayo de 2002). *Nuevas alternativas en el diagnóstico clínico de campo y en el tratamiento de mastitis*. Obtenido de Biozoo Lab: <http://www.biozoo.com.mx>
- Conrick, J. (1994). *Neem. The ultimate herb*. U.S.A. Alchua, Florida: hopeful communications.
- Council, N. N. (1992). *A tree fpr solving global problems*. National Reserch Council. Washintong D.C.: Technol. for international development, national academy Press.
- Cruz, F. (1998). *Dinámica de la azadirachta indica en árboles de neem de México y su efecto*. México: UANL.

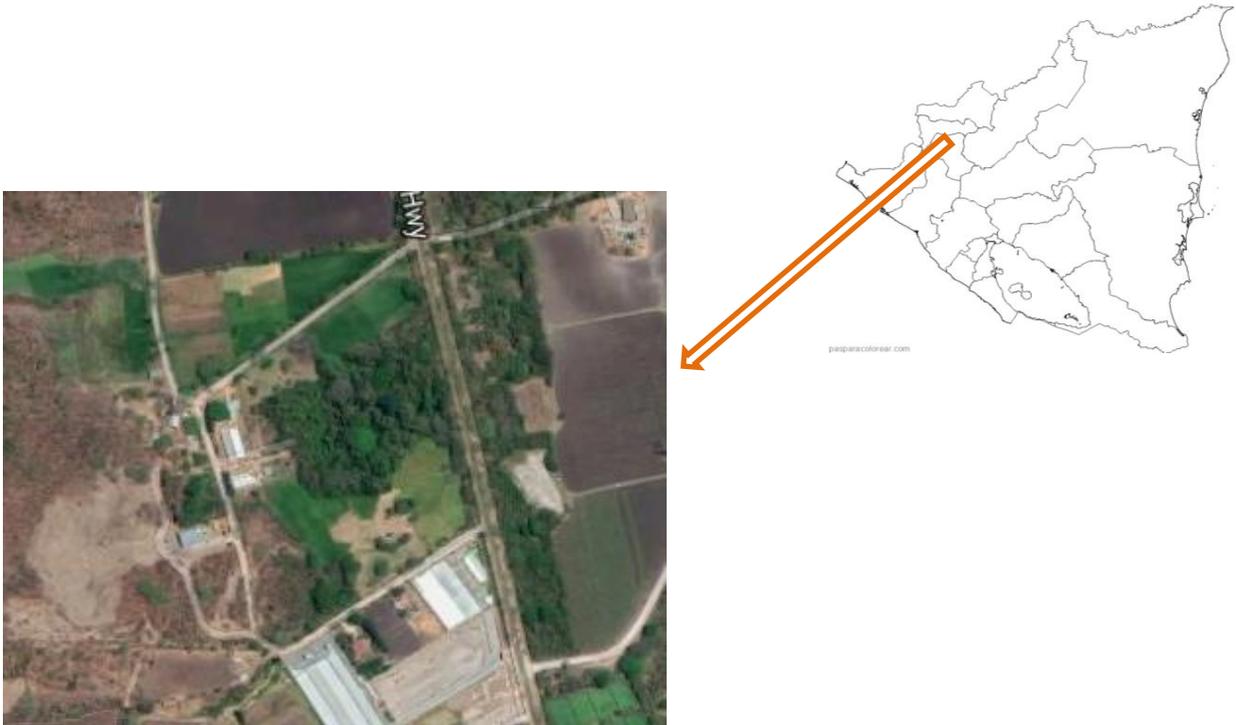
- Dismore, R. P. (2002.). food animal practical. En R. P. Dismore, *Biosegurity for mammary discases , health dairy cattle*. (págs. 115-131). North America.
- E, J., & Nicolas, J. (1994). *Investigación Integral de mercado*. Bogotá: Nomos S.A.
- Estuningsh, S. S. (2002). En S. S. Estuningsh, *Studies on streptococcus agalactiae isolated* (págs. 185- 187). Indonesia.
- Etgen, W., & Reaves, P. (1989). Alimentación y administración. En W. Etgen, & P. Reaves, *Ganado Lechero* (págs. 201-227). México D.F: Limusa S.A.
- Evans, A. (1916). Microbiota de la glandula mamaria bovina. *produccion animal*.
- FRACICA N, G. (1988). *Modelo de simulación en muestreo*. (M. M. Estrada, Ed.) Bogotá: Nomos S.A.
- Gonzales, L. O. (2015). *Solución hipertónica*. Estelí.
- Gonzales, R. (2012). *Comparacion de la actividad bactericida y accion residual de desinfectantes a base de etanol en areas pecuarias*. Chile: Repositorio universitario.
- Guerra, D. (2013). *Uso de desinfectantes y Antisepticos*. Buenos Aires , Argentina.
- Hogan, J., Gonzales, R., S, N., Oliver, J, P., & Smith, K. S. (1999.). Laboratory Handbook on bovine mastitis National mastitis counal. En H. J, R. Gonzales, N. S, Oliver, P. J, & K. S. Smith. Estados Unidos.
- Hommez, J. D. (1999). Identification of Nonlipophilic, Corynebacterium Isolated from Daury Cows With Mastitis. En J. D. Hommez, *Clinical Microbiology* (págs. 954-957).
- IARI. (1983). *Neem in agriculture*. Mexico DF: Res. Bull. 40.
- INETER. (2019). *Instituto Nicaraguense de Estudios Territoriales*. Recuperado el 16 de Agosto de 2019, de Instituto Nicaraguense de Estudios Territoriales: <https://www.ineter.gob.ni/met.html>
- Jaime, S. (2013). Evaluacion de un producto a base de alcoholes organicos frente a E. coli. *Alimentos Hoy*, 29.
- Jimenez, L. (2018). Microbiota de la glandula mamaria bovina. *Produccion Animal*.
- Kasterine, A. (10 de Marzo de 2011). *Etiquetado de productos naturales*. Recuperado el 9 de Abril de 2020, de El mercado de los estados Unidos: <file:///C:/Users/DELL/Downloads/Labeling%20Guide%20Spanish%20for%20web.pdf>

- Keefe, G. a. (1997). Health Management for environmental streptococci. En G. a. Keefe, *Therapy protocols for environmental streptococcal mastitis*. (págs. 75-86). Canada.
- KINNEAR, T. &. (1993). *Investigación de mercados*. (M. M. Estrada, Ed.) México: Nomos S.A.
- Kirk. (1984). Nonclinical mastitis In a dairy herd.
- Kleinschroth. (1991). La Mastitis. En Kleinschroth, *Laboratory Handbook on bovine mastitis*. (págs. 294-302). Estados Unidos.
- Las Heras, A., Lopez, I., E, L., Dominguez, L., & Fernandez. (2002). Pseudomonas aeruginosa. En A. Las Heras, I. Lopez, L. E, L. Dominguez, & Fernandez., *Necesidad del diagnostico*. Madrid España.
- Madigan, M. e. (5 de Diciembre de 2010). *Microbial growth*. Obtenido de Brack biology of microorganisms.
- Mateus, V. (1983). Mastitis en Bovinos. En V. Mateus, *Departamento de Produccion animal* (págs. 5-10). Turrialba, CR: CATIE.
- Mellenberguer, R., & Roth, C. (2002). Estudio sobre higiene animal. En R. Mellenberguer, & C. Roth. Michigan and Wisconsin.
- OEA. (3 de octubre de 2003). *Organizacion de estados americanos*. Obtenido de Produccion higienica de leche cruda: <http://www.oea.com>
- PERULACTEA. (6 de Mayo de 2013). Tratamiento natural, la mastitis con Ajo. *Perulactea*, 2.
- Philpot, N. N. (1992). *Mastitis, el contraataque*. USA: Babson Bros.
- Pizon, J. (1989). Mastitis Bovina I. tipo, agentes causales y Diagnosticos.
- Raisa Zhurbenko, D. R. (2010). *Revista Cenic*. obtenido de <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB2010-4-CB011.pdf>.
- Reneau, J. K. (2005). Association between hygiene scores and somatic cell scores in dairy cattle . 227.
- Roberts, W. e. (s.f.). Microbiota de la glandula mamaria bovina. *Produccion Animal*.
- Salazar, S. R. (1992). *El arbol de neem medicinal*. Facultad de agronomia. Mexico: UANL.
- Saran, A. (1986). *Mastitis bovina: enfermedades de la ubre y su control*. Israel.

- Tollersrud, T. K. (2000.). Genetic and serologia. En T. K. Tollersrud, *Evaluation, of, capsule production by bovine Mammary Isolates of Staphylococcus aureus and other staphylococcus spp.* (págs. 2998-3003). Europe and United States: Journal of clinical Microbiology.
- Vasi, J. F. (2000). Infection and Immunity. En J. F. Vasi, *Proteins of streptococcus dysagalactiae* (págs. 294-302).
- Warthen, j. J. (1989). *Neem (Azadirachta indica) organisms affected and reference list.* Washington: Proc. Entomol. Soc.
- Wellenberg, G. e. (2002). viral infections and bovine mastitis. *veterinary microbiology*, 2-21.
- Yamagata, M. e. (14 de Abril de 1987). The economic benefit of treating subclinical Streptococcus agalactie mastitis in lactating cows. *JAVMA*, 1556-1561. Obtenido de JAVMA.

## X. ANEXOS

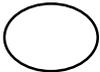
### Anexo 1. Mapa de ubicación del estudio



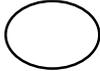
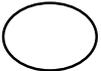
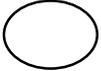
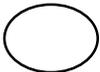
### Anexo 2. Tabla de tratamiento 1

Tratamiento 1: Extracto de Neem al 70% de concentración				
PEZON	P1	P2	P3	P4
VACA 1 4108	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
VACA 2 1358	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
VACA 3 1480	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
VACA 4 7006	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**Anexo 3. Tabla de tratamiento 2**

<b>Tratamiento 2: Extracto de Neem al 35% de concentración</b>				
<b>PEZON</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
<b>VACA 1</b>				
<b>VACA 2</b>				
<b>VACA 3</b>				
<b>VACA 4</b>				

**Anexo 4. Tabla de tratamiento 3**

<b>Tratamiento 3: testigo (agua)</b>				
<b>PEZON</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
<b>VACA 1</b>				
<b>VACA 2</b>				
<b>VACA 3</b>				
<b>VACA 4</b>				

**Anexo 5. Hoja de campo**

<b>No</b>	<b>Identificación del animal</b>	<b>Número de partos</b>	<b>Cantidad de leche producida</b>	<b>Fecha de recolección de muestra</b>	<b>Tratamiento</b>
1	4108	3	3 litros / día	09-01-20	70%
2	1358	2	5 litros / día	09-01-20	70%
3	1480	1	4 litros/ día	09-01-20	70%

4	7006	1	4 litros / día	09-01-20	70%
5	7017	2	5 litros / día	09-01-20	35%
6	1359	3	6 litros / día	09-01-20	35%
7	6813	1	5 litros / día	09-01-20	35%
8	6853	2	4 litros / día	09-01-20	35%
9	1483	2	4 litros / día	09-01-20	0%
10	4110	3	6 litros/ día	09-01-20	0%
11	1342	4	6 litros / día	09-01-20	0%
12	1340	4	6 litros / día	09-01-20	0%

---

<b>No.</b>	<b>Características del animal (raza)</b>	<b>Edad (meses)</b>
1	Yersey / Pardo suizo	36
2	Holstein / Brahman	24
3	Pardo / Brahman	24
4	Holstein	24
5	Pardo / brahmán	36
6	Holstein	24
7	Pardo suizo	24
8	Pardo suizo	36
9	Pardo / brahmán	36
10	Pardo / brahmán	48
11	Pardo / brahmán	48
12	Pardo / brahmán	48

---

**Anexo 6. Neem (*Azadirachta indica*)**



**Anexo 7. Pesaje de hojas para extracto**



### Anexo 8. Preparación del extracto



### Anexo 9. Extracto



**Anexo 10. Extracto listo**



**Anexo 11. Tubos de ensayo con gel**



## Anexo 12. Animales a muestrear



## Anexo 13. Aplicación de antiséptico



**Anexo 14. Toma de muestra**



**Anexo 15. Toma de muestra en campo finalizada**



### Anexo 16. Fase en campo finalizada



### Anexo 17. Siembra de bacterias



### Anexo 18. Muestras en plato petri



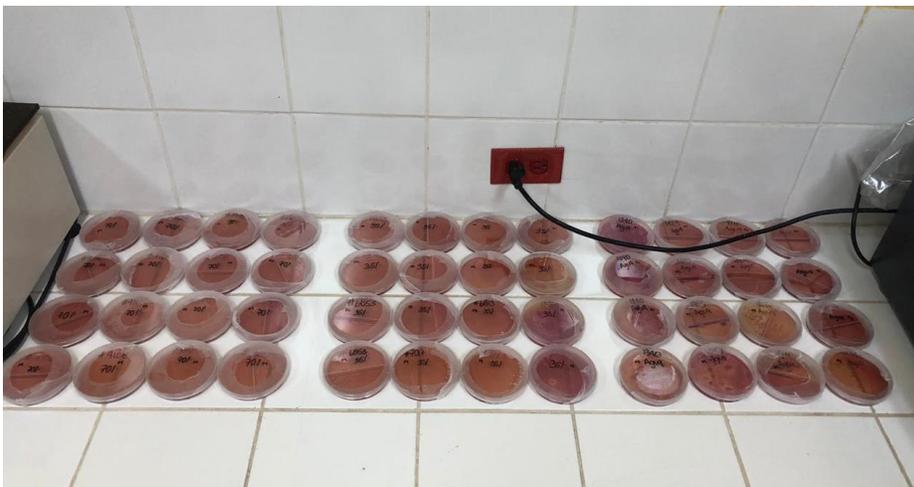
### Anexo 19. Muestras en incubadora



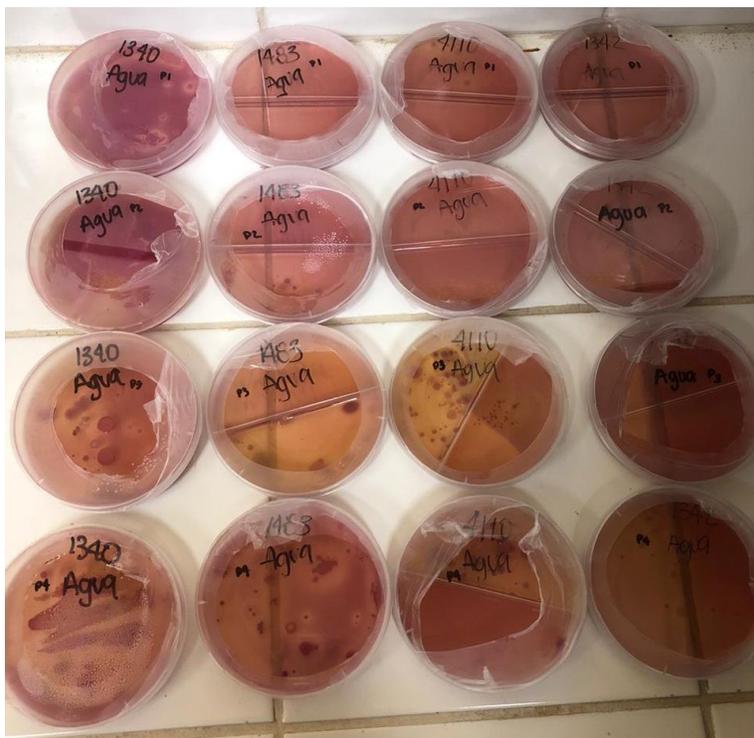
## Anexo 20. Siembra de cultivos Finalizada



## Anexo 21. Muestras de colonias



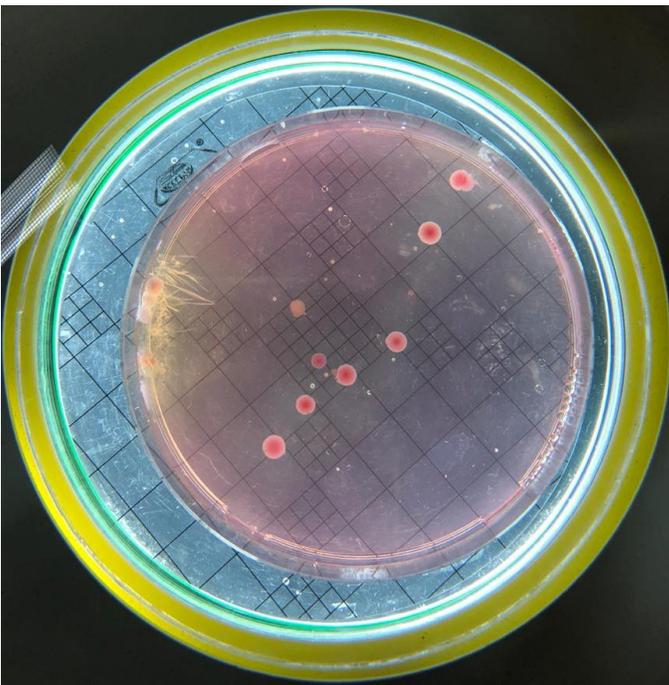
## Anexo 22. Resultado de colonias



**Anexo 23. Conteo de colonias**



**Anexo 24. Colonias Bacterianas**



## Anexo 25. Tinción de gram para identificación de bacterias



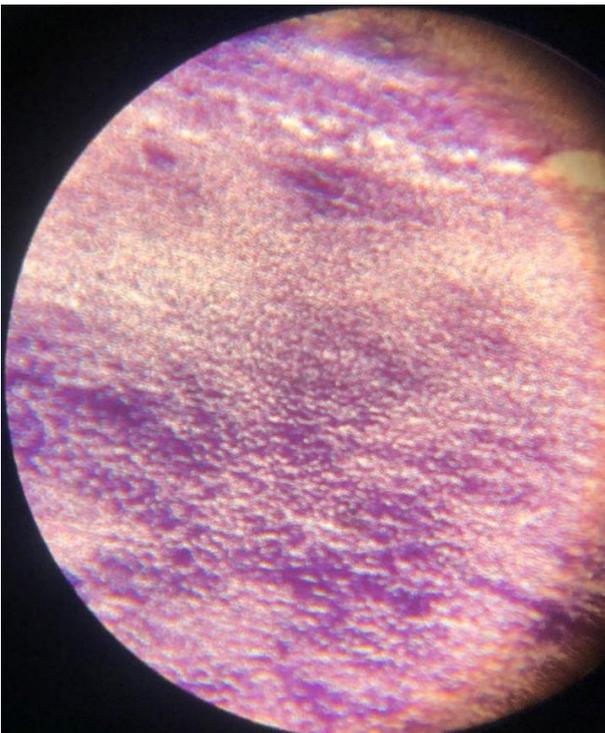
## Anexo 26. Resultados al microscopio



**Anexo 27. Bacterias gram negativas**



**Anexo 28. Bacterias gram positivas**



## Anexo 29. Base de resultado de datos

### Resumen del modelo

R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
.562	.316	.301	14.925

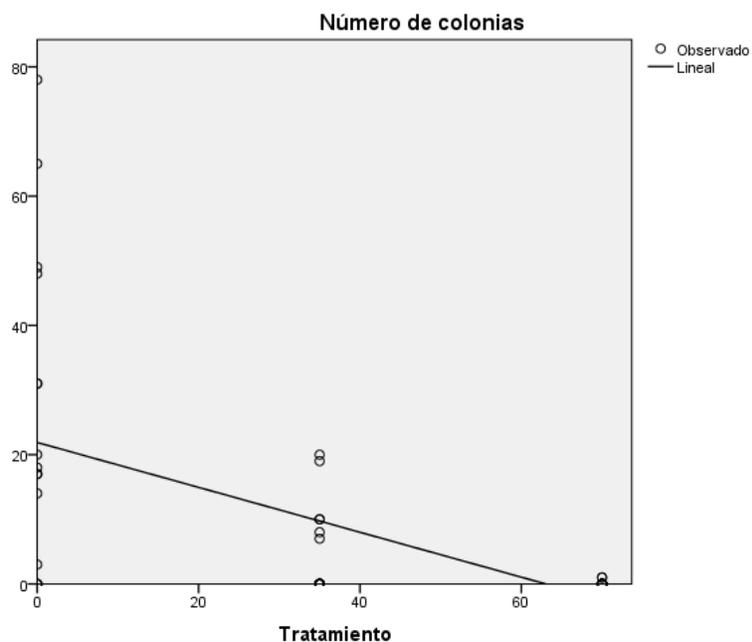
## Anexo 30. Resultado ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	4728.781	1	4728.781	21.229	.000
Residuo	10246.698	46	222.754		
Total	14975.479	47			

## Anexo 31. Resultado de coeficientes

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error estándar	Beta		
Tratamiento	-.347	.075	-.562	-4.607	.000
(Constante)	21.885	3.406		6.425	.000

### Anexo 32. Número de colonias



### Anexo 33. Efectividad de producto

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Número de colonias	48	0.36	0.33	150.29

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5354.04	2	2677.02	12.52	<0.0001
Tratamientos	5354.04	2	2677.02	12.52	<0.0001
Error	9621.44	45	213.81		
Total	14975.48	47			

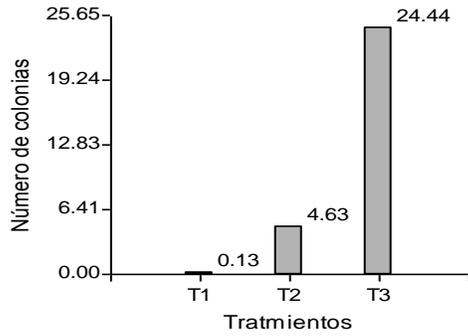
**Test: Tukey Alfa:=0.05 DMS:=12.54222**

Error: 213.8097 gl: 45

Tratamientos	Medias	n	
T1	0.13	16	A
T2	4.63	16	A
T3	24.44	16	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0.05)

**Figura 1. Efectividad del antiséptico**



## Regresión

### análisis de regresión lineal

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj
Número de colonias	48	0.36	0.33

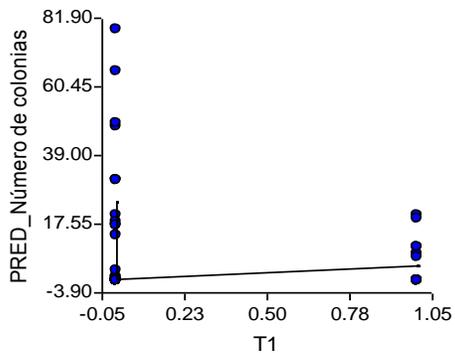
### Coefficientes de regresión y estadísticos asociados

Coef	Est.	EE	LI (95%)	LS (95%)	T	p-valor	CpMallows
const	0.13	3.66	-7.24	7.49	0.03	0.9729	
T1	4.50	5.17	-5.91	14.91	0.87	0.3887	2.76
T2	24.31	5.17	13.90	34.72	4.70	<0.0001	23.66

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5354.04	2	2677.02	12.52	<0.0001
Tratamientos	5354.04	2	2677.02	12.52	<0.0001
Error	9621.44	45	213.81		
Total	14975.48	47			

### Título



### Anexo 33. Etiqueta del producto

<b>Drug facts</b>	
<b>Ingrediente activo:</b>	<b>Propósito:</b>
Neem 35%	Antibacteriano, antiinflamatorio, antimicótico.
Alcohol 100%	Antiséptico por excelencia
<b>Usos:</b>	
Producto indicado para la higiene y desinfección de la glándula mamaria y superficie del tejido mamario. Indicado como preventivo a patologías de origen bacteriano y recomendado para el sellado de pezón posterior al ordeño. <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Mastitis subclínica.</li></ul>	
<b>Al momento de usar:</b> únicamente de forma externa (tópica), no más de dos veces por día.	
<b>Advertencias:</b>	
Manténgase fuera del alcance de los niños, evita contacto con el sol, áreas faciales (Ojos, boca, oídos) del animal.	
Uso exclusivo de forma tópica, en caso de efectos secundarios consultar al veterinario de emergencia.	
<b>Indicaciones:</b>	
Indicado para desinfección de tejidos superficiales de la glándula mamaria, prevención de enfermedades de origen bacteriano y sellado de pezón posterior al ordeño.	

**Anexo 34. Nombre y marca del producto**

Antiséptico natural

**MID-NEEM**

