

**LIBERACIÓN CONTROLADA DEL LARVICIDA NOVALURON, EMPLEADO EN
EL CONTROL DE VECTORES DE ENFERMEDADES TROPICALES, A PARTIR
DE HIDROGELES DE QUITOSANO**

STEPHANIE FALLA FLÓREZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2015**

**LIBERACIÓN CONTROLADA DEL LARVICIDA NOVALURON, EMPLEADO EN
EL CONTROL DE VECTORES DE ENFERMEDADES TROPICALES, A PARTIR
DE HIDROGELES DE QUITOSANO**

STEPHANIE FALLA FLÓREZ

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

**TUTORAS:
NORA ELENA VALDERRUTEN Ph.D
CLARA BEATRIZ OCAMPO Ph.D**

**ASESOR:
EDUARDO RUIZ Ph.D**

**SANTIAGO DE CALI
2015**

APROBADO POR:

**Nombre correspondiente
Evaluador**

**Nombre correspondiente
Evaluador**

**Nombre correspondiente
Director del proyecto**

**Nombre correspondiente
Co-director del proyecto**

Ciudad de fecha y entrega (día, mes y año)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar le agradezco a mi tutora Nora Elena Valderruten por su dedicación y apoyo incondicional. Su orientación, paciencia, persistencia y motivación fueron las bases fundamentales para la realización de este proyecto y mi formación como investigadora. A mi cotutora Clara Ocampo le agradezco por su apoyo y compromiso permanente con el proyecto.

Gracias a Eduardo Ruiz, Guillermo Montoya y Luis E. Ramírez por su colaboración y gran solidaridad ya que dedicaron de su tiempo para compartirme sus conocimientos. Quiero agradecerle a mi familia, principalmente a mis padres por su apoyo. También a mis compañeros por su colaboración permanente.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA TABLAS	6
LISTA DE GRÁFICAS.....	7
LISTA DE IMÁGENES	8
RESUMEN DEL PROYECTO	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	15
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	15
2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	17
2.3 OBJETIVOS.....	25
2.3.1 OBJETIVO GENERAL	25
2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2.4 METODOLOGÍA	26
2.4.1 MATERIALES Y REACTIVOS.....	26
2.4.2 SÍNTESIS DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN (HIDROGEL/LARVICIDA) 26	
2.4.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS LARVARIOS	28
2.4.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	29
2.4.5 MATRIZ DE MARCO LÓGICO.....	30
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
2.5.1 OBTENCIÓN DE HIDROGELES.....	32
2.5.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS	32
2.6 CONCLUSIONES	39
2.7 RECOMENDACIONES.....	40
3. BIBLIOGRAFÍA.....	41

LISTA TABLAS

Tabla 1. Casos clínicos de dengue clásico reportados entre el año 1990 y el año 2003.....	17
Tabla 2. Tasa de persona afectadas por dengue hemorrágico entre el año 1990 y el año 1999.....	18
Tabla 3. Características de absorción UV dependiendo de las condiciones de pH.....	22
Tabla 4. Reactivos utilizados en la síntesis de los hidrogeles.....	26
Tabla 5. Valor p para larvas, pupas y adultos para la comparación de los tres bioensayos por cada entrecruzamiento en el periodo 1.....	33
Tabla 6. Valor p para larvas, pupas y adultos para la comparación de los tres bioensayos por cada entrecruzamiento en el periodo 2.....	33
Tabla 7. Análisis factorial para los dos periodos.....	34
Tabla 8. Análisis de mortalidad de larvas en los dos periodos independientemente del % de entrecruzamiento.....	34
Tabla 9. Análisis mortalidad de pupas en los dos periodos independientemente del % de entrecruzamiento.....	34
Tabla 10. Análisis de mortalidad de adultos en los dos periodos independientemente del % de entrecruzamiento.....	34
Tabla 11. Análisis factorial del comportamiento de la mortalidad de larvas dependiendo del % de entrecruzamiento en cada periodo.....	35
Tabla 12. Análisis factorial del comportamiento de la mortalidad de pupas dependiendo del % de entrecruzamiento en cada periodo.....	35
Tabla 13. Análisis factorial del comportamiento de la mortalidad de adultos dependiendo del % de entrecruzamiento en cada periodo.....	35
Tabla 14. Datos para la determinación de la densidad de la solución de glutaraldehído 8,3%.....	44
Tabla 15. Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% para los hidrogeles sin Novaluron.....	46
Tabla 16. Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% para los hidrogeles con Novaluron.....	48
Tabla 17. Volumen de Novaluron, agua y solución de glutaraldehído 8,3 % para el mix.....	48
Tabla 18. Valor P del análisis de varianzas y prueba de normalidad para larvas, con los diferentes entrecruzamientos en los dos periodos.....	50

LISTA DE GRÁFICAS

Grafica 1. Mortalidad acumulada de larvas para los diferentes entrecruzamientos en el periodo 1	37
Grafica 2. Mortalidad acumulada de larvas para los diferentes entrecruzamientos en el periodo 2	38
Grafica 3. Comparación de mortalidad de larvas en los dos periodos evaluados.	38

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	20
Imagen 2. Estructura química del Novaluron	21
Imagen 3. Estructura química del quitosano	24

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cálculos de la síntesis de los hidrogeles	44
Anexo 2. Formato de documentación del ensayo biológico	49
Anexo 3. Análisis estadístico de normalidad e igualdad de varianzas para los datos del ensayo biológico	50

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Síntesis de sistemas de liberación	27
--	----

RESUMEN DEL PROYECTO

El dengue y el chikungunya son enfermedades infecciosas agudas, producidas por un virus, el cual es transmitido especialmente por la picadura del mosquito infectado *Aedes aegypti* y pueden afectar a personas de cualquier edad, desde neonatos hasta adultos. Los mosquitos hembras depositan aproximadamente 80 a 150 huevos, en depósitos de agua limpia y cualquier recipiente que almacene agua, ya sea que se encuentre a la intemperie o dentro de las casas. En estos depósitos se desarrollan las larvas y posteriormente pasan a la forma adulta, la transmisora del virus. (Organización Mundial de la Salud, 2014)

En Colombia, uno de los principales criaderos del mosquito son los sumideros, que tienen como propósito evacuar aguas residuales, lo que los convierte en lugares idóneos para mantener su constante proliferación. Diferentes larvicidas comerciales han sido exitosos en el control de mosquitos en los sumideros, pero no han presentado un largo tiempo de efectividad debido al constante recambio de agua. Una solución innovadora a la problemática de la incontrolable proliferación del mosquito, es la liberación controlada de larvicidas, que en este caso se evaluó a partir de hidrogeles de quitosano.

Con la finalidad de proporcionar una solución ante la proliferación del mosquito, se incorporó el larvicida comercial Novaluron en tres hidrogeles de quitosano que presentan diferente grado de entrecruzamiento: 25%, 50% y 75%. El larvicida fue incorporado en esta matriz polimérica de manera directa durante su síntesis. Se realizó un ensayo biológico con larvas de *Aedes aegypti* en estadio L1-L2 con el objetivo de realizar un contraste entre: la mortalidad de las larvas y la liberación del larvicida de acuerdo al porcentaje de entrecruzamiento. A los hidrogeles se les realizó un cambio del medio acuoso cada 15 días para simular los cambios de agua que se sufren en los sumideros debido a la lluvia.

A partir de los resultados obtenidos en los dos periodos evaluados, cada uno de 15 días, se determinó que el hidrogel más eficaz en el periodo 2 fue el que presentaba un entrecruzamiento del 75% debido a la alta mortalidad de larvas en comparación con los otros entrecruzamientos en ese mismo periodo. En el periodo 1 no se determinó cual hidrogel fue el más eficaz, ya que la mortalidad de larvas para los tres entrecruzamientos no presentó diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, se recomienda que se continúe el ensayo para determinar si la eficacia de este hidrogel continúa en el tiempo. Al realizar la comparación del comportamiento de cada entrecruzamiento en los dos periodos, se observó que la mortalidad para todos los entrecruzamientos disminuyó en el periodo 2, aunque la diferencia no fue significativa estadísticamente para el hidrogel con entrecruzamiento 75% en comparación con los otros entrecruzamientos.

ABSTRACT

Dengue and chikungunya are acute infectious diseases, especially transmitted by the sting of infected *Aedes aegypti* mosquito and can affect people of any age, from infants to adults. Female mosquitoes lay about 80-150 eggs in clean water tanks and any vessel that stores water and be outdoors. In these deposits the larvae are develop and subsequently passed to adults, which is how the virus.

In Colombia, the major mosquito breeding sites are evacuating wastewater sinks, which makes them ideal locations to maintain its steady growth. Different commercial larvicides have been successful in controlling mosquitoes in these places, but did not have an effective long time due to constant water exchange. An innovative solution to this problem is the controlled release of larvicides using hydrogels, which in this case was evaluated from hydrogels of chitosan.

In order to provide a solution to the proliferation of mosquito, the commercial larvicide called Novaluron was incorporated in three chitosan hydrogels where different crosslinking degree were use: 25%, 50% and 75%. The larvicide was incorporated in this polymer matrix directly during its synthesis. A bioassay with larvae of *Aedes aegypti* L1-L2 stage in order to make a contrast between performed the mortality of larvae and the release of the larvicide according to the percentage of cross-linking present in the hydrogels. The aqueous medium where hydrogels released the larvicide was changed every 15 days to simulate the changes of water in sinks suffer due to rain.

The results obtained in the two evaluate periods (every 15 days each) determinate that the hydrogel who present the best behavior was the one who presented a 75% cross-linking due to the high mortality of larvae compared to the others materials. The first period didn't show which hydrogel was the most effective, since the statistical analysis told us that there is no difference between the 3 materials in this period. However, testing should be conducted to determine the effectiveness of the hydrogel over the time. Comparing the behavior of each material in the remaining two periods, was observed that the mortality decreased in the second period, although the difference was not significative.

1. INTRODUCCIÓN

El dengue y el chikungunya son dos enfermedades con principal incidencia en zonas tropicales y subtropicales, característica relevante de Colombia. El dengue no es una enfermedad nueva, es una enfermedad que está causando problemas de salud desde el año 1990 y los casos aumentan de manera significativa anualmente, esta enfermedad presenta elevada mortalidad y morbilidad. (Rodríguez, J., Ortíz, Y., Rodríguez, R., 2006. Bogotá. rev. fac. med. vol. 54 no. 2). El chikungunya es una enfermedad que en épocas anteriores ha afectado diferentes países no cercanos a Colombia y aunque ha afectado a millones de personas no ha sido clasificada como una enfermedad mortal. (De la Hoz, J.; Bayona, B.; Viloria, S.; Accini, J.; Vergara, H.; Viasus, D., 2015) Sin embargo, en Colombia este virus ha presentado alta morbilidad a razón de que los colombianos presentan vulnerabilidad por ser un virus nuevo (Instituto Nacional de Salud, 2015).

El chikungunya se ha convertido en un problema de salud pública alarmante, puesto que en poco tiempo el número de personas afectadas ha sido bastante alto. El primer caso fue identificado el 22 de Julio de 2014 (Instituto Nacional de Salud, 2014) y al 15 de Marzo de este año se han confirmado 225.050 casos por este virus, sin tener en cuenta las personas que son afectadas y no van al médico. Además, los fallecidos hasta Diciembre de 2014 fueron 3 y pasaron a ser 22 hasta el 29 de Mayo de este año. (Organización Mundial de la Salud, 2015) Cabe resaltar que el virus puede afectar a cualquier persona, pero presentan más vulnerabilidad las personas con edad avanzada y las mujeres embarazadas, las cuales pueden transmitirle el virus al bebé dependiendo de la etapa del embarazo y pueden nacer con problemas neurológicos, síntomas hemorrágicos y enfermedad del miocardio. (Gérardin, P.; Barau, G.; Michault, A.; Bintner M.; i, 2008)

El vector transmisor de estas enfermedades es el mosquito *Aedes aegypti*, el cual se caracteriza por reproducirse en depósitos naturales y artificiales de agua. Por ello, entre las opciones para reducir la proliferación del mosquito se contempla la disminución de depósitos de agua, esto requiere la capacitación de la comunidad y no ha resultado muy efectivo. Se debe recurrir a otras estrategias para encontrar una solución para este problema, entre ellas se encuentra la aplicación de insecticidas para prevenir que los huevos emerjan a adulto o aplicarlos a los mosquitos adultos, para evitar que siga el ciclo de transmisión de estas enfermedades y disminuir las personas afectadas (Giglio, N., Fernandes, D., Valle, D., Pereira, J., 2012. Rio de Janeiro vol. 107 no. 3).

Para evitar el crecimiento de este mosquito se ha utilizado larvicidas organofosforados, pero el mosquito ha adquirido resistencia debido al uso continuo. Ante este obstáculo mundial, el Programa Nacional de Control de Dengue, del Ministerio de Salud de Brasil (PNCD/MS) aprobó el uso de larvicidas alternativos como los reguladores de crecimiento de insectos (IGR), que ya estén evaluados por PNCD/MS (bajo condiciones climáticas y operacionales de Brasil) y

aprobados por la OMS para su uso en agua potable. El Novaluron es uno de estos compuestos, lo cual lo hace un compuesto de interés (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2009). El Novaluron pertenece al grupo de los IGR, los cuales actúan en la metamorfosis del insecto principalmente en estadio larvario y pupa, inhibiendo la síntesis de quitina; no permite que se realice la muda entre las etapas del ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Con esto se espera que el huevo del mosquito no llegue a adulto (Farnesi, 2012). Cabe resaltar que el Novaluron es uno de los larvicidas que no presenta resistencia en estos mosquitos en Colombia, por eso hace parte de las actividades permanentes del control de este mosquito.

En el Valle del Cauca, uno de los principales criaderos de *Aedes aegypti* son los sumideros ya que por su diseño hay agua presente todo el tiempo, lo que permite la proliferación continua del mosquito. Debido al recambio constante de agua en los sumideros el tiempo de efectividad de los diferentes larvicidas es muy corto; aproximadamente 15 días, ante esta problemática de la ineffectividad de la aplicación de los larvicidas en los sumideros, se realiza la síntesis de hidrogeles de quitosano para tener una liberación modificada y permitir que la liberación del larvicida se mantenga en el tiempo. Los hidrogeles son redes de polímeros reticulados con la característica de presentar alto número de grupos hidrófilos, los cuales tienen alta afinidad por el agua pero sin llegar a la disolución. En este caso los hidrogeles son de quitosano, un polisacárido que se encuentra en el exoesqueleto de insectos y crustáceos y tiene la ventaja de ser biodegradables, biocompatibles y presentan baja toxicidad. (Bhattari, 2010)

Los sistemas de liberación controlada permiten que un compuesto activo sea liberado de una forma uniforme y equilibrada, reduciendo el riesgo de exceso, la frecuencia de aplicación y posibles errores en la aplicación. Los hidrogeles se han estudiado como sistemas de liberación controlada de diferentes sustancias bioactivas; sin embargo, su uso en la liberación de sustancias biocidas se ha limitado a algunos pesticidas y herbicidas. El uso de hidrogeles permitiría extender el tiempo de vida de estos productos, reducir el número de aplicaciones, el consumo del producto, el personal que realiza las aplicaciones y el efecto ambiental. Este proyecto busca evaluar los hidrogeles de quitosano en la liberación controlada *in vitro* de dos inhibidores de crecimiento comerciales para el control de larvas de mosquitos.

2 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Es la liberación controlada de larvicidas a partir de hidrogeles de quitosano una forma eficiente de mantener la concentración constante de larvicida a través del tiempo para evitar la proliferación del mosquito?

El dengue y el chikungunya están presentes en todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta. En los últimos años, la transmisión ha aumentado predominantemente en zonas urbanas, se ha convertido en un problema significativo de salud pública y en una de las causas principales de hospitalización y muerte personas vulnerables en estas regiones.

En los últimos años, ha aumentado de manera significativa el número de personas infectadas por el dengue. Ahora esta enfermedad es endémica en más de 100 países. Más de 2500 millones de personas presentan riesgo de adquirir dengue. Se producen anualmente aproximadamente entre 50 y 100 millones de infecciones en el mundo, principalmente los niños requieren hospitalización y un 2,6% fallecen. (Rodríguez, R, 2002) Actualmente, se tiene gran preocupación acerca de la transmisión del virus del chikungunya, pues este virus ha afectado a más de 700.00 personas en América Latina y se ha detectado en casi 40 países del mundo y causa alta morbilidad. (Caracol, 2015) Cabe resaltar que Colombia es uno de los países con aumento significativo en las personas afectada y fallecidas, principalmente en la Costa Caribe un principal sitio turístico, lo que podría llegar a generar una pandemia. No hay un tratamiento específico para estas enfermedades, el tratamiento consiste en tratar los síntomas (Revista Semana, 2015).

La gravedad de la situación es tal que Ministros de Salud de los países del Continente Americano aprobaron la resolución CD39.R11, que establece un mandato hacia los gobiernos para elaborar un Plan Continental con el fin de erradicar *Aedes aegypti* (Rodríguez, R, 2002).

Aunque el dengue es un problema que lleva afectando la comunidad desde hace muchos años, el chikungunya es otro virus que actualmente afecta a muchos países, algunas veces causando hasta la muerte. Estas enfermedades tropicales causadas por el virus que transmite el vector *Aedes aegypti* son peligrosas ya que una vez afecte a algún país no se puede disminuir rápidamente las personas afectadas. Como se mencionó anteriormente se ha intentado evitar la proliferación del mosquito utilizando métodos convencionales como la utilización de insecticidas en los criaderos de este vector, pero no ha sido efectivo por la resistencia que han creado los mosquitos ante los larvicidas comunes, por estas razones se plantea la liberación controlada del larvicida Novaluron a partir de hidrogeles de quitosano como una forma innovadora de contribuir a la solución de este problema. Se ha evidenciado que el Novaluron es efectivo ante la proliferación de *Aedes aegypti* ya

que no presenta resistencia a dicho larvicida, cabe aclarar que este larvicida presenta la ventaja de no ser toxico para otras especies ni para los seres humanos. Este proyecto será generador de conocimientos valiosos que a futuro contribuirán a la reducción de la proliferación del mosquito y al mejoramiento de la salud pública.

2.2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

El dengue es una enfermedad de interés para la salud pública en Colombia, ya que presenta alta mortalidad y morbilidad. Los múltiples factores que dan una explicación acerca de su habitual comportamiento son: aumento de la transmisión, ciclos epidémicos cada vez más frecuentes, circulación simultánea de los cuatro serotipos del virus, la infestación por el vector en más del 90% del territorio nacional y falta de saneamiento básico en zonas urbanas. (Maestre, 2014)

El dengue es una infección viral, con principal incidencia en zonas tropicales y subtropicales, transmitida por mosquitos; de la especie el *Aedes aegypti*. El dengue presenta 4 tipos serológicos diferenciados (dengue 1, 2, 3 y 4), los cuales son transmitidos a los humanos por la picadura de un mosquito infectado. Se pueden evidenciar amplias manifestaciones clínicas de este virus, que pueden ir desde cuadros asintomáticos hasta cuadros hemorrágicos. Anteriormente el dengue se clasificaba de la siguiente manera: dengue clásico, dengue hemorrágico y síndrome de choque causado por dengue. (U.S.department of health and human services, 1980). Actualmente, se clasifica en dengue y dengue grave. (Ministerio de Salud , 2013)

Colombia, debido a su clima tropical, ha presentado un incremento anual considerable en el número de personas afectadas por el dengue. A continuación en la Tabla 1 se podrá observar el número de casos reportados de dengue clásico en Colombia desde el año 1990.

Tabla 1. Casos clínicos de dengue clásico reportados entre el año 1990 y el año 2003¹

CASOS CLÍNICOS	AÑO
17.839	1990
15.103	1991
20.130	1992
25.585	1993
27.274	1994
18.398	1995
29.280	1996
30.552	1997
57.956	1998
20.322	1999
180.1/100.000 habitantes	2002
176.2/100.000 habitantes	2003

¹ Información tomada de: (Rodríguez, J.,Ortíz, Y.Rodríguez, R., 2006.Bogotá. rev.fac.med.vol.54 no.2)

Entre los años 1991-1992 se detectaron personas afectadas por el dengue hemorrágico, los respectivos datos se pueden observar en la siguiente tabla:

Tabla 2. Tasa de persona afectadas por dengue hemorrágico entre el año 1990 y el año 1999²

Tasa de personas afectadas	AÑO
0.11/100.000 habitantes	1990
12.4/100.000 habitantes	1998
2.6/100.000 habitantes	1999

Al igual que el dengue, la fiebre chikungunya es una enfermedad vírica transmitida al ser humano por el mosquito infectado *Aedes aegypti*. (Organización Mundial de la Salud, 2015) Esta enfermedad se está convirtiendo en un problema de salud pública en muchos países, aunque no es considerada como una enfermedad potencialmente mortal puede causar una morbilidad preocupante. (De la hoz, J.; Bayona, B.; Vilorio, S.; Accini, J.; Vergara, H.; Viasus, D., 2015) El chikungunya tuvo origen en África, Asia y el subcontinente indio, el primer caso que se evidenció en África fue en 1950 y en los últimos decenios los vectores se han propagado a Europa y a las Américas (Thiberville, S.; Moyon, N.; Dupuis, L.; Nougairede, A.; Gould, E.; Roques, P.; Lamballerie, X., 2013). En el 2007 se evidenció la transmisión de la enfermedad a Europa por primera vez, en un brote al nordeste de Italia, desde ese momento se evidenciaron brotes en Francia y Croacia. En Colombia, se reportaron aproximadamente 100.000 casos a finales de Diciembre de 2014.

Esta enfermedad es caracterizada por la aparición de fiebre súbita acompañada de dolores articulares. Adicionalmente aparecen dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. Los dolores en articulaciones son muy debilitantes e incapacitantes. Las manifestaciones clínicas tienen alta variabilidad y pueden llegar a ser graves. El nombre chikungunya viene del idioma Kimakonde que significa doblarse, debido a que los pacientes tienden a encorvarse como respuesta a los dolores articulares. Algunas de las manifestaciones clínicas son iguales a las del dengue por lo que pueden presentarse confusiones a la hora de diagnosticar, en las zonas donde son frecuentes estas dos enfermedades.

Generalmente, los pacientes se recuperan de los síntomas; hasta el momento esta enfermedad no tiene cura y el tratamiento tiene como objetivo aliviar los síntomas. Sin embargo, algunas veces se evidencian dolores articulares que pueden variar desde meses hasta años. Además, se ha evidenciado que en algunos casos se puede llegar a tener complicaciones oculares, neurológicas, cardíacas y gastrointestinales. No es frecuente que las personas presenten complicaciones graves pero en algunos casos puede causar la muerte. En el caso de nuestro país,

² Información tomada de: (Rodríguez, J.,Ortíz, Y.Rodríguez, R., 2006.Bogotá. rev.fac.med.vol.54 no.2)

inicialmente se estimaba que este virus no provocaría la muerte de ninguna persona, pero, hasta el 29 de Diciembre de 2014 fallecieron 3 personas y hasta el 29 de Mayo de 2015 fallecieron 22 personas. (Organización Mundial de la Salud, 2015).

En Colombia actualmente se evidencia una epidemia por este virus, debido a que los colombianos son vulnerables a esta enfermedad ya que es un virus nuevo. Aunque no se ha afectado la población total del país, el virus circula en 31 de los 32 departamentos del país. El Instituto Nacional de Salud ha confirmado por pruebas de laboratorio 10.453 casos nuevos con lo que el número de personas afectadas por el virus llega a 225.050 (Instituto Nacional de Salud, 2015). El primer caso de chikungunya en Colombia se confirmó el 22 de Julio de 2014, pero no se tiene conocimiento de cuantas personas están infectadas, puesto que muchas de ellas no asisten a centros de salud debido a muchos factores sociales y económicos. (Instituto Nacional de Salud, 2014) Una de las zonas más afectadas es la Costa Caribe; Bolívar es el departamento donde más se han presentados casos de chikungunya con 29.244 afectados. Esto representa un gran riesgo debido a que Cartagena es la ciudad colombiana que más turistas recibe, afrontar una pandemia tendría un impacto económico muy alto, la atención tiene un costo promedio de 517,5 dólares por niño infectado y un costo similar o superior para los adultos. (Revista Semana, 2015)

Esta enfermedad puede afectar a mujeres y hombres de cualquier edad. Aunque se ha considerado que la presentación clínica varía con la edad, siendo los neonatos y los ancianos los más propensos a desarrollar formas más graves. En la mayoría de los casos las mujeres embarazadas que adquieren el virus no lo transmiten al feto. No obstante, hay reportes de abortos espontáneos después de que la madre ha tenido esta infección. Existe un riesgo de transmisión mayor cuando la mujer está infectada en el periodo intraparto, donde la transmisión madre-hijo puede llegar hasta un 49%. Generalmente, los niños nacen sin síntomas y posterior presentan fiebre, dolor, rash y edema periférico. Aquellos bebés que adquieran la infección durante el periodo intraparto pueden desarrollar problemas neurológicos, síntomas hemorrágicos y enfermedad del miocardio. Los bebés que nacen con problemas neurológicos pueden desarrollar discapacidades a largo plazo. (Gérardin, P.; Barau, G.; Michault, A.; Bintner M.; i, 2008) El adulto mayor es más propenso a presentar esta enfermedad atípica grave y llegar hasta la muerte. De acuerdo a estudios las personas mayores a 65 años presentan mortalidad 50 veces mayor que los adultos jóvenes, los cuales tienen edad menor a 45 años (Economopoulou, A.; Dominguez, M.; Helynck B, et al, 2009). Aunque no se tiene evidencia porque el adulto mayor es más propenso a adquirir esta enfermedad, se puede justificar en que este grupo de personas presentan frecuentemente varias enfermedades concomitantes o por su edad presenta menor respuesta inmunológica (Organización Panamericana de la salud).

El mosquito *Aedes aegypti* se caracteriza por reproducirse en recipientes artificiales. La especie se encuentra extendida en todo el mundo, aunque se

conoce que se introduce en las estaciones de calor pero no sobreviven a los inviernos. (U.S.department of health and human services, 1980). Posee un ciclo de vida con cuatro etapas: huevo, cuatro estadios larvarios, pupa y adulto. Este ciclo fundamentalmente es acuático y el mosquito alcanza el medio ambiente terrestre solo cuando es adulto. En la siguiente imagen se puede apreciar los lapsos de tiempo que existen entre cada etapa del ciclo de vida de *Aedes Aegypti*

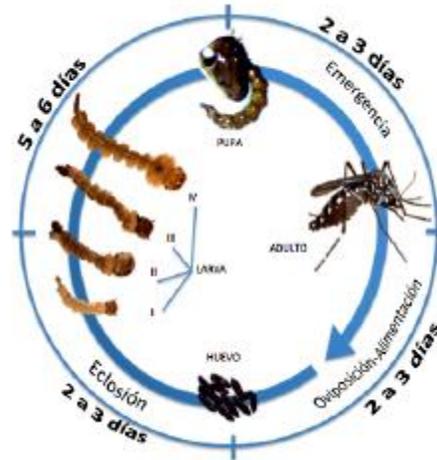


Imagen 1. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*³

Los mosquitos en todas las etapas de vida tienen su cuerpo cubierto con un tegumento. El crecimiento y desarrollo adecuado después de la eclosión del huevo requiere una muda periódica de la cutícula. La muda de los insectos depende precisamente de la biosíntesis y degradación de la quitina, que es un polisacárido formado por residuos de N-acetilglucosamina y es uno de los principales componentes de la cutícula de insectos. (Farnesi, 2012)

Para estas dos enfermedades el ciclo endémico – epidémico es: humano – mosquito – humano. Para el dengue el virus puede encontrarse en la sangre de una persona 5-6 días después de haber sido picado por un mosquito infectado y para el chikungunya entre 4-8 días, aunque puede variar entre 2-12 días. (Organización Mundial de la Salud, 2015). En los siguiente 4-5 días, el mosquito que se alimente de la sangre de esta persona quedara infectado. Posteriormente continúa el proceso de incubación del virus en el mosquito en un periodo de tiempo de 8 a 11 días. A partir de que la hembra adquiere el virus, quedara infectada por el resto de su vida, con la posibilidad de transmitir la infección cada vez que esta pique una persona. (U.S.department of health and human services, 1980)

El control de *Aedes aegypti* es la principal forma de prevenir la transmisión del dengue. La forma más utilizada de control del vector de estas enfermedades se basa en la aplicación de insecticidas a los hábitats de larvas o mosquitos adultos,

³ Imagen tomada de (Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades de Mexico)

debido a que otras alternativas no presentan viabilidad, puesto que las vacunas aún no se encuentran disponibles y la eliminación de posibles criaderos aun es compleja. (Giglio, N., Fernandes, D., Valle, D., Pereira, J., 2012. Rio de Janeiro vol.107 no.3)

Los insecticidas, pueden emplearse como larvicidas adicionándose a los criaderos de mosquitos o aplicándose contra los mosquitos adultos, lo más común son los insecticidas residuales, fumigaciones espaciales y materiales impregnados. Son buenos reguladores del crecimiento de insectos y de toxinas bacterianas los insecticidas organofosforados, que son compuestos de baja toxicidad para los mamíferos. Algunos ejemplos de estos son el Piriproxifeno, Metopreno y Novaluron, los cuales pueden ser aplicados a los criaderos de mosquitos para atacar sus larvas. Hasta hace poco tiempo, los insecticidas más usados en el control de *Aedes aegypti* fue el organofosforado Temefos y el Deltametrina piretroides. (Vontas, 2012). La resistencia de este mosquito a estos insecticidas comunes ha evolucionado en todo el mundo debido al uso continuo, por lo que se presentará dificultad en el control del mosquito

Ante esta dificultad, en la actualidad para el control de *Aedes aegypti* se están utilizando reguladores del crecimiento de insectos (IGR), los cuales no presentan una toxicidad directa. A diferencia de los insecticidas químicos y los biolarvicidas, su acción es selectiva sobre el desarrollo, la metamorfosis o reproducción de los insectos. Dentro de la categoría IGR, se encuentran los inhibidores de la síntesis de quitina (CSI), su acción es interferir en la síntesis o deposición de quitina en el exoesqueleto o estructuras internas compuestas por quitina como la matriz peritrófica. (Giglio, N., Fernandes, D., Valle, D., Pereira, J., 2012. Rio de Janeiro vol.107 no.3)

El Novaluron es un inhibidor de la síntesis de quitina y actúa ya sea por ingestión o contacto. Pertenece a la familia de las benzoilfenilurea, su estructura química presenta dos bencenos y una mezcla racémica de dos enantiómeros como se puede observar en la imagen 1. Su solubilidad en agua es independiente del pH y es de aproximadamente (3µg / L), tienen un coeficiente de reparto de 4.3, lo que indica mayor solubilidad en grasas que en agua. (Food and agriculture organization of the United Nations, 2003)

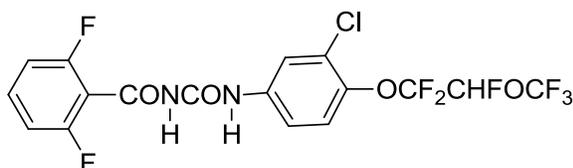


Imagen 2. Estructura química del Novaluron

En estudios fisiológicos y morfológicos de *Aedes aegypti* se determinó que el Novaluron: afecta de manera significativa el contenido de quitina durante el desarrollo de la larva, induce una cutícula alterada y discontinua en algunas regiones, la epidermis en algunos casos fue muy delgada y en otros no estaba

presente. La mayoría de compuestos CSI hacen parte del grupo de benzoilfenilurea (BPU), que afectan la biosíntesis de quitina y el proceso de muda. Los BPU actúan en larvas y pupas dificultando la supervivencia para la próxima muda. Otro factor interesante es que el Novaluron afecta más a las hembras que a los machos, lo que le da un valor agregado a su efecto ya que las hembras son las transmisoras del virus. (Farnesi, 2012)

A partir de comparaciones de diferentes BPU, Novaluron es una alternativa efectiva para contribuir al control del vector del dengue. (Farnesi, 2012) . Novaluron es uno de los pocos compuestos recomendado actualmente por la OMS para usarse en agua potable contra el vector *Aedes aegypti* y estipula que la dosis no puede ser superior a 0,05 mg/L. (World Health Organization W., 2007)

El Novaluron puede identificarse a través de diferentes pruebas como: espectroscopia ultravioleta, espectroscopia infrarroja, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas. Para la identificación por espectroscopia UV se debe tener en cuenta las condiciones de pH, ya que los espectros de absorción UV presentan diferentes características de acuerdo a la condición de basicidad o acidez como se puede observar en la tabla 3. El cambio en el coeficiente de absorción molar es debido a la degradación ya que el Novaluron es propenso a hidrólisis en condiciones básicas. (Food and agriculture organization of the United Nations, 2003)

Tabla 3. Características de absorción UV dependiendo de las condiciones de pH⁴

Condiciones de la muestra en la solución	Máximo de absorción (nm)	Coefficiente de absorción molar
Acido (0,1 M HCl en metanol-agua, 3:2 v/v)	253	$9,8 \times 10^3$
Neutro (metanol- agua, 3:2)	253	$15,4 \times 10^3$
Básico (0,1 M NaOH en metanol-agua 3:2 v/v)	263	$20,5 \times 10^3$

La resistencia que ha generado el mosquito *Aedes aegypti* a los larvicidas convencionales ha introducido la necesidad de emplear nuevas formulaciones de larvicidas como alternativa para el control del mosquito. Generalmente estas formulaciones son diseñadas con el fin de mejorar la seguridad y la eficacia de la sustancia activa, además, de proteger a los seres humanos y el medio ambiente. (Paula, 2006). Por otro lado, los sistemas de liberación controlada son una alternativa útil para la incorporación de larvicidas tales como el Novaluron, con el fin de obtener una liberación controlada para disminuir el número de aplicaciones de dichos larvicidas.

⁴ Información tomada de: (Food and agriculture organization of the United Nations, 2003)

Los hidrogeles son excelentes sistemas de liberación controlada. Están compuestos por redes de polímeros reticulados los cuales presentan un alto número de grupos hidrófilos. Estas redes presentan alta afinidad por el agua, pero no llegan al punto de la disolución debido a los enlaces químicos o entrecruzamientos formados por el polímero. Las dimensiones de los hidrogeles pueden ser diversas, pueden ir desde nanómetros a centímetros de ancho. (Bhattari, 2010)

Estos sistemas presentan múltiples aplicaciones pero generalmente se utilizan en los campos farmacéuticos debido a que los medicamentos pueden liberarse de manera controlada y en el sitio donde se requiera la acción, generando una mejora en la eficacia, estabilidad física y propiedades de liberación características. El suministro controlado también puede ser aplicado en el campo agrícola, maximizando así el efecto de los insecticidas a bajas concentraciones..

Los sistemas de suministros controlados han generado una alternativa para regular la biodisponibilidad de agentes terapéuticos ya que pueden existir demasiados compuestos activos que pueden tener actividad terapéutica pero muy pocos son exitosos, lo cual es atribuido a la baja biodisponibilidad; velocidad y alcance con que el compuesto activo alcanza su diana. En la administración controlada de fármacos, la sustancia activa se incorpora en una red polimérica de tal forma que el fármaco se libera del material polimérico de una manera ya establecida. (Isiklan, 2007)

La preparación de hidrogeles se puede realizar a partir de diferentes materiales sintéticos. Pero se ha presentado un mayor interés en los polímeros naturales, como polisacáridos y proteínas. Las principales razones de este interés es que estos polímeros presentan baja toxicidad, son biocompatibles y biodegradables. Además, sus preparaciones son realizadas en medio acuoso, lo que evita el uso de solventes orgánicos que afectan el medio ambiente.

El quitosano es un polisacárido formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina distribuidos al azar y unidas por enlaces glucosídicos β - (1-4) como se puede observar en la imagen 3. Es un elemento estructural del exoesqueleto de insectos y crustáceos. Este polímero se caracteriza por presentar átomos de nitrógeno en su estructura que se pueden protonar y le confieren cargas positivas, es soluble en soluciones ácidas y es capaz de formar complejos con polielectrolitos.

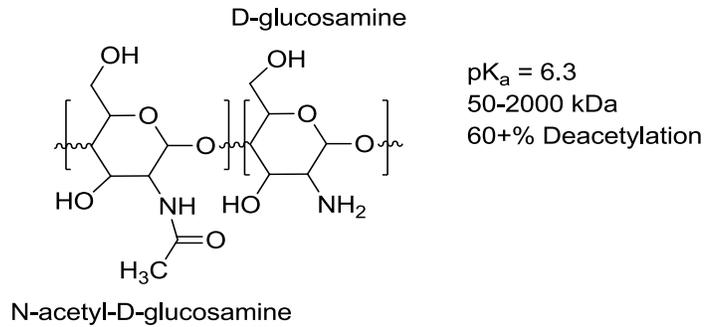


Imagen 3. Estructura química del quitosano

Los hidrogeles presentan unas características requeridas, para cumplir con ellas la red de polímero de quitosano debe cumplir lo siguiente: las interacciones generadas entre las cadenas deben ser lo suficientemente fuerte para promover la formación de puntos semi-permanentes en la red, también, la red formada debe ser capaz de promover el acceso y mantener el agua dentro de la red polimérica. (Bhattari, 2010)

En la síntesis de los hidrogeles comúnmente se utilizan agentes entrecruzantes, los cuales permiten la formación más de enlaces covalentes. Algunos de los entrecruzantes más utilizados son los dialdehídos como el glioxal y el glutaraldehído. El entrecruzamiento entre el quitosano y estos compuestos se da entre el grupo aldehído y los grupos amino primario del quitosano formando un enlace imina covalente vía reacción de Schiff (Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.; Felt, O.; Peppas, N.; Gurny, R., 2004. Vol 57).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el hidrogel más eficaz como sistema de liberación controlada del larvicida Novaluron mediante el estudio de la cinética de liberación a través del tiempo y la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito *Aedes aegypti*.

2.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar hidrogeles a partir de quitosano con diferente concentración de agente entrecruzante (25%, 50% y 75%)
- Determinar la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito, en condiciones de laboratorio, contando el número de larvas muertas a través del tiempo.

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 MATERIALES Y REACTIVOS

En la síntesis de los hidrogeles se utilizaron los reactivos que se muestran en la Tabla 4, los cuales fueron suministrados por la Universidad Icesi.

Tabla 4. Reactivos utilizados en la síntesis de los hidrogeles

MATERIALES Y REACTIVOS	MARCA
Quitosano	Aldrich
Ácido acético glacial	Sucromiles S.A.
Glutaraldehído 25% (G 25%)	J.T.Baker
Novaluron (NOV)	Makhteshim

La evaluación biológica de la liberación controlada del larvicida se realizó en las instalaciones de CIDEIM, donde suministraron las larvas para el ensayo y el ambiente adecuado y controlado para su desarrollo.

2.4.2 SÍNTESIS DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN (HIDROGEL/LARVICIDA)

La síntesis de los hidrogeles inició con la preparación de la solución de quitosano al 3% (SQ 3%) utilizando como solvente solución de ácido acético al 2% (SAA 2%). Posteriormente se realizó la síntesis de los hidrogeles con y sin Novaluron con entrecruzamientos de 25% (E. 25%), 50% (E. 50%) y 75% (E. 75%), se utilizó como agente entrecruzante una solución de glutaraldehído al 8,3% (SG 8,3%).

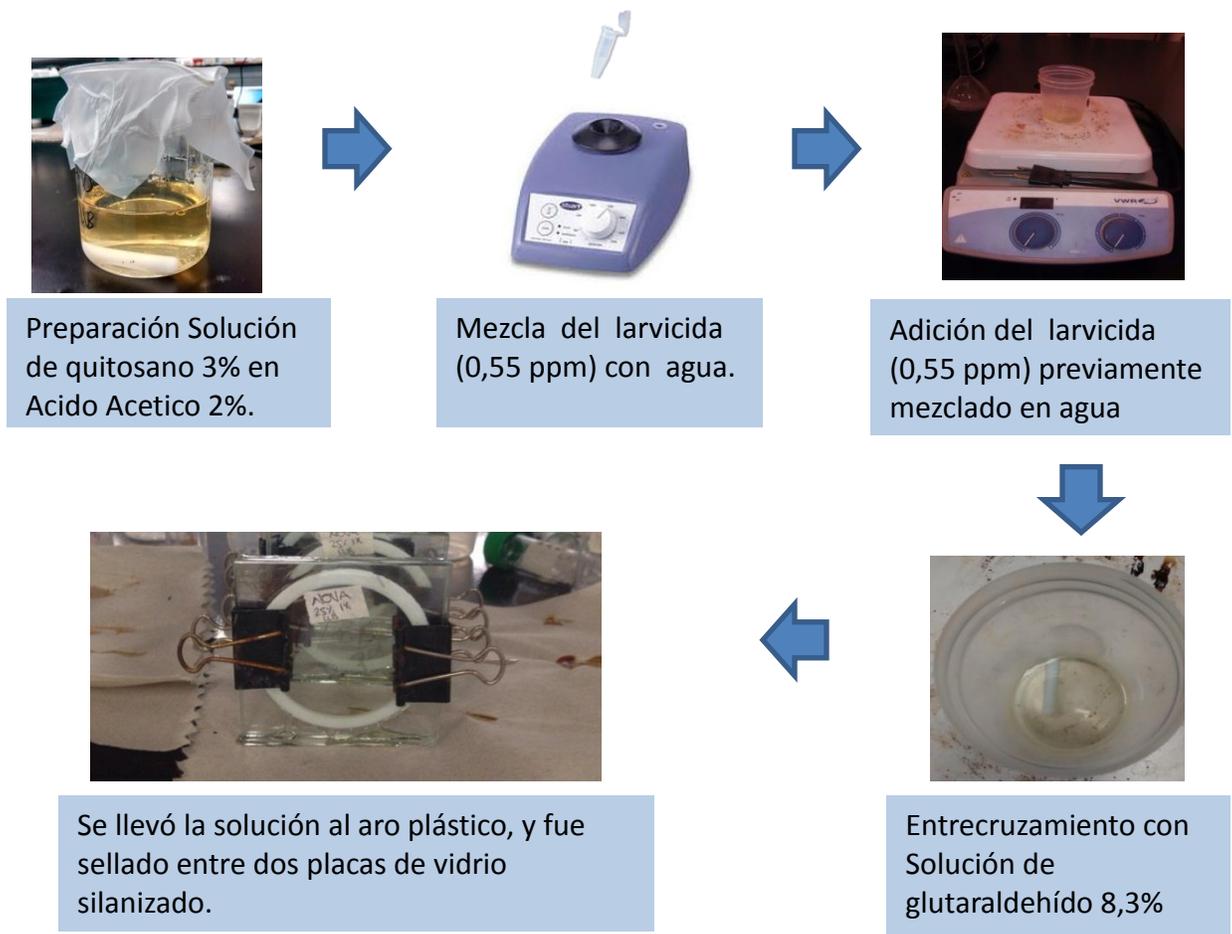
El larvicida fue incorporado a la SQ 3% en una solución mix de 1 mL que contenía: agua, SG 8,3%. y NOV con el fin de permitirle al larvicida una incorporación más homogénea. Esta solución mix siempre tuvo la misma concentración del larvicida, lo que varió fue el volumen del agua y SG 8,3%, en función del porcentaje de entrecruzamiento pero siempre manteniéndose 1 mL como volumen final. Todos los hidrogeles cargados con el larvicida contenían la misma concentración, la cual fue 0,55 ppm; dosis letal 99 (DL 99) para este mosquito (Arredondo, J.; Valdez, K., 2006. Vol 20).

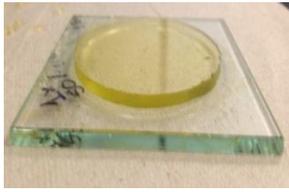
La síntesis del hidrogel cargado inició con la mezcla de NOV y el agua en un tubo eppendorf con agitación en un vortex aproximadamente por 10 minutos, esto permitió una excelente mezcla entre estos dos componentes ya que el larvicida es muy hidrófobo. Posteriormente, en un recipiente plástico y con un agitador magnético de 1 cm se realizó la mezcla de SQ 3% con la mezcla anterior, sobre una plancha sin calentamiento por aproximadamente 3 minutos. Cuando se observó una distribución homogénea de NOV sobre SQ 3% se adicionó la SG

8,3%, la cual fue añadida con una micropipeta en pequeñas cantidades. Esto con la finalidad de obtener hidrogeles con entrecruzamiento y distribución del larvicida homogéneo. Para los hidrogeles que no contienen larvicida su síntesis se realiza siguiendo el mismo procedimiento anterior, pero sin la inclusión de NOV.

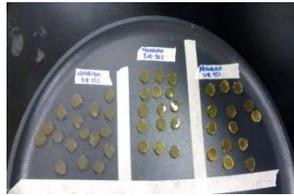
Esta solución fue llevada a un aro plástico de aproximadamente 10 mL, el cual estaba entre dos placas de vidrio silanizado (para evitar la adhesión del hidrogel al vidrio) y aprisionado por dos pinzas medianas. La gelificación de los hidrogeles duró 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el aro con el hidrogel de las placas de vidrio y se colocó en una bandeja de teflón, en la cual se cortaron los hidrogeles con un sacabocados de tamaño # 10. Estos hidrogeles se dejaron secar a temperatura ambiente entre 2 a 3 días y se llevaron al horno por 12 horas a 50°C cuando ya tenían consistencia dura. Los hidrogeles se almacenaron en las condiciones de laboratorio (27 °C) hasta el momento de utilizarlos en los ensayos biológicos. Este proceso se puede entender mejor en el Diagrama 1. Todos los cálculos realizados para esta sección se encuentran en el Anexo 1.

Diagrama 1. Síntesis de sistemas de liberación

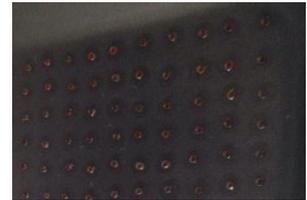




Se retiró el hidrogel del molde



Se llevaron a una bandeja de teflón y fueron cortados con sacabocados #10



Se dejaron secar a temperatura ambiente entre 2 – 3 días



Almacenamiento en condiciones ambientales hasta su uso.



Se llevaron al horno por 12 horas a 50 °C.

2.4.3 ENSAYOS BIOLÓGICOS LARVARIOS

Esta parte consistió en evaluar la liberación de NOV desde los tres sistemas de liberación sintetizados a partir de la mortalidad de las larvas del mosquito. Para esto se realizó un ensayo en donde se evaluó la mortalidad de las larvas a través del tiempo para los diferentes entrecruzamientos. Para cada entrecruzamiento se realizaron 3 bioensayos, cada uno contaba con 4 réplicas y 1 control; en cada réplica se aplicó el hidrogel que contenía NOV y el control era el hidrogel sin NOV.

El ensayo se realizó en vasos plásticos transparente de 7 onzas, que contenían 100 mL de agua de clorada, 10 larvas en estadio L1-L2 y el hidrogel, cada vaso fue cubierto con una malla sostenida del vaso por un caucho, para evitar la salida de cualquier adulto que hubiera emergido. La liberación de NOV se evaluó durante 15 días, al cumplir este tiempo se realizó el cambio del medio, con la finalidad de

simular el recambio de agua que se genera en las alcantarillas a raíz de las lluvias. Los hidrogeles fueron colocados de nuevo en recipientes plásticos con la misma cantidad de agua y de larvas en el mismo estadio y se volvió a evaluar la liberación del larvicida por otros quince días, realizando nuevamente el recambio después de otros quince días (WHO, 2005).

Las larvas fueron alimentadas cada 2 días con hígado en suspensión (Ramirez, L.; Ocampo, C.). Siempre se mantuvieron todos los bioensayos en las mismas condiciones ambientales con una temperatura de 27 °C con periodos de luz y oscuridad cada uno de 12 horas. (WHO, 2005). Los resultados de mortalidad fueron registrados en el formato de “evaluación para medir la eficacia de la liberación de hidrogeles” suministrado por CIDEIM. Ver anexo 2. (Ramirez, L.; Ocampo, C.)

2.4.4 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los bioensayos se analizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA). No obstante para realizar este análisis los datos debieron primero cumplir los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas.

SUPUESTO 1: los datos presentan distribución normal

Ho: los datos presentan distribución normal

Ha: los datos no presentan distribución normal

SUPUESTO 2: los datos presentan igualdad de varianzas

Ho: los datos presentan igualdad de varianzas

Ha: los datos no presentan igualdad de varianzas

Para evaluar los supuestos se utilizó como referencia el valor p, el cual no debe ser menor a 0,05 para que se cumplan los supuestos. (Anexo 3). Para los datos analizados se cumplieron los dos supuestos, por lo tanto, se realizó el análisis ANOVA y comparaciones a través del test LSD de Fisher. El ANOVA permite contrastar la media de las poblaciones y determinar si una población difiere de las otras (Universitat de Barcelona). El test de Fisher permite realizar comparaciones múltiples, compara las medias de un factor después de que se rechaza la igualdad de medias (Universidad Nacional de Colombia). En este caso los factores son entrecruzamiento y periodo.

2.4.5 MATRIZ DE MARCO LÓGICO

OBJETIVO GENERAL			
Identificar el hidrogel más eficaz como sistema de liberación controlada del larvicida Novaluron mediante el estudio de la cinética de liberación a través del tiempo y la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i> .			
Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicador
Realizar la síntesis de los tres hidrogeles con la diferente concentración de agente entrecruzante (25%, 50% y 75%)	<ul style="list-style-type: none"> • Preparación de SQ 3% en SAA 2% • Preparación del "mix" • Mezcla del "mix" con 10 mL SQ 3% • Adición de la SG 8,3 % dependiendo del porcentaje de entrecruzamiento. • Adición de la mezcla anterior al aro plástico, el cual se encuentra entre dos placas de vidrio silanizado y sellar con ganchos metálicos. • Dejar gelificar por 24 horas a temperatura ambiente. • Retirar el aro de las placas de vidrio, llevar a bandeja de teflón y realizar el corte de los hidrogeles con sacabocados #10. • Dejar secar a temperatura ambiente entre 2 a 3 días y llevar al horno por 12 horas a 50°C. 	<ul style="list-style-type: none"> • El hidrogel presenta completa homogeneidad. • El tiempo de agitación después de la adición del glutaraldehído sea el adecuado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Los hidrogeles sintetizados presentan homogeneidad, la consistencia de un hidrogel y distribución completa del Novaluron. • La gelificación del hidrogel puede iniciar en el recipiente de preparación, lo que impide transferirlo al aro.
Determinar la tasa de mortalidad de las larvas del mosquito.	<ul style="list-style-type: none"> • Rotular los vasos plásticos de acuerdo a los entrecruzamientos y llenarlos con 100 mL de agua de clorada. 	<ul style="list-style-type: none"> • La mortalidad de las larvas concuerden con el efecto 	<ul style="list-style-type: none"> • Las larvas que se encuentren en los vasos con el hidrogel cargado

	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar 10 larvas a cada vaso y el respectivo hidrogel. • Tapar cada vaso con la malla y sujetarla con un caucho. • Hacer cada dos días el conteo de larvas muertas para cada vaso. • Alimentar las larvas con hígado en solución cada vez que se haga el conteo. • Realizar el recambio del medio cada 15 días. 	<p>del larvicida.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La mortalidad de las larvas concuerden con la liberación del larvicida de acuerdo al porcentaje de entrecruzamiento. 	<p>mueran y las larvas que se encuentren en el recipiente control no mueran y emerjan a adulto.</p>
--	--	--	---

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 OBTENCIÓN DE HIDROGELES

La síntesis de los hidrogeles se realizó como ya se mencionó en la metodología, sin embargo, fue un proceso arduo y de mucha paciencia debido a que la falta de experiencia en este proceso no contribuía a obtener los hidrogeles homogéneos que se esperaban. Los hidrogeles finalmente no se prepararon con la metodología que se había manejado en el grupo de investigación, en la cual la síntesis se realizaba en un tubo falcón, con la adición de G 25%. Puesto que no se obtenía un entrecruzamiento homogéneo. Se realizó el cambio del agente entrecruzante pasando de G 25% a SG 12,5% y posteriormente a SG 8,3%, pero tampoco se obtuvieron los resultados esperados.

Al observarse que la concentración del agente entrecruzante no era el único inconveniente, se procedió a cambiar el recipiente donde se estaba realizando la síntesis. El tubo falcón fue cambiado por un recipiente plástico en forma de vaso, obteniéndose hidrogeles homogéneos, al emplear SG 8,3%. Este cambio se fundamenta en que los tubos falcón son largos y de diámetro pequeño, de modo que al adicionar el entrecruzante solo se daba el entrecruzamiento en la superficie donde estaban en contacto la SQ 3% y SG 8,3%, problema que fue resuelto utilizando el vaso plástico, el cual tenía menor altura pero mayor diámetro, por lo tanto la SQ 3% presentaba mayor área de contacto con la SG 8,3%.

Otro parámetro modificado fue el método de mezcla entre la SQ 3% y la SG 8,3%, ya que se había venido realizando en agitador vortex, lo cual generaba muchas burbujas difíciles de eliminar así se llevara a ultrasonido. Esto muchas veces generó que se gelificara el hidrogel en el recipiente plástico mientras se intentaba eliminar las burbujas. Por lo tanto, la síntesis se realizó con agitación magnética en una plancha sin calentamiento, proceso en el cual no se evidenció la presencia de burbujas, ni se llegó a la gelificación del hidrogel en el recipiente de la síntesis.

2.5.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Los hidrogeles sintetizados se utilizaron en los ensayos biológicos para evaluar la liberación del larvicida a partir de los diferentes entrecruzamientos, la evaluación fue realizada a partir de datos de mortalidad de larvas a través del tiempo. La liberación de larvicida se evaluó en tres periodos de tiempo, cada uno de 15 días. En cada periodo se evaluaron los tres entrecruzamientos, cada entrecruzamiento se evaluó en tres bioensayos y cada bioensayo constaba de 4 réplicas y un control. En el tercer periodo (30-45 días) no se determinó la eficacia de los hidrogeles en la liberación del larvicida debido a que en los controles de varios

bioensayos murieron aproximadamente el 100% de las 10 larvas expuestas, ya que por problemas técnicos no se pudo realizar el conteo a los dos días de colocar el hidrogel sino a los 5 días, por lo que no se pudieron alimentar en ese lapso de 5 días y probablemente murieron de inanición, lo contrario a los controles de los otros dos periodos, en los cuales se evidenció la supervivencia del 100% de las larvas. Por la razón anterior, no se evaluó la mortalidad de larvas en este periodo ya que los resultados no son totalmente confiables. Debido a que no se sabría si las larvas murieron por inanición o por el efecto del larvicida.

A continuación se encuentra el análisis de los periodos 1 y 2. Para analizar la diferencia de mortalidad entre los diferentes entrecruzamientos y determinar el hidrogel más eficaz. Se realizó primero un análisis entre los tres bioensayos de cada entrecruzamiento para los dos periodos, los valores que se van a tener en cuenta son los de las larvas ya que es el estadio donde actúa principalmente el NOV. Los resultados del análisis se pueden observar en las siguientes tablas (Tabla 5 y 6):

Tabla 5. Valor p para larvas, pupas y adultos para la comparación de los tres bioensayos por cada entrecruzamiento en el periodo 1

ENTRECRUZAMIENTO	VALOR P LARVAS	VALOR P PUPAS	VALOR P ADULTOS
25%	0,5320	0,4053	0,4053
50%	0,1004	--	0,3227
75%	0,3935	0,4053	0,4053

Tabla 6. Valor p para larvas, pupas y adultos para la comparación de los tres bioensayos por cada entrecruzamiento en el periodo 2

ENTRECRUZAMIENTO	VALOR P LARVAS	VALOR P PUPAS	VALOR P ADULTOS
25%	0,8853	0,4997	0,6994
50%	0,2871	0,1346	0,8211
75%	0,2776	0,1004	0,5785

Para determinar las diferencias se utilizó el valor p como valor de referencia, donde la hipótesis nula es que los bioensayos se comportan estadísticamente igual y la hipótesis alterna es que los bioensayos presentan diferencia significativa estadísticamente, por lo tanto, si el valor p es mayor que 0,05 se acepta la hipótesis nula. A partir de las tablas 5 y 6 se puede concluir que entre cada bioensayo de cada entrecruzamiento en los dos periodos evaluados no se presentó diferencia significativa; la mortalidad se comportó de manera similar, debido a que todos los valores son mayores que 0,05 por lo que se acepta en todos los casos la hipótesis nula.

En el caso de la mortalidad de pupas con un E. 50% en el periodo 1 no se obtuvo un valor p, debido a que cada vez que se realizó el conteo de mortalidad nunca se observaron pupas muertas, por lo que en este caso el larvicida no actuó matando pupas pero no permitió el desarrollo completo del adulto, ya que todos los adultos encontrados estaban muertos y no presentaban desarrollo completo de sus partes. Estos resultados confirman experimentalmente que el NOV actúa principalmente en larvas.

Como ya se determinó la similitud estadística entre los bioensayos de cada entrecruzamiento, se puede comparar la mortalidad entre los diferentes entrecruzamientos en cada periodo. A continuación se muestra un análisis factorial donde se analizó el comportamiento de la mortalidad en los dos periodos.

Tabla 7. Análisis factorial para los dos periodos

ESTADIO	VALOR P
Larva	0,0009
Pupa	0,0061
Adultos	<0,0001

A partir de los valores p se evidencia diferencia en la mortalidad de larvas, pupas y adultos en los dos periodos. Esto puede entenderse con mayor claridad a partir de los siguientes análisis (Tabla 8,9 y 10).

Tabla 8. Análisis de mortalidad de larvas en los dos periodos independientemente del % de entrecruzamiento

t agrupamiento	Media	Periodo
A	93,611	1
B	77,500	2

Tabla 9. Análisis mortalidad de pupas en los dos periodos independientemente del % de entrecruzamiento

t agrupamiento	Media	Periodo
A	8,056	2
B	0,556	1

Tabla 10. Análisis de mortalidad de adultos en los dos periodos independientemente del % de entrecruzamiento

t agrupamiento	Media	Periodo
A	13,333	2
B	1,667	1

A partir de los datos de las tablas 8,9 y 10 se evidencia diferencia significativa en el comportamiento de los dos periodos ya que en el periodo 1 se observó una mortalidad de larvas de 93,6% y en el periodo 2 de 77,5% independientemente de los entrecruzamientos. Este resultado concuerda con que en el periodo 2 se evidencie mayor mortalidad de pupas y adultos; si en el periodo 2 murieron menor cantidad de larvas estas pueden continuar con su desarrollo a pupa y luego a adulto, estadios en los que se evidenció mayor mortalidad en comparación con el periodo 1.

Al comparar la tasa de mortalidad de larvas, pupas y adultos para cada uno de los entrecruzamientos en cada periodo. Se evidenció diferencia estadísticamente significativa en cada periodo, estas diferencias se determinaron teniendo en cuenta el agrupamiento t, donde las medias con la misma letra no presentan diferencia significativa, este agrupamiento es la manera como la prueba LSD compara los datos. Este comportamiento se puede analizar en las tablas 11, 12 y 13.

Tabla 11. Análisis factorial del comportamiento de la mortalidad de larvas dependiendo del % de entrecruzamiento en cada periodo

Agrupamiento t		Media	Periodo	Entrecruzamiento
	A	95.833	1	25%
	A	95.833	1	50%
B	A	89,167	1	75%
B	A	84,167	2	75%
B	C	78,333	2	25%
	C	70,000	2	50%

Tabla 12. Análisis factorial del comportamiento de la mortalidad de pupas dependiendo del % de entrecruzamiento en cada periodo

Agrupamiento t		Media	Periodo	Entrecruzamiento
	A	12,500	2	50%
B	A	6,667	2	25%
B	A	5,000	2	75%
B		0,833	1	25%
B		0,833	1	75%
B		0,000	1	50%

Tabla 13. Análisis factorial del comportamiento de la mortalidad de adultos dependiendo del % de entrecruzamiento en cada periodo

Agrupamiento t		Media	Periodo	Entrecruzamiento
	A	15,000	2	50%
	A	14,167	2	25%

A	10,833	2	75%
B	2,50	1	50%
B	1,667	1	75%
B	0,833	1	25%

A partir de los resultados de las tablas 11,12 y 13 se puede concluir para el periodo 1, que la mortalidad para los tres entrecruzamientos no presentó diferencia significativa estadísticamente. El E. 25% y E. 50% tuvieron un comportamiento igual, ya que el porcentaje de mortalidad fue de 95,8% para ellos y de 89,2% para E. 75%.

Este comportamiento concuerda con lo esperado para este primer periodo, debido a que se espera que el sistema con E. 25% liberara mayor cantidad de larvicida que los otros entrecruzamientos. Basándose en que a medida que aumenta el grado de entrecruzamiento disminuye el tamaño de los poros que presenta el hidrogel. En el caso del hidrogel con E. 75% donde se esperaría tener un tamaño de poro más pequeño, el larvicida presenta más dificultad para liberarse desde la matriz, debido a que la entrada del agua presenta dificultad y por ende la liberación del larvicida. Lo contrario sucede con el hidrogel con E. 25% donde los poros podrían presentar mayor tamaño, lo que favorece la liberación del larvicida.

En este proyecto no se evaluó la cinética de liberación *in vitro*, ni se determinó la relación inversa entre el tamaño del poro y el grado de entrecruzamiento. Por lo cual, se recomienda a futuro evaluar la cinética de liberación *in vitro* a través de espectrometría de masas, técnica que permite analizar concentraciones muy pequeñas, como lo fueron las de NOV utilizadas en los hidrogeles y determinar el tamaño del poro para los diferentes grados de entrecruzamiento, a través de microscopia electrónica de barrido.

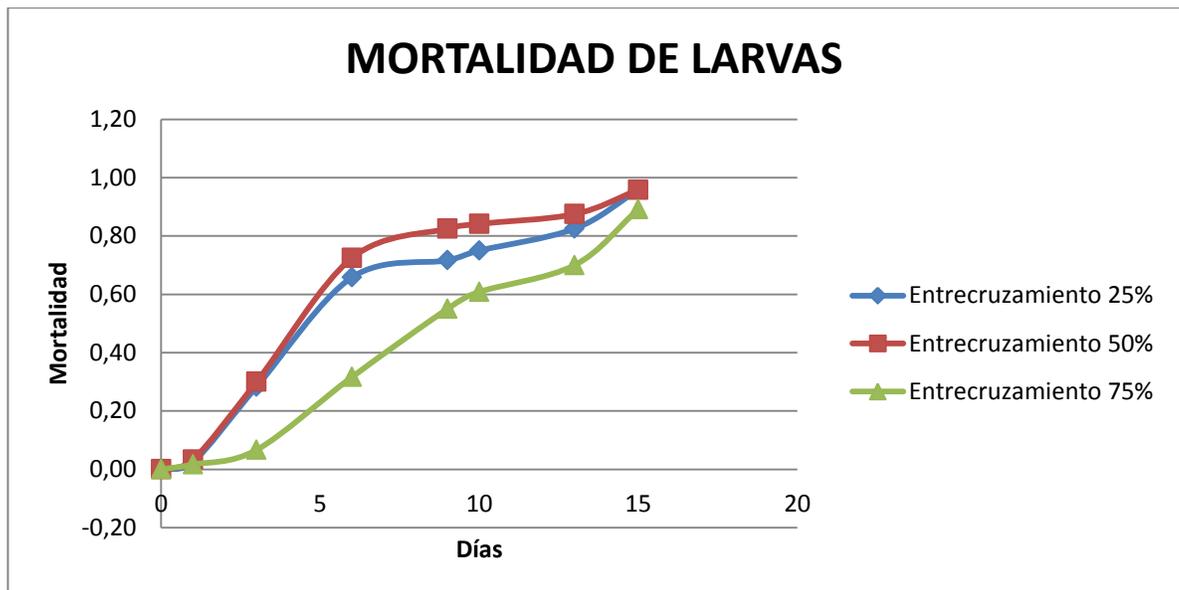
En el periodo 2 (15 – 30 días) se observó diferencia significativa en la mortalidad de larvas entre cada entrecruzamiento a partir de las tablas 11,12 y 13. Se identificó una mortalidad de 89.2% para el hidrogel con E. 75%, mayor a la obtenida en los otros entrecruzamientos. Esto probablemente suceda debido a que el tamaño del poro del hidrogel con E. 75% permite una liberación constante del larvicida a través del tiempo, comportamiento que se evidencia en la tabla 11, donde se observa que no hay diferencia significativa de mortalidad para el E. 75% para los dos periodos; teniendo una mortalidad de 89,2% en el periodo 1 y de 84,2% para el periodo 2. En el caso de los hidrogeles con E.25% y E. 50%, lo que sucede probablemente es que en el primer periodo liberaron mucha cantidad del larvicida, lo cual deja poca cantidad del larvicida para que sea liberado en el siguiente periodo.

En los dos periodos, para los diferentes entrecruzamientos se evidenció que las larvas que llegaron a adulto estaban muertas y con desarrollo incompleto en su morfología. Al final del periodo 1, cuando se realizó el recambio del medio, todos los hidrogeles presentaron sobrevivencia de algunas larvas y pupas. En el

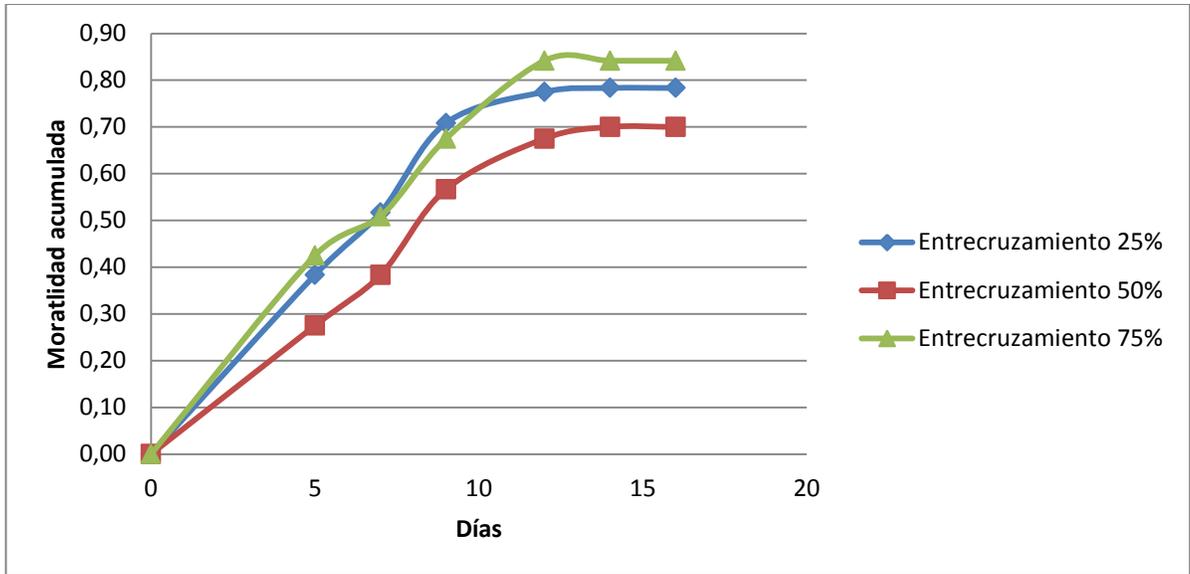
recambio del periodo 2 también se observó sobrevivencia de larvas y pupas en los E 25% y 50%, pero no en el E. 75%. A partir de esto se puede decir que en el periodo 2 el hidrogel con E. 75% presentó una mortalidad del 100% de las larvas evaluadas indiferentemente del estadio en el que se encontrara.

Los hidrogeles presentan propiedades como: resistencia mecánica, hinchamiento y difusión, las cuales se ven influenciadas por el grado de entrecruzamiento que presente la matriz de liberación. Además, este factor también determina el tamaño del poro del hidrogel. Debido a la sobrevivencia de larvas y pupas para los diferentes entrecruzamientos, en los dos periodos el día del recambio. Solamente se retiró el hidrogel para el respectivo cambio del medio y las larvas y pupas vivas se dejaron en ese medio, con el fin de evaluar si la concentración de NOV que quedaba en el agua era suficiente para la mortalidad de estas. A los dos días todas las larvas y pupas estaban muertas indicando que la concentración que había liberado el hidrogel es suficiente para continuar matando larvas y pupas. Cabe resaltar que no se sabe cuál es la concentración del medio ni por cuanto tiempo pueda seguir actuando.

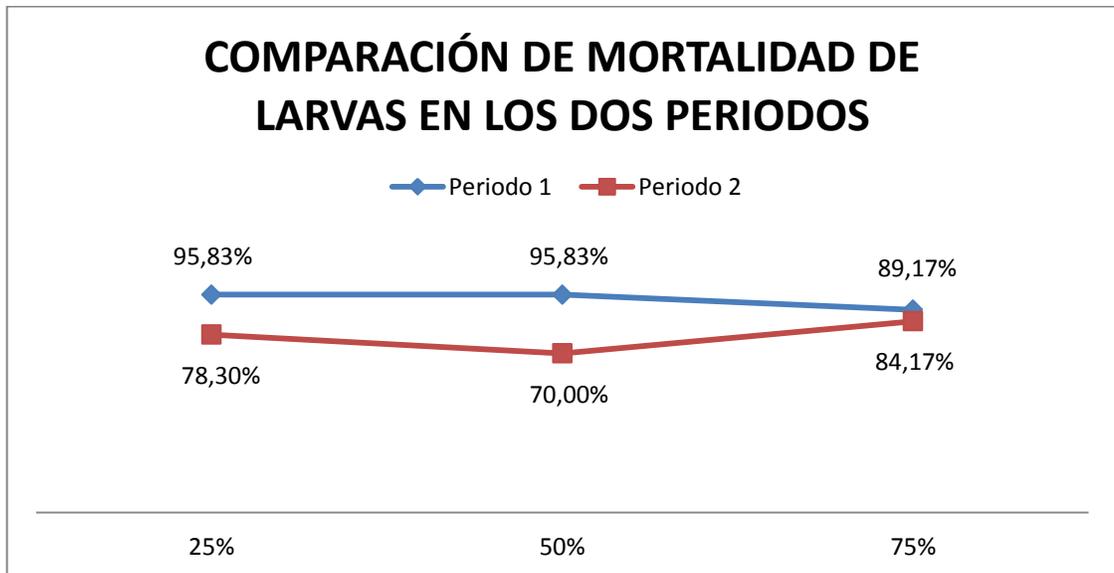
La mortalidad de larvas para los diferentes entrecruzamientos en cada periodo puede entenderse con más facilidad observando las Gráficas 1 y 2. En las cuales se ha representado la tasa de mortalidad acumulada en larvas para los dos periodos. Con la finalidad de mostrar el comportamiento de la mortalidad a través del tiempo evaluado. En el primer periodo se puede observar que en el día 6 presenta la mayor mortalidad para los diferentes entrecruzamientos y para el periodo 2 en el día 9. Lo que concuerda con que en el periodo 1 se presenta la liberación del larvicida más rápido que en el periodo 2.



Grafica 1. Mortalidad acumulada de larvas para los diferentes entrecruzamientos en el periodo 1



Grafica 2. Mortalidad acumulada de larvas para los diferentes entrecruzamientos en el periodo 2



Grafica 3. Comparación de mortalidad de larvas en los dos periodos evaluados

La Gráfica 3 fue realizada a partir de los datos obtenidos en la tabla 11. En la gráfica se puede entender de manera visual, la diferencia significativa estadísticamente que presenta el comportamiento de la mortalidad para los hidrogel con E. 25% y 50% en los dos periodos. Lo que sucede de manera contraria para el hidrogel con E. 75% donde la mortalidad fue similar para los dos periodos, lo que se puede observar tanto estadísticamente como gráficamente.

2.6 CONCLUSIONES

Se logró la síntesis de hidrogeles con diferente grado de entrecruzamiento y con la incorporación de Novaluron.

No se determinó el hidrogel más eficaz para el periodo 1 ya que la mortalidad de larvas no presentó diferencia estadística significativamente entre los tres entrecruzamientos evaluados.

Se determinó que el hidrogel más eficaz para el periodo 2, es el que presenta E. 75%. Debido a que presentó mayor mortalidad de larvas en ese periodo y no se evidenció diferencia significativa de la mortalidad de larvas para este entrecruzamiento en los dos periodos.

La cantidad de Novaluron que queda en 100 mL de agua en el momento que se retira el hidrogel, es suficiente para matar larvas y pupas que no hayan muerto en los 15 días de la evaluación, en aproximadamente 3 días.

2.7 RECOMENDACIONES

La cinética de liberación in vivo del Novaluron fue evaluada en dos periodos cada uno de 15 días, tiempo en el cual se determinó que en el hidrogel con E. 75% fue el más eficaz para el periodo 2. Sin embargo, se recomienda que se continúe el ensayo biológico por más tiempo, para que los datos que se obtengan en ese tiempo permitan determinar claramente si el hidrogel con E. 75% continua siendo el más eficaz o si por el contrario el comportamiento de la mortalidad cambió y el hidrogel más eficaz pase a ser el de E. 25% o E. 50%.

Además, se recomienda evaluar la cinética de liberación *in vitro* con espectrometría de masas y hacer análisis del tamaño del poro utilizando microscopia electrónica de barrido. Con el fin de determinar la similitud entre la mortalidad de larvas con la concentración que libera el hidrogel, esto de acuerdo al tamaño del poro que presenten los diferentes grados de entrecruzamiento.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, F. O. (2012). Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 1277-1282.
- Arredondo, J.; Valdez, K. (2006. Vol 20). Effect of Novaluron (Rimon® 10 EC) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 377 - 387.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.; Felt, O.; Peppas, N.; Gurny, R. (2004. Vol 57). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 19-34.
- Bhattari, N. G. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 83-99.
- Caracol. (2015, Enero 5). *Caracol*. Retrieved Junio 01, 2015, from <http://www.caracol.com.co/noticias/actualidad/chikungunya-en-el-mundo/20150105/nota/2574192.aspx>
- Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades de Mexico. (n.d.). *Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades*. (S. d. Mexico, Editor) Retrieved Junio 01, 2015, from <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/vector.html>
- De la hoz, J.; Bayona, B.; Vilorio, S.; Accini, J.; Vergara, H.; Viasus, D. (2015). Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: diagnostic and treatment challenges. *Journal of Clinical Virology*.
- Economopoulou, A.; Dominguez, M.; Helynck B, et al. (2009). Atypical chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. *Epidemiol Infect*, 534-541.
- Farnesi, L. B.-M. (2012, Enero 24). *Pubmed*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3265478/>

- Food and agriculture organization of the United Nations. (n.d.). Retrieved from http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/novaluro.pdf
- Gérardin, P.; Barau, G.; Michault, A.; Bintner M.; i. (2008). Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. *Plos Med*, 5.
- Giglio, N., Fernandes, D., Valle, D., Pereira, J. (2012. Rio de Janeiro vol.107 no.3, Mayo). *SciELO*. (M. d. Cruz, Ed.) Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000300014&lang=pt
- Instituto Nacional de Salud. (2015, Marzo 15). *Caracol Radio*. Retrieved Junio 01, 2015, from <http://www.caracol.com.co/noticias/actualidad/instituto-nacional-de-salud-investiga-21-muertes-por-chikungunya-en-el-pais/20150315/nota/2674191.aspx>
- Instituto Nacional de Salud. (2014, Julio 22). Primer caso de chikungunya en Colombia llegó de República Dominicana. (E. tiempo, Ed.) *El tiempo*.
- Isiklan, N. (2007). Controlled Release Study of Carbaryl Insecticide from Calcium Alginate and Nickel Alginate Hydrogel Beads. *InterScience*.
- Maestre, R. G. (2014). Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 11.
- Ministerio de Salud . (2013). *Enfermedades infecciosas: dengue* . Argentina.
- Organización Mundial de la Salud. (2014, Marzo). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved Noviembre 02, 2014, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2015, Mayo). *Organización Mundial de la Salud*. Retrieved Mayo 31, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>
- Organización Panamericana de la salud. (n.d.). *preparación y respuesta ante la eventual introduccion del virus chikungunya en las Américas*. http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf.
- Paula, H. C. (2006). Swelling and Release Kinetics of Larvicide-Containing Chitosan/Cashew Gum Beads. *InterScience*.

- Ramirez, L.; Ocampo, C. (n.d.). *Evaluación del uso de hidrogeles para la liberación controlada de insecticidas*. Cideim.
- Revista Semana. (2015, Enero 17). *Chikungunya podría terminar en una pandemia*. Retrieved Junio 01 , 2015, from <http://www.semana.com/nacion/articulo/chikungunya-va-afectar-el-turismo-en-colombia/414956-3>
- Rodríguez, J., Ortíz, Y., Rodríguez, R. (2006, Bogotá. rev.fac.med.vol.54 no.2, Junio). *SciELO*. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112006000200004&lang=pt
- Rodríguez, R. (2002, Sep-Dic). *SciELO*. (R. C. Habana, Editor) Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602002000300004&lang=pt
- Secretaria de Vigilância em Saúde. (2009). *Uso do larvicida Diflubenzuron (PM25%) para controle de Aedes aegypti*. Gestão Dd: Ministério da saúde.
- Terrádez, M.; Angel, J. (n.d.). *Universitat Oberta de Catalunya* . Retrieved Junio 04, 2015, from <http://www.uoc.edu/in3/emath/docs/ANOVA.pdf>
- Thiberville, S.; Moyen, N.; Dupuis, L.; Nougairède, A.; Gould, E.; Roques, P.; Lamballerie, X. (2013). Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*. Vol 99, 345-370.
- U.S. department of health and human services. (1980). *Biología y control del Aedes aegypti*. Atlanta, Georgia: Public health service.
- Universidad Nacional de Colombia. (n.d.). *Diferencia Mínima Significativa*.
- Universitat de Barcelona. (n.d.). *Análisis de varianza con un factor (ANOVA)*.
- Vontas, J. K. (2012, Octubre). Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*(104), 126 - 131.
- WHO. (2005). *GUIDELINES FOR LABORATORY AND FIELD TESTING OF MOSQUITO LARVICIDES*. COMMUNICABLE DISEASE CONTROL, PREVENTION AND ERADICATION.
- World Health Organization W. (2007). *Novaluron in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers*. Geneva: WHO Press.

Anexo 1. Cálculos de la síntesis de los hidrogeles

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

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

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

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

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

Se utilizó como solvente la solución de ácido acético 2% y la solución fue preparada en un balón volumétrico de 100 mL.

- **Preparación de solución de glutaraldehído 8,3% a partir de solución de glutaraldehído 25%**

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$8,3\% * 25\text{mL} = 25\% * V_2$$

$$V_2 = \frac{8,3\% * 25\text{mL}}{25\%} = 8,3 \text{ mL}$$

Se utilizó como solvente agua destilada y la solución fue preparada en un balón volumétrico de 25 mL.

- **Determinación de la densidad de la solución de glutaraldehído 8,3%**

Tabla 14. Datos para la determinación de la densidad de la solución de glutaraldehído 8,3%

Medida	Peso picnómetro vacío (g)	Peso picnómetro con agua (g)	Peso con solución de glutaraldehído 8,3% (g)
1	9,7289	14,9490	15,0533
2	9,7290	14,9439	15,0534
3	9,7289	14,9439	15,0533
Promedio	9,7289	14,9439	15,0533

- Densidad de agua a 21 °C = 0,99808 g/mL
- Peso del agua contenida en el picnómetro

$$\begin{aligned} \text{Peso del agua del picnómetro} \\ &= \text{peso promedio picnómetro con agua} \\ &\quad - \text{peso promedio picnómetro vacío} \end{aligned}$$

$$\text{Peso del agua en el picnómetro} = 14,9439 - 9,7289 = 5,215 \text{ g}$$

- Volumen del picnómetro

$$\begin{aligned} \text{Volumen del picnómetro} \\ &= \text{peso del agua en el picnómetro} * \text{densidad del agua a } 21^{\circ}\text{C} \end{aligned}$$

$$\text{Volumen del picnómetro} = 5,215 \text{ g} * \frac{\text{mL}}{0,99808 \text{ g}} = 5,225 \text{ mL}$$

- Densidad de la solución de la solución de glutaraldehído 8,3%

$$\begin{aligned} \text{Densidad de la solución de glutaraldehído } 8,3\% \\ &= \frac{\text{Peso de la solución de glutaraldehído } 8,3\% \text{ contenida en el picnómetro}}{\text{volumen del picnómetro}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Densidad de la solución de glutaraldehído } 8,3\% \\ &= \frac{\text{peso promedio del picnómetro con solución} - \text{peso promedio picnómetro vacío}}{\text{volumen del picnómetro}} \end{aligned}$$

$$\text{Densidad de la solución de glutaraldehído } 8,3\% = \frac{15,0533 \text{ g} - 9,7289 \text{ g}}{5,225 \text{ mL}}$$

$$\text{Densidad de la solución de glutaraldehído } 8,3\% = \frac{1,019 \text{ g}}{\text{mL}}$$

- **Cálculos para la síntesis de hidrogeles sin Novaluron**

- Determinación del volumen necesario de solución de glutaraldehído 8,3% para el entrecruzamiento de 11 mL de solución de quitosano 3%

$$\begin{aligned} 11 \text{ mL de solución de quitosano } 3\% * \frac{3 \text{ g quitosano}}{100 \text{ mL solución quitosano}} \\ * \frac{1 \text{ mol}}{170,376 \text{ g quitosano}} = 1,937 \times 10^{-3} \text{ moles de quitosano} \end{aligned}$$

Porcentaje de quitosano desacetilado = 80%

$$1,937 \times 10^{-3} \text{ moles de quitosano} * 0,8 \% \text{ quitosano desacetilado} \\ = 1,5496 \times 10^{-3} \text{ moles de quitosano desacetilado}$$

$$1,5496 \times 10^{-3} \text{ moles quitosano desacetilado} * \frac{1 \text{ mol glutaraldehído}}{2 \text{ moles de quitosano desacetilado}} \\ = 7,748 \times 10^{-4} \text{ moles de glutaraldehído}$$

- Para 25% de entrecruzamiento

$$7,748 \times 10^{-4} \text{ moles glutaraldehído} * 0,25 \\ = 1,937 \times 10^{-4} \text{ moles glutaraldehído}$$

$$1,937 \times 10^{-4} \text{ moles glutaraldehído} * \frac{100,12 \text{ g glutaraldehído}}{1 \text{ mol glutaraldehído}} \\ * \frac{100 \text{ g solución glutaraldehído } 8,3\%}{8,3 \text{ g glutaraldehído}} * \frac{1 \text{ mL}}{1,019 \text{ g}} = 0,229 \text{ mL}$$

Se realizó el mismo cálculo para los entrecruzamientos 25%, 50% y 75%. En la siguiente tabla se puede apreciar los respectivos volúmenes para los diferentes entrecruzamientos.

Tabla 15. Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% para los hidrogeles sin Novaluron

Entrecruzamiento	Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% (mL)	Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% (μL)
25%	0,229	229
50%	0,458	458
75%	0,688	688

- **Cálculos para la síntesis de hidrogeles con Novaluron**

Cada hidrogel debe liberar 0,55 ppm en los 100 mL de agua donde va a estar contenido. Para ello se determinó el volumen del hidrogel y poder determinar la cantidad de larvicida que debía ser adicionado a la solución de quitosano.

- Volumen del hidrogel

$$Volumen hidrogel = \pi r^2 h$$

$$Volumen hidrogel = \pi (5 \text{ mm})^2 * 3 \text{ mm}$$

$$\text{Volumen hidrogel} = 235,6 \text{ mm}^3 * \frac{1 \text{ cm}^3}{1000 \text{ mm}^3} * \frac{1 \text{ mL}}{1 \text{ cm}^3} = 0,236 \text{ mL}$$

- Cantidad de Novaluron para los hidrogeles a partir de solución de Novaluron 10% en 10 mL de solución de quitosano 3%

$$\frac{0,55 \text{ mg Novaluron}}{L} * 0,1 L = 0,055 \text{ mg Novaluron}$$

$$\text{Concentración de Novaluron en cada hidrogel} = \frac{\text{Cantidad de Novaluron en 100 mL}}{\text{volumen del hidrogel}}$$

$$\text{Concentración de Novaluron en cada hidrogel} = \frac{0,055 \text{ mg Novaluron}}{0,236 \text{ mL}}$$

$$\text{Concentración de Novaluron en cada hidrogel} = \frac{0,233 \text{ mg Novaluron}}{\text{mL}}$$

$$11 \text{ mL} * \frac{0,233 \text{ mg Novaluron}}{\text{mL}} * \frac{1000 \text{ mL de solución Novaluron 10\%}}{100000 \text{ mg Novaluron}} = 0,0256 \text{ mL}$$

- Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% para el entrecruzamiento de 10 mL de solución de quitosano 3%

En la preparación de los hidrogeles con Novaluron se utilizan 10 mL de solución de quitosano 3% debido a que el mix que contiene el larvicida tiene volumen de 1 mL.

$$10 \text{ mL de solución de quitosano 3\%} * \frac{3 \text{ g quitosano}}{100 \text{ mL solución quitosano}} * \frac{1 \text{ mol}}{170,376 \text{ g quitosano}} = 1,7608 \times 10^{-3} \text{ moles de quitosano}$$

Porcentaje de quitosano desacetilado = 80%

$$1,7608 \times 10^{-3} \text{ moles de quitosano} * 0,8 \% \text{ quitosano desacetilado} = 1,4086 \times 10^{-3} \text{ moles de quitosano desacetilado}$$

$$1,4086 \times 10^{-3} \text{ moles quitosano desacetilado} * \frac{1 \text{ mol glutaraldehído}}{2 \text{ moles de quitosano desacetilado}} = 7,0432 \times 10^{-4} \text{ moles de glutaraldehído}$$

- Para 25% de entrecruzamiento

$$7,0432 \times 10^{-4} \text{ moles glutaraldehído} * 0,25 \\ = 1,7608 \times 10^{-4} \text{ moles glutaraldehído}$$

$$1,7608 \times 10^{-4} \text{ moles glutaraldehído} * \frac{100,12 \text{ g glutaraldehído}}{1 \text{ mol glutaraldehído}} \\ * \frac{100 \text{ g solución glutaraldehído 8,3\%}}{8,3 \text{ g glutaraldehído}} * \frac{1 \text{ mL}}{1,019 \text{ g}} = 0,208 \text{ mL}$$

Tabla 16. Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% para los hidrogeles con Novaluron

Entrecruzamiento	Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% (mL)	Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% (μL)
25%	0,208	208
50%	0,417	417
75%	0,625	625

El mix que contiene el larvicida tiene volumen de 1 mL y el volumen de Novaluron es el mismo para los diferentes entrecruzamientos, por lo tanto, se determinó la cantidad de agua necesaria para el mix de acuerdo a cada entrecruzamiento y según la cantidad de solución de glutaraldehído ya determinada (Tabla 6). En la siguiente tabla se puede apreciar el volumen de agua, Novaluron y solución de glutaraldehído 8,3% para el mix de acuerdo al porcentaje de entrecruzamiento de los hidrogeles.

Tabla 17. Volumen de Novaluron, agua y solución de glutaraldehído 8,3 % para el mix

Entrecruzamiento	Volumen de Novaluron (μL)	Volumen de solución de glutaraldehído 8,3% (μL)	Volumen de agua (μL)
25%	25,6	208	766,4
50%	25,6	417	557,4
75%	25,6	625	394,4

Anexo 2. Formato de documentación del ensayo biológico

Formato para evaluación para medir la eficacia de la liberación de hidrogeles en larvas

Experimento # _____ Responsable _____ Fecha aplicación hidrogeles _____ Fecha de aplicación de larvas _____

Producto _____ especie _____ cepa _____

Instar evaluada _____

Fecha													
conc	Repetición	vivos	muertos										
		L	P	A	L	P	A	L	P	A	L	P	A
	1												
	2												
	3												
	4												
	control												
	1												
	2												
	3												
	4												
	control												
	1												
	2												
	3												
	4												
	control												
Fecha													
	1												
	2												
	3												
	4												
	control												
	1												
	2												
	3												
	4												
	control												
	1												
	2												
	3												
	4												
	control												

Anexo 3. Análisis estadístico de normalidad e igualdad de varianzas para los datos del ensayo biológico

Tabla 18. Valor P del análisis de varianzas y prueba de normalidad para larvas, con los diferentes entrecruzamientos en los dos periodos.

PERIODO	ENTRECRUZAMIENTO	ESTADIO	Valor P varianzas	Valor P normalidad
1	25	Larva	0,1957	0,79158
1	50	Larva	0,0866	0,90087
1	75	Larva	0,7615	0,95077
2	25	Larva	0,6490	0,79164
2	50	Larva	0,0750	0,91801
2	75	Larva	0,3938	0,90286

Solamente se analizaron los valores P de larvas, pues es el estadio en el cual el NOV tiene principal efecto.