

**ESTUDIO DEL EFECTO Y DURACIÓN DEL LARVICIDA PIRIPROXIFÉN  
SOBRE EL DESARROLLO DE LAS LARVAS DEL MOSQUITO *Aedes  
aegypti* LIBERADO A PARTIR DE MATRICES POLIMÉRICAS DE  
QUITOSANO**

**JUAN PABLO SILVA RUIZ**

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

**ESTUDIO DEL EFECTO Y DURACIÓN DEL LARVICIDA PIRIPROXIFÉN  
SOBRE EL DESARROLLO DE LAS LARVAS DEL MOSQUITO *Aedes  
aegypti* LIBERADO A PARTIR DE MATRICES POLIMÉRICAS DE  
QUITOSANO**

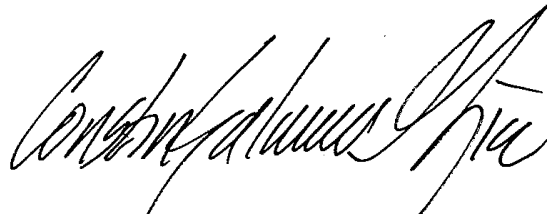
**JUAN PABLO SILVA RUIZ**

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

**TUTORAS:  
NORA ELENA VALDERRUTEN, Ph.D  
PROFESORA DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CLARA BEATRIZ OCAMPO, Ph.D  
INVESTIGADORA CIDEIM**

**SANTIAGO DE CALI  
2016**

**APROBADO POR:**



---

**Constain Hugo Salamanca Mejía**

**Evaluador**

*Nora E. Valderruten*

---

**Nora Elena Valderruten, Ph.D**

**Director del proyecto**

*Clara B. Ocampo Durán*

---

**Clara Beatriz Ocampo, Ph.D**

**Co-director del proyecto**

**Santiago de Cali  
Martes 02 de enero de 2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional, compañía y por darme la oportunidad para alcanzar mis metas. A mis tutoras, Nora Elena Valderruten y Clara Beatriz Ocampo, por su compromiso y acompañamiento constante brindado a lo largo del proyecto. Al personal del CIDEIM, especialmente a Luis E. Ramírez, por su colaboración y el tiempo dedicado para orientarme en la realización esta investigación. Finalmente, a mis compañeros de Icesi que me ayudaron a alcanzar este gran logro.

## 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 .....	17
2.2.1 LAS ENFERMEDADES TROPICALES.....	17
2.2.1.1 DENGUE .....	17
2.2.1.2 CHIKUNGUNYA .....	17
2.2.1.3 ZIKA.....	18
2.1.1.4 SÍNTOMAS DE LAS ENFERMEDADES TROPICALES.....	18
2.1.1.5 EL VECTOR.....	19
2.1.2 ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DEL VECTOR.....	20
2.1.3 SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA.....	21
2.1.4 PIRIPROXIFÉN .....	22
2.2 OBJETIVOS.....	24
2.3 METODOLOGÍA .....	25
2.3.1 Recursos requeridos .....	25
2.3.2 Obtención de hidrogeles de quitosano cargados de piriproxifen .....	25
2.3.3 Estudios en condiciones controladas de laboratorio .....	26
2.3.4 Estudios en condiciones de semicampo .....	26
2.3.5 Análisis estadístico .....	27
2.3.6 Matriz de marco lógico .....	28
2.4 RESULTADOS.....	31
2.4.1 Obtención de hidrogeles de quitosano cargados de piriproxifén .....	31
2.4.2 Estudios en condiciones controladas de laboratorio .....	31
2.4.3 Análisis estadístico .....	34
2.4.4 Estudios en condiciones de semicampo .....	36

2.5	DISCUSIÓN.....	39
2.5.1	Obtención de hidrogeles de quitosano cargados de piroxicam .....	39
2.5.2	Estudios en condiciones controladas de laboratorio .....	41
2.5.3	Análisis estadístico .....	41
2.5.4	Estudios en condiciones de semicampo .....	43
2.6	CONCLUSIONES .....	46
2.7	RECOMENDACIONES .....	47
3.	REFERENCIAS.....	48
	ANEXOS .....	52

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Similitudes y diferencias entre Zika, dengue y chikungunya. ....	18
<b>Tabla 2.</b> Matriz de marco lógico para la ejecución del proyecto. ....	28
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los datos usados en el análisis estadístico. ....	35
<b>Tabla 4.</b> Análisis de varianza de los datos de porcentaje de mortalidad. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Convenciones para el contenido de los baldes en los bioensayos de semicampo. ....	36
<b>Tabla 6.</b> Resumen de los tamaños muestra (n) y porcentajes de emergencia (E) obtenidos en los bioensayos de semicampo. ....	38
<b>Tabla 7.</b> Resumen de los resultados de porcentaje de emergencia para los mosquitos encontrados en los bioensayos de semicampo. ....	38
<b>Tabla 8.</b> Datos para la reacción de entrecruzamiento. ....	54
<b>Tabla 9.</b> Cantidad de piriproxifén de acuerdo a la concentración. ....	56
<b>Tabla 10.</b> Resumen de los datos obtenidos para fabricar los hidrogeles de quitosano cargados de piriproxifén. ....	56

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Mortalidad acumulada de larvas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el primer bioensayo. ....	32
<b>Gráfica 2.</b> Mortalidad acumulada de larvas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el segundo bioensayo. ....	32
<b>Gráfica 3.</b> Mortalidad acumulada de larvas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el tercer bioensayo. ....	32
<b>Gráfica 4.</b> Mortalidad acumulada de larvas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el cuarto bioensayo. ....	33
<b>Gráfica 5.</b> Mortalidad acumulada de larvas y pupas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el primer bioensayo. ....	33
<b>Gráfica 6.</b> Mortalidad acumulada de larvas y pupas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el segundo bioensayo. ....	33
<b>Gráfica 7.</b> Mortalidad acumulada de larvas y pupas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y de (b) 75% de entrecruzamiento para el tercer bioensayo. ....	34
<b>Gráfica 8.</b> Mortalidad acumulada de larvas y pupas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y de (b) 75% de entrecruzamiento para el cuarto bioensayo. ....	34
<b>Gráfica 9.</b> Emergencia de mosquitos de las muestras obtenidas (a) el 18 y el (b) 31 de octubre de 2016 en los baldes de los bioensayos de semicampo. ....	37
<b>Gráfica 10.</b> Emergencia de mosquitos de las muestras obtenidas (a) el 9 y (b) el 15 de noviembre de 2016 en los baldes de los bioensayos de semicampo. ....	37
<b>Gráfica 11.</b> Emergencia de mosquitos cepa Rockefeller de las muestras de agua obtenidas (a) el 31 de octubre y (b) el 15 de noviembre de 2016 en los baldes de los bioensayos de semicampo. ....	38



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida del mosquito <i>Aedes aegypti</i> . .....	19
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la unidad monomérica del quitosano.....	21
<b>Figura 3.</b> Estructura química del piriproxifén. ....	22
<b>Figura 4.</b> Molde de acrílico utilizado para la fabricación de los hidrogeles. ....	25
<b>Figura 5.</b> Bioensayo en condiciones controladas de laboratorio.....	26
<b>Figura 6.</b> Bioensayo en condiciones de semicampo.....	27
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de entrecruzamiento del quitosano con glutaraldehído. ....	41

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Cálculos realizados para la obtención de los hidrogeles. ....	52
<b>Anexo 2.</b> Formato de recolección de datos para los bioensayos de laboratorio. .....	57
<b>Anexo 3.</b> Formato de recolección de datos para ensayos biológicos en semicampo. ....	58
<b>Anexo 4.</b> Análisis estadístico de los datos de los bioensayos de laboratorio...	59

## RESUMEN DEL PROYECTO

Con el objetivo de encontrar nuevas estrategias que extiendan la actividad residual de larvicidas usados para controlar proliferación del vector de las enfermedades endémicas: Zika, dengue y chikungunya, este proyecto buscó crear una matriz de liberación controlada, amigable con el medio ambiente, con el fin de lograr la inhibición del desarrollo del insecto *Aedes aegypti*. Se obtuvieron hidrogeles de quitosano con dos grados de entrecruzamiento distintos y tres cantidades diferentes de emulsión de piriproxifén. Los bioensayos se llevaron a cabo en condiciones controladas de laboratorio y de semicampo, en ellos se evaluó la mortalidad de las larvas y las pupas o la emergencia de los mosquitos adultos. Se hizo un análisis estadístico comparativo que no determinó cuál matriz fue más eficaz, dado que el tiempo de estudio fue de dos meses y no se llegó a la liberación total del larvicida. Además, se concluyó que la propuesta de escalonamiento mostró liberación constante de piriproxifén, debido a que a los 43 días de haber iniciado el experimento se presentaron porcentajes de emergencia nulos para la mayoría de los baldes y posiblemente pueda ser empleada en ensayos de campo en el futuro.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, Enfermedades infecciosas, Hidrogel, Liberación controlada, Piriproxifén, Quitosano.

## ABSTRACT

In order to find new strategies that extend the residual activity of larvicides which are used to control of the vector of endemic diseases: Zika, dengue and chikungunya, this project searched to create a controlled release matrix, environmental friendly, in order to achieve the developmental inhibition of the *Aedes aegypti* insect. Chitosan hydrogels were obtained with two different degrees of cross-linking and three different pyriproxyfen emulsion amounts. The bioassays were made under laboratory controlled conditions and semi-field, in which larval and pupal mortality or the emergence of adult mosquitoes were evaluated. A comparative statistical analysis was made. It did not determine which matrix was most effective, because the study time was two months and the total release of the larvicide was not reached. In addition, it was concluded that the staggered proposal showed a constant release of pyriproxyfen, due to the fact that 43 days after the experiment was started, emergency percentages were zero for most buckets and could possibly be used in field trials in the future.

**Keywords:** *Aedes aegypti*, infectious diseases, hydrogel, controlled release, pyriproxyfen, chitosan.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las patologías tropicales hacen referencia a enfermedades infecciosas que tienen mayor incidencia en zonas de climas cálidos y húmedos. Dentro de éstas se encuentran el Zika, dengue y chikungunya, las cuales se transmiten a través del mosquito *Aedes aegypti*, por lo que se les conoce como enfermedades arbovirales (OMS, 2016).

Según datos estadísticos del Instituto Nacional de Salud, el número de casos reportados de chikungunya en Colombia a finales de 2016 fue de 8,700. Por otro lado, los casos nacionales confirmados del virus del dengue llegaron a 43,434 infectados. Finalmente, las estadísticas del presente año sobre el Zika muestran que hubo 58,109 afectados, de los cuales 18,570 fueron habitantes de Valle del Cauca (Sivigila, 2016).

Para disminuir las infecciones de enfermedades tropicales, la OMS plantea como medida de prevención el control del mosquito *Aedes aegypti*. Este consiste principalmente en eliminar las aguas estancadas de los espacios domésticos, usar repelentes de insectos y realizar aspersiones de diferentes insecticidas. Sin embargo, dicho vector se ha adaptado a los cambios de su entorno y ha desarrollado mecanismos de supervivencia, entre ellos la resistencia a algunos biocidas y a la desecación de sus huevos hasta por periodos de dos meses (Rodríguez, 2004). Los sumideros de las calles son uno de los criaderos más productivos en el Valle del Cauca, los cuales son fumigados quincenalmente por las Secretarías de Salud con el objetivo de interrumpir el crecimiento adecuado de los estadios inmaduros del mosquito e impedir la emergencia de adultos. Esta fumigación es muy costosa y requiere un alto número de personal debido a la presencia de más de 48,000 sumideros en la ciudad.

El piriproxifén es un larvicida regulador del crecimiento, mimético de la hormona juvenil, que interrumpe e impide la metamorfosis. Es una molécula de acción lenta dado que actúa solamente en la transición de larva a pupa o pupa a adulto. Además, la DL<sub>99</sub> del mosquito es de 0,05ppm, concentración muy pequeña y atóxica para los vertebrados, lo que representa una ventaja al usarlo para el control del vector de las enfermedades tropicales (IRAC, 2011).

Los hidrogeles de quitosano planteados en este proyecto pueden ser una alternativa viable para prevenir la transmisión de Zika, dengue y chikungunya en Colombia y el mundo, ya que ayudarían a disminuir la proliferación de su vector, el mosquito *Aedes aegypti*. Estos hidrogeles presentan una buena biocompatibilidad, biodegradabilidad, un proceso de fabricación fácil y se han usado como matrices de liberación controlada, por lo que pueden difundir el larvicida gradualmente por largos periodos de tiempo, controlando la emergencia de los estadios inmaduros del insecto. Esta característica hace que este método de control sea más eficiente que los convencionales, porque requieren menor número de aplicaciones, duran más tiempo, reducen la contaminación y merman los costos en materiales y personal.

En este proyecto se sintetizaron hidrogeles de quitosano con dos grados de entrecruzamiento (25% y 75%) y tres concentraciones de piriproxifén (1X, 5X y 10X; X=0,05ppm), usando glutaraldehído como agente entrecruzante. Se realizaron pruebas de laboratorio y semicampo donde se midió la mortalidad de las larvas y pupas, y la emergencia de adultos, respectivamente. El análisis estadístico permitió determinar que no hubo diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de larvicida y los grados de entrecruzamiento usados. Finalmente, se propuso un método para el escalonamiento del producto, el cual consistía en el uso de cien hidrogeles por balde para los bioensayos de semicampo, dado que su relación con el volumen de agua en los bioensayos de laboratorio era de cien veces mayor. De esta manera se liberó el larvicida y se controló la emergencia del mosquito durante dos meses y, posiblemente, se pueda implementar en ensayos de mayor escala, como por ejemplo en sumideros.

Los resultados de la matriz de quitosano de liberación controlada obtenidos en este proyecto pueden ser útiles para investigaciones relacionadas con la creación de productos similares que estén encaminados a ser usados en el sector agrícola para el control de plagas, asimismo como para estudios de control de vectores en sumideros y de mayor duración.

## 2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

### 2.1 Planteamiento del problema de investigación

Para conocer el porqué de este proyecto es necesario formular la siguiente pregunta: ¿los hidrogeles de quitosano pueden ser una nueva estrategia viable para extender la duración de los insecticidas y con ello controlar al vector de varias enfermedades endémicas, el mosquito *Aedes aegypti*, de una forma más eficaz que las convencionales?

Muchos países del mundo, como Colombia, se encuentran en la zona intertropical, región del planeta donde las condiciones son adecuadas para la proliferación del vector del Zika, dengue y chikungunya. Es por esta razón que sus habitantes son propensos a desarrollar las enfermedades infecciosas mencionadas anteriormente.

Según datos estadísticos de la Organización Panamericana de la Salud y la OMS, el número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas en enero de 2016 fue de 991,134 pacientes, de los cuales 49,529 son colombianos (OPS, 2016). Por otro lado, recientemente el dengue ha repercutido en un mayor grado sobre la población mundial. Se estima que se dan 390 millones de infecciones por dengue cada año, donde aproximadamente el 24% de los casos se manifiestan clínicamente (OMS, Dengue y dengue grave, 2015). Finalmente, el Zika es una patología endémica relativamente nueva y su incidencia está aumentando. El Instituto Nacional de Salud reportó estadísticas sobre los casos reportados de esta enfermedad hasta el 30 de enero de 2016. Los registros muestran que a finales de enero de 2016 se registraron 20,297 afectados, de los cuales 1,911 fueron mujeres embarazadas (Palomino, 2016).

Las cifras expuestas anteriormente son preocupantes y aumentan rápidamente. Para el control del vector de estas enfermedades, la OMS ha planteado indicaciones basadas en eliminar los posibles criaderos del mosquito en aguas estancadas y el uso de repelentes para prevenir su picadura. Adicionalmente, se implementan aspersiones de insecticidas periódicamente para eliminar el insecto, sin embargo, este artrópodo ha desarrollado resistencias tanto a la desecación de sus huevos como a algunos compuestos usados en dichas fumigaciones (Cáceres, 2013). Unos químicos son adulticidas y otros larvicidas. Entre los larvicidas están los reguladores del crecimiento, como el piriproxifén, los cuales son moléculas que impiden el desarrollo de los estadios inmaduros del insecto, adecuadas para el control del mosquito debido a que presentan toxicidad mínima ante los vertebrados y el vector es sensible a bajas concentraciones de los mismos. Adicionalmente, el hecho de incorporarlos en matrices poliméricas podría permitir la modificación de su durabilidad para que sea mayor a través del tiempo.

La matriz de liberación controlada que se busca es una solución potencial al problema, porque podría difundir el larvicida continuamente a través del tiempo

e inhibir el desarrollo del mosquito en su estadio larvario por largos periodos de duración y, por consiguiente, mitigar o prevenir la transmisión de estos virus en la población colombiana y mundial en un lapso considerablemente mayor a los métodos convencionales. Con esta invención podría aumentar la eficacia de la actividad residual del insecticida, disminuir los costos en materiales y personal, así como la frecuencia de riego y minimizar la contaminación al medio y sus habitantes. Además, esta investigación sobre los hidrogeles de quitosano se puede extrapolar en futuros proyectos de desarrollo de productos similares antiplagas que quieran ser implementados en el campo de la agricultura.



## **2.2 MARCO TEÓRICO**

### **2.2.1 LAS ENFERMEDADES TROPICALES**

Los métodos para la prevención y el control del vector del Zika, dengue y chikungunya son poco eficientes, debido a que es necesario realizar aspersiones regulares y, en el proceso, se incurren en gastos sustanciales. Estas patologías representan un problema grave, pues tienen alta incidencia en el territorio nacional. Es por eso que las investigaciones para el desarrollo de nuevas técnicas de erradicación del vector están aumentando (Numa, 2015). A continuación, se muestran descripciones generales y algunos datos históricos de cada patología que contextualizan y respaldan la existencia de un problema de salud pública en potencia, evidencia de la necesidad de implementar un mejor control sobre el mosquito *Aedes aegypti*.

#### **2.2.1.1 DENGUE**

Esta patología se define como una infección viral aguda, la cual no discrimina edad, aunque debido a los procesos fisiológicos asociados a cada población, los niños y los adultos mayores son los pacientes potenciales a desarrollar la infección. Esta enfermedad se produce por un virus que se trasmite a través de la picadura de mosquitos *Aedes aegypti* infectados (Ministerio de salud y protección social, 2016).

Esta enfermedad infecciosa representa una amenaza para la salud pública a nivel mundial, ya que más de 2500 millones de personas (dos quintas partes de la población mundial) están ubicadas en zonas propensas a desarrollar dengue (Kouri, 2006). Adicionalmente, se ha confirmado la aparición de esta patología en más de cien países. América central y del sur son territorios que han mostrado altas tasas de prevalencia de dengue. El 72% de los municipios de Colombia se encuentran por debajo de los 2200 msnm, por eso presentan la humedad y temperatura adecuada para la presencia del vector. Esto indica que hay que prestar especial atención al control de este tipo de complicaciones clínicas (Guzmán, 2002).

#### **2.2.1.2 CHIKUNGUNYA**

Esta patología es ocasionada por un arbovirus, este agente infeccioso fue aislado por primera vez en Tanzania en 1953. Chikungunya significa “caminar encorvado” en algunos idiomas de África oriental, nombre que hace alusión a los síntomas de dolores articulares. Esta enfermedad es específica de zonas tropicales, aunque se han reportado brotes en Réunion (un complejo insular situado cerca de Madagascar), India y en regiones cercanas al océano Índico (Gilles Pialoux, 2007). En las últimas décadas, la enfermedad se ha propagado hasta las Américas y, en 2007, ocurrió el primer brote de chikungunya en el continente europeo (OMS, Chikungunya, 2016).

El Instituto Nacional de Salud reportó que a finales de 2016 se habían presentado 8,700 casos confirmados del virus, y los departamentos con mayor número de personas afectadas fueron Santander, Valle del Cauca, Risaralda y Tolima (Sivigila, 2016). Por todo lo dicho con anterioridad, se confirma que la patología es un problema de salud pública a nivel mundial y que es necesario crear estrategias sagaces para su control y prevención.

### 2.2.1.3 ZIKA

Esta enfermedad, semejante a las mencionadas anteriormente, consiste en otro arbovirus que emergió rápidamente a escala mundial que apareció en las Américas en el año 2013. Originalmente, se reportó su primer brote en 2007 en la isla de Yap en los Estados Federados de Micronesia, donde se reportaron 49 casos confirmados y documentados. En los años siguientes, el Zika se asoció con brotes en la Polinesia Francesa y después en las islas del Pacífico Sur de Nueva Caledonia y la isla de Pascua (Brault, 2016). Esta patología se ha convertido en una epidemia diseminada desde Brasil, en 2015, a más de 30 países del continente americano. Se han descrito casos que asocian dicha enfermedad con el embarazo y con un aumento en la incidencia de microcefalia en los recién nacidos, el desarrollo del síndrome de GuillainBarré e infecciones de impacto leve o asintomáticas (Anderson, 2016).

Los primeros casos de Zika en Colombia se dieron en la costa caribe en el mes de septiembre de 2015, dado que nuestro país se encuentra en la zona ecuatorial, las condiciones fueron propicias para el inicio de una epidemia mediante la transmisión autóctona del virus. Hasta enero de 2016 se documentaron 20.297 casos, 18.165 confirmados y 2.132 casos sospechosos (Rodríguez, 2016). Los reportes expuestos anteriormente ocasionaron que la Organización Mundial de la Salud declarara que los brotes de esta enfermedad son una emergencia de salud pública de importancia internacional. Debido al impacto negativo asociado a las enfermedades endémicas mencionadas anteriormente, se ha hecho una gran insistencia en el desarrollo de vacunas y terapias antivirales como prevención y tratamiento de estas infecciones virales (Brault, 2016).

### 2.1.1.4 SÍNTOMAS DE LAS ENFERMEDADES TROPICALES

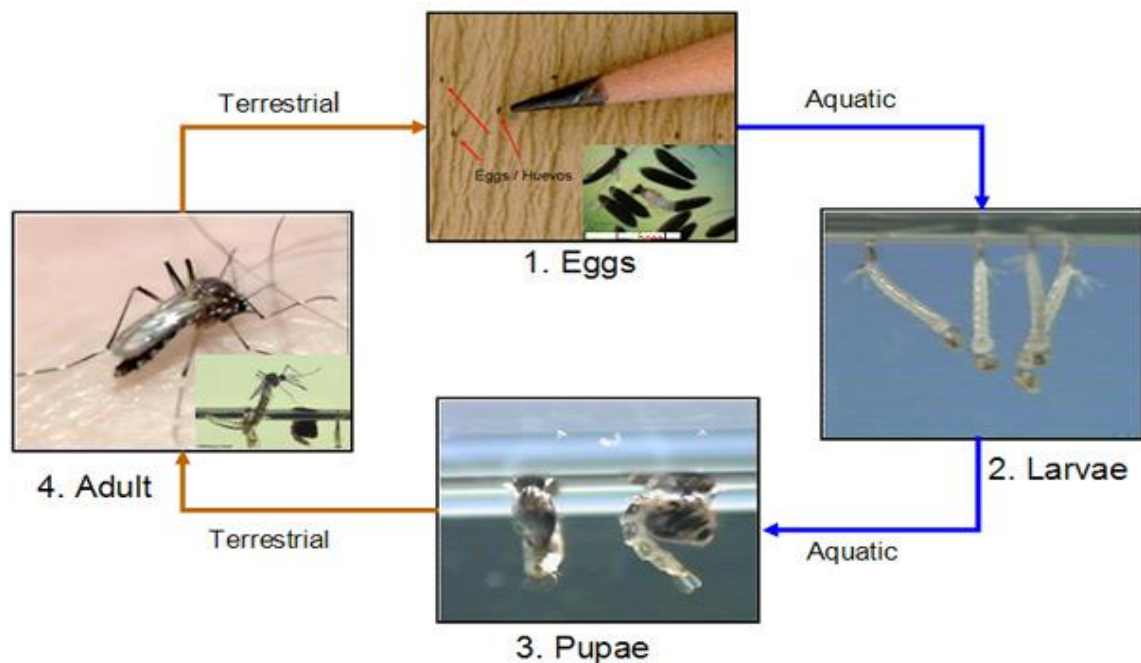
Las tres patologías descritas anteriormente muestran síntomas semejantes y se pueden confundir. Las guías de diagnóstico diferencial ayudan a realizar un dictamen médico adecuado. En la Tabla 1 se muestran algunas similitudes y diferencias entre los síntomas de cada enfermedad.

**Tabla 1.** Similitudes y diferencias entre Zika, dengue y chikungunya (*Secretaría de Salud de México, 2015*).

CHIKUNGUNYA	DENGUE	ZIKA
Con la picadura los síntomas aparecen de 3 a 7 días después	Con la picadura los síntomas aparecen de 5 a 8 días después	Con la picadura los síntomas aparecen de 3 a 12 días después

Fiebre alta (40°C)	Fiebre alta (40°C)	Fiebre (38,5°C)
Dolor de cabeza	Dolor de cabeza intenso	Dolor de cabeza
Dolores musculares	Dolores musculares	Dolores musculares
Fuertes dolores articulares	Dolores articulares	Conjuntivitis no purulenta
Malestar general	Malestar general	Artritis o artralgia
Náuseas	Vómito	Vómito
Manchas rojas o puntos púrpura en la piel que se acompaña de picor	Parches de sangre bajo la piel (en el dengue hemorrágico)	Erupciones en la piel con puntos rojos o blancos
Inflamación de las articulaciones	Disminución del apetito	Falta de apetito
Artritis	Dolor alrededor de los ojos y detrás de los globos oculares	Dolores en la parte posterior de los ojos
Sensación de cansancio	Sensación de cansancio	Diarrea
	Sudoración	Dolor abdominal
Los síntomas duran de 4 a 7 días	Los síntomas duran hasta 7 días	Los síntomas duran de 4 a 7 días

### 2.1.1.5 EL VECTOR



**Figura 1.** Ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti* (Centers for disease control and prevention, 2012).

Como se ha planteado a lo largo del documento, el mosquito *Aedes aegypti* es el vector de las enfermedades endémicas de Zika, dengue y chikungunya. Dichos insectos habitan climas tropicales, subtropicales y algunos climas templados. Estos artrópodos viven cerca de las personas, porque allí encuentran las condiciones apropiadas para su subsistencia (aguas estancadas, alimento,

entre otros). Las hembras prefieren alimentarse de sangre humana por lo que tienen más probabilidades de diseminar estos virus que otros tipos de mosquitos (CDC, 2016).

El vector de las patologías endémicas tiene un ciclo de vida (figura 1) en donde ocurren transiciones que modifican la forma, la función y el hábitat del animal. El mosquito hembra pone sus huevos en las paredes de los recipientes y las larvas eclosionan después de que entran en contacto con el agua (recuadro 1). Las larvas (recuadro 2) adquieren su alimento de la materia suspendida en el medio, hasta que están listas para pasar al siguiente estadio. Una larva se convierte en una pupa (recuadro 3) en una semana aproximadamente y, finalmente, en un mosquito adulto en dos días (recuadro 4). El ciclo de vida completo dura de 8 a 10 días a temperatura ambiente (Centers for disease control and prevention, 2012).

Los huevos del vector de las enfermedades endémicas tratadas en este documento desarrollaron adaptaciones que representan un problema para el control de esta plaga y la prevención de Zika, dengue y chikungunya. Estos pueden resistir la desecación durante meses. Esto implica que, si se elimina un alto porcentaje de la población de mosquito en cualquier otro estadio, la repoblación del insecto será instantánea luego de que los huevos entren en contacto con el agua. Hasta el momento no se conoce una forma efectiva de controlar dichos huevos en los contenedores de agua (Centers for disease control and prevention, 2012).

### **2.1.2 ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DEL VECTOR**

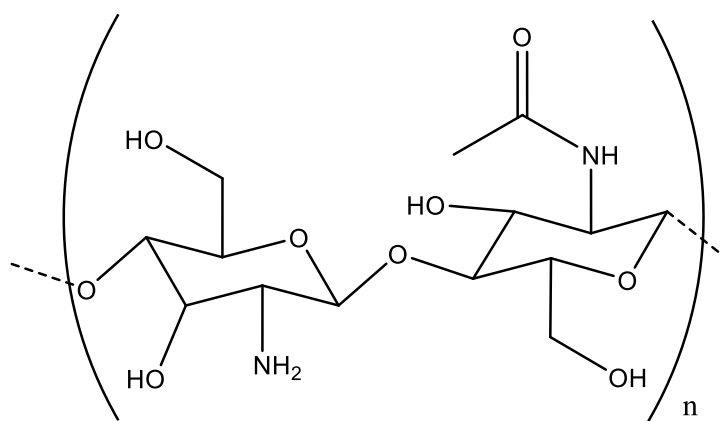
La Organización mundial de la salud establece que el único método para controlar o prevenir la transmisión de virus asociados a enfermedades endémicas consiste en luchar contra los mosquitos, es decir, el vector de las patologías. Por lo que, en primera instancia, se busca educar a la población para que evite tener aguas estancadas en sus hogares, en los cuales el insecto tenga oportunidad de depositar sus huevos. También se recomienda lavar periódicamente los recipientes que contengan agua de forma permanente e implementar el uso de elementos de protección contra el mosquito como, por ejemplo, ropa de manga larga, anjeos y repelentes (OMS, Dengue y dengue grave, 2015). Adicionalmente, se instauró el uso de insecticidas aplicados mediante aspersiones periódicas para erradicar la plaga (Reiter, 2003). Estos métodos resultan poco eficientes por los gastos regulares asociados a reactivos, equipos y personal asociado. Además de que se han reportado ciertas resistencias a los insecticidas comunes (Fontoura, 2012).

Además de los métodos anteriores, la Organización Mundial de la salud ha planteado una estrategia adicional para el control del vector mediante el desarrollo de insecticidas que regulen su proliferación. Para evaluar la inocuidad de estos productos químicos existe un Esquema de Evaluación de Plaguicidas (WHOPES) establecido con la aprobación de la Asamblea Mundial de la Salud en 1960. El programa sirve como referencia para establecer normas y

estándares para plaguicidas y la gestión del ciclo de vida de sus blancos. En la actualidad, WHOPEs establece el estudio de la seguridad, eficacia y aceptabilidad operativa de los plaguicidas para la salud pública y el desarrollo de especificaciones para el control de calidad y el comercio internacional (WHO, 2016).

### 2.1.3 SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

El quitosano es un polisacárido derivado de la quitina (figura 2), la cual se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos y en el exoesqueleto de los artrópodos. Se produce mediante la hidrólisis de este componente en medio alcalino (Velásquez, 2003).



**Figura 2.** Estructura química de la unidad monomérica del quitosano.

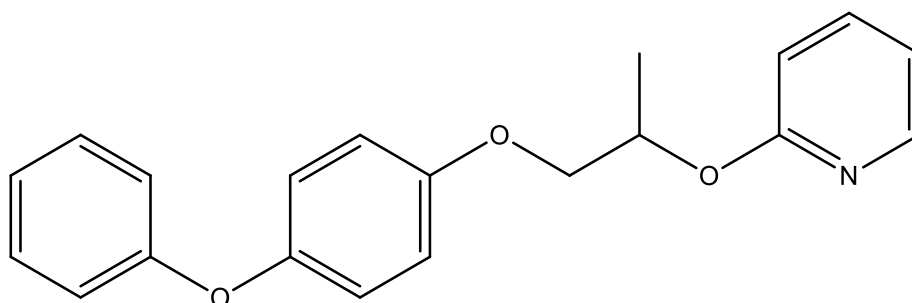
Los hidrogeles son redes tridimensionales constituidas por cadenas poliméricas con la capacidad de hincharse en medio acuoso, dado que tienen un carácter hidrófilo. Los hidrogeles obtenidos a partir de quitosano presentan una buena biocompatibilidad, biodegradación y un proceso de fabricación fácil; la capacidad de estos hidrogeles de hincharse y deshidratarse depende de la composición y medio en el cual se obtuvo el gel (Sánchez, 2007). Adicionalmente, los hidrogeles pueden cargarse con moléculas activas que son liberadas cuando se hinchan, mediante procesos de difusión. Es por eso que este producto se puede implementar como un sistema de liberación controlada de sustancias químicas cuya tasa de liberación dependerá del grado de entrecruzamiento del material.

La liberación controlada se caracteriza por difundir un compuesto activo al medio de forma constante a través del tiempo, alcanzando un equilibrio o estado estacionario en el que la concentración del activo en el cuerpo es invariable, posteriormente declina por el proceso de eliminación (Tapia, 1995). El quitosano es un polímero natural, por lo que al exponerse al medio ambiente no va a representar un elemento contaminante, en cambio es biocompatible y biodegradable. También se conoce como el único biopolímero natural catiónico útil por poseer propiedades antifúngicas, antivírico, antimicrobiano, no tóxico para el ser humano, emulsionante, absorbente de grasas, adsorbente de metales contaminantes, entre otras aplicaciones que hacen que sea considerado de gran utilidad en distintos campos de la industria (Vila, 2001). Este biopolímero ya se

ha empleado en diversos estudios de liberación controlada, entre los cuales se encuentra la determinación de la velocidad de liberación de metronidazol incorporado en membranas de quitosano, medida a través de la técnica de volumetría de pulso diferencial y se concluyó que existen diferentes mecanismos de liberación dependiendo del grosor de la película de quitosano (Ortíz, 2012). También se ha evaluado la liberación de difosfato de cloroquina a través de micropartículas de este polímero, en donde se encontró que el grado de entrecruzamiento, la cantidad de fármaco cargado y el medio influye en la velocidad de liberación (Hernández, 2010).

#### 2.1.4 PIRIPROXIFÉN

El piriproxifen (Figura 3) es un derivado de la piridina con actividad insecticida por contacto e ingestión. No tiene actividad anticolinesterasa, pero actúa como un compuesto mimético de la hormona juvenil. Es un compuesto fotoestable, lo que implica que presenta una actividad residual extendida en el medio en el que se encuentra. Cuando una pupa o larva entra en contacto con el piriproxifen se difunde a través de la envoltura de la misma y ocasiona que emerja prematuramente. Esto conlleva a la mortalidad de los adultos que no se alcanzaron a desarrollar completamente. Sin embargo, la fecundidad de las hembras que sobreviven no se ve afectada (Maddison, 2008).



**Figura 3.** Estructura química del piriproxifén.

Estudios anteriores realizados en Israel, Estados Unidos y España revelaron que solamente la mosca blanca presenta resistencia al piriproxifén. Sin embargo, el mecanismo es desconocido (Schirmer, 2012). Los nuevos larvicidas emergentes como el piriproxifen, son moléculas adecuadas para el control del mosquito debido a que presentan bajos niveles de toxicidad a vertebrados y el vector es sensible a bajas concentraciones del agente químico ( $DL_{99}=0,05\text{ppm}$ ). Además, estudios revelan que el mosquito *Aedes aegyti* ha desarrollado resistencia a otros tipos de insecticidas comerciales comunes como los organofosforados. Sin embargo, los métodos actuales de aplicación de dichos larvicidas son una desventaja potencial debido a que la fumigación representa un gasto enorme en producto y riesgo para los operarios que diseminan estos químicos (Fontoura, 2012).

En una investigación por parte del CIDEIM en Colombia, se evaluó la acción del piriproxifen en los sumideros de un área urbana de Guadalajara en Buga, Valle del Cauca. Tras la aplicación mensual del larvicida se observó que la captura de

larvas decreció notablemente. Al finalizar el estudio, la incidencia de dengue bajó en la población estudiada (Ocampo, 2013). Recientes investigaciones relacionadas a la liberación controlada de piriproxifén mediante hidrogeles de quitosano muestran que el sistema hidrogel más eficiente para el control de *Aedes aegypti* es el que contiene una concentración de 3X de larvicida, independientemente del entrecruzamiento, con un pico de 0% de emergencia. Dado que, en este estudio se evaluaron concentraciones de 1X y 2X de biocida, las cuales no presentaron diferencias entre ellas. Sin embargo, al compararse con la concentración de 3X presentaron un porcentaje de emergencia mayor. Adicionalmente, se determinó que así el grado de entrecruzamiento sea del 25% o 75%, la eficiencia de la matriz va a ser la misma, debido a que no emergieron adultos en ambos casos (Peña, 2016).

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1 Objetivo general**

Determinar el efecto del larvicida piriproxifén incorporado en matrices poliméricas de quitosano sobre la inhibición del desarrollo de larvas y pupas del mosquito *Aedes aegypti* a través del tiempo.

### **2.2.2 Objetivos específicos**

- Sintetizar hidrogeles de quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento y concentraciones de larvicida.
- Determinar bajo condiciones controladas de laboratorio y de semicampo la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* al usar matrices cargadas de larvicida.
- Determinar el grado de entrecruzamiento y la concentración de larvicida en la que se evidencia mayor mortalidad mediante análisis estadísticos.
- Proponer un método para el escalonamiento del producto con la finalidad de que sea eficaz y viable en los ensayos de campo a través del tiempo.



## 2.3 METODOLOGÍA

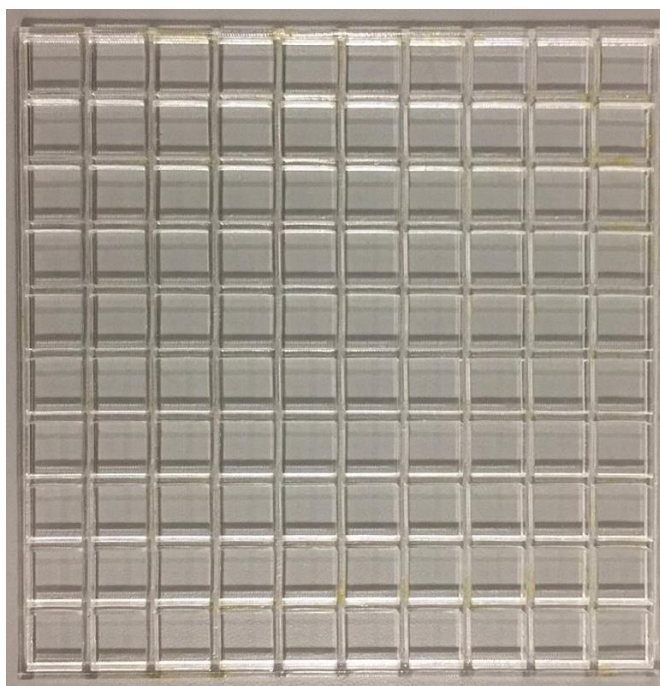
### 2.3.1 Recursos requeridos

Se usaron los siguientes recursos:

- Larvas de *Aedes aegypti* de cepa Rockefeller suministrados por el CIDEIM.
- Reactivos: quitosano de bajo peso molecular marca Sigma-Aldrich (peso molecular de 50,000-190,000 Da), ácido acético glacial marca Sucromiles S.A. (pureza de 99,5% m/m), glutaraldehído al 25% marca Protectol y piriproxifen en emulsión O/W 100g/L marca Sumitomo Chemical Co.
- Materiales y equipos: vidrios silanizados, balanza analítica, Horno Binder, Micropipetas, magneto, espátula, cabina de extracción, plancha de calentamiento, ultrasonido.
- Cuartos que permitieron mantener un ambiente con condiciones controladas (temperatura y humedad) en las instalaciones del CIDEIM.

### 2.3.2 Obtención de hidrogeles de quitosano cargados de piriproxifen

Para realizar la obtención del hidrogel fue necesario preparar una solución de ácido acético al 2%, ésta se mezcló con la emulsión de larvicida, utilizando el magneto, en cantidades adecuadas para lograr tres concentraciones diferentes: 1X, 5X, y 10X ( $X = DL_{99} = 0,05\text{ppm}$ ) (Salazar, 2012). A partir de esta mezcla, se preparó la solución de quitosano al 3%. Posteriormente, se agregó el volumen necesario de solución de glutaraldehído al 0,4% para obtener grados de entrecruzamiento de 25% y 75% (anexo 1).

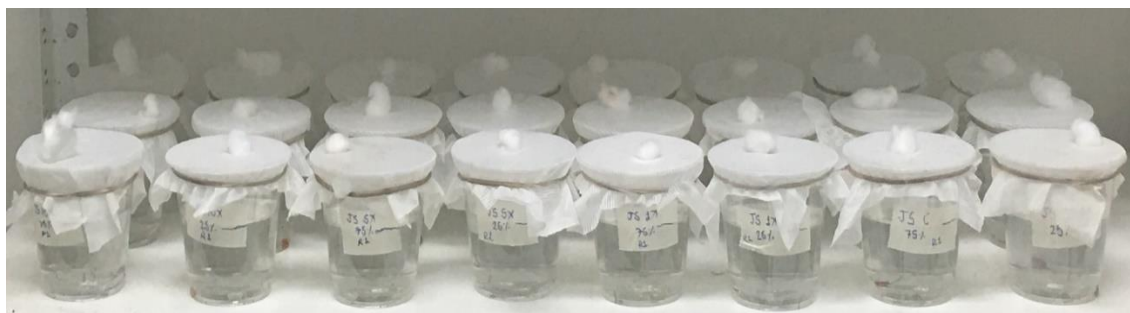


**Figura 4.** Molde de acrílico utilizado para la fabricación de los hidrogeles.

Se desgasificó la mezcla por medio del equipo de ultrasonido o se retiraron las burbujas de la superficie con una espátula y después se ubicó el producto en un molde (figura 4) por 3 días en el horno a 28°C. A los 2 días de haber puesto a secar los hidrogeles, se eliminaron las uniones existentes entre los cuadros del molde, con el objetivo de facilitar la extracción de los hidrogeles y conseguir un mejor secado. Al transcurrir el tiempo estipulado, se retiró el gel del molde obteniendo pequeños prismas de 1cm<sup>2</sup>. A continuación, las piezas obtenidas se llevaron al horno a 32°C por 1 día. Finalmente, los hidrogeles perdieron el agua residual que contenían y fueron almacenarlos hasta su uso.

### 2.3.3 Estudios en condiciones controladas de laboratorio

Este estudio se llevó a cabo en un total de 24 vasos desechables con 100mL de agua de clorada por bioensayo (Figura 5). En la mitad se trabajó con hidrogeles con grado de entrecruzamiento de 25% y la otra mitad con 75%. Para cada entrecruzamiento se realizaron cuatro ensayos biológicos con cada concentración de piriproxifén (1X, 5X y 10X); estos estudios se ejecutaron por triplicado. Además, se estudió el comportamiento de tres vasos control (con pastilla, pero sin larvicida) para cada porcentaje de entrecruzamiento. En cada vaso se colocaron diez larvas y se cubrió con una malla asegurada con un caucho. Se adicionó hígado de res en solución (0,02g/mL) como alimento para las larvas cada dos días.



**Figura 5.** Bioensayo en condiciones controladas de laboratorio.

La prueba examinó el crecimiento y la mortalidad de las larvas y pupas cada 15 días, periodo en el que se realizó un recambio de agua y de larvas para evaluar la actividad residual del larvicida, revisando y tomando las respectivas notas cada 2 días (anexo 2). Si al hacer este registro el volumen del vaso fue menor de 100mL, éste se completó con agua de clorada. Además, si después de los 15 días no murió la totalidad de las larvas, se dejó el recipiente sin hidrogel para observar si el contenido de insecticida residual lograba erradicarlas. Este estudio duró 2 meses. Las muestras se mantuvieron bajo un período de luz de 12 horas seguido de uno de oscuridad de la misma duración a 25-28°C (Ladino, 2016).

### 2.3.4 Estudios en condiciones de semicampo

Se utilizaron 10 baldes de 12L de capacidad, limpios y sin residuos de cualquier clase de producto de limpieza (Figura 6). De los cuales cuatro fueron para el entrecruzamiento de 25%, cuatro para el de 75% y los dos restantes fueron

controles positivos con sólo larvicida a una concentración de 5X y 10X. En cada grupo de porcentaje de entrecruzamiento había tres replicas que contenían 100 hidrogeles de quitosano cargados de piriproxifén y un control negativo (tabla 5).



**Figura 6.** Bioensayo en condiciones de semicampo.

En cada balde se depositó 10L de agua de acequia y se hicieron dos agujeros para que el volumen no sobrepasara el estipulado. Se esperaron 15 días después de haber montado del experimento para tomar las muestras y luego se recolectaron las larvas y las pupas semanalmente. Si el recipiente presentaba larvas de mosquito era necesario llevarlas al laboratorio. Este procedimiento se hizo semanalmente, llevando un registro cada 2 días (anexo 3).

En dos ocasiones, se tomaron 100mL de agua de los baldes y se le agregaron 20 larvas de la cepa Rockefeller, proporcionadas por el CIDEIM, para evaluar su emergencia. Todos los vasos se taparon con una malla para evitar que los adultos escaparan. Esta actividad tuvo una duración total de alrededor de 2 meses.

El tamaño de los hidrogeles fue el mismo tanto para las pruebas de laboratorio como para las de semicampo, con la diferencia de que en las primeras se usó una sola pastilla por 100mL de agua en cada vaso. En contraste, dado que cada balde del estudio de semicampo contenía 10L de agua (100 veces más que el volumen de los vasos), se usaron 100 pastillas dispuestas en una malla para su fácil movilización durante el experimento.

### **2.3.5 Análisis estadístico**

Se organizaron los datos obtenidos en los ensayos de laboratorio y se realizó un análisis estadístico comparativo (ANOVA y homocedasticidad) para determinar cuál concentración y grado de entrecruzamiento presentó diferencias significativas durante el estudio.

### 2.3.6 Matriz de marco lógico

**Tabla 2.** Matriz de marco lógico para la ejecución del proyecto.

<b>OBJETIVO GENERAL</b>			
Determinar el efecto del larvicida piriproxifén incorporado en matrices poliméricas de quitosano sobre la inhibición del desarrollo de larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i> a través del tiempo.			
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b>	<b>ACTIVIDADES</b>	<b>SUPUESTOS</b>	<b>INDICADOR</b>
Sintetizar hidrogeles de quitosano con diferentes grados de entrecruzamiento y concentraciones de larvicida.	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Preparación de la solución de ácido acético al 2%.</li> <li>▪ Mezclar la emulsión de larvicida con la solución de ácido acético al 2%.</li> <li>▪ Preparar la solución de quitosano al 3% en la solución de ácido acético al 2%.</li> <li>▪ Adicionar de la solución de glutaraldehído al 0,4%.</li> <li>▪ Agregar la mezcla obtenida al molde.</li> <li>▪ Dejar gelificar por 3 días a en el horno a 28°C.</li> <li>▪ A los 2 días de secado eliminar las uniones existentes entre los hidrogeles.</li> <li>▪ Extraer los hidrogeles del molde y secar a en el horno a 32°C por un día.</li> <li>▪ Almacenar los hidrogeles hasta su uso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Disponibilidad de reactivos utilizados en el proceso de fabricación de la matriz.</li> <li>▪ El hidrogel queda completamente homogéneo y el larvicida se distribuye de forma uniforme en la matriz.</li> <li>▪ El vidrio está completamente silanizado.</li> <li>▪ La solución se gelifica luego de ser adicionado al molde.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Obtención de una matriz de hidrogeles de quitosano cargado de larvicida.</li> <li>▪ Homogenización completa de la mezcla y distribución uniforme del larvicida en la matriz.</li> </ul>
Determinar bajo condiciones controladas de laboratorio y de semicampo la mortalidad de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> al usar	<p>Condiciones controladas de laboratorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rotular los vasos de acuerdo a la concentración del larvicida y entrecruzamiento del hidrogel que va a contener y llenarlos con la cantidad de agua específica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Un entrecruzamiento de hidrogel específico presenta mayor eficiencia para ser empleado como un sistema de liberación prolongada a</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ La matriz libera el larvicida al impedir el desarrollo de las larvas a través del tiempo.</li> <li>▪ En los ensayos control, en los que había ausencia de larvicida, hay presencia de</li> </ul>

<p>matrices cargadas de larvicida de liberación controlada.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Adicionar 10 larvas y el respectivo hidrogel a cada vaso.</li> <li>▪ Tapar los vasos con la malla y sujetarla con un caucho.</li> <li>▪ Contar cada dos días las larvas muertas u observar la aparición de las mismas para cada vaso.</li> <li>▪ Alimentar las larvas cada vez que se haga el conteo.</li> <li>▪ Realizar el recambio del medio manteniendo el mismo hidrogel usado cada 15 días.</li> </ul> <p>Condiciones de semicampo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Rotular los baldes de acuerdo a la concentración del larvicida y entrecruzamiento del hidrogel que va a contener y llenarlos con la cantidad de agua específica.</li> <li>▪ Adicionar el respectivo hidrogel a cada balde.</li> <li>▪ En caso de que el recipiente presente larvas de mosquito es necesario llevarla al laboratorio.</li> <li>▪ Si no hay larvas se toman 100mL de agua del balde y se le agrega 10 larvas de la cepa Rockefeller para confirmar que el insecticida está ejerciendo su efecto.</li> </ul>	<p>través del tiempo.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ La concentración de larvicida usada se libera constante y uniformemente por el tiempo de duración estudiado.</li> <li>▪ Los vasos y baldes que contenían el hidrogel sin carga de larvicida no inhiben el desarrollo del mosquito por presentar larvas en ellos.</li> <li>▪ Factores como la limpieza de los baldes y estímulos externos no controlados (lluvia, humedad y temperatura) alteren la mortalidad de las larvas del mosquito en los ensayos de semicampo.</li> </ul>	<p>larvas vivas y/o mosquitos en estadio adulto.</p>
<p>Determinar cuál es el grado de entrecruzamiento y la concentración</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Organizar los datos obtenidos en los ensayos de laboratorio.</li> <li>▪ Realizar un análisis estadístico comparativo (ANOVA y</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Un entrecruzamiento de hidrogel específico presenta mayor eficiencia para</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Las pruebas estadísticas definen la concentración y el grado de entrecruzamiento</li> </ul>

<p>de larvicida en la que se evidencia mayor mortalidad mediante análisis estadísticos.</p>	<p>homocedasticidad) para determinar cuál concentración y qué grado de entrecruzamiento presenta diferencias significativas respecto a los otros implementados en el estudio.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Definir las condiciones de fabricación óptimas a la hora de elaborar los hidrogeles según el análisis de datos obtenido.</li> </ul>	<p>ser empleado como un sistema de liberación prolongada a través del tiempo.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Existe una concentración mínima de insecticida a la que elimine al 100% de las larvas.</li> </ul>	<p>o óptimos para inhibir el desarrollo de larvas de mosquito <i>Aedes aegypti</i> a estadio adulto.</p>
<p>Proponer un método para el escalonamiento del producto con la finalidad de que sea eficaz y viable en los ensayos de campo a través del tiempo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Investigar en artículos científicos sobre la liberación de moléculas a través de matrices poliméricas y las dimensiones que adoptan dichas matrices para tener una liberación óptima.</li> <li>▪ Obtener asesoramiento con personas expertas en el uso de matrices para la liberación controlada de moléculas.</li> <li>▪ Optimizar las dimensiones de la matriz de quitosano con el fin de provechar completamente el material necesario para su fabricación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ La fabricación de la matriz al adoptar una forma cuadrada es más sencilla y se aprovecha todo el material implementado sin crear residuos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Obtención de una malla con 100 pastillas para la liberación controlada de larvicida por cada 10L de agua.</li> </ul>

## **2.4 RESULTADOS**

### **2.4.1 Obtención de hidrogeles de quitosano cargados de piriproxifén**

La dispersión de la emulsión de piriproxifén en la solución de quitosano al 3% inicialmente se realizó agregando el larvicida a la solución, obteniendo completa homogeneidad luego de 24 horas de agitación. Posteriormente, la emulsión se mezcló directamente con la solución de ácido acético al 2%, observando su dispersión instantánea y la posterior solubilización del quitosano sin ninguna alteración.

El proveedor del quitosano empleado en este trabajo fue el mismo que el usado en proyectos anteriores, motivo por el cual se puede asumir que tenían viscosidad semejante. Por este motivo se empleó una solución de glutaraldehído al 2,5% para la fabricación de los hidrogeles (Ladino, 2016). Sin embargo, al implementar esta concentración de agente entrecruzante se observó que la gelificación fue inmediata y no daba tiempo de verter la mezcla final en el molde.

Se tuvieron que realizar diferentes ensayos reduciendo la concentración del agente entrecruzante, hasta llegar a una concentración de glutaraldehído de 0,4% que permitió eliminar las burbujas y verter la mezcla final en el molde sin que la mezcla se gelificara.

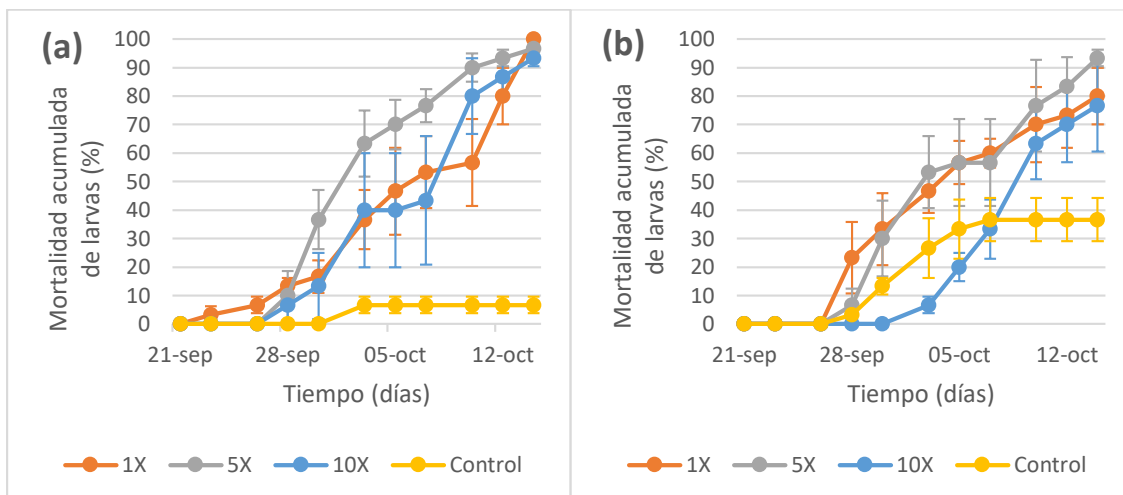
A la hora de secar los hidrogeles, inicialmente se dejaban en un estante del laboratorio, fuera de exposición de la luz. Sin embargo, se obtenía un secado irregular, por lo que se decidió secarlos en el horno a 28°C asegurando una temperatura constante.

Adicionalmente, al llevar a cabo el proceso de secado se creaba una lámina en la parte superior del molde que interconectaba sus espacios y hacía que los hidrogeles se deformaran, se rompieran o dificultaba su extracción del molde. Para solucionar esta situación se optó por eliminar dichas uniones con una espátula, con esta acción se optimizó la fabricación de las matrices de liberación controlada y su rendimiento fue mayor.

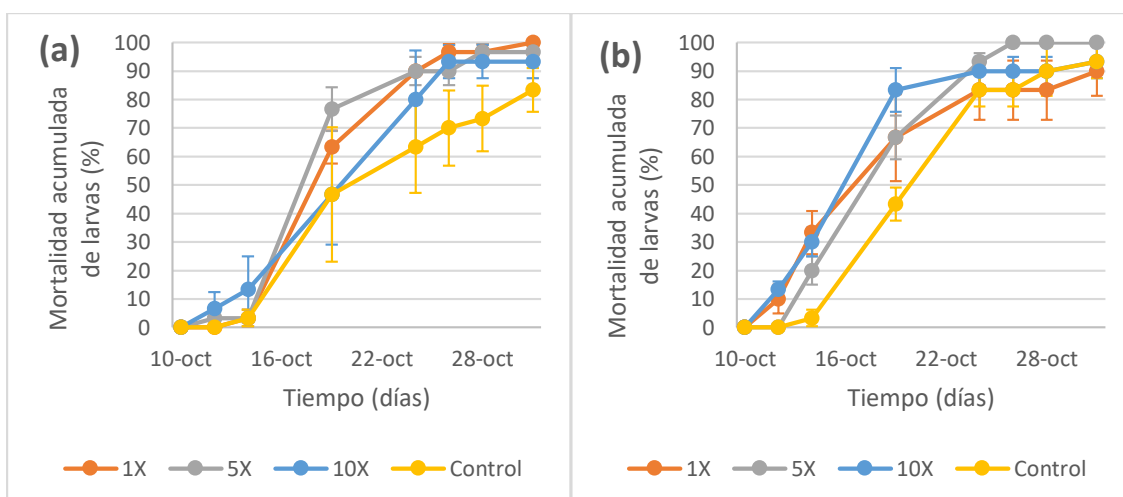
### **2.4.2 Estudios en condiciones controladas de laboratorio**

Al iniciar los bioensayos de laboratorio, se observó que las larvas de los controles (hidrogeles sin larvicida) estaban muriendo. Se cambiaron los vasos desechables que contenían las larvas y se vio que la mortalidad disminuyó significativamente. Aun así, los controles tuvieron tendencia a mostrar mortalidad acumulada significativa (gráfica 6), sin embargo, al finalizar el experimento, se comportaron de forma aceptable y mostraron mortalidad acumulada mínima (gráfica 8).

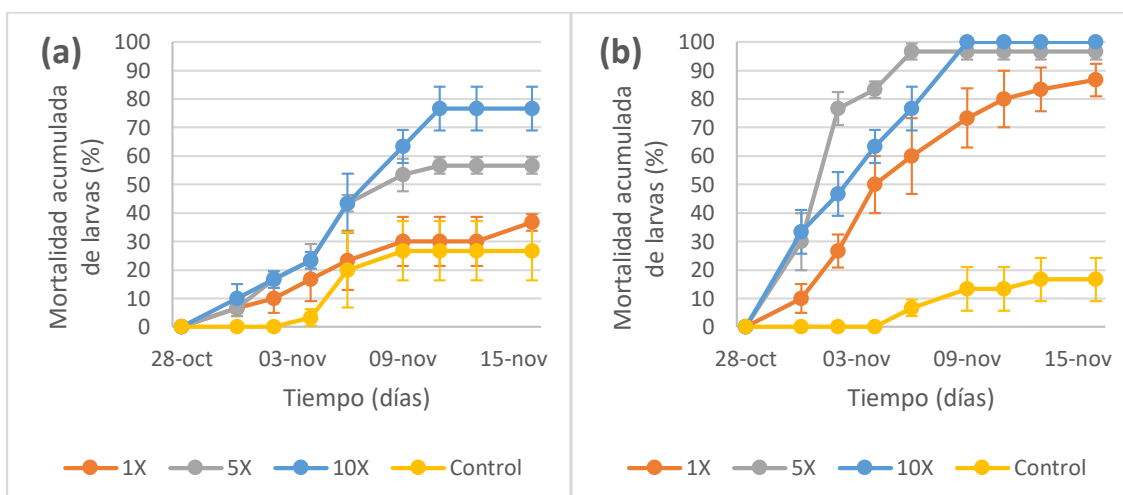
En las gráficas de la 1 a la 4 se observa la mortalidad acumulada de las larvas y en las gráficas de la 5 a la 8 se pueden ver los datos registrados de la mortalidad acumulada de larvas y pupas de los bioensayos.



**Gráfica 1.** Mortalidad acumulada de larvas para hidrogel 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el primer bioensayo.

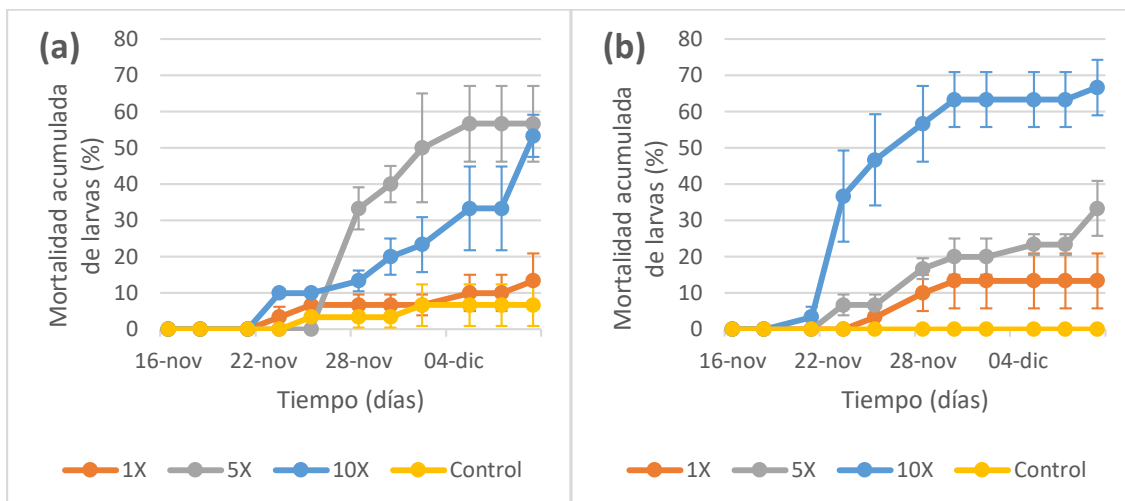


**Gráfica 2.** Mortalidad acumulada de larvas para hidrogel 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el segundo bioensayo.

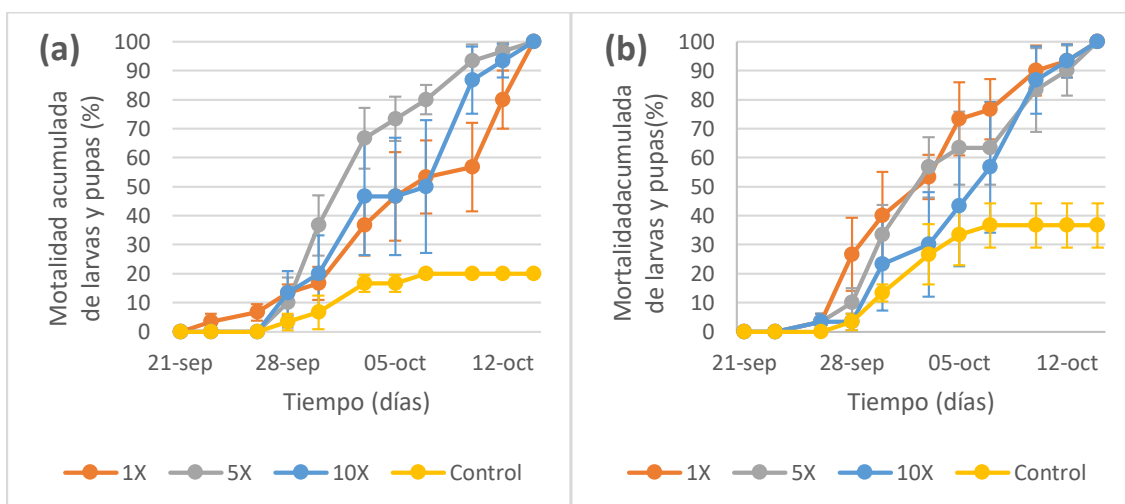


**Gráfica 3.** Mortalidad acumulada de larvas para hidrogel 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el tercer bioensayo.

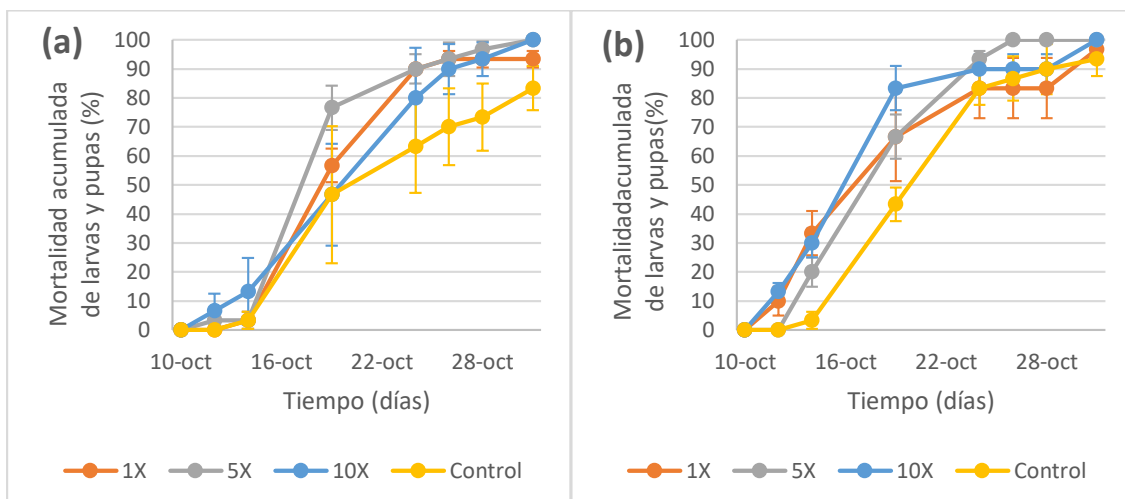




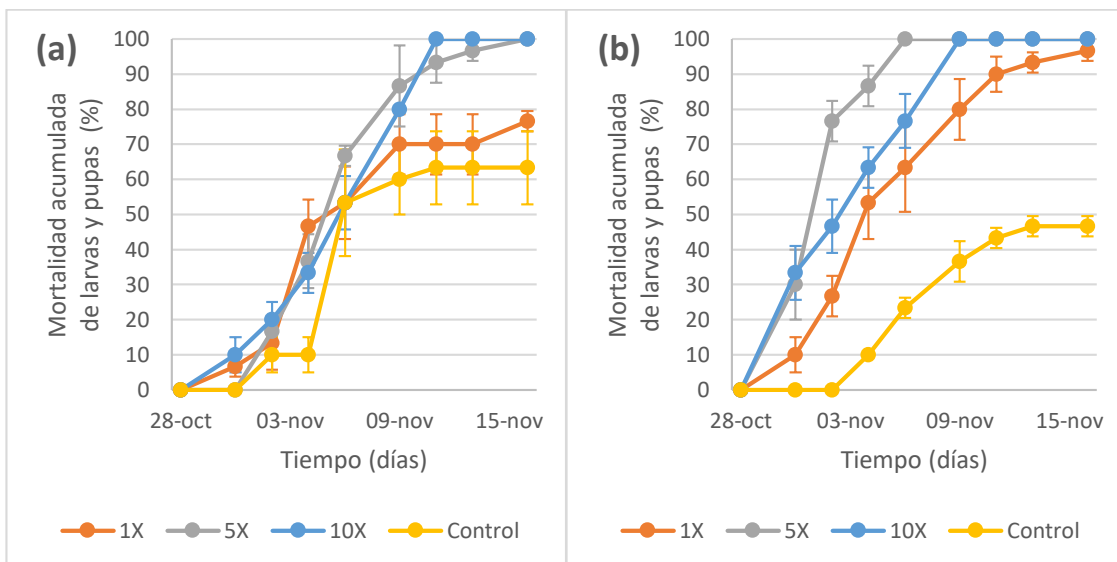
**Gráfica 4.** Mortalidad acumulada de larvas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el cuarto bioensayo.



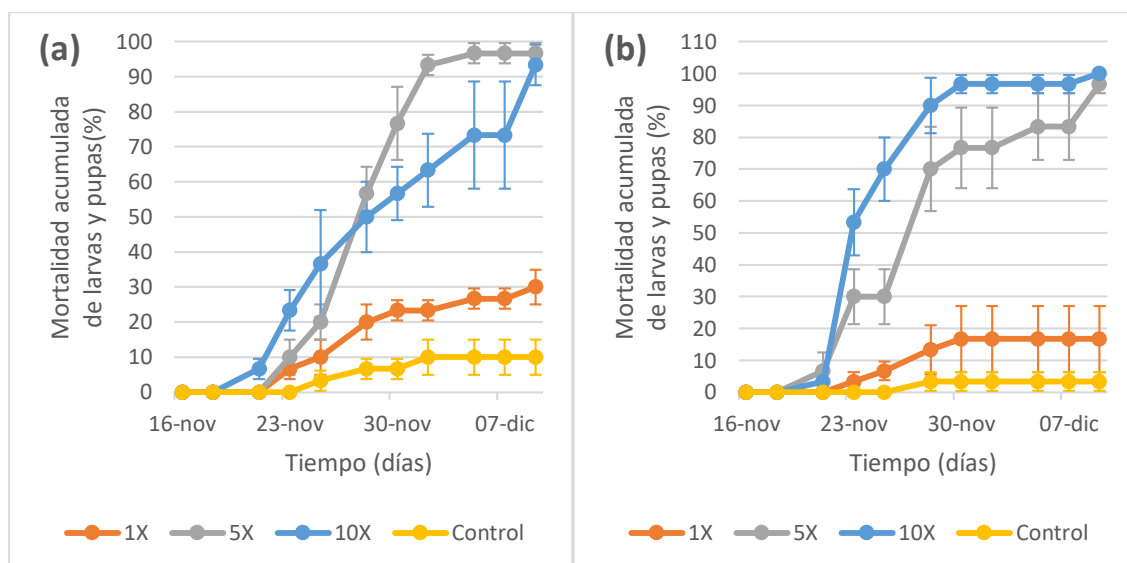
**Gráfica 5.** Mortalidad acumulada de larvas y pupas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el primer bioensayo.



**Gráfica 6.** Mortalidad acumulada de larvas y pupas para hidrogeles 1X, 5X y 10X con (a) 25% y (b) 75% de entrecruzamiento para el segundo bioensayo.



**Gráfica 7.** Mortalidad acumulada de larvas y pupas para hidrogel 1X, 5X y 10X con (a) 25% y de (b) 75% de entrecruzamiento para el tercer bioensayo.



**Gráfica 8.** Mortalidad acumulada de larvas y pupas para hidrogel 1X, 5X y 10X con (a) 25% y de (b) 75% de entrecruzamiento para el cuarto bioensayo.

### 2.4.3 Análisis estadístico

En la tabla 3 se observa el resumen de los datos de mortalidad a los 16 días de los cuatro bioensayos usados en el análisis estadístico. Inicialmente, se evaluó la interacción entre las concentraciones de piriproxifén y los porcentajes de entrecruzamiento, obteniendo que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de concentración (1X vs 5X y 1X vs 10X) y los porcentajes de entrecruzamiento (anexo 4a). Por esta razón, se redujo el modelo sin medir el efecto de estos factores. El modelo de regresión lineal final reducido se muestra en la ecuación 1, el cual se obtuvo de eliminar las variables que no presentaron diferencias estadísticas significativas mencionadas anteriormente (anexo 4b).

**Tabla 3.** Resumen de los datos usados en el análisis estadístico.

Experimento	Variable	25%			75%		
		1X	5X	10X	1X	5X	10X
Bioensayo 1	$\bar{x}$	40,5	60,5	38,0	70,0	52,5	52,5
	Sd	32,9	39,8	44,5	21,6	29,9	37,7
	Cv	81,2	65,8	117,1	30,9	57,0	71,8
Bioensayo 2	$\bar{x}$	95,0	87,5	85,0	87,5	100,0	85,0
	Sd	5,8	18,9	19,1	18,9	0,0	12,9
	Cv	6,1	21,6	22,5	21,6	0,0	15,2
Bioensayo 3	$\bar{x}$	67,5	92,5	95,0	85,0	85,0	87,5
	Sd	18,9	15,0	10,0	23,8	30,0	25,0
	Cv	28,0	16,2	10,5	28,0	35,3	28,6
Bioensayo 4	$\bar{x}$	25,0	75,0	55,0	15,0	62,5	72,5
	Sd	5,8	43,6	44,3	17,3	45,0	48,6
	Cv	23,1	58,1	80,5	115,3	72,0	67,0

$\bar{x}$ : promedio; Sd: desviación estándar; Cv: coeficiente de variación

$$y_{ijkl} = \beta_0 + \alpha_i X_1 + \lambda_j X_2 + \lambda_k X_3 + \tau_l X_4 + e_{ijkl}; \quad i,l=1, 2, 3, 4, j,k=1,2 \quad (1)$$

Donde:

- $\lambda_j$  es el efecto debido a la interacción del experimento 4 y la concentración 5X
- $\lambda_k$  es el efecto debido a la interacción del experimento 4 y la concentración 10X
- $\tau_l$  es el efecto de la réplica
- $\alpha_i$  es el efecto del experimento
- $\beta_0$  es el intersepto
- $e_{ijkl}$  es el error
- $y_{ijkl}$  es el porcentaje de mortalidad

Los resultados del ANOVA se observan en la tabla 4 y las hipótesis planteadas fueron:

H<sub>0</sub>: no existen diferencias entre los porcentajes de mortalidad de los mosquitos.

H<sub>A</sub>: existen diferencias entre los porcentajes de mortalidad de los mosquitos.

Se tomó el valor P como referencia con un alfa de 0,05; donde si el valor P fue mayor o igual al alfa ( $P \geq \alpha$ ) se afirmaba la hipótesis nula. Todas las variables de la tabla 4 presentan un valor P menor a 0,05; lo que significa que afectan la variable respuesta (porcentaje de mortalidad) y son estadísticamente significativas, por lo que son las únicas incluidas en el modelo de la ecuación 1.

**Tabla 4.** Análisis de varianza de los datos de porcentaje de mortalidad.

Number of obs = 96    R-squared = 0,6364  
 Root MSE = 21.4358    Adj R-squared = 0.6030

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	Valor F	Valor P
Modelo	69983,9167		8747,98958	19,04	0,0000
Experimento	42786,3833	3	14262,1278	31,04	0,0000
exp4conc2	9506,25	1	9506,25	20,69	0,0000
exp4conc3	7656,25	1	7656,25	16,66	0,0001
réplica	26876,125	3	8958,70833	19,5	0,0000
Residual	39976,0417	87	459,494732		
Total	109959,958	95	1157,47325		

Finalmente, se realizaron las pruebas de White y de Breusch-Pagan, las cuales tenían las siguientes hipótesis:

H<sub>0</sub>: los datos presentan homocedasticidad, varianza constante.

H<sub>A</sub>: los datos presentan heterocedasticidad, varianza no constante.

Dado que el valor P fue menor a 0,05; se rechaza la hipótesis nula y se dice que hay heterocedasticidad (anexo 4c), es decir que los datos no cumplen con la homogeneidad de varianzas, por lo que deberían ser analizados por pruebas no paramétricas.

#### 2.4.4 Estudios en condiciones de semicampo

Este experimento comenzó el 3 de octubre de 2016. En la tabla 5 se muestra a qué composición corresponde cada balde, con el objetivo de usar la convención en el resto del documento.

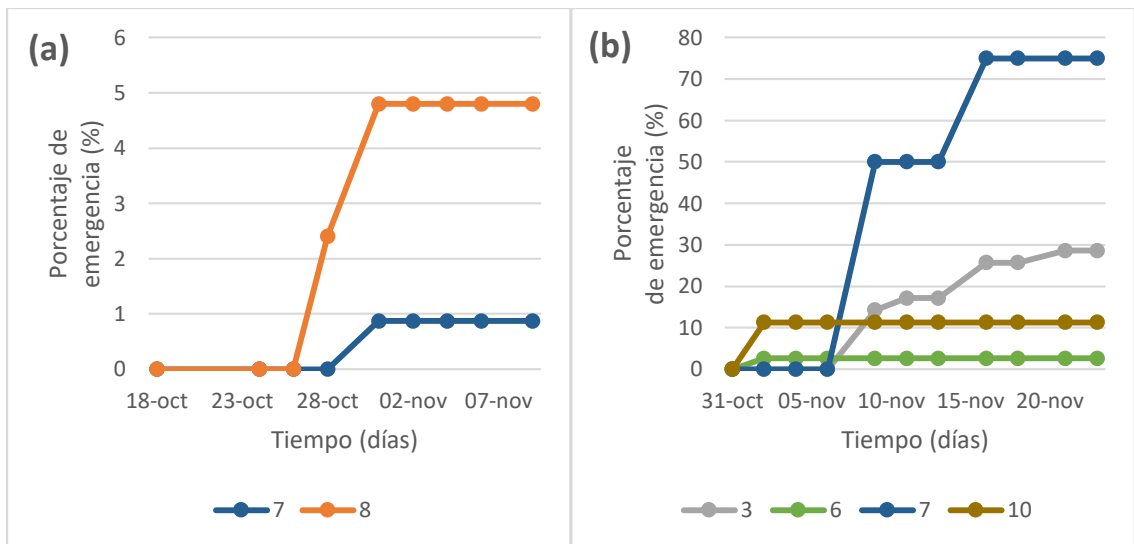
**Tabla 5.** Convenciones para el contenido de los baldes en los bioensayos de semicampo.

No de Balde	1	2	3	4*	5'	6	7	8	9*	10'
Tratamiento	1X	5X	10X	C(+)	C(-)	1X	5X	10X	C(+)	C(-)
Entrecruzamiento	25%		-	25%	75%			-	75%	
Concentración	-			5X	-	-		10X	-	

\*C(+): con larvicida, sin hidrogel; 'C(-): hidrogel sin larvicida

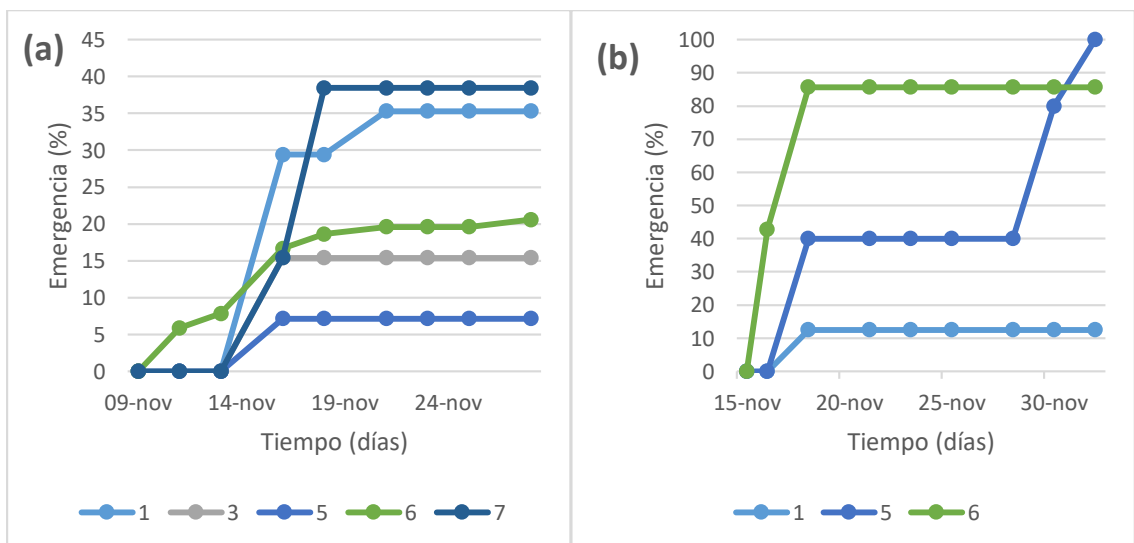
El gráfico 9(a) muestra el porcentaje de emergencia de adultos obtenidos el 18 de octubre de 2016, encontrando un total de 7 adultos *Culex sp.* En las muestras obtenidas el 24 de octubre de 2016 sólo emergió un adulto *Culex sp.* en el balde 2, con un porcentaje de emergencia de 1,6%. Adicionalmente, en el gráfico 9(b) se ven los resultados de las muestras colectadas el 31 de octubre de 2016.

Emergieron un total de 20 adultos de los cuales 70% fueron *Culex sp.* y 30% *Aedes aegypti*.



**Gráfica 9.** Emergencia de mosquitos de las muestras obtenidas (a) el 18 y (b) 31 de octubre de 2016 en los baldes de los bioensayos de semicampo.

En el gráfico 10(a) se pueden ver los datos obtenidos de las muestras del 9 de noviembre de 2016. Emergieron un total de 35 adultos, de los cuales fueron 88,6% *Aedes aegypti*, 5,7% *Culex sp.* y 5,7% *Aedes albopictus*. En el gráfico 10(b) se pueden ver los resultados conseguidos de las muestras del 15 de noviembre de 2016. Emergieron un total de 12 adultos, de los cuales fueron 83,3% *Aedes aegypti* y 16,7% *Culex sp.*



**Gráfica 10.** Emergencia de mosquitos de las muestras obtenidas (a) el 9 y (b) el 15 de noviembre de 2016 en los baldes de los bioensayos de semicampo.

En las tablas 6 y 7 se puede observar un resumen de todos los datos obtenidos en los bioensayos de semicampo.

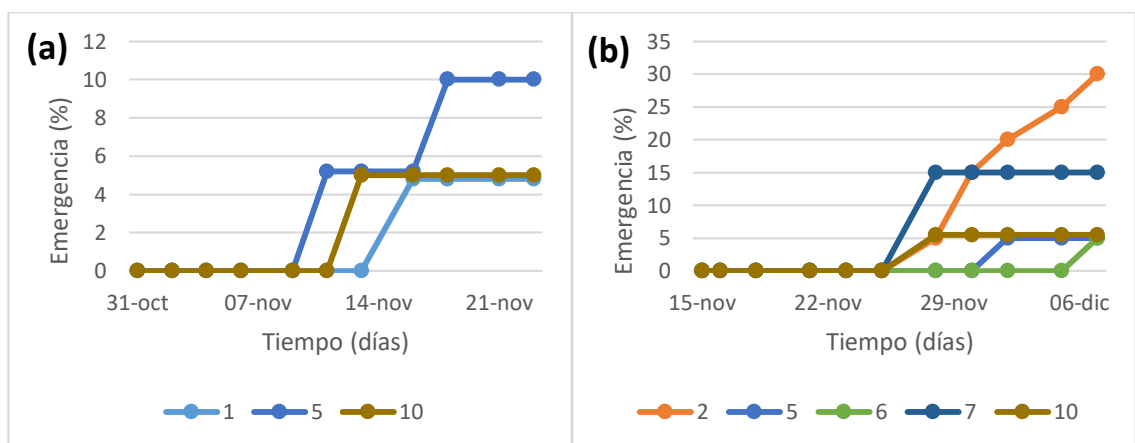
**Tabla 6.** Resumen de los tamaños muestra (n) y porcentajes de emergencia (E) obtenidos en los bioensayos de semicampo.

Balde	18/10		24/10		31/10		9/11		15/11	
	n	E (%)	n	E (%)	n	E (%)	n	E (%)	n	E (%)
1	42	-	116	-	83	-	17	35,3	8	12,5
2	5	-	63	1,6	3	-	1	-	12	-
3	27	-	60	-	35	28,6	26	15,4	4	-
4	0	-	0	-	0	-	10	-	2	-
5	80	-	73	-	15	-	14	7,1	5	100,0
6	76	-	7	-	38	2,6	102	20,6	7	85,7
7	115	0,9	16	-	4	75,0	13	38,5	4	-
8	125	4,8	9	-	3	-	1	-	2	-
9	0	-	0	-	0	-	11	-	0	-
10	47	-	11	-	53	11,3	22	-	1	-

**Tabla 7.** Resumen de los resultados de porcentaje de emergencia para los mosquitos encontrados en los bioensayos de semicampo.

Fecha de recolección de muestras	Cantidad de adultos que emergieron	Porcentaje de emergencia (%)		
		<i>Culex sp.</i>	<i>Aedes</i>	
			<i>aegypti</i>	<i>albopictus</i>
18 de octubre	7	100	0	0
24 de octubre	1	100	0	0
31 de octubre	20	70	30	0
9 de noviembre	35	5,7	88,6	5,7
15 de noviembre	9	16,7	83,3	0

En dos ocasiones, con el objetivo de monitorear la emergencia de los mosquitos, se recolectó agua de los baldes y se agregaron 20 larvas de la cepa Rockefeller, los porcentajes de emergencia obtenidos se muestran en la gráfica 11.



**Gráfica 11.** Emergencia de mosquitos cepa Rockefeller de las muestras de agua obtenidas (a) el 31 de octubre y (b) el 15 de noviembre de 2016 en los baldes de los bioensayos de semicampo.

## 2.5 DISCUSIÓN

### 2.5.1 Obtención de hidrogeles de quitosano cargados de piriproxifén

En el proceso de fabricación de los hidrogeles se observó una dispersión lenta cuando se agregaba la emulsión de piriproxifén en la solución de quitosano al 3%. Esto se explica debido a que la solución tiene una viscosidad alta, por lo que el dinamismo del sistema es menor, implicando que se dificulte la difusión de la emulsión. Además, la agitación suministrada por el magneto está restringida por la alta viscosidad, en consecuencia, la zona cercana a la superficie de la solución presenta turbulencia mínima.

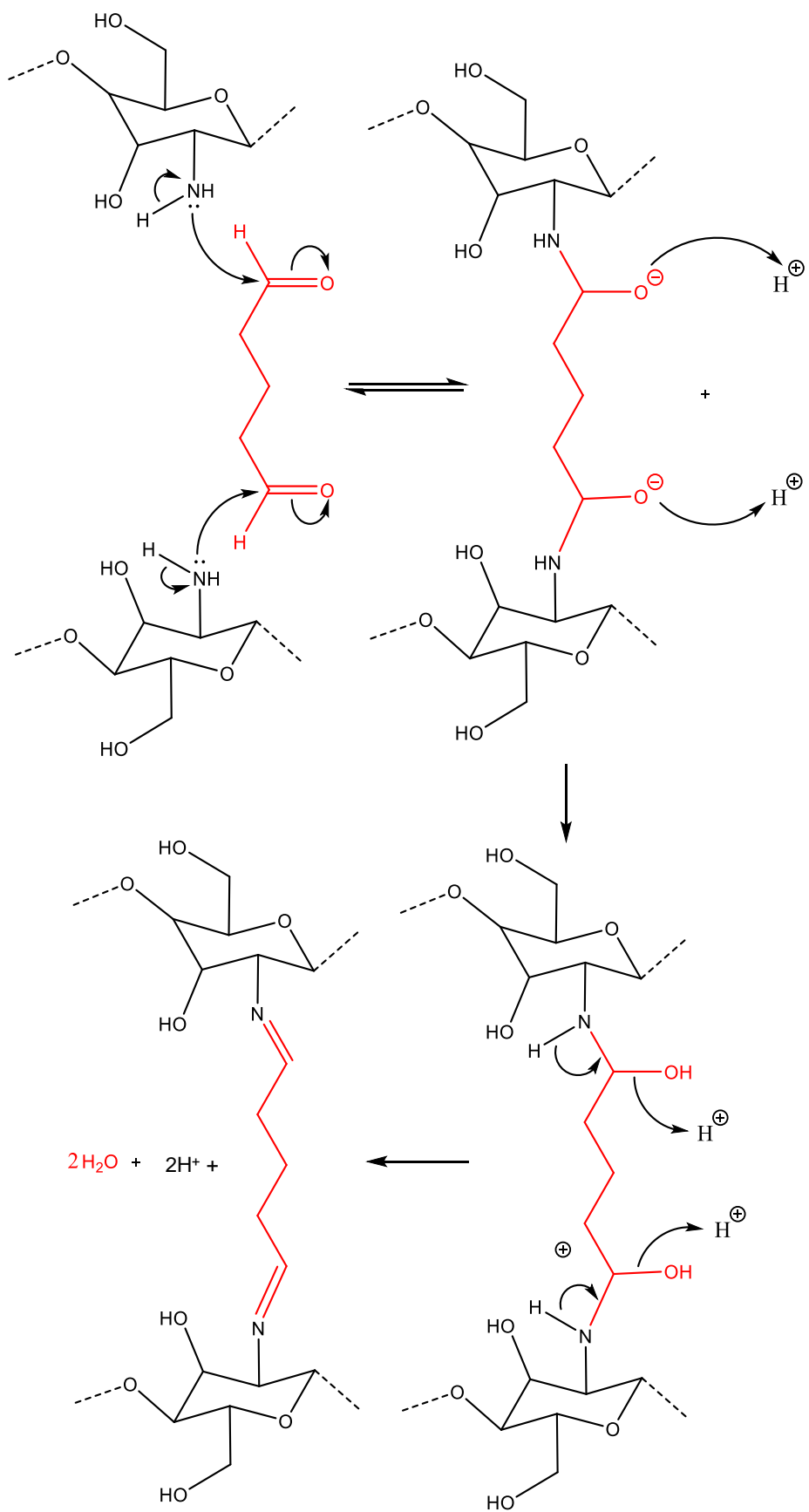
Al mezclar la emulsión de piriproxifen con la solución de ácido acético al 2% la dispersión fue instantánea, ya que la emulsión es O/W lo que significa que en soluciones acuosas la homogenización será más fácil. Además, el ácido acético al 2% presenta baja viscosidad por lo que la difusión del larvicida no se ve restringida por el medio de disolución, ni por la agitación mecánica.

El piriproxifén es una molécula que posee un anillo de piridina y tres grupos éter (figura 3). Los éteres son grupos estables y la hidrólisis no se produce a temperaturas altas sin catalizador, ni en medios básicos. Sin embargo, los ácidos fuertes, incluso a bajas temperaturas, pueden hidrolizar éteres (Klages, 2005). Ésta es una reacción lenta que no está involucrada al mezclar el ácido acético al 2% con la emulsión de larvicidas, debido a que se usa un ácido débil y no hay calentamiento. Por lo tanto, se asegura que la molécula de biocida no va a presentar ninguna reacción de degradación en el proceso de fabricación de los hidrogeles.

La solución de glutaraldehído al 2,5% generaba una gelificación inmediata de la mezcla de reacción. Para solucionar este problema se disminuyó la concentración del agente entrecruzante hasta 0,4%, de modo que daba tiempo suficiente para verter la mezcla final a los moldes, sin que se formara el gel. Esto se explica porque el glutaraldehído se encuentra más diluido, por lo que tarda más tiempo en encontrarse con los grupos amino del quitosano con los que va a reaccionar para formar el polímero reticulado, es decir, retardando la gelificación.

El quitosano está constituido por monómeros de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, unidades deacetiladas y acetiladas respectivamente. Las primeras son las que participan en la reacción de entrecruzamiento (figura 7) mediante la reacción con glutaraldehído. El grupo amino del quitosano ataca nucleofílicamente el carbono del grupo carbonilo del aldehído y, posteriormente, se forma una unión química tipo base de Schiff o imina (C=N) (Díaz, 2013).

Dado que el quitosano es el mismo que el usado en proyectos similares anteriores, la variación en el tiempo de gelificación se le atribuye al glutaraldehído de la nueva marca.





**Figura 7.** Mecanismo de entrecruzamiento del quitosano con glutaraldehído.

### **2.5.2 Estudios en condiciones controladas de laboratorio**

Al realizar el montaje se observó que en los vasos de los controles (hidrogel sin larvicida) las larvas estaban muriendo. Primero se pensó que había ocurrido contaminación cruzada, dado que existía la probabilidad de que hayan quedado trazas de piriproxifén en los moldes al momento de fabricar dichos controles.

Los hidrogeles de los controles se lavaron con agua de clorada y se depositaron en vasos desechables nuevos de otra marca con 100mL de agua. Adicionalmente, se montó un vaso sin pastilla ni larvicida para determinar si los vasos podrían estar influyendo en los resultados. La cantidad de larvas muertas disminuyó considerablemente, lo que llevó a concluir que los vasos que se usaron al principio tenían un tratamiento previo con una solución fungicida, la cual afectaba a las larvas dado que son organismos muy sensibles a las sustancias desinfectantes.

Por otra parte, en las gráficas 6 y 7 se puede ver que el control supera el 40% de mortalidad acumulada. Hay que destacar que en este proyecto se trabajó con una marca de glutaraldehído distinta a la de investigaciones anteriores y ésta fue la única variante en los reactivos utilizados para la fabricación de los hidrogeles. El fabricante del glutaraldehído usado, de marca Protectol GA 50, reporta en el certificado de análisis que puede contener hasta 0,1% de metanol; a diferencia del mismo reactivo de marca J.T. Baker Chemicals que no muestra ninguna impureza en su ficha de seguridad (Avantor, 2014). El alcohol metílico es altamente tóxico y, a pesar de estar en una cantidad reducida, puede ser una de las posibles causas de la muerte de las larvas en los bioensayos debido a su alta sensibilidad a sustancias químicas.

Otra posible explicación a esta situación es que posiblemente hubo contaminación cruzada de larvicida en los controles en los moldes utilizados para hacer las matrices poliméricas, los cuales eran difíciles de limpiar ya que tenían muchas esquinas internas donde se acumulaba fácilmente producto del lote anterior. Finalmente, pudo ser que la cantidad de solución de hígado de res suministrada como alimento en cada lectura de los bioensayos haya afectado la sobrevivencia. Inicialmente se suministraba una gota, esta cantidad podría ser insuficiente para todas las larvas y estas recurran al canibalismo para sobrevivir. Por lo que luego del segundo bioensayo se empezó a añadir de a dos gotas, que puede representar una suma excesiva, ya que comienzan a formarse hongos dentro del vaso, los cuales pueden obstruir las tráqueas de los estadios inmaduros del insecto, impidiendo su intercambio gaseoso con el medio. Sin embargo, en el cuarto bioensayo la mortalidad acumulada de los controles es mínima, por lo que da el indicio de que lo que estaba matando las larvas se había agotado.

### **2.5.3 Análisis estadístico**

Se evaluaron los porcentajes de mortalidad a los 16 días, dado que se tomó la

duración del bioensayo más corto, en este caso el tercero. En el ANOVA de la tabla 4 y en el anexo 4b se resaltan diferencias estadísticas significativas entre los 4 bioensayos, esto se puede explicar pues el primero tardó más tiempo debido a que los hidrogeles debieron hincharse primero para luego liberar el piriproxifén. Dado que ya había ocurrido este fenómeno, los ensayos intermedios fueron más cortos. Sin embargo, el último bioensayo se demoró más en matar las larvas, ya que la concentración de larvicida en la matriz polimérica se redujo con el tiempo y con el número de ensayos. En las réplicas de estas pruebas también hubo diferencias estadísticamente significativas puesto que los datos de mortalidad de los mosquitos no fueron uniformes, esto puede deberse a que se trabajó con organismos vivos que pueden reaccionar de forma diferente a estímulos semejantes.

En la tabla 3 se evidencia la gran variación entre las réplicas del experimento, esto se puede corroborar con los resultados de las pruebas de White y Breusch-Pagan, donde se concluyó que los datos presentan heterocedasticidad, es decir, la varianza de los datos no es homogénea. Además, los coeficientes de variación mostrados en dicha tabla son mayores a 10%, esto indica gran dispersión entre los valores y baja representatividad de la media. Debido a todos estos inconvenientes, se recomienda transformar los datos o probar otros tipos de modelos para la variable respuesta conteo de mosquitos muertos en los que se evalúe cada réplica por separado (Calaza, 2007). En este proyecto sólo se propuso el modelo de regresión lineal múltiple descrito en la ecuación 1, con él se obtuvieron resultados coherentes con la teoría, ya que los factores que afectaron la variable respuesta mostraron relación con los resultados y se lograron reconocer las diferencias claves que ocurrieron en las etapas de los experimentos de laboratorio.

Se encontró que el porcentaje de mortalidad reportado para las concentraciones de piriproxifén de 5X y 10X en el cuarto bioensayo, presentó diferencias estadísticas frente a los de la concentración 1X del primer bioensayo. En la gráfica 5 se puede ver que para ambos grados de entrecruzamiento la concentración 1X mató el 100% de las larvas y pupas al inicio del experimento. En la gráfica 6, ésta misma concentración erradicó a menos del 96,6% de los individuos. En la gráfica 7a, la mortalidad disminuyó a 76,6% y en la gráfica 8 el larvicida eliminó menos del 30% de los individuos. En otras palabras, el efecto del biocida incorporado al hidrogel fue disminuyendo gradualmente porque se estaba llegando a la liberación total del insecticida. No obstante, las concentraciones de 5X y 10X alcanzaron a erradicar el 100% de los estadios inmaduros del mosquito antes de que emergieran en los cuatro bioensayos de laboratorio. Lo anterior prueba que, luego de dos meses, la concentración 1X era insuficiente para inhibir el crecimiento del mosquito y que las concentraciones de 5X y 10X necesitan ser monitoreadas por más tiempo para definir la vida útil de dichos hidrogeles.

Según el análisis estadístico (anexo 4a), el porcentaje de entrecruzamiento de los hidrogeles no influyó en la mortalidad de las larvas y pupas del mosquito *Aedes aegypti* debido a que se tomó un tiempo fijo de 16 días para examinar los datos. Un polímero entrecruzado se origina cuando reaccionan cadenas vecinas

de igual o diferente naturaleza y se obtiene una red tridimensional. Las propiedades del material cambian dependiendo de las ramificaciones y su longitud. Estas variaciones se reflejan en la densidad, cristalización, reología, elasticidad, flexibilidad y resistencia del polímero (Nicholson, 2006). En el caso de este proyecto, el grado de entrecruzamiento del quitosano puede modificar de forma directamente proporcional la compactibilidad de la matriz e inversamente proporcional la tasa de liberación del piriproxifen que contiene. El hidrogel asemeja una jaula que entre más conexiones entre las cadenas tenga, más difícil le será intercambiar el insecticida por moléculas de agua del medio. Esto significa que teóricamente una pastilla con un grado de entrecruzamiento menor, tendrá vida útil más corta y tardará menos tiempo en liberar el biocida (Harris, 2010). Se recomienda continuar los bioensayos, ya que posiblemente se observen diferencias estadísticas significativas entre los niveles de este factor si se llegan a agotar completamente las reservas de larvicida.

#### **2.5.4 Estudios en condiciones de semicampo**

El experimento inició el 3 de octubre de 2016, en la gráfica 9(a) se observan porcentajes de emergencia menores al 5% para los baldes 7 y 8, demostrando que a los 15 días de haber hecho el montaje el proceso de liberación controlada estaba funcionando correctamente. Asimismo, a los 21 días la emergencia era prácticamente nula.

A los 28 días de haber iniciado los bioensayos se observa un porcentaje de emergencia del 75% para el balde 7. Sin embargo, para este caso el tamaño de la muestra extraída de larvas y pupas ( $n$ ) de ese recipiente era de 4 individuos, el cual es muy pequeño para llegar a concluir que en muestras de mayor tamaño vaya a morir la misma proporción de mosquitos. En contraste, el balde 3 obtuvo una emergencia de 28,6% ( $n=35$ ), siendo este un valor alto. Esto indica que la acción del piriproxifén estaba siendo afectada probablemente por las lluvias y el recambio de agua, debido a que en lecturas posteriores los porcentajes de emergencia fueron menores, lo que demostró que la matriz continuó liberando el larvicida de forma constante.

A los 37 días los porcentajes de emergencia estaban entre 5 y 40% siendo el más alto el correspondiente al balde 1, que contenía los hidrogeles con menor cantidad de emulsión de piriproxifén y el entrecruzamiento más bajo. Finalmente, a los 43 días el balde 5 presentó un 100% de emergencia ( $n=4$ ), seguido de un porcentaje de 85,7% ( $n=7$ ) para el balde 6. Estos resultados indican que un mayor porcentaje de entrecruzamiento implica una mayor duración del efecto insecticida en el tiempo, porque el biocida se libera más lentamente a cantidades que logran erradicar larvas y pupas. Además, una mayor cantidad de piriproxifén asegura que haya más reservas cargadas en la pastilla y contribuye al efecto de prolongar la vida útil de la matriz polimérica.

Es importante tener en cuenta que a finales de octubre y durante el mes de noviembre hubo lluvias recurrentes que generaron recambios de agua en los baldes, promoviendo la eliminación del piriproxifén de los mismos y

disminuyendo la mortalidad de los insectos que proliferaban en el balde. Adicionalmente, los controles de hidrogeles sin insecticida no tuvieron porcentajes de emergencia altos, posiblemente por las mismas razones que se plantean en la sección 2.6.2. Cabe tener en cuenta que a las muestras extraídas de los baldes no se les alimentó en el laboratorio porque se consideró que la materia orgánica con la que provenía era suficiente para su sobrevivencia. No se sabe si el hecho de no haber suministrado solución de hígado a las larvas colectadas haya provocado que murieran de hambre, por eso para próximos bioensayos es necesario agregar alimento en los vasos para corroborar si este factor influyó en los porcentajes de emergencia. Adicionalmente, sería propicio montar un tratamiento sin hidrogel ni larvicida, con el propósito de monitorear la emergencia de los mosquitos y descartar factores ambientales que modifiquen el desarrollo de las larvas a mosquitos adultos. Sin embargo, esto no se puede hacer pues se estaría montando un criadero potencial del insecto y promoviendo la proliferación del vector. No obstante, si se recolectan las pupas antes de que hagan metamorfosis (7 días) podría ser viable.

Por otro lado, en los controles positivos no hubo presencia de larvas, a lo largo del experimento se observaron menos de 10 individuos y nunca emergió un adulto en el tiempo estudiado. En cambio, los controles negativos presentaron la mayor cantidad de individuos en las muestras recolectadas. Estos resultados eran esperados pues las dosis en los baldes 4 y 9 eran superiores al  $DL_{99}$  e iban a matar la mayoría de los individuos antes del momento de recolección de la muestra. Sin embargo, no se evidenció que el uso del piriproxifén en los hidrogeles de quitosano fuera más eficaz que el larvicida libre, ya que dichos baldes presentaron una emergencia nula. No obstante, se debería continuar con las mediciones para determinar hasta qué momento perdura el efecto del biocida sin hidrogel y evaluar si el uso de las matrices poliméricas supera ese tiempo de acción.

En la gráfica 11 se muestran los resultados del monitoreo del experimento. Se optó por tomar estas mediciones adicionales para evaluar el comportamiento inesperado de los baldes 5 y 10. Con estos datos, se descartó la posibilidad de que las larvas obtenidas en los bioensayos de semicampo no emergieran debido al cambio de condiciones del entorno, pues la emergencia en el laboratorio de la cepa Rockefeller también fue baja. A los 28 días de iniciar el experimento, gráfica 11(a), sólo emergió el 10% y 5% de las larvas en las muestras de los baldes 5 y 10, respectivamente. Se esperaba que estos porcentajes fueran mayores dado que estos tratamientos no contenían piriproxifén. A los 43 días, gráfica 11 (b), dichos baldes presentaron emergencias del 5% y se registraron datos pequeños de otros recipientes que contenían hidrogeles con insecticida. Esto indica que aún no había el desarrollo esperado de adultos en los controles negativos y que, a medida que avanza el tiempo, el efecto del biocida se ve afectado por factores asociados al recambio de agua ocasionado por la lluvia y concentraciones insuficientes del compuesto para inhibir la metamorfosis del 100% de los mosquitos.

Los resultados muestran que el piriproxifén es un larvicida que se desempeña bien en bioensayos de semicampo, ya que funciona como trampa atrayendo los

mosquitos, los cuales ponen sus huevos en las aguas estancadas y este larvicida es capaz de reducir los porcentajes de emergencia por varias semanas, dependiendo del grado de entrecruzamiento de la matriz polimérica que lo contenga.

En la tabla 7 se pueden observar las especies de mosquito encontradas durante los bioensayos de semicampo. Para los primeros 28 días de estudio la mortalidad de los estadios inmaduros de *Aedes aegypti* fue alta y, luego de los 37 días, los porcentajes de emergencia asociados a este mosquito aumentaron. Esto significa que hubo diversos factores que disminuyeron el efecto del piriproxifén a través del tiempo. La lluvia causa que el agua al interior de los baldes se rebose y se eliminen cantidades de producto. Además, al inicio del experimento la concentración del larvicida era mayor, pues los hidrogeles empezaron a liberar el biocida constantemente hasta que el recambio de agua, el agotamiento de las reservas o los niveles bajos del compuesto provocaron que el sistema sea incapaz de disminuir la proliferación de adultos en su totalidad.

En la tabla 6 se puede ver que en general se obtuvieron porcentajes de emergencia pequeños a lo largo del bioensayo de semicampo y que a los 43 días de haber iniciado el experimento se presentaron porcentajes de emergencia nulos, a excepción de los hidrogeles con concentración de larvicida 1X, los cuales ya empezaban a terminar de liberar por completo el piriproxifén de su interior. Con estos resultados se puede afirmar que la propuesta de escalonamiento mostró liberación constante de piriproxifén, dado que si no fuera así los porcentajes de emergencia habrían sido mayores, y que el aumento de esta variable fue afectado por el recambio de agua ocasionado por la lluvia.

El uso de cien hidrogeles pequeños (1cm x 1cm x 0,5cm) permitió que la liberación del larvicida fuera adecuada a través del tiempo, debido a que, si se usaba solamente una pastilla grande con la cantidad estipulada de emulsión de piriproxifén para cada concentración, la relación superficie/volumen sería menor y presentaría una liberación inicial grande y rápida, seguida de una liberación mucho más lenta. Esto haría que los niveles de biocida en el medio a través del tiempo fueran insuficientes para controlar la proliferación del mosquito, ya que el recambio de agua de las lluvias contribuiría a la eliminación de las bajas cantidades de insecticida al interior de los baldes. En cambio, cuando se usan hidrogeles pequeños la liberación de piriproxifén resulta mayor y más rápida durante la fase de liberación lenta, haciendo que la concentración necesaria para impedir la emergencia de mosquitos se mantenga así llueva (Sáez, 2004). Además, en proyectos anteriores probaron usar pastillas redondas de aproximadamente 4,5cm de radio, pero al incharse el hidrogel se deformó y se obtuvo una liberación ineficaz (Ladino, 2016).

## 2.6 CONCLUSIONES

- Se logró sintetizar hidrogeles de quitosano con grados de entrecruzamiento de 25% y 75% y con cantidades de piriproxifén de 1X, 5X y 10X ( $X = DL_{99} = 0,05\text{ppm}$ ).
- Se determinó que la cantidad de Piriproxifén incorporada en los hidrogeles usados en condiciones de laboratorio, fue suficiente para matar las larvas y pupas presentes y la concentración residual que quedaba en el agua después de los 15 días, fue suficiente para matar los individuos sobrevivientes.
- No fue posible encontrar la mejor combinación entre el grado de entrecruzamiento y la concentración de piriproxifén, debido a que los hidrogeles usados en los bioensayos de laboratorio aún no han agotado el larvicida que contienen y siguen eliminando al 100% de las larvas para las concentraciones de 5X y 10X.
- Se determinó que las variables: experimento, concentraciones 5X y 10X del cuarto bioensayo y réplica presentaron un valor P menor a 0,05; lo que significa que son estadísticamente significativas y afectan la variable respuesta, porcentaje de mortalidad de las larvas y pupas.
- Se evidenció que en condiciones de semicampo la emulsión de piriproxifén presentó un efecto trampa, ya que atrajo los mosquitos para que pusieran sus huevos en las aguas estancadas, obteniendo muestras grandes de larvas y pupas.
- Se comprobó que la propuesta de escalonamiento mostró liberación constante de piriproxifén, debido a que a los 43 días de haber iniciado el experimento en condiciones de semicampo, se presentaron porcentajes de emergencia nulos para la mayoría de los baldes y posiblemente pueda ser empleada en ensayos de campo en el futuro.

## 2.7 RECOMENDACIONES

- Designar un molde exclusivamente para elaborar los controles con el fin de evitar la contaminación cruzada. También está la posibilidad de rediseñar el molde, de tal forma que la cuadrícula no esté integrada y ésta tenga bordes más filosos con el objetivo de llenar el cuadrado grande, dejarlo secar el tiempo adecuado, cortar el gel con la cuadrícula y separar fácilmente los hidrogeles.
- Montar un tratamiento sin hidrogel ni larvicida en los ensayos de laboratorio, con el fin de evaluar y confirmar si los vasos utilizados son adecuados para trabajar con organismos altamente sensibles a sustancias químicas.
- Repetir los experimentos con una solución de glutaraldehído de marca J.T. Baker o semejante para responder la incógnita de por qué los controles de los bioensayos tenían alta mortalidad acumulada.
- Alimentar las larvas extraídas de los baldes de los bioensayos de semicampo para corroborar si este factor contribuyó a la muerte de los controles negativos.
- Cuantificar la concentración de piriproxifén por medio de espectrometría de masas, debido a que las concentraciones usadas de larvicida en este proyecto son menores a las del límite de detección de otras técnicas como UV y HPLC, colectando muestras de agua de los vasos en tiempos determinados con el fin de obtener las cinéticas de liberación de larvicida de cada bioensayo, conocer la dosis presente en el medio respecto al tiempo, asegurar que se mantengan los niveles deseados del biocida y determinar la vida útil de los hidrogeles usados.

### 3. REFERENCIAS

- Anderson, T. S. (2016). The Emergence of Zika Virus: A Narrative Review. *Annals of Internal Medicine Journal*.
- Avantor. (2014). *Safety data sheet: Glutaraldehyde 25 % Aqueous*. Center Valley: Avantor Performance Materials. Obtenido de <https://www.avantormaterials.com/Documents/MSDS/USA/SAP/00007133.PDF>
- Brault, B. R. (2016). The Development of Small Animal Models for Zika Virus Vaccine Efficacy Testing and Pathological Assessment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Cáceres, L. (Septiembre de 2013). Determinación de la sensibilidad a insecticidas organofosforados, carbamato y piretroides en poblaciones de *Aedes aegypti* Linneaus, 1762 ( Díptera: Culicidae ) de Panamá. *Biomédica*, 33, 89-96. 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)
- Calaza, P. (2007). Hipótesis de homocedasticidad. En *Revisión bibliográfica y análisis comparativo de métodos de evaluación de riesgo de arbolado urbano. Caso particular: La Coruña*. (pág. 405). Santiago de Compostela: Universidad Santiago de Compostela.
- CDC. (26 de Abril de 2016). *Acerca del alcance APROXIMADO del Aedes aegypti y el Aedes albopictus en los Estados Unidos, mapas 2016*. Obtenido de Centros para el control y la prevención de enfermedades: <http://espanol.cdc.gov/enes/zika/vector/range.html>
- Centers for disease control and prevention. (27 de Septiembre de 2012). *Dengue Homepage: Mosquito Life-Cycle*. Obtenido de Centers for disease control and prevention: [http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m\\_lifecycle.html](http://www.cdc.gov/dengue/entomologyEcology/m_lifecycle.html)
- Díaz, C. (Diciembre de 2013). Estudio de la biosorción de cromo (VI) con quitosano cuaternario reticulado para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 79(4), 304-318.
- Fontoura, G. (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)



- Gilles Pialoux, B.-A. G. (2007). Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 319-327.
- Guzmán, K. (2002). Dengue: an update. *Lancet Infect Diseases*, 33-42.
- Harris, R. (2010). *Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de <http://eprints.ucm.es/11160/1/T32051.pdf>
- Hernández, C. R. (2010). *Liberación controlada del difosfato de cloroquina a través de micropartículas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído*. Lima: Universidad Nacional de Ingeniería.
- IRAC. (2011). *Clasificación del Modo de Acción de Insecticidas y Acaricidas IRAC*. Insecticide Resistance Action Committee, Madrid.
- Klages, F. (2005). Éteres. En *Tratado de Química Orgánica. Tomo I (1ª parte). Química Orgánica sistémica* (pág. 223). Bogotá: Reverté.
- Kouri, G. (2006). El dengue, un problema creciente de salud en las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*.
- Ladino, L. (2016). *Liberación controlada del larvicida novaluron para el control de mosquitos vectores de enfermedades tropicales a partir de hidrogeles de quitosano*. Santiago de Cali: Universidad Icesi.
- Maddison, S. P. (2008). Pyriproxyfen. En S. P. Jill Maddison, *Small Animal Clinical Pharmacology* (pág. 226). Amsterdam: Elsevier Health Sciences.
- Ministerio de salud y protección social. (4 de mayo de 2016). Dengue. Bogotá, Cundinamarca, Colombia.
- Nicholson, J. (2006). *The chemistry of polymers* (Third edition ed.). Cambridge, Reino Unido: RSCPublishing.
- Numa, S. S. (28 de febrero de 2015). Los huérfanos de la salud. *El Tiempo*.
- Ocampo, M. N. (2013). Reduction in dengue cases observed during mass control of Aedes (Stegomyia) in street catch basins in an endemic urban area in Colombia. *Acta Trópica*, 1-8.
- OMS. (Mayo de 2015). *Dengue y dengue grave*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
- OMS. (Abril de 2016). *Chikungunya*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>
- OMS. (2016). *Enfermedades tropicales*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: [http://www.who.int/topics/tropical\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/tropical_diseases/es/)

- OPS, O. (22 de Enero de 2016). *Chikungunya: Datos Estadísticos*. Obtenido de Número de casos reportados de chikungunya en países o territorios de las Américas 2016 (por semanas): [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&Itemid=270&gid=32984&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=32984&lang=es)
- Ortíz, R. (2012). Determinación de la velocidad de liberación de metronidazol incorporado en membranas de quitosano, utilizando voltametría de pulso diferencial. *Acta Bioclínica*, 69-93.
- Palomino, S. (31 de febrero de 2016). El País. *El virus del Zika se expande por Colombia, el segundo país más afectado*, pág. 1.
- Peña, J. (2016). *Liberación controlada de piriproxifén, insecticida empleado en el control de vectores de enfermedades tropicales a partir de hidrogeles de quitosano en condiciones controladas de campo*. Universidad Icesi. Santiago de Cali: Universidad Icesi.
- Reiter, M. N. (2003). *Guías para la evaluación de la eficacia del rociado espacial de insecticidas para el control del vector del dengue Aedes Aegypti*. Organización Mundial de la Salud.
- Rodríguez, M. (2004). Resistencia a insecticidas en larvas y adultos de *Aedes aegypti*: prevalencia de la esterasa A4 asociada con la resistencia a temefos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 56(1), 54-60.
- Rodríguez, W. (2016). El reto de Zika en Colombia y América Latina: Una urgencia sanitaria internacional. *Infectio*, 59-61.
- Sáez, V. (Julio de 2004). Liberación controlada de fármaco. Micropartículas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 5(2), 87-101. Obtenido de <http://www.ehu.es/reviberpol/pdf/JUL04/Saez.pdf>
- Salazar, L. I. (2012). *Determinación de las concentraciones diagnósticas de los reguladores de crecimiento de insectos piriproxifen y diflubenzurón para Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) cepa Rockefeller y el estado de la resistencia de seis poblaciones de campo en Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional.
- Sánchez, A. (2007). Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (*Pleuroncodes planipes*) con potenciales aplicaciones biomédicas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 241-267.
- Schirmer, P. J. (2012). Pyriproxyfen: A New Juvenoid. En P. J. Ulrich Schirmer, *Modern Crop Protection Compounds: Herbicides, Volumen 1* (pág. 995). Berlín: John Wiley & Sons.
- Secretaría de Salud de México. (6 de Julio de 2015). *Diagnóstico diferencial Dengue/Chikungunya/Virus Zika*. México: Centro Nacional de la

Transfusión Sanguínea. Obtenido de Lucha contra el dengue y el chikungunya.

Sivigila. (14 de Diciembre de 2016). *Vigilancia Rutinaria*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Paginas/vigilancia-rutinaria.aspx>

Tapia, J. S.-H. (1995). Diseño de un Sistema Matriz de Liberación Prolongada a base de Quitosano de producción Chilena. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 163-172.

Velásquez, L. (2003). Quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* , 92.

Vila, J. (2001). *Tecnología Farmacéutica Volumen I: aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Madrid: Editorial Síntesis.

WHO. (2016). *WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES)*. Obtenido de World Health Organization: <http://www.who.int/whopes/en/>

## ANEXOS

**Anexo 1.** Cálculos realizados para la obtención de los 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 matraz aforado 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 2% preparada anteriormente.

- **Preparación de solución de glutaraldehído 0,4% a partir de solución de glutaraldehído 50%**

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$50\% * V_1 = 0,4\% * 100\text{mL}$$

$$V_1 = \frac{0,4\% * 100\text{mL}}{50\%}$$

$$V_1 = 0,8\text{mL} = 800\mu\text{L}$$

Esta solución fue preparada en un matraz aforado de 100mL usando como solvente agua destilada.

- **Determinación de la densidad de la solución de glutaraldehído 0,4%**

En trabajos anteriores se determinó para esta solución una densidad de 1,006g/mL a una temperatura de 21°C (Ladino, 2016).

- **Cálculos para la obtención de los hidrogeles con piroproxifén para el ensayo de laboratorio**

- Volumen del molde

Cada molde tiene 100 espacios de 1cm<sup>2</sup> de área y 0,5cm de altura por lo que el volumen total de solución para su llenado deberá de ser de

$$\begin{aligned} \text{Volumen total} &= 1\text{cm}^2 * 0,5\text{cm} * 100 = 50\text{cm}^3 \\ &= 50\text{mL de solución para llenarlo completamente} \end{aligned}$$

- Moles de quitosano

Para preparar las soluciones se partió de 60mL y 40mL de solución de quitosano para los grados de entrecruzamiento de 25% y 75% respectivamente. Con el volumen de quitosano se hallan las moles totales del mismo:

- Para 25%

$$\begin{aligned} 60\text{mL sln quitosano} &\times \frac{3\text{g quitosano}}{100\text{mL ácido acético}} \times \frac{1\text{mol quitosano}}{170,376\text{g}} \\ &= 1,056 \times 10^{-2} \text{mol quitosano} \end{aligned}$$

- Para 75%

$$\begin{aligned} 40\text{mL sln quitosano} &\times \frac{3\text{g quitosano}}{100\text{mL ácido acético}} \times \frac{1\text{mol quitosano}}{170,376\text{g}} \\ &= 7,043 \times 10^{-3} \text{mol quitosano} \end{aligned}$$

Para poder realizar el cálculo de las moles de quitosano que deben reaccionar para generar cada entrecruzamiento, se debe tener en cuenta que el porcentaje de desacetilación proporcionado por el fabricante del quitosano es 75%.

- Para 25%

$$\begin{aligned} \text{Moles quitosano desacetilado} &= 1,056 \times 10^{-2} \text{moles quitosano} * 0,75 \\ &= 7,924 \times 10^{-3} \text{mol quitosano desacetilado} \end{aligned}$$

- Para 75%

$$\begin{aligned} \text{Moles quitosano desacetilado} &= 7,043 \times 10^{-3} \text{moles quitosano} * 0,75 \\ &= 5,282 \times 10^{-3} \text{mol quitosano desacetilado} \end{aligned}$$

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

- Para 25%

$$\begin{aligned} \text{Moles glutaraldehído} &= 7,924 \times 10^{-3} \text{moles desacetiladas} * \frac{1\text{mol glutaraldehído}}{2\text{moles desacetiladas}} \\ &* 0,25 = 9,905 \times 10^{-4} \text{mol glutaraldehído} \end{aligned}$$

- Para 75%

*Moles glutaraldehído*

$$= 5,282 \times 10^{-3} \text{ moles desacetiladas} * \frac{1 \text{ mol glutaraldehído}}{2 \text{ moles desacetiladas}} * 0,75 = 1,981 \times 10^{-3} \text{ mol glutaraldehído}$$

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

- Para entrecruzamiento 25%

$$9,905 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído} * \frac{100,11 \text{ g glutaraldehído}}{1 \text{ mol glutaraldehído}} * \frac{100 \text{ g solución glutaraldehído}}{0,4 \text{ g glutaraldehído}} * \frac{1 \text{ mL sln glutaraldehído}}{1,006 \text{ g glutaraldehído}} = 24,64 \text{ mL glutaraldehído}$$

- Para entrecruzamiento 75%

$$1,981 \times 10^{-3} \text{ mol glutaraldehído} * \frac{100,11 \text{ g glutaraldehído}}{1 \text{ mol glutaraldehído}} * \frac{100 \text{ g solución glutaraldehído}}{0,4 \text{ g glutaraldehído}} * \frac{1 \text{ mL sln glutaraldehído}}{1,006 \text{ g glutaraldehído}} = 49,28 \text{ mL glutaraldehído}$$

**Tabla 8.** Datos para la reacción de entrecruzamiento.

Entrecruzamiento	Volumen quitosano (mL)	Quitosano desacetilado (mol)	Glutaraldehído (mol)	Volumen glutaraldehído (mL)
25%	60	$7,924 \times 10^{-3}$	$9,905 \times 10^{-4}$	24,64
75%	40	$5,282 \times 10^{-3}$	$1,981 \times 10^{-3}$	49,28

Ahora, se procede a calcular la cantidad de piriproxifén necesaria para que cada hidrogel cortado tenga la concentración requerida. Para esto se debe tener en cuenta el volumen de cada espacio del molde y los microlitros de emulsión de piriproxifén necesarios para cada concentración.

- Cálculos para los bioensayos (se trabaja con 100mL de agua para todas las condiciones)

- Para 1X

$$1X = DL_{99} = 0,05 \text{ ppm} = 0,05 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \Rightarrow 0,05 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,1 \text{ L} = 0,005 \text{ mg}$$

- Para 5X

$$5X = DL_{99} = 5 * 0,05ppm = 0,25 \frac{mg}{L} \Rightarrow 0,25 \frac{mg}{L} \times 0,1L = 0,025mg$$

- Para 10X

$$10X = DL_{99} = 10 * 0,05ppm = 0,5 \frac{mg}{L} \Rightarrow 0,5 \frac{mg}{L} \times 0,1L = 0,05mg$$

Los valores obtenidos son la cantidad teórica de larvicida en cada vaso.

Se procede a determinar el volumen del prisma rectangular resultante de cada espacio del molde con el fin de asegurar la concentración necesaria en el volumen total de este.

$$V = A * h$$

$$V = (10mm)^2 * 5mm * \frac{1cm^3}{1000mm^3} * \frac{1mL}{1cm^3} = 0,5mL$$

Habiendo obtenido este valor, se calcula la cantidad de larvicida por mililitro.

- Para 1X

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de larvicida por mL de solución} &= \frac{0,005mg}{0,5mL} \\ &= 0,01 \frac{mg \text{ piriproxifén}}{mL \text{ de solución}} \end{aligned}$$

- Para 5X

$$\begin{aligned} \text{Cantidad de larvicida por mL de solución} &= \frac{0,025mg}{0,5mL} \\ &= 0,05 \frac{mg \text{ piriproxifén}}{mL \text{ de solución}} \end{aligned}$$

- Para 10X

$$\text{Cantidad de larvicida por mL de solución} = \frac{0,05mg}{0,5mL} = 0,1 \frac{mg \text{ piriproxifén}}{mL \text{ de solución}}$$

Cada concentración se preparó desde 100mL de solución de quitosano. Hay que tener en cuenta que la solución de piriproxifen está al 10%:

- Para 1X

$$100mL \text{ sln quitosano} * \frac{0,01mg \text{ piriproxifén}}{1 \text{ mL sln quitosano}} = 1mg \text{ piriproxifén}$$

$$1\text{mg piriproxifén} * \frac{100\text{mL de emulsión}}{10\text{g piriproxifén}} * \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} * \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}}$$

$$= 10\mu\text{L de emulsión de piriproxifén al 10\%}$$

- Para 5X

$$100\text{mL sln quitosano} * \frac{0,05\text{mg piriproxifén}}{1\text{ mL sln quitosano}} = 5\text{mg piriproxifén}$$

$$5\text{mg piriproxifén} * \frac{100\text{mL de emulsión}}{10\text{g piriproxifén}} * \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} * \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}}$$

$$= 50\mu\text{L de emulsión de piriproxifén al 10\%}$$

- Para 10X

$$100\text{mL sln quitosano} * \frac{0,1\text{mg piriproxifén}}{1\text{ mL sln quitosano}} = 10\text{mg piriproxifén}$$

$$10\text{mg piriproxifén} * \frac{100\text{mL de emulsión}}{10\text{g piriproxifén}} * \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} * \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}}$$

$$= 100\mu\text{L de emulsión de piriproxifén al 10\%}$$

**Tabla 9.** Cantidad de piriproxifén de acuerdo a la concentración.

Concentración	Quitosano (mL)	Emulsión de piriproxifén (μL)
1X		10,0
5X	100,00	50,0
10X		100,0

**Tabla 10.** Resumen de los datos obtenidos para fabricar los hidrogeles de quitosano cargados de piriproxifén.

Entrecruzamiento	Concentración piriproxifén (X=0,05ppm)	Quitosano (mL)*	Glutaraldehído (mL)	Piriproxifén (μL)	Volumen total (mL)
25%	1X			6,0	84,65
	5X	60,00	24,64	30,0	84,67
	10X			60,0	84,70
75%	1X			4,0	89,29
	5X	40,00	49,28	20,0	89,30
	10X			40,0	89,32

\*Dicho volumen se toma de la solución de quitosano previamente preparada según sea el caso (Ver tabla 9)



## Anexo 2. Formato de recolección de datos para los bioensayos de laboratorio.

### FORMATO DE EVALUACIÓN PARA MEDIR LA EFICACIA DE LA LIBERACIÓN DE HIDROGELES EN LARVAS (LABORATORIO)

Experimento #: \_\_\_\_\_ Responsable: \_\_\_\_\_ Fecha de aplicación hidrogeles: \_\_\_\_\_ Fecha de aplicación de larvas: \_\_\_\_\_

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

		Fecha																									
Entrec	Conc	Repet	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	
		1																									
		2																									
		3																									
		Control																									
		1																									
		2																									
		3																									
		Control																									
		1																									
		2																									
		3																									
		Control																									
		1																									
		2																									
		3																									
		Control																									
		1																									
		2																									
		3																									
		Control																									

### Anexo 3. Formato de recolección de datos para ensayos biológicos en semicampo.

#### 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																							
Entrec	Repet	# Baldes	Vivos			Muertos			Vivos			Muertos			Vivos			Muertos					
			L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A			
25%	1X	1																					
	5X	2																					
	10X	3																					
	C (-)	4																					
	C (+)	5																					
75%	1X	6																					
	5X	7																					
	10X	8																					
	C (-)	9																					
	C (+)	10																					
Observaciones																							

## Anexo 4. Análisis estadístico de los datos de los bioensayos de laboratorio.

### a) Evaluación de la interacción entre experimento y concentración:

#### MODELO 1

```
. xi: regress percmortalidad i.experimento*i.concentracion
i.percentrecruzamiento i.replica
i.experimento      _Iexperimen_1-4      (naturally coded; _Iexperimen_1 omitted)
i.concentracion    _Iconcentra_1-3      (naturally coded; _Iconcentra_1 omitted)
i.exp~o*i.con~n    _IexpXcon_#_#      (coded as above)
i.percentrecr~o    _Ipercentre_1-2      (naturally coded; _Ipercentre_1 omitted)
i.replica          _Ireplica_1-4        (naturally coded; _Ireplica_1 omitted)

      Source |           SS          df           MS              Number of obs =      96
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
      Model |    72197.625         15     4813.175              F( 15,      80) =    10.20
      Residual |   37762.3333         80     472.029167             Prob > F          =    0.0000
-----+-----+-----+-----+-----+-----
      Total |  109959.958         95    1157.47325             R-squared         =    0.6566
                                           Adj R-squared    =    0.5922
                                           Root MSE        =    21.726

percmortalid~d |           Coef.      Std. Err.      t    P>|t|      [95% Conf.
Interval]
-----+-----+-----+-----+-----+-----
_Iexperimen_2 |           36      10.86312       3.31   0.001      14.38171
57.61829
_Iexperimen_3 |           21      10.86312       1.93   0.057       - .61829
42.61829
_Iexperimen_4 |          -35.25     10.86312      -3.24   0.002     -56.86829  -
13.63171
Iconcentra_2 |           1.25     10.86312       0.12   0.909     -20.36829
22.86829
Iconcentra_3 |          -10      10.86312      -0.92   0.360     -31.61829
11.61829
_IexpXcon_2_2 |           1.25     15.36277       0.08   0.935     -29.32288
31.82288
_IexpXcon_2_3 |           3.75     15.36277       0.24   0.808     -26.82288
34.32288
_IexpXcon_3_2 |          11.25     15.36277       0.73   0.466     -19.32288
41.82288
_IexpXcon_3_3 |           25      15.36277       1.63   0.108     -5.572879
55.57288
_IexpXcon_4_2 |          47.5      15.36277       3.09   0.003      16.92712
78.07288
_IexpXcon_4_3 |          53.75     15.36277       3.50   0.001      23.17712
84.32288
Ipercentre_2 |          3.208333    4.434849       0.72   0.472     -5.617297
12.03396
_Ireplica_2 |          38.5      6.271823       6.14   0.000      26.01867
50.98133
_Ireplica_3 |          38.5      6.271823       6.14   0.000      26.01867
50.98133
_Ireplica_4 |          38.91667    6.271823       6.21   0.000      26.43534
51.39799
_cons |          24.66667    8.869697       2.78   0.007      7.015407
42.31793
-----+-----+-----+-----+-----+-----
```

No se encuentra diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de concentración (1X vs 5X y 1X vs 10X) y los porcentajes de entrecruzamiento.

```
. estat ic
```

Model	Obs	ll(null)	ll(model)	df	AIC	BIC
.	96	-474.3072	-423.0046	16	878.0092	919.0388

**b) Reducción del modelo sin medir el efecto de concentración y porcentaje de entrecruzamiento:**

**MODELO 2.**

```
. xi: regress percmortalidad i.experimento i.exp4conc2 i.exp4conc3 i.replica
i.experimento      _Iexperimen_1-4      (naturally coded; _Iexperimen_1 omitted)
i.exp4conc2        _Iexp4conc2_0-1      (naturally coded; _Iexp4conc2_0 omitted)
i.exp4conc3        _Iexp4conc3_0-1      (naturally coded; _Iexp4conc3_0 omitted)
i.replica          _Ireplica_1-4        (naturally coded; _Ireplica_1 omitted)
```

Source	SS	df	MS	Number of obs =	96
Model	69983.9167	8	8747.98958	F( 8, 87) =	19.04
Residual	39976.0417	87	459.494732	Prob > F =	0.0000
				R-squared =	0.6364
				Adj R-squared =	0.6030
Total	109959.958	95	1157.47325	Root MSE =	21.436

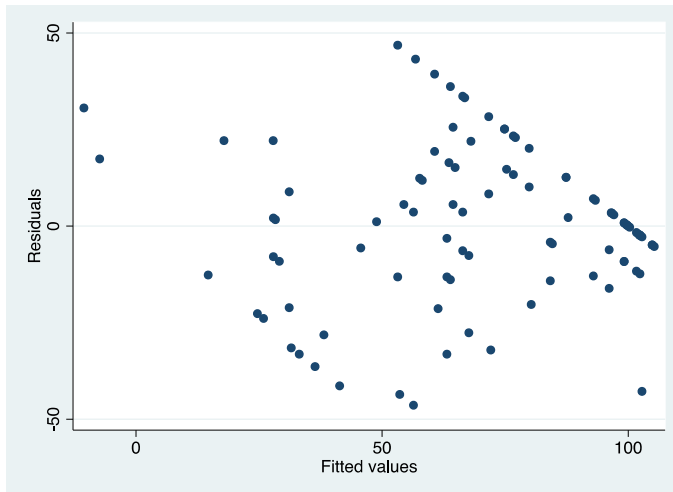
percmortalid~d Interval]	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf.
_Iexperimen_2 49.96597	37.66667	6.187991	6.09	0.000	25.36737
_Iexperimen_3 45.38263	33.08333	6.187991	5.35	0.000	20.78403
_Iexperimen_4 14.93949	-32.33333	8.75114	-3.69	0.000	-49.72717 -
_Iexp4conc2_1 70.05301	48.75	10.71791	4.55	0.000	27.44699
_Iexp4conc3_1 65.05301	43.75	10.71791	4.08	0.000	22.44699
_Ireplica_2 50.7993	38.5	6.187991	6.22	0.000	26.2007
_Ireplica_3 50.7993	38.5	6.187991	6.22	0.000	26.2007
_Ireplica_4 51.21597	38.91667	6.187991	6.29	0.000	26.61737
_cons 34.85911	23.35417	5.788335	4.03	0.000	11.84922

Todos los coeficientes del modelo 2 son estadísticamente significativos a un nivel de significancia de 0,05.

```
. estat ic
```

Model	Obs	ll(null)	ll(model)	df	AIC	BIC
.	96	-474.3072	-425.7391	9	869.4782	892.5573

c) Diagnóstico de regresión:



```
. estat htestest
Breusch-Pagan / Cook-Weisberg test for heteroskedasticity
Ho: Constant variance
   Variables: fitted values of perc mortalidad
   chi2(1)    =    7.74
   Prob > chi2 =   0.0054

. estat imtest, white
White's test for Ho: homoskedasticity
against Ha: unrestricted heteroskedasticity
   chi2(23)   =   39.76
   Prob > chi2 =   0.0164

Cameron & Trivedi's decomposition of IM-test
```

Source	chi2	df	p
Heteroskedasticity	39.76	23	0.0164
Skewness	10.64	8	0.2232
Kurtosis	0.18	1	0.6707
Total	50.57	32	0.0196

En ambas pruebas (White y Breusch-Pagan) se rechaza la hipótesis de varianza constante de los valores ajustados del porcentaje de mortalidad, hay heteroscedasticidad. Se corrobora el resultado con el método gráfico, se ve un rombo en la distribución del error. En los modelos se requiere que la distribución de los errores sea aleatoria.