

**ESTUDIO DE HIDROGELES DE QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN DE UN
REGULADOR DE CRECIMIENTO DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

ALEJANDRO JARAMILLO MEDINA

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD CIENCIAS NATURALES

**PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
FARMACÉUTICAS**

SANTIAGO DE CALI

2016

**ESTUDIO DE HIDROGELES DE QUITOSANO PARA LA LIBERACIÓN DE UN
REGULADOR DE CRECIMIENTO DE LARVAS DE *Aedes aegypti***

ALEJANDRO JARAMILLO MEDINA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE PREGRADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

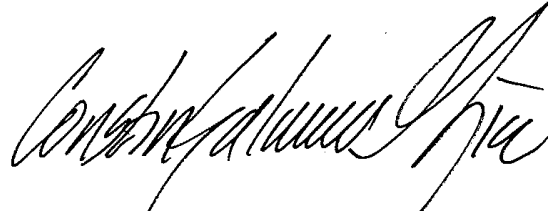
TUTORAS: NORA ELENA VALDERRUTEN POSSO, Ph.D

CLARA BEATRIZ OCAMPO, Ph.D

SANTIAGO DE CALI

2016

APROBADO POR:



Constain Hugo Salamanca Mejía

Evaluador



Nora Elena Valderruten, Ph.D

Director del proyecto



Clara Beatriz Ocampo, Ph.D

Co-director del proyecto

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo incondicional ofrecido durante toda la carrera. Sin ellos este proyecto de vida no habría sido posible. Agradecerles a mis tutoras Nora Elena Valderruten y Clara Beatriz Ocampo por todo su apoyo a lo largo de este proceso. Su compromiso, paciencia y dedicación fueron fundamentales para el desarrollo exitoso de esta etapa académica.

Agradezco a Luis E. Ramírez por su constante acompañamiento y su tiempo dedicado al desarrollo de este proyecto de grado. Finalmente quiero agradecerle a todos mis compañeros y amigos de la universidad, por permitirme aprender de cada una de sus experiencias y así fortalecer mis conocimientos, valores y principios.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE GRÁFICAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ANEXOS	10
RESUMEN DEL TRABAJO.....	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	14
2.1 Planteamiento del problema de investigación y su justificación en términos de necesidad y pertinencia.....	14
2.2 Marco teórico y estado del arte.....	16
2.2.1 Aedes aegypti.....	16
2.2.2 Dengue, chikunguña y Zika	17
2.2.3 Agentes químicos para el control del Aedes aegypti	19
2.2.5 Hidrogeles de quitosano.....	22
2.2.6 Resultados obtenidos en trabajos de proyectos de grado anteriores	23
2.3 OBJETIVOS.....	25
2.3.1 Objetivo general	25
2.3.2 Objetivos específicos.....	25
2.4 METODOLOGÍA	26
2.4.1 Reactivos, materiales y equipos empleados.....	26
2.4.2 Obtención de hidrogeles de quitosano con tres concentraciones diferentes de Novaluron y Bifentrin y dos entrecruzamientos distintos	26
2.4.3 Determinación del efecto del producto comercial sobre la mortalidad de las larvas de Aedes aegypti en condiciones de laboratorio.	28
2.4.4 Determinación del efecto del Novaluron sobre la mortalidad de las larvas de Aedes aegypti en condiciones de semicampo.....	30
2.4.5 Evaluación de los resultados obtenidos para la propuesta de un escalonamiento a futuro	32
2.4.6 Matriz de marco lógico	32
2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
2.5.1 Obtención de los hidrogeles	35
2.5.2 Bioensayos en laboratorio	35

2.5.3 Bioensayos en condiciones de semicampo.....	44
2.5.4 Propuesta de escalonamiento a recipientes de mayor volumen.	45
2.6 CONCLUSIONES	47
2.7 RECOMENDACIONES.....	48
3 REFERENCIAS.....	49
ANEXOS.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos empleados durante el proyecto.	26
Tabla 2. Modelo de regresión lineal múltiple para evaluar si existe diferencias entre los bioensayos, las réplicas, la concentración del larvicida, el porcentaje de entrecruzamiento y la interacción de estos.	42
Tabla 3. Modelo de regresión lineal múltiple para evaluar si existe diferencias entre los diferentes bioensayos y las réplicas evaluados.	43
Tabla 5. Datos para determinación de la densidad del glutaraldehído 2,5%	53
Tabla 6. Moles de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento	54
Tabla 7.. Volumen de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento	54
Tabla 8. Cantidad de Novaluron de acuerdo a la concentración	56

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Primer bioensayo con entrecruzamiento del 25%.	37
Gráfica 2. Primer bioensayo con entrecruzamiento del 75%.	37
Gráfica 3. Segundo bioensayo con entrecruzamiento del 25%.	38
Gráfica 4. Segundo bioensayo con entrecruzamiento de 75%.	38
Gráfica 5. Tercer bioensayo con entrecruzamiento de 25%.	39
Gráfica 6. Tercer bioensayo con entrecruzamiento de 75%.	39
Gráfica 7. Cuarto bioensayo con entrecruzamiento de 25%.	40
Gráfica 8. Cuarto bioensayo con entrecruzamiento de 75%.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del <i>Aedes aegypti</i>	16
Figura 2. Estructura química del Novaluron (Scott-dupree, 2007)	20
Figura 3. Cihalotrina, piretroide sintético tipo II	21
Figura 4. Estructura química del insecticida Bifentrina (Riar, 2014).....	21
Figura 5. Estructura química del quitosano (Bhattarai et al., 2010)	23
Figura 6. Molde con hidrogeles de quitosano.	27
Figura 7. Hidrogeles en el sartén de teflón antes de ser llevados al horno.....	27
Figura 8. Hidrogeles secos en los recipientes de plástico.	28
Figura 9. Vasos empleados en los bioensayos en condiciones de laboratorio.	29
Figura 10. Diseño experimental del ensayo en condiciones de laboratorio (Ladino, L., 2016).....	29
Figura 11. Baldes empleados en los bioensayos con condiciones de semicampo	30
Figura 12. Diseño experimental del ensayo en condiciones de semicampo.....	31
Figura 13. Ejemplo de la adición de larvas del CIDEIM al agua proveniente de los baldes en semicampo.	31
Figura 14. Colección de larvas nativas para evaluar su mortalidad en el laboratorio.	32

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cálculos para la síntesis de los hidrogeles.	52
Anexo 2. Formato para la evaluación de la mortalidad de las larvas en laboratorio.	57
Anexo 3. Formato para la evaluación de la mortalidad de las larvas en semicampo.	58

RESUMEN DEL TRABAJO

En este proyecto se evaluó la mortalidad de las larvas del *Aedes aegypti*, el cual es un vector de muchas enfermedades víricas entre las cuales se destacan el dengue, chikunguña y Zika. Inicialmente se desarrollaron seis sistemas que prolongan la duración del efecto de un larvicida en comparación a un producto convencional, cada uno con una concentración diferente de una emulsión comercial que contenía el larvicida Novaluron y el insecticida Bifentrina dentro de una matriz polimérica de quitosano, con el propósito de disminuir la emergencia del mosquito *Aedes aegypti* durante periodos de tiempo prolongados. Posteriormente, se evaluó la mortalidad del mosquito en condiciones de laboratorio durante 8 semanas y en semicampo durante 6 semanas. Se evaluaron tres concentraciones de larvicida (0,5 ppm, 2,5 ppm y 5,0 ppm) con dos grados de entrecruzamientos distintos (25% y 75%). Los principales resultados mostraron que durante 2 meses de evaluación, todos los sistemas mataron el 100% de las larvas para los bioensayos de laboratorio mientras que para condiciones de semicampo, los hidrogeles de concentración 0,5 ppm y 25% de entrecruzamiento perdieron su efectividad en tres semanas de evaluación. Finalmente se seguirá el estudio por parte del CIDEIM con el fin de encontrar el tiempo máximo de efectividad y observar el comportamiento que puedan tener los hidrogeles a través del tiempo.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, hidrogel, quitosano, vector, Novaluron.

ABSTRACT

In this project we evaluated the mortality of *Aedes aegypti* larvae, which is a vector of many viral diseases, among which dengue, chikunguña and Zika. Initially, six systems were developed which prolong the duration of effect of a larvicide compared to a conventional product, each with a different concentration of a commercial emulsion containing Novaluron larvicide and Bifenthrin insecticide within a chitosan polymer matrix, with the Purpose of reducing the emergence of the *Aedes aegypti* mosquito for prolonged periods of time. Subsequently, mosquito mortality was evaluated in laboratory conditions for 8 weeks and in the semi-field for 6 weeks. Three concentrations of larvicide (0.5 ppm, 2.5 ppm and 5.0 ppm) were evaluated with two different degrees of crosslinking (25% and 75%). The main results showed that during 2 months of evaluation, all systems killed 100% of the larvae for the laboratory bioassays, while for semi-field conditions, hydrogels of 0.5 ppm concentration and 25% of cross-linking lost their effectiveness in Three weeks of evaluation. Finally it is tried to find the maximum time of effectiveness and to observe the behavior that the hydrogels can have through the time, reason why they will continue evaluating in the CIDEIM.

Key words: *Aedes aegypti*, hydrogel, chitosan, vector, Novaluron.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores se han convertido en un problema mundial, afectando a cientos de millones de personas cada año. Sin embargo, estas enfermedades han existido desde mucho tiempo atrás, por lo cual las autoridades competentes se han visto en la obligación de usar insecticidas sintéticos para el control del vector. Entre los años de 1940 y 1950 con el empleo de estos insecticidas, se observó una disminución de la prevalencia en las enfermedades transmitidas por vectores. No obstante, hoy en día la incidencia de estas patologías está incrementando. (Smith, Kasai, & Scott, 2016).

El mosquito *Aedes aegypti* es la especie mejor caracterizada dentro de la familia Culicidae debido a su fácil transición del campo al laboratorio. Sus estudios han proporcionado gran información acerca de la biología, fisiología, genética y competencia vectorial del mosquito (Nene et al., 2007). El desarrollo del ciclo de vida se da principalmente en lugares donde existe agua estancada, es decir, recipientes naturales (huecos en los árboles y rocas, axilas de las hojas) o artificiales (tanques, barriles, floreros, botellas, llantas) que mantienen un depósito de agua durante un tiempo determinado.

Las campañas para el control del vector se han enfocado en la reducción de las fuentes de infestación, jornadas de limpieza y educación sanitaria. A pesar de esto, los resultados no han sido satisfactorios, debido a que estas acciones se deben hacer regularmente, para que la reducción en la proliferación del mosquito en recipientes de almacenamiento de agua sea eficaz. Se han propuesto otras alternativas como el empleo de larvicidas que, con el tiempo, se han convertido en estrategias poco efectivas debido a la generación de resistencia por parte del vector.

De esta manera, el proyecto se basa en el empleo de larvicidas inmersos en una matriz polimérica como desarrollo de nuevos sistemas para el control del vector *A. aegypti*. Además, se empleó como polímero el quitosano, un polisacárido biodegradable. La matriz empleada funciona como un sistema que prolonga la duración del efecto de un larvicida en comparación a un producto convencional, la cual contribuye a que este producto se libere lentamente evitando que se elimine su acción con el recambio de agua además de reducir la frecuencia de aplicación en las fuentes de infestación.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

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

El *Aedes aegypti* es un insecto del filo *Arthropoda* que transmite tres infecciones víricas: el dengue, el chikunguña y el zika. Este vector se presenta en climas tropicales y subtropicales de todo el planeta, especialmente en zonas urbanas y semiurbanas. Colombia es un país con una gran diversidad climática por lo cual ha desarrollado este mosquito, especialmente en lugares situados por debajo de los 2,200 m.s.n.m (OMS, 2016). Se han reportado brotes epidémicos de estos tres virus transmitidos por el vector, por lo que estas enfermedades se han convertido en un problema de salud pública, principalmente en los últimos años, debido al incrementado de su incidencia. Además, alrededor de la mitad de la población del mundo está en riesgo de contraer alguna de estas tres enfermedades (OMS, 2016).

El dengue es una enfermedad de carácter endémico-epidémico que constituye hoy la arbovirosis más importante a nivel mundial en términos de morbilidad, mortalidad y afectación económica (Martínez, E., 2008). En Colombia, el dengue representa un problema prioritario en salud pública debido a múltiples factores, entre ellos: el aumento en la frecuencia de brotes de dengue hemorrágico debido al incremento en la reemergencia en la transmisión viral, la circulación de los cuatro serotipos al mismo tiempo, y la infestación por *Aedes aegypti* de más del 90% del territorio nacional. Estos factores ponen en riesgo a aproximadamente 25 millones de personas que habitan en zonas urbanas de nuestro país (Salamanca et al., 2010).

Desde 1978 hasta el 2010 se reportaron 1'020.637 casos de dengue en Colombia (Padilla, Rojas & Sáezn, 2012). Por otro lado, después del 2010 la ocurrencia de dengue por año incremento a 54,382 casos (Restrepo et al., 2014). Además, el Instituto Nacional de Salud declara que hasta la semana 52 del 2016 se han reportado aproximadamente 103,822 casos (INS, 2016).

De esta misma manera, para el virus del chikunguña se han reportado 19,566 casos hasta diciembre del 2016, donde el 97,8 % han sido confirmados por clínica, 1,1% confirmados por laboratorio y el 1,1% son casos sospechosos. Así mismo, a partir del inicio de la fase epidémica del virus zika en el país (octubre del 2015) hasta diciembre del 2016, se han notificado 9,799 casos confirmados de esta enfermedad con 98,860 casos sospechosos (INS, 2016).

La alta incidencia de casos de enfermedades transmitidas por el vector, ha generado la implementación de diferentes formas de prevención que consisten principalmente en la aplicación de insecticidas organofosforados, organoclorados y carbamatos en los hábitats donde se encuentra el mosquito adulto. Sin embargo,

estos insecticidas han resultado poco efectivos por la resistencia que han desarrollado las poblaciones de *Aedes aegypti* (Vontas et al., 2012).

Este proyecto busca desarrollar nuevas alternativas para el control del crecimiento y propagación del vector y así disminuir la tasa de morbilidad por la transmisión de estas enfermedades. Para esto, se pretende realizar un sistema que prolonga la duración del efecto de un regulador de crecimiento comparado con un producto convencional, desde una matriz polimérica de quitosano, el cual es un polímero biodegradable y no tóxico para los seres humanos, empleando hidrogeles con un grado de entrecruzamiento del 25% y 75% de acuerdo a los resultados encontrados por Karen Luna (Luna, K., 2016). Cabe resaltar que el objetivo es lograr obtener resultados favorables, en cuanto a la duración del efecto del larvicida, en condiciones de laboratorio y semicampo, que proporcionen información importante sobre cómo realizar un escalonamiento hacia otros medios de mayor volumen y así evaluar la viabilidad del proyecto.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 *Aedes aegypti*

El *Aedes aegypti* es un vector de metamorfosis completa, antropofílico y que es capaz de transmitir el virus del dengue, chikunguña y zika si se encuentra infectado (Padilla et al., 2012). El mosquito es capaz de reproducirse en lugares que tengan agua estancada como lavaderos, macetas, recipientes descubiertos y abandonados, neumáticos desechados, etc. En su forma adulta, se encuentra generalmente en el interior de las casas y suele volar aproximadamente 400 metros alrededor de esta (OMS, 2016).

Las hembras son las únicas que pueden realizar ovogénesis, por lo que necesitan chupar sangre preferiblemente de humanos como fuente de proteínas y lípidos, en particular colesterol, una molécula que el insecto es incapaz de sintetizar y que es necesaria como componente esencial de las membranas biológicas y como precursor de las hormonas ecdiesteroides que son necesarias para la maduración de los huevos, e indispensables para el éxito de su reproducción (Talyuli et al., 2015).

Durante su ciclo de vida, el *Aedes aegypti* pasa a través de cuatro etapas diferentes: huevo, larva (cuatro estadios), pupa y adulto (figura 1). Las primeras tres etapas son llamadas inmaduras y tienen lugar en el agua, mientras que el aire es el medio para la etapa de adulto (Otero, Solari, & Schweigmann, 2006).

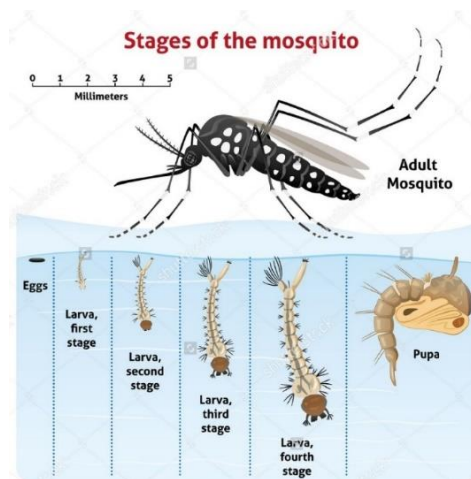


Figura 1. Ciclo de vida del *Aedes aegypti*.¹

El desarrollo del huevo puede durar 48 horas si el ambiente es húmedo y cálido, en condiciones adversas podría durar hasta 5 días. Esta etapa puede soportar periodos

¹ Imagen tomada de <http://www.shutterstock.com/s/aedes/search.html?page=1&inline=369343772>

de desecación hasta por un año. Posteriormente, sigue la fase larvaria que consta de 4 estadios diferentes y donde se alimentan del material orgánico sumergido en el agua o adherido a las paredes del recipiente donde se están desarrollando. Esta fase dura entre 5 y 7 días y requiere temperaturas entre 10 y 45°C. La etapa de pupa dura de 1 a 2 días y estas no se alimentan, pero si sufren modificaciones anatómicas y fisiológicas. Finalmente, los adultos emergen del agua dejando atrás su piel pupal (Padilla et al., 2012).

Al final, la persistencia de esta especie depende de varios eventos como la obtención de nutrientes por parte de la hembra (sin lo cual no se formarán los huevos), la disponibilidad de agua adecuada para la vida de los estadios de larva y pupa, además de una apropiada temperatura (25-28°C) que permita a la hembra y el macho copular, para finalmente comenzar de nuevo el ciclo con la ovoposición (Simoy, Simoy, & Canziani, 2015).

2.2.2 Dengue, chikunguña y Zika

Estos tres virus, además de la fiebre amarilla, pueden ser transmitidos por mosquitos del genero *Aedes* en Colombia. Existen otros tipos virus como la encefalitis japonesa, el virus del Nilo occidental y el virus Mayaro que pueden ser transmitidos por estos mosquitos, pero no se encuentran en Colombia (OMS, 2016) por lo cual no se tendrán en cuenta para este trabajo. Por lo tanto, y teniendo en cuenta su incidencia y distribución, el *Aedes aegypti* es el vector más importante en la transmisión de estas tres enfermedades por lo cual se hará referencia solo a esta especie en el trascurso del documento.

El dengue es una enfermedad viral aguda del género Flavivirus que posee cuatro serotipos (DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4). Estos cuatro serotipos diferentes no desencadenan inmunidad cruzada, por lo cual una persona puede tener esta enfermedad por los cuatro serotipos. Sin embargo, cuando se adquiere la enfermedad por un serotipo, se adquiere una inmunidad temporal de aproximadamente 2 a 3 meses para otro serotipo. Después, la probabilidad de adquirir dengue grave es mayor (Salamanca et al., 2010).

El periodo de incubación del virus gira alrededor de 7 días y las sintomatologías son muy variadas, van desde formas asintomáticas hasta cuadros muy graves con compromiso vascular, afección de órganos y sistemas que se asocian a mortalidad (Guzmán, 1999). De esta manera, se ha clasificado la enfermedad en dos tipos: dengue y dengue grave. El primero presenta una sintomatología de fiebre, dolores musculares y articulares, dolor de cabeza, náuseas y sarpullido; mientras que el dengue grave se caracteriza por dificultad respiratoria, hemorragias severas, extravasación del plasma y fallas orgánicas, lo que aumenta el riesgo de muerte en personas que padecen esta enfermedad (OMS, 2016).

A principios de 2016 se aprobó la primera vacuna contra el dengue: Dengvaxia (CYD-TDV) de Sanofi Pasteur. Esta, es una vacuna tetravalente que contiene el virus vivo atenuado y que ha demostrado ser efectiva con un perfil de seguridad satisfactorio lo cual sugiere que, con esta inmunización, se puede contribuir a alcanzar los objetivos propuestos por la Organización Mundial de la Salud de reducir, para el 2020, la mortalidad en un 50% y la morbilidad de un 25% en personas con el virus (Gessner & Wilder-Smith, 2016). Además, se están elaborando otras tres vacunas vivas atenuadas tetravalentes que se encuentran en fase IIb (CYD23) y en fase III (CYD14 y CYD15) de los ensayos clínicos (Guy, Briand, Lang, Saville, & Jackson, 2015).

Por otro lado, el virus de chikunguña es otro factor importante en la incidencia de morbilidad causada por el *A. aegypti*. Su diagnóstico es difícil ya que se puede confundir fácilmente con el dengue por su similar sintomatología que se caracteriza por: fiebre, dolor de cabeza y, manifestaciones cutáneas. Además, también podría causar dolores articulares, principalmente en las extremidades, que pueden desaparecer con los demás síntomas, o pueden permanecer por muchos años (Moro et al., 2012).

Similar a la vacuna para el dengue, el virus del chikunguña tiene dos vacunas candidatas para prevenir la enfermedad. La primera es una versión muy similar al virus llamada VRC 311 y la segunda es un virus vivo basado en la vacuna del sarampión llamada MVB. Ambas vacunas han sido evaluadas en fase I presentando un porcentaje de efectos adversos, principalmente artralgias transitorias y por esta razón aún se mantienen lejos de otorgamiento de licencias (Fernández-Salas et al., 2015).

El virus del Zika es el último de los tres en llegar a Colombia. El primer brote se describió en octubre del 2015. Los síntomas son similares a los de otras infecciones por arbovirus y consisten en fiebre, erupciones cutáneas, conjuntivitis, dolores musculares y articulares, malestar y cefaleas (OMS, 2016).

Por el contrario a los dos virus anteriores, la transmisión del Zika también es probable que se dé mediante el intercambio de fluidos, transmisión sexual y transfusiones de sangre lo que hace que la contención de esta enfermedad sea mucho más difícil. Hasta ahora la enfermedad ha tenido poco impacto en la sociedad, aunque su verdadero riesgo está en la asociación con malformaciones congénitas, síndrome de Guillain-Barré y otros síndromes neurológicos. Sin embargo, aún es necesario establecer su asociación (Tilak, Ray, Tilak, & Mukherji, 2016).

Hasta la fecha no hay disponible ninguna vacuna para el zika. No obstante, la iniciativa para desarrollar esta vacuna ha sido tomada por varios institutos entre el cual se destaca el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas, NIAID por sus siglas en inglés, de Estados Unidos (Tilak et al., 2016)

Para el proyecto se empleó un producto comercial, Rimon Dúo, usado en diferentes sectores agrícolas. Inicialmente se quería obtener solo el producto que tuviera el larvicida Novaluron. Sin embargo, no fue posible conseguir una emulsión comercial que tuviera solo este larvicida por lo cual se tuvo que emplear el Rimon Dúo el cual consta de un 5% de Novaluron y un 5% de Bifentrina como ingredientes activos. En proyectos anteriores se ha empleado el estándar de Novaluron, no obstante, este resulta ser muy costoso y poco rentable a la hora de usarse en proyectos como este. Por esta razón, se busca un producto comercial mucho más barato que contenga el larvicida.

2.2.3 Agentes químicos para el control del *Aedes aegypti*

Actualmente existen tres métodos para el control del vector *Aedes aegypti* que se basan en: manejo del medio ambiente, control biológico y control químico. Dentro del control químico, se encuentra el manejo focal de formas inmaduras, es decir el empleo de larvicidas, y el control de formas adultas del mosquito, es decir el empleo de adulticidas. Para el primero, se dispone de larvicidas organofosforados como el temefos, biopesticidas como el *Bacillus thuringiensis* y reguladores del crecimiento como el diflubenzuron y el pyriproxyfen. Para el manejo de las formas adultas, se emplean insecticidas líquidos en forma de aerosol, los cuales actúan si sus gotas quedan suspendidas en el aire. Entre ellos están el malation, el fenitrothion y el pirimiphos-metil (Salamanca et al., 2010).

Sin embargo, en los últimos años se ha venido presentando un alto grado de resistencia por parte de los mosquitos a los insecticidas organofosforados empleados actualmente. Por esta razón, muchos países han reemplazado este tipo de insecticidas por reguladores del crecimiento de insectos (IGR) ya que presentan una acción selectiva sobre el desarrollo de ciertas etapas específicas en el ciclo de vida del vector. Entre este tipo de larvicidas se encuentra el Novaluron que será el empleado en el proyecto. (Fontoura et al., 2012)

El Novaluron es una benzoilfenilurea ((±)-1-[3-cloro-4-(1,1,2-trifluoro-2-trifluorometoxietoxi) fenil]-3-(2,6-difluorobenzoil) urea) (figura 2) que actúa principalmente por ingestión, pero también por contacto, alterando la composición de la cutícula, especialmente la inhibición de la síntesis de quitina, lo que conlleva a una deposición endocuticular anormal que afecta la firmeza y la elasticidad cuticular causando muda abortiva. Sin embargo, se han establecido otros posibles mecanismos de acción del Novaluron que consisten en: inhibir el transportador UDP-GlcNac a través de las membranas biológicas; bloquear la unión de la quitina a las proteínas cuticulares resultando en la inhibición de la deposición cuticular y fibrillogénesis; inhibir la formación de quitina debido a la inhibición de la quitina sintasa, además de la activación de las quitinasa y fenoloxidasas las cuales están relacionadas con el catabolismo de la quitina; afectar el metabolismo de la ecdisona,

ocasionando la acumulación de esta hormona que estimula la quitinasa y así afecta la síntesis de la quitina; bloquea la conversión de glucosa a fructosa 6-fosfato; e inhibe la síntesis de ADN (Dhadialla et al., 2005)

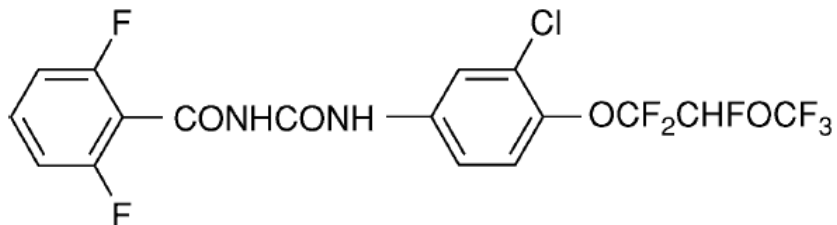


Figura 2. Estructura química del Novaluron (Scott-dupree, 2007)

De esta manera, el Novaluron pertenece a la familia de los compuestos que intervienen en la regulación del crecimiento de insectos (IGR) y dentro de este grupo, se sub clasifica en el grupo de los inhibidores de la síntesis de quitina (CSI). Así, el larvicida actúa no solamente en los vectores del genero *Aedes*, sino que también se usa para el control de plagas de otros dípteros, lepidópteros, coleópteros y homópteros (Benradia & Soltani, 2016).

Por otro lado, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y la Agencia Regulatoria para el Manejo de Plagas en Canadá (PMRA) designaron que el Novaluron presenta una baja toxicidad aguda y no presenta efectos subcrónicos significativos para los mamíferos. Además, señalan que presenta un bajo riesgo para el medio ambiente por lo cual sugieren que sea una alternativa que reemplace el uso de pesticidas organofosforados, organoclorados y carbamatos (Scott-dupree, 2007). Así mismo, la OMS recomienda que la dosis del larvicida en agua potable no debe exceder los 0,05 ppm para ser considerado como seguro en los seres humanos.

Otro grupo químico para el control del vector son los piretroides, los cuales son derivados sintéticos de un insecticida natural, la piretrina, obtenida en el extracto de las flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Estos insecticidas se dividen en dos tipos: los tipo I, que son sintetizados por la modificación del grupo alcohol de la molécula, mientras que los tipo II han sufrido una modificación del grupo ácido y contienen un grupo α -ciano-3-fenoxibencil como la Cihalotrina (ver figura 3).

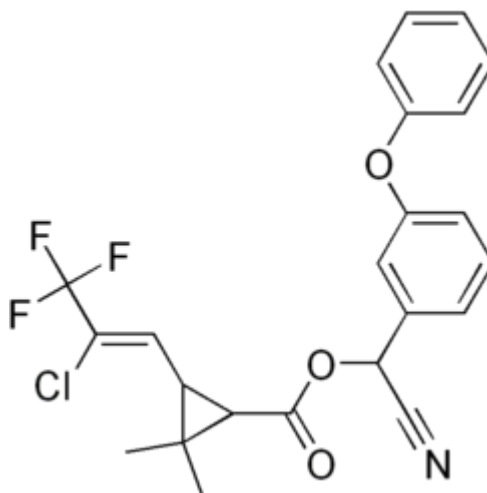


Figura 3. Cihalotrina, piretroide sintético tipo II

La Bifentrina, es un piretroide tipo I de tercera generación, es fotolábil y su vida media es tan solo de horas. Su nombre IUPAC es 2-metilbifenil-3-ilmetil (Z) (1RS, 3RS)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato (ver figura 4).

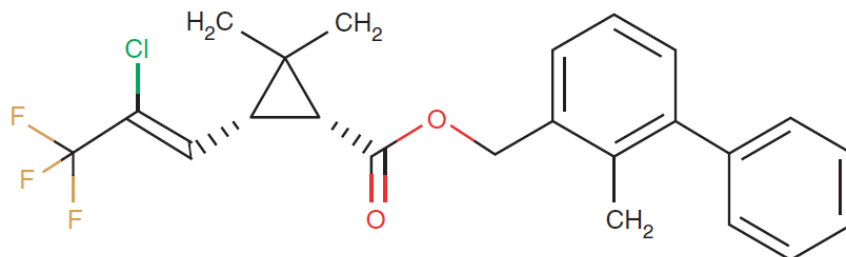


Figura 4. Estructura química del insecticida Bifentrina (Riar, 2014).

Su mecanismo de acción se basa en atacar el sistema nervioso central. La Bifentrina interacciona con los canales de sodio dependientes de voltaje en las neuronas y causa una despolarización debido a la entrada de iones sodio durante la excitación. Esta despolarización produce una actividad nerviosa repetitiva que lleva a una hiperexcitación y al final la muerte. Debido a este comportamiento, el insecticida actúa en el estadio adulto del mosquito *A. aegypti* y por esta razón, se usa comúnmente en el control por aspersión en zonas infectadas con el adulto (Riar, 2014).

El uso de este insecticida se vio restringido por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) en el año de 1989, debido a que presenta alta toxicidad en gran variedad de peces, algunas aves, invertebrados terrestres y acuáticos y otros insectos como las abejas (Riar, 2014). Por este motivo, el empleo de Bifentrina se debe hacer de manera responsable, procurando tener un buen

manejo de desechos y haciendo un correcto empleo en diferentes campos como la agricultura, control de vectores, etc.

2.2.5 Hidrogeles de quitosano

Los hidrogeles son sistemas compuestos por redes de polímeros con grupos hidrófilos en su estructura. Estos sistemas tienen una alta afinidad por el agua, la cual es capaz de penetrar estas redes y hacer que el hidrogel se hinche confiriéndole una consistencia blanda, elástica y con una baja tensión interfacial con respecto al agua (Bhattarai, Gunn, & Zhang, 2010).

Los hidrogeles han venido utilizándose como sistemas de liberación modificada de medicamentos para mejorar algunas características como: la cantidad de fármaco absorbido, el lugar de absorción y el tiempo indicado para que el tratamiento sea eficaz. Esto se logra gracias a la característica de hinchamiento que permite, dependiendo de las condiciones del organismo, que el fármaco sea liberado poco a poco a medida que el hidrogel va adquiriendo mayor volumen (Kumar et al., 2004).

Los polisacáridos son polímeros naturales empleados en la síntesis de los hidrogeles por su abundancia y por encontrarse en fuentes naturales renovables tales como: animales, algas, plantas, microbios y hongos. Además, la mayoría de estos polímeros son clasificados como GRAS (generalmente reconocidos como seguros), es decir que la mayoría de estos polímeros naturales son biodegradables y no tóxicos para los humanos (Alhaique et al., 2015).

Para este proyecto se utilizará el quitosano, un polisacárido lineal conformado por unidades aleatorias de β -(1,4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina (figura 5). Es producido comercialmente por la desacetilación de la quitina, un elemento estructural en el exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insectos principalmente, aunque se encuentra también en algunos hongos. Además, la quitina es el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa, por lo que puede ser aprovechado para el uso en diferentes campos, no solo farmacéuticos sino también en la medicina, biotecnología, etc. (Muñoz et al., 2015)

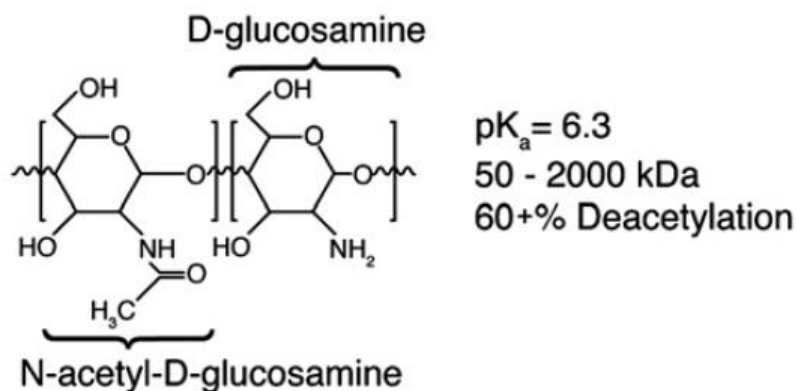


Figura 5. Estructura química del quitosano (Bhattarai et al., 2010)

Las características del quitosano permiten su uso para la elaboración de hidrogeles como sistemas de liberación modificada que posibiliten el desarrollo de nuevas formulaciones que mejoren la biodisponibilidad de algunos fármacos, así como la disminución de efectos adversos. El quitosano es una materia prima que se caracteriza por ser biodegradable, biocompatible y no tóxico ya que los vertebrados tienen la capacidad de metabolizar el compuesto, tanto químicamente a través de la hidrólisis en medios ácidos como el estómago, así como enzimáticamente a través de ciertas proteínas como las lisozimas y las quitinasas (Kean & Thanou, 2010).

Así, algunos aldehídos y ácidos carboxílicos son usados ampliamente en el desarrollo de los hidrogeles como agentes entrecruzantes, siendo el glutaraldehído el más usado para formar las cadenas reticuladas del polímero (Delmar & Bianco-Peled, 2016). Sin embargo, la formación del hidrogel no depende solamente del agente entrecruzante y de su concentración, sino que también depende del peso molecular del polímero, el grado de desacetilación que tenga, el pH del medio, el volumen de solvente empleado en la preparación, entre otras variables que van a condicionar que se obtenga un proceso reproducible con el fin de poder obtener un sistema que permita prolongar el efecto de un larvicida (Novaluron) a través del tiempo para el control del *A. aegypti*.

2.2.6 Resultados obtenidos en trabajos de proyectos de grado anteriores

En trabajos anteriores que han empleado el larvicida Novaluron, se ha encontrado que el grado de entrecruzamiento de los hidrogeles no es un factor significativo en la mortalidad de las larvas. Sin embargo, si se demostró que los hidrogeles con la concentración 1,5 ppm fueron los más efectivos en los 4 bioensayos de laboratorio, que tardaron 15 días cada uno, para matar el 100% de las larvas (Ladino, L., 2016).

Por otro lado, Stephanie Falla encontró que el entrecruzamiento del hidrogel si afectaba la mortalidad de las larvas. Determinó que el sistema de entrecruzamiento del 75% fue el más efectivo en el segundo periodo que duro 15 días (Falla, S., 2015).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo general

Determinar la efectividad de hidrogeles de quitosano cargados con una emulsión comercial (Rimon Duo) del regulador de crecimiento Novaluron y el insecticida Bifentrina como sistema que permita la prolongación del efecto larvicida, capaz de inhibir el desarrollo del mosquito *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio y semicampo, para el 2016

2.3.2 Objetivos específicos

- Obtener hidrogeles de quitosano con tres diferentes concentraciones del producto Novaluron y Bifentrina proveniente de una emulsión comercial.
- Evaluar la eficacia del larvicida desde la matriz polimérica sobre la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio y semicampo.
- Proponer estrategias de escalonamiento del proceso hacia volúmenes mayores como los sumideros.

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 Reactivos, materiales y equipos empleados.

Para la obtención de los hidrogeles se utilizaron los reactivos presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos empleados durante el proyecto.

Reactivos	Pureza o concentración	Casa Comercial
Quitosano	98%	Sigma-Aldrich
Ácido acético glacial	99,5%	Sucromiles S.A.
Glutaraldehído	50%	Protectol
Emulsión Rimon Duo: Bifentrina y Novaluron	Bifentrina 5% y Novaluron 5%	Proficol

Los materiales utilizados fueron: vidrios silanizados, rejilla de 10cm x 10 cm, Beaker de 500mL, probeta de 100 mL y puntas de micropipeta. Se emplearon equipos como la balanza analítica, micropipetas, horno Binder, magnetos, cabina de extracción y plancha de agitación.

2.4.2 Obtención de hidrogeles de quitosano con tres concentraciones diferentes de Novaluron y Bifentrin y dos entrecruzamientos distintos

Para la elaboración de los controles de los hidrogeles se preparó una solución de quitosano al 3%, empleando como disolvente una solución de ácido acético al 2%. Posteriormente, se adicionó la cantidad necesaria del agente entrecruzante, glutaraldehído, para obtener los dos grados de entrecruzamiento distintos (25% y 75%). Esta adición se realizó a una velocidad constante mientras la solución de quitosano estaba en agitación permanente con un magneto sobre una plancha de agitación. Se esperó a que el glutaraldehído se homogeneizara completamente y posteriormente se llevó al ultrasonido donde con la ayuda de una espátula cóncava, se sacaron las burbujas generadas en el proceso. Después, se llevó la solución a un molde de 10cm x 10cm que estaba sobre un vidrio previamente silanizado para

evitar la adhesión del hidrogel (ver figura 6). Luego, se aseguró el molde al vidrio con 8 caimanes, 2 por cada lado, y se dejó gelificar a temperatura ambiente por 3 días. Finalmente, se sacaron los hidrogeles del molde y se pusieron sobre un sartén de teflón (ver figura 7) para llevarlos al horno a una temperatura de 50 °C. Allí se dejaron por un día más y después se sacaron y se almacenaron en recipientes plásticos marcados previamente para su posterior uso (ver figura 8).



Figura 6. Molde con hidrogeles de quitosano.



Figura 7. Hidrogeles en el sartén de teflón antes de ser llevados al horno



Figura 8. Hidrogeles secos en los recipientes de plástico.

Por otro lado, se prepararon hidrogeles con tres concentraciones diferentes del larvicida (0,5 ppm, 2,5 ppm y 5,0 ppm). En este caso se tuvo que dispersar el larvicida, proveniente de una emulsión, en la solución de ácido acético al 2%. Para esto, se agregó la cantidad de emulsión requerida para cada concentración, con la ayuda de una micropipeta, a la solución de ácido acético hasta que se homogeneizara completamente. Posteriormente, se agregó a la dispersión la cantidad de quitosano requerido para obtener los hidrogeles y se dejó homogeneizar hasta que se obtuvo una coloración blanca translúcida. Finalmente, se le adicionó la cantidad de glutaraldehído necesario para obtener cada grado de entrecruzamiento y se siguieron los mismos pasos llevados a cabo para la elaboración de los controles.

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

2.4.3 Determinación del efecto del producto comercial sobre la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.

Los bioensayos realizados en esta parte se llevaron a cabo en el laboratorio de control de vectores ubicado en las instalaciones del CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas), debido a que aquí se dispone de las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo del experimento, además de tener un cuarto disponible para la cría de las larvas utilizadas.

El efecto del larvicida liberado desde el hidrogel sobre la inhibición de la emergencia de *Aedes aegypti* se determinó utilizando 10 larvas en estadios larvarios L1 y L2, un vaso plástico con 100mL de agua de clorada y el hidrogel evaluado. Cada ensayo se realizó por triplicado, incluyendo los controles (ver figura 9). Los vasos eran cubiertos con una malla y un caucho con el fin de evitar que los mosquitos que emergieran escaparan al aire (ver figura 10). Además, se alimentaron las larvas cada dos días con solución de hígado al 2% marca Difco hasta completar 15 días. En este tiempo se contaron las larvas vivas, muertas y los adultos que emergían cada dos días hasta completar este tiempo.



Figura 9. Vasos empleados en los bioensayos en condiciones de laboratorio.



Figura 10. Diseño experimental del ensayo en condiciones de laboratorio (Ladino, L., 2016).

Después de transcurridos 15 días, se procedió a cambiar el hidrogel a otro vaso con 10 larvas nuevas en estadios L1 y L2 y con 100mL de agua de clorada. Se evaluó la mortalidad de las larvas durante esos 15 días y se repitió el proceso durante la ejecución del experimento que tuvo una duración de 60 días en total (4 bioensayos). En los casos en que las larvas no habrían muerto durante los 15 días, se dejaron en el vaso correspondiente, sin el hidrogel, y se seguía evaluando la mortalidad hasta que se completara el 100%.

2.4.4 Determinación del efecto del Novaluron sobre la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de semicampo.

Estos bioensayos se realizaron de igual manera en las instalaciones del CIDEIM; se utilizaron baldes de 12L con agujeros al nivel de 10L para asegurarnos de que no excediera ese volumen. Los baldes fueron dispuestos en las zonas verdes debajo de árboles y expuestos a los cambios ambientales que sufrió la ciudad de Cali los meses de octubre y noviembre de 2016. El agua utilizada fue la que provenía de un riachuelo que pasa por el campus del CIDEIM y que proviene del río Pance, es decir, es un agua de pozo y sin tratamiento alguno.

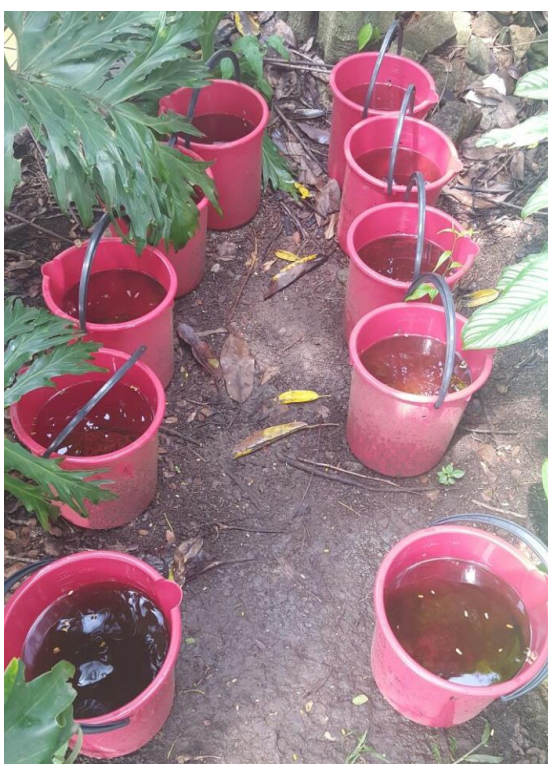


Figura 11. Baldes empleados en los bioensayos con condiciones de semicampo

Para evaluar la efectividad de los hidrogeles en los baldes se montaron 10 sistemas diferentes. Los baldes 1, 2 y 3 estaban cargados con 100 hidrogeles cada uno (debido a que se utiliza un hidrogel para 100mL de agua, es decir que para 10L se emplean 100 hidrogeles) con las concentraciones 0,5 ppm, 2,5 ppm y 5ppm, respectivamente, y un entrecruzamiento del 25%. El balde 4 contenía la cantidad de larvicida en emulsión necesaria para preparar 100 hidrogeles de concentración 1X (control positivo) y el balde 5 contenía 100 hidrogeles control con un entrecruzamiento del 25% (control negativo). Los baldes 6, 7 y 8 tenían 100 hidrogeles cada uno, con las concentraciones 0,5 ppm, 2,5 ppm y 5ppm

respectivamente, y con un entrecruzamiento del 75%. El balde 9 contenía la cantidad de larvicida en emulsión necesaria para preparar 100 hidrogeles de concentración 5X (control positivo) y finalmente el balde 10 estaba cargado con 100 hidrogeles control con un entrecruzamiento del 75% (control negativo) (ver figura 12).

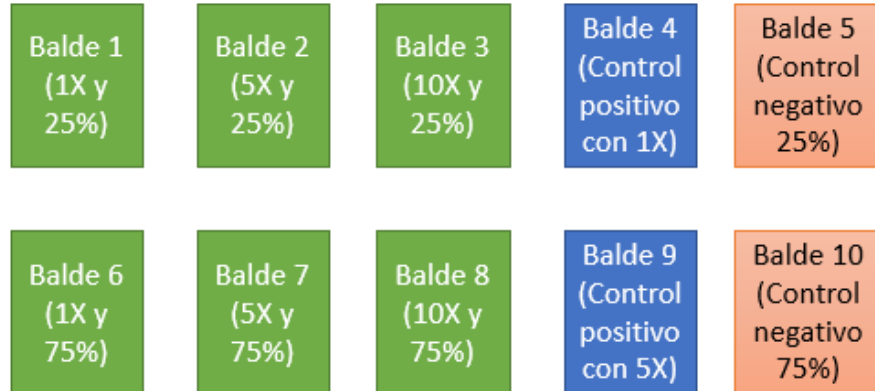


Figura 12. Diseño experimental del ensayo en condiciones de semicampo.

Los baldes se revisaron todas las semanas con el fin de observar si había proliferación de larvas nativas en ellos. Dentro de los primeros 21 días no se observó presencia de larvas, por lo cual se decidió tomar 100mL de agua de cada balde y ponerlos en vasos desechables con 10 larvas en estadios L1 y L2 criadas en el laboratorio del CIDEIM y evaluar así que la concentración en los baldes era la necesaria para matar las larvas (ver figura 13).

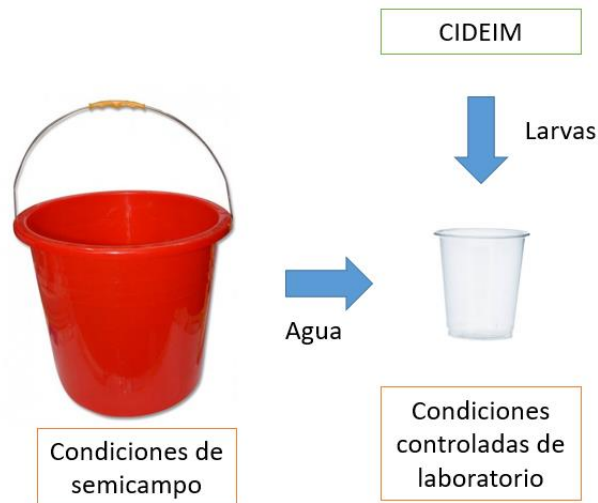


Figura 13. Ejemplo de la adición de larvas del CIDEIM al agua proveniente de los baldes en semicampo.

7 días después se observó la presencia de larvas nativas en algunos de los baldes por lo cual se procedió a su recolección con la ayuda de una malla, se pusieron en vasos plásticos con agua del mismo balde y luego fueron llevadas al laboratorio con el fin de evaluar su mortalidad a través del tiempo (ver figura 14).



Figura 14. Colección de larvas nativas para evaluar su mortalidad en el laboratorio.

2.4.5 Evaluación de los resultados obtenidos para la propuesta de un escalonamiento a futuro

De acuerdo con los resultados obtenidos, se analizó cual es el sistema más viable para ser utilizado en un medio de mayor volumen como podría ser los sumideros, tanques, lavaderos domésticos, llantas abandonadas, etc. Se realizó el cálculo de la capacidad en volumen que podría tener un sumidero (u otro medio de mayor volumen) regular y la cantidad de hidrogeles necesarios para lograr el mismo efecto en la mortalidad de las larvas. Además, se consideró cuáles son los cambios ambientales que podrían afectar las condiciones en la liberación del larvicida y el comportamiento del hidrogel. Por último, se consideró la forma y la cantidad de hidrogeles que van a ser empleados en los sumideros y las posibles diferencias que puedan presentar con respecto a las condiciones de laboratorio y semicampo.

2.4.6 Matriz de marco lógico

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad de nuevas formulaciones de hidrogeles de quitosano cargados emulsiones comerciales del regulador de crecimiento Novaluron como sistema de liberación modificada capaz de inhibir el desarrollo del mosquito <i>Aedes aegypti</i> en condiciones de laboratorio y semicampo, para el 2016			
Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicadores
<p>1. Sintetizar hidrogeles de quitosano con tres diferentes concentraciones de Novaluron proveniente de una emulsión comercial.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Preparar una solución de quitosano al 3% en ácido acético al 2% - Adicionar el Novaluron en emulsión a la solución de quitosano - Se adiciona solución de glutaraldehído como agente entrecruzante -Adicionar la mezcla a los moldes y dejar gelificar por 24 horas -Cortar el hidrogel y dejar secar a temperatura ambiente de 2 a 3 días. - Llevar al horno a 50°C por 24 horas. 	<ul style="list-style-type: none"> - El hidrogel no gelifica antes de adicionarlo al molde -El hidrogel presenta completa homogeneidad y uniformidad - Se obtiene un correcto grado de entrecruzamiento 	<ul style="list-style-type: none"> - Obtener un hidrogel completamente homogéneo, consistente y que presente uniformidad del larvicida.
<p>2. Evaluar la eficacia del larvicida desde la matriz polimérica sobre la mortalidad de las larvas de <i>Aedes aegypti</i> en condiciones de laboratorio y semicampo.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - En los ensayos de laboratorio se requiere llenar los vasos con 100 mL de agua, 10 larvas y 1 hidrogel. -Tapar el vaso con una malla y asegurarla con un caucho. -Alimentar las larvas con gotas de solución de hígado. 	<ul style="list-style-type: none"> - La liberación del larvicida se da de forma constante y uniforme asegurando que no emerjan las larvas al estado adulto. -Los medios utilizados no sufren ninguna alteración inesperada y el ensayo se realiza normalmente. -Los ensayos control no presenten ningún tipo de interferencia 	<ul style="list-style-type: none"> - Las larvas que se encontraban en el medio con el hidrogel cargado de larvicida murieron y no emergieron adultos. - Las larvas que se encontraban en el ensayo control emergieron como adultos.

	<ul style="list-style-type: none"> -Realizar el conteo de las larvas vivas y muertas cada 3 días. -Cambiar el medio (agua, larvas y vaso) cada 15 días. -Realizar un control donde el hidrogel no contenga el larvicida. -Para condiciones de semicampo se requiere lavar muy bien los baldes a emplear. -Llenar los baldes con 10L de agua y los hidrogeles. -Realizar el conteo de las larvas cada 3 días y registrar los valores. -Realizar de igual forma un control donde no haya presencia de larvicida. 	<p>que pueda afectar los resultados esperados.</p>	
<p>3. Proponer estrategias de escalonamiento del proceso hacia volúmenes mayores como los sumideros.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Analizar estadísticamente los resultados obtenidos en los anteriores objetivos. - Realizar el cálculo de la capacidad en volumen que podría tener un sumidero regular y la cantidad de hidrogeles necesarios para lograr el mismo efecto en la mortalidad de las larvas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los resultados obtenidos no son concluyentes. -La información obtenida durante el proyecto es insuficiente para realizar una propuesta de escalonamiento. 	<ul style="list-style-type: none"> - Los resultados muestran que el hidrogel perdura en el tiempo y es una alternativa viable para el empleo contra el vector.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1 Obtención de los hidrogeles

La obtención de los hidrogeles de quitosano se logró después de un mes de intentar varias opciones, empleando la metodología mencionada anteriormente. Inicialmente se intentó realizar el entrecruzamiento con una solución de glutaraldehído al 2,5%, observando que el proceso de entrecruzamiento del polímero se daba inmediatamente. El gel se formaba rápidamente y no daba tiempo para verterlo en el molde. Por esta razón, se empezó a reducir la concentración del glutaraldehído, de tal manera que diera tiempo tanto de sacar las burbujas de la solución, como de agregarla al molde y así esperar que se gelificara allí para obtener la forma deseada. Este procedimiento se hizo con pruebas de ensayo y error, hasta que finalmente se encontró que la solución del agente entrecruzante debía estar al 0,4% para poder obtener resultados satisfactorios.

En la obtención de los hidrogeles con concentraciones 0,5 ppm, 2,5 ppm y 5ppm del larvicida fue necesario cambiar el orden de adición de los reactivos a la mezcla, en comparación con los trabajos anteriores. Stephania Falla mezclaba la emulsión del larvicida después de haber formado la solución de quitosano (Falla, S. 2015). Sin embargo, en este caso el larvicida no se incorporaba totalmente, dejando grumos y formando una solución heterogénea, que no garantizaba que los 100 hidrogeles del molde tuvieran la misma concentración del larvicida. Por esta razón, se decidió dispersarla primero en la solución de ácido acético al 2% y después adicionar el quitosano. Al realizar este procedimiento se observó que la emulsión se dispersaba inmediatamente y el quitosano se dispersaba en esa solución sin inconveniente, logrando finalmente una mezcla totalmente homogénea.

Finalmente, para obtener un mayor rendimiento en la obtención de los hidrogeles (mayor número de hidrogeles sacados de la rejilla), se llevó el molde al horno con una temperatura constante de 25 °C. A temperatura ambiente los hidrogeles de los bordes del molde se secaban, mientras que los que se encontraban en el centro seguían con la consistencia de un líquido viscoso debido a las fluctuaciones de temperatura que había en el laboratorio (el aire acondicionado se apagaba por las noches y se prendía de nuevo por las mañanas), llevando todo esto a obtener porcentajes de rendimiento muy bajos (menos del 60% de hidrogeles sacados de la rejilla).

2.5.2 Bioensayos en laboratorio

Al comenzar los bioensayos de laboratorio se presentó un inconveniente que retrasó el experimento por casi mes y medio. Los bioensayos propuestos para la evaluación

de la mortalidad del mosquito se montaron de la forma descrita, sin embargo, tanto las larvas que se encontraban en los vasos con hidrogeles cargados con larvicida, como las larvas que estaban en los vasos con hidrogeles control, se estaban muriendo. Si los controles estaban matando las larvas, el experimento no podía continuar ya que estos hidrogeles no deberían tener el larvicida y el polímero con el entrecruzante no debería tener ningún efecto sobre las larvas.

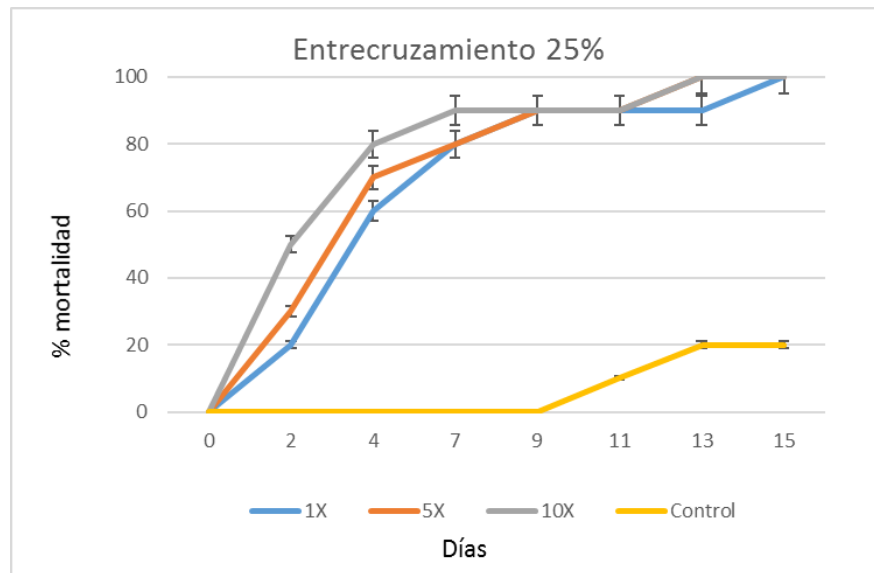
Lo primero que se pensó fue en que hubo una contaminación cruzada entre los diferentes lotes de hidrogeles fabricados anteriormente. Se realizó una nueva producción de hidrogeles control para descartar esta posibilidad, asegurando que todos los materiales estuvieran muy bien lavados para garantizar que estos nuevos hidrogeles no tuvieran trazas de larvicida. Posteriormente, se procedió a montar de nuevo el experimento con los nuevos hidrogeles y las larvas de laboratorio. Sin embargo, todavía se seguían muriendo los individuos por lo que aún había algo que las estaba matando.

Se revisó el agua utilizada en los vasos, la cual no tuvo ningún cambio respecto a la empleada en proyectos anteriores. Se revisó también la alimentación de las larvas, que fue la misma que se ha usado en los ensayos anteriores y por último, se tuvo en cuenta los vasos de plástico usados, los cuales si habían cambiado respecto a los que siempre se han dispuesto para este tipo de proyectos. Se procedió a colocar 10 larvas en el vaso, pero sin hidrogel, para evaluar la mortalidad y se observó que si murieron. Por esta razón, se atribuyó la mortalidad de las larvas estudiadas con los hidrogeles control a los vasos usados.

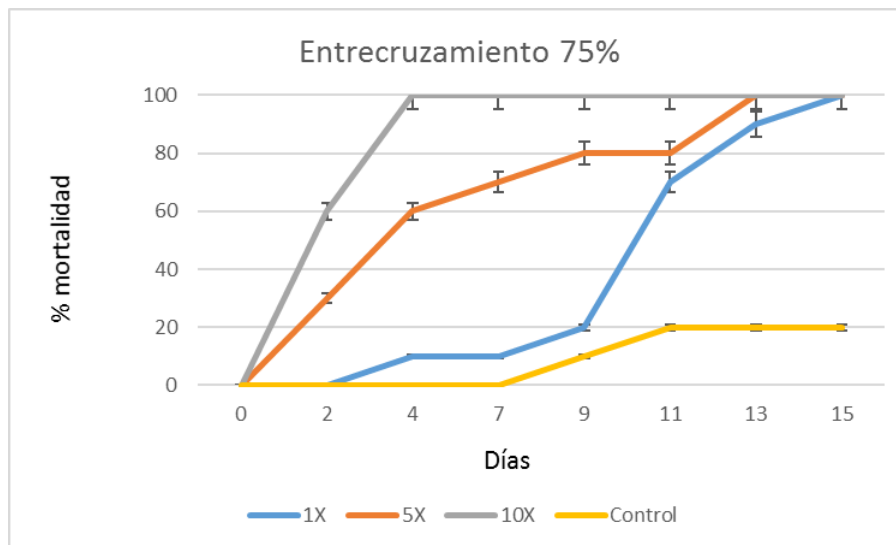
Los vasos desechables se cambiaron por otra marca y se repitió el experimento. En esta ocasión los vasos que tenían hidrogel cargados con larvicida mataban las larvas, mientras que los vasos que tenían el hidrogel control no lo hacían. De esta manera se logró continuar el ensayo sin problema.

Se realizaron 4 bioensayos de 15 días cada uno para un total de 60 días de evaluación. Después de terminar los 15 días, se pasaba el hidrogel a otro vaso nuevo que contenía otros 100 mL de agua y 10 larvas nuevas para el siguiente bioensayo. En cada ciclo se realizaron gráficas de mortalidad acumulada en el tiempo donde se observa la comparación del comportamiento para cada concentración del larvicida (0,5 ppm, 2,5 ppm y 5 ppm) con su respectivo control negativo (sin larvicida) y el grado de entrecruzamiento (25% y 75%).

El primer bioensayo de 15 días se llevó a cabo desde el 21 de septiembre de 2016 hasta el 7 de octubre de 2016. Los resultados se expresan en número de días donde se llevó a cabo el conteo en la mortalidad de las larvas (ver gráficas 1 y 2).

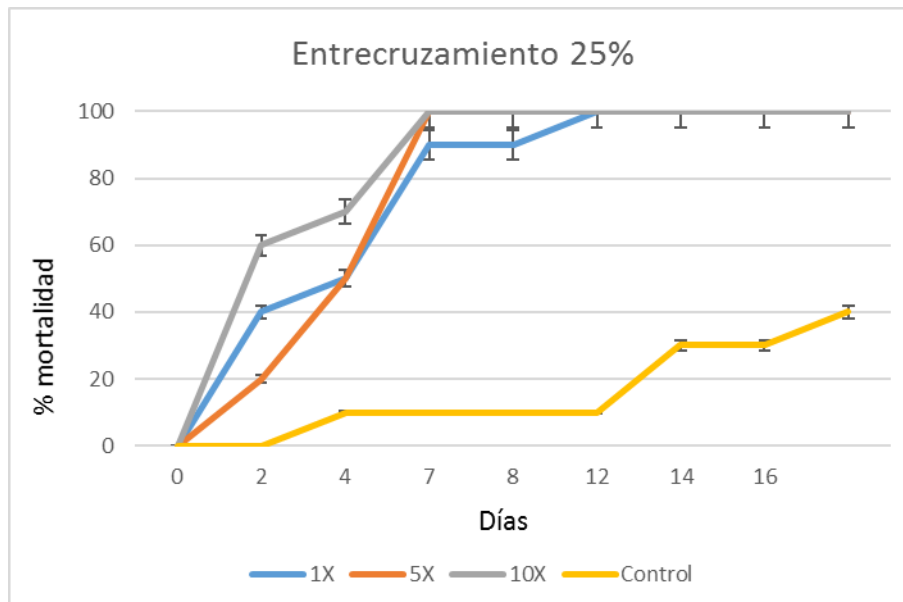


Gráfica 1. Primer bioensayo con entrecruzamiento del 25%.

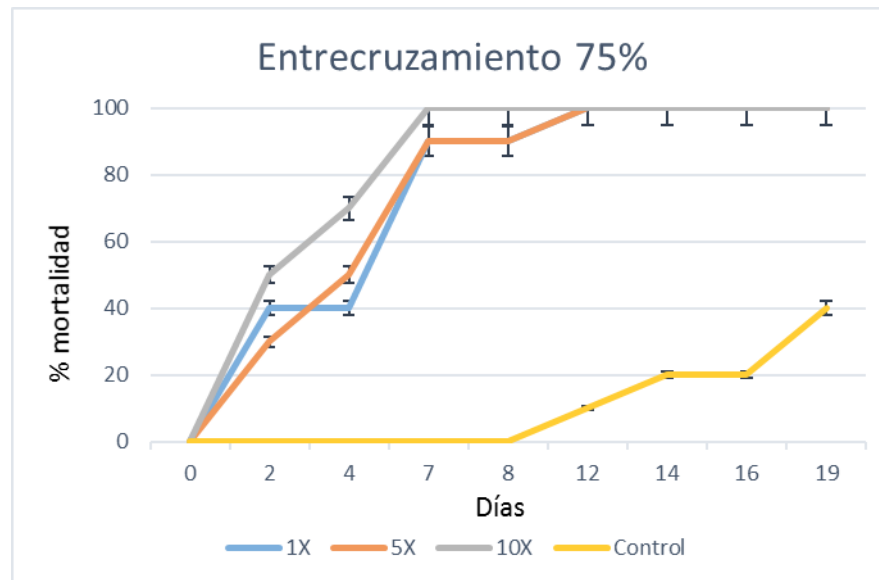


Gráfica 2. Primer bioensayo con entrecruzamiento del 75%.

El segundo bioensayo se realizó entre el 12 de octubre de 2016 hasta el 31 de octubre de 2016. En este caso, el ciclo duro más tiempo debido a que el 100% de las larvas no habían muerto durante los primeros 15 días por lo tanto se extrajo el hidrogel para comenzar el tercer bioensayo y se dejaron los vasos con el hidrogel 4 días más (19 días) hasta que murieran las larvas o emergieran los adultos (ver gráficas 3 y 4).

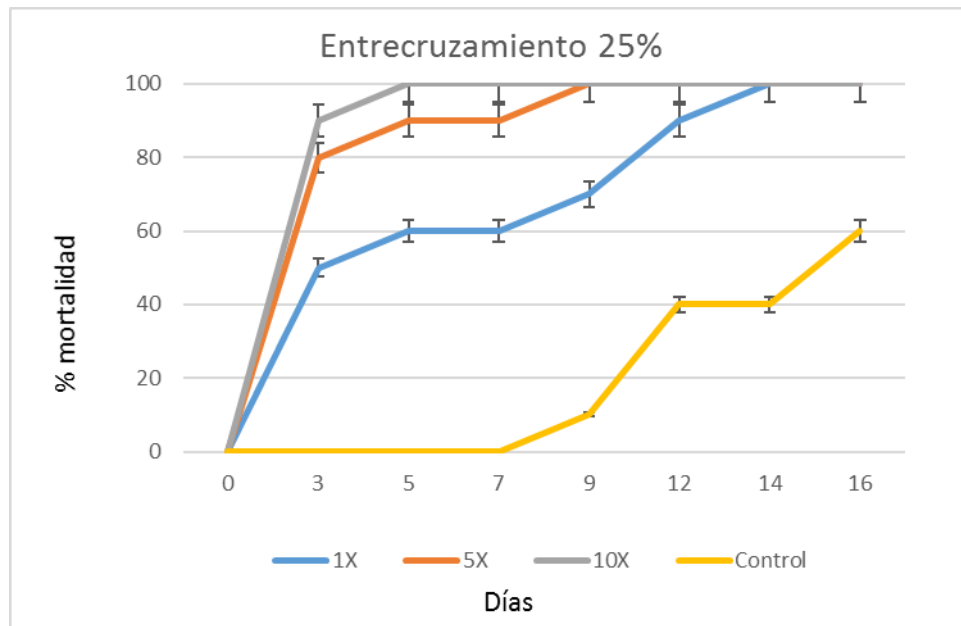


Gráfica 3. Segundo bioensayo con entrecruzamiento del 25%.

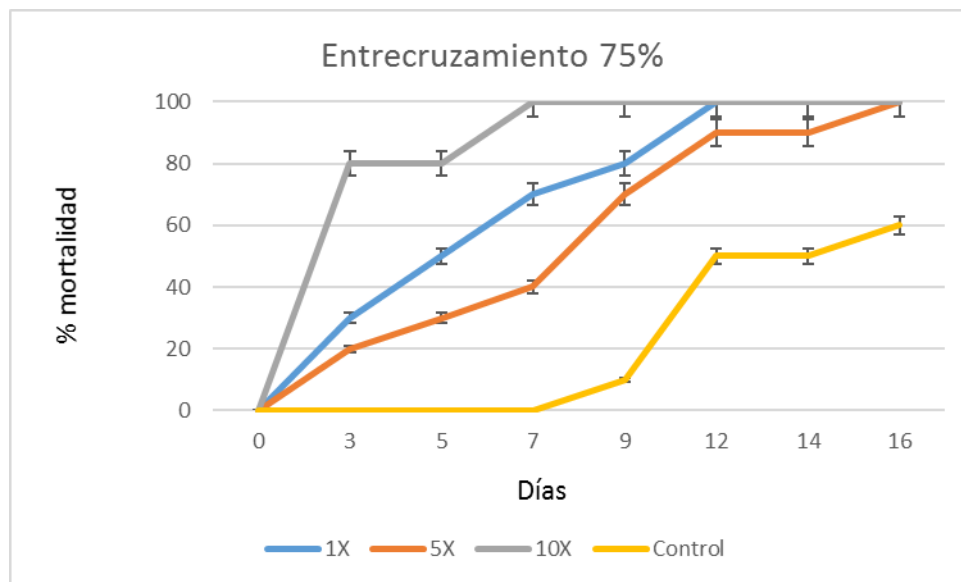


Gráfica 4. Segundo bioensayo con entrecruzamiento de 75%.

El tercer bioensayo se llevó a cabo desde el 29 de octubre de 2016 hasta el 13 de noviembre de 2016. (ver figuras 5 y 6).

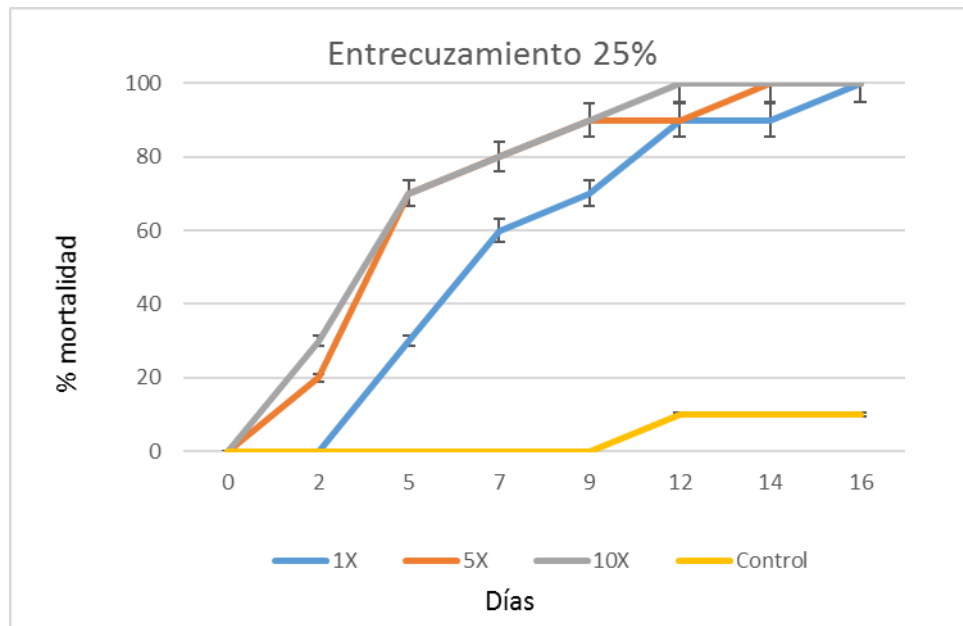


Gráfica 5. Tercer bioensayo con entrecruzamiento de 25%.

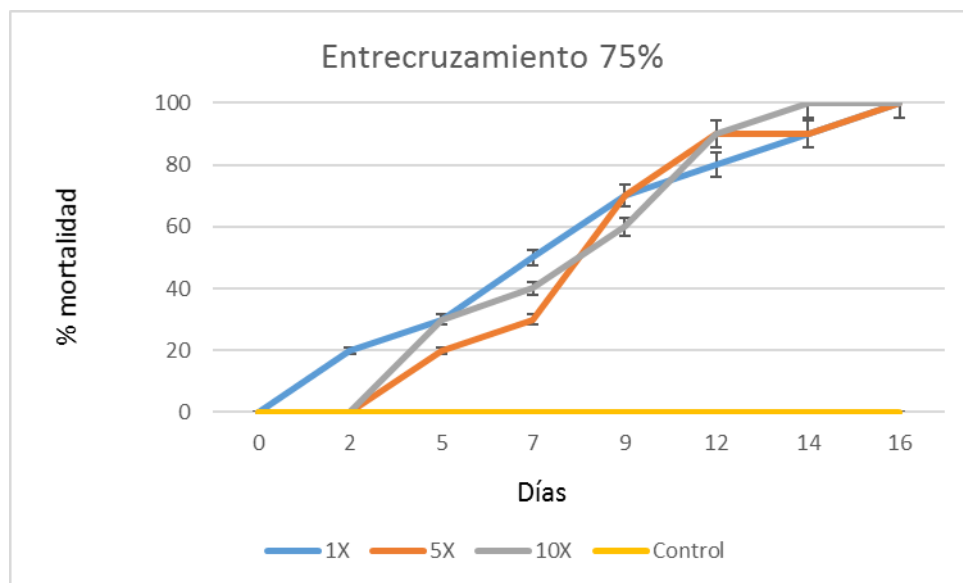


Gráfica 6. Tercer bioensayo con entrecruzamiento de 75%.

Finalmente, el último ciclo se llevó a cabo del 15 de noviembre de 2016 hasta el 2 de diciembre de 2016 (ver graficas 7 y 8). Hasta esta fecha se completó los 60 días de evaluación para realizar la comparación de la efectividad de los diferentes hidrogeles.



Gráfica 7. Cuarto bioensayo con entrecruzamiento de 25%.



Gráfica 8. Cuarto bioensayo con entrecruzamiento de 75%.

Todas las gráficas de mortalidad (gráficas 1 a 8) realizadas para los 4 bioensayos muestran que el 100% de las larvas murieron. Se observó que los tiempos necesarios para alcanzar el 100% de mortalidad variaron entre los diferentes

bioensayos, siendo el bioensayo 2 el que más tiempo demora con 19 días, 4 días más en comparación con el bioensayo 1 que duró 15 días y 3 días más en comparación con los bioensayos 3 y 4 que duraron 16 días. Sin embargo, como la diferencia de tiempo fue muy pequeña entre los bioensayos, el análisis estadístico se realizó teniendo en cuenta la mortalidad a los 15 días para los 4 bioensayos.

Para determinar si existen diferencias significativas entre los diferentes bioensayos, las réplicas evaluadas, las diferentes concentraciones de larvicida, los dos grados de entrecruzamiento o la interacción de estos, se realizó un modelo de regresión múltiple para evaluar estos parámetros.

Para esto se planteó una hipótesis nula (H_0) y una hipótesis alternativa (H_A):

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

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

Para comprobar estas hipótesis se toma el valor P como valor de referencia con un alfa de 0,05, donde si el valor P es mayor o igual al alfa ($P \geq \alpha$) se afirma la hipótesis nula.

En la tabla 2 se muestra el modelo que evalúa los diferentes parámetros: los bioensayos, sus réplicas, la concentración del larvicida, el porcentaje de entrecruzamiento y la interacción de estos dos últimos. En todos los casos se hace una comparación respecto al experimento uno, debido a que para realizar el modelo se debe tener una referencia con la cual comparar los demás parámetros. Por esta razón este experimento no se muestra en la tabla. Así, las diferencias estadísticamente significativas encontradas son respecto a este experimento. En la columna de la izquierda se muestra cada uno de los parámetros (siendo “experimen” los diferentes bioensayos, “concentra” las concentraciones, “percentre” el porcentaje de entrecruzamiento, “expXcon” la interacción los bioensayos y la concentración y “replica” las diferentes replicas) y se compara con el valor P de cada uno de ellos.

Tabla 2. Modelo de regresión lineal múltiple para evaluar si existe diferencias entre los bioensayos, las réplicas, la concentración del larvicida, el porcentaje de entrecruzamiento y la interacción de estos.

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

Source	SS	df	MS	Number of obs =	96
Model	107879.167	15	7191.94444	F(15, 80) =	57.99
Residual	9920.83333	80	124.010417	Prob > F =	0.0000
				R-squared =	0.9158
				Adj R-squared =	0.9000
Total	117800	95	1240	Root MSE =	11.136

percmortalidad	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
_Iexperimen_2	-1.25	5.567998	-0.22	0.823	-12.33067 9.83067
_Iexperimen_3	7.5	5.567998	1.35	0.182	-3.58067 18.58067
_Iexperimen_4	-11.25	5.567998	-2.02	0.047	-22.33067 -1.1693304
Iconcentra_2	-6.25	5.567998	-1.12	0.265	-17.33067 4.83067
Iconcentra_3	-6.25	5.567998	-1.12	0.265	-17.33067 4.83067
IexpXcon_2_2	5.89e-14	7.874339	0.00	1.000	-15.67043 15.67043
IexpXcon_2_3	2.5	7.874339	0.32	0.752	-13.17043 18.17043
IexpXcon_3_2	3.75	7.874339	0.48	0.635	-11.92043 19.42043
IexpXcon_3_3	6.25	7.874339	0.79	0.430	-9.420433 21.92043
IexpXcon_4_2	10	7.874339	1.27	0.208	-5.670433 25.67043
IexpXcon_4_3	12.5	7.874339	1.59	0.116	-3.170433 28.17043
Ipercentre_2	-2.083333	2.273126	-0.92	0.362	-6.606998 2.440331
_Ireplica_2	77.08333	3.214685	23.98	0.000	70.68591 83.48076
_Ireplica_3	76.25	3.214685	23.72	0.000	69.85257 82.64743
_Ireplica_4	75	3.214685	23.33	0.000	68.60257 81.39743
_cons	26.45833	4.546252	5.82	0.000	17.411 35.50566

Las filas resaltadas, que señalan la concentración, el porcentaje de entrecruzamiento y la interacción de estos, muestran que estos parámetros no presentan diferencias estadísticamente significativas exteriorizando en todos los casos un valor P mayor a 0,05.

Los análisis muestran que solo hay diferencias significativas cuando se evalúan los bioensayos (experimento) y las réplicas. De esta manera, el modelo queda reducido a los diferentes bioensayos y las diferentes réplicas evaluadas para determinar cuáles son diferentes (ver tabla 3). En la primera columna de la tabla se observan los parámetros de interés: bioensayos y réplicas y se compara con el valor P mostrado en la columna 5. Se puede observar que todas las réplicas presentan diferencias significativas con un valor P menor a 0,05 y que solo el experimento 3 es estadísticamente diferente al experimento 1 con un valor P de 0,001. Los demás

experimentos presentan un valor P mayor al alfa, por lo cual se considera que no presenta diferencias significativas aceptando la hipótesis nula. Así, se propone el modelo final

$$\% \text{ mortalidad} = \beta_0 + \beta_i X_1 + \beta_j X_2 + e_{ij}$$

Donde X_1 representa los bioensayos y X_2 representa las réplicas.

Tabla 3. Modelo de regresión lineal múltiple para evaluar si existe diferencias entre los diferentes bioensayos y las réplicas evaluados

```
. xi: regress percmortalidad i.experimento i.replica
i.experimento  _Iexperimen_1-4  (naturally coded; _Iexperimen_1 omitted)
i.replica      _Ireplica_1-4    (naturally coded; _Ireplica_1 omitted)
```

Source	SS	df	MS	Number of obs = 96		
Model	107216.667	6	17869.4444	F(6, 89) =	150.27	
Residual	10583.3333	89	118.913858	Prob > F	= 0.0000	
				R-squared	= 0.9102	
				Adj R-squared	= 0.9041	
				Root MSE	= 10.905	
Total	117800	95	1240			

percmortalid	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
_Iexperimen_2	-.4166667	3.147934	-0.13	0.895	-6.671544	5.838211
_Iexperimen_3	10.833333	3.147934	3.44	0.001	4.578456	17.08821
_Iexperimen_4	-3.75	3.147934	-1.19	0.237	-10.00488	2.504878
_Ireplica_2	77.083333	3.147934	24.49	0.000	70.82846	83.33821
_Ireplica_3	76.25	3.147934	24.22	0.000	69.99512	82.50488
_Ireplica_4	75	3.147934	23.83	0.000	68.74512	81.25488
_cons	21.25	2.944623	7.22	0.000	15.3991	27.1009

En el laboratorio todas las concentraciones evaluadas mataron el 100% de las larvas en los 4 bioensayos realizados. Sin embargo, al aumentar la concentración del larvicida 5 o 10 veces se espera que la mortalidad de las larvas sea mucho mayor, debido a que se está aumentando en esta proporción la Dosis Letal 99 del larvicida. No obstante, no se encontraron diferencias debido a que con la concentración 1X fue suficiente para matar el 100% de las larvas. Lo que si se podría evidenciar con más tiempo de estudio, es que al aumentar la concentración del larvicida, el hidrogel tenga la capacidad de ejercer su acción por más tiempo. Esta hipótesis no pudo comprobarse por el límite de tiempo establecido. Sin embargo, el CIDEIM continúa con el experimento y es posible que al pasar el tiempo se vean estas diferencias.

El grado de entrecruzamiento está muy relacionado con el tiempo de efectividad del larvicida. Para los 60 días de evaluación del experimento tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes porcentajes de entrecruzamiento evaluados (25% y 75%), ya que en la tabla 2 se puede observar que este parámetro presenta un valor P mayor a 0,05. Se esperaría que al aumentar el grado de entrecruzamiento exista una menor movilidad de las cadenas del polímero, por lo

cual el larvicida tendrá mayor dificultad en salir de la red polimérica y por tanto, habrá una menor liberación de éste en el tiempo. Esta hipótesis también se podría comprobar por parte del CIDEIM con un mayor tiempo de experimentación.

La evaluación de la mortalidad de las larvas para cada hidrogel sintetizado se realizó por triplicado, con el objetivo de darle validez estadística al experimento. El modelo estadístico propuesto demostró que existen diferencias entre las réplicas de cada bioensayo ya que el valor P obtenido es menor a 0,05 (tabla 3). Se esperaría que el comportamiento de las tres replicas fuera similar y las diferencias en la mortalidad de las réplicas se debe a la variabilidad genética de las larvas.

2.5.3 Bioensayos en condiciones de semicampo

Para llevar a cabo el experimento se tuvo en cuenta la recomendación de los proyectos anteriores, los cuales no lavaron bien los baldes y por lo tanto no crecieron larvas debido a que estos recipientes tienen en su superficie ciertos químicos para evitar el crecimiento de plagas.

El bioensayo se llevó a cabo en un lugar abierto, los baldes se colocaron debajo de árboles y expuestos a cualquier cambio climático que pudiera afectar el experimento. Durante el periodo del 7 de octubre hasta el 21 de noviembre que tuvo cabida el ensayo, se presentaron lluvias fuertes que, sin lugar a duda, realizaron un recambio en el agua de los baldes. Además, se encontró material orgánico, hojas, tallos y tierra en todos los recipientes.

Después de tres semanas de haber montado el experimento (31 de octubre), y sin obtención alguna de larvas nativas en ninguno de los 10 baldes, se recolectó agua de cada uno de los recipientes para ver el comportamiento con larvas de laboratorio. En esta primera tanda se observó que después de 8 días todas las larvas habían muerto, con excepción del balde 1 (1X con entrecruzamiento del 25%) donde a los 8 días aún permanecían 18 larvas vivas de 20. 15 días después (15 de noviembre), y al no encontrar larvas nativas en ninguno de los 10 baldes, se procedió a recoger agua de cada uno de los recipientes para colocar larvas de laboratorio y ver su comportamiento. En esta segunda tanda, y pasados 6 días, todas las larvas habían muerto exceptuando el balde 1 con 18 larvas vivas de 20, el balde 2 (5X con entrecruzamiento del 25%) con 8 larvas vivas de 20 y el balde 6 (1X con entrecruzamiento del 75%) con 15 larvas vivas de 20.

Hay que tener en cuenta que el balde 1 tenía los hidrogeles con el menor grado de entrecruzamiento y la menor concentración del larvicida. Esto podría indicar dos cosas: al tener un menor porcentaje de entrecruzamiento, las cadenas de los polímeros van a permitir que haya una mayor liberación del larvicida al medio, reduciendo su tiempo de efectividad. Por otro lado, al ser el hidrogel con la menor

concentración de larvicida, se esperaría que su efecto terminara en menor tiempo en comparación a los otros hidrogeles con mayor concentración del larvicida.

A la cuarta semana de evaluación se encontró la presencia de larvas nativas exclusivamente en el balde 1 (1X con 25% de entrecruzamiento). Estas se llevaron al laboratorio y se observó que al pasar los días iban saliendo mosquitos *Aedes Albopictus*, lo que confirma que los hidrogeles del balde 1 habían perdido la efectividad y estaban dejando emerger los vectores. Para los demás baldes nunca se vio presencia de larvas o pupas nativas.

Para estos bioensayos no se realizaron análisis estadísticos debido a que los datos obtenidos eran insuficientes para lograr realizar un estudio completo y que mostrara resultados certeros.

En las siguientes semanas no se observó presencia de larvas nativas en los recipientes y la recolección de datos, para este experimento en condiciones de semicampo, se suspendió. Sin embargo, los sistemas quedaron montados y la lectura de los datos se seguirá realizando por parte del CIDEIM.

Por otro lado, se estaba evaluando simultáneamente otro producto (Piriproxifen) por parte de un compañero al cual si le llegaron muchas larvas. Una explicación para que no hubiera presencia de larvas nativas en los baldes es debido a que los mosquitos presentan cierta repulsión al Novaluron por lo cual ni siquiera se acercaban a los baldes a colocar sus huevos. Esto se ha observado en proyectos anteriores con Lorena Ladino y para este se evidencio una situación similar, por lo cual se cree que existe cierta repelencia. Además, se encontró que la Bifentrina presenta una repelencia espacial a las hembras de *A. aegypti* utilizando concentraciones muy pequeñas del insecticida (Ayala-Sulca et al., 2008). Los 10 recipientes se colocaron de forma contigua, el balde control positivo al lado del balde control negativo, lo cual podría explicar porque ni siquiera hubo presencia de larvas en los baldes con control negativo donde había hidrogeles sin larvicida. Esto podría ser una ventaja cuando no se quiera tener presencia del mosquito en las aguas estancadas, es decir, se podría proponer usar estos hidrogeles con Novaluron en los lavaderos de las casas o cualquier otro recipiente con agua dentro de una casa y evitar su reproducción. Por otro lado, podría ser una desventaja cuando se quiere poner una trampa al mosquito, es decir, si se quiere atraer al vector al depósito de agua para que ponga sus huevos, este podría ser el caso de los sumideros en las ciudades o en cualquier otro lugar al aire libre.

2.5.4 Propuesta de escalonamiento a recipientes de mayor volumen.

Finalmente, este proyecto propone realizar un escalonamiento a medios que contengan mayor capacidad en volumen, para lograr la inhibición del vector *A. Aegypti* en lugares que contienen agua estancada y que representan un potencial

criadero para el mosquito. Lo primero que hay que tener en cuenta es que los resultados a nivel de laboratorio fueron satisfactorios, para 100mL de agua fue suficiente un hidrogel con un volumen $0,5\text{cm}^3$. Este hidrogel tiene forma de cubo, con medidas de 1cm de largo, 1cm de ancho y 0,5cm de alto. En esta ocasión, la concentración y el grado de entrecruzamiento no fueron un factor determinante ya que en todos los casos se vio una mortalidad de 100% en 2 meses que se llevó a cabo el bioensayo, además en el análisis estadístico se evidencio que estos dos parámetros presentaban un valor P mayor a 0,05 por lo cual se acepta la hipótesis nula y se comprueba que no existen diferencias significativas en el tiempo que requiere matar el 100% de las larvas.

Para pasar del bioensayo a nivel de semicampo se tuvo en cuenta que el volumen aumentaba a 10L de agua. Por esta razón, se incluyeron 100 hidrogeles con las mismas características mencionadas anteriormente. En este caso los resultados tuvieron una variación y se encontró que los 100 hidrogeles con una concentración de 1X y un entrecruzamiento del 25% perdieron el efecto en aproximadamente tres semanas de uso. Esto probablemente se debió al recambio de agua que sufrió el balde debido a las constantes lluvias presentadas en esas fechas. Este es un importante factor a considerar dependiendo del recipiente escogido realizar el escalonamiento. Es decir, si es un lugar abierto y el aire libre, este tipo de hidrogel posiblemente no vaya a arrojar resultados favorables. Por otro lado, si es un lugar cerrado que siempre conserva el mismo volumen de agua durante un tiempo determinado, se podría considerar utilizar este sistema.

Para realizar el escalonamiento se debe usar un hidrogel con volumen de $0,5\text{cm}^3$ por cada 100mL de agua. Por ejemplo, si el volumen de un sumidero (que está en la ciudad, es destapado y al aire libre) es de 150L, se recomendaría utilizar 1500 hidrogeles de concentración 5X o 10X con un entrecruzamiento del 25% o del 75%, dependiendo del tiempo que se requiera para que permanezca la efectividad del sistema. Si por el contrario se tiene otro receptáculo de volumen de 50L y está en algún sitio cerrado, se recomendaría usar 500 hidrogeles de concentración 1X o 5X con un entrecruzamiento del 25% y con un recambio de los hidrogeles cada 2 meses para asegurar el efecto del larvicida durante el tiempo que se requiera.

Es importante aclarar que se deben utilizar hidrogeles de estas medidas (1cm x 1cm x 0,5 cm) así sea en un número mucho mayor. En proyectos anteriores se realizó el experimento con un hidrogel de mayor tamaño que contenía la DL_{99} del larvicida para garantizar su efecto en un volumen de agua de 10L. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos proyectos demostraron una baja efectividad, ya que de esta manera no se conseguía la mortalidad del 100% de las larvas. Al usar un solo hidrogel de mayor tamaño se reduce el área superficial considerablemente y la liberación del larvicida en términos de concentración era mucho menor. Por esta razón, se deben usar un mayor número de hidrogeles pequeños para poder escalar los resultados.

2.6 CONCLUSIONES

Se logró obtener todos los hidrogeles con las diferentes concentraciones de larvicida y los dos grados de entrecruzamiento propuestos.

Se determinó que todos los hidrogeles cargados con alguna concentración del larvicida, tuvieron la capacidad de matar el 100% de las larvas en dos meses de evaluación y que no presentaron diferencias estadísticamente significativas en este tiempo. También se encontró que la concentración residual del larvicida que quedaba en el agua después de los 15 días de un ciclo fue suficiente para seguir matando las larvas del *A. aegypti*.

Se encontró que hubo diferencias estadísticas entre las réplicas de estos, las cuales se deben a la variabilidad genética de los organismos vivos.

Se observó que hubo repelencia por parte del vector a la mezcla de larvicidas utilizados (Novaluron y Bifentrina) en los bioensayos de semicampo.

Se evidencio que para condiciones de semicampo, el hidrogel con concentración 1X y 25% de entrecruzamiento perdió la efectividad a las tres semanas de evaluación dejando emerger los adultos del mosquito. También se encontró que los hidrogeles con concentración 10X y 25% de entrecruzamiento, 5X y 75% de entrecruzamiento y 10X y 75% de entrecruzamiento fueron los más efectivos en tres semanas de estudio

2.7 RECOMENDACIONES

Se sugiere que se realice una cinética de liberación del larvicida para cada hidrogel y se cuantifique su concentración a través del tiempo, para ello se podría emplear la espectrometría de masas ya que es una técnica sensible y es capaz de cuantificar las pequeñas concentraciones usadas en cada hidrogel. Esto con el fin de ver el comportamiento que tiene cada hidrogel en cuanto a la liberación del larvicida para cada sistema.

También se recomienda que se lleven a cabo los bioensayos por aproximadamente 6 meses hasta que se vea una disminución de la mortalidad de las larvas, con lo cual se puede establecer el tiempo estimado de efectividad de cada sistema individual.

Se propone que los ensayos en condiciones de semicampo se hagan por triplicado para obtener resultados más congruentes y así poder realizar un análisis estadístico que muestre posibles diferencias en los sistemas.

Se recomienda realizar el escalonamiento en un sumidero real y aplicar las consideraciones mencionadas anteriormente para observar su comportamiento en estas condiciones.

3 REFERENCIAS

- Alhaique, F., Casadei, M. A., Cencetti, C., Coviello, T., Di Meo, C., Matricardi, P., Paolicelli, P. (2015). From macro to nano polysaccharide hydrogels: An opportunity for the delivery of drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. <http://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.018>
- Ayala-Sulca, Y. O., Ibarra-Juarez, L., Grieco, J. P., Achee, N., Mercado Hernandez, R., & Fernández-Salas, I. (2008). RESPUESTA CONDUCTUAL DE *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) FRENTE A ADULTICIDAS PIETROIDES DE USO FRECUENTE EN SALUD PÚBLICA. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 25(1).
- Benradia, H., & Soltani, N. (2016). Impact of insect growth disruptor , novaluron , on biochemical composition of cuticle from the shrimp *Palaemon adspersus*, 4(2), 147–151.
- Bhattacharai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 83–99. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>
- Delmar, K., & Bianco-Peled, H. (2016). Composite chitosan hydrogels for extended release of hydrophobic drugs. *Carbohydrate Polymers*, 136, 570–80. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.072>
- Falla, S. (2015). Liberación controlada del larvicida Novaluron, empleado en el control de vectores de enfermedades tropicales, a partir de hidrogeles de quitosano. (tesis de pregrado). Universidad Icesi, Santiago de Cali.
- Fernández-Salas, I., Danis-Lozano, R., Casas-Martínez, M., Ulloa, A., Bond, J. G., Marina, C. F., Díaz-González, E. E. (2015). Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. *Antiviral Research*, 124, 30–42. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.10.015>
- Fontoura Giglio, N., Fernandez Bellinato, D., Valle, D., & Pereira Lima, J. B. (Mayo de 2012). The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(3), 387-395.
- Gessner, B. D., & Wilder-Smith, A. (2016). Estimating the public health importance of the CYD-tetravalent dengue vaccine: Vaccine preventable disease incidence and numbers needed to vaccinate. *Vaccine*, 34(20), 2397–2401. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.017>

Guy, B., Briand, O., Lang, J., Saville, M., & Jackson, N. (2015). Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. *Vaccine*, 33(50), 7100–7111. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.108>

Guzmán M, Álvarez M, Rodríguez R, et al. Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1999. *International Journal of Infectious Diseases* 1999;3:130-5

INS. (2016). Boletín epidemiológico número 12. Bogotá: Dirección de vigilancia y análisis del riesgo en salud pública.

Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3–11. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>

Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A. J., M. N. V. Ravi Kumar *, †, ... Dombll, A. J. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem. Rev.*, 104(12), 6017–6084. <http://doi.org/10.1021/cr030441b>

Ladino, L. (2016). Liberación controlada del larvicida Novaluron para el control de mosquitos vectores de enfermedades tropicales a partir de hidrogeles de quitosano. (tesis de pregrado). Universidad Icesi, Santiago de Cali.

Luna, K. (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. (tesis de pregrado). Universidad Icesi, Santiago de Cali.

Martínez Torres, E. (2008). Dengue. *Estudos Avançados*, 22(64), 33–52. <http://doi.org/10.1590/S0103-40142008000300004>

Moro, M. L., Grilli, E., Corvetta, A., Silvi, G., Angelini, R., Mascella, F., ... Bossio, N. (2012). Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: A prognostic cohort study. *Journal of Infection*, 65(2), 165–172. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.04.005>

Muñoz, G., Valencia, C., Valderruten, N., Ruiz-Durántez, E., & Zuluaga, F. (2015). Extraction of chitosan from *Aspergillus niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine. *Reactive and Functional Polymers*, 91-92, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2015.03.008>

OMS. (2011). Novaluron in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers. Abril 13, 2016, de OMS sitio web: http://www.who.int/water_sanitation_health/waterquality/guidelines/chemicals/novaluron_2add_feb2008.pdf?ua=1

Organización mundial de la salud. (2016). Dengue y dengue grave. Abril 6, 2016, de OMS Sitio web: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>

Otero, M., Solari, H. G., & Schweigmann, N. (2006). A stochastic population dynamics model for *Aedes aegypti*: Formulation and application to a city with temperate climate. *Bulletin of Mathematical Biology*, 68(8), 1945–1974. <http://doi.org/10.1007/s11538-006-9067-y>

Padilla, J., Rojas, D., & Sáezn, R. (2012). *Dengue en Colombia, Epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia*. Guías de Impresión Ltda (Vol. Primera Ed). <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Restrepo, B. N., Piedrahita, L. D., Agudelo, I. Y., Marín, K., & Ramírez, R. E. (2014). Infección por dengue una causa frecuente de síndrome febril en pacientes de Quibdó, Chocó, Colombia. *Biomédica*, 35(1), 131–137. <http://doi.org/10.7705/biomedica.v35i1.2345>

Salamanca, M., Londoño, B., Urquijo, L., López, J., Álvarez, V., & Rey, G. (2010). *Guía para la atención clínica integral del paciente con dengue*. Bogotá: Plan Nacional de Salud Pública.

Scott-dupree, G. C. C. D. (2007). Novaluron : Prospects and Limitations in Insect Pest Management †, (Carson 1962).

Simoy, M. I., Simoy, M. V., & Canziani, G. A. (2015). The effect of temperature on the population dynamics of *Aedes aegypti*. *Ecological Modelling*, 314, 100–110. <http://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.07.007>

Talyuli, O. A. C., Bottino-Rojas, V., Taracena, M. L., Soares, A. L. M., Oliveira, J. H. M., & Oliveira, P. L. (2015). The use of a chemically defined artificial diet as a tool to study *Aedes aegypti* physiology. *Journal of Insect Physiology*, 83, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.11.007>

Tilak, R., Ray, S., Tilak, V. W., & Mukherji, S. (2016). Dengue, chikungunya ... and the missing entity – Zika fever: A new emerging threat. *Medical Journal Armed Forces India*, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.mjafi.2016.02.017>

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

ANEXOS

Anexo 1. Cálculos para la síntesis de los hidrogeles.

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

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

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

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

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

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

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

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(50\%) \times V_1 = (0,4\%) \times 50\text{mL}$$

$$V_1 = \frac{(0,4\%) \times 50\text{mL}}{50\%}$$

$$V_1 = 0,4\text{mL}$$

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

- **Determinación de la densidad de la solución de glutaraldehído**

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

Tabla 4. Datos para determinación de la densidad del glutaraldehído 2,5%

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

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

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

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

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

Pic.= Picnómetro

Gluta = glutaraldehído

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

- Moles de quitosano

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

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

$$\text{Moles quitosano desacetilado} = 1,056 \times 10^2 \text{ moles quitosano} \times 0,75$$

$$\text{Moles quitosano desacetilado} = 7,92 \times 10^{-3}$$

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

- Para entrecruzamiento 25%

$$7,92 \times 10^{-3} \text{ moles desacetiladas} \times \frac{1 \text{ mol glutaraldehído}}{2 \text{ moles desacetiladas}} \times 0,25$$

$$\text{Moles glutaraldehído} = 9,904 \times 10^{-4}$$

Tabla 5. Moles de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento

Entrecruzamiento	Moles glutaraldehído
25%	$9,904 \times 10^{-4}$
75%	$1,981 \times 10^{-3}$

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

- Para entrecruzamiento 25%

$$9,904 \times 10^{-4} \text{ moles gluta} \times \frac{100 \text{ g gluta}}{1 \text{ mol gluta}} \times \frac{100 \text{ g solución}}{0,4 \text{ g gluta}} \times \frac{1 \text{ mL}}{1,006 \text{ g gluta}}$$

$$\text{mL glutaraldehído} = 24,6$$

Tabla 6.. Volumen de glutaraldehído por porcentaje de entrecruzamiento

Entrecruzamiento	Vol. Solución glutaraldehído 0,4% (mL)
25%	24,6
75%	49,3

Ahora, se procede a calcular la cantidad de Novaluron necesaria para que cada hidrogel tenga la concentración requerida, para esto se debe tener en cuenta los mg de Novaluron necesarios para cada concentración.

- Para cantidad de Novaluron

Volumen 100mL para cada bioensayo

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

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

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

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

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

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

$$\text{Cantidad de larvicida} = \frac{5 \times 10^{-2} \text{mg}}{0,5\text{mL}} = 0,11 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

Habiendo obtenido este valor del volumen y asumiendo que se tiene una concentración de 0,55ppm en el hidrogel completo se calcula la cantidad de larvicida por mililitro teniendo en cuenta que la emulsión presenta una concentración de Novaluron de 5%

Cantidad NOV necesaria

$$\begin{aligned} &= 0,11 \frac{\text{mg Nov}}{\text{mL sln}} \times 100\text{mL sln quitosano} \times \frac{1\text{g}}{100\text{mg}} \times \frac{100\text{ml emulsión}}{5\text{g Nov}} \times \frac{1000\text{uL}}{1\text{mL}} \\ &= 220\text{uL de emulsión} \end{aligned}$$

Este cálculo se repite para las diferentes concentraciones obteniendo los resultados presentados en la Tabla 7.

Tabla 7. Cantidad de Novaluron de acuerdo a la concentración

Concentración (X=0,55ppm)	Emulsión de larvicida (uL)
1X	220
5X	1100
10X	2200

Anexo 3. Formato para la evaluación de la mortalidad de las larvas en semicampo.

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

Experimento #: _____ Responsable: _____ Fecha de inicio: _____

Producto: _____ Especie: _____ Cepa: _____ Instar Evaluada: _____

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