

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL PIRIPROXIFEN COMO REGULADOR DE
CRECIMIENTO, EMPLEADO EN EL CONTROL DE VECTORES DE
ENFERMEDADES TROPICALES A PARTIR DE MATRICES DE QUITOSANO.**

KAREN TATIANA LUNA AMAYA

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

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL PIRIPROXIFEN COMO REGULADOR DE
CRECIMIENTO, EMPLEADO EN EL CONTROL DE VECTORES DE
ENFERMEDADES TROPICALES A PARTIR DE MATRICES DE QUITOSANO.**

KAREN TATIANA LUNA AMAYA

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

**TUTORAS DE INVESTIGACIÓN:
NORA ELENA VALDERRUTEN POSSO
CLARA BEATRIZ OCAMPO**

**ASESOR:
EDUARDO RUIZ**

**SANTIAGO DE CALI, VALLE
2015**

Aprobado Por:

Nombre correspondiente
Evaluador

Nombre correspondiente
Evaluador

Nombre correspondiente
Director del Proyecto

Nombre correspondiente
Co-Director del Proyecto

Santiago de Cali, Valle

11 de Junio de 2015

AGRADECIMIENTOS

Más que un proyecto de grado, para mí este trabajo fue el desafío más enriquecedor y satisfactorio que he tenido que afrontar durante toda mi carrera. Por esto, antes que nada quiero dar gracias a Dios por darme la oportunidad de ser quien soy, colmándome de salud y un hogar lleno de amor.

Agradezco enormemente a mis padres, ya que sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Siempre me brindaron todo su amor, apoyo, comprensión, dedicación y paciencia, donde su única meta era que yo pudiera lograr las mías y alcanzar mis sueños.

También quiero agradecer a mi tutora de grado Nora Elena Valderruten, por la enorme paciencia y dedicación que tuvo en todo momento y por permitirme aprender de su experiencia. Al igual que a Clara Ocampo y Eduardo Ruiz, quienes también me brindaron su apoyo y acompañamiento constante.

Por último, quiero agradecer al CIDEIM, en especial a Don Luis quien estuvo muy pendiente de que este proyecto diera los resultados esperados, y a la Universidad Icesi por formarme académica, profesional y personalmente. Gracias por todo lo brindado, por cada experiencia y por darme la oportunidad de vivir momentos inolvidables y conocer personas extraordinarias que de una u otra manera dejaron una huella en mí.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN EN TÉRMINOS DE NECESIDAD Y PERTINENCIA.....	15
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	17
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 OBJETIVO GENERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5. METODOLOGÍA PROPUESTA	25
5.1 SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES DE QUITOSANO CON GRADOS DE ENTRECruzAMIENTO DIFERENTES Y CARGADOS CON EL LARVICIDA PIRIPROXIFEN.....	25
5.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL PIRIPROXIFEN SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA EMERGENCIA DE ADULTOS DE <i>Aedes aegypti</i> DE MANERA <i>IN VIVO</i>	26
5.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	27
5.4 MATRIZ DE MARCO LÓGICO.	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIONES	43
8. RECOMENDACIONES	44
9. BIBLIOGRAFÍA.	45
ANEXOS.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pequeñas moléculas de entrecruzamiento para la fabricación de hidrogeles físicos o colvalentes. Tomada de (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009).	18
Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis de los hidrogeles	25
Tabla 3. Porcentaje de larvas muertas para cada entrecruzamiento en los tres periodos de tiempo evaluados	32
Tabla 4. Porcentaje de pupas muertas para cada entrecruzamiento en los tres periodos de tiempo evaluados	33
Tabla 5. Porcentaje total de larvas y pupas muertas para cada entrecruzamiento en los tres periodos de tiempo evaluados.....	33
Tabla 6. Valores P para la prueba de homogeneidad de varianzas y distribución normal de los datos para cada estadio en los diferentes entrecruzamientos a lo largo de los tres periodos de tiempo	36
Tabla 7. Valores P obtenidos para el análisis de varianza entre los bioensayos de cada entrecruzamiento para cada periodo del tiempo evaluado.....	37
Tabla 8. Comparación estadística del promedio de larvas muertas entre los tres periodos para todos los entrecruzamientos	38
Tabla 9. Comparación estadística del promedio de pupas muertas entre los tres periodos para todos los entrecruzamientos	38
Tabla 10. Comparación estadística del promedio de larvas muertas entre los tres entrecruzamientos	39
Tabla 11. Comparación estadística del promedio de pupas muertas entre los tres entrecruzamientos	40
Tabla 12. Comparación estadística del promedio de larvas muertas evaluando la correlación entre las variables periodo de tiempo y entrecruzamiento	41
Tabla 13. Comparación estadística del promedio de pupas muertas evaluando la correlación entre las variables periodo de tiempo y entrecruzamiento	41
Tabla 14. Datos de las mediciones para determinar la densidad del glutaraldehído	49

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Mortalidad de <i>Aedes aegypti</i> a través del tiempo con hidrogel cargado con piriproxifen y entrecruzado al 25%	33
Gráfica 2. Mortalidad de <i>Aedes aegypti</i> a través del tiempo con hidrogel cargado con piriproxifen y entrecruzado al 50%	34
Gráfica 3. Mortalidad de <i>Aedes aegypti</i> a través del tiempo con hidrogel cargado con piriproxifen y entrecruzado al 75%	34
Gráfica 4. Comparación de la mortalidad a través del tiempo de <i>Aedes aegypti</i> con los tres hidrogeles entrecruzados al 25%, 50% y 75% cargados con piriproxifen .	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución espacial de <i>Aedes aegypti</i> , Colombia, 2010. Tomada de (VILLAREAL, 2012).	16
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> . Tomada de (Coordinación Nacional de Vectores).....	20
Figura 3. Estructura química del Piriproxifen. Tomada de (OMS, 2005).	22

RESUMEN

Colombia, como la mayoría de los países tropicales, sufre de epidemias de dengue (PAULA, MATOSO, & DE FREITAS, 2010). El dengue es una enfermedad viral, de carácter endémo-epidémica, la cual es transmitida por el mosquito *Aedes aegypti*, y es considerada hoy en día la arbovirosis humana que causa la mayor morbilidad y mortalidad a nivel mundial (ARALI, DIAZ, & Angel, 2005). Se estima que, cada año son infectadas aproximadamente unas 100 millones de personas aproximadamente, lo que la convierte en un importante problema de salud pública (ARALI, DIAZ, & Angel, 2005). La circulación simultánea de los cuatro serotipos del mosquito vector, y su infestación en más del 90% del territorio Colombiano ubicado por debajo de los 2200 metros sobre el nivel del mar, pone a más de 25 millones de personas en riesgo de contraer esta enfermedad (INS/OPS/OMS, 2010).

Desde hace dos décadas, se está empleando en el país una estrategia combinada de los insecticidas organofosforados malatión y temefós para el control de *Aedes aegypti*. El malatión se utiliza para el control de mosquitos adultos por una técnica de aplicación espacial, mientras que el temefós, se emplea para el control del vector en larvas por aplicación local en los depósitos de agua de consumo doméstico (VILLAREAL, 2012). No obstante, se ha reportado la resistencia del *Aedes aegypti* al temefós en el 70% de las poblaciones evaluadas (VILLAREAL, 2012). Debido a esto, se ha venido empleando al piriproxifen como una alternativa para el control del mosquito.

Para llevar a cabo este proyecto se sintetizaron hidrogeles con tres diferentes grados de entrecruzamiento, y cargados con una concentración de 0.05 ppm, correspondiente a la concentración letal 90 (CL₉₀) del agente inhibidor de crecimiento de insectos piriproxifen (RAMIREZ & OCAMPO). También se determinó el efecto del larvicida liberado desde el hidrogel, sobre la inhibición de la emergencia de adultos de *Aedes aegypti* de manera *in vivo*; para identificar así el sistema de liberación controlada más eficiente.

Una vez realizado lo anterior, se logró determinar que los hidrogeles con un entrecruzamiento del 25% no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la mortalidad de larvas en los periodos 2 y 3 en la inhibición de la emergencia de adultos *Aedes aegypti*, mientras que los entrecruzamientos del 25%, 50% y 75% se comportaron estadísticamente igual en el periodo 1 para la letalidad de pupas. Por esto se puede afirmar, que en el tiempo transcurrido del estudio los hidrogeles con un entrecruzamiento del 25% fueron los que presentaron una inhibición más efectiva en la emergencia de adultos del mosquito vector, ya que con este entrecruzamiento el regulador de crecimiento inhibió la emergencia de adultos del mosquito vector en un 100% durante los tres periodos. Sin embargo, es necesario mencionar que para dar una conclusión final acerca de cuál es el sistema

de liberación controlada más efectivo a través del tiempo debe continuarse con el estudio por más tiempo.

Palabras Clave: Hidrogel, piroxifen, entrecruzamiento, dengue y *Aedes aegypti*

ABSTRACT

Colombia, like most tropical countries suffers of epidemics such as dengue (PAULA, MATOSO, & DE FREITAS, 2010), this being an epidemic-endemic viral disease, which is transmitted by the mosquito *Aedes aegypti*, and it is considered nowadays human arbovirus that causes increased morbidity and mortality worldwide (ARALI, DIAZ, & Angel, 2005). It is estimated that every year around the world, are infected approximately 100 million people with the virus, making it the most important public health problem (ARALI, DIAZ, & Angel, 2005). The simultaneous circulation of the four serotypes of the mosquito vector and its infestation in more than 90% of the Colombian territory located below 2200 meters above the sea level, exposes more than 25 million people living in urban areas at risk for this disease (INS/OPS/OMS, 2010).

For two decades, scientists are using a combined strategy of organophosphate insecticides malathion and temephos for control of *Aedes aegypti* in the country. Malathion is used to control a technical infected mosquitoes space application, while temephos it is used for vector control in their immature stage for local application on the deposits of domestic water (VILLAREAL, 2012). However, the project "Current status of the susceptibility of the primary malaria vectors (*Anopheles* spp.) and the vector of dengue (*Aedes aegypti*) to insecticides used in public health in Colombia and initiation of the National Monitoring Network insecticides" reported the resistance of *Aedes aegypti* to temephos in 70% of the evaluated populations (VILLAREAL, 2012).

Because of this, it has been employed pyriproxyfen as a new alternative for the control of insect growth, especially addressed to *Aedes aegypti*. To carry out this project was essential to make the correct synthesis on hydrogel with three different degrees of crosslinking, and a charged with a concentration of 0.05 ppm, corresponding to the lethal concentration 90 (LC₉₀) of the inhibitor insect growth pyriproxyfen (RAMIREZ & OCAMPO). The larvicidal effect released from the hydrogel, for the inhibition of adult emergence, makes *Aedes aegypti* also determined; in order to identify controlled release system more efficient. Once done all of the above, it was determined that hydrogels with intersecting 25% had no statistically significant difference in period 2 and 3 in the inhibition of adult emergence *Aedes aegypti* from larvae, while crossovers 25% 50% and 75% behaved statistically equal in period 1 for the lethality of pupae. Therefore we can

say, that in the time of the study hydrogels intersecting 25% were those with more effective inhibition of adult emergence vector mosquito.

Keywords: Hydrogel, pyriproxyfen, crosslinking, dengue and *Aedes aegypti*.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el dengue es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que 80 millones de personas se infectan anualmente, y cerca de 550 mil enfermos necesitan de hospitalización, 20 mil mueren como consecuencia del dengue, más de 2500 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad y más de 100 países tienen transmisión endémica (Coordinación Nacional de Vectores). Se estima que para el año 2085 el cambio climático pondrá a 3500 millones de personas en riesgo de contraer esta enfermedad (Coordinación Nacional de Vectores). Es importante mencionar que existen cuatro serotipos del virus del dengue (DEN-1, 2, 3, 4). Los virus se transmiten al hombre a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes* y la infección puede resultar asintomática o en un síndrome febril de severidad variada (OCAZIOINEZ & GÓMEZ, 2007). La mayoría de los enfermos desarrolla la forma leve o dengue clásico, pero algunos individuos desarrollan el dengue hemorrágico que puede llevar a la muerte, donde la probabilidad de contraer este último se maximiza si se ha tenido una infección anterior por un serotipo diferente del virus (OCAZIOINEZ & GÓMEZ, 2007).

En Colombia, la circulación de virus del dengue se detectó por primera vez en los años 70 cuando ocurrieron epidemias por DEN-1, DEN-2 y DEN-3 y más tarde en 1986 cuando el DEN-4 apareció (OCAZIOINEZ & GÓMEZ, 2007). Desde entonces, se han adoptado varias medidas de prevención y erradicación de esta enfermedad, donde la fumigación con insecticidas solo ha sido recomendada cuando se producen brotes o se confirman casos de dengue hemorrágico (OCAZIOINEZ & GÓMEZ, 2007). Sin embargo, a pesar de la importancia y el impacto socioeconómico que tiene este arbovirus, el uso de insecticidas en el país, y que además no existe tratamiento antiviral ni vacuna para el dengue y el dengue hemorrágico; el estado actual de la susceptibilidad y resistencia de poblaciones de *Aedes aegypti* no se han evaluado de forma continua (OCAMPO, MINA, CARABALÍ, ALEXANDER, & OSORIO, 2013).

Por otro lado, informes anteriores han indicado la resistencia local al temefós y al malatión en Antioquia y al temefós en Cali (OCAMPO, MINA, CARABALÍ, ALEXANDER, & OSORIO, 2013). Por esto, el uso alternativo de reguladores de crecimiento como es el caso del piriproxifen, fue aprobado por la OMS para el control de *Aedes aegypti*, restringiendo el uso de temefós en aquellas localidades donde se había manifestado la resistencia del vector (VILLAREAL, 2012). Los reguladores de crecimiento de insectos son los grupos de compuestos químicos sintéticos eficaces contra estados inmaduros del *Aedes aegypti*, y poseen un buen margen de seguridad para los organismos no blanco (VILLAREAL, 2012). El piriproxifen es un juvenoide o análogo de la hormona de crecimiento y afecta la fisiología de la morfogénesis, reproducción y embriogénesis de los insectos provocando la mortalidad en el estado de pupa (VILLAREAL, 2012).

Es por lo anterior, que este proyecto se enfocó principalmente en desarrollar hidrogeles de quitosano cargados con el regulador de crecimiento piriproxifen y evaluar la duración de su efecto sobre la inhibición de la emergencia de adultos de *Aedes aegypti*. Esto gracias a que los hidrogeles son sistemas inteligentes de liberación modificada, los cuales se han convertido en una opción muy prometedora para el control de vectores primarios de enfermedades endémicas, tal como es el caso del dengue. En estos sistemas se incorpora el agente activo en una red polimérica, para ser liberado de una forma definida, en función del tiempo (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009), que es justo lo que se desea lograr.

Para esto fue necesario sintetizar los hidrogeles de quitosano con tres diferentes grados de entrecruzamiento y cargarlos con el larvicida para posteriormente utilizarlos en los ensayos *in vivo*. La síntesis de los hidrogeles se llevó a cabo con tres diferentes grados de entrecruzamiento cargados con la concentración letal 90 (CL₉₀) de larvicida (0.05 ppm) (RAMIREZ & OCAMPO), mientras que otros se obtuvieron sin larvicida siendo el control para evaluar su efecto sobre la inhibición de la emergencia de adultos de mosquitos *Aedes aegypti*. Posteriormente, se prosiguió con el ensayo *in vivo* donde se realizaron tres bioensayos para cada grado de entrecruzamiento, con cuatro replicas y un control por bioensayo. Cada bioensayo duró un mes y 15 días, haciendo recambio de agua y larvas cada 15 días. La mortalidad de las larvas, pupas o adultos, se determinó por un conteo periódico de individuos (WHO, Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, 2005) y se registraba en un formato especial otorgado por el CIDEIM. Finalmente se realizó un tratamiento estadístico para determinar cuál fue el sistema más eficiente de liberación modificada, logrando inhibir en un mayor porcentaje la emergencia de adultos de *Aedes aegypti* a lo largo de los tres periodos de tiempo evaluados.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN EN TÉRMINOS DE NECESIDAD Y PERTINENCIA.

Es de vital importancia comprender la necesidad de implementar nuevas y efectivas alternativas para el control de crecimiento, reproducción y propagación del mosquito vector del dengue. Por otro lado, también es importante recolectar la información necesaria para entender y concientizar a toda la población no solo nacional, sino mundial que esta es una problemática que nos afecta a todos y que con un plan de prevención efectivo se pueden obtener resultados positivos donde se beneficien todos.

Lo primero que hay que saber es que el dengue constituye hoy la arbovirus más importante a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad e impacto económico, siendo esta una enfermedad viral aguda, endémo-epidémica, que se transmite fácilmente por la picadura de mosquitos hembra del género *Aedes*, principalmente por *Aedes aegypti* (INS/OPS/OMS, 2010). El agente etiológico es el virus dengue, el cual pertenece al género Flavivirus y su infección desencadena un amplio espectro de manifestaciones clínicas, las cuales pueden ir desde formas asintomáticas y subclínicas hasta cuadros que resultan ser muy graves, con compromiso vascular, afección de órganos y sistemas que resultan en asociación a la mortalidad (INS/OPS/OMS, 2010). Este virus posee cuatro serotipos (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4), los cuales circulan simultáneamente en nuestro país, lo que significa que una persona puede ser infectada y contraer el virus del dengue hasta cuatro veces (INS/OPS/OMS, 2010). Esto lo que lo convierte en una amenaza latente, ya que el dengue puede ser ocasionado por cualquiera de sus cuatro serotipos, sin desencadenar inmunidad cruzada entre ellos. Colombia, al ser un país tropical, sufre de epidemias de dengue, al igual que los demás países a nivel mundial que posean estas características ambientales y territoriales (PAULA, MATOSO, & DE FREITAS, 2010). La **Figura 1** muestra en naranja las regiones de nuestro país, reportadas hasta el 2010, que son susceptibles a contraer el virus.

Según el Instituto Nacional de Salud (INS), hasta la semana epidemiológica No. 51 de 2012 en Colombia, se notificaron en el Sistema de Vigilancia Salud Pública (SIVIGILA) 53141 casos totales de dengue, (51724 (97%) de dengue y 1417 (3%) dengue grave, que a la fecha de publicación se encontraban distribuidos así:

Probables: 29164 (56%) casos dengue, 610 (43%) dengue grave
Confirmados: 22560 (44%) casos dengue, 807 (57%) dengue grave

De los 53141 casos, se reportaron en total 191 muertes probables por dengue, de las cuales 55 fueron confirmadas. Comparando esos datos con el año 2011 a la semana epidemiológica No.51 se dio un aumento de casos distribuidos así: 29977 casos totales de dengue, aumentó en un 43.5%, de los cuales 28694 casos

corresponden a dengue (aumentó un 44.5%) y 1283 casos a dengue grave (aumentó un 9.4%) (ETV/INS, 2012).

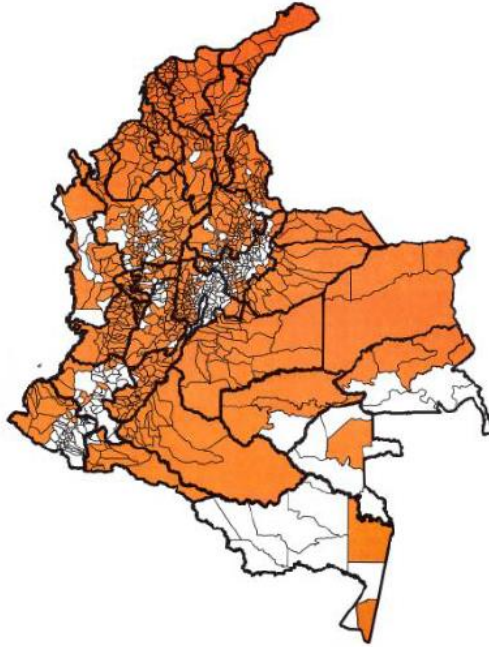


Figura 1. Distribución espacial de *Aedes aegypti*, Colombia, 2010. Tomada de (VILLAREAL, 2012).

SIVIGILA del INS también reportó hasta la semana epidemiológica No. 06 de 2013 en Colombia 10612 casos totales de dengue, 10345 (97.5%) de dengue y 267 (2.5%) de dengue grave, que hasta la fecha fueron confirmados 3118 casos (30%) de dengue y 117 casos (44%) de dengue grave. Datos que si se coparan con el año 2012 a la semana epidemiológica No.6 se documentan 5283 casos más con un aumento del 50.2% en los casos totales de dengue, de los cuales 5139 casos son de dengue y 144 de dengue grave. Se publicó también un total de 33 muertes probables por dengue de las cuales 5 fueron confirmadas, siendo la letalidad por dengue grave para Colombia del 1.9% a la semana epidemiológica No. 6 de 2013 (ETV/INS, 2013).

Las alternativas de control para inhibir la emergencia del mosquito, están dirigidas a disminuir las densidades del vector mediante el uso de insecticidas, como es el caso del malation y el temefos (VILLAREAL, 2012). Sin embargo, ya se reportó la resistencia de ambos larvicidas por parte del mosquito vector, *Aedes aegypti* (VILLAREAL, 2012). Por lo anterior es necesario encontrar alternativas de control, una de ellas es el uso de reguladores de crecimiento, como es el caso del piriproxifen, inmerso en una matriz de quitosano que permita prolongar la residualidad del producto.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

Las formulaciones de plaguicidas, incluyendo los larvicidas, son cada vez más complejas y exigentes, son diseñadas para mejorar no solo la seguridad y la eficiencia del ingrediente activo, sino también para proteger al medio ambiente y al usuario final al cual va dirigido (PAULA, DE PAULA, & BEZERRA, 2006). Por esto, los sistemas inteligentes de liberación modificada, se han convertido en una opción muy prometedora para el control de vectores primarios de enfermedades endémicas, tal como es el caso del dengue. En estos sistemas, se incorpora el agente activo en una red polimérica, para ser liberado de una forma definida, en función del tiempo (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009).

Los polímeros sintéticos y naturales (biopolímeros), han sido estudiados como portadores de principios activos y se han aprovechado sus componentes hidrófobos e hidrófilos para lograr interacciones favorables polímero-polímero, polímero-fármaco, polímero-disolvente y polímero-medio fisiológico, según sea la necesidad para este tipo de sistemas de liberación modificada (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009). Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque existan ilimitadas posibilidades de combinaciones posibles para estos materiales, hay factores limitantes que restringen la elaboración y desarrollo de dichos sistemas, tales como: la biocompatibilidad, subproductos tóxicos, biodegradabilidad y el costo de fabricación (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009).





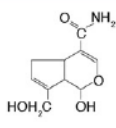
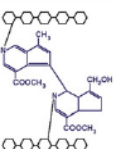
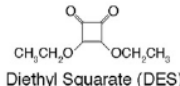

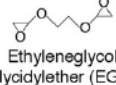
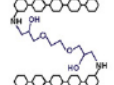
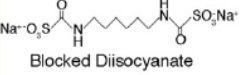
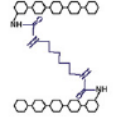
Los biopolímeros son generados por plantas, animales, bacterias y algunos hongos durante su ciclo de vida, por lo que son considerados como recursos renovables. Los principales biopolímeros encontrados en la naturaleza son: proteínas, lípidos, polinucleótidos y polisacáridos. El quitosano es un polisacárido lineal formado por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos $\beta(1-4)$, distribuidas al azar (VALDERRUTEN, VALVERDE, ZULUAGA, & RUIZ, 2014). Está presente en conchas de crustáceos, moluscos e insectos (ABREU, OLIVEIRA, PAULA, & DE PAULA, 2012), y es uno de los principales elementos estructurales en el exoesqueleto de los mismos (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009). El quitosano, se caracteriza por su alta basicidad, por lo que una de sus principales limitaciones es su mala solubilidad en soluciones acuosas, no obstante, se destaca por su solubilidad en soluciones acuosas ácidas, debido a la presencia del grupo amino. Es un polisacárido no tóxico, estable, biodegradable, puede ser esterilizado, es altamente absorbente y posee propiedades antimicrobianas gracias a la presencia de los grupos amino cargados positivamente. Esto hace del quitosano un excelente excipiente, con una amplia gama de aplicaciones en el campo biomédico, biotecnológico y farmacéutico (VALDERRUTEN, VALVERDE, ZULUAGA, & RUIZ, 2014).

Los hidrogeles son redes poliméricas reticulados que se caracterizan por presentar un alto número de grupos hidrófilos en su estructura, teniendo una elevada afinidad

por el agua, pero no se disuelven gracias a los enlaces físicos o químicos formados entre las cadenas del polímero. Las redes pueden estar formadas por enlaces covalentes (hidrogeles químicos) o por fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (hidrogeles físicos) (VALDERRUTEN, VALVERDE, ZULUAGA, & RUIZ, 2014).

Hay que tener en cuenta que la red polimérica de quitosano debe satisfacer dos condiciones para cumplir con las características requeridas por un hidrogel: 1) las cadenas deben tener interacciones entre ellas, lo suficientemente fuertes como para formar puntos semi-permanentes en la red molecular y así evitar la solubilidad; y 2) la red polimérica debe promover y permitir el acceso y permanencia de las moléculas de agua (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009). La producción de hidrogeles de quitosano, útiles en la fabricación de sistemas de liberación controlada, requiere el uso de pequeñas moléculas de entrecruzamiento para formar redes irreversibles entre las cadenas poliméricas, unidas por enlaces covalentes (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009). En la tabla 1 se muestran varias moléculas pequeñas de entrecruzamiento que se han venido utilizando para producir estos hidrogeles covalentes de quitosano.

Tabla 1. Pequeñas moléculas de entrecruzamiento para la fabricación de hidrogeles físicos o covalentes. Tomada de (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009).

	Agent	Target Functional Groups	Reaction Conditions	Cross-linkage	Comments
Small Molecule	 Glutaraldehyde	Primary amines & aldehydes	Reaction favors basic & neutral pH		Reaction completes within 1 h; Difficult to remove trace glutaraldehyde
	 Formaldehyde	Primary amines & aldehydes	Basic & neutral pH		Reaction completes within 1 h; Difficult to remove trace formaldehyde
	 Genepin	Primary amines & aldehydes	Independent of pH		Nontoxic linker; Can undergo self polymerization
	 Diethyl Squarate (DES)	Primary amines	pH 4.5-5.5; Solution precipitates at higher pH; Reaction favors elevated temperatures		Reacts under mild conditions & is nontoxic; Long reaction time precludes use for in situ gelation
	 Ethyleneglycol diglycidylether (EGDE)	Primary amines and oxiranes	Basic pH; Reaction favors elevated temperatures		Difficult to remove EDGE traces; Long reaction times & basic pH can yield hydrogel beads
	 Blocked Diisocyanate	Primary amines	Basic pH; Reaction requires elevated temperatures		Long reaction times & basic pH requirements preclude in situ gelation; Can produce hydrogel beads

Todas las características anteriormente mencionadas para el quitosano, lo convierten en un polímero adecuado para la fabricación de hidrogeles como sistemas de liberación controlada de compuestos con una funcionalidad definida

(BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009), como es el caso del piriproxifen, un larvicida de uso comercial para la inhibición del crecimiento y propagación del vector del dengue, el mosquito *Aedes aegypti*.

Aedes aegypti es un mosquito con hábitos típicamente domiciliarios. Sus sitios de cría son fundamentalmente artificiales: botellas, floreros, neumáticos, bebedores de animales, latas abiertas o contenedores de cualquier tipo, vasijas o cualquier tipo de recipiente en desuso. Cuando las condiciones son apropiadas, el mosquito no suele desplazarse grandes distancias de los sitios de ovoposición, sin embargo, en ocasiones puede reconocerse un rango de dispersión activa hasta de 1-2 kilómetros. Es por esto que la dispersión a través de medios de transporte tales como automóviles, trenes, camiones, barcos, y aviones, es uno de los factores más importantes de diseminación de estos mosquitos y de los virus del dengue de una región a otra. (Coordinación Nacional de Vectores)

Su ciclo de vida presenta una metamorfosis completa que comprende estados inmaduros de vida acuática y adultos de vida aérea, las cuales se pueden dividir en cuatro fases y evidenciar en la **Figura 2**:

- 1) Posterior a una alimentación sanguínea las hembras pueden colocar entre 50 y 150 huevos pequeños (aproximadamente de 0.8 mm) en las paredes de los recipientes, sobre el nivel del agua; cuando el recipiente recibe agua nuevamente los huevos son inundados y se produce la eclosión de los mismos. Cabe mencionar que los huevos son formas de resistencia, las cuales pueden sobrevivir durante muchos meses en clima adverso hasta que las condiciones ambientales favorezcan su eclosión.
- 2) Los huevos eclosionan dando lugar a formas larvianas, acuáticas, nadadoras, de respiración aérea, que se alimentan por filtración de material en suspensión.
- 3) Posteriormente las larvas mudan al estado de pupa, durante el cual no se alimentan y en el que se producen los cambios que conducirán a la última fase del desarrollo.
- 4) El último estado es el adulto alado. Las formas adultas tienen dimorfismo sexual, son fitófagos ambos géneros, la hembra además hematófaga, es decir, que necesita de las proteínas disponibles en la sangre para la producción de sus huevos (Coordinación Nacional de Vectores).

La duración del ciclo completo depende de las condiciones ambientales, pero en condiciones óptimas puede variar entre 7 y 14 días aproximadamente. Las formas adultas tienen un promedio de vida de una semana para los machos y aproximadamente un mes para las hembras. Una hembra ovoponiendo cada tres o cuatro días en condiciones óptimas, puede llegar a poner alrededor de 700 huevos en el curso de su vida (Coordinación Nacional de Vectores).

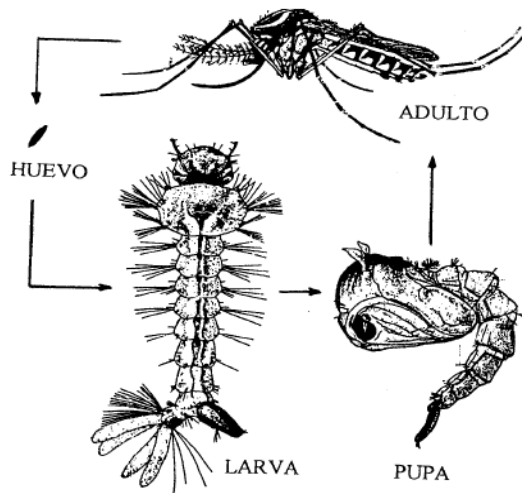


Figura 2. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. Tomada de (Coordinación Nacional de Vectores).

Por otro lado, el dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos extendida más rápidamente en el mundo. En los últimos 50 años, la incidencia se ha incrementado unas 30 veces con el aumento de la extensión geográfica a nuevos países y en la presente década, de lo urbano a los entornos rurales. Se estima que ocurren unos 50 millones de infecciones de dengue cada año y aproximadamente 2.5 billones de personas viven en países endémicos de dengue (TDR/WHO, 2009). En Colombia, es una de las patologías infecciosas con mayor impacto a nivel nacional, siendo de especial interés en salud pública, exigiendo así, planes de vigilancia, prevención y control del virus (INS/OPS/OMS, 2010). En las Américas, este virus es transmitido por la picadura de un mosquito *Aedes aegypti* infectado con uno de los cuatro serotipos del virus del dengue (OPS/OMS, 2014). Es una enfermedad febril que puede afectar no sólo a personas adultas, sino también a lactantes y niños (OPS/OMS, 2014). Sus síntomas son muy variados y van desde fiebre moderada a una fiebre tan alta que incapacita totalmente, acompañada con dolor de cabeza severo, dolor muscular, en las articulaciones, detrás de los ojos y en ocasiones puede producir sarpullidos (OPS/OMS, 2014). Si la enfermedad evoluciona, puede ocasionar un dengue grave, el cual se caracteriza por síntomas tales como dificultad al respirar, sangrado severo y complicaciones en los órganos lo que desenvoca en shock. Cabe mencionar que la infección por un serotipo, seguida por la infección dada por otro serotipo diferente aumenta el riesgo de una persona de padecer dengue grave y puede llegar a la muerte más fácilmente (OPS/OMS, 2014).

La tasa de incidencia del dengue en Colombia, ha venido fluctuando desde 1978 tendiendo al incremento a través del tiempo (INS/OPS). En Puerto Berrío, Antioquia, se reportó el primer caso de dengue grave (hemorrágico) en diciembre de 1989; desde entonces se ha observado en el país una tendencia de rápido aumento en el número de casos, pasando de 5.2 casos por 100 mil habitantes en la década de

1990, a 18.1 casos por 100 mil habitantes en los últimos cinco años (INS/OPS). El comportamiento de la mortalidad es muy similar, y muestra índices de aumento, se paso de 0.07 muertes por 100 mil habitantes en la década de los 90 a 0.19 muertes por 100 mil habitantes en la presente década (INS/OPS). Según el Boletín Epidemiológico Dengue, hasta la semana epidemiológica No.51 de 2012 se notificaron en el Sistema de Vigilancia Salud Pública (Sivigila) del Instituto Nacional de Salud (INS) 53141 casos totales de dengue, de los cuales 51725 (97%) fueron de dengue y 1417 (3%) de dengue grave, con una letalidad de 191 muertes probables por dengue, de las cuales 55 fueron confirmadas; comparando esto con la misma semana epidemiológica del año 2011 se registra un aumento del 43.5% de casos totales de dengue (ETV/INS, 2012). De la misma manera en la semana epidemiológica No.06 del año 2013 se notificaron 10612 casos totales de dengue, 10345 de dengue y 267 de dengue grave; 5283 casos totales de dengue más que en el año 2012 hasta la misma semana epidemiológica, con una letalidad de 33 muertes probables por dengue, 5 de ellas confirmadas (ETV/INS, 2013). Mientras que Pan American Health Organization (PAHO) y World Health Organization (WHO) actualizó los datos de la semana 38 del 2014 el 07 de octubre de 2014, donde muestran que en Colombia se reportaron hasta la fecha 77796 casos totales con sospecha de dengue, de los cuales 33296 fueron confirmados, 1954 como dengue grave, llevando a que se presentaran 56 casos de muertes provocadas por los cuatro serotipos del virus (PAHO/WHO, 2014).

A pesar de las complicaciones de este virus, aun no existe vacuna ni medicina específica para tratar el dengue (OPS/OMS, 2014), pero la detección oportuna y el acceso a la asistencia médica adecuada disminuyen las tasas de mortalidad por debajo del 1% (VILLAREAL, 2012). Desde los años 50-70 que se llevó a cabo en las Américas una campaña de control de vectores contra *Aedes aegypti* por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) utilizando DDT, un insecticida organoclorado, no se ha llevado a cabo ni desarrollado una campaña comparable a ésta para reducir la transmisión del virus (OCAMPO, SALAZAR, MINA, MCALLISTER, & BROGDON, 2011). El INS y la OPS recomienda realizar el control focal de larvas *Aedes aegypti* en depósitos de agua destinadas a uso doméstico, los cuales no pueden ser protegidos, eliminados, destruidos o tratados otra manera, y en sumideros de aguas lluvias que no puedan ser controlados con otro método (INS/OPS/OMS, págs. 52-53). Por otro lado la resistencia a los insecticidas es una de las principales amenazas para la eficacia de programas de control de vectores (OCAMPO, SALAZAR, MINA, MCALLISTER, & BROGDON, 2011), según la OMS (1980), la resistencia es un fenómeno dinámico, que aparece en lapsos sumamente variables en diferentes especies que son sometidas a diferentes intensidades de aplicación de insecticidas. Estos continúan siendo el soporte principal de los programas de control de enfermedades transmitidas por vectores, sin embargo, a pesar de no ser posible evitar el desarrollo de la resistencia en poblaciones de insectos expuestos a estos, es posible retardar este proceso (VILLAREAL, 2012). La OMS aprobó el uso alternativo de *Bacillus thuringiensis Israeliensis* (Bti) y de los

reguladores de crecimiento diflubenzurón y piriproxifen, para el control del *Aedes aegypti*, y restringió el uso de temefos en aquellas localidades donde se había manifestado la resistencia del vector (VILLAREAL, 2012).

Los reguladores de crecimiento de insectos son los grupos de compuestos químicos sintéticos eficaces contra estados inmaduros del *Aedes aegypti*, y poseen un buen margen de seguridad para los organismos no blanco (VILLAREAL, 2012). El piriproxifen es un juvenoide o análogo de la hormona de crecimiento y afecta la fisiología de la morfogénesis, reproducción y embriogénesis de los insectos, y la mortalidad ocurre principalmente en el estado de pupa (VILLAREAL, 2012). El contenido de piriproxifen es detectado por UV a 245 nm (CIMAP, 2005), y su toxicidad fue evaluada en 1999 y 2001 por la FAO/OMS de la JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues), la cual es la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre Residuos de Plaguicidas, donde se concluyó que no era necesario establecer una dosis de referencia aguda debido a la baja toxicidad del piriproxifen (OMS, 2005); sin embargo, WHOPEP (WHO Pesticide Evaluation Scheme) recomienda no exceder de 0.01mg/L de piriproxifen en recipientes de agua potable (WHO, 2008). En el 2001 la JMPR evaluó la toxicidad del piriproxifen como larvicida de mosquitos en el agua potable y llegó a la conclusión de que la ingesta en una concentración objetivo de control no presenta riesgos inaceptables, es decir, no es genotóxico y no supone un riesgo cancerígeno para los seres humanos (OMS, 2005). A continuación, se presenta su estructura química en la **Figura 3**:

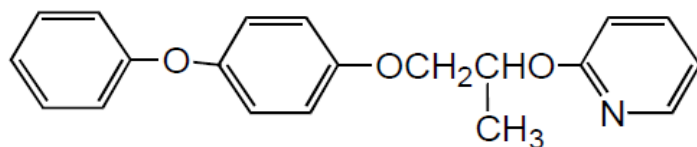


Figura 3. Estructura química del Piriproxifen. Tomada de (OMS, 2005).

Debido a la resistencia local al temefos y malatión reportados en Antioquia y al temefos en Cali (OCAMPO, SALAZAR, MINA, MCALLISTER, & BROGDON, 2011), la efectividad del piriproxifen como regulador de crecimiento de *Aedes aegypti* fue evaluado por Clara Ocampo y colaboradores (OCAMPO, MINA, CARABALÍ, ALEXANDER, & OSORIO, 2013). En este estudio realizado en el área urbana de Guadalajara de Buga, en el suroeste Colombiano, se encontró que los desagües de agua eran criaderos potenciales de este mosquito en sus etapas inmaduras, por lo que el paso a seguir fue la aplicación mensual de piriproxifen en todos los desagües de esta zona (en total 4800), donde después de cada tratamiento se observó una reducción significativa en la captura de larvas de *Aedes aegypti*, lo que se vio reflejado en la disminución de la incidencia del dengue en Buga durante el periodo de intervención, reportándose un 100% en la inhibición de la emergencia de mosquitos adultos por la implementación de este larvicida, una vez terminado el estudio (OCAMPO, MINA, CARABALÍ, ALEXANDER, & OSORIO, 2013). Por otro

lado, es necesario conocer las concentraciones a las cuales el piriproxifen cumple su efecto como un potente y eficaz larvicida, por lo que Estrada y Mulla, Hatakoshi y colaboradores, y Henrick, reportaron en 1986, 1987 y 1995, respectivamente, la CL₅₀ (concentración letal 50), es decir, la concentración a la cual se inhibe en un 50% la emergencia de *Aedes aegypti* con piriproxifen; obteniendo valores de 0.33 ppm, 0.023 ppm y 0.0039 ppm, respectivamente (VILLAREAL, 2012). Para el desarrollo de este trabajo, se trabajará con una CL₉₀ de 0.05 ppm, reportada por los investigadores Clara Ocampo y Luis Ramirez (RAMIREZ & OCAMPO).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un hidrogel de quitosano cargado con el larvicida piriproxifen, y evaluar la duración de su efecto sobre la inhibición de la emergencia de adultos de *Aedes aegypti*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar hidrogeles de quitosano con tres grados de entrecruzamiento diferentes y cargados con el larvicida piriproxifen, para emplearlos en estudios de liberación controlada.
- Determinar el efecto del larvicida piriproxifen liberado por medio del hidrogel, sobre la inhibición de la emergencia de mosquitos adultos de *Aedes aegypti* de manera *in vivo*.

5. METODOLOGÍA PROPUESTA

5.1 SÍNTESIS DE LOS HIDROGELES DE QUITOSANO CON GRADOS DE ENTRECruzAMIENTO DIFERENTES Y CARGADOS CON EL LARVICIDA PIRIPROXIFEN.

Tabla 2. Reactivos utilizados para la síntesis de los hidrogeles

Reactivo	Pureza	Marca
Piriproxifen	10%	Valent BioSciences
Ácido acético glacial	99.9%	J.T.BAKER
Glutaraldehído	25%	J.T.BAKER
Quitosano	98%	ALDRICH Chemistry

La síntesis de los hidrogeles se inició con la disolución de quitosano al 3% en una solución al 2% de ácido acético por medio de agitación constante, hasta completa homogeneidad. En un recipiente aparte se realizó una mezcla de la cantidad de larvicida correspondiente a la CL_{90} y agua destilada con ayuda del homogenizador vortex hasta que quedara completamente homogéneo. Posterior a esto se adicionó la mezcla la cantidad necesaria de la solución de quitosano para mantener la concentración del larvicida y siguiendo con agitación constante se adicionó por último la cantidad de glutaraldehído previamente calculada para cada grado de entrecruzamiento (25%, 50% y 75%). Esta mezcla se agitó con ayuda del vortex, por aproximadamente 15 a 20 segundos para garantizar homogeneidad pero sin que se empiece a gelificar ya que este proceso ocurre a temperatura ambiente.

La mezcla, se adicionó sobre un molde en forma de aro sostenido en una placa de vidrio previamente silinizado para evitar que el hidrogel se adhiriera a las paredes del mismo; se tapa con otra placa de vidrio silinizado y se mantuvieron unidas con ayuda de un gancho para evitar que la mezcla se derrame. El hidrogel se dejó por 24 horas a temperatura ambiente para que se entrecruzara correctamente, posteriormente fueron retiradas las placas de vidrio y se puso el hidrogel en un recipiente de teflón para cortar los discos con un diámetro de 10 mm, el cual fue el tamaño elegido previamente, a partir del cual se realizaron los cálculos pertinentes para mantener la concentración estipulada de larvicida (0.05 ppm). Una vez cortados los hidrogeles se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 48 horas para que se eliminara el exceso de humedad, y por último se dejaron en el horno a 50°C por 24 horas más, quedando listos para su utilización en los ensayos *in vivo*.

Es importante mencionar que las cantidades requeridas de la solución de quitosano en ácido acético, de larvicida, agua, piriproxifen y glutaraldehído se determinaron a partir del volumen que podía contener el aro que se empleó como molde (11 mL aproximadamente) y del diámetro al que finalmente iba a ser cortado cada hidrogel (10 mm) para mantener la concentración de larvicida estipulada previamente. Además fue necesario calcular la densidad del glutaraldehído para determinar así la cantidad necesaria para cumplir con los diferentes grados de entrecruzamiento 1, 2 y 3 para el 25%, 50% y 75% respectivamente, ya que el glutaraldehído inicialmente se encontraba al 25% y a esta concentración se presentaron inconvenientes pues el hidrogel empezaba a entrecruzarse muy rápido sin lograr la homogeneidad completa, por lo que se decidió diluirlo y llevarlo a una concentración de 8.33% donde se facilitó el proceso. Todos estos cálculos están contenidos en el **Anexo 1**.

5.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL PIRIPROXIFEN SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA EMERGENCIA DE MOSQUITOS ADULTOS DE *Aedes aegypti* DE MANERA *IN VIVO*.

La determinación del efecto del regulador de crecimiento liberado desde el hidrogel, sobre la inhibición de la emergencia de *Aedes aegypti* de manera *in vivo*, se realizó con tres bioensayos por cada grado de entrecruzamiento. Cada bioensayo se componía de cuatro réplicas y un control. Las réplicas se realizaron en vasos desechables de 7 onzas transparentes para evitar la contaminación, con 100 mL de agua de clorada, 10 larvas de acuerdo a la metodología sugerida por la OMS (WHO, Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, 2005). Los vasos de las pruebas y el control fueron cubiertos con una malla para evitar el escape de algún adulto que llegara a emerger (WHO, Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, 2005). Las larvas se alimentaron cada dos o tres días con una o dos gotas de hígado en solución (RAMIREZ & OCAMPO), cada dos días se contaron las larvas muertas para retirarlas del experimento, siendo las larvas muertas aquellas que no mostraron movimiento (WHO, Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, 2005).

Los bioensayos fueron realizados por triplicado, realizando dos recambios de recipiente, agua y larvas cada 15 días, dejando los hidrogeles. Por otro lado, para garantizar que todos los bioensayos se encontraban bajo las mismas condiciones, las pruebas se realizaron a 25-28°C aproximadamente, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y una humedad relativa del 70% aproximadamente (WHO, Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides, 2005).

Estos experimentos se realizaron en el laboratorio de Biología y Control de Vectores de CIDEIM, quienes me apoyaron con su experiencia en evaluación de insecticidas y nos facilitaron los formatos de registro, cual se puede observar en el **Anexo 2**.

5.3 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

La variable que se evaluó fue la mortalidad de larvas y pupas. Se determinó si existía una diferencia estadísticamente significativa entre los bioensayos de cada grado de entrecruzamiento, entre los tres diferentes grados de entrecruzamiento y los periodos de tiempo. Como primera medida se determinó si los tres bioensayos eran iguales para cada grado de entrecruzamiento, luego se evaluó si había una diferencia estadísticamente significativa entre los hidrogeles con 3 diferentes grados de entrecruzamiento, y por último se determinó si existía una correlación entre el grado de entrecruzamiento y el periodo de tiempo en el cual fue evaluado el hidrogel.

Para lo anterior se realizó un ANOVA como prueba estadística para el análisis de los datos, dado que esta sirve compara varios grupos en cuanto a una variable cuantitativa (porcentaje mortalidad) y establecer si alguno de los grupos es diferente del resto (GIRDEN, 1992). Sin embargo, para aplicar esta prueba los resultados obtenidos debieron cumplir con dos supuestos:

Supuesto 1: Los datos tienen homogeneidad de varianzas

Para lo que se plantea una hipótesis nula y otra alterna:

H₀: Los datos tienen varianzas iguales

H₁: Los datos no tienen varianzas iguales

Supuesto 2: Los datos tienen una distribución normal

Para lo que se plantea como hipótesis nula y alterna lo siguiente:

H₀: Los datos tienen una distribución normal

H₁: Los datos no tienen una distribución normal

Para determinar si los datos obtenidos cumplían con los supuestos, se tiene un valor alfa de 0,05 como referencia, donde se tiene que si los valores P obtenidos después del tratamiento estadístico son inferiores a este valor alfa se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alterna (GIRDEN, 1992). Dado que estos dos supuestos se cumplieron, se procedió a realizar el ANOVA para determinar si había una diferencia estadísticamente significativa entre los bioensayos, planteando como lo siguiente:

Supuesto: No existe diferencia estadísticamente significativa entre los 3 bioensayos para cada entrecruzamiento.

H₀: bioensayo 1= bioensayo 2= bioensayo 3

H₁: bioensayo 1 ≠ bioensayo 2 ≠ bioensayo 3

Se obtuvieron valores P inferiores al alfa, por lo que se asegura que los tres bioensayos son iguales para cada grado de entrecruzamiento.

Posteriormente se realizó otro ANOVA para establecer si existía una diferencia estadísticamente significativa entre los tres diferentes grados de entrecruzamiento, por lo que se planteó lo siguiente:

Supuesto: No existe diferencia estadísticamente significativa entre los 3 grados de entrecruzamiento para el porcentaje de larvas y pupas muertas.

H₀: entrecruzamiento 25% = entrecruzamiento 50% = entrecruzamiento 75%

H₁: entrecruzamiento 25% ≠ entrecruzamiento 50% ≠ entrecruzamiento 75%

Se obtuvieron valores P superiores al alfa, por lo que se asegura que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre tres diferentes grados de entrecruzamiento. Por esto, se procede a realizar el Test de Fisher, el cual permite realizar comparaciones múltiples, como por ejemplo las medias de los niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de varianzas mediante la técnica ANOVA (LLOPIS, 2013). Por este medio se determinó cuál grado de entrecruzamiento se comportó de una manera estadísticamente diferente a los demás.

Para determinar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre los tres periodos de tiempo se volvió a realizar un ANOVA, donde se planteó lo siguiente:

Supuesto: No existe diferencia estadísticamente significativa entre los 3 periodos de tiempo para el porcentaje de larvas y pupas muertas.

H₀: periodo 1 = periodo 2 = periodo 3

H₁: periodo 1 ≠ periodo 2 ≠ periodo 3

La prueba arrojó valores P superiores al alfa (0,05), por lo que se puede asegurar que si existía una diferencia estadísticamente significativa entre los 3 periodos de tiempo evaluados. Por esto, se realizó nuevamente un Test de Fisher, para determinar qué grado de entrecruzamiento se comportó de una manera significativamente diferente.

Por último, se realizó el análisis factorial, el cual tiene como finalidad analizar la correlación entre un gran número de variables (GORSUCH, 1983), por ejemplo la mortalidad de larvas y pupas para cada entrecruzamiento y para cada periodo por separado y correlacionarlos entre sí.

5.4 MATRIZ DE MARCO LÓGICO.

OBJETIVO GENERAL: Aportar información acerca de la utilidad de la implementación de sistemas de liberación modificada de larvicidas como un posible mecanismo en la inhibición de la emergencia de adultos de <i>Aedes aegypti</i> .			
Objetivos específicos	Actividad	Indicador	Supuesto
Síntesis de los hidrogeles de quitosano con grados de entrecruzamiento diferentes y cargados con el larvicida piriproxifen	<ul style="list-style-type: none"> - Preparar una solución de quitosano al 3% en ácido acético al 2% - Aparte preparar un "mix" con el larvicida y agua destilada - Se adicionan la solución de quitosano al "mix" - Se adiciona el glutaraldehído - La mezcla se adiciona al molde sostenido en placa de vidrio - Se tapa con otra placa de vidrio y se ajusta con ayuda de un gancho - Se deja entrecruzar a temperatura ambiente por 24 horas - Se retiran las placas de vidrio, hidrogel contenido 	<ul style="list-style-type: none"> -Que la homogenización del hidrogel sea completa y uniforme -Que el vidrio este correctamente silanizado. -Que el tiempo de agitación después de adicionar el glutaraldehído sea el indicado 	<ul style="list-style-type: none"> -Que el hidrogel quede completamente homogéneo y el larvicida correctamente distribuido en él. -Que el hidrogel no se adhiera a las paredes del vidrio. -Que el hidrogel no empiece a gelificarse antes de ser adicionado al aro molde.

	<p>en el aro molde se coloca sobre una superficie de teflón</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se cortan los discos con un diámetro de 10 mm - Se dejan secar a temperatura ambiente por 48 horas -Se dejan en el horno por 24 horas a 50°C y se retiran. 		
<p>Determinación del efecto del piriproxifen sobre la inhibición de la emergencia de adultos de <i>Aedes aegypti</i> de manera <i>in vivo</i>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Cada ensayo (replica o control) se realiza en un vaso desechable -Se adiciona a cada vaso 100 mL de agua de clorada -Se adiciona a cada vaso un total de 10 larvas y el hidrogel -Se cubrieron todos los vasos con una malla -Las larvas se alimentan con dos gotas de solución de hígado -Las larvas muertas se cuentan cada dos o tres días y estas eran retiradas del experimento 	<ul style="list-style-type: none"> -Que la CL₉₀ del larvicida mantenga constante su liberación, liberándose de forma regular y uniforme a través de los hidrogeles sintetizados con grado de entrecruzamiento diferente. - Que las larvas de los ensayos que contenían el hidrogel cargado con el larvicida no emerjan a adultos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Que uno de los entrecruzamientos de los hidrogeles sea más eficiente para ser empleado como un sistema de liberación prolongada a través del tiempo -Que la CL₉₀ empleada se libere constante y uniformemente por el tiempo de duración del estudio. - Que solo las larvas de los ensayos que contenían el hidrogel sin carga de larvicida emerjan a adultos

	<p>-Los datos de mortalidad se registran</p> <p>-Los bioensayos para cada entrecruzamiento, se repitieron cada 15 días haciendo recambio completo de recipiente, agua y larvas, dejando el hidrogel intacto</p> <p>-Los ensayos se mantienen a 28°C con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad</p>		
--	---	--	--

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimentalmente se realizó la síntesis de hidrogeles de quitosano, con tres diferentes grados de entrecruzamiento (1, 2 y 3) y cargados con el larvicida piriproxifen. Se lograron obtener materiales homogéneos y consistentes con ausencia de burbujas, para esto fue necesario realizar primero una mezcla entre el piriproxifen y el agua antes de ser adicionada la solución de quitosano al 3%. Si no se hacía esto previamente el larvicida no se incorporaba correctamente, quedando precipitado en el fondo de la mezcla. También fue necesario diluir la solución de glutaraldehído, ya que esta se encontraba al 25% y al estar tan concentrada la cantidad necesaria para llegar al entrecruzamiento deseado era muy poca, por lo que no lograba dispersarse bien en la mezcla de larvicida, agua y solución de quitosano, entonces, empezaba a entrecruzarse muy rápido sin llegar a completa homogeneidad y el hidrogel quedaba inconsistente. Este problema se logró solucionar diluyendo poco a poco la solución de glutaraldehído, hasta que se llegó a una concentración de 8.3% donde se observó que el material quedaba completamente homogéneo y consistente, libre de burbujas.

Los hidrogeles se evaluaron de manera *in vivo* bajo condiciones de laboratorio realizando tres bioensayos por cada entrecruzamiento, cada uno con cuatro réplicas y un blanco, que no estaba cargado con el larvicida. El estudio se realizó por tres periodos de tiempo, cada uno de 15 días, durante el transcurso de este tiempo se realizaba el conteo de larvas y pupas muertas y al final de cada periodo se hacía el recambio total de vaso, agua y larvas. En las **Tablas 3, 4 y 5** se muestran los resultados del porcentaje de larvas y pupas muertas por cada periodo de tiempo en las réplicas, ya que como era de esperarse en los blanco no murió ninguna larva ni pupa y por el contrario muchas emergieron a adultos.

Tabla 3. Porcentaje de larvas muertas para cada entrecruzamiento en los tres periodos de tiempo evaluados

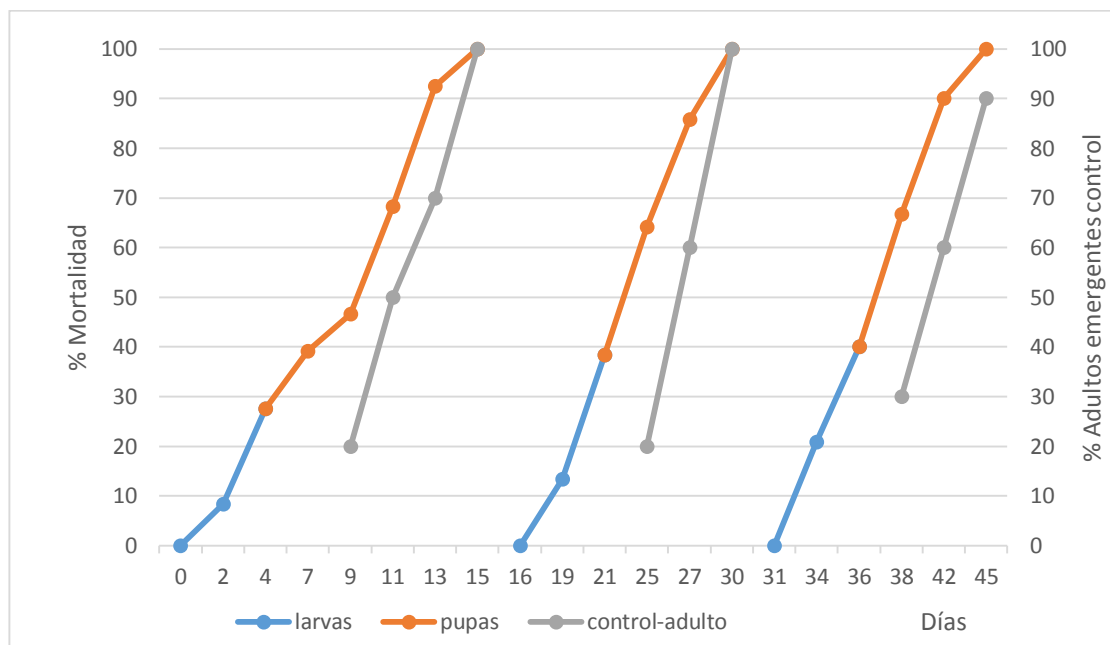
ENTRECRUZAMIENTO	PERIODO 1	PERIODO 2	PERIODO 3
25%	27.50%	38.33%	40.00%
50%	22.50%	31.67%	30.00%
75%	20.00%	21.67%	25.00%

Tabla 4. Porcentaje de pupas muertas para cada entrecruzamiento en los tres periodos de tiempo evaluados

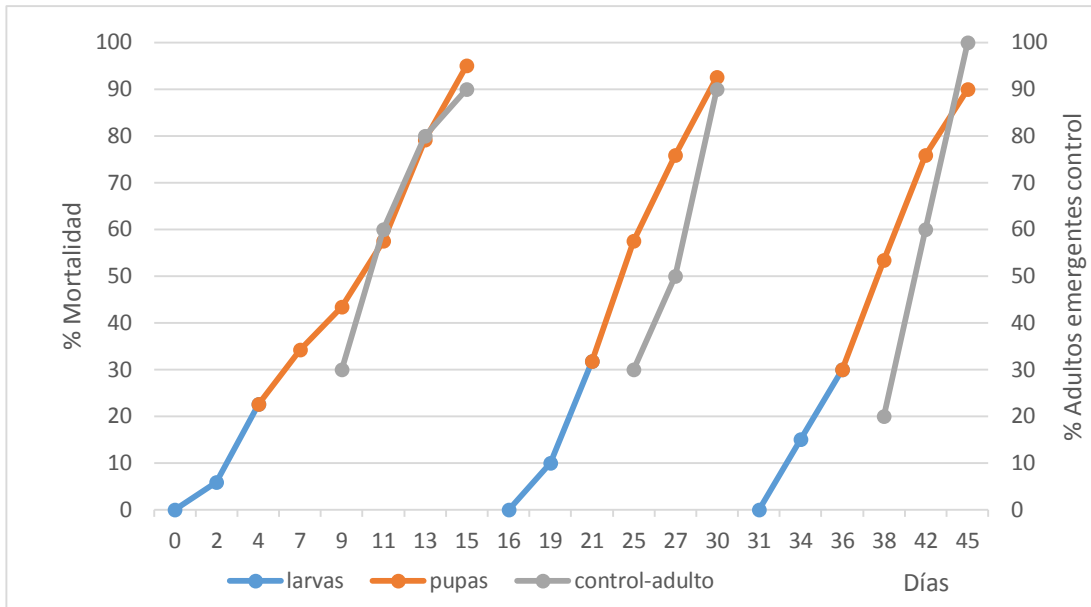
ENTRECRUZAMIENTO	PERIODO 1	PERIODO 2	PERIODO 3
25%	72.50%	61.67%	60.00%
50%	72.50%	60.83%	58.83%
75%	69.17%	58.33%	54.17%

Tabla 5. Porcentaje total de larvas y pupas muertas para cada entrecruzamiento en los tres periodos de tiempo evaluados

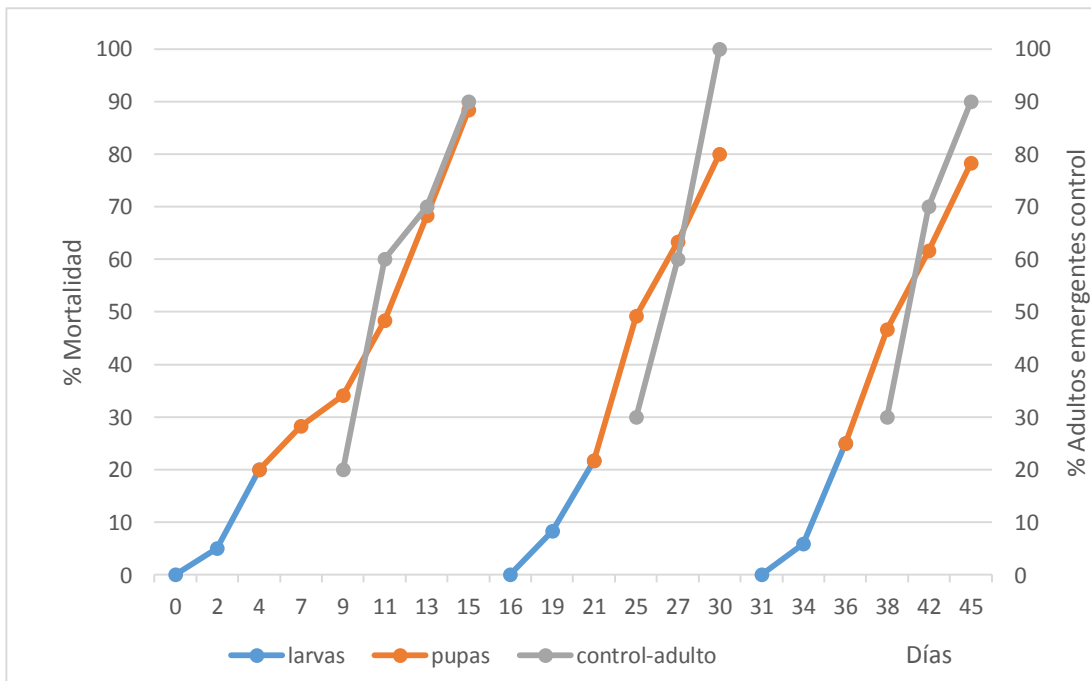
ENTRECRUZAMIENTO	PERIODO 1	PERIODO 2	PERIODO 3
25%	100.00%	100.00%	100.00%
50%	95.00%	92.50%	88.33%
75%	89.17%	80.00%	79.17%



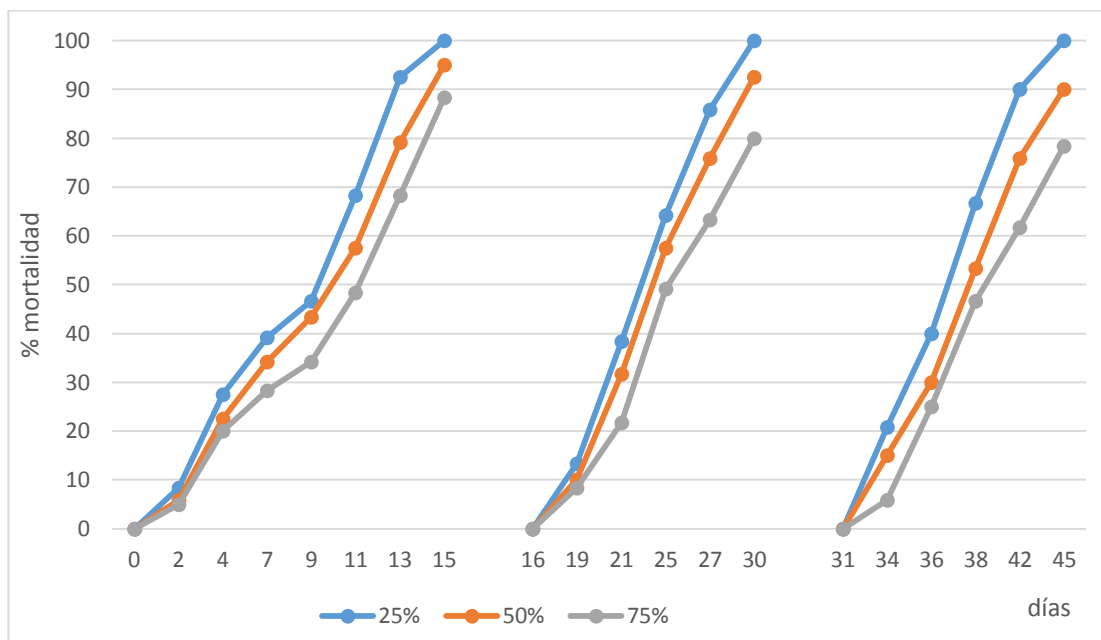
Gráfica 1. Mortalidad de *Aedes aegypti* a través del tiempo con hidrogel cargado con piriproxifen y entrecruzado al 25%



Gráfica 2. Mortalidad de *Aedes aegypti* a través del tiempo con hidrogel cargado con piriproxifen y entrecruzado al 50%



Gráfica 3. Mortalidad de *Aedes aegypti* a través del tiempo con hidrogel cargado con piriproxifen y entrecruzado al 75%



Gráfica 4. Comparación de la mortalidad a través del tiempo de *Aedes aegypti* con los tres hidrogeles entrecruzados al 25%, 50% y 75% cargados con piriproxifen.

Como se puede observar en las **Gráficas 1, 2 y 3**, hay un mayor porcentaje de pupas muertas que de larvas para todos los entrecruzamientos en cada uno de los periodos. Esto se debe a que el piriproxifen es un juvenoide o análogo de la hormona de crecimiento y tiene un mayor efecto letal sobre el estadio de pupa (VILLAREAL, 2012). También se evidencia en el eje Y derecho, correspondiente al porcentaje de larvas que emergieron a adultos en el control, que este valor fue superior al 90%. Esto se debe a que los hidrogeles control no estaban cargados con el larvicida piriproxifen, por lo que era de esperarse que no muriera ninguna larva ni pupa y que por el contrario estas llegaran a adultos, lo que demuestra que el hidrogel por si solo no influye en la mortalidad y/o inhibición de la emergencia del mosquito vector.

Por otro lado, en la **Gráfica 4** se observa que a través de los tres periodos los hidrogeles con un entrecruzamiento del 25% inhibieron la emergencia de adultos de *Aedes aegypti* en un 100%, mientras que los entrecruzamientos del 50% y 75% inhibieron al final del ensayo un 88.33% y 79.17% respectivamente. Sin embargo, no se puede asegurar si son o no estadísticamente diferentes sin antes realizar un tratamiento estadístico de los datos obtenidos. Es importante mencionar que el estudio se realizó por 45 días, divididos en tres periodos de tiempo, cada uno de 15 días, donde al finalizar cada periodo de tiempo se hacía un recambio completo tanto de vaso, como de agua y larvas, pero en algunos vasos al finalizar este periodo aún habían pupas vivas las cuales eran entregadas al técnico del CIDEIM encargado de desecharlas.

El análisis de los datos se llevó a cabo por medio de un Análisis de Varianza (ANOVA), el cual permite determinar si existen o no diferencias significativas entre diferentes ensayos. Lo primero que se hizo fue determinar si había una homogeneidad de varianzas y una distribución normal entre los datos para así evaluar si había una diferencia estadísticamente significativa entre los bioensayos de cada entrecruzamiento a lo largo de los tres periodos de tiempo evaluados. Para lo que se plantearon los siguientes supuestos:

Supuesto 1: Los datos tienen homogeneidad de varianzas

Para esto, se plantea una hipótesis nula y otra alterna:

H₀: Los datos tienen varianzas iguales

H₁: Los datos no tienen varianzas iguales

Supuesto 2: Los datos tienen una distribución normal

Para lo que se plantea como hipótesis nula y alterna lo siguiente:

H₀: Los datos tienen una distribución normal

H₁: Los datos no tienen una distribución normal

Obteniendo los siguientes valores P para cada estadio (larva y pupa) en los diferentes entrecruzamientos (25%, 50% y 75%) a lo largo de los tres periodos de tiempo, mostrados a continuación en la **Tabla 6**:

Tabla 6. Valores P para la prueba de homogeneidad de varianzas y distribución normal de los datos para cada estadio en los diferentes entrecruzamientos a lo largo de los tres periodos de tiempo

Obs	PERIODO	ENTRECRUZAMIENTO	ESTADIO	Valor P varianzas	ValoP normalidad
1	1	25	larva	0.6028	0.12183
2	1	25	pupa	0.6028	0.12183
3	1	50	larva	0.0601	0.26511
4	1	50	pupa	0.1533	0.91211
5	1	75	larva	0.1516	0.28734
6	1	75	pupa	0.1533	0.91211
7	2	25	larva	0.1613	0.29206
8	2	25	pupa	0.1613	0.29206
9	2	50	larva	0.4582	0.06670

Obs	PERIODO	ENTRECruzAMIENTO	ESTADIO	Valor P varianzas	ValoP normalidad
10	2	50	pupa	0.0866	0.16276
11	2	75	larva	0.2060	0.85496
12	2	75	pupa	0.1063	0.51888
13	3	25	larva	0.0771	0.05994
14	3	25	pupa	0.0771	0.05994
15	3	50	larva	0.4582	0.83619
16	3	50	pupa	0.0971	0.51573
17	3	75	larva	0.4582	0.07670
18	3	75	pupa	0.2156	0.20966

Dado que todos los valores P son mayores al $\alpha=0.05$ se aceptan las hipótesis nulas de ambos supuestos y se dice que los datos tienen una distribución normal y sus varianzas son iguales. Por lo que se prosigue a realizar el ANOVA fijando lo siguiente como hipótesis nula y alterna:

H_0 : bioensayo 1 = bioensayo 2 = bioensayo 3

H_1 : bioensayo 1 \neq bioensayo 2 \neq bioensayo 3

Esto se planteó así para los tres grados de entrecruzamiento, y se evaluó a partir del $\alpha=0.05$, donde se tenía que si el valor P que arrojaba el estudio era mayor al α se rechazaba la hipótesis alterna y se aceptaba la hipótesis nula, diciendo que los tres bioensayos eran estadísticamente iguales. A continuación, en la **Tabla 7** se muestran los valores P obtenidos para cada análisis.

Tabla 7. Valores P obtenidos para el análisis de varianza entre los bioensayos de cada entrecruzamiento para cada periodo del tiempo evaluado

Entrecruzamiento	25%		50%		75%	
	larva	pupa	larva	pupa	larva	pupa
Bioensayo 1	0.2908	0.2908	0.6871	0.8290	0.4402	0.6531
Bioensayo 2	0.4053	0.4053	0.1140	0.1004	0.5606	0.6693
Bioensayo 3	1	1	0.5483	0.1149	0.2009	0.6338

Dado que todos los valores P obtenidos fueron mayores al α (0.05), se acepta la hipótesis nula y se obtiene que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los bioensayos de cada entrecruzamiento para los tres periodos

de tiempo. Esto se debe a que todos los bioensayos para cada entrecruzamiento, fueron montados y monitoreados por la misma persona y bajo las mismas condiciones, por lo que se esperaba que no tuvieran una diferencia estadísticamente significativa.

Posteriormente, se realizó un análisis factorial para determinar la correlación que existía entre el promedio de larvas y pupas muertas por periodo, por entrecruzamiento, y por periodo y entrecruzamiento juntos. Para esto se fijó una hipótesis nula y otra alterna para la interpretación de los resultados de los valores P para analizar cada situación, dependiendo del caso:

H_0 : periodo 1= periodo 2= periodo 3

H_1 : periodo 1 \neq periodo 2 \neq periodo 3

Cuando se hizo la comparación de larvas y pupas muertas entre periodos, se obtuvo un valor P de 0.0003 y <0.0001 respectivamente. Dado que este valor es mucho menor que $\alpha = 0.05$, entonces, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna, donde se obtiene que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tres periodos de tiempo sobre la mortalidad de las larvas y pupas lo que se puede evidenciar en la **Tabla 8** y **9**:

Tabla 8. Comparación estadística del promedio de larvas muertas entre los tres periodos para todos los entrecruzamientos

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.		
t Agrupamiento	Media	PERIODO
A	31.667	3
A	30.556	2
B	23.333	1

Tabla 9. Comparación estadística del promedio de pupas muertas entre los tres periodos para todos los entrecruzamientos

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.		
t Agrupamiento	Media	PERIODO
A	71.389	1
B	60.278	2
B	58.333	3

En la **Tabla 8** se puede apreciar que en los periodos dos y tres la mortalidad de larvas no tuvieron una diferencia estadísticamente significativa, y presentaron un mayor porcentaje de mortalidad de larvas, mientras que el periodo uno si se comportó de forma diferente. Esto puede deberse a que a medida que aumenta el periodo de tiempo de contacto del hidrogel con el agua, esta va hacia el interior del material haciendo que se hinche cada vez más. Los hidrogeles son redes poliméricas caracterizadas por tener un alto número de grupos hidrófilos en su estructura, y una alta afinidad por el agua, lo que les permite absorberla sin disolverse gracias a los enlaces físicos o químicos formados entre las cadenas del polímero (VALDERRUTEN, VALVERDE, ZULUAGA, & RUIZ, 2014). Este proceso facilita la difusión del larvicida hacia el medio de liberación, donde entra en contacto con las larvas, causándoles la muerte.

Para el caso de las pupas, en la **Tabla 9**, también se presentó que los periodos 2 y 3 eran estadísticamente iguales y el periodo 1 muy diferente a ellos, pero en este caso fue el periodo uno el que presentó la mayor mortalidad de pupas. Esto puede deberse a que la letalidad de piriproxifen se da principalmente en el estadio de pupas, entonces, las larvas que no alcanzó a matar en los primeros días, murieron en el estado de pupa cuando la concentración del larvicida liberado debía ser mayor.

Para evaluar el comportamiento de los entrecruzamientos se fijó que:

H_0 : entrecruzamiento 25%= entrecruzamiento 50%= entrecruzamiento 75%

H_1 : entrecruzamiento 25%≠ entrecruzamiento 50%≠ entrecruzamiento 75%

En este caso, cuando se compararon los tres entrecruzamientos por separado se obtuvo un valor P para la mortalidad de larvas y pupas de <0.0001 y 0.0488 respectivamente. Al igual que en el caso anterior el valor de P para la mortalidad del estadio de larvas y pupas es menor a 0.05, correspondiente al α , por lo que se acepta la hipótesis alterna y se dice que los entrecruzamientos son estadísticamente diferentes entre ellos, lo que se puede apreciar en las **Tablas 10 y 11**.

Tabla 10. Comparación estadística del promedio de larvas muertas entre los tres entrecruzamientos

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.		
t Agrupamiento	Media	ENTRECRUZAMIENTO
A	35.278	25
B	28.056	50
C	22.222	75

Tabla 11. Comparación estadística del promedio de pupas muertas entre los tres entrecruzamientos

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.		
t Agrupamiento	Media	ENTRECRUZAMIENTO
A	64.722	25
A	64.722	50
B	60.556	75

Se obtuvo que la mortandad de las larvas en los tres entrecruzamientos son estadísticamente diferentes entre ellos mismos, teniendo un promedio de mortalidad de larvas mayor en el entrecruzamiento del 25%, seguido por el de 50% y por último el de 75%. Del mismo modo, se obtuvo que la mortandad de las pupas en los tres grados de entrecruzamiento son diferentes estadísticamente, teniendo un mayor promedio de mortalidad los entrecruzamientos del 25% y 50% sin presentar diferencias significativas, mientras que el entrecruzamiento del 75% si se comportó de manera diferente a estos dos últimos, teniendo el porcentaje de mortalidad de pupas menor. Esto se debe a que el hidrogel con un grado de entrecruzamiento mayor, presenta una red polimérica mucho más reticulada y “enredada”, lo que lleva a un tamaño de poro mucho menor, por lo que la liberación del larvicida se espera que sea mucho más lenta. Mientras que el grado de entrecruzamiento del 25% tiene una red polimérica mucho más “suelta” y un tamaño de poro mucho mayor, propenso a un mayor hinchamiento y dando lugar a una liberación de larvicida más rápida (BHATTARAI, GUNN, & ZHANG, 2009).

Finalmente, para evaluar el efecto de la correlación entre las variables entrecruzamiento y periodo de tiempo sobre el promedio de mortalidad de larvas se realizó un análisis factorial. Los resultados obtenidos se muestran de forma separada para larvas en la **Tabla 12** y para pupas en la **Tabla 13**:

Tabla 12. Comparación estadística del promedio de larvas muertas evaluando la correlación entre las variables periodo de tiempo y entrecruzamiento

T Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de PERIODO*ENTRECRUZAMI					
LS-medias con la misma letra no son significativamente diferentes.					
			ValorP_muertos LSMEAN	PERIODO	ENTRECRUZAMIENTO
	A		40.00000	3	25
	A		38.33333	2	25
	B		31.66667	2	50
C	B		30.00000	3	50
C	B	D	27.50000	1	25
C	E	D	25.00000	3	75
	E	D	22.50000	1	50
	E	D	21.66667	2	75
	E		20.00000	1	75

Tabla 13. Comparación estadística del promedio de pupas muertas evaluando la correlación entre las variables periodo de tiempo y entrecruzamiento

T Líneas de comparación para medias de mínimos cuadrados de PERIODO*ENTRECRUZAMI					
LS-medias con la misma letra no son significativamente diferentes.					
			ValorP_muertos LSMEAN	PERIODO	ENTRECRUZAMIENTO
	A		72.50000	1	25
	A		72.50000	1	50
	A		69.16667	1	75
	B		61.66667	2	25
C	B		60.83333	2	50
C	B		60.83333	3	50
C	B		60.00000	3	25
C	B		58.33333	2	75
C			54.16667	3	75

En el estadio de larvas se obtuvo que no existe una diferencia estadísticamente significativa en el entrecruzamiento del 25% para los periodos 2 y 3, teniendo el mayor porcentaje de larvas muertas durante estos periodos. Por otro lado, se tiene que el resto de entrecruzamientos en los diferentes periodos de tiempo se comportaron estadísticamente de una forma muy similar entre ellos pero completamente diferentes al entrecruzamiento del 25% en los periodos 2 y 3. Así mismo, se tuvo que para la mortandad en el estadio de pupa no existe una diferencia estadísticamente significativa para todos los entrecruzamientos en el periodo 1, teniendo el mayor porcentaje de pupas muertas durante este periodo de tiempo. También se observó que los tres entrecruzamientos en los periodos de tiempo 2 y 3, se comportaron estadísticamente de una forma muy similar entre ellos, pero completamente diferentes en periodo de tiempo 1.

Esto puede deberse a lo explicado anteriormente, ya que el hidrogel con entrecruzamiento del 25% tendrá una red polimérica más “desenredada” y un tamaño de poro mucho mayor al del 50% y 75%, además por ya estar en el periodo de tiempo 2 y 3, tendrá para este momento una mayor difusión del larvicida gracias al hinchamiento del hidrogel que se ha generado a través del tiempo, otorgando una mayor letalidad de larvas que cualquier otro entrecruzamiento en otro periodo de tiempo.

7. CONCLUSIONES

- Se logró realizar correctamente la síntesis de los hidrogeles con los tres diferentes grados de entrecruzamiento (25%, 50% y 75%), obteniendo un material homogéneo y libre de burbujas.
- Se evaluó la efectividad de los hidrogeles sintetizados de manera *in vivo* en la inhibición de la emergencia de adultos de *Aedes aegypti*.
- Después de seguir detalladamente la eficacia de los hidrogeles por tres periodos de tiempo de 15 días cada uno, se logró determinar que los hidrogeles con un grado de entrecruzamiento del 25% en los periodos dos y tres, fueron los que se comportaron estadísticamente iguales presentando un mayor porcentaje de larvas muertas.
- Todos los hidrogeles sintetizados se comportaron estadísticamente igual respecto a la letalidad de pupas en el periodo de tiempo 1, presentando un mayor porcentaje de mortalidad en comparación al periodo de tiempo 2 y 3.
- Los hidrogeles con un grado de entrecruzamiento del 25% fueron los que mejor se comportaron a lo largo del estudio, inhibiendo la emergencia de adultos del mosquito vector en un 100% en los tres periodos de tiempo analizados.

8. RECOMENDACIONES

Los hidrogeles funcionaron muy bien a lo largo de los tres periodos de tiempo evaluados, sin embargo, es muy poco tiempo para llegar a una conclusión definitiva acerca de cuál pudiera llegar a comportarse mejor a lo largo del tiempo. Por esto, se recomienda seguir con los estudios de manera *in vivo* por más tiempo en condiciones de laboratorio y evaluarlos en semi-campo

, para así ensayar su eficiencia bajo condiciones ambientales normales, donde se pretende pudieran llegar a emplearse para la inhibición de la emergencia de adultos de *Aedes aegypti*.

También se recomienda que se evalúe la cinética de liberación del larvicida a través de los hidrogeles, de forma *in vitro* por espectrometría de masas y comparar los resultados con el porcentaje de larvas y pupas muertas y la cantidad de larvicida liberado a través del tiempo. Además sería interesante determinar el tamaño de poro de los hidrogeles con diferentes grados de entrecruzamiento empleando microscopia electrónica de barrido, para evaluar también su influencia en la liberación del larvicida.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- ABREU, F., OLIVEIRA, E., PAULA, H., & DE PAULA, R. (2012). Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 1-6.
- ARALI, R., DIAZ, F., & Angel, L. (2005). *Evaluación de la definición clínica del dengue sugerida por la Organización Mundial de la Salud*. Bucaramanga: Centro de Investigaciones Epidemiológicas .
- BHATTARAI, N., GUNN, J., & ZHANG, M. (2009). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1-17.
- CIMAP. (2005). *Collaborative International Pesticides Analytical Council Limited*. 715. Pyriproxyfen. England.
- Coordinación Nacional de Vectores, R. y. (s.f.). *Protocolo de Acciones de Control de Aedes aegypti*.
- ETV/INS, G. F. (2012). *Boletín Epidemiológico Dengue semana 51 de 2012*. Bogotá: Boletín Comité Estratégico en Salud.
- ETV/INS, G. F. (2013). *Boletín Epidemiológico Dengue semana 06 de 2013*. Bogotá: Boletín Comité Estratégico en Salud.
- GIRDEN, E. (1992). *ANOVA*. California: Sage Publications.
- GORSUCH, R. (1983). *Factor Analysis*. LEA: Second Edition.
- INS/OPS. (s.f.). *Protocolo para la vigilancia en Salud Pública del dengue*. Plan Nacional de Salud Pública.
- INS/OPS/OMS. (2010). *Guía para la atención clínica integral del paciente con dengue*. Bogotá: Plan Nacional de Salud Pública.
- INS/OPS/OMS. (s.f.). *Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión del dengue*. Plan Nacional de la Salud.
- LLOPIS, J. (2013). *Test LSD de Fisher*.
- OCAMPO, C., MINA, N., CARABALÍ, M., ALEXANDER, N., & OSORIO, L. (2013). Reduction in dengue cases observed during mass control of *Aedes* (*Stegomyia*) in street catch basins in an endemic urban area in Colombia. *Acta Tropica*, 1-8.

- OCAMPO, C., SALAZAR, M., MINA, N., MCALLISTER, J., & BROGDON, W. (2011). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* in 10 localities in Colombia. *Acta Tropica*, 1-9.
- OCAZIOÑEZ, R., & GÓMEZ, S. y. (2007). *Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área Endémica Colombiana*. Bucaramanga: Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander.
- OMS. (2005). *WHO specifications and evaluations for public health pesticides: Pyriproxifen*.
- OPS/OMS. (2014). *Pequeñas picaduras, grandes amenazas: Protégete y protege a tu entorno de los vectores que transmiten enfermedades*.
- PAHO/WHO. (2014). *Number of reported cases of Dengue and Severe Dengue (SD) in the Americas, by country: Figures for 2014*.
- PAULA, H., DE PAULA, R., & BEZERRA, S. (2006). Swelling and release kinetics of larvicide-containing chitosan/cashew gum beads. *Journal of Applied Polymer Science*, 1-6.
- PAULA, H., MATOSO, F., & DE FREITAS, R. (2010). Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia Sidoides* essential oil. *Materials Science and Engineering C.*, 1-6.
- RAMIREZ, L. E., & OCAMPO, C. B. (s.f.). *Evaluación del Uso de Hidrogeles para la Liberación Controlada de Insecticidas*. Cali: CIDEIM.
- TDR/WHO. (2009). *Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. WHO press.
- VALDERRUTEN, N., VALVERDE, J., ZULUAGA, F., & RUIZ, E. (2014). Synthesis and characterization of chitosan hydrogels cross-linked with dicarboxylic acid. *Reactive & Functional Polymers*, 1-8.
- VILLAREAL, L. (2012). *Determinación de las concentraciones diagnósticas de los reguladores de crecimiento de insectos piriproxifen y diflubenzurón para *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) cepa Rockefeller y el estado de la resistencia de 6 poblaciones de campo en Colombia*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- WHO. (2005). *Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides*. Phase I: Laboratory Studies.

WHO. (2008). *WHO guidelines for drinking-water quality: Chemical facts sheets: Pyriproxifen.*

ANEXOS

Anexo 1: Cálculos correspondientes a la síntesis de los hidrogeles de quitosano con grados de entrecruzamiento diferentes y cargados con el larvicida piriproxifen.

- Cantidad de piriproxifen para hidrogel de 11 mL

$$\frac{0.05 \text{ mg}}{L} * 100 \text{ mL} * \frac{1L}{1000 \text{ mL}} = 5.0 \times 10^{-3} \text{ mg de piriproxifen}$$

Volumen del hidrogel a partir del aro molde:

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

$$V = \pi * (5\text{mm})^2 * 3\text{mm} = 0.236\text{mm}^3$$

$$235.6 \text{ mm}^3 * \frac{1 \text{ mL}}{1\text{cm}^3} * \frac{1\text{cm}^3}{(10\text{mm})^3} = 0.237 \text{ mL}$$

Concentración de Piriproxifen:

$$\frac{5.0 \times 10^{-3} \text{ mg}}{0.237\text{mL}} = \frac{0.0212 \text{ mg}}{\text{mL}}$$

Para preparar 11 mL de solución de quitosano, teniendo en cuenta que la solución de piriproxifen está al 10%:

$$11\text{mL sln quitosano} * \frac{0.0212 \text{ mg}}{\text{mL}} = 0.233 \text{ mg piriproxifen}$$

$$0.233 \text{ mg piriproxifen} * \frac{100 \text{ mL}}{10 \text{ g}} * \frac{1\text{g}}{1000 \text{ mg}} = 2.33 \times 10^{-3} \text{ mL piriproxifen}$$

$$2.33 \times 10^{-3} \text{ mL piriproxifen} * \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} \\ = 2.33 \mu\text{L de la solución de piriproxifen al 10\%}$$

- Densidad del glutaraldehído al 8.3%

Tabla 14. Datos de las mediciones para determinar la densidad del glutaraldehído

No.	Picnómetro vacío (g)	Picnómetro con agua (g)	Picnómetro con glutaraldehído (g)
1	9.7289	14.9440	15.0533
2	9.7290	14.9439	15.0534
3	9.7289	14.9439	15.0533
promedio	9.7289	14.9439	15.0533

Teniendo en cuenta que esta determinación se realizó en condiciones de laboratorio donde la temperatura era de 21°C, se tiene que el agua destilada con la cual se realizó el ensayo tenía una densidad de 998.08 Kg/m³, dato reportado por las tablas de densidad del agua líquida entre 0 °C y 100 °C.

$$\frac{998.08 \text{ Kg}}{\text{m}^3} * \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} * \frac{1 \text{ m}^3}{(100 \text{ cm})^3} * \frac{1 \text{ cm}^3}{1 \text{ mL}} = \frac{0.99808 \text{ g}}{\text{mL}}$$

$$\frac{0.99808 \text{ g}}{\text{mL}} * \frac{1}{(14.9439 - 9.7289) \text{ g}} * (15.0533 - 9.7289) \text{ g}$$

$$= \frac{1.019 \text{ g}}{\text{mL}} \text{ glutaraldehído al } 8.3\%$$

- **Cantidad de glutaraldehído dependiendo del grado de entrecruzamiento**

Teniendo en cuenta que el quitosano está compuesto por monómeros de glucosamina en un 80% y de N-acetil-glucosamina en un 20% y que solo los grupos NH₂ de la glucosamina reaccionan con el glutaraldehído para formar el entrecruzamiento de la red polimérica, se tiene que:

Peso molecular de la glucosamina: 161.17 g/mol

Peso molecular de la N-acetil-glucosamina: 207.20 g/mol

$$\left(0.8 * \frac{161.17 \text{ g glucosamina}}{\text{mol}} \right) + \left(0.2 * \frac{207.20 \text{ g N - acetil - glucosamina}}{\text{mol}} \right)$$

$$= 170.376 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{ quitosano}$$

$$11 \text{ mL solución quitosano} * \frac{3 \text{ g quitosano}}{100 \text{ mL solución}} * \frac{1 \text{ mol quitosano}}{170.376 \text{ g quitosano}}$$

$$= 1.937 \times 10^{-3} \text{ mol quitosano}$$

$$1.937 \times 10^{-3} \text{ mol quitosano} * 0.8 = 1.55 \times 10^{-3} \text{ mol glucosamina}$$

Siendo estas las moles del quitosano capaces de reaccionar con el glutaraldehído.

Entrecruzamiento al 75%:

Teniendo en cuenta que el glutaraldehído es difuncional, es decir, que por cada mol de glutaraldehído que reaccione, reaccionan dos moles de quitosano (2 grupos amino de la glucosamina), entonces:

$$1.55 \times 10^{-3} \text{ mol glucosamina} * \frac{1 \text{ mol glutaraldehído}}{2 \text{ moles glucosamina}}$$

$$= 7.75 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído}$$

$$7.75 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído} * 0.75 = 5.81 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído}$$

Peso molecular del glutaraldehído: 100.12 g/mol

$$5.81 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído} * \frac{100.12 \text{ g glutaraldehído}}{\text{mol glutaraldehído}} * \frac{100 \text{ g H}_2\text{O}}{8.3 \text{ g glutaraldehído}}$$

$$* \frac{1 \text{ mL}}{1.019 \text{ g glutaraldehído}} * \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 688 \mu\text{L glutaraldehído}$$

Entrecruzamiento al 50%:

$$7.75 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído} * 0.5 = 3.88 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído}$$

$$3.88 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído} * \frac{100.12 \text{ g glutaraldehído}}{\text{mol glutaraldehído}} * \frac{100 \text{ g H}_2\text{O}}{8.3 \text{ g glutaraldehído}}$$

$$* \frac{1 \text{ mL}}{1.019 \text{ g glutaraldehído}} * \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 459 \mu\text{L glutaraldehído}$$

Entrecruzamiento al 25%:

$$7.75 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído} * 0.25 = 1.94 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído}$$

$$1.94 \times 10^{-4} \text{ mol glutaraldehído} * \frac{100.12 \text{ g glutaraldehído}}{\text{mol glutaraldehído}} * \frac{100 \text{ g H}_2\text{O}}{8.3 \text{ g glutaraldehído}} * \frac{1 \text{ mL}}{1.019 \text{ g glutaraldehído}} * \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 230 \mu\text{L glutaraldehído}$$

Anexo 2: Formato aportado por CIDEIM para el registro de la mortalidad de larvas, pupas y adultos de *Aedes aegypti*

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	Repetición	vivos		muertos		vivos		muertos		vivos		muertos	
conc		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												
	1												
	2												
	3												
	4												
	control												