

**LIBERACIÓN CONTROLADA DEL LARVICIDA NOVALURON PARA EL  
CONTROL DE MOSQUITOS VECTORES DE ENFERMEDADES TROPICALES  
A PARTIR DE HIDROGELES DE QUITOSANO**

**LORENA LADINO BELTRÁN**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
QUÍMICA FARMACÉUTICA  
SANTIAGO DE CALI  
2016**

**LIBERACIÓN CONTROLADA DEL LARVICIDA NOVALURON PARA EL  
CONTROL DE MOSQUITOS VECTORES DE ENFERMEDADES TROPICALES  
A PARTIR DE HIDROGELES DE QUITOSANO**

**LORENA LADINO BELTRÁN**

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE PREGRADO EN  
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**TUTORAS  
NORA ELENA VALDERRUTEN, Ph.D  
PROFESORA DEPTO. CIENCIAS QUÍMICAS  
CLARA BEATRIZ OCAMPO, Ph.D  
INVESTIGADORA - CIDEIM**

**SANTIAGO DE CALI  
2016**

**APROBADO POR:**

---

**Nombre correspondiente**

**Evaluador**

---

**Nombre correspondiente**

**Evaluador**

---

**Nora Elena Valderruten, Ph.D**

**Director del proyecto**

---

**Clara Beatriz Ocampo, Ph.D**

**Co-director del proyecto**

**Santiago de Cali  
Viernes 18 de Marzo de 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por su apoyo incondicional, su compañía y por ser la principal motivación para lograr mis metas.

Agradezco a mis tutoras, Nora Elena Valderruten y Clara Beatriz Ocampo, por su compromiso con el proyecto, su constante apoyo y el acompañamiento que me brindaron a lo largo de todo este proceso.

Al personal del CIDEIM, especialmente a Luis E. Ramírez por su colaboración y el tiempo dedicado para orientarme en la realización del proyecto. Finalmente, a mis compañeros de Icesi que siempre estuvieron escuchándome y apoyándome.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	7
LISTA DE GRÁFICAS.....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE ANEXOS .....	10
RESUMEN DEL PROYECTO .....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO.....	15
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	15
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	17
2.2.1 Descripción del Dengue, Chikungunya y Zika .....	17
2.2.3 Mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	19
2.2.4 Control del mosquito .....	20
2.2.5 Novaluron .....	21
2.2.6 Hidrogeles como sistemas de liberación controlada.....	23
2.3 OBJETIVOS .....	25
2.3.1 Objetivo General.....	25
2.3.2 Objetivos Específicos.....	25
2.4 METODOLOGÍA.....	26
2.4.1 Reactivos.....	26
2.4.2 Materiales y equipos.....	26
2.4.3 Síntesis de sistemas de liberación (Hidrogel/Larvicida) .....	26
2.4.4 Bioensayo larvario en condiciones de laboratorio .....	27
2.4.5 Bioensayo larvario en condiciones de semi-campo.....	30
2.4.1 Matriz de marco lógico.....	33
2.5 RESULTADOS .....	34
2.5.1 Síntesis de los hidrogeles.....	34
2.5.2 Bioensayos en laboratorio .....	35
2.5.3 Bioensayos en condiciones de semi-campo.....	39
6. DISCUSIÓN .....	42
2.6 CONCLUSIONES.....	45

2.7 RECOMENDACIONES .....46  
3. LITERATURA CITADA .....47

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Nombre y casa comercial de los reactivos empleados.....	26
<b>Tabla 2.</b> Actividades, supuestos e indicadores según los objetivos específicos. ...	33
<b>Tabla 3.</b> Variación del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas, respecto a los bioensayos, la concentración y/o interacción entre ambos. ....	37
<b>Tabla 4.</b> Test t (LSD) de comparación de la respuesta media del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas entre los bioensayos. Los bioensayos 1, 2 y 4 están en el grupo A. Y los bioensayos 1, 3 y 4 están en el grupo B. ....	38
<b>Tabla 5.</b> Test t (LSD) de comparación de la respuesta media del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas entre las concentraciones. La concentración 1X y 2X están en el grupo A y la 3X en el grupo B .....	38
<b>Tabla 6.</b> Test de comparación de la respuesta media del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas entre la interacción de factores .....	38
<b>Tabla 7.</b> Datos para determinación de la densidad del glutaraldehído 2,5%.....	51
<b>Tabla 8.</b> Moles de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento .....	52
<b>Tabla 9.</b> Volumen de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento .....	52
<b>Tabla 10.</b> Cantidad de novaluron de acuerdo a la concentración.....	54
<b>Tabla 11.</b> Cantidad de novaluron de acuerdo a la concentración y entrecruzamiento .....	54
<b>Tabla 12.</b> Cantidades finales de los componentes del hidrogel.....	55
<b>Tabla 13.</b> Variación de la respuesta media, mediante el análisis del valor P para el bioensayo 1 (0-15 días) .....	59
<b>Tabla 14.</b> Variación de la respuesta media, mediante el análisis del valor P para el bioensayo 2 (15-30 días) .....	59
<b>Tabla 15.</b> Variación de la respuesta media, mediante el análisis del valor P para el bioensayo 3 (30-45 días) .....	59
<b>Tabla 16.</b> Variación de la respuesta media, mediante el análisis del valor P para el bioensayo 4 (45-60 días) .....	59

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Mortalidad acumulada de larvas para 1X, 2X y 3X con 25% de entrecruzamiento para los diferentes bioensayos.....	35
<b>Gráfica 2.</b> Mortalidad acumulada de larvas para 1X, 2X y 3X con 75% de entrecruzamiento para los diferentes bioensayos.....	36
<b>Gráfica 3.</b> Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas en condiciones de semi-campo con larvas de laboratorio, periodo 1 .....	40
<b>Gráfica 4.</b> Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas en condiciones de semi-campo con larvas de laboratorio, periodo 2 .....	40
<b>Gráfica 5.</b> Porcentaje de mortalidad de larvas en las 3 colecciones de semi-campo llevadas a condiciones controladas de laboratorio.....	41



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo matemático del comportamiento de los casos de las arbovirosis Dengue, Chikungunya y Zika en las Américas y su proyección para el 2016.....	14
<b>Figura 2.</b> Estructura química del Novaluron .....	22
<b>Figura 3.</b> Estructura química del quitosano .....	24
<b>Figura 4.</b> Diseño experimental del ensayo en condiciones de laboratorio .....	28
<b>Figura 5.</b> Bioensayos en condiciones de laboratorio.....	29
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental del ensayo en condiciones de semi-campo.....	30
<b>Figura 7.</b> Adecuación de los baldes y su exposición a condiciones ambientales..	31
<b>Figura 8.</b> Diagrama de colección de larvas nativas de los baldes de estudio .....	32
<b>Figura 9.</b> Diagrama de adición de larvas de CIDEIM en ausencia de larvas nativas .....	32

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Cálculos para la síntesis de hidrogeles.....	50
<b>Anexo 2.</b> Documento de recolección de datos para ensayos biológicos en laboratorio.....	56
<b>Anexo 3.</b> Documento de recolección de datos para ensayos biológicos en semi campo.....	57
<b>Anexo 4.</b> Variación de respuesta media mediante análisis del valor P para los diferentes bioensayos.....	58

## RESUMEN DEL PROYECTO

Actualmente, la problemática de salud pública en las Américas se ha venido incrementando con la emergencia del Chikungunya, las epidemias de Dengue y las infecciones por el virus Zika. Estos son tres arbovirus transmitidos por el mismo vector *Aedes aegypti*, del cual no se ha logrado tener un control adecuado, ya que las estrategias de control son costosas de mantener y además, este mosquito presenta resistencia a una amplia variedad de insecticidas. Las estrategias de control por insecticidas requieren gran cantidad de estos compuestos lo cual causa impacto ambiental negativo.

Este estudio pretende desarrollar una estrategia innovadora en la cual, por medio del uso de hidrogeles de quitosano, se logre la liberación controlada del larvicida Novaluron, con el propósito de disminuir la proliferación del mosquito *Aedes aegypti* por periodos de tiempo prolongados. Haciendo uso del polímero natural quitosano (biodegradable) y de menor cantidad de insecticida para así disminuir el impacto en el ecosistema.

Para esto se realizó la síntesis de hidrogeles de quitosano con un porcentaje de entrecruzamiento de 25% y 75%. Se realizaron dos bioensayos larvarios, uno en condiciones de laboratorio efectuando la incorporación de tres concentraciones diferentes del larvicida Novaluron, y el otro, en condiciones de semi-campo con una sola concentración, con el fin de determinar la eficacia de cada uno de estos frente a la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito *Aedes aegypti*.

Los resultados obtenidos de los hidrogeles durante los 60 días de evaluación, con un recambio quincenal del agua y larvas. Para el ensayo de laboratorio se determinó que el entrecruzamiento no es un factor determinante en la mortalidad de las larvas, debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de las larvas. Por el contrario, se encontró que los hidrogeles con la concentración 3X fueron más efectivos en cuanto al tiempo requerido para matar el 100% de las larvas expuestas que los 1X y 2X en el tiempo evaluado. Se recomienda continuar los ensayos planteados para determinar si los hidrogeles 3X presentan una mayor efectividad que las demás concentraciones. Finalmente, en los ensayos de semi-campo no se obtuvieron resultados satisfactorios por lo que se plantearon nuevas alternativas de experimentación.

**Palabras clave:** hidrogel, liberación controlada, quitosano, Novaluron, larvas, mortalidad, *Aedes aegypti*.

## ABSTRACT

Nowadays, public health problems in the Americas have been increasing due to the Chikungunya emergency, the Dengue Epidemic and infections caused by the Zika virus. These three health threats are arboviruses, which are transmitted by the same vector *Aedes aegypti*. This vector has been difficult to contain since control strategies can be very expensive to keep, and as a result of its resistance to a wide variety of insecticides. Furthermore, insecticide control strategies demand high quantities of this kind of product in order to be effective, but this also causes an environmental impact.

This study was made in order to develop an innovative way through the usage of chitosan hydrogels to reduce the *Aedes aegypti* mosquito proliferation. This can be achieved with a natural biodegradable polymer (chitosan) which enables the release of Novaluron's larvicide in a control manner during long periods while reducing the environmental impact through less insecticide usage. For this, a chitosan hydrogel synthesis was made with crosslinking percentages of 25% and 75%. With the hopes to determine the effectiveness of Novaluron's larvicide, two larval bio-tests took place. The first test was made within laboratory conditions with three different Novaluron's concentrations, whereas the second was done in semi-field conditions with only one concentration. The expected result was to find the *Aedes aegypti* larvae's mortality rate with different insecticide's concentration.

The following results were obtained from the 60-day evaluation exposure hydrogels, which were subdued to 15-day water and larvae changes. For the laboratory test, it is concluded that the crosslinking is not a determining factor in larvae mortality rate since no conclusive results were obtained in the statistical analysis. In contrast, insecticide concentration levels were found to be very important in mortality rate results as it was also found that the 3X concentration was the most effective to kill 100% of the larvae compared to 1X and 2X with the same evaluation time. More tests are advised to determine whether the 3X hydrogels present a higher efficacy than the other concentrations.

Finally, the semi-field tests did not provide any satisfactory result; therefore, new experimental alternative strategies were established.

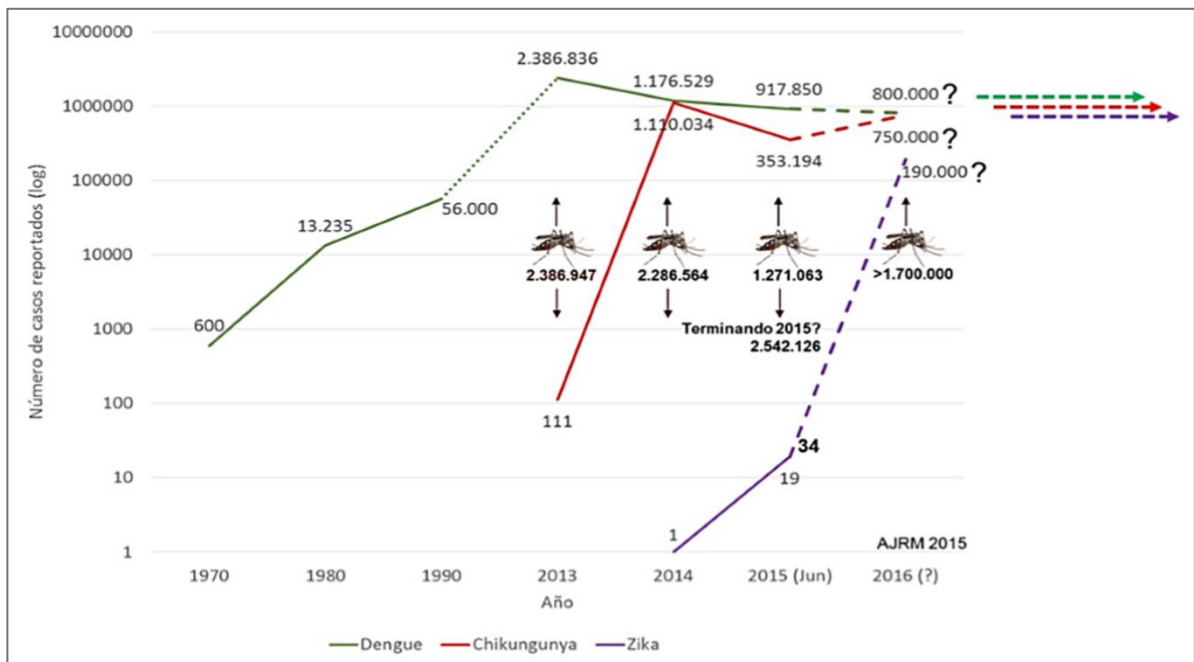
**Key words:** Hydrogel, controlled release, chitosan, Novaluron, larvae, mortality, *Aedes aegypti*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Dengue, el Chikungunya y el Zika son enfermedades clasificadas como arbovirales debido a que son transmitidas por artrópodos, en este caso, el mosquito *Aedes aegypti*. Son enfermedades con la principal incidencia en las regiones tropicales y subtropicales siendo favorecidas por el clima colombiano.

Estas arbovirosis se han convertido en grandes problemáticas de salud pública debido a su rápida expansión y al aumento del número de afectados en poco tiempo. Se ha venido evidenciando un incremento significativo en la transmisión de las enfermedades infecciosas por parte del vector *Aedes aegypti*, más específicamente, desde el 2013 hasta el 2015 la Organización Panamericana de Salud reportó un total de 2.386.836 casos de Dengue en las Américas. Además de esto, en el 2013 se encuentran los primeros reportes de casos de Chikungunya en las islas del Caribe, extendiéndose por las Américas teniendo su máximo en el 2014 con un total de 1.130.034 casos. Todos estos reportes han venido en aumento con el tiempo como se muestra en la Figura 1, evidenciando la efectividad del vector no solo para la transmisión del Dengue sino para la transmisión del Chikungunya (Rodríguez, 2015).

En relación con lo mencionado anteriormente, en el 2015 empezaron los reportes de otra arbovirosis, el Zika; de la cual si se hace el análisis según la progresión del Chikungunya se espera que en el 2016 una considerable fracción de transmisión de arbovirus por parte de *Aedes aegypti* sea de Zika aumentando la problemática de salud presentada (Rodríguez, 2015).



**Figura 1.** Modelo matemático del comportamiento de los casos de las arbovirosis Dengue, Chikungunya y Zika en las Américas y su proyección para el 2016 (Morales, 2015)

El vector implicado en la transmisión de estas arbovirosis (*Aedes aegypti*) se caracteriza por su alta proliferación en lugares donde hay agua sin circulación. Se han planteado por diversas entidades gubernamentales diferentes métodos de control para disminuir los hábitats propicios para el crecimiento del mosquito, entre estos la concientización de la comunidad para darle mejor manejo a los depósitos de agua presentes en los hogares y en las vías públicas, sin embargo, esta es una estrategia difícil de aplicar debido a que no es fácil lograr la eliminación de todos los depósitos. Como estrategia complementaria se ha venido implementando el control de los sumideros de agua en las ciudades de Colombia por medio del uso de larvicidas cada 15 días para detener el desarrollo de las larvas o para eliminar los mosquitos en su estadio adulto.

Ante la necesidad de sistemas eficientes que contribuyan al control de la proliferación del mosquito *Aedes aegypti* se plantea la implementación de hidrogeles de quitosano como sistemas de liberación controlada para lograr mantener el efecto del larvicida en el tiempo y así disminuir tanto la cantidad de larvicida utilizada en los controles de sumideros como la periodicidad de aplicación. Otro beneficio de los sistemas de liberación controlada a base del polisacárido quitosano es que este es un polímero biodegradable por lo que se contribuye al cuidado del medio ambiente.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Es la implementación de hidrogeles de quitosano como sistemas para la liberación controlada de larvicidas una estrategia eficiente para evitar la proliferación de los vectores de enfermedades tropicales como el Dengue y Chikungunya?

El mosquito *Aedes aegypti* se encuentra en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, donde debido a las condiciones ambientales, se favorece su desarrollo y proliferación. Este es uno de los principales causantes del contagio de enfermedades infecciosas, entre las que se encuentra: el Dengue, el Chikungunya, la fiebre amarilla y Zika. Anualmente, de 50 a 100 millones de personas se ven afectadas por estas enfermedades, además de esto, aproximadamente 2.500 millones de personas viven en áreas en las cuales existe un riesgo potencial de transmisión de estas patologías (Vontas et al., 2012).

Desde 1978 hasta 2010, se registró un acumulado de 1'020,637 casos de Dengue en Colombia, lo que representa un promedio anual de 30,928, y de este total, entre 8 y 10% corresponden a casos de Dengue grave (Padilla et al., 2012). Este virus es de sintomatología aguda, los síntomas aparecen entre tres a catorce días después de la picadura del mosquito. A pesar de que es de corta duración, sus síntomas varían desde síndromes febriles hasta cefaleas, dolor muscular, vómitos y hemorragias pudiendo producir la muerte (OMS, 2014).

Por otro lado, el virus de Chikungunya ha presentado 358.850 casos en Colombia hasta el 19 de Diciembre de 2015 según el Instituto Nacional de Salud (Instituto Nacional de Salud, 2015). Este virus es crónico, es decir, produce afecciones a larga duración y es de progresión lenta, compromete las articulaciones, la mayoría de los pacientes se recuperan completamente pero en algunos casos esos dolores persisten por meses, o incluso años. Todos los individuos que no han sido infectados previamente con Chikungunya están en riesgo de adquirir la infección y desarrollar la enfermedad. Finalmente, en cuanto a la sintomatología del Zika, esta tiene mucho en común con el Chikungunya y la diferencia más significativa es la presencia de conjuntivitis en la mayoría de los casos (OMS, 2014).

En septiembre de 1996, los ministros de salud de los países del continente americano, dieron su aprobación a la resolución CD39.R11, la cual determina que deben haber unas directrices generales para elaborar un plan continental para intensificar la supresión del mosquito por parte de los gobiernos (Cruz, 2002).

A pesar que la problemática del Dengue no es una novedad y el Chikungunya y el Zika son enfermedades infecciosas emergentes en América, siendo tres tipos de enfermedades endémicas de las que no se ha logrado tener un control riguroso, por lo que representa un problema de salud pública en una gran cantidad de países. Entre las estrategias de control se encuentra la eliminación de los criaderos, la cual es complicada debido a la falta de conciencia de las personas, y por otro lado, las vacunas contra estas enfermedades aún no se encuentran en el mercado.

Sin embargo, la estrategia más viable es el control del vector en los hábitats en que se ha determinado mayor proliferación del mosquito como en los sumideros. Por ejemplo, actualmente en Colombia el control se está realizando por medio de la aplicación de larvicidas en los sumideros cada quince días (Giraldo et al., 2008); pero a pesar de las estrategias de control planteadas, se ha evidenciado que es costoso mantener los niveles de larvicidas que se necesitan en los sumideros a través del tiempo, y además de esto, debido a su uso excesivo causan un aumento de la contaminación ambiental.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la finalidad de este proyecto es proponer una estrategia innovadora en la cual, por medio del uso de hidrogeles de quitosano, se produzca una liberación controlada del larvicida que permita disminuir la proliferación del mosquito por mayores períodos de tiempo y simultáneamente se consiga un menor uso del producto insecticida, lo cual disminuiría el impacto en el ecosistema. El hidrogel de quitosano es un polímero natural (biopolímero) que es biodegradable.

Por último, ya que el mosquito ha creado resistencia a las 4 clases de insecticidas (carbamatos, organoclorados, organofosforados y piretroides) (Cáceres et al., 2013), se va a usar en este caso Novaluron, el cual es un larvicida incluido en la familia de las Benzoil Fenil Ureas. Este es caracterizado por la inhibición de la síntesis de quitina, además de esto, vale la pena resaltar que este compuesto no es tóxico para otras especies (Food and Agriculture Organization , 2003). Finalmente, con este proyecto se contribuye a la búsqueda de estrategias eficientes para el control de vectores de enfermedades endémicas y promueve el uso de biopolímeros como sistemas inteligentes de liberación controlada.



## **2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

A partir de los registros de temperatura global de la superficie terrestre, se determinó que entre 1995 y 2006 se presentaron los 11 años catalogados entre los más cálidos desde 1850 (Cerdea et al., 2009), evidenciando el indiscutible cambio de temperatura global que se ha venido dando, esto ha provocado la disminución de la masa de nieve, y como consecuencia del derretimiento de la nieve han aumentado los niveles de los mares.

Teniendo en cuenta que el clima es la principal influencia del ambiente en los ecosistemas y que se encuentran constituidos por microorganismos, insectos vectores biológicos, reservorios de animales, entre otros; es evidente que un cambio en el clima representa un cambio en cada uno de estos componentes. Estos cambios generan variaciones en la incidencia y distribución de algunas patologías en su mayoría infecciosas, por lo tanto, existe gran preocupación a nivel mundial con respecto al impacto que puede tener el cambio climático sobre algunas enfermedades, más que todo en países en vía de desarrollo (Cerdea et al., 2009). Por un lado, las lluvias en áreas normalmente secas pueden provocar el aumento de charcos y agua estancada, generando ambientes propicios para la proliferación de los mosquitos, y por otro lado, el cambio climático permitiría que los vectores se propaguen en lugares donde anteriormente no tenían la capacidad de sobrevivir.

Además de las condiciones climáticas que conlleven al aumento de lugares con aguas estáticas para la proliferación del mosquito, su reproducción está muy relacionada con el hábitat humano. Especialmente en países en vías de desarrollo las ciudades proporcionan lugares propicios para el desarrollo de las larvas del mosquito, como lo son: envases plásticos con restos de agua acumulados, neumáticos en desuso, entre otros, lo que contribuye al aumento de la densidad de la población de estos vectores en zonas urbanizadas (Vontas et al., 2012).

### **2.2.1 Descripción del Dengue, Chikungunya y Zika**

El Dengue, el Chikungunya y el Zika tienen diferentes implicaciones y niveles de gravedad, lo que los convierte en enfermedades desencadenantes de una problemática de salud pública.

Primero que todo, estas tres enfermedades están clasificadas como enfermedades arbovirales, lo cual hace referencia a que son virus transmitidos por artrópodos, en este caso mosquitos del género *Aedes*, siendo el vector con mayor relevancia *Aedes aegypti*. Por un lado, el Dengue es una infección vírica que causa síntomas gripales y en ocasiones evoluciona a un cuadro que puede ser mortal (Dengue grave). Existen 4 serotipos diferentes de este virus: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4 (Berrueta, 2015), lo que implica mayores problemas de salud, ya que cuando una persona se recupera de una infección por alguno de los serotipos, adquiere inmunidad de por vida contra ese serotipo específico, sin embargo, la inmunidad hacia los otros serotipos existentes es temporal (alrededor de 2-3 meses). Por lo tanto las infecciones causadas posteriormente debidas a otro serotipo aumentan en gran proporción el riesgo de presentar Dengue grave ( Organización Mundial de la Salud (OMS); Programa Especial para Investigación & Capacitación en Enfermedades Tropicales, 2009). Hasta Diciembre de 2015 se notificaron en Colombia 92.795 casos de los cuales 1.322 casos (1,4%) correspondieron a Dengue grave, comparando estos valores con los obtenidos en el mismo periodo epidemiológico del 2014 se evidencia una disminución de 14.390 casos, representando un 13,4% de variación (Instituto Nacional de Salud, 2015).

El Dengue hemorrágico, actualmente conocido como Dengue grave, es una forma severa y en algunos casos fatal de esta patología. En general, los primeros días no se presentan síntomas específicos, además de la fiebre presente aproximadamente por 2-7 días, pero en algunos casos después de este periodo pueden desarrollar manifestaciones hemorrágicas que pueden avanzar rápidamente a Dengue severo. A su vez, una de las complicaciones relacionadas con el Dengue grave es que su evolución conlleve al Síndrome del Shock de Dengue, ya que si este no es tratado correctamente en el menor tiempo posible puede llevar a la muerte (Valerio et al., 2008).

Por otro lado, como ya se había mencionado, la fiebre de Chikungunya es una enfermedad emergente causada por un alfavirus, transmitida por el mismo mosquito involucrado en la transmisión del Dengue. La cual, presenta un registro acumulado 2014-2015 de 73 muertes en Colombia de las cuales siete tienen relación con el Dengue (Instituto Nacional de Salud, 2015). Es una enfermedad con un índice de morbilidad elevado y es altamente incapacitante. Por otro lado, al igual que el Dengue, presenta formas atípicas o graves de la enfermedad que corresponden aproximadamente del 0,3% al 0,5% del total de los afectados, teniendo grupos de riesgo específicos como lo son: las personas de edad avanzada (>65 años), los niños menores de 1 año, recién nacidos de madres virémicas durante el parto y personas con comorbilidades (diabetes, hipertensión, insuficiencia renal crónica, enfermedades cardiovasculares, VIH-SIDA, tuberculosis o neoplasias) (Ministerio de Salud, 2015).

A partir de la confirmación de la circulación del virus Zika en Colombia, se han reportado hasta Diciembre de 2015, 736 casos positivos y 9.280 casos

sospechosos en el 90% del territorio colombiano. Estos virus tienen muchos factores sintomatológicos en común, tales como: fiebre, dolor de cabeza, malestar general y dolor muscular. Sin embargo, por un lado la fiebre del Chikungunya puede durar un poco más que la del Dengue y se presentan erupciones y picazón en manos y pies, y por otro lado, el Zika tiene una sintomatología clínica más leve que el Dengue y no se han observado casos de choque o hemorragia grave (Organización Panamericana de la Salud, 2015).

Debido a la ausencia de vacuna contra el Dengue, el Chikungunya y el Zika en el mercado, hay diferentes centros de investigación enfocados a este tipo de patologías. Por un lado, el desarrollo de una vacuna contra el Dengue es de gran complejidad debido a que se necesita una vacuna tetravalente, es decir, con cuatro inmunógenos para cubrir el desarrollo de cualquiera de los serotipos de este virus. Además, no se han encontrado modelos animales que reproduzcan de manera adecuada la enfermedad en humanos para evaluar las vacunas candidatas (Organización Mundial de la Salud, 2009). Por otro lado, en el “Institute Pasteur” de Francia, se desarrolló una vacuna contra el Chikungunya tomando como base la vacuna contra el sarampión; hay grandes expectativas con esta investigación ya que tuvo resultados exitosos en fase clínica 1 (estudios de seguridad y tolerabilidad). Posteriormente, se planteó un estudio clínico fase 2 para confirmar los resultados obtenidos, el cual puede ser decisivo para su comercialización (Ramsaver et al., 2015). Debido a que estas alternativas aún están en desarrollo, se estipularía como medio efectivo predeterminado para la prevención de estas patologías la protección frente a las picaduras de los mosquitos; en general, los métodos de prevención y control están enfocados en disminuir el número de fuentes de proliferación del mosquito y el control de estos sitios de alto riesgo con la utilización de larvicidas.

### **2.2.3 Mosquito *Aedes aegypti***

Los mosquitos son capaces de transmitir muchas enfermedades infecciosas y presentan su mayor proliferación en climas cálidos, siendo muy sensibles a los cambios de temperatura. El clima cálido, además de causar un aumento en la tasa de natalidad de los mosquitos favorece factores como: aumento del tiempo durante el cual se pueden reproducir, acelerar la madurez de los microbios que portan y el aumento en la frecuencia de las picaduras de estos insectos. Todos estos factores aumentan la posibilidad de transmisión de las enfermedades que porten los vectores (Climate Institute, 2010).

Como proceso evolutivo del hombre, en las primeras urbanizaciones, debido a la construcción de viviendas situadas en antiguos medios rurales se evidenció el paso del mosquito *Aedes aegypti* de su hábitat natural (la selva) a la ciudad, haciendo ahora parte de las casas, ubicándose en sus lugares más oscuros. Por

esto, ya el riesgo no se ve limitado al hábitat natural de los mosquitos, sino que va en aumento para las personas que pasan mucho tiempo en sus hogares o lugares cerrados, además de esto se debe tener mayor precaución en el día ya que este mosquito presenta su mayor frecuencia de picadas en este momento (Hoyos Rivera & Pérez Rodríguez, 2010).

Por otro lado, es importante conocer que el mosquito hembra es el que pica al ser humano, se debe agregar que esta puede picar más de una vez, por lo tanto, uno solo de estos mosquitos puede causar una gran cantidad de infecciones. Los mosquitos infectados, pueden transmitir la enfermedad por aproximadamente 65 días que corresponde a su tiempo promedio de vida (Hoyos Rivera & Pérez Rodríguez, 2010).

Este vector tiene un ciclo de vida compuesto de cuatro etapas en las que se encuentran: huevo, cuatro estadios larvarios, pupa y adulto. La mayor parte del ciclo de vida es acuático; el mosquito tiene contacto con el medio ambiente terrestre al momento de pasar a su etapa de adulto. Los mosquitos en todas sus etapas post-embrionarias, como cualquier insecto, tienen sus cuerpos cubiertos con tegumento, el cual está compuesto por una matriz epidérmica interna y una externa llamada cutícula (Farnesi et al., 2012).

La cutícula es la capa exterior del tegumento y está compuesta por quitina, entre otras sustancias, y realiza varias funciones: actúa como esqueleto externo que permite la articulación de las diferentes partes del cuerpo, funciona como capa protectora ante el efecto abrasivo del suelo y perforaciones por parásitos, sirve como barrera para prevenir el ingreso de micro-organismos y disminuye la pérdida de agua generada por acción del clima. La importancia de lo mencionado anteriormente, sale a relucir cuando se evidencia que el crecimiento y desarrollo del mosquito para pasar a su etapa de adulto, requiere muda periódica que depende de factores como la biosíntesis y degradación de quitina (Toro et al., 2009).

#### **2.2.4 Control del mosquito**

Actualmente, el control de los sumideros en las ciudades, específicamente en Colombia, se realiza por medio de aspersiones de larvicidas cada quince días. Hay diferentes factores que pueden influir en la concentración del larvicida en el agua, como la presencia de lluvia que provoque la pérdida de producto en el momento en que se rebosan los sumideros, por esto llevar un control adecuado tiene cierto grado de complejidad y requiere tiempo de estudio.

Además del control de los sumideros, se han creado estrategias de alerta a través de los medios de comunicación sobre la problemática de salud pública que representa el mosquito *Aedes aegypti*, con el fin de concientizar a las personas

acerca de las precauciones que se deben tener en el hogar para así, disminuir la cantidad de sitios y condiciones que favorecen la proliferación del mosquito, tales como: reservorios de agua, almacenamiento de agua en recipientes al aire libre, mantener con agua sin renovación continua las pilas de los lavaderos, entre otros.

Debido a la gran problemática que desencadenan estas patologías, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) con el apoyo de la División de enfermedades transmitidas por vectores del centro para el control y la prevención de enfermedades de los Estados Unidos, formó un grupo de trabajo y se discutió la amenaza que representan estos vectores y que medidas serían las pertinentes para mitigar este riesgo. De aquí surgieron las guías de preparación destinadas a mejorar conocimiento sobre la amenaza y dar herramientas para: prevenir, controlar, orientar, desarrollar investigaciones epidemiológicas y detectar posibles brotes de estas enfermedades de alto impacto. Plantean como el único método de control disponible la protección de los individuos contra las picaduras de los moquitos (Organización Panamericana de la Salud, 2011).

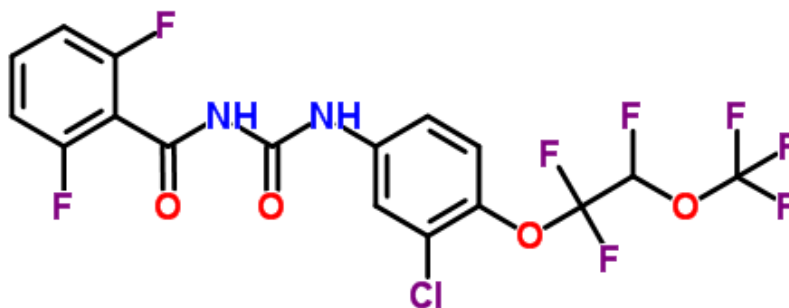
La proliferación de los mosquitos es un suceso que se debe regular, sin embargo, es un aspecto que ha venido adquiriendo complejidad con el paso del tiempo debido al control poco efectivo causado por la resistencia presentada por los mosquitos a algunos tipos de larvicidas tales como: carbamatos, organoclorados, organofosforados y piretroides. Actualmente en algunos países se están cambiando los larvicidas usados convencionalmente por reguladores del crecimiento de los insectos (IGR); estos productos han ganado gran reconocimiento debido a que no presentan toxicidad directa y presentan una acción selectiva sobre el desarrollo en alguna de las etapas del ciclo de vida. Entre estos, se encuentran los larvicidas inhibidores de la síntesis de quitina como el Novaluron (Giglio Fontoura, Fernandez Bellinato, Valle, & Pereira Lima, 2012).

### **2.2.5 Novaluron**

El Novaluron es un larvicida catalogado dentro de la familia Benzoil Fenil Ureas (BPU), este grupo se caracteriza por regular el crecimiento de los insectos e inhibir la biosíntesis de quitina. La mayoría de los insecticidas que inhiben la síntesis de quitina (CSIs) tales como hexaflumorón, lufenurón, diflubenzurón, entre otros, se encuentran en esta familia y actúan por ingestión o contacto (Muthukrishnan, Merzendorfer, Arakane, & Kramer, 2012).

El Novalurón está compuesto por dos anillos de benceno y una mezcla racémica de dos enantiómeros (Imagen 1), presenta una baja solubilidad en agua ( $3\mu\text{g/L}$ ), no es inflamable y su coeficiente de partición es de 4,3, siendo esto indicativo de alta solubilidad en grasas. Las técnicas más usadas para su identificación son:

Ultravioleta, infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (Food and Agriculture Organization , 2003).



**Figura 2.** Estructura química del Novaluron<sup>1</sup>

Vale la pena mencionar que el Novaluron inhibe la emergencia de los adultos, causa mortalidad inducida y retrasa el desarrollo de las larvas; por otro lado, al afectar la biosíntesis y deposición de quitina, ocasiona una cutícula discontinua y alterada; por último, en estudios de exposición de los mosquitos a Novaluron, se presenta una diferencia relevante en la emergencia de machos y hembras, siendo la emergencia de hembras mucho menor, por lo tanto, este resultado representa un parámetro de gran relevancia a nivel epidemiológico ya que las hembras son las encargadas de la transmisión del virus (Farnesi et al., 2012).

Giglio Fontoura y colaboradores (2012), evaluaron la mortalidad del mosquito *Aedes aegypti* en cada etapa del ciclo de vida al exponerlo al uso de este larvicida. Los resultados demostraron que el nivel de alteración en cada etapa depende de la dosis de Novaluron, a pesar de esta dependencia se encontró evidencia de mortalidad en todas las etapas del ciclo, siendo la mortalidad cada vez más prematura en la medida en que se aumenta la dosis de Novaluron. En contraste a esto, se halló que la emergencia de adultos sólo se dio cuando se realizaba una exposición a concentraciones muy bajas del larvicida (Giglio Fontoura, Fernandez Bellinato, Valle, & Pereira Lima, 2012).

Por otro lado, actualmente se ha generado un fuerte énfasis ambientalista, que pretende restringir el uso de las sustancias que puedan tener efectos contaminantes, esta es otra característica a favor del Novaluron, ya que es uno de los pocos compuestos que son catalogados como seguros por la OMS para su uso

<sup>1</sup> Fuente: Chemspider, Obtenido de: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.84442.html?rid=73c43939-61ee-45cd-ad11-ca1953410bfe>

en agua potable, en una dosis no mayor a 0,05mg/L (World Health Organization, 2011).

### **2.2.6 Hidrogeles como sistemas de liberación controlada**

En las últimas décadas los polímeros han recibido mucha atención debido a la tendencia global enfocada a la obtención de sistemas inteligentes. Entre los polímeros, los hidrogeles han mostrado propiedades óptimas para ser cargados con medicamentos, debido a su biocompatibilidad y sus características de hinchamiento en medio acuoso. Además de su hinchamiento, a estos hidrogeles se les asigna la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas algunos principios activos (Arredondo Peñaranda & Londoño Lopez, 2009).

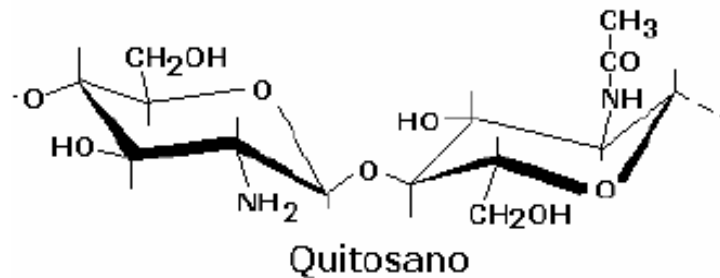
La necesidad de nuevas estrategias para ofrecer una metodología más eficiente para el control de los mosquitos, surge principalmente por la resistencia que se ha venido presentado a lo largo de los años a los diferentes tipos de larvicidas usados para *Aedes aegypti*. Estas nuevas estrategias, van enfocadas al mejoramiento de la seguridad, eficacia y protección, tanto del medio ambiente como de los seres vivos que puedan tener contacto con la sustancia.

A partir de esto, la innovación en los sistemas de dosificación controlada de principios activos, ha hecho especial énfasis en la investigación para la inclusión de polímeros de origen natural (biopolímeros), debido a su característica de biodegradabilidad, entre estos se encuentran: la lignina, el alginato y el quitosano. Esta investigación ha venido revolucionando las aplicaciones de estos sistemas de liberación controlada, siendo usado actualmente tanto para el control de plagas en agricultura, como para aplicaciones biotecnológicas y médicas (Harris, 2010).

En este caso específico, es de gran importancia el uso de hidrogeles con el fin de disminuir la cantidad de larvicida utilizado para el control de los vectores. Esta técnica incluye el compuesto de interés dentro de una estructura polimérica, la cual evita la dispersión descontrolada y mantiene la concentración del mismo en los niveles de efectividad, de esta manera, disminuyen pérdidas de material en la aplicación y se requiere menor cantidad de larvicida.

Por otro lado, el quitosano se ha catalogado como uno de los polímeros más utilizados debido a su bajo impacto ambiental, es obtenido normalmente de materiales de desecho, como micelio de hongos de procesos industriales y cascaras de camarón. La utilización de estos polímeros naturales se ha visto incrementada debido a la problemática generada por el uso masivo de materiales plásticos que en los últimos años está generando acumulación en el planeta, formación de especies tóxicas y accidentes animales como la asfixia con restos de plástico (Velásquez, 2006).

El quitosano es obtenido comercialmente por medio de la hidrólisis del grupo aminoacetil de la quitina, como se puede observar en la Imagen 2, es un homopolímero de cadena lineal compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. Este polímero tiene un grupo amino primario y dos grupos hidroxilos libres por cada unidad de glucosa. Además de esto, los grupos amino catiónicos reaccionan con aniones multivalentes formando hidrogeles y es un compuesto soluble en soluciones ácidas. En cuanto a su degradación, en ambientes fisiológicos varias enzimas como la quitosanasa y la lisozima lo degradan formando productos inocuos (Kumar et al., 2012).



**Figura 3.** Estructura química del quitosano<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Fuente: (Velásquez, 2006)



## **2.3 OBJETIVOS**

### **2.3.1 Objetivo General**

Determinar la influencia de la concentración del larvicida incorporado en el hidrogel sobre la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito *Aedes aegypti* en condiciones de semi-campo.

### **2.3.2 Objetivos Específicos**

1. Sintetizar hidrogeles a partir del polímero quitosano con tres concentraciones diferentes del larvicida Novaluron
2. Identificar la concentración de larvicida de mayor eficiencia en condiciones de laboratorio
3. Determinar la eficacia del sistema larvicida-hidrogel sobre la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito, en condiciones de semi-campo

## 2.4 METODOLOGÍA

### 2.4.1 Reactivos

Para la síntesis de los hidrogeles se utilizaron los reactivos presentados en la Tabla 1, los cuales fueron proporcionados por el almacén de reactivos de la Universidad Icesi.

**Tabla 1.** Nombre y casa comercial de los reactivos empleados

<b>Reactivos</b>	<b>Casa Comercial</b>
Quitosano	Sigma-Aldrich
Ácido acético glacial	Sucromiles S.A.
Glutaraldehído 25%	J.T. Baker
Estandar de Novaluron	Chem Service Inc

### 2.4.2 Materiales y equipos

Vidrios silanizados, Vortex, Baño termostático, balanza analítica, Horno Binder, Micropipetas, magneto, Cabina de extracción, plancha de calentamiento.

### 2.4.3 Síntesis de sistemas de liberación (Hidrogel/Larvicida)

Para realizar la síntesis de los hidrogeles, inicialmente se elaboró una solución de quitosano al 3% (SQ 3%) usando como solvente la solución de ácido acético al 2% (SAA 2%) preparada anteriormente. Seguido a esto, se midieron 10mL de la solución de quitosano en una probeta de esta capacidad, y se llevó a un recipiente plástico.

Posteriormente, para lograr la incorporación adecuada del larvicida en la solución de quitosano, se hizo un mix en un tubo eppendorf el cual fue homogenizado utilizando un agitador tipo vortex; este mix, contenía diferentes proporciones de etanol y Novaluron (NOV) dependiendo de la concentración requerida. Para los bioensayos en condiciones de semi-campo se utilizó una misma concentración en los hidrogeles sintetizados la cual fue 1X para 10 litros de agua, X corresponde a

la dosis letal 99 (DL 99) correspondiente a 0,55ppm, debido a la poca cantidad de producto disponible. Para los bioensayos en el laboratorio se usaron tres concentraciones diferentes, correspondientes a: 1X, 2X y 3X en un volumen de 100ml.

Posteriormente, se adicionó el mix al recipiente plástico donde se encuentra la SQ 3%, este debe tener agitación constante proporcionada por un magneto de 1cm sobre una plancha sin calentamiento a una velocidad moderada con el fin de no generar burbujas. Debido a la presencia del estándar de NOV, se logró evidenciar una ligera coloración blanca en la solución, esta es útil al momento de determinar la homogeneidad del sistema. Después de obtener una coloración más homogénea en la solución, se procedió a agregar la solución de glutaraldehído al 2,5% como agente entrecruzante, usando una micropipeta y distribuyéndolo sobre toda la superficie de la solución, las cantidades de este reactivo fueron determinadas por el porcentaje de entrecruzamiento requerido, los cuales fueron 25% (E.25%) y 75% (E.75%).

A continuación, esta solución fue depositada en dos placas de vidrio a las cuales previamente se les realizó una reacción de silanización, por la cual se logra desactivar la superficie para evitar la adhesión de la solución de quitosano al vidrio en el momento de su gelificación; en medio de las dos placas de vidrio se encontraba el molde del hidrogel, el cual fue un aro plástico con un volumen aproximado de 9mL y estas placas fueron aprisionadas por caimanos. La gelificación del hidrogel se dio en 24 horas, posteriormente, se separaron las placas de vidrio y se retiró el molde con el hidrogel adherido a él para transferirlo a una superficie de teflón, después, se cortó el hidrogel con un sacabocados # 10 y se dejó de 48 a 72 horas secando a temperatura ambiente seguido de un secado a 50°C por 12 horas en el horno, con el objetivo de eliminar todo el agua presente el hidrogel y lograr una consistencia sólida.

Finalmente, los hidrogeles secos fueron almacenados en recipientes plásticos debidamente marcados con su fecha de síntesis, la concentración del larvicida y el porcentaje de entrecruzamiento, hasta el momento de su uso. Se debe agregar que para la síntesis de los hidrogeles usados como control, se realizó este mismo procedimiento sin agregar el larvicida al mix, y que los hidrogeles destinados al bioensayo de semi-campo no fueron cortados con el sacabocados sino que fueron utilizados completos.

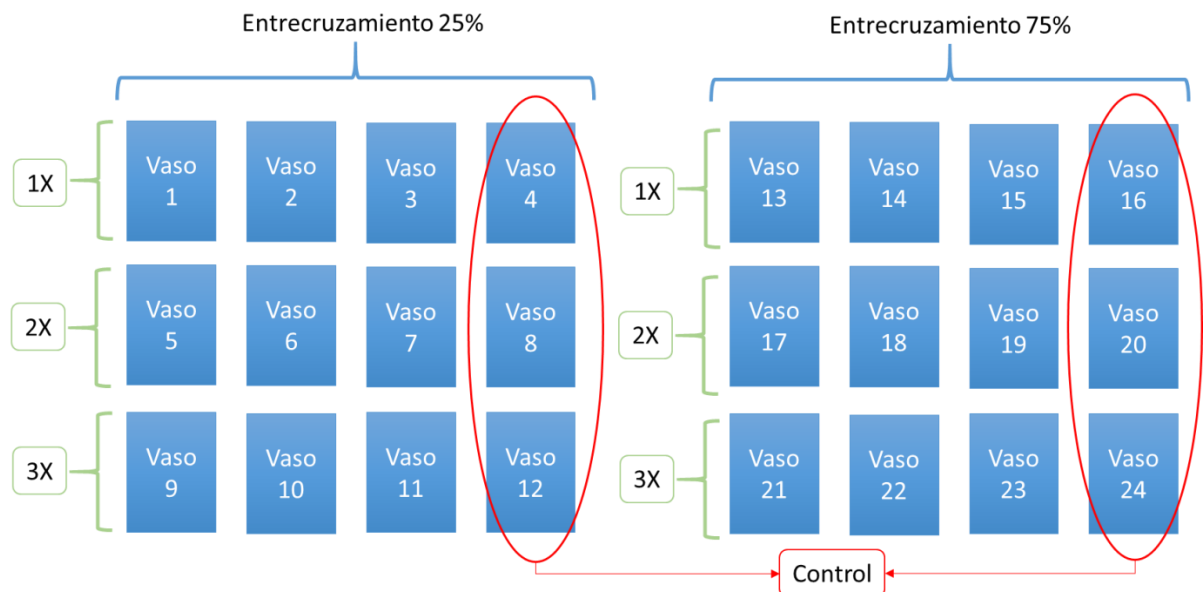
Los cálculos requeridos para esta sección se encuentran en el Anexo 1.

#### **2.4.4 Bioensayo larvario en condiciones de laboratorio**

Los diferentes bioensayos realizados para la evaluación de la liberación dependiendo de la concentración del larvicida, se llevaron a cabo en un laboratorio

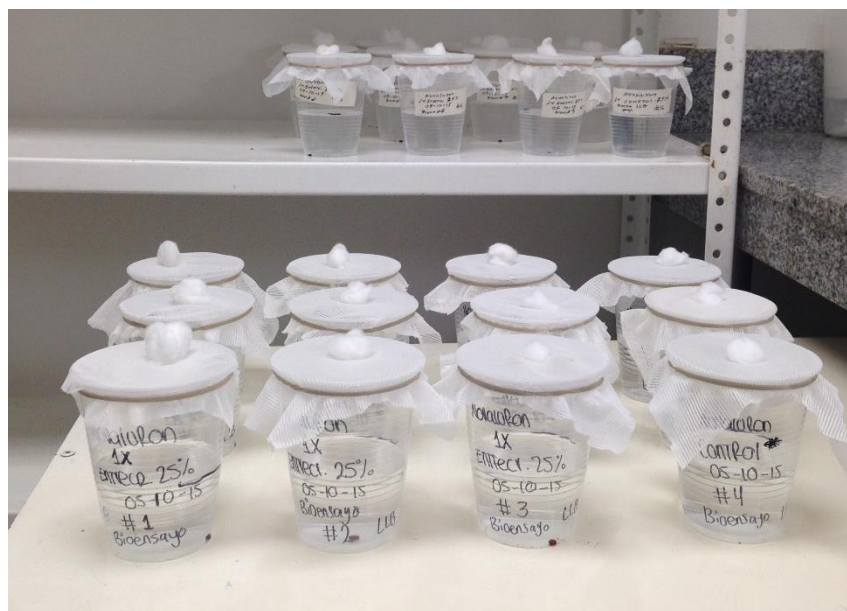
en las instalaciones del CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas) debido a que en este lugar además de tener acceso a las larvas necesarias para el bioensayo proporciona las condiciones ambientales controladas necesarias para su desarrollo.

Este ensayo se fundamenta en la evaluación de la mortalidad de las larvas del mosquito a través del tiempo para los diferentes tipos de hidrogeles dependiendo de su concentración y su entrecruzamiento. Para cada entrecruzamiento se realizaron 3 ensayos biológicos, uno para cada concentración los cuales contaban con 3 réplicas y un control como se muestra en la Figura 4; cada réplica contenía un hidrogel cargado con el larvicida. Todos los bioensayos se mantuvieron bajo las mismas condiciones de laboratorio con un periodo de luz de 12 horas seguido de un periodo de oscuridad de 12 horas y una temperatura promedio entre 25-28°C (World Health Organization, 2005).



**Figura 4.** Diseño experimental del ensayo en condiciones de laboratorio

Estos bioensayos fueron realizados en vasos plásticos desechables de 8 onzas, en los cuales se adicionaron 100mL de agua de clorada; en cada uno de estos, se agregaron además del hidrogel, 10 larvas en estadios larvarios L1 y L2, finalmente fueron cubiertos con una malla sostenida con un caucho, con el fin de evitar que los adultos que emergieran salieran del recipiente y cada dos días se les proporcionaba alimento (hígado en solución). Para evaluar la liberación del NOV se realizaron bioensayos de 15 días en los cuales se hacía una revisión periódica día de por medio para llevar el control de las larvas muertas y cerciorarse que el volumen del agua se mantuviera en 100mL, en el caso contrario, se completaba el volumen con agua de clorada. (Ver Figura 5)



**Figura 5.** Bioensayos en condiciones de laboratorio

Por otro lado, buscando simular las condiciones de recambio de agua que sufren los criaderos debido a las lluvias, después de transcurridos los 15 días se procedió a cambiar el agua en su totalidad, se usaron nuevos vasos plásticos con las mismas condiciones, 100mL de agua y 10 larvas en estadios L1 y L2, y los hidrogeles usados inicialmente se transfirieron a estos nuevos vasos para evaluar la liberación del hidrogel en los 15 días siguientes. Este procedimiento se llevó a cabo cada 15 días hasta la finalización del estudio (60 días) (WHO, 2005). Además de esto, si después de los 15 días estipulados para el bioensayo no habían muerto la totalidad de las larvas se dejaba el recipiente sin hidrogel aparte, para realizar el seguimiento del caso.

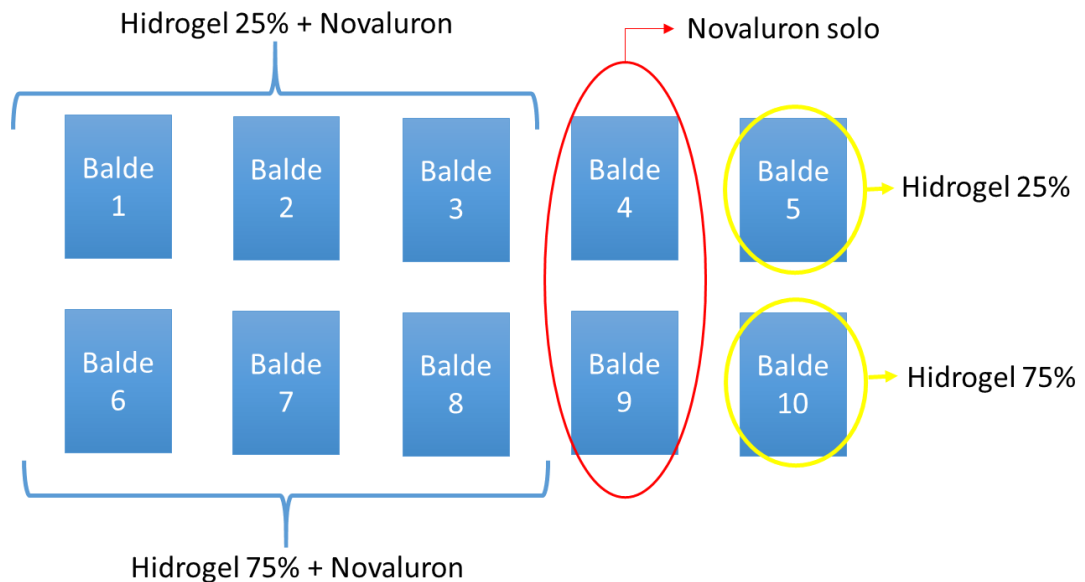
En cuanto a la colección de resultados, estos fueron reportados en el formato "Formato de evaluación para medir la eficacia de la liberación de hidrogeles en larvas (Laboratorio)" proporcionado por el CIDEIM el cual se encuentra en el Anexo 2.

Finalmente, para el análisis de los resultados obtenidos en el ensayo de laboratorio, primero se realizaron curvas de mortalidad en las que se comparó la mortalidad de las larvas en los diferentes bioensayos, seguido a esto, se llevó a cabo un análisis de varianza por bioensayo determinando como variable dependiente el día y teniendo en cuenta el entrecruzamiento y la concentración como factores. Luego, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con el fin de determinar si los factores considerados en el estudio son causantes de una variación significativa en la media de los resultados obtenidos.

### 2.4.5 Bioensayo larvario en condiciones de semi-campo

Estos bioensayos fueron realizados en baldes de 12L ubicados bajo las mismas condiciones en las zonas verdes del CIDEIM en las cuales, se encontraban expuestos a lluvias y a las temperaturas variables de la ciudad de Cali, también es importante mencionar que se encontraban bajo árboles y diferentes tipos de plantas de los cuales caía constantemente material orgánico al interior de los baldes.

Los bioensayos realizados para la evaluación de la efectividad de la liberación controlada del larvicida están fundamentados en la determinación de la mortalidad de las larvas del mosquito a través del tiempo para los diferentes tipos de hidrogeles dependiendo de su entrecruzamiento (25% o 75%). Como se evidencia en la Figura 6, para cada entrecruzamiento se realizó un bioensayo: el bioensayo uno compuesto por los baldes del 1 al 5 y el bioensayo 2 del 6 al 10, cada bioensayo tenía 3 réplicas que contenían el hidrogel cargado con Novaluron, una réplica con sólo el larvicida (sin hidrogel) y un control que contenía el hidrogel sin larvicida.



**Figura 6.** Diseño experimental del ensayo en condiciones de semi-campo

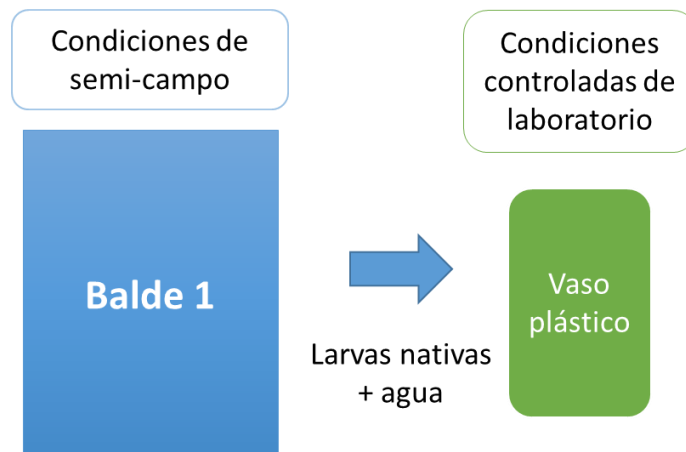
A los baldes utilizados se les abrieron dos agujeros al nivel de los 10L con el fin de que no se incremente el volumen de evaluación (10L) debido a las lluvias. A cada balde se adicionaron 10L de agua de pozo (sin tratar), en los baldes 1, 2, 3, 6, 7 y 8 se agregaron los hidrogeles cargados con Novaluron, en los baldes 4 y 9 se

agregó el larvicida en solución y finalmente los baldes 5 y 10 fueron los controles donde no hubo incorporación de larvicida, en estos solo se usó el hidrogel (Ver Figura 6). Los baldes se dejaron expuestos a las condiciones ambientales y se realizó una revisión periódica día de por medio, con el fin de evidenciar la presencia de larvas nativas para su recolección y posterior traslado al laboratorio para la evaluación de su mortalidad (Ver Figura 7).

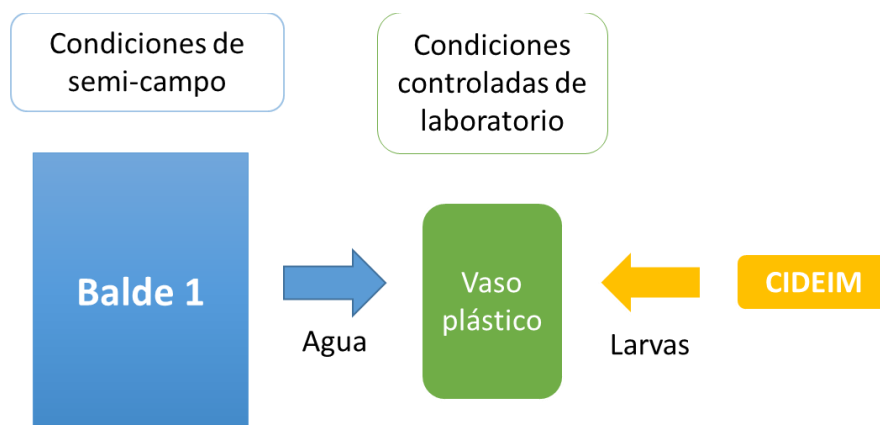


**Figura 7.** Adecuación de los baldes y su exposición a condiciones ambientales

Previendo la posibilidad de que no hubiera larvas nativas en las primeras semanas de evaluación, se propusieron ensayos biológicos con una duración de 15 días. En los cuales se tomaron 100mL de agua de cada balde en vasos plásticos para adicionarles 10 larvas en condiciones de laboratorio obtenidas del CIDEIM en estadios L1 y L2, con el fin de comprobar que la concentración de larvicida alcanzada en los baldes era suficiente para matar las larvas adicionadas (Ver figura 9). Después de 20 días de haber instalado los baldes en sus puntos de evaluación, se constató que había larvas nativas en los baldes por lo que se recurrió a su colección en vasos plásticos, los cuales fueron llevados al laboratorio y se cubrieron con una malla sostenida por un caucho y se repetían estas colecciones día de por medio con el fin de controlar la emergencia de adultos (Ver figura 8).



**Figura 8.** Diagrama de colección de larvas nativas de los baldes de estudio



**Figura 9.** Diagrama de adición de larvas de CIDEIM en ausencia de larvas nativas

De la misma manera que el bioensayo de laboratorio, día de por medio se les proporcionaba el alimento y se hacía el seguimiento de mortalidad de larvas. En cuanto a la colección de resultados, estos fueron reportados en el formato “Formato de evaluación para medir la eficacia de la liberación de hidrogeles en larvas (Semi-campo)” junto con sus observaciones en el Anexo 3.

Para el análisis de los datos obtenidos, se realizaron curvas de mortalidad en el tiempo para cada balde, a partir de esto se determinó el porcentaje de mortalidad de larvas para cada recolección de campo realizada.



## 2.4.1 Matriz de marco lógico

**Tabla 2.** Actividades, supuestos e indicadores según los objetivos específicos.

<b>Objetivo General</b>			
Determinar la influencia de la concentración del larvicida incorporado en el hidrogel sobre la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i> en condiciones de campo.			
	<b>Actividades</b>	<b>Supuestos</b>	<b>Indicador</b>
<b>Objetivo específico 1:</b> Sintetizar hidrogeles a partir del polímero quitosano con tres concentraciones diferentes del larvicida Novaluron	Sintetizar los hidrogeles con un porcentaje de entrecruzamiento determinado.  Incluir los larvicidas durante la síntesis en tres concentraciones distintas.	Se contará con los reactivos y los larvicidas.  Se contará con los materiales de laboratorio necesarios para el proceso de síntesis.	Obtener los hidrogeles con el larvicida incorporado
<b>Objetivo específico 2:</b> Determinar la eficacia del sistema larvicida-hidrogel sobre la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito, en condiciones de semi-campo	Colocar las larvas y el hidrogel en el recipiente y/o sumidero.  Realizar la colección de muestras semanales de las larvas en los sumideros y determinar el número de estas que emergen en el laboratorio.	Contar con los recipientes y/o sumideros para los ensayos.	Obtener una curva de relación entre la tasa de mortalidad de larvas y el tiempo.
<b>Objetivo específico 3:</b> Identificar la concentración de	Realizar la evaluación de las diferencias presentadas en	-Hay diferencias entre los resultados obtenidos con los	Diferencias en la mortalidad y el tiempo entre los diferentes

larvicida de mayor eficiencia en condiciones de laboratorio	cuanto a la tasa de mortalidad de las larvas para cada uno de los sistemas de hidrogeles sintetizados.	diferentes sistemas	hidrogeles.
---	--	---------------------	-------------

## 2.5 RESULTADOS

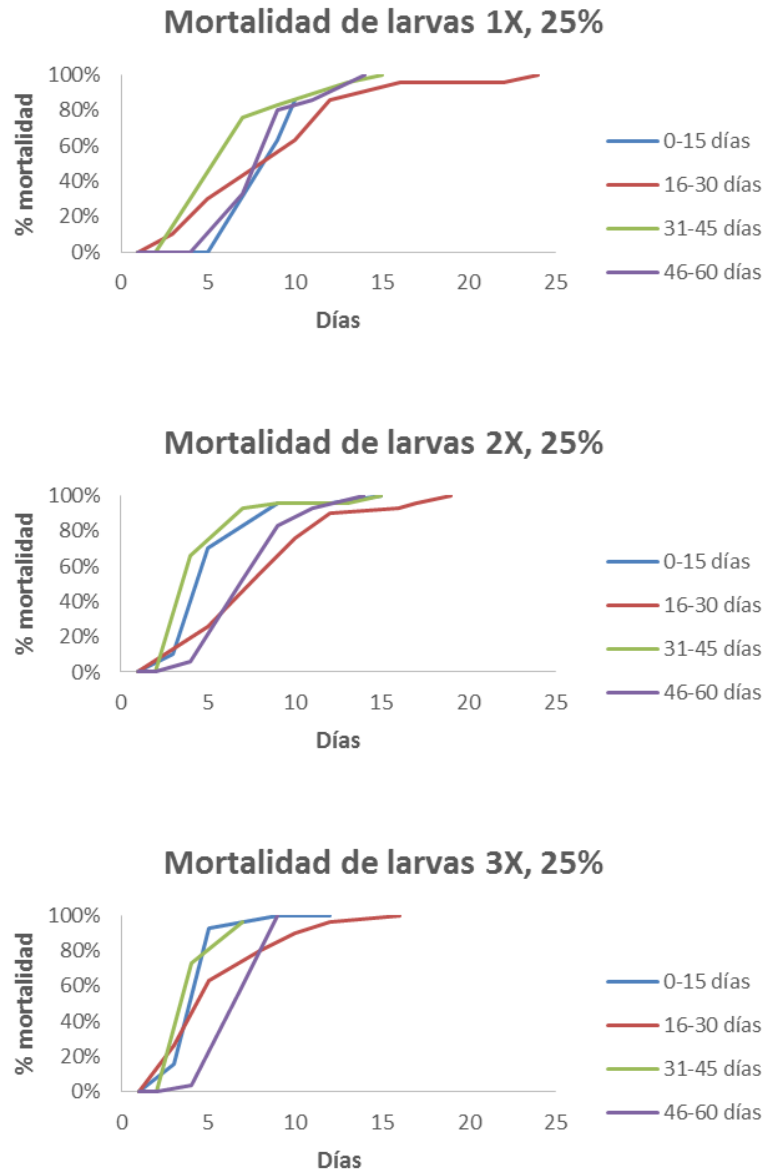
### 2.5.1 Síntesis de los hidrogeles

La síntesis de los hidrogeles de quitosano fue realizada como se especifica en la metodología, sin embargo, esta se llevó a cabo con un lote de quitosano diferente al utilizado en los proyectos anteriores, el cual, contrario a la congruencia esperada entre lotes presentó una viscosidad más alta, causando que al momento de realizar la reacción de entrecruzamiento, la solución de quitosano se gelificara en el recipiente plástico antes de ser transferida al molde, por esto, se tuvo que hacer una modificación en la concentración del agente entrecruzante de una solución de glutaraldehído al 8,3% a una al 2,5%.

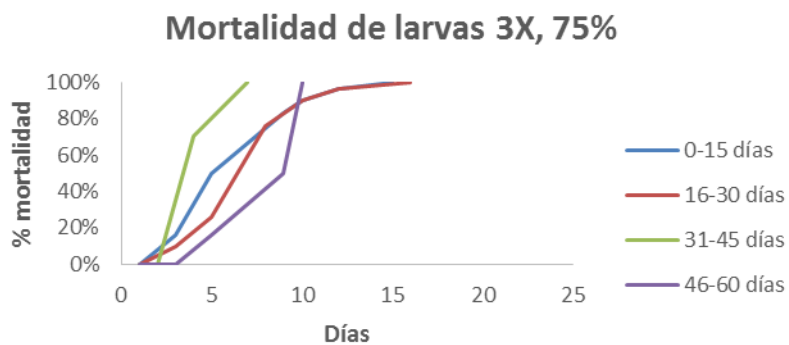
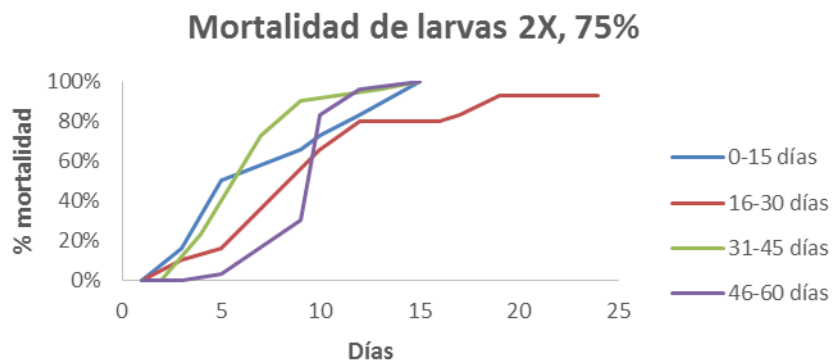
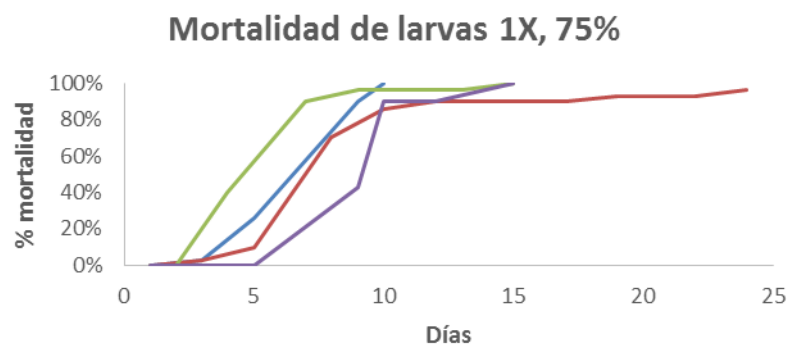
Otro factor importante al momento de la síntesis fue la solubilización del estándar de Novaluron, debido a que a diferencia del proyecto anterior en el cual se utilizó un producto comercial correspondiente a una emulsión de este larvicida (Falla, 2015), en este estudio se utilizó un reactivo estándar (Estándar de Novaluron de la casa comercial Chem Service Inc). El producto estándar se encuentra en forma de cristales y en concentraciones altas no logra una solubilización inmediata en el medio, en este caso, el alcohol etílico al 96% que se utilizó. A partir de estos hallazgos, se procedió a determinar la mejor manera de solubilizar este compuesto y se encontró que para lograr homogeneidad en la solución se debían hacer ciclos de calentamiento en baño maría con temperatura de 30°C por 5 minutos seguido de agitación en vortex por 5 minutos hasta evidenciar que no quedan restos de los cristales en el fondo del recipiente utilizado. Además de esto, para evitar la fotólisis en la molécula, se usan recipientes ámbar o en su defecto después de lograr su homogeneización se procede a cubrir el recipiente con aluminio.

## 2.5.2 Bioensayos en laboratorio

Primero, para los ensayos en condiciones de laboratorio, se procedió a la realización de gráficas de porcentaje de mortalidad acumulada en donde se expusieron los resultados de los diferentes bioensayos para poder comparar el comportamiento que tuvo cada hidrogel en el tiempo, como se muestra en la gráfica 1 (25% de entrecruzamiento) y grafica 2 (75% de entrecruzamiento).



**Gráfica 1.** Mortalidad acumulada de larvas para 1X, 2X y 3X con 25% de entrecruzamiento para los diferentes bioensayos



**Gráfica 2.** Mortalidad acumulada de larvas para 1X, 2X y 3X con 75% de entrecruzamiento para los diferentes bioensayos

Debido, a que el NOV mató el 100% de las larvas de *Aedes aegypti* expuestas con todos los hidrogel, se procedió a analizar si existían diferencias en el tiempo que toma el producto en matar la totalidad de las larvas.

Primero se realizaron análisis de ANOVA para determinar los factores (entrecruzamiento, y concentración) que influyen en la variación del tiempo por cada bioensayo (Anexo 4). Con base en estos resultados, se observó que las diferencias significativas en el tiempo estaban asociadas al factor “concentración” en el último bioensayo (Anexo 4, tabla 16).

A partir de estos resultados, se realizó un análisis de ANOVA para analizar si existían diferencias en el tiempo requerido para matar el 100% de las larvas con respecto a los bioensayos, la concentración y/o interacción entre ambos, tomando como hipótesis:

$H_0$ : No existen diferencias en el tiempo que requiere matar el 100% de las larvas

$H_A$ : Existen diferencias en el tiempo que requiere matar el 100% de las larvas

Los resultados de este ANOVA se observan en la Tabla 3. Se tomó el valor P como valor de referencia con un alfa de 0,05, donde si el valor P es mayor o igual al alfa ( $P \geq \alpha$ ) se afirma la hipótesis nula.

**Tabla 3.** Variación del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas, respecto a los bioensayos, la concentración y/o interacción entre ambos.

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Bioensayo</b>	3	32.9561	3.10	0.0337
<b>Concentración</b>	2	60.0072	5.64	0.0058
<b>Bioensayo*Concentración</b>	6	4.6804	0.44	0.8491

Seguido a esto, se realizó un *test t*, para identificar donde existen las diferencias. Para esto se compara la variación de la respuesta media del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas con respecto a los factores a evaluar (bioensayo, concentración, bioensayo\*concentración) y se agrupan por medio de letras (A,B,C), asignando los grupos que no presentan diferencias estadísticamente significativas con la misma letra. En las tablas 4, 5 y 6 se presentan los análisis estadísticos de ANOVA por bioensayo, concentración e interacción entre ambos respectivamente.

**Tabla 4.** Test t (LSD) de comparación de la respuesta media del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas entre los bioensayos. Los bioensayos 1, 2 y 4 están en el grupo A. Y los bioensayos 1, 3 y 4 están en el grupo B.

Agrupamiento t	Media	Bioensayo
A	12.563	2
B A	10.833	1
B A	10.833	4
B	9.111	3

**Tabla 5.** Test t (LSD) de comparación de la respuesta media del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas entre las concentraciones. La concentración 1X y 2X están en el grupo A y la 3X en el grupo B

Agrupamiento t	Media	Concentración
A	11.8750	1
A	11.5455	2
B	9.0000	3

**Tabla 6.** Test de comparación de la respuesta media del tiempo promedio para matar el 100% de las larvas entre la interacción de factores

Agrupamiento t	Media	Bioensayo	Concentración
A	14.6666	2	1
B A	12.5000	2	2
B A	12.5000	1	2
B A	12.0000	4	1
B A	11.5000	4	2
B C	10.5000	2	3
B C	10.5000	1	1
B C	10.3333	3	1
B C	10.0000	3	2
B C	9.5000	1	3

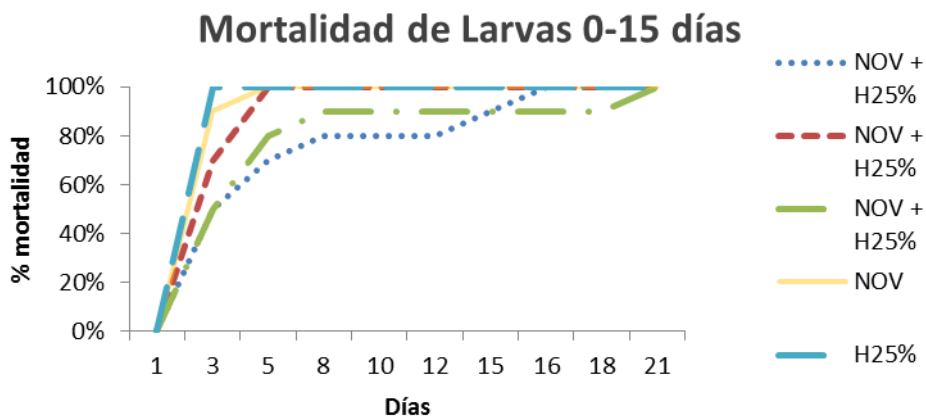
B	C	9.0000	4	3
	C	7.00000	3	3

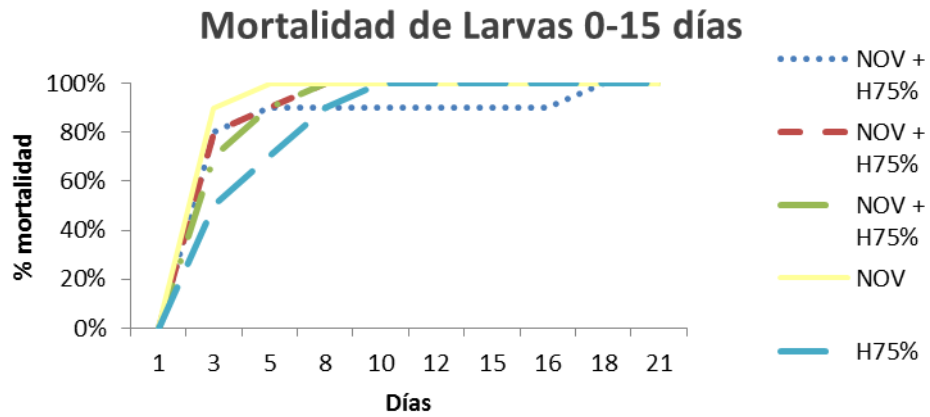
De acuerdo a la prueba *t-student* se encontró con respecto a los bioensayos que el bioensayo 3 fue el que presento mayores diferencias, debido a que el tiempo promedio obtenido fue el menor en comparación con los otros bioensayos, y por medio del *test t* se logra identificar que esta diferencia es significativa estadísticamente ya que es el bioensayo que no se agrupa con la letra A. Por otro lado, en cuanto a *t-student* con respecto a la concentración, se determinó que la concentración que requiere menor tiempo para matar el 100% de las larvas es 3X y se evidencia su importancia estadística ya que es el único valor agrupado con la letra B.

Finalmente en la Tabla 6 se puede evidenciar que en la interacción de factores, la combinación que requirió menor tiempo para la mortalidad de las larvas expuestas fue la concentración 3X con el bioensayo 3 dando un valor de tiempo promedio de 7 días.

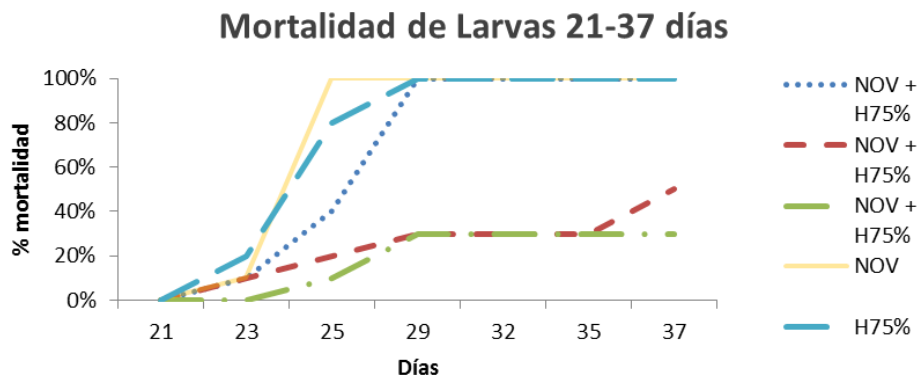
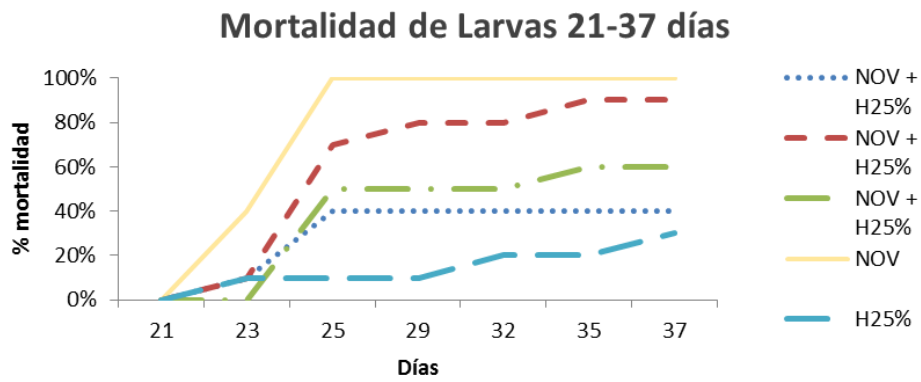
### 2.5.3 Bioensayos en condiciones de semi-campo

Para el ensayo en condiciones de semi-campo con las larvas del laboratorio se realizaron las gráficas 3 y 4, con el fin de evidenciar el comportamiento de la mortalidad de las larvas de acuerdo a la liberación del larvicida en los baldes.





**Gráfica 3.** Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas para 25% y 75% de entrecruzamiento en condiciones de semi-campo con larvas de laboratorio, periodo 1



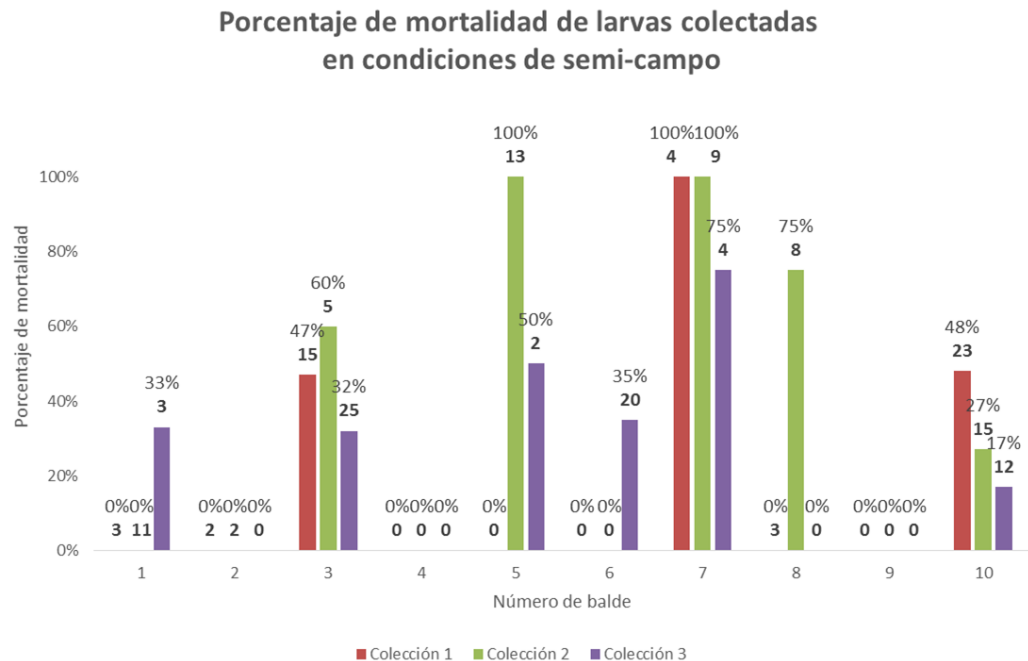
**Gráfica 4.** Porcentaje de mortalidad acumulada de larvas para 25% y 75% de entrecruzamiento en condiciones de semi-campo con larvas de laboratorio, periodo 2



En la gráfica 3 y 4 se logra evidenciar cómo en el primer periodo de recolección se logró la muerte del 100% de las larvas expuestas en todos los baldes incluyendo los baldes control, sin embargo, en la gráfica 4 la cual corresponde al periodo 2 de colección, se observa que en casi ninguno de los baldes se llega al 100% de las muertes, exceptuando los dos que contenían el Novaluron solo (4 y 9), uno de los baldes control (balde 10, hidrogel 75%) y el balde 6 que contiene el larvicida con el hidrogel de 75% de entrecruzamiento.

Finalmente, con las larvas recolectadas en condiciones de semi-campo y llevadas a condiciones controladas de laboratorio, se realizó el porcentaje de mortalidad por balde con el fin de hacer la comparación entre los mismos como se presenta en la Gráfica 5.

En esta gráfica, además del porcentaje de mortalidad por balde, se clasifican las barras dependiendo del número de colección, correspondiente al día en que se colectaron larvas en los baldes. El primero de estos 26-oct-15, el segundo 30-oct-15 y finalmente 04-nov-15. Debajo de los porcentajes presentados en la parte superior de las barras se encuentra un número en negrilla correspondiente a la cantidad de larvas recolectadas en cada balde para los días determinados.



**Gráfica 5.** Porcentaje de mortalidad de larvas en las 3 colecciones de semi-campo llevadas a condiciones controladas de laboratorio

Finalmente, es de gran importancia mencionar que a medida que se encontraba más material orgánico en los baldes, tal como mangos, hojas e insectos que caían en su interior, se evidenciaba menor presencia del mosquito *Aedes aegypti* debido a que estos se caracterizan por proliferar en mayor medida en depósitos de agua limpia. Por el contrario, en los baldes en que se encontraba más material vegetal y en general orgánico había una marcada presencia del mosquito del género *Culex*.

## 6. DISCUSIÓN

Como ya se mencionó en los resultados, hubo un cambio en el lote de quitosano utilizado en el proyecto anterior (Falla, 2015) obteniendo un producto de viscosidad mayor, esto puede ser debido al método de fabricación utilizado, sin embargo, se esperaría congruencia en el comportamiento a lo largo de los diferentes lotes. Se puede utilizar un viscosímetro para determinar la viscosidad y el porcentaje de variación con respecto al lote anterior para realizar un reporte a la empresa productora.

Este proyecto se realizó como continuación al proyecto de Stephanie Falla Flórez en el cual también se propone el uso de los hidrogeles como alternativa para la liberación controlada de larvicidas. A pesar de esto, esta es una estrategia innovadora de la cual no se encuentran reportes en la literatura, generalmente estos sistemas de liberación se han usado para cargar medicamentos con usos biomédicos, pero no larvicidas para el control de los vectores, además de esto, los estudios encontrados con hidrogeles cargados con plaguicidas no presentan la misma metodología de síntesis de este proyecto, no usan el mismo tipo de agentes entrecruzantes ni los mismos larvicidas, por lo tanto, no hay estudios que sirvan para realizar la comparación directa de los resultados obtenidos ni en condiciones de campo ni de laboratorio.

Conservando el orden presentado en los resultados se realizará primero el análisis de los datos obtenidos en condiciones de laboratorio. Para empezar, conforme a la información presentada en la gráfica 1, correspondiente a 25% de entrecruzamiento, tanto la concentración 1X, como 2X y 3X, mostraron una mortalidad del 100% en los 4 bioensayos que cubren un total de 60 días de experimentación. Se observó variación en el tiempo que requerían para morir el 100% de las larvas expuestas entre los bioensayos; siendo el bioensayo 2 el que tomó mayor tiempo de mortalidad, específicamente, 9 días más para 1X, 4 días para 2X y 6 días para 3X. Sin embargo, estadísticamente no se observan diferencias significativas con el bioensayo 2 siendo agrupado junto al bioensayo 1 y 4; es posible que el tiempo se haya extendido debido a una liberación no homogénea del larvicida, lo cual se podría corroborar realizando las cinéticas de liberación correspondientes a medida que avance el tiempo de evaluación.

Por otro lado, la gráfica 2 permitió determinar que la efectividad de los hidrogeles con 75% de entrecruzamiento es menor. Esta composición requiere más tiempo para matar el 100% de las larvas, debido probablemente a que un menor porcentaje de entrecruzamiento permite mayor movilidad de las cadenas de quitosano y, por tanto, la liberación del larvicida en menor tiempo. A pesar de esta disminución de efectividad o aumento en el tiempo de mortalidad, con un valor P de 0,6 se afirma la hipótesis nula, evidenciando que el entrecruzamiento no es un factor determinante en la respuesta obtenida.

Al evaluar la concentración se evidenció que para entrecruzamiento 75% en las concentraciones 1X y 2X no se obtuvo el 100% de la mortalidad en estadio de larva, ya que uno de los individuos llegó a estadio de pupa y dos llegaron a adultos, los cuales se hallaron muertos sin haber culminado su desarrollo fisiológico. Esto se podría explicar por el alto porcentaje de entrecruzamiento del hidrogel lo cual provoca mayor dificultad para la liberación del larvicida. Por otro lado, en las concentraciones 1X, 2X y 3X para 25% no hubo paso de las larvas ni a pupas ni a adultos y vale la pena resaltar que la concentración 3X para cualquiera de los entrecruzamiento muestra diferencias significativas en el tiempo de mortalidad; pudiendo afirmar que el comportamiento de las gráficas obtenidas es acorde a lo esperado ya que a mayor concentración se espera mayor mortalidad en menor tiempo.

A partir de estos resultados obtenidos, teniendo en cuenta que el entrecruzamiento no fue un factor determinante en las respuestas obtenidas, se procedió a realizar un análisis ANOVA tomando como factores los bioensayos, la concentración, y la interacción entre estos (Ver Tabla 3). Observando con respecto a los bioensayos, con un valor P de 0,0337, y a la concentración, con un valor P de 0,0058, que existen diferencias en el tiempo que requiere matar el 100% de las larvas. Además de esto, se evidencia que no existen diferencias en el tiempo que requiere para la mortalidad la interacción entre los factores con un valor P de 0,8491 (Tabla 3).

En el caso de la concentración se logra evidenciar una diferencia significativa en los días requeridos para matar la totalidad de las larvas expuestas. Para la concentración 3X se requirieron en promedio 9 días a diferencia de los 11,5 y 11,87 días para la concentración 2X y 1X respectivamente. Estos resultados coinciden con lo esperado debido a que se está triplicando y duplicando la dosis letal 99 necesaria para la mortalidad de los mosquitos. A partir de la interacción entre los factores de interés presentados en la Tabla 6, se logra evidenciar que la concentración 3X requirió un tiempo menor para matar la totalidad de larvas de cada bioensayo (1, 4 y 3), por tanto, se determina la concentración 3X como la más efectiva del ensayo.

Con base en los datos ya expuestos, surge un interrogante acerca del comportamiento de la liberación de los hidrogeles con el cambio de

concentraciones, planteando dos posibilidades: la primera, que al aumentar la concentración el hidrogel libere mayor cantidad de larvicida y la segunda, que al aumentar la concentración, el hidrogel tenga la capacidad de ejercer su acción por más tiempo. Este interrogante no pudo ser resuelto a lo largo del estudio porque al momento de su finalización todavía se evidenciaba la muerte del 100% de las larvas, por lo que para esto, se deben proponer estudios de mayor duración de los cuales se determine la cinética de liberación para poder determinar de una manera más clara el comportamiento de los hidrogeles frente a la liberación del larvicida.

Por otro lado, los resultados correspondientes a los ensayos biológicos en semi-campo. En la gráfica 3 se evidencia la mortalidad del 100% de las larvas incluso en el caso de los baldes que contenían el hidrogel sin larvicida (controles: baldes 5 y 10); esto debido probablemente a que no se lavaron los baldes antes de ser utilizados y generalmente tienen en su superficie químicos con el fin de controlar la proliferación de plagas. Por lo tanto, se recomienda que en un próximo ensayo se tenga en cuenta este factor y se realice el lavado de los recipientes antes de ser utilizados.

En la gráfica 4 se presentan los resultados de la segunda colección de agua de los baldes, realizando el ensayo en las mismas condiciones controladas mencionadas anteriormente. En este caso la gráfica muestra cómo en la mayoría de los casos no se llega a la mortalidad del 100% de las larvas, evidenciando una disminución en la efectividad del ensayo. Vale la pena mencionar que en este último ensayo el balde 4 y el 9 que contenían el larvicida puro fueron los primeros en matar la totalidad de las larvas.

Este comportamiento de disminución de efectividad del bio-ensayo probablemente pudo haberse debido a la evaporación o eliminación por lluvias del químico presente en los baldes y la concentración proporcionada por los hidrogeles adicionados no era suficiente llevar un control adecuado de la proliferación del mosquito. Por tanto, al evaporarse o eliminarse el químico de los baldes se obtuvo como resultado la baja mortalidad y el avance de estadio de los mosquitos de larvas a adultos.

Por último, se encontraron larvas nativas en los baldes a los 15 días de iniciar el ensayo, por lo que se procedió a recolectarlas en 3 ocasiones, procurando recolectarlas todas las larvas presentes para evitar la proliferación del mosquito. Estas larvas se llevaron al laboratorio en condiciones controladas con el agua de los baldes. La gráfica 5 presenta el porcentaje de mortalidad para cada balde en cada una de las colecciones realizadas. No se encontraron larvas en los baldes 4 y 9 los cuales correspondían al larvicida puro, esto parece indicar que el Novaluron puede generar repelencia a los mosquitos, por lo que no ponen huevos específicamente en estos baldes. Por otro lado en los baldes 10 y 5 se presentó la mayor cantidad de larvas a través del tiempo, correspondiendo estos a los controles que no contenían larvicida. Debido a que no se estaba logrando la

mortalidad esperada del 100%, se decidió parar el ensayo para no causar la proliferación del mosquito.

A partir de estos resultados se puede llegar a diferentes conclusiones, siendo la primera de estas que el Novaluron en su estado puro no ejerce un efecto óptimo en condiciones de campo, ya que el sistema deseado de control de vectores debería atraer los mosquitos para que pongan los huevos en esos lugares, y además de eso, lograr la mortalidad máxima; sin embargo, en este caso se evidencia la repelencia del Novaluron hacia el vector cuando no es incorporado en un hidrogel.

La segunda, tiene que ver con la tasa tan baja de mortalidad obtenida en condiciones de campo, esto se puede deber al empleo de los hidrogeles completos, los cuales debido a su tamaño tienen mayor superficie expuesta, razón por la que pudo haberse perdido parte del larvicida debido a la evaporación en el momento del secado. Otra posibilidad es que no se haya logrado la incorporación del larvicida, o finalmente, que la concentración en los hidrogeles no fuese suficiente para la cantidad de agua de los baldes. Por esto, se recomienda hacer un proceso de escalonamiento para determinar la mejor metodología de síntesis para los hidrogeles usados en volúmenes de agua mayores a 100mL.

## 2.6 CONCLUSIONES

A partir del proceso de síntesis se lograron obtener hidrogeles con homogeneidad de concentración y entrecruzamiento.

Se determinó que la cantidad de Novaluron presente en los hidrogeles usados en condiciones de laboratorio fue suficiente para matar las larvas presentes y la concentración residual que quedaba en el agua después de los 15 días fue suficiente para matar las larvas sobrevivientes. Se halló la concentración 3X como la más efectiva en condiciones de laboratorio.

Se evidenció repelencia para los mosquitos por parte del larvicida Novaluron.

No se obtuvieron resultados satisfactorios en condiciones de semi-campo por lo que se debe replantear la metodología de síntesis para volúmenes mayores a 100mL.

Entre más material orgánico presente en el agua de los baldes había menos presencia de *Aedes aegypti* y más de otras especies como *Culex*.

## **2.7 RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar una cinética de liberación del larvicida para los hidrogeles con 75% de entrecruzamiento, bajo las mismas condiciones del bioensayo realizado para entender su comportamiento con respecto al tiempo, además de darle continuidad a los ensayos biológicos realizados en laboratorio con el fin de determinar el tiempo máximo de liberación.

Se hace necesario realizar un proceso de escalonamiento para sintetizar los hidrogeles para los ensayos en condiciones de semi-campo, para asegurar la incorporación del larvicida al hidrogel y asegurar su liberación efectiva.

Finalmente, es necesario realizar una comparación entre los otros proyectos de grado que involucran esta nueva estrategia de liberación para determinar cuál de estos métodos de síntesis utilizados logra prolongar más el tiempo de acción del larvicida.

### 3. LITERATURA CITADA

- Arredondo Peñaranda, A., & Londoño Lopez, M. (2009). Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*, 3(5), 83-94.
- Berrueta, T. U. (23 de Abril de 2015). Dengue, fiebre Chicungunya y otros arbovirus. *Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*. Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/virologia/dengue.html>
- Cáceres, L., Rovira, J., García, A., Torres, R., & De La Cruz, M. (Septiembre de 2013). Determining the status of susceptibility to organophosphate, carbamate and pyrethroids insecticides in populations of *Aedes aegypti*. *Biomédica*, 33(1). Obtenido de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572013000500009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-41572013000500009&script=sci_arttext)
- Cerda L., J., Valdivia C., G., & Valenzuela B., T. M. (Diciembre de 2009). Cambio climático y enfermedades infecciosas. Un nuevo escenario epidemiológico. *Revista virtual REDESMA*, 3, 40-47. Obtenido de <http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rvr/v3n3/a06.pdf>
- Climate Institute. (2010). *Climate Institute*. Obtenido de <http://climate.org/topics/health.html>
- Cruz, R. R. (2002). Estrategias para el control del Dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Revista Cubana Med Trop*, 54, 189-201. Obtenido de [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol54\\_3\\_02/mtr04302.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol54_3_02/mtr04302.pdf)
- Farnesi, L. C., Brito, J. M., Linss, J. G., Pelajo Machado, M., Valle, D., & L., R. G. (24 de Enero de 2012). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de Physiological and Morphological Aspects of *Aedes aegypti* Developing Larvae: Effects of the Chitin Synthesis Inhibitor Novaluron: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265478/>
- Falla, S. (2015). Liberación controlada del larvicida novaluron, empleado en el control de vectores de enfermedades tropicales, a partir de hidrogeles de quitosano. Cali: Universidad Icesi.
- Food and Agriculture Organization of The United Nations. (2003). *Novaluron*. FAO specifications and evaluations for plant protection products. Food and Agriculture Organization.

- Fontoura Giglio, N., Fernandez Bellinato, D., Valle, D., & Pereira Lima, J. B. (Mayo de 2012). The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(3), 387-395. Obtenido de [http://www.scielo.br/sci-hub.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762012000300014&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/sci-hub.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000300014&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- Giraldo Calderón, G. I., Pérez, M., & Morales, C. A. (2008). Evaluación del triflumurón y la mezcla de *Bacillus thuringiensis* más *Bacillus sphaericus* para el control de las formas inmaduras de *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* en sumideros en Cali, Colombia. *Biomédica*, 28, 224-233. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v28n2/v28n2a07.pdf>
- Harris, R. E. (2010). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. *E-Prints Complutense*. Obtenido de Universidad Complutense Madrid: <http://eprints.ucm.es/11160/1/T32051.pdf>
- Hoyos Rivera, A., & Pérez Rodríguez, A. (Marzo de 2010). Actualización en aspectos epidemiológicos y clínicos del Dengue. *Revista Cubana de Salud Pública*, 36(1). Obtenido de [http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S0864-34662010000100015&script=sci\\_arttext](http://www.scielosp.org/scielo.php?pid=S0864-34662010000100015&script=sci_arttext)
- Instituto Nacional de Salud. (2014). *ABC: Fiebre de Chikungunya*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/informacion-epidemiologica/Paginas/abc\\_Chikungunya.aspx](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/informacion-epidemiologica/Paginas/abc_Chikungunya.aspx)
- Instituto Nacional de Salud. (8 de Enero de 2015). *El Instituto Nacional de Salud desmiente casos de muerte por chikunguña en Colombia*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: [http://www.ins.gov.co/comunicaciones/Comunicados%20de%20Prensa/EI%20INS%20desmiente%20casos%20de%20muerte%20por%20Chikungu%C3%B1a%20\(enero%208%20-%20202015\).pdf](http://www.ins.gov.co/comunicaciones/Comunicados%20de%20Prensa/EI%20INS%20desmiente%20casos%20de%20muerte%20por%20Chikungu%C3%B1a%20(enero%208%20-%20202015).pdf)
- Giri Kumar, T., Thakur, A., Alexander, A., Badwaik Ajazuddi, H., & Krishna Tripathi, D. (2012). Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. (Elsevier, Ed.) *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5), 439-449.
- Ministerio de Ambiente, V. y. (2007). *Resolución Número 1768*. Autoridad Nacional de Licencias Ambientales. Obtenido de [http://www.anla.gov.co/documentos/res\\_1768\\_280907.pdf](http://www.anla.gov.co/documentos/res_1768_280907.pdf)
- Ministerio de Salud. (Febrero de 2015). *Ministerio de Salud*. Obtenido de Enfermedades Infecciosas: Fiebre Chikungunya:



<http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000547cnt-guia-equipo-salud-fiebre-Chikungunya-2015.pdf>

Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y., & Kramer, K. (2012). Chitin Metabolism in Insects. Chapter 7. *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (págs. 193-235). North Carolina: Elsevier.

OMS. (Octubre de 2014). Chikungunya. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>

OMS. (2014). Dengue. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/topics/Dengue/es/>

Organización Mundial de la Salud (OMS); Programa Especial para Investigación & Capacitación en Enfermedades Tropicales. (2009). *BVSDE: Colombia*. Obtenido de DENGUE: GUIAS PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y Control: [http://www.bvsde.paho.org/cursoa\\_Dengue/e/pdf/Dengue\\_oms\\_2009.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cursoa_Dengue/e/pdf/Dengue_oms_2009.pdf)

Organización Panamericana de la Salud. (2011). *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus Chikungunya en las Américas*. Washington D.C.: Center For Disease Control and Prevention. Biblioteca sede OPS.

Organización Panamericana de la Salud. (21 de Julio de 2014). *Organización Mundial de la Salud Oficina Regional para las Américas*. Obtenido de [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=9783%3Adominican-republic-is-first-country-in-the-americas-to-publish-guidelines-for-clinical-management-of-Chikungunya&Itemid=1926&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9783%3Adominican-republic-is-first-country-in-the-americas-to-publish-guidelines-for-clinical-management-of-Chikungunya&Itemid=1926&lang=es)

Padilla, J. C., Rojas, D. P., & Sáenz Gómez, R. (2012). Dengue en Colombia. Bogotá: Los Autores.

Rodriguez, M. A. (2015). Aedes: Un eficiente vector de viejos y nuevos arbovirus en las Americas. *Cuerpo Médico HNAAA*, 50-52.

Toro G., H., Chiappa T., E., & Tobar M., C. (2009). Reproducción, Desarrollo y estacionalidad. En *Biología de insectos* (págs. 17-20). Chile: Ediciones Universitarias de Valparaíso.

Valerio, L., Tenas, D. M., & Roure, S. (Noviembre de 2008). El Dengue. *Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 15(9), 556-562.

Velásquez, C. L. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15-21.

Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., & della Torre, A. &. (2012). Insecticide resistance in the major Dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 126-131.

World Health Organization. (7 de January de 2011). WHO. Obtenido de Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality:  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/gdwqrevision/novaluron2ndadd.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/gdwqrevision/novaluron2ndadd.pdf)

### **Anexo 1.**Cálculos para la síntesis de hidrogeles

- **Preparación de solución de ácido acético al 2%**

$$\frac{2\text{mL ácido acético glacial}}{100\text{mL de solución}} * 100 = \text{solución de ácido acético 2\%}$$

Esta solución fue preparada en un balón volumétrico de 100mL y como solvente se utilizó agua destilada.

- **Preparación de solución de quitosano al 3%**

$$\frac{3\text{g de quitosano}}{100\text{mL de solución ácido acético 2\%}} * 100 = \text{solución quitosano 3\%}$$

Esta solución fue preparada en un beaker de 400mL y como solvente se utilizó la solución de ácido acético al 3% preparada anteriormente.

- **Preparación de solución de glutaraldehído 2,5% a partir de solución de glutaraldehído 25%**

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(25\%) \times V_1 = (2,5\%) \times 50\text{mL}$$

$$V_1 = \frac{(2,5\%) \times 50\text{mL}}{25\%}$$

$$V_1 = 5\text{mL}$$

Esta solución fue preparada en un balón volumétrico de 50mL usando como solvente agua destilada.

- **Determinación de la densidad de la solución de glutaraldehído 2,5%**

**Tabla 7.** Datos para determinación de la densidad del glutaraldehído 2,5%

Número	Para el agua		Para glutaraldehído	
	Peso picnómetro vacío (g)	Peso picnómetro con agua (g)	Peso picnómetro vacío (g)	Peso con solución de glutaraldehído 2,5% (g)
1	9,4695	14,9316	9,4714	14,9728
2	9,4696	14,9295	9,4713	14,9750
3	9,4694	14,9280	9,4713	14,9706
<b>Promedio</b>	9,4695	14,9290	9,4713	14,9733

En este caso se utilizó como densidad del agua 0,99808 g/mL que es la correspondiente a 21°C, temperatura del laboratorio en el que se lleva al cabo la síntesis. Para este cálculo se utilizó la ecuación mostrada a continuación.

$$\rho_{\text{glutaraldehído 2,5\%}} = \left( \frac{\text{Pic. con gluta} - \text{Pic. vacío}}{\text{Pic. con agua} - \text{Pic. vacío}} \right) \times \rho_{\text{del agua}}$$

$$\rho_{\text{glutaraldehído 2,5\%}} = \left( \frac{14,9733g - 9,4713g}{14,929g - 9,4695g} \right) \times 0,99808 \frac{g}{mL}$$

$$\rho_{\text{glutaraldehído 2,5\%}} = 1,006 \frac{g}{mL}$$

Pic.= Picnómetro

Gluta = glutaraldehído

▪ **Cálculos para la síntesis de los hidrogeles con Novaluron para el ensayo de laboratorio**

- Moles de quitosano

$$9mL \text{ sln quitosano} \times \frac{3g \text{ quitosano}}{100mL \text{ ácido acético}} \times \frac{1mol \text{ quitosano}}{170,376g} = 1,585 \times 10^{-3}$$

Para poder realizar el cálculo de las moles de quitosano aptas para realizar el entrecruzamiento, se debe tener en cuenta el porcentaje de desacetilación del quitosano, el cual es 75%, proporcionado por el fabricante.

$$\text{Moles quitosano desacetilado} = 1,585 \times 10^{-3} \text{ moles quitosano} \times 0,75$$

$$\text{Moles quitosano desacetilado} = 1,189 \times 10^{-3}$$

A partir de las moles de quitosano desacetilado se realiza el cálculo de las moles de glutaraldehído necesarias para realizar el entrecruzamiento necesario.

- Para entrecruzamiento 25%

$$1,189 \times 10^{-3} \text{ moles desacetiladas} \times \frac{1 \text{ mol glutaraldehído}}{2 \text{ moles desacetiladas}} \times 0,25$$

$$\text{Moles glutaraldehído} = 1,486 \times 10^{-4}$$

**Tabla 8.** Moles de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento

Entrecruzamiento	Moles glutaraldehído
25%	$1,486 \times 10^{-4}$
50%	$1,973 \times 10^{-4}$
75%	$4,459 \times 10^{-4}$

Después de obtenidas las moles de glutaraldehído se procede a su conversión de unidades haciendo uso de la densidad ya determinada.

- Para entrecruzamiento 25%

$$1,486 \times 10^{-4} \text{ moles gluta} \times \frac{100 \text{ g gluta}}{1 \text{ mol gluta}} \times \frac{100 \text{ g solución}}{2,5 \text{ g gluta}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1,006 \text{ g gluta}}$$

$$\text{mL glutaraldehído} = 0,592$$

$$0,592 \text{ mL} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 591,6 \mu\text{L glutaraldehído}$$

**Tabla 9.** Volumen de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento

Entrecruzamiento	Vol. Solución glutaraldehído 2,5% (mL)	Vol. Solución glutaraldehído 2,5% (μL)
25%	$1,486 \times 10^{-4}$	591,6
50%	$1,973 \times 10^{-4}$	1183,5
75%	$4,459 \times 10^{-4}$	1775,1

Ahora, se procede a calcular la cantidad de novaluron necesaria para que cada hidrogel cortado tenga la concentración requerida, para esto se debe tener en cuenta el volumen del cortador (sacabocados) y los mg de novaluron necesarios para cada concentración.

- Para cantidad de Novaluron

Volumen 100mL para cada bioensayo

$$Dosis letal 99 = 0,55ppm = 0,55 \frac{mg}{L}$$

$$0,55 \frac{mg}{L} \times 0,1L = 0,055mg$$

Se procede a determinar el volumen del cilindro resultante del corte con el sacabocados, con el fin de asegurar la concentración necesaria en el volumen total de este.

$$V = \pi r^2 \times h$$

$$V = \pi(5mm)^2 \times 3,5mm \times \frac{1cm^3}{1000mm^3} \times \frac{1mL}{1cm^3} = 0,275mL$$

Habiendo obtenido este valor del volumen y asumiendo que se tiene una concentración de 0,55ppm en el hidrogel completo se calcula la cantidad de larvicida por mililitro.

$$Cantidad\ de\ larvicida = \frac{5 \times 10^{-2} mg}{0,275mL} = 0,182 \frac{mg}{mL}$$

Ahora, tomando como base la cantidad de larvicida, se lleva esta concentración a la totalidad de la solución de quitosano preparado como se muestra a continuación.

$$\text{Cantidad NOV necesaria} = 0,182 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \times 10\text{mL de solución} = 1,82\text{mg novaluron}$$

Este cálculo se repite para las diferentes concentraciones (teniendo en cuenta que el volumen de la solución varía dependiendo del entrecruzamiento y la concentración) obteniendo los resultados presentados en la Tabla 7.

**Tabla 10.** Cantidad de novaluron de acuerdo a la concentración

Concentración (X=0,55ppm)	Novaluron (mg)
1X	1,82
2X	3,64
3X	5,45

Posteriormente, se realizó una solución concentrada con el estándar de Novaluron y de esta se tomaron las alícuotas necesarias para obtener la concentración deseada como se muestra a continuación.

$$\text{Solución de novaluron} = \frac{29\text{mg novaluron}}{5\text{mL de etanol}}$$

- Para 1X

$$1,82\text{mg novaluron} \times \frac{5\text{mL}}{29\text{mg NOV}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}} = 313,8\mu\text{L solución novaluron}$$

**Tabla 11.** Cantidad de novaluron de acuerdo a la concentración y entrecruzamiento

Concentración (X=0,55ppm)	25%	75%
	Novaluron ( $\mu\text{L}$ )	
1X	313,80	375,55
2X	690,34	753,1

3X

1033,6

1127,6

**Tabla 12.** Cantidades finales de los componentes del hidrogel

Entrecru.	Concentración	Volumen Gluta (μL)	Volumen NOV (μL)	Volumen Etanol (μL)	Volumen total (μL)
25%	1X	591,6	313,8	94,6	1000
	2X	591,6	690,3	718,1	2000
	3X	591,6	1033,6	374,8	2000
75%	1X	1775,1	375,6	849,35	3000
	2X	1775,1	753,1	471,8	3000
	3X	1775,1	1127,6	97,3	3000

- **Cálculos para la concentración de novaluron en los hidrogeles usados en el ensayo de semicampo**

En este caso, fue necesario determinar el volumen del molde (aro plástico) ya que se usaron los hidrogeles en su totalidad.

$$V = \pi r^2 \times h$$

$$V = \pi (27,5mm)^2 \times 3,5mm$$

$$V = 8315,4mm^3 \times \frac{1mL}{1000mm^3} = 8,32mL$$

Al igual que en los cálculos ya presentados, se realizó una solución concentrada con el estándar de Novaluron y de esta se tomaron las alícuotas.

$$\text{Solución de novaluron} = \frac{44,5mg \text{ novaluron}}{7mL \text{ de etanol}}$$

- Concentración de NOV para entrecruzamiento 25%

$$\frac{5,5mg\ novaluron}{8,3mL\ etanol} \times 10mL\ solución \times \frac{7mL}{44,5mg} \times \frac{1000\mu L}{1mL} = 1042,4\mu L$$

Se realiza el mismo cálculo teniendo en cuenta el volumen del hidrogel de acuerdo a su entrecruzamiento para determinar la alícuota a adicionar.

**Anexo 2.** Documento de recolección de datos para ensayos biológicos en laboratorio





**FORMATO DE EVALUACIÓN PARA MEDIR LA EFICACIA DE LA LIBERACIÓN DE HIDROGELES EN LARVAS (SEMI-CAMPO)**

Experimento #: \_\_\_\_\_ Responsable: \_\_\_\_\_ Fecha de inicio: \_\_\_\_\_

Producto: \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_ Cepa: \_\_\_\_\_ Instar Evaluada: \_\_\_\_\_

Fecha			Vivos			Muertos			Vivos			Muertos			Vivos			Muertos			Vivos			Muertos					
Entrec	Repet	# balde	Vivos			Muertos			Vivos			Muertos			Vivos			Muertos			Vivos			Muertos					
			L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A			
Presencia de larvas																													
Volumen de balde																													
Fecha colección de larvas																													
Fecha de colección de agua																													
Fecha de aplicación de larvas																													
Observaciones																													

**Anexo 4.** Variación de respuesta media mediante análisis del valor P para los diferentes bioensayos

Para determinar la probabilidad de obtención de los resultados presentados y evidenciar las diferencias estadísticas a partir de una hipótesis nula, se usó el valor P como valor de referencia. En este caso,  $H_0$ : los bioensayos se comportan estadísticamente igual y como  $H_A$ : los bioensayos presentan diferencias estadísticamente significativas, con un valor alfa de 0,05

**Tabla 13.** Variación de la respuesta media, mediante el análisis del valor P para el bioensayo 1 (0-15 días)

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Entrecruzamiento</b>	1	9.3888	1.43	0.2545
<b>Concentración</b>	2	14.0000	2.14	0.1609
<b>Entrecruz*Concentración</b>	2	16.2222	2.47	0.1260

**Tabla 14.** Variación de la respuesta media, mediante el análisis del valor P para el bioensayo 2 (15-30 días)

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Entrecruzamiento</b>	1	5.0416	0.24	0.6337
<b>Concentración</b>	2	26.4500	1.27	0.3231
<b>Entrecruz*Concentración</b>	2	8.0500	0.39	0.6896

**Tabla 15.** Variación de la respuesta media, mediante el análisis del valor P para el bioensayo 3 (30-45 días)

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Entrecruzamiento</b>	1	3.5555	0.23	0.6424
<b>Concentración</b>	2	20.2222	1.29	0.3106
<b>Entrecruz*Concentración</b>	2	2.8888	0.18	0.8339

**Tabla 16.** Variación de la respuesta media, mediante el análisis del valor P para el bioensayo 4 (45-60 días)

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor P</b>
<b>Entrecruzamiento</b>	1	0.5000	0.10	0.7573
<b>Concentración</b>	2	15.5000	3.10	0.0822
<b>Entrecruz*Concentración</b>	2	0.5000	0.10	0.9056