

**ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE UN LARVICIDA DE USO ACTUAL EN  
SALUD PÚBLICA A PARTIR DE HIDROGELES DE QUITOSANO CONTRA  
UNA CEPA RESISTENTE Y UNA SUSCEPTIBLE DE *Aedes aegypti*,  
VECTOR DE DENGUE Y ZIKA, EN CONDICIONES DE LABORATORIO.**

**ALEJANDRO MONTOYA MONTERO**

**UNIVERSIDAD ICESI  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
QUÍMICA FARMACÉUTICA  
Santiago de Cali  
2018**

**ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE UN LARVICIDA DE USO ACTUAL EN SALUD PÚBLICA A PARTIR DE HIDROGELES DE QUITOSANO CONTRA UNA CEPA RESISTENTE Y UNA SUSCEPTIBLE DE *Aedes aegypti*, VECTOR DE DENGUE Y ZIKA, EN CONDICIONES DE LABORATORIO.**

**ALEJANDRO MONTOYA MONTERO**

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

**DIRECTORA:**

**CLARA BEATRIZ OCAMPO DURAN, Ph.D**

**CO-DIRECTORA:**

**NORA ELENA VALDERRUTEN POSSO, Ph.D**

**SANTIAGO DE CALI**

**2018**

**APROBADO POR:**

---

**Constain Hugo Salamanca Mejia**  
**Evaluador**

*Clara B. Ocampo Durán*

---

**Clara Beatriz Ocampo Duran**  
**Directora del proyecto**

*Nora E. Valderruten*

---

**Nora Elena Valderruten Posso**  
**Co-Directora del Proyecto**

**SANTIAGO DE CALI**

**06 – MAYO - 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecerle a Dios por ponerme los obstáculos y desafíos y brindarme la fortaleza para superarlos y la razón que hoy esté aquí.

Agradezco enormemente a mi mamá por ser la persona base de mi vida, por ser el apoyo no solo para la carrera sino también para la vida.

Agradezco al acompañamiento constante de mi familia e interés en mi desarrollo como profesional en la universidad.

Agradecerles a mis tutoras Clara Beatriz Ocampo y Nora Elena Valderruten por toda la confianza, el apoyo y el conocimiento brindado durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a Luis Ramírez, Katherine Escobar y Tatiana Villa por sus enseñanzas y su acompañamiento dedicado al desarrollo de este proyecto.

Finalmente agradezco a mis compañeros y amigos de la universidad, por permitirme convivir con ellos y brindarme experiencias que me enriquecieron como amigo, como profesional y como persona.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	12
2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO .....	13
2.1 Planteamiento del problema de investigación y su justificación en términos de necesidad y pertinencia .....	13
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	14
2.2.1 Enfermedades infecciosas en Colombia .....	14
2.2.2 Dengue y Zika.....	14
2.2.3 <i>Aedes aegypti</i> como vector de enfermedades infecciosas.....	15
2.2.4 Larvicida Temefos.....	17
2.2.5 Quitosano y su aplicación como sistemas de liberación modificada.....	18
2.3 OBJETIVOS .....	21
2.3.1 Objetivo general .....	21
2.3.2 Objetivos específicos.....	21
2.4 METODOLOGÍA .....	22
2.4.1 Reactivos, materiales y equipos empleados. ....	22
2.4.2 Síntesis de hidrogeles de quitosano a concentraciones 1X, 5X y 10X de Temefos con entrecruzamiento del 25% .....	23
2.4.3 Determinación de la mortalidad de los hidrogeles cargados con Temefos; bioensayos en condiciones de laboratorio. ....	25
2.4.4 Análisis estadísticos de los resultados obtenidos .....	26
2.5 MATRIZ DE MARCO LÓGICO .....	27
2.6 RESULTADOS.....	29
2.7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	32
1.7.1 Obtención de los hidrogeles de quitosano .....	32
2.7.2 Bioensayos bajo condiciones de laboratorios .....	36
2.8 CONCLUSIONES .....	38
2.9 RECOMENDACIONES .....	39
3. REFERENCIAS .....	40
ANEXOS.....	44

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Reactivos empleados durante la síntesis de los hidrogeles .....	22
<b>Tabla 2.</b> Listado de equipos para la síntesis de los hidrogeles de quitosano ...	22
<b>Tabla 3.</b> Datos para determinación de la densidad del glutaraldehído 2,5% ....	45
<b>Tabla 4.</b> Moles de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento .....	46
<b>Tabla 5.</b> Volumen de glutaraldehído para entrecruzamiento del 25%.....	46
<b>Tabla 6.</b> Cantidad de Temefos de acuerdo a la concentración .....	47
<b>Tabla 7.</b> Cantidad de Temefos de acuerdo a la concentración y entrecruzamiento. ....	48

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfico 1.</b> Experimento 1 – Cepa Resistente de <i>Aedes aegypti</i> .....	29
<b>Gráfico 2.</b> Experimento 1 – Cepa Susceptible de <i>Aedes aedypti</i> .....	30
<b>Gráfico 3.</b> Experimento 2 – Cepa Susceptible de <i>Aedes aedypti</i> .....	31
<b>Gráfico 4.</b> Experimento 2 – Cepa Resistente de <i>Aedes aedypti</i> .....	31

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema general del ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> . (Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, 2016). .....	16
<b>Figura 2.</b> Estructura química del temefos/Abate .....	17
<b>Figura 3.</b> Unidad repetitiva de la quitina (Lárez, 2006) .....	18
<b>Figura 4.</b> Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano (Lárez, 2006). .....	19
<b>Figura 5.</b> Entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con un dialdehído (Beltrán, 2010). .....	20
<b>Figura 6.</b> Molde con hidrogeles de quitosano. ....	23
<b>Figura 7.</b> Hidrogeles en horno a 28°C .....	24
<b>Figura 8.</b> Hidrogeles cortados en sartén de teflón. ....	24
<b>Figura 9.</b> Hidrogeles secos (xerogeles) en recipiente. ....	24
<b>Figura 10.</b> Diseño experimental del proyecto. ....	25
<b>Figura 11.</b> Montaje de bioensayos de larvas de <i>Aedes aegypti</i> . ....	25
<b>Figura 12.</b> Representación esquemática de un sistema de liberación controlada de una molécula activa en el tiempo (Escobar, García, Zaldivar, & Katime, 2002). .....	33
<b>Figura 13.</b> Estructura química Piriproxifén (University of Hertfordshire, s.f) .....	33
<b>Figura 14.</b> Estructura química Bifentrina (University of Hertfordshire, s.f) .....	34
<b>Figura 15.</b> Estructura química Novaluron (University of Hertfordshire, s.f) .....	34
<b>Figura 16.</b> Estructura química Temefos (University of Hertfordshire, s.f) .....	34
<b>Figura 17.</b> Hidrogel de quitosano entrecruzado covalentemente (Sánchez et al., 2007). .....	36



## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Cálculos realizados para la síntesis de los hidrogeles. ....	44
<b>Anexo 2.</b> Formato usado para la lectura de los bioensayos bajo condiciones de laboratorio. ....	49

## RESUMEN

Este proyecto estudió la liberación del larvicida Temefos a partir de hidrogeles de quitosano bajo condiciones de laboratorio, evaluando la susceptibilidad de larvas de una cepa resistente y una cepa susceptible de *Aedes aegypti* a este larvicida. Para esto, se sintetizaron matrices poliméricas de quitosano o también llamados hidrogeles con un entrecruzamiento del 25% a diferentes concentraciones de Temefos (1X, 5X y 10X respectivamente) e hidrogeles control (sin insecticida). Posteriormente se realizaron los bioensayos bajo condiciones de laboratorio siguiendo las recomendaciones de la OMS. Los bioensayos no evidenciaron diferencias en la mortalidad con respecto a los controles (hidrogel sin larvicida y agua sola). Se presentó alta mortalidad en los controles, no observada en estudios anteriores, de tal forma que no permitió evaluar la eficacia del hidrogel. Se realizaron diferentes experimentos para determinar las fallas en los controles y en el comportamiento de los hidrogeles. Se realizaron sugerencias para continuar con los estudios.

**Palabras clave:** *Aedes aegypti*, quitosano, resistencia, susceptible, temefos, sistemas de liberación modificada.

## ABSTRACT

This project studied the release of Temefos larvicide from chitosan hydrogels under laboratory conditions, evaluating the susceptibility of larvae of a resistant strain and a susceptible strain of *Aedes aegypti* to this larvicide. For this, polymer matrices of chitosan were synthesized or also called hydrogels with a crosslinking of 25% at different concentrations of Temefos (1X, 5X and 10X respectively) and control hydrogels (without insecticide). Subsequently, the bioassays were carried out under laboratory conditions following the recommendations of the WHO. The bioassays showed no differences in mortality with respect to the controls (hydrogel without larvicide and water alone). There was high mortality in controls, not observed in previous studies, in such a way that it was not possible to evaluate the effectiveness of the hydrogel. Different experiments were carried out to determine the faults in the controls and in the behavior of the hydrogels. Suggestions were made to continue with the studies.

**Key words:** *Aedes aegypti*, chitosan, resistance, susceptible, temefos, controlled release systems.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los arbovirus son virus transmitidos por especies de artrópodos. Los mosquitos actúan como vectores que producen enfermedades como dengue y Zika, las cuales actualmente representan un problema de salud pública. Estas enfermedades son propagadas por el ser humano como principal hospedero de la infección transmitida por el vector *Aedes aegypti*. La situación epidemiológica actual en Colombia arroja un total de 538 casos de dengue y 313 casos nuevos de Zika en la semana 15 del año 2018. En la misma semana epidemiológica 15 del año 2017 se notificaron 447 casos de dengue, observándose un aumento en la aparición de la enfermedad según el boletín epidemiológico de Colombia (INS, 2018).

Entre las medidas para disminuir la transmisión de enfermedades infecciosas se encuentran las de protección personal: para evitar la picadura de mosquitos, como lo es el uso de repelentes contra mosquitos, el uso de vestimenta que cubran piernas y brazos de manera completa, el uso de mosquiteros (mallas de tul) en las ventanas, la disminución de las poblaciones de mosquitos a través de la aplicación de insecticidas y la eliminación de los reservorios de agua o la aplicación de larvicidas para matar las formas inmaduras (CDC, 2017).

La eliminación de los reservorios de agua significa una disminución en la propagación del mosquito y por ende de la enfermedad, sin embargo, esto requiere de un compromiso de labores, junto con acciones de higiene y saneamiento básico para la erradicación del vector que no son realizadas por parte de la población. Por esta razón es necesario la utilización de larvicidas para evitar la madurez del estado larvario al estado adulto de *Aedes aegypti* como uno de los principales métodos de control contra este vector. No obstante, el uso constante de larvicidas implica una variedad de problemas que involucra el desarrollo de resistencia en algunas cepas del vector, junto con problemas de carácter económico, debido a los altos costos de mantenimiento y, de carácter ambiental por el impacto negativo de los larvicidas (Argueta, Valle, & Marina, 2011).

Proyectos de investigación realizados en la universidad Icesi soportan la utilización de hidrogeles de quitosano como una opción para la liberación controlada de larvicidas, ya que son sustancias no tóxicas, biodegradables y biocompatibles (Ladino, 2016). Con el fin de desarrollar nuevas estrategias que ayuden en la reducción de las poblaciones del mosquito *Aedes aegypti*, para disminuir el riesgo de transmisión de los arbovirus que causan dengue y Zika, se estudió la liberación del larvicida temefos a partir de hidrogeles de quitosano en una cepa susceptible y resistente de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.

## **2. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO**

### **2.1 Planteamiento del problema de investigación y su justificación en términos de necesidad y pertinencia**

Para entender la relevancia de este proyecto de investigación, se debe realizar la siguiente pregunta: ¿son los hidrogeles de quitosano, sistemas de liberación modificada del larvicida Temefos, como opción de control de vectores de enfermedades infecciosas?

Para responder esta pregunta es necesario recordar que el dengue y el Zika son enfermedades infecciosas que representan un problema de salud pública y son enfermedades causadas por la picadura del mosquito *Aedes aegypti* (MINERD, s.f). Las estrategias de control contra este vector son realizadas por entidades de salud junto con sectores públicos y privados, y organizaciones encargadas de mantener el control del vector y la propagación de la enfermedad (OMS, s.f). Pese a que en la actualidad se considera que hay un control del mosquito; los resultados de las estrategias de control de las entidades mencionadas anteriormente demuestran que algunas de estas terminan siendo costosas y complejas de mantener después de usarlas un tiempo determinado (Goldman, Montoya, Sinclair, Soto, & Narvaéz, 2007).

Aunque la utilización de larvicidas ha resultado ser efectiva en el control del vector, el continuo uso de estas sustancias ha logrado que los mosquitos desarrollen resistencia a estos insecticidas que son usados por entidades gubernamentales de salud pública (Graciela, 2008). Lo que conlleva a tener que usar larvicidas en tiempos prolongados, que en altas concentraciones representan un riesgo para la salud humana, además de ser perjudiciales para el medio ambiente (OMS, s.f).

El temefos es un larvicida de uso actual en salud pública, es poco tóxico para los humanos y los mamíferos, y en bajas concentraciones tiene efecto inhibitorio en el desarrollo de las larvas del mosquito (Palomino, y otros, 2006). Debido a que algunas cepas de *Aedes aegypti* han desarrollado resistencia ante la exposición al Temefos (Álvarez, Briceño, & Oviedo, 2006) se evaluó si la liberación constante de insecticida por medio de las matrices poliméricas de quitosano ejerce su acción contra las cepas resistentes de este vector e identificando diferencias significativas en la mortalidad de las cepas. De esta forma, además de contribuir al control del vector del dengue y Zika, se espera promover el uso de estos sistemas para disminuir el impacto ambiental causado por el uso de larvicidas.

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

### **2.2.1 Enfermedades infecciosas en Colombia**

Colombia es un país que posee una gran variabilidad climática, algunos de estos climas promueven la proliferación de distintos vectores de enfermedades tropicales (INS, 2017). Las enfermedades infecciosas transmitidas por vectores que más se evidencian en Colombia son la malaria, el dengue, la fiebre amarilla, la enfermedad de Chagas y el Zika. Siendo el dengue y el Zika enfermedades incidentes, con nuevos casos presentados para el 2018 según el boletín epidemiológico semanal del Instituto Nacional de Salud (INS, 2018).

Según el boletín de clima y salud del Instituto Nacional de Salud (INS), el mes de abril del año 2018 es el “abre bocas” para la temporada lluviosa en Colombia, presentándose el fenómeno de La Niña para las regiones Andina y Pacífica. No obstante, el INS conforme a las predicciones climáticas, espera que se presente una disminución de estas precipitaciones y que aumente la acumulación de agua, generando las condiciones ambientales favorables para el desarrollo del vector causante de la propagación de la enfermedad (INS, 2018). Empero que Colombia históricamente ha venido presentando cambios positivos con respecto al manejo de vectores que transmiten las enfermedades; que involucraron ampliación del conocimiento, la industrialización y mejoras en la higiene que significaron una disminución de las tasas de morbilidad de la enfermedad, se considera necesario tomar medidas más efectivas para disminuir la proliferación de estos vectores (Sarmiento, 2000).

### **2.2.2 Dengue y Zika**

El dengue es una enfermedad causada por un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae* que es transmitido a través de la picadura del mosquito hembra de *Aedes aegypti* (Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, 2013). La enfermedad puede presentar un cuadro clínico variable tras un periodo de incubación entre 3 y 7 días. Los síntomas comunes del dengue incluyen fiebre alta, mialgias, artralgias, cefalea, anorexia, náuseas y vómitos (Céspedes, Díez, Tobías, & Tereva, 2015). El dengue es considerado como una enfermedad dinámica, ya que la expresión de sus síntomas puede agravarse de manera súbita, por lo cual la persona infectada requerirá de atención inmediata y de modo repetitivo (Martínez, 2008).

Al dengue lo constituyen cuatro serotipos virales serológicamente diferenciables (Dengue 1, 2, 3 y 4) que comparten analogías estructurales y patogénicas, por lo que cualquiera puede producir las formas graves de la enfermedad, aunque los serotipos 2 y 3 han estado asociados a la mayor cantidad de casos graves y mortales (Martínez, 2008). Los serotipos no desencadenan inmunidad cruzada, por lo cual una persona puede infectarse por los cuatro serotipos, pero al adquirirse la enfermedad por un serotipo, se presenta inmunidad temporal para otro serotipo. Sin embargo, después de esto la probabilidad de adquirir la forma grave del dengue es mayor (Jaramillo, 2016).

El Zika es una enfermedad infecciosa, que al igual que el dengue es causada por el virus perteneciente a la familia *Flaviviridae* y también se transmite por la

picadura de mosquito hembra de *Aedes aegypti*, pero se han comprobado casos de transmisión de persona a persona a través de las relaciones sexuales (Gobierno de Argentina, s.f). El periodo de incubación de la enfermedad por el virus de Zika no es definido, pero se cree que solo dure unos cuantos días. Los síntomas son similares a los de otras infecciones por arbovirus, entre ellas el dengue. Sin embargo, solo un 25% presentan los síntomas y estos suelen ser breves y durar entre 2 y 7 días (Maguiña & Galán-Rodas, 2016).

No existe un tratamiento para enfermedades como el dengue y el Zika que tengan como objetivo curar la enfermedad, sino un tratamiento que controle los síntomas hasta que estos desaparezcan. Las recomendaciones iniciales en caso de manifestarse alguno de los síntomas mencionados anteriormente es dirigirse al médico, beber líquido ante una posible deshidratación, reposar y evitar tomar medicamentos como la aspirina y el ibuprofeno debido al riesgo de presentar hemorragias graves (MinSalud, s.f).

## **2.2.3 *Aedes aegypti* como vector de enfermedades infecciosas**

### **2.2.3.1 Generalidades**

*Aedes aegypti* es un mosquito originario de África que en su forma adulta tiene una coloración oscura y franjas plateadas en sus patas (UNICEF, 2016). Viven en climas tropicales, climas subtropicales, y algunos climas templados (CDC, 2017). El virus infecta el intestino mediano del mosquito y se extiende a las glándulas salivales en un periodo de 10 días aproximadamente. De esta manera, cuando el mosquito pica a una persona después del estado de incubación, infecta a la persona que ya está en capacidad de hospedar y transmitir el virus. (OMS, s.f).

### **2.2.3.2 Ciclo de vida de *Aedes aegypti***

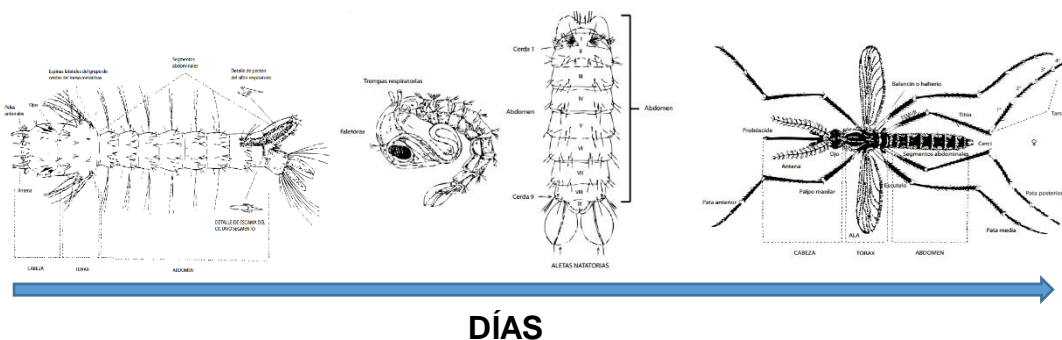
El mosquito hembra adulto (alimentada) deposita sus huevos sobre las paredes internas de recipientes con agua, los huevos se adhieren a estas paredes y cuando el recipiente se llena de agua los huevos eclosionan. Se ha visto que en condiciones de sequía, las hembras ponen entre un 10-20% de huevos directamente en el agua y el resto pegado a la superficie del recipiente, de este modo, cuando el agua sube de nivel hay eclosión paulatina de los huevos, asegurando su supervivencia en condiciones desfavorables (Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, 2016). Al eclosionar, da lugar al estado larvario del mosquito; las larvas son nadadoras y tienen respiración aerobia. Además, se alimentan de los residuos que se encuentran en las paredes y en el fondo gracias a sus cerdas bucales en forma de abanico. El estado larvario es el de mayor alimentación y crecimiento, pero también es el estado de mayor vulnerabilidad del ciclo de vida del mosquito. La duración del desarrollo larval, que dura entre 5 y 7 días, depende de condiciones específicas como la temperatura, la disponibilidad de alimento y la cantidad de larvas en el recipiente. Las larvas no sobreviven a temperaturas menores a 10°C y mayores a 45°C (CDC, s.f).

Posteriormente las larvas se transforman en pupas. No se alimentan y tienen poco movimiento. Las pupas se caracterizan por estar en un estado de reposo donde presentan cambios anatómicos y fisiológicos para la finalización de su desarrollo. Respiran gracias a que disponen de un par de trompetas respiratorias que atraviesan el agua, por lo que les permite tener flotabilidad.

Las condiciones de temperatura pueden alargar el periodo de crecimiento y son altamente sensibles a estímulos externos. Finalmente, llega el estado adulto, donde la pupa en estado de reposo logra el endurecimiento del exoesqueleto y sus alas.

Durante el día hay apareamiento entre los machos y las hembras, generalmente solo una vez para el caso de las hembras. Los machos y hembras adultos tienen características que difieren uno de otro por las características de sus antenas; peludas en los primeros y desnudas en las segundas. Las hembras son hematófagas, lo que significa que requieren de proteínas que se encuentran en la sangre para producir sus huevos, siguen los olores y gases emitidos por las personas y disponen de receptores olfativos, táctiles y térmicos que las guían a su sitio de alimentación (Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, 2016).

La duración del ciclo de desarrollo de *Aedes aegypti* depende de las condiciones ambientales, por lo que en condiciones óptimas el ciclo debe durar aproximadamente 10 días. Las formas adultas tienen un promedio de vida de una semana para los machos y un mes para las hembras. Las hembras en condiciones óptimas de alimentación pueden llegar a poner alrededor de 700 huevos durante su vida (Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, 2016).



**Figura 1.** Esquema general del ciclo de vida de *Aedes aegypti*. (Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, 2016).

### 2.2.3.3 Estrategias de control de propagación de *Aedes aegypti*

El mosquito *Aedes aegypti* usa como criaderos multitud de espacios que puedan contener agua y sean pequeños, tanto artificiales como naturales. Algunos recipientes artificiales proliferan grandes cantidades de mosquitos, a diferencia de otros que resultan ser menos productivos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) propone estrategias de control dirigidas a hábitats que sean más favorables para el desarrollo del mosquito, y por tanto, más importantes desde el punto de vista epidemiológico.

Las estrategias de control según las guías de la Organización Mundial de Salud (OMS) incluyen la participación activa de los sectores privados y públicos, haciendo énfasis en la promoción y planificación, en la aplicación de métodos químicos y no químicos, y en el desarrollo de infraestructuras adecuadas para

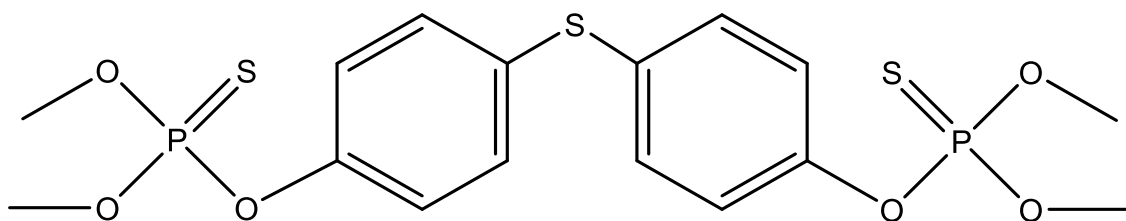


el manejo de vectores. La OMS dentro de su guía expone que un método de control es incidir sobre el desarrollo del mosquito, el cual denominan como "foco". Este método basado en la gestión ambiental, en controles químicos y en controles biológicos; que promueve las transformaciones del entorno con la instalación de sistemas adecuados de agua potable (modificación ambiental), modificaciones en los hábitats del sector (control biológico) y la utilización de larvicidas (control químico), es considerado como el pilar fundamental del control de los vectores. No obstante, el uso constante de larvicidas es tóxico, por lo que la OMS recoge una lista de directrices donde se manifiesta el uso específico de los larvicidas, procedimientos de seguridad, etc (OMS, s.f).

## 2.2.4 Larvicida Temefos

### 2.2.4.1 Generalidades

Temefos, o también llamado Abate, es un larvicida organofosforado no sistémico de baja toxicidad, formulado generalmente en gránulos, usado a nivel mundial por programas gubernamentales de salud pública para el control de enfermedades transmitidas por mosquitos (ORQYMSA, s.f.). El nombre científico del temefos es 0,0,0,0'-tetrametil-0,0'-tio-di-p-fenileno, su fórmula química es  $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$  y su peso molecular es 466.4 g/mol (Olvera, 2013).



**Figura 2.** Estructura química del temefos/Abate.

Este larvicida es poco soluble en agua, por lo que puede aplicarse sobre aguas destinadas al consumo humano sin riesgos para la salud. La dosis de aplicación por lo general es de 1ppm (partes por millón) cada seis semanas o 2ppm si la re-aplicación se hace después de 6 semanas. El temefos ejerce su acción tóxica sobre el sistema nervioso, inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, por lo que hay una acumulación de acetilcolina que causa una interferencia con la transmisión neuromuscular, provocando excitación excesiva de los músculos voluntarios para finalmente causar parálisis (Olvera, 2013).

### 2.2.4.2 Toxicidad para el medio ambiente

El temefos tiene clasificación toxicológica tipo IV, por lo que se considera moderadamente tóxico para aves, sin embargo si se hace el correcto uso de este larvicida no constituye un riesgo real para aves silvestres. Para los organismos acuáticos es variable; en insectos y crustáceos es moderada a extremadamente alta, en peces de ligera a extremadamente alta, en moluscos prácticamente nula a ligera, en anfibios es moderada y en zooplancton ligera. La toxicidad del temefos para estos organismos también depende del tipo de formulación; el grado técnico es considerado moderadamente tóxico, mientras que la emulsión y el polvo (gránulos) son alta a extremadamente tóxico. No se

considera tóxico para las plantas solo cuando se hace bajo condiciones de uso recomendado (INECC, s.f).

### 2.2.4.3 Resistencia de *Aedes aegypti* al larvicida Temefos

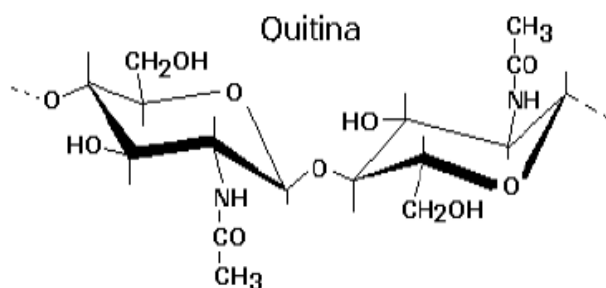
La resistencia a larvicidas es definida como la capacidad que tiene un grupo poblacional de sobrevivir y reproducirse, cuando ha sido expuesto a una dosis letal a la cual anteriormente era susceptible (Villalba, 2009). Los genes de resistencia por lo general se encuentran en frecuencias muy bajas. Por lo que al ser expuestos a la sustancia química, las larvas susceptibles empiezan a desaparecer y predominan aquellos individuos que portan el gen de resistencia, al no tenerse control sobre este factor ocurre un aumento de las larvas resistentes dentro de la población (Rey, 2011).

Existen reportes que indican que *Aedes aegypti* presenta resistencia al exponerse con el larvicida Temefos, estos reportes exponen que algunas enzimas como las esterasas son las principales implicadas en el desarrollo de resistencia a los larvicidas organofosforados (Rodriguez et al., 2006). Otros estudios reportan que la capacidad de la resistencia a los larvicidas se da gracias a un proceso llamado detoxificación dado por la actividad enzimática de las carboxilesterasas (Rodriguez et al., 1999).

## 2.2.5 Quitosano y su aplicación como sistemas de liberación modificada

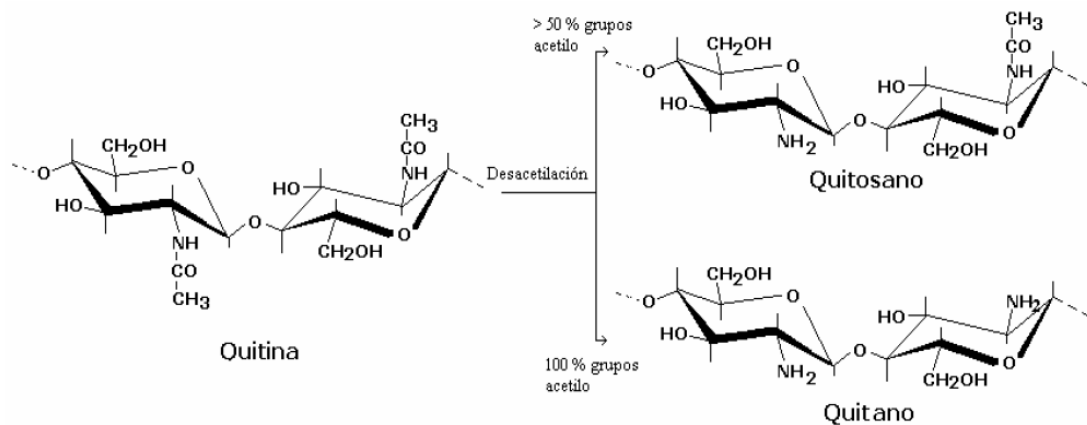
### 2.2.5.1 La quitina y el quitosano

La quitina y el quitosano son considerados como los materiales naturales más usados en la actualidad con un sinfín de aplicaciones que involucran la agricultura, la medicina, el tratamiento de aguas, cosméticos, biosensores, etc. La quitina es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa, se encuentra en las conchas de algunos crustáceos y forman parte del exoesqueleto de los insectos, completamente insoluble en agua y en medio ácido (Lárez, 2006).



**Figura 3.** Unidad repetitiva de la quitina (Lárez, 2006)

Tanto la quitina como el quitosano están relacionados, la quitina es una poli( $\beta$ -Nacetil-glucosamina), la cual, mediante reacciones de desacetilación que elimine por lo menos el 50% de sus grupos acetilo se convierte en quitosano. Cuando la quitina logra el 100% de eliminación de sus grupos acetilo, al polímero formado se le conoce como quitano.



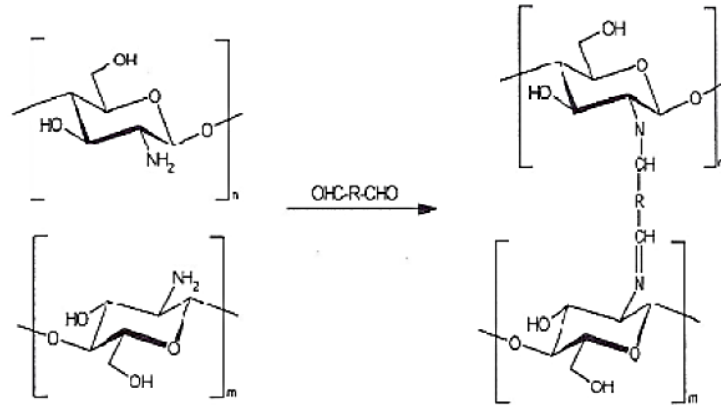
**Figura 4.** Relación estructural entre la quitina, el quitosano y el quitano (Lárez, 2006).

El quitosano por otro lado es un polisacárido catiónico de carácter lineal compuesto por unidades de  $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y  $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa (Nacetil-D-glucosamina), es biodegradable, biocompatible y sensible al pH del medio (Sánchez et al., 2007). El quitosano es insoluble en soluciones acuosas neutras; empero, en soluciones diluidas de ácido acético donde el pH es menor a 6, los grupos amino del quitosano comienzan a protonarse haciendo soluble el polímero cargado (Beltrán, 2010).

### 2.2.5.2 Entrecruzamiento del quitosano

El entrecruzamiento de polímeros es una reacción que implica la formación de una red tridimensional que es formada por la asociación o unión de varias cadenas poliméricas. Esta capacidad de entrecruzamiento de moléculas les proporciona más rigidez y por tanto que las propiedades de resistencia aumenten. El grado de desacetilación del quitosano afecta la formación del entrecruzamiento, esta característica permite su uso en ingeniería debido al aumento de la fuerza del polímero.

Los agentes entrecruzantes poseen dos o más sitios reactivos que permiten que ocurra la reacción, no solo para polímeros sino también para proteínas. El glutaraldehído es un dialdehído que reacciona con el grupo amino del quitosano y entrecruza el polímero (Beltrán, 2010).



**Figura 5.** Entrecruzamiento de las cadenas de quitosano con un dialdehído (Beltrán, 2010).

### 2.2.5.2 Hidrogeles de quitosano y su función como sistemas de liberación controlada

Los hidrogeles son materiales que se obtienen a base de polímeros, se caracterizan por la capacidad de absorber agua (hinchamiento), siendo esta característica muy interesante para la medicina debido a su posible uso como sistema de liberación modificada (Escobar, García, Zaldivar, & Katime, 2002). Estos sistemas pueden cargarse con moléculas activas que son liberadas gracias a procesos que ocurren desde el material polimérico hinchado (cuando absorbe agua) hacia el ambiente externo (Romero, 2011).

Son materiales con aplicaciones en medicina debido a su buena interacción con los tejidos vivos y por propiedades de biocompatibilidad dada por su consistencia blanda, elástica y contenido de agua. También son inertes por lo que células y proteínas no suelen pegarse a su superficie.

Su aplicación como sistemas de liberación modificada, como se mencionó anteriormente, está dada por el agua. Sus características físicas y químicas como capacidad de hinchamiento y cinética de liberación son actualmente estudiadas molecularmente para lograr una optimización. El proceso de obtención determina la capacidad de hinchamiento que el hidrogel va a tener, ya que los poros que se establezcan en las redes poliméricas flexibles formadas, determinarán la cantidad de agua que se puede absorber. Esta flexibilidad está en función de su peso molecular, grado de pureza del polímero y de su concentración en solución acuosa (Romero, 2011).

## 2.3 OBJETIVOS

### 2.3.1 Objetivo general

Estudiar la liberación del larvicida Temefos a partir de hidrogeles de quitosano contra una cepa susceptible y una cepa resistente de *Aedes aegypti*, bajo condiciones de laboratorio.

### 2.3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar matrices poliméricas de quitosano a diferentes concentraciones (1X, 5X y 1X) del larvicida Temefos.
- Determinar la susceptibilidad al Temefos liberado a partir matrices poliméricas de quitosano, de una cepa susceptible y resistente de *Aedes aegypti* en el tiempo, bajo condiciones de laboratorio.
- Determinar la persistencia en el tiempo de acción de los hidrogeles de quitosano a diferentes concentraciones del larvicida Temefos, e identificar si existen diferencias en la mortalidad entre las cepas susceptible y resistente de *Aedes aegypti*.

## 2.4 METODOLOGÍA

### 2.4.1 Reactivos, materiales y equipos empleados.

Para la realización de la síntesis de los hidrogeles se usaron los reactivos presentados en la Tabla 1 y los equipos presentados en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Reactivos empleados durante la síntesis de los hidrogeles

REACTIVO	PUREZA O CONCENTRACIÓN	EMPRESA
Quitosano	98%	Sigma-Aldrich
Ácido acético glacial	99,5%	Sucromiles S.A
Glutaraldehído	25%	Panreac
Etanol	98%	Sigma
Estándar de Temefos o Abate	97,3%	ChemService

**Tabla 2.** Listado de equipos para la síntesis de los hidrogeles de quitosano

EQUIPOS	MARCA
Balanza analítica	Mettler Toledo
Horno calentamiento	Binder
Cabinas de extracción	Esco
Plancha de agitación	VWR
Ultrasonido	Col-Palmer

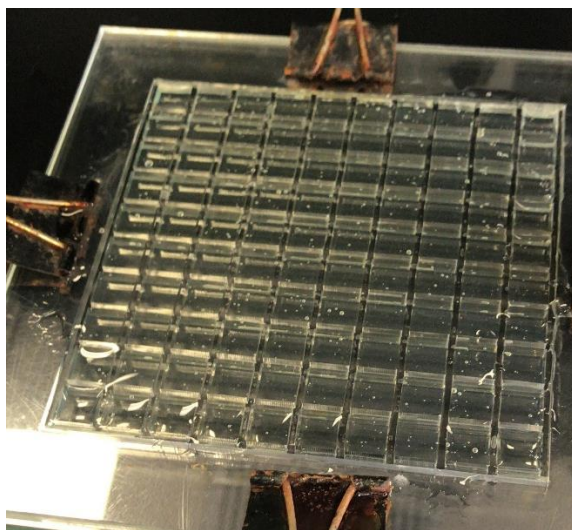
La instrumentación usada para la síntesis de los hidrogeles constaron de: espátulas, vidrios silanizados, rejillas de 10cm x 10cm, beakers de 500mL, micropipetas y puntas de micropipeta.

#### 2.4.2 Síntesis de hidrogeles de quitosano a concentraciones 1X, 5X y 10X de Temefos con entrecruzamiento del 25%

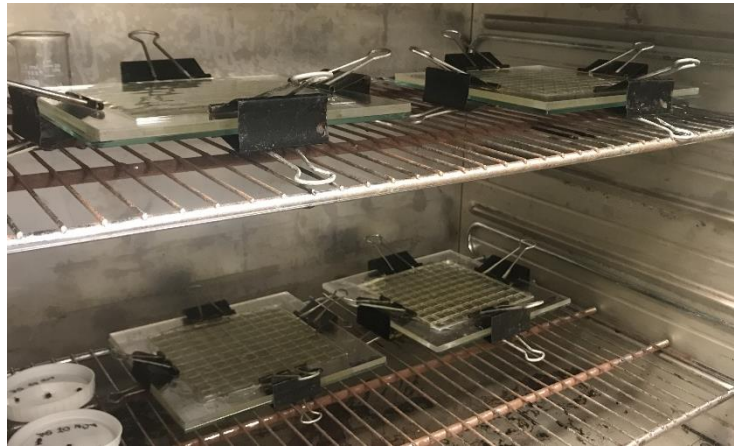
Para la síntesis de los controles de los hidrogeles y de los hidrogeles cargados con el larvicida Temefos, se siguió la metodología presentada por Alejandro Jaramillo Medina en el año 2016 en su trabajo de grado titulado como “Estudio de hidrogeles de quitosano para la liberación de un regulador de crecimiento de larvas de *Aedes aegypti*” (Jaramillo, 2016).

Esta metodología consiste en preparar una solución de quitosano al 3%, empleando como disolvente una solución de ácido acético al 2% bajo agitación constante en una plancha de agitación; este es el caso para los controles, para la síntesis de los hidrogeles cargados solo fue necesario añadir la cantidad necesaria en  $\mu\text{L}$  de la solución de Temefos con ayuda de una micropipeta para poder obtener la concentración deseada; 1X, 5X y 10X respectivamente, donde X hace referencia a la  $DL_{99} = 0.012\text{ppm}$ .

Debido a que el quitosano se solubiliza lentamente, fue necesario con la ayuda de una espátula quitar los grumos formados durante la agitación. Al conseguir una solución homogénea se llevó al ultrasonido. A continuación, se adicionó la cantidad necesaria de glutaraldehído (agente entrecruzante) para obtener un entrecruzamiento del 25%. La adición de este reactivo se hizo bajo agitación constante con un magneto sobre una plancha de calentamiento y añadiendo poco a poco a la solución de glutaraldehído para evitar la formación de burbujas. Después se llevó la solución a un molde de 10cm x 10cm que estaba sobre un vidrio previamente silanizado para evitar la adhesión del hidrogel. Se aseguró el molde al vidrio con 4 caimanes, 1 por cada lado, y se dejó entrecruzar (gelificar) a una temperatura de 28°C en el horno de calentamiento por 2 días (Ver Figura 6 y Figura 7). Para finalizar, se sacaron los hidrogeles del molde, se cortaron y se colocaron sobre un sartén de teflón para llevarlos al horno a una temperatura de 50 °C (Ver Figura 8). Se dejaron por un día más y después se almacenaron en recipientes previamente marcados (Ver Figura 9).



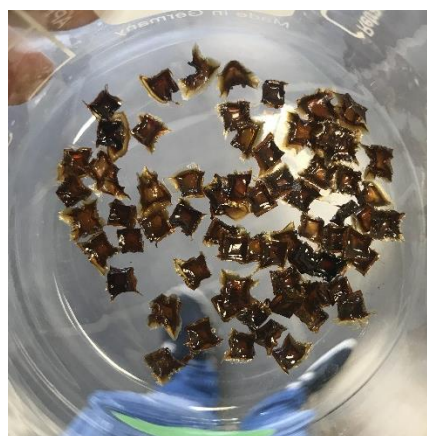
**Figura 6.** Molde con hidrogeles de quitosano.



**Figura 7.** Hidrogeles en horno a 28°C



**Figura 8.** Hidrogeles cortados en sartén de teflón.



**Figura 9.** Hidrogeles secos (xerogeles) en recipiente.

Los cálculos requeridos para la realización de estos hidrogeles se encuentran en el anexo 1.



**2.4.3 Determinación de la mortalidad de los hidrogeles cargados con Temefos; bioensayos en condiciones de laboratorio.**

Los bioensayos de este proyecto fueron realizados en el laboratorio de control de vectores CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas) que está ubicado en el campus de la universidad Icesi. Estos laboratorios cuentan con un insectario, las condiciones ambientales e insumos necesarios para el desarrollo del experimento.

El efecto del larvicida Temefos liberado desde la matriz polimérica se determinó usando 10 larvas en estadios larvarios L2, un vaso plástico con 100mL de agua declorada y el hidrogel evaluado. Se hizo el montaje total de 24 bioensayos, la mitad de los cuales se trabajaron con larvas susceptibles al temefos y la otra mitad con larvas resistentes al temefos (Ver Figura 10). Para cada cepa se realizaron tres ensayos biológicos con cada concentración de Temefos (1X, 5X y 10X); estos estudios se ejecutaron por triplicado. Se estudió el comportamiento de tres vasos control (con hidrogeles, que no están cargados = HC) para cada concentración y el comportamiento de tres vasos control negativo (sin hidrogel = SH). En cada vaso se colocaron diez larvas y se cubrieron el recipiente con una malla asegurada con un caucho (Ver Figura 11). Se adicionó hígado de conejo en solución a los vasos como alimento para las larvas día de por medio. La prueba evaluó el crecimiento y la mortalidad larvaria cada 15 días, periodo en el que se realizaron recambios de agua y de larvas y tomando las respectivas notas cada 2 días. Si después de los 15 días no morían la totalidad de las larvas, se dejaba el recipiente sin hidrogel para observar si el contenido de insecticida lograba erradicarlas. Este estudio duró cerca de 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).

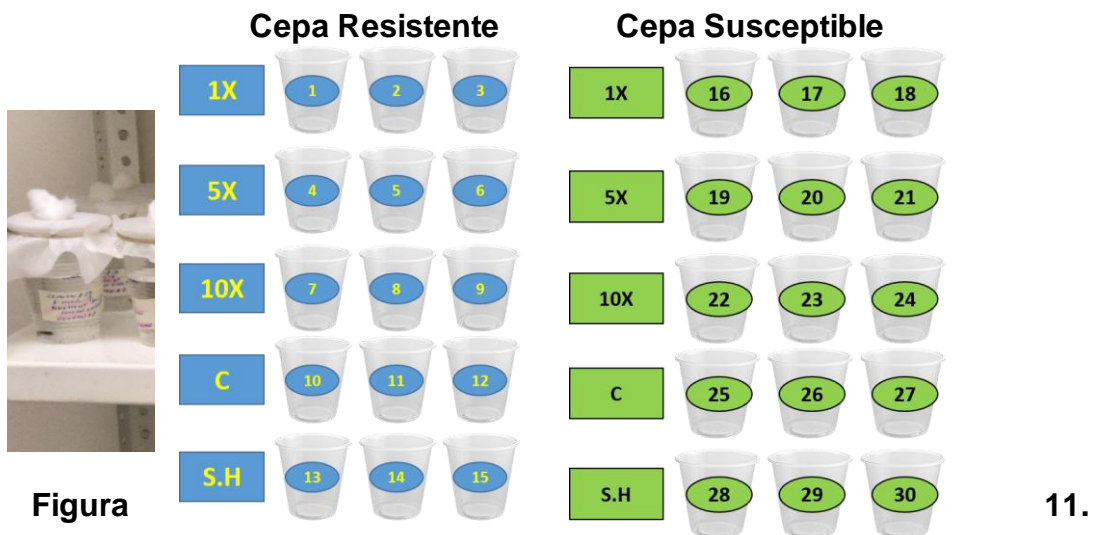


Figura 11. Montaje de larvas de

Figura 10. Diseño experimental del proyecto.

bioensayos de *Aedes aegypti*.

#### **2.4.4 Análisis estadísticos de los resultados obtenidos**

Para identificar si los hidrogeles ejercían su acción inhibitoria sobre las cepas susceptibles y resistentes se realizaron gráficos de tiempo en días VS mortalidad en porcentaje (%). Debido a los problemas presentados durante el desarrollo del proyecto fue imposible realizar más análisis estadísticos. Sin embargo, el análisis estadístico correcto para identificar si existían diferencias entre la mortalidad de ambas cepas habría sido una regresión lineal simple.

## 2.5 MATRIZ DE MARCO LÓGICO

<b>OBJETIVO GENERAL</b>			
Estudiar la liberación del larvicida Temefos a partir de hidrogeles de quitosano contra una cepa susceptible y una cepa resistente de <i>Aedes aegypti</i> , bajo condiciones de laboratorio.			
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>ACTIVIDADES</b>	<b>SUPUESTOS</b>	<b>INDICADORES</b>
Sintetizar matrices poliméricas de quitosano con el larvicida Temefos a concentraciones de 1X, 5X y 10X.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Capacitación para la síntesis de hidrogeles de quitosano (controles).</li> <li>-Capacitación para la síntesis de hidrogeles de quitosano (con larvicida a diferentes concentraciones).</li> <li>-Síntesis de hidrogeles de quitosano (controles y a concentraciones diferentes de larvicida Temefos).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gelificación adecuada de los hidrogeles de quitosano.</li> </ul>	Matrices poliméricas (hidrogeles de quitosano) con diferentes concentraciones de larvicida Temefos sintetizadas.
Determinar la susceptibilidad al Temefos liberado a partir matrices poliméricas de quitosano, de una cepa susceptible y resistente de <i>Aedes aegypti</i> en el tiempo, bajo condiciones de laboratorio.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Realización de bioensayos de larvarios en condiciones de laboratorio (15 días de evaluación).</li> <li>-Recambio de agua y de larvas cada 15 días.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La concentración liberada de larvicida es constante durante el tiempo de estudio.</li> <li>- Los bioensayos realizados con controles no presentan mortalidad asociada a una contaminación</li> </ul>	Frecuencia de mortalidad de las cepas (susceptible y resistente) de <i>Aedes aegypti</i> medida.

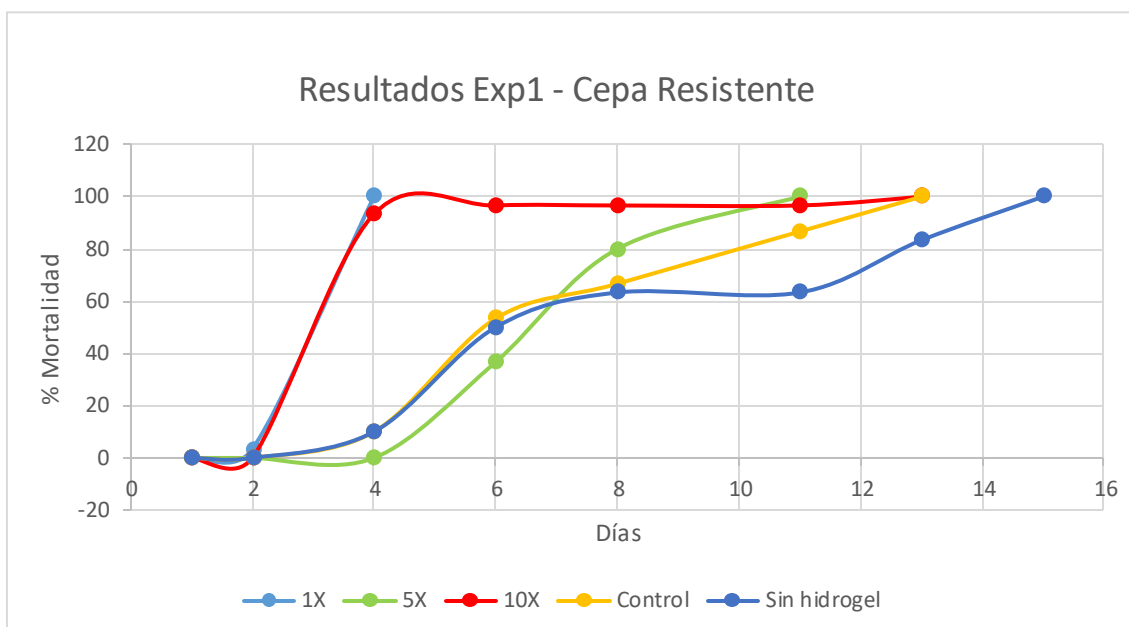
		<p>durante la síntesis.</p> <p>- Los hidrogeles mantienen su forma durante la realización del bioensayo.</p>	
<p>Determinar el tiempo de acción de los hidrogeles de quitosano a diferentes concentraciones del larvicida Temefos, e identificar si existen diferencias en la mortalidad entre las cepas susceptible y resistente de <i>Aedes aegypti</i>.</p>	<p>-Realización de graficas de bioensayos (mortalidad vs días).</p> <p>- Determinación del tiempo de acción de los hidrogeles durante la realización del bioensayo de larvarios.</p> <p>- Determinación de diferencias de la mortalidad entre la cepa resistente y susceptible de <i>Aedes aegypti</i>.</p>	<p>- Se encuentran diferencias significativas en la mortalidad de las cepas susceptibles y resistentes de <i>Aedes aegypti</i> que fueron expuestas a los hidrogeles cargados con Temefos.</p>	<p>- Tiempo de acción de los hidrogeles de quitosano en una cepa resistente y susceptible de <i>Aedes aegypti</i> a diferentes concentraciones del larvicida Temefos medido.</p> <p>- Diferencias en la mortalidad entre las cepas susceptible y resistente de <i>Aedes aegypti</i> determinadas.</p>

## 2.6 RESULTADOS

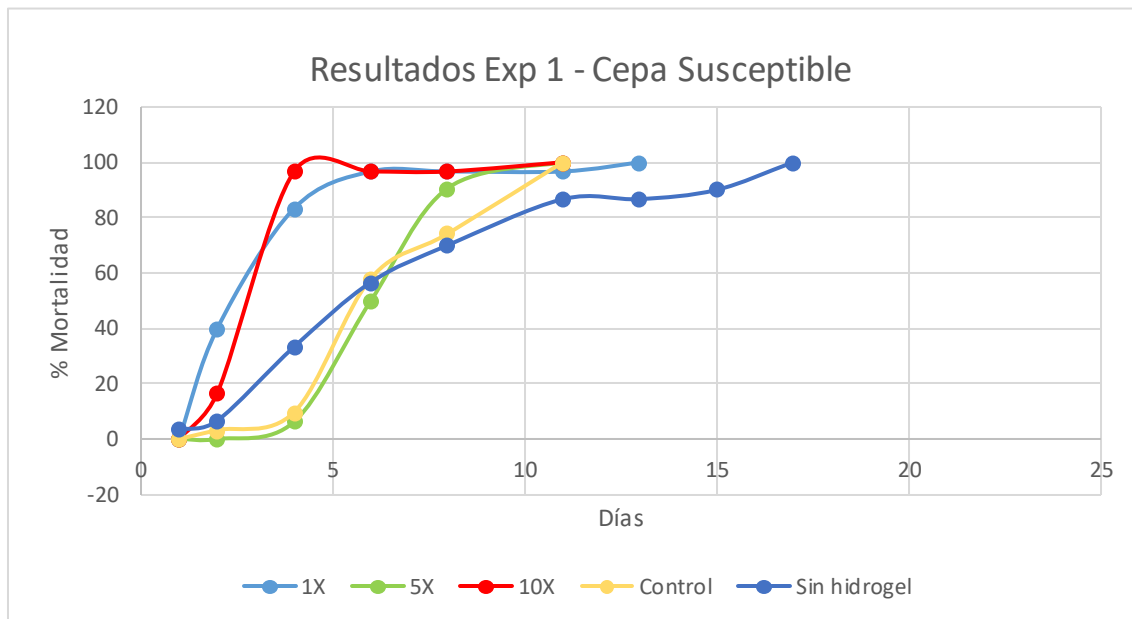
La síntesis de los hidrogeles de quitosano se realizó según la metodología mencionada anteriormente. Cuando se lograron sintetizar los hidrogeles controles (hidrogeles sin insecticida), fueron llevados a CIDEIM para realizar ensayos preliminares y determinar si los componentes del hidrogel mataba las larvas. Al demostrarse que los hidrogeles controles no mataban, se prosigió con la síntesis de los hidrogeles cargados con temefos.

La obtención de los primeros hidrogeles de quitosano cargados con larvicida presentó inconvenientes, ya que durante el primer secado (cuando la solución está vertida en el molde) al pasar los dos días los hidrogeles estaban quemados. Diferenciándose de los controles por tener una coloración oscura, casi negra y una gran dureza haciendo imposible cortarlos para su segundo proceso de secado. Por esta razón, se redujo el tiempo de entrecruzamiento para estos hidrogeles de 48 a aproximadamente 12-13 horas. Al realizarse este cambio, se logró la obtención de las matrices poliméricas cargadas con el larvicida, sin embargo presentó poco rendimiento ya que solo se lograron obtener entre 15-20 hidrogeles por cada 100.

El primer bioensayo (experimento 1) se realizó desde el 6 de marzo hasta el 26 de marzo del 2018. Los resultados de este experimento se expresan en días, que implicaban el conteo en la mortalidad de las larvas (Ver Gráficos 1 y 2).



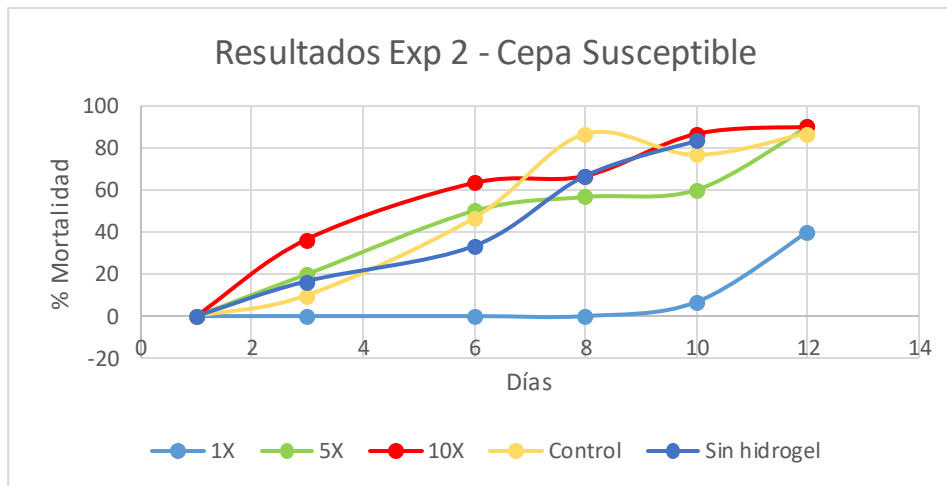
**Gráfico 1.** Experimento 1 – Cepa Resistente de *Aedes aegypti*.



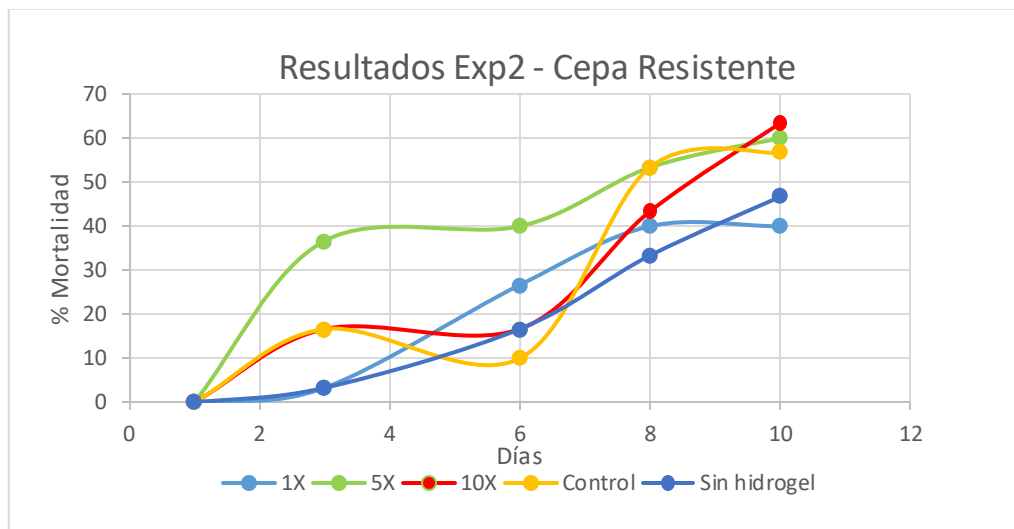
**Gráfico 2.** Experimento 1 – Cepa Susceptible de *Aedes aegypti*

Los resultados de este primer experimento no fueron satisfactorios, ya que indicaban que solamente los hidrogeles 1X y 10X presentaban un patrón de mortalidad asociado a la acción inhibitoria del larvicida y un porcentaje de mortalidad de casi 100% para las larvas en los primeros 4 días. Comportamiento que no presentó el hidrogel 5X que se asoció a una mortalidad entre 0-20% en los primeros 4 días. Adicionalmente, los controles negativos (larvas sin hidrogel) se estaban muriendo y los hidrogeles se estaban fracturando cuando entraban en contacto con el agua. Por lo anterior, se realizó la síntesis de nuevos hidrogeles siguiendo los cambios en el tiempo de entrecruzamiento y la realización de un nuevo experimento con agua comercial marca Cristal. Esto con el fin de corroborar que el agua usada para los bioensayos no estaba relacionada con la muerte de los controles negativos.

El experimento 2 se realizó desde el 21 de marzo hasta el 2 de abril, para este experimento se fue más precavido (mejor lavado y uso de material) debido a los problemas presentados en el experimento 1 (Ver Gráficos 3 y 4).



**Gráfico 3.** Experimento 2 – Cepa Susceptible de *Aedes aedypti*



**Gráfico 4.** Experimento 2 – Cepa Resistente de *Aedes aedypti*.

En el experimento 2 se presentaron las mismas dificultades. Se observó que los hidrogeles 5X y 10X liberaban el insecticida, pero no de manera uniforme. Se evidenció que el hidrogel 1X no mataba, que los controles negativos presentaban una mortalidad casi igual a los hidrogeles 5X y 10X y los hidrogeles cargados con larvicida se seguían partiendo.

Debido a este percance, se decidió realizar un tercer experimento que arrojó resultados similares a los dos experimentos anteriores. Simultáneamente se realizaron dos (2) ensayos con larvas en recipientes de vidrio (beakers) para descartar un posible efecto inhibitorio para los controles negativos debido a los componentes de los vasos plásticos usados en los bioensayos, no obstante estos resultados no fueron satisfactorios ya que las larvas se seguían muriendo.

## 2.7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 1.7.1 Obtención de los hidrogeles de quitosano

La obtención de los hidrogeles cargados con Temefos presentó un cambio en la metodología propuesta por Alejandro Jaramillo; se varió el tiempo de entrecruzamiento debido a que los hidrogeles se estaban quemando (Jaramillo, 2016). Inicialmente se pensó que el origen del problema era el horno de calentamiento, ya que las fluctuaciones de temperatura que se presentaban cuando se abría y cerraba el horno eran de entre  $\pm 2 - 4^{\circ}\text{C}$ , más las fluctuaciones causadas por el aire acondicionado del laboratorio. Sin embargo el horno ya se había usado para experimentos anteriores y las variaciones de temperatura son muy pequeñas, por lo que no se atribuyó este percance al uso del horno.

Por lo anterior se creyó que el cambio en el tiempo de entrecruzamiento había sido el factor asociado al problema del rendimiento de los hidrogeles, ya que las fluctuaciones en el tiempo hacían que los hidrogeles de los bordes del molde se secaran más rápido con un color pardo característico, pero los del centro seguían con una consistencia viscosa y más pálida, por lo que no todos los hidrogeles iban a ser cortados de manera correcta y unos iban a terminar dañados.

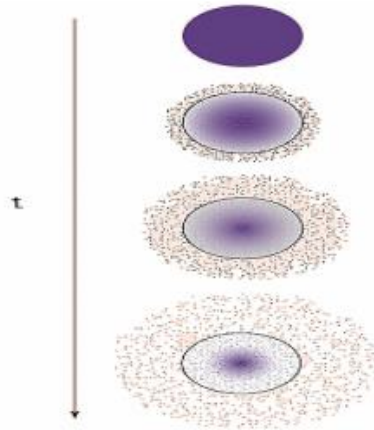
Los resultados de los experimentos 1 y 2 indican que no todos los hidrogeles cargados con Temefos estaban liberando de manera continua el larvicida en el agua, y que los hidrogeles para ambos experimentos se estaban partiendo. Esto revela un posible error durante la síntesis, o que el cambio en el tiempo del secado haya podido ser el causante en el cambio de su estructura física al ser expuesto en agua.

Para este problema hay que analizar 1) si realmente el hidrogel tenía la concentración deseada y estaba liberando el insecticida y 2) las razones por la cual el hidrogel se partía.

Con respecto a la concentración del larvicida y su liberación, el volumen de temefos deseado para cada hidrogel se presenta en el Anexo 1. La base de cálculo que se usó en el anexo, es la misma usada por los proyectos de investigación pasados, por lo que se descarta un error de cálculo.

Los procesos de liberación del hidrogel se ven dados por difusión, erosión e hinchamiento (Ver Figura 12). La difusión ocurre a causa de los poros creados por la red polimérica, los procesos de erosión son solo importantes para aquellas moléculas que sean poco solubles en agua y el hinchamiento se genera cuando el hidrogel entra en contacto con un medio líquido, al ocurrir esto, el hidrogel se hincha o deshinchando dependiendo del balance de fuerzas osmóticas causadas por el agua al entrar a la red, y por las mismas fuerzas elásticas dadas por las cadenas de polímero que se oponen a esa expansión (Escobar K. , 2017)

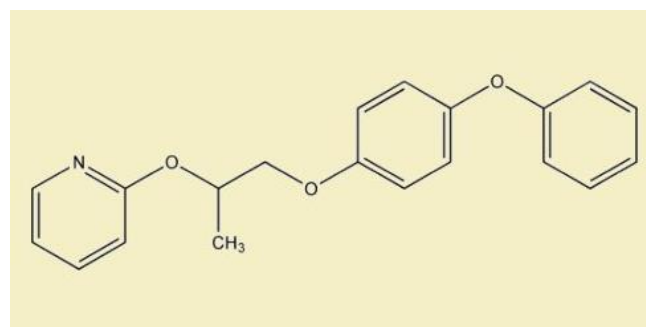




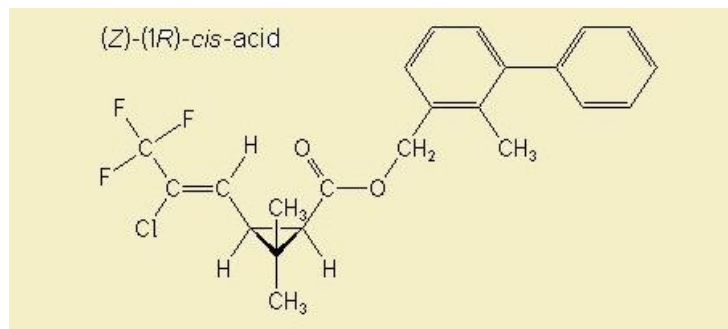
**Figura 12.** Representación esquemática de un sistema de liberación controlada de una molécula activa en el tiempo (Escobar, García, Zaldivar, & Katime, 2002).

Estos procesos de liberación se ven influenciados por la fuerza iónica del medio, esta puede limitar o suprimir la ionización y a su vez causar una disminución del coeficiente de difusión inicial y final. Por tanto, cada componente adicional que afecte la fuerza iónica, ya sea por la presencia de electrolitos pequeños, pueden afectar el comportamiento de la liberación del hidrogel. Teniendo en cuenta que hubo cambio en el agua de la universidad a potable comercial Cristal, es necesario considerar si alguno de los componentes del agua afectó la fuerza iónica del medio y por tanto la liberación del larvicida. No se tiene en cuenta el alimento debido a que este tiene como fin la producción de bacterias para que las larvas puedan alimentarse y este se ha usado en ensayos anteriores.

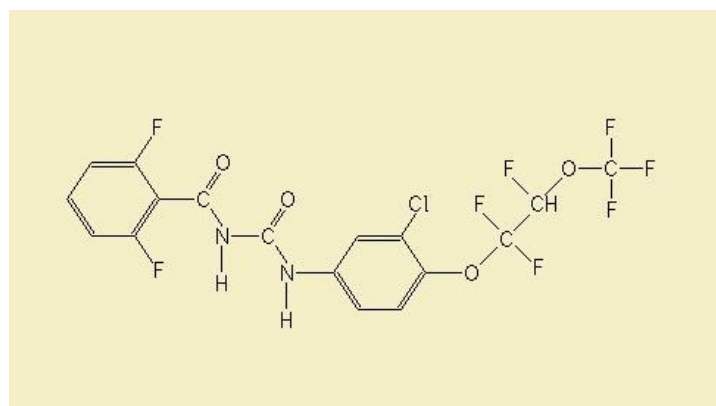
Proyectos de investigación anteriores usaron como moléculas activas Piriproxifen (Silva, 2016), Bifentrina (Jaramillo, 2016) y Novaluron (Escobar K. , 2017). Estas moléculas son caracterizadas por ser polares debido a la naturaleza de su estructura (Ver Figuras 13,14 y 15) (Estivill, s.f).



**Figura 13.** Estructura química Piriproxifén (University of Hertfordshire, s.f)

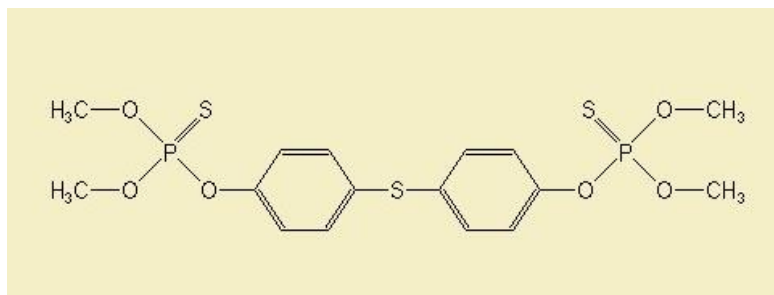


**Figura 14.** Estructura química Bifentrina (University of Hertfordshire, s.f)



**Figura 15.** Estructura química Novaluron (University of Hertfordshire, s.f)

El temefos por lo contrario es una molécula apolar debido a la simetría en su estructura (Ver Figura 16).



**Figura 16.** Estructura química Temefos (University of Hertfordshire, s.f)

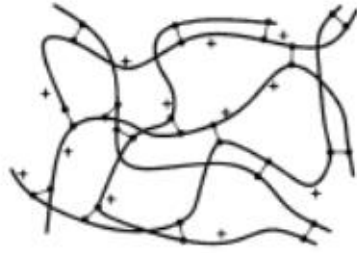
Estudios demuestran que la incorporación de moléculas hidrófilas en la reacción de entrecruzamiento, aporta una mayor cantidad de grupos afines a las moléculas de agua, favoreciendo así la interacción del hidrogel en soluciones acuosas. Sin embargo, si se incrementa la proporción de moléculas hidrófobas el comportamiento es el contrario. Siendo el temefos una molécula apolar, al incorporarse durante la síntesis del hidrogel, favorece el aumento de las interacciones entre las cadenas de polímero y disminuye las interacciones

de la cadena con las moléculas de agua afectando su hinchamiento y en consecuencia la liberación del insecticida (Ramirez et al., 2016).

Cuando un hidrogel se parte es porque este ha perdido sus propiedades. Se debe tener en cuenta que las propiedades del quitosano vienen dadas por el grado de desacetilación, y esta a su vez, influencia el entrecruzamiento que el hidrogel va a tener (Beltrán, 2010). El quitosano usado para este proyecto de investigación es de marca Sigma-Aldrich, con un grado de desacetilación entre el 75-85% según el proveedor. Para la realización de los cálculos y determinar la cantidad de volumen de glutaraldehído (agente entrecruzante) se supuso un grado de desacetilación (GD) igual a 80, haciendo un promedio entre los dos valores entregados por el proveedor. Ese valor de GD=80, puede significar que el quitosano no se encuentre en ese grado de desacetilación y que por tanto, la cantidad de agente entrecruzante no fue la adecuada para los hidrogeles, por lo que su grado y tiempo de entrecruzamiento varió, mostrando una posible razón por la cual el tiempo de secado tuvo que disminuir en casi 36 horas. Aunque el quitosano ya ha sido usado en proyectos anteriores, podría realizarse una caracterización de este para corroborar su grado de desacetilación y determinar la cantidad real de agente entrecruzante para la formación del hidrogel.

Se realizó la lectura de proyectos anteriores evidenciando la utilización de moléculas activas en forma de emulsión (Silva, 2016). Una emulsión según la USP es un sistema bifásico en la que un líquido está disperso sobre otro en forma de pequeñas gotículas, caracterizados por tener una alta viscosidad por el uso de agentes viscosantes (FMC, s.f). La adición de estos agentes viscosantes brindan al hidrogel propiedades mecánicas mucho más marcadas, por lo que entraría a consideración si la solución de temefos en etanol, pudo haber suprimido la elasticidad de las redes poliméricas. Sin embargo, en la Universidad Icesi se realizó la síntesis de los hidrogeles cargados con una solución de etanol hecha desde un estándar que ofreció buenos resultados, adicional a eso, la OMS expone unas directrices las cuales indican el uso de etanol como solvente principal para la realización de soluciones estándares de este insecticida, por lo que el uso de la solución durante la síntesis no atribuye a cambios en el hidrogel desde el punto de vista teórico (Graciela, 2008).

Como se ha venido mencionando, el entrecruzamiento es una reacción que involucra dos unidades estructurales y es el principal parámetro que atribuye en las propiedades de resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, además de brindar una estructura porosa. Las principales interacciones que presenta el hidrogel corresponden a enlaces covalentes, empero, también puede presentar interacciones como enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas, las cuales se forman entre unidades acetiladas del quitosano (Ver Figura 17). No obstante entre mayor sea el grado de entrecruzamiento tienden a prevalecer los enlaces covalentes (Sánchez et al., 2007).



**Figura 17.** Hidrogel de quitosano entrecruzado covalentemente (Sánchez et al., 2007).

Durante la síntesis, el tiempo de gelificación del hidrogel tuvo que disminuirse debido a que estos se estaban quemando. Esta reducción en el tiempo de reacción implica un menor grado de entrecruzamiento y por lo tanto un hidrogel con propiedades físicas y mecánicas diferentes. Anteriormente se expuso que el entrecruzamiento está relacionado con la formación de estructuras porosas, por lo que, al tener un hidrogel con más grado de entrecruzamiento, sus poros van a ser mucho más pequeños (Jaramillo, 2016) y pueden exhibir una marcada reducción en el máximo contenido de agua que pueden almacenar (Ramírez et al., 2016). Durante el hinchamiento las cadenas que conforman la red se estiran, y simultáneamente aparece una fuerza retráctil en oposición al proceso de hinchamiento, ejercida por las cadenas de la red sobre el disolvente contenido en ella. Al no tener un grado de entrecruzamiento específico, el hinchamiento no alcanza un equilibrio entre las fuerzas, el sistema colapsa y se pierde la estructura del hidrogel (Soto & Oliva, 2012).

### **2.7.2 Bioensayos bajo condiciones de laboratorios**

Los experimentos realizados en CIDEIM (experimento 1 y 2) evidenciaron una mortalidad para los bioensayos con hidrogeles cargados, los hidrogeles controles (sin larvicida) y los controles negativos (solo agua). Cuando se realizó el experimento 3 se obtuvieron resultados similares que no permitieron realizar los análisis estadísticos de los datos obtenidos, porque los controles negativos muertos invalidan el resto de los resultados con la premisa de que: si la mortalidad de las larvas está asociada al uso de solamente agua, entonces no es necesario la utilización de matrices poliméricas cargadas con larvicida para ejercer una acción inhibitoria sobre su crecimiento.

En los bioensayos se usaron larvas de *Aedes aegypti* especie Rockefeller (susceptible) y Comuna 18 (resistente) ambos en estadio L2. En el gráfico anterior (Ver Gráfico 3) puede observarse que solo hasta después del día 8 las larvas del bioensayo 1X empiezan a morir. Este comportamiento indica 1) que el hidrogel no está liberando larvicida y 2) que las larvas mantuvieron su estadio larvario por varios días y la teoría indica que entre los 5-7 días estas desarrollan su forma de pupa en condiciones óptimas o sea en condiciones de laboratorio.

Las larvas de *Aedes aegypti* tienen un ciclo de 4 estadios larvales de los cuales los 3 primeros ocurren de manera rápida, mientras que el estadio 4 toma más tiempo junto con un aumento de tamaño y peso. Cuando las larvas se

encuentran en condiciones no favorables (disminución de temperatura, escasez de alimento) el cuarto estadio larval puede prolongarse incluso hasta por 7 meses (Montero, 2009). Las larvas usadas en los experimentos fueron alimentadas con una solución de hígado de conejo. Cada vez que se hacían la lectura de los datos, se aplicaban de 1 a 2 gotas de solución según la metodología. La supervivencia de las larvas susceptibles en el experimento 2 para 1X, puede estar asociado a una baja concentración de alimento, ya que al añadir el alimento desde el recipiente, este no se agitaba y se tomaba de la parte superficial del recipiente, operación que se hizo en algunas ocasiones en otros días de lectura para el resto de los bioensayos. La mortalidad de las demás especies puede estar relacionada por una posible contaminación de la fuente de alimento.

Finalmente se tuvo en cuenta la utilización de vasos para los bioensayos. Los vasos usados fueron desechables plásticos transparentes marca Domingo del Grupo Phoenix hechos de poliestireno (Grupo Phoenix, s.f). Los vasos desechables de plástico por lo general suelen ser no tóxicos para el consumo humano, pero se consideran dañinos para el medio ambiente y su fauna debido a su tiempo de degradación (CIT, 2007). Los ensayos simultáneos realizados junto con el experimento 3, arrojaron resultados no concluyentes, sin embargo se descartaron los vasos como factor asociado a la mortalidad de los hidrogeles controles y los controles negativos.

## **2.8 CONCLUSIONES**

Se logró obtener los hidrogeles controles e hidrogeles cargados con temefos, sin embargo muchos de estos no ejercieron su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las larvas

No se logró hacer análisis estadísticos debido a que los bioensayos controles y los controles negativos estaban muriendo haciendo de los otros resultados obtenidos inválidos.

No se pudo realizar el estudio de la liberación del larvicida Temefos a partir de los hidrogeles de quitosano, ya que todos los hidrogeles con concentración 1X, 5X y 10X exponían un comportamiento diferente con respecto a la mortalidad de las larvas.

No se logró determinar el tiempo de acción de los hidrogeles debido a que estos al estar en contacto con agua, se fracturaban, además de eso, se tuvo que sintetizar nuevos hidrogeles para los experimentos 2 y 3.

El tiempo de entrecruzamiento de los hidrogeles cargados está asociado a la liberación no homogénea del larvicida durante los bioensayos y a la fractura de los hidrogeles al estar en contacto con agua.

## **2.9 RECOMENDACIONES**

Cambiar la presentación inicial del larvicida, de solución a emulsión. El estándar de temefos es muy costoso, además usando el larvicida formulado en emulsión puede significar que las características del hidrogel (resistencia y flexibilidad) se vean favorecidas.

Realizar un estudio de la cinética de la liberación del larvicida Temefos para cada hidrogel y se cuantifique su concentración a través del tiempo por medio es espectrofotometría UV.

Realizar análisis de calorimetría de barrido (DSC) y establecer si existen incompatibilidades entre el temefos y los componentes del hidrogel.

Realizar la caracterización de las materias primas a usar para corroborar sus propiedades y poder desarrollar el proyecto bajo condiciones específicas.

### 3. REFERENCIAS

- Álvarez, L., Briceño, A., & Oviedo, M. (2006). Resistencia al temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) del occidente de Venezuela. *Revista Colombiana* , 172-175.
- Argueta, A., Valle, J., & Marina, C. (2011). Efectos ovicida y larvicida del spinosad en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 269-272.
- Beltrán, J. (2010). *Universidad del Valle*. Obtenido de EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO DEL CAMARÓN TITI Y SU APLICACIÓN EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE UN FÁRMACO: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/4713/1/CB-0441207.pdf>
- CDC. (Septiembre de 2017). *Virus del Zika*. Obtenido de Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades : <https://espanol.cdc.gov/enes/zika/vector/range.html?mobile=nocontent>
- CDC. (S.f). *Ciclo de vida del mosquito Aedes Aegypti*. Obtenido de Colorado : [https://www.colorado.gov/pacific/sites/default/files/OEPR4\\_ZTK\\_MosquitoLifeCycle\\_Spanish\\_1.pdf](https://www.colorado.gov/pacific/sites/default/files/OEPR4_ZTK_MosquitoLifeCycle_Spanish_1.pdf)
- Céspedes, M., Díez, M., Tobías, F., & Tereva, I. (2015). Dengue: manifestaciones clínicas y de laboratorios más frecuentes durante las epidemias 2011-2012 en Trinidad - Bolivia. *Sociedad Boliviana de Pediatría* , 3-9.
- ChemSpider. (s.f). *Temefos*. Obtenido de ChemSpider : <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5199.html>
- Escobar, J., García, D., Zaldivar, D., & Katime, I. (2002). HIDROGELES. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS EN EL DISEÑO DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 1-25.
- Escobar, K. (2017). *ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL LARVICIDA NOVALURON A PARTIR DE UNA MATRIZ POLIMÉRICA DE QUITOSANO*. Cali.
- FMC. (s.f). *Emulsions*.
- Gobierno de Argentina. (s.f). *Argentina*. Obtenido de Zika.
- Goldman, A., Montoya, R., Sinclair, I., Soto, A., & Narvaéz, A. (2007). Costo-efectividad de métodos de control de vectores de malaria sin uso de DDT u otros insecticidas persistentes. *Costo-efectividad de métodos de control de vectores de malaria sin uso de DDT u otros insecticidas persistentes*. México.



Graciela, M. (2008). *Determinación de susceptibilidad o resistencia de larvas de mosquitos a insecticidas*.

INECC. (s.f). *Inecc*. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/temefos.pdf>

INS. (10 de Junio de 2017). *Clasificaciones Climaticas Colombia*. Obtenido de Ministerio de Salud y Protección Social : <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/boletin-clima-03.pdf>

INS. (8 de Abril de 2018). Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2015.pdf>

INS. (2018). *Boletín Clima y Salud*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Boletn%20Clima%20y%20Salud/Bolet%C3%ADn%20clima%20y%20salud,%202018%20Abril.pdf>

INS. (8 de Abril de 2018). *Semana Epidemiológica 15*. Obtenido de Instituto Nacional de Salud: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2018%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2015.pdf>

Jaramillo, A. (2016). *ESTUDIO DE HIDROGELES DE QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN DE UN REGULADOR DE CRECIMIENTO DE LARVAS DE Aedes aegypti*. Cali.

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.

Láres, C. (2003). ALGUNOS USOS DEL QUITOSANO EN SISTEMAS ACUOSOS. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 91-109.

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

Maguiña, C., & Galán-Rodas, E. (8 de Febrero de 2016). El virus Zika: una revisión de literatura. *Acta Médica Peruana*, 35-41. Obtenido de Enfermedad por el virus de Zika: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/zika-virus>

Martínez, E. (2008). Dengue. *Estudios Avanzados*, 33-52.

MINERD. (s.f). *Orientaciones para la comunidad educativa (docentes y estudiantes) sobre Zika, Dengue y Chikungunya*. Obtenido de UNICEF: [https://www.unicef.org/republicadominicana/Guia\\_Un\\_Mosquito\\_web.compressed.pdf](https://www.unicef.org/republicadominicana/Guia_Un_Mosquito_web.compressed.pdf)

- Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. (2013). *Enfermedades Infecciosas: Dengue*. Obtenido de Ministerio de Salud : <http://www.msal.gov.ar/images/stories/epidemiologia/pdf/guia-dengue.pdf>
- Ministerio de Salud Presidencia de la Nación. (2016). *Directrices para la prevención y control de Aedes aegypti*. Obtenido de Ministerio de Salud: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000235cnt-01-directrices-dengue-2016.pdf>
- MinSalud. (s.f). *ABECÉ sobre el virus del Zika*. Obtenido de Ministerio de Salud : <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/V/S/ED/VSP/abc-zika.pdf>
- Olvera, G. (Octubre de 2013). Resistencia a insecticidas en el mosquito vector del dengue *Aedes aegypti* (L) en dos épocas de transmisión de la enfermedad en Mérida, Yucatán.
- OMS. (s.f). *Lucha contra el Dengue*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud : <http://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>
- OMS. (s.f). *Lucha contral el dengue*. Obtenido de WHO: [http://www.who.int/denguecontrol/control\\_strategies/es/](http://www.who.int/denguecontrol/control_strategies/es/)
- ORQYMSA. (s.f.). *PRODUCTOS DE INSECTICIDAS: Themefós*. Obtenido de Organización Química y Médica, S. A.+: <http://orqymasa.com/index.php/productos-de-insecticidas/abate>
- Palomino, M., Solari, L., León, W., Vega, R., Vergaray, M., Cubillas, L., . . . García, N. (2006). Evaluación del efecto residual del temefos en larvas de *Aedes aegypti* en Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp*, 158.
- Rey, G. (2011). *Determinación de los grados de resistencia al insecticida temefos en poblaciones de Aedes Aegypti Linnaeus 1762, (Diptera: Culicidae) y su implicación en la eficacia del insecticida en los departamentos de Cauca, La Guajira, Cundinamarca y Atlántico . Bogotá.*
- Rodriguez, M., Bisset, J., Milá, L., Calvo, E., Díaz, C., & Soca, L. (1999). Niveles de resistencia a insecticidas y sus mecanismos en una cepa de *Aedes aegypti* de Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Medicina*, 83-88.
- Rodriguez, M., Bisset, J., Pérez, O., Ramos, F., & Risco, G. (2006). Modo de herencia de la resistencia a temefos (abate) en *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) de Cuba. *Revista Cubana de Medicina*, 142-147.
- Romero, E. (2011). *Universidad del Valle*. Obtenido de OBTENCIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO A PARTIR DEL MICELIO DE *Aspergillus niger* Y SU ESTUDIO EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE CEFALEXINA:

<http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/3922/4/CB-0439240.pdf>

Sánchez, A., Sibaja, M., Vega-Baudrit, J., & Madrigal, S. (2007). SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DEL CAMARÓN LANGOSTINO (*Pleuroncodes planipes*) CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMEDICAS . *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 241-267.

Sarmiento, M. (2000). Enfermedades Transmisibles en Colombia: Cambios Ambivalentes. *Salud Pública*, 82-93.

UNICEF. (Mayo de 2016). *Control del vector Aedes*. Obtenido de Unicef : [https://www.unicef.org/lac/20161220\\_UNICEF\\_Control\\_Vector\\_Prevention\\_Zika\\_Esp\\_UNICEF.pdf](https://www.unicef.org/lac/20161220_UNICEF_Control_Vector_Prevention_Zika_Esp_UNICEF.pdf)

Villalba, A. (2009). Resistencia a herbicidas. Glifosato. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 169-186.

## ANEXOS

### Anexo 1. Cálculos realizados para la síntesis de los hidrogeles.

#### 1. Preparación de solución de ácido acético al 2%

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

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

#### 2. Preparación de solución de quitosano al 3%

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

Esta solución fue preparada en un beaker de 500mL y como solvente se utilizó la solución de ácido acético al 3% preparada anteriormente.

#### 3. Preparación de solución de glutaraldehído 2,5% a partir de solución de glutaraldehído 25%

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

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

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

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

#### 4. Determinación de la densidad de la solución de glutaraldehído 2,5%

Se tomó como referencia los cálculos realizados en el proyecto realizado por Lorena Ladino en el 2015 y de acuerdo a sus resultados, se usó la densidad para realizar los cálculos posteriores de este proyecto.

**Tabla 3. Datos para determinación de la densidad del glutaraldehído 2,5%**

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

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

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

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

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

Pic.= Picnómetro

Gluta = glutaraldehído

### 5. Cálculos para la síntesis de los hidrogeles con Temefos para el ensayo de laboratorio

- Moles de quitosano

$$100\text{mL sln quitosano} \times \frac{3\text{g quitosano}}{100\text{mL ácido acético 2\%}} \times \frac{1\text{mol quitosano}}{170,376\text{g}} = 0,017608 \text{ moles quitosano}$$

Para poder realizar el cálculo de las moles de quitosano aptas para realizar el entrecruzamiento, se debe tener en cuenta el porcentaje de desacetilación del quitosano, el cual es 80%, proporcionado por el fabricante.

$$\text{Moles quitosano desacetilado} = 0,017608 \text{ moles quitosano} \times 0,80$$

$$\begin{aligned} \text{Moles quitosano desacetilado} \\ = 0,014086 \text{ moles quitosano desacetilado} \end{aligned}$$

A partir de las moles de quitosano desacetilado se realiza el cálculo de las moles de glutaraldehído necesarias para realizar el entrecruzamiento frl 25%.

- Entrecruzamiento 25%

$$0,014086 \text{ moles quitosano desacetilados} \times \frac{1 \text{ mol glutaradehído}}{2 \text{ moles desacetilados}} \times 0,25$$

$$\text{Moles glutaraldehído} = 1,76075 \times 10^{-3} \text{ moles glutaraldehído}$$

**Tabla 4.** Moles de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento

Entrecruzamiento	Moles glutaraldehído
25%	$1,76075 \times 10^{-3}$

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

- Para entrecruzamiento 25%

$$1,76075 \times 10^{-3} \text{ moles gluta} \times \frac{100 \text{ g gluta}}{1 \text{ mol gluta}} \times \frac{50 \text{ g solución}}{2,5 \text{ g gluta}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1,006 \text{ g gluta}}$$

$$\text{mL glutaraldehído} = 3,5 \text{ mL}$$

**Tabla 5.** Volumen de glutaraldehído para entrecruzamiento del 25%.

Entrecruzamiento	Vol. Solución glutaraldehído 2,5% (mL)
25%	3,5

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

- Para cantidad de Temefos

Volumen 100mL para cada bioensayo

$$Dosis\ letal\ 99 = 0,012\ ppm = 0,012 \frac{mg}{L}$$

$$0,012 \frac{mg}{L} \times 0,1L = 1,2 \times 10^{-3} mg\ Temefos$$

Se procede a determinar el volumen del cubo del hidrogel resultante del molde, con el fin de asegurar la concentración necesaria en el volumen total de este.

$$V = l \times l \times l$$

$$V = 1\ cm \times 1\ cm \times 0,5\ cm \times \frac{1\ mL}{1\ cm^3} = 0,5\ mL$$

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

$$Cantidad\ de\ larvicida = \frac{1,2 \times 10^{-3} mg\ Temefos}{0,5\ mL} = 2,4 \times 10^{-3} \frac{mg\ Temefos}{mL}$$

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

$$Cantidad\ Temefos\ necesaria = 2,4 \times 10^{-3} \frac{mg\ Temefos}{mL} \times 100\ mL\ de\ solución = 0,24\ mg\ Temefos$$

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

**Tabla 6.** Cantidad de Temefos de acuerdo a la concentración

Concentración (X=0,55ppm)	Temefos (mg)
1X	0,024
5X	1,2
10X	2,4

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

$$\text{Solución de Temefos} = \frac{100\text{mg Temefos}}{1\text{mL de etanol}}$$

- Para 1X

$$0,024\text{mg Temefos} \times \frac{1\text{mL}}{100\text{mg TEM}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}} = 0,24\mu\text{L solución Temefos}$$

Se diluyó la concentración inicial de la solución de Temefos a una concentración de 1mgTemefos/mL etanol

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$\left(\frac{100\text{mg Temefos}}{1\text{mL etanol}}\right) \times 100\mu\text{L} = \frac{1\text{mg Temefos}}{\text{mL}} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{\left(\frac{100\text{mg Temefos}}{1\text{mL etanol}}\right) \times 100\mu\text{L}}{\frac{1\text{mg Temefos}}{\text{mL}}}$$

$$V_2 = 10000\mu\text{L} (100\mu\text{L estándar} + 9900\mu\text{L etanol})$$

- Para 1X

$$0,024\text{mg Temefos} \times \frac{1\text{mL}}{1\text{mg Temefos}} \times \frac{1000\mu\text{L}}{1\text{mL}} = 24\mu\text{L solución Temefos}$$

**Tabla 7.** Cantidad de Temefos de acuerdo a la concentración y entrecruzamiento.

<b>Concentración (X=0,012ppm)</b>	<b>25%</b>
	<b>Temefos (μL)</b>
<b>1X</b>	24
<b>5X</b>	120
<b>10X</b>	240



