

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*) COMO
REPELENTE DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*

DANIEL ALEJANDRO PAIVA APONTE

YULIETH ANDREA RIOS ROZO

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
TECNOLOGÍA EN SANEAMIENTO AMBIENTAL
BOGOTÁ D.C.

2021

EVALUACIÓN DEL EXTRACTO DE CALÉNDULA (*Calendula officinalis*) COMO
REPELENTE DE MOSQUITOS *Aedes aegypti*

DANIEL ALEJANDRO PAIVA APONTE

(20181085057)

YULIETH ANDREA RIOS ROZO

(20181085066)

Trabajo de grado en modalidad de investigación presentado como requisito parcial para
optar al título de Tecnólogos en Saneamiento Ambiental

DIRECTOR

DIEGO TOMÁS CORRADINE MORA

Médico Veterinario MSc Salud Pública

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
TECNOLOGÍA EN SANEAMIENTO AMBIENTAL
BOGOTÁ D.C.

2021

Tabla de contenido

1. Introducción.....	7
2. Objetivos.....	9
2.1. Objetivo general.....	9
2.2. Objetivo específico.....	9
3. Marco teórico.....	9
3.1. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	9
3.2. Ciclo de vida.....	11
3.2.1. Huevos.....	11
3.2.2. Larvas.....	11
3.2.3. Pupas.....	12
3.2.4. Mosquito adulto.....	13
3.3. Enfermedades transmitidas.....	14
3.4. Distribución geográfica del vector <i>Aedes aegypti</i>	16
3.5. Medidas de control del vector.....	17
3.5.1. Control físico.....	17
3.5.2. Control químico.....	17
3.5.3. Control biológico.....	17
3.6. Caléndula (<i>Calendula officinalis</i>)	17
3.7. Extracto de <i>Calendula officinalis</i>	19
3.8. Extracción Soxhlet.....	19
4. Materiales y Método.....	19
4.1. Obtención y cría de colonias de <i>Aedes aegypti</i>	19
4.1.1. Fase de huevos.....	19
4.1.2. Fase larvaria.....	20
4.1.3. Fase pupal.....	20
4.1.4. Fase adulta.....	20
4.2. Obtención del extracto.....	21

4.2.1. Maceración en calor, método Soxhlet.....	21
4.2.2. Preparación de material.....	21
4.2.3. Elaboración de cartuchos Soxhlet.....	21
4.2.4. Extracción de las propiedades de la caléndula.....	22
4.2.5. Destilación de la solución obtenida.....	22
4.3. Bioensayos.....	23
4.3.1. Selección de voluntarios	23
4.3.2. Firma de formato de consentimiento.....	23
4.3.3. Aplicación de pruebas de alergia en los sujetos de prueba.....	23
4.3.4. Cálculo área de aplicación.....	24
4.4. Preparación del repelente.....	24
4.5. Determinación de dosis efectiva.....	25
4.6. Determinación tiempos de repelencia (tiempos de protección).....	25
4.7. Formulación de Hipótesis.....	26
5. Resultados y análisis.....	26
5.1 Efecto repelente a diferentes concentraciones de disolución del extracto.....	26
5.2. Tiempos de repelencia	27
5.3. Comparación tiempos de repelencia	28
5.4. Comprobación de Hipótesis.....	28
6. Discusión de resultados.....	29
7. Conclusiones.....	30
8. Recomendaciones.....	30
9. Referencias.....	32
Anexos.....	35

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica <i>A.aegypti</i>	10
Tabla 2 Clasificación taxonómica de la caléndula.....	18
Tabla 3. Promedio de posturas de mosquito en el minuto 0.....	27
Tabla 4. Tiempos de repelencia a diversas concentraciones.....	28
Tabla 5. Prueba T Student.....	29

Índice de figuras y gráficas

Figura 1. Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	10
Figura 2 Huevo de <i>A. aegypti</i>	11
Figura 3 Larva estadio 3.....	12
Figura 4 Pupa de <i>A. aegypti</i>	13
Figura 5 Mosquito hembra adulto.....	14
Figura 6 Distribución mundial de <i>Aedes aegypti</i> . El mapa muestra la probabilidad de ocurrencia.....	16
Figura 7 Caléndula molida y molino convencional.....	21
Figura 8 Cartuchos Soxhlet.....	22
Figura 9 Rotovapor IKA RV10.....	23
Figura 10 Solución repelente a 6% de concentración.....	24
Figura 11 Bioensayos.....	27
Gráfica 1 Comparativa porcentaje de protección.....	28

Agradecimientos

“Agradezco a mi familia, amigos y personas especiales que estuvieron en mi vida, y más en esta etapa de mi vida universitaria, gracias por ayudarme y darme aliento cuando lo necesite, apoyarme en todas mis decisiones a lo largo de este proyecto, este es un nuevo logro y es en gran parte gracias a ustedes, he logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio podría parecer una tarea difícil, pero con mucho esfuerzo y dedicación se logró, le agradezco a mi mamá la cual estuvo en todo momento apoyándome y cuidándome, dándome la fuerza para continuar, al profesor Diego Corradine, el cual confió en nosotros y nos guió en la realización del proyecto así como la profesora Liliana Alvarado la cual nos asesoró en este proyecto, gracias por compartir sus conocimientos, tiempo y dedicación.”

- Yulieth Andrea Ríos Rozo.

“Bueno, bueno, bueno. Hasta que por fin llegó el día de redactar esto, madre mía, ya era hora. Y la verdad es que no me alcanzan las palabras para plasmar lo que siento, pero ahí va:

Primeramente, quisiera agradecer al profe Diego Corradine por habernos extendido la mano a Julieth y a mí en este proyecto; por su ayuda, consejos y paciencia con nosotros en el desarrollo del mismo. Un grandísimo docente y mejor ser humano. (No como otros, ¿Verdad, Mojica y Wilches?). Así como a la profe Liliana Alvarado por asesorarnos y brindarnos sus conocimientos.

Agradecer también a mi familia por el apoyo que me han dado en estos 4 años de carrera. De igual forma a mis amigos del colegio: Miguel, Brayan, Sebas, Julián, Laura T., Valen y Laura M. Y a la nueva familia que he hecho este tiempo: Santi R., Santi S., Paula, Jesús, Felpu y demás. Con especial énfasis en mis chicas: Lau, Valen, Mayra y mi compañera Julieth. Este logro es también de ustedes, y solo me queda decirles: “Gracias”

Por último, que esto se está alargando mucho (jeje), agradecer a mi profesora de física del colegio, Janneth Puentes, por confiar en mí y facilitarme el PIN de presentación a la UD. Sé que estuvo muy contenta cuando fui admitido, espero lo esté más cuando sea egresado, todo esto no hubiese pasado sin usted, y las palabras jamás serán suficientes para describir lo agradecido que estoy por ese gesto. Este logro, tiene especial dedicación a usted, muchísimas gracias profe”

-Daniel Alejandro Paiva Aponte

Resumen

El presente trabajo de investigación tuvo como propósito evaluar el efecto repelente del extracto de *Calendula officinalis* en mosquitos hembra adultos de la especie *A. aegypti*, la cual es una de las especies de mayor importancia en salud pública y epidemiología a nivel mundial. En el estudio fueron partícipes 10 voluntarios de ambos sexos de la ciudad de Bogotá, Colombia. A dichos voluntarios se les aplicó una solución de extracto de caléndula y aceite mineral a concentraciones de disolución del 2% y 6%, con el fin de determinar su dosis efectiva mayor al ED50 y un tiempo de repelencia igual o superior a las 2 horas. El repelente fue puesto a prueba en una población de entre 50 a 150 hembras de *Aedes aegypti*, criadas en condiciones controladas, según lineamientos de la «Guía para pruebas de eficacia de repelentes en piel humana» de la OMS. Los resultados obtenidos mostraron que ambas disoluciones son efectivas como repelente de mosquitos. Sin embargo, los resultados obtenidos de los ensayos con concentración del 6% fueron mejores en cuanto a determinación de dosis efectiva y tiempo de repelencia respecta. Con lo anteriormente expuesto, se puede afirmar que la caléndula puede ser utilizada como repelente alternativo de mosquitos, además de ser amigable con el ambiente debido a sus características orgánicas.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, repelente, Caléndula, *Calendula Officinalis*, mosquitos.

1. Introducción

Los mosquitos son insectos depredadores y consumidores de sangre, existiendo más de 3200 especies descritas principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (CDC, 2020). Los 3 géneros de mayor relevancia y trascendencia en temas de salud pública son *Culex*, *Anopheles* y *Aedes*, géneros presentes en el territorio nacional.

El mosquito *Aedes aegypti* es uno de los principales vectores de enfermedades en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, siendo el portador de enfermedades como: el dengue, la fiebre amarilla, la fiebre del zika, el chikungunya, etc, causando más de 390 millones de infecciones anualmente, según cifras de la organización World Mosquito Program. Siendo el dengue la enfermedad más propagada por mucho, «Las epidemias de dengue más significativas en los últimos años han ocurrido en el sudeste asiático, las Américas y el Pacífico occidental. Aproximadamente 141 países están afectados» (Monash University & World Mosquito Program, 2019)

Diferentes factores climáticos y ambientales como el calentamiento global, la deforestación para ganadería de extensión, fenómenos como “El niño”, además de un consumo indiscriminado de recursos, han sido los principales culpables de la creciente propagación y proliferación de mosquitos *Aedes aegypti* en las diferentes zonas tropicales del mundo. Así mismo, el constante movimiento demográfico también juega un papel importante en su expansión. (Instituto Nacional de Salud, 2014)

Existen diversos métodos de control para evitar la propagación y proliferación del mosquito *Aedes aegypti*, así como tratamientos efectivos a las enfermedades que este transmite. Sin embargo, no todos reciben acceso a estos controles o tratamientos eficaces contra el mismo, ya sea por factores económicos, sociales, culturales o ambientales de una población. (OPS, 2011)

Una de las estrategias utilizadas para el control de las enfermedades consiste en ejercer un control sobre posibles picaduras de mosquito potencialmente transmisores de infecciones como el dengue, chikungunya, y zika en poblaciones vulnerables, utilizando sustancias repelentes, bien sea producidas de manera sintética o mediante el uso de extractos naturales obtenidos de plantas aromáticas. (OPS, 2011)

Para la presente investigación se toman como base los resultados de un par de estudios realizados en Irán e India, ‘Repellency Effects of Essential Oils of Myrtle (*Myrtus communis*), Marigold (*Calendula officinalis*) Compared with DEET against *Anopheles stephensi* on Human Volunteers’ (Tavassoli et al, 2011) y ‘Development of Mosquito Repellent Formulations and Evaluation for its Activity’ (Shubhangi S et al, 2014) respectivamente, donde se ponen a prueba los efectos repelentes de la planta de caléndula (*Calendula officinalis*) como alternativa natural, segura con el humano y de bajo costo para prevenir las picaduras de mosquitos.

Este estudio tiene como objetivo medir a qué concentración el extracto de caléndula tiene efecto repelente sobre mosquitos de la especie *A. aegypti* y determinar cuánto tiempo de

repelencia ofrece al usuario. Además de realizar comparaciones con otros autores de su eficiencia como repelente de mosquitos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto repelente del extracto de Caléndula (*Calendula officinalis*) sobre los mosquitos adultos *Aedes aegypti*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar una dosis efectiva del extracto de *Calendula officinalis* como repelente de mosquitos adultos.
- Definir el tiempo de repelencia que ofrece el extracto de *Calendula officinalis* sobre mosquitos *Aedes aegypti*.
- Establecer el extracto de caléndula como posible biorepelente de mosquitos.

3. Marco teórico

3.1. Mosquito *Aedes aegypti*

El *Aedes aegypti* es un mosquito de origen africano descrito por primera vez en 1762 por Carl Linnaeus. Es conocido como el vector portador de enfermedades zoonóticas como la fiebre amarilla, el dengue, el zika, entre otros, en regiones tropicales y subtropicales del planeta. Más específicamente entre los paralelos 45°N y 35°S. «Su expansión a diferentes lugares se debió a las migraciones humanas en masa, pues los huevos de mosquitos se transportaban en los depósitos de agua. Primero llegaron al Nuevo Mundo con el comercio de esclavos entre los siglos XV y XIX, y luego a Asia como resultado del comercio durante los siglos XVIII y XIX. La redistribución mundial de este mosquito se produjo luego de la Segunda Guerra Mundial con el movimiento de tropas.» (World Mosquito Program, 2019). Así mismo es llamado “mosquito doméstico” debido a su estrecha relación con las viviendas humanas y los grandes asentamientos urbanos y rurales por las precarias condiciones de saneamiento básico que estas puedan tener, «el rápido crecimiento de la población humana y el aumento de la urbanización han dado paso a la creación de viviendas deficientes, sistemas inadecuados de suministros de agua y gestión de desechos y, en consecuencia, a una abundancia de espacios propicios para los criaderos de mosquitos.»(World Mosquito Program, 2019).

«Es un insecto pequeño de color oscuro (castaño oscuro o negro) con rayas blancoplateadas en el dorso y patas. Este patrón de coloración es igual tanto para el macho como para la hembra. El tórax presenta un diseño en forma de lira y las patas son anilladas. Mide aproximadamente 5 mm» (Rossi y Almirón, 2004). Este mosquito presenta un dimorfismo sexual entre hembras y machos de la especie en sus antenas y palpos, presentando vellosidades en las antenas y unos palpos tan largos como su estilete picador o pico, mientras que las hembras poseen antenas sin vellosidades y palpos más pequeños.

Este mosquito comprende su ciclo de vida en 2 ambientes, acuático, donde se desarrollan las etapas inmaduras (huevo, larva y pupa) y terrestre, cuando el mosquito llega a su fase adulta y reproductiva. Una vez dicho esto, llegado el estadio de mosquito adulto, este puede tener

la capacidad de reproducirse antes de cumplir las 24 horas de haber emergido de la pupa, «Antes de 24 horas ambos sexos están listos para el apareamiento, alrededor del 58% de las hembras nulíparas son inseminadas antes de su primera alimentación sanguínea, un 17% durante y el 25% es inseminada entre la segunda alimentación y la primera oviposición; los machos rondan como voladores solitarios aunque es más común que lo hagan en grupos pequeños» (Bates, 1970; Kettle, 1993).

La alimentación de estos mosquitos, para ambos sexos, es el néctar floral (fitófagos). Sin embargo, debido a la alta demanda de proteínas que requiere la hembra del *Aedes aegypti* para de los huevos, esta tiene también una dieta basada en sangre de mamíferos, preferiblemente, sangre del ser humano (hematófaga).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Familia	Culicidae
Género	Aedes
Especie	aegypti

Tabla 1. Clasificación taxonómica *A.aegypti*. Fuente: Universidad Autónoma de San Luis Potosí



Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti*.

Fuente: OSFATLYF

3.2. Ciclo de vida del *Aedes aegypti*

Los mosquitos tienen un ciclo de vida definido en 4 estadios (huevos - larvas - pupas - mosquito adulto). Este ciclo de vida se desarrolla en 2 ambientes, acuático y terrestre. En el ambiente acuático se suceden las fases de huevo, larva y pupa, los llamados “estadios inmaduros”; mientras que en el terrestre se encuentra el mosquito adulto.

«El ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*, bajo condiciones óptimas de temperatura, luminosidad, alimentación, entre otros, puede completarse en 10 días.» (CDC, 2014)

3.2.1. Huevos

Son el primer estado del ciclo de vida. «Miden aproximadamente un milímetro de longitud, son depositados uno a uno al ras del agua quedando adheridos a las paredes del recipiente.» (Icaza, 2010). La hembra realiza la ovipositora posterior de una alimentación sanguínea en una gran gama de posibles criaderos, siendo en su mayoría, recipientes artificiales cerca o dentro de las viviendas humanas. «Las hembras evitan poner los huevos en piletas o colecciones de agua en el suelo, donde los bordes son de barro o tierra; prefieren oviponer en lugares resguardados, especialmente donde los huevos pueden adherirse a alguna pared.» (Rossi y Almirón, 2004).

Poseen una coloración blanca al momento de la ovipositora; sin embargo, pasado un tiempo en contacto con el aire adquieren el color negro. Son resistentes a las condiciones más adversas por prolongados periodos de tiempo. «Pueden sobrevivir sin estar dentro del agua por un período de hasta 8 meses. Los huevos de mosquito pueden incluso sobrevivir un invierno en la zona sur de Estados Unidos.» (CDC, 2014)

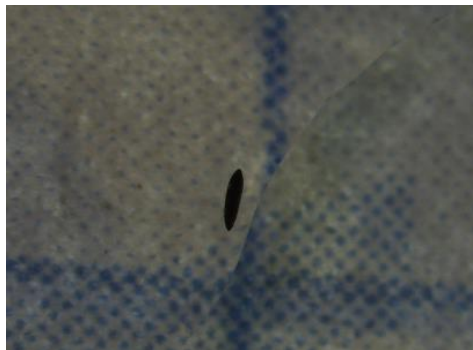


Figura 2 Huevo de *A. aegypti* Fuente: Autores

3.2.2. Larvas

Segunda fase del ciclo de vida del *Aedes aegypti*. Es el periodo de crecimiento y desarrollo, por lo que se dedican a buscar y consumir alimento todo el día. «Las larvas se alimentan prácticamente durante todo el día de cualquier materia orgánica acumulada en las paredes y en el fondo del recipiente, utilizan sus sedas bucales que tienen forma de abanico» (Nelson, 1986). Morfológicamente hablando, «las larvas de *Aedes aegypti* son semejantes a larvas de otras especies debido a la presencia de una cabeza, un tórax ovoide y un abdomen dividido

en 9 segmentos; adicionalmente, en el segmento posterior y anal de la larva, posee 4 branquias cuya función es la regulación osmótica y un sifón para respirar en la superficie del agua.» (Nelson, 1986)

«La duración del desarrollo larval está en función de la temperatura, la disponibilidad de alimento y la densidad de larvas en el criadero. En condiciones óptimas, el período larval desde la eclosión hasta la pupación puede ser de cinco días, pero por lo regular ocurre de siete a catorce días.» (Nelson, 1986). En esto, pasa por 4 estadios larvales, siendo los primeros 3 los que se desarrollan con mayor rapidez, el cuarto estadio suele ser más tardado debido a la necesidad de aumentar significativamente su peso y tamaño. Por último, las larvas presentan fotosensibilidad a los diversos estímulos de luz, prefiriendo los lugares sombreados.



Figura 3 Larva estadio 3.

Fuente: Autores

3.2.3. Pupas

Tercera fase del ciclo de vida del mosquito *Aedes aegypti*. A diferencia de su etapa anterior, este no tiene la necesidad de alimentarse, puesto que su función biológica es hacer de intermediario metamórfico entre la larva y el mosquito adulto. En cuanto a su morfología, en la base del tórax presenta tubos respiratorios que atraviesan la superficie del agua y le permiten respirar, en la base del abdomen posee un par de “paletas natatorias” que le permiten desplazarse.

Al igual que su etapa anterior, es fotosensible a los cambios de luz que se presenten. A pesar de tener paletas natatorias para desplazarse, se mantienen inmóviles una buena parte del tiempo. «En condiciones favorables, la duración de este estado es de alrededor de dos días.» (Rossi y Almirón, 2004).

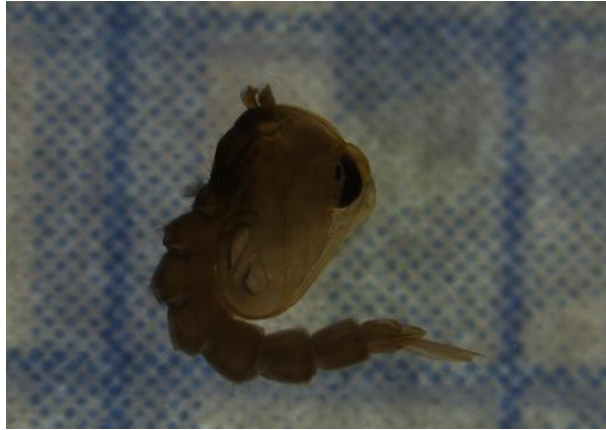


Figura 4 Pupa de *A. aegypti*.

Fuente: Autores

3.2.4. Mosquito adulto

Cuarto y último estadio del ciclo de vida. Una vez emergen de la pupa procuran lugares húmedos o cercanos al agua y sin corrientes de aire los primeros minutos para el endurecimiento de su exoesqueleto y sus alas. «La función más importante del adulto de *A. aegypti* es la reproducción. En la mayoría de los insectos voladores, inclusive otras especies de mosquitos, el adulto también hace la labor de dispersión de la especie.» (Nelson, 1986). Pasadas las 24 horas de haber emergido de la exuvia de pupa, están listos para aparearse, «Antes de 24 horas ambos sexos están listos para el apareamiento, alrededor del 58% de las hembras nulíparas son inseminadas antes de su primera alimentación sanguínea, un 17% durante y el 25% es inseminada entre la segunda alimentación y la primera oviposición; los machos rondan como voladores solitarios, aunque es más común que lo hagan en grupos pequeños» (Bates, 1970; Kettle, 1993).

De su morfología tenemos que son insectos de color oscuro (castaño oscuro o negro), su principal característica son las rayas plateadas o blancas que presenta en el torso y en sus patas. Posee palpos cortos, tiene el abdomen agudo, no presenta cerdas espiraculares. Tiene diferenciación macho-hembra en la longitud de sus palpos, siendo el de los machos considerablemente más largo que el de las hembras, llegando a ser tan grande como su estilete picador; así como en las antenas presentando vellosidades y asemejándose a un cepillo.

En cuanto a su alimentación, ambos sexos tienen una dieta basada en néctar floral. Sin embargo, las hembras presentan la característica hematofágica, debido a la necesidad de proteínas al momento de realizar las oviposiciones, «las hembras escogen horas del día de baja luminosidad para ovipositar, o bien lo hacen por la noche.» (Rossi y Almirón, 2004).



Figura 5 Mosquito hembra adulto. Fuente: Periodico 'La Vanguardia'

3.3. Enfermedades transmitidas

Las enfermedades transmitidas por este mosquito crean agentes patógenos transmitidos por el mosquito, que se alimentan de sangre humana. Al ingerir la sangre de un humano portador de alguno de estos virus, el mosquito puede adquirir el agente y en una segunda ingesta de sangre puede pasarlo a un humano sano. (*World Mosquito Program En Colombia, s. f.*), las enfermedades que transmiten van desde el Dengue la cual llegó a las ciudades portuarias a mediados del siglo XV y XIX, este salió de África gracias al crecimiento del transporte marítimo, esto ocasionó que las zonas portuarias dieran un entorno de crecimiento ideal para estos mosquitos, lo cual ocasionó que la infección de esta enfermedad creciera en países de África, Asia, islas del pacífico y las Américas, (*Pinheiro, 1989*) uno de los primeros casos registrados fue en el Caribe, 1872 el cual fue la primera epidemia de dengue en la zona, esta infección se presentó como la forma clásica del dengue, con fiebre indiferenciada o presentando una infección asintomática, después de esto los casos siguieron aumentando en América del sur, un ejemplo de este fue en Colombia, ya que se estima que 1.5 millones de personas fueron afectadas por el serotipo del dengue 2-3 en 1970, y no solo en Colombia sino que también en Venezuela y la Guayana Francesa, (*Pinheiro, 1989*) entre 1977 - 1980 los casos fueron aumentando, haciendo que el serotipo de dengue 1, fuera el único en esta región, después de esto los casos fueron disminuyendo, pero en 1980 la enfermedad tuvo una explosión de contagio, un ejemplo de esto fue el brote que se dio en Cuba en 1981, el cual fue realmente grave. Para 1970 únicamente 9 países tenían registro de haber sufrido epidemias del dengue, pero con el tiempo más de 100 países tienen registro de esto, y en las últimas décadas, aumentó enormemente la incidencia de dengue en el mundo. Según estimaciones recientes de la OMS, se producen 390 millones de infecciones cada año, de los cuales 96 millones se manifiestan clínicamente, cualquiera sea la gravedad de la enfermedad. Alrededor de la mitad de la población del mundo corre riesgo de contraer esta enfermedad, que se presenta en los climas tropicales y subtropicales de todo el planeta, sobre todo en las zonas urbanas y semiurbanas» (Cámara Argentina de Especialidades Medicinales INSTITUCIONAL, 2021) el Dengue se presenta como infección la cual causa síntomas gripales, y en ocasiones evoluciona hasta convertirse en un cuadro potencialmente mortal,

llamado dengue grave o dengue hemorrágico. (Rigau-Pérez *et al.*, 2007) el cuadro clínico del dengue puede variar según el paciente y este puede tener diferentes síntomas, desde tener una fiebre de más de 38° grados hasta ser asintomáticos; seguido de este tenemos “La fiebre del Zika es una enfermedad viral transmitida por mosquitos del género *Aedes* causada por el virus Zika (ZIKV), y que consiste en fiebre leve, sarpullido (principalmente maculo-papular), dolor de cabeza, dolor en las articulaciones, dolor muscular, malestar general y conjuntivitis no purulenta que ocurre entre 2 a 7 días después de la picadura del mosquito vector.” (Organización Panamericana de la Salud, 2017). El primer registro de esta enfermedad se dio en 1947 en la India, este se descubrió mientras se hacía una investigación de la enfermedad de la fiebre amarilla, 6 años después en 1952 se presentaron los primeros casos de infección en humanos, este se presentó en Uganda y Tanzania, dos años después de estos casos se encontró también en una mujer de Nigeria del este, hacia 1969 el virus se empezó a propagar por el continente asiático (Tomislav Meštrović, 2021), para el 2015 el virus llegó a Suramérica desde Brasil, de aquí varias personas presentaron un brote en su cuerpo, se les hizo estudios para descartar otras enfermedades posibles, dando negativo a estas, para finales del 2015 la OMS afirmó una alarma epidemiológica hacia el Zika, también se registró aumento de microcefalia en recién nacidos, esta enfermedad se puede transmitir de diversas formas ya sea por una picadura de un mosquito, mediante relaciones sexuales, y de mujeres embarazadas hacia el feto (Tomislav Meštrović, 2021). Existen diversas formas de prevenir esta enfermedad, desde evitar la picadura de algún mosquito infectado mediante la utilización de repelentes, eliminación de criaderos, o utilizar protección al momento de tener relaciones sexuales; Centroamérica posee las condiciones climáticas, geográficas y ambientales, propicias para el desarrollo de los vectores, esto sin contar en las condiciones sanitarias en las que se ha desarrollado la enfermedad, la insalubridad en las viviendas ayuda en la propagación de esta enfermedad así como de muchas otras (Núñez *et al.*, 2016), otra enfermedad similar a esta es La fiebre del Chikungunya, este virus pertenece al género *Alfavirus* de la familia *Togaviridae*. Este virus parece ser originario de África Central/Este, fue descubierto en 1950, gracias a que varias personas se infectaron, esta enfermedad la asociaron con el dengue, ya que es transmitida principalmente por el mosquito *Aedes aegypti*. Hay dos formas de infección de esta enfermedad, una de ellas es la transmisión silvestre que se asocia a la transmisión asociada con bosque o sabanas y la otra es la transmisión urbana humano-mosquito-humano (Acosta-Reyes *et al.*, 2015), esta enfermedad actualmente se tiene identificada en Asia, África, Europa y en el 2013 se registró en el continente Americano, este se dio por primera vez en la isla Saint Martin, con dos personas que venían desde Asia, de ahí varios países sudamericanos empezaron a reportar casos, en Colombia se registraron casos en 2014 en los municipios de Mahates y San Juan Nepomuceno (Bolívar), (Barrera, 2011) lamentablemente las características geográficas de Colombia permitieron que este virus creciera. Las características de esta enfermedad van desde fiebre repentina, a menudo acompañada de dolor en las articulaciones. Otros síntomas incluyen dolor muscular, dolor de cabeza, náuseas, fatiga y erupción cutánea, el síntoma más significativo es el dolor severo de las articulaciones, este puede durar pocos días, pero también se puede presentar dolor durante meses o años, los síntomas pueden aparecer entre los 4 u 8 días después de una picadura, el único tratamiento para tratar esta enfermedad es guardar reposo y tomar analgésicos para el

dolor (OPS,2014); la última enfermedad que transmite este mosquito es la Fiebre Amarilla, esta es endémica de África y su propagación empezó en el siglo 15 con el tráfico de esclavos africanos, cuando este llegó a Sudamérica fue cuando empezó el verdadero problema, ya que cuando los europeos e indígenas americanos se empezaron a infectar estos empezaron a morir, desde ese momento empezaron a surgir las epidemias y pandemias en esta zona (Tuellsa & Massóc, 2019) la transmisión empezó por medio de mosquitos infectados, estos al picar a un huésped ingresan el virus por el torrente sanguíneo (Mayo Clinic, 2020)«Los síntomas aparecen entre 3 y 6 días después de la picadura de un mosquito infectado. En una fase inicial causa fiebre, dolor muscular y de cabeza, escalofríos, pérdida del apetito y náuseas o vómitos. Para la mayoría de los pacientes estos síntomas desaparecen después de 3 a 4 días. Sin embargo, el 15% entra en una segunda fase, más tóxica dentro de las 24 horas siguientes a la remisión inicial. En esta fase, vuelve la fiebre alta y varios sistemas del cuerpo son afectados. La función renal se deteriora. La mitad de los pacientes que pasan a la fase tóxica mueren a los 10 -14 días, el resto se recupera sin daño orgánico significativo.»(OPS s. f.).

3.4.Distribución geográfica del vector *Aedes aegypti*

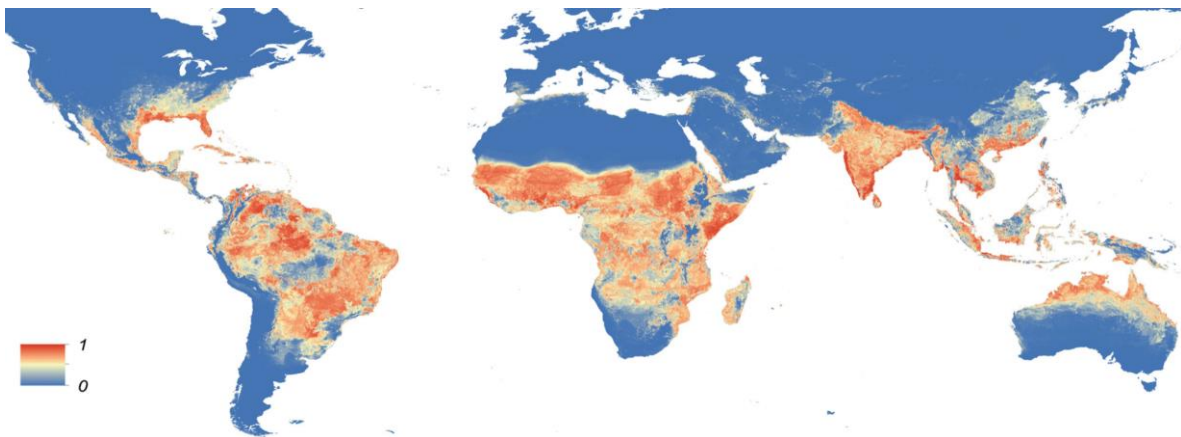


Figura 6 Distribución mundial de *Aedes aegypti*. El mapa muestra la probabilidad de ocurrencia. Fuente: Kreamer et al (2015)

«Originario de África y hoy hallado en regiones tropicales y subtropicales a través del mundo. En América, se presenta desde los estados del sur de EE. UU. hasta el centro de la Argentina y el Uruguay. Comparte hábitat con *Aedes albopictus*, que lo está desplazando en algunas zonas».(Mousson, 2005), esta especie se caracteriza por su preferencia por climas cálidos (de 15 a 40 °C) y con niveles de precipitación pluvial moderados y altos, donde se generan condiciones ambientales favorables para su reproducción (Mora-Covarrubias et al., 2010).«Debido al calentamiento global y a múltiples factores socioeconómicos, regionales y locales, los patrones de distribución de *A. aegypti* han cambiado, con nuevos registros altitudinales y una extensa distribución en todos los continentes », (Suárez, 1981) «en Colombia, se pensaba que la especie no habitaba por encima de los 1.585 msnm antes del trabajo de Suárez y Nelson en 1981 ; sin embargo, estos autores lo registraron en 22 municipios por encima de los 1.600 msnm y a 2.200 msnm en Málaga (Santander), siendo

este último el registro altitudinal más alto para Suramérica hasta ahora ».(Ruiz-López, 2016)

3.5. Medidas de control del vector

3.5.1. Control físico

Las más efectivas, según la Organización Panamericana de la Salud, 2017; así como de aplicación más sencilla. Consiste en distintas estrategias como: la eliminación de los posibles criaderos del mosquito *Aedes aegypti* (debido a su cercanía con el ser humano), el lavado y cepillado constante de paredes cuyos exteriores estén en contacto con jardines, el uso de tela mosquitera en ventanas y puertas, aplicación de repelentes en piel expuesta y ropa en un determinado periodo de tiempo, así como el uso de espirales o tabletas repelentes. Así mismo, la aplicación del saneamiento básico en exteriores y zonas de alto riesgo gestionando los residuos sólidos.

3.5.2. Control químico

Consistente en la aplicación de plaguicidas en las formas inmaduras del mosquito *Aedes* (huevos, larvas y pupas), así como en la forma adulta, con el fin de reducir la densidad de este en una determinada zona. «Esta medida solo está indicada en el control oportuno de una epidemia de dengue detectada precozmente o ante la presencia de una epidemia en curso.» (Organización Panamericana de la Salud, 2011).

Sin embargo, debido al riesgo elevado de contaminación es la menos recomendable, además de ser posible un riesgo en la salud para los seres humanos. Adicionalmente, el uso indiscriminado de estos ha provocado una resistencia por parte del mosquito. «La resistencia del *A. aegypti* a los insecticidas ha tendido en la última década a intensificarse y expandirse geográficamente. A medida que el dengue ha resurgido a escala mundial, el aumento de las intervenciones químicas en respuesta a los brotes grandes y recurrentes, junto con la dependencia a largo plazo de los piretroides para el control urbano de vectores, han sido factores clave del aumento rápido y generalizado de la resistencia a los insecticidas» (Ranson et al., 2010)

3.5.3. Control biológico

Este tipo de control se basa en «la introducción de organismos que son predadores, parásitos o competidores de la especie de interés, o que de algún modo reducen su población (p. ej. Copépodos, *Bacillus thuringiensis var. israelensis*, *wolbachia*).» (Unicef, 2016). «Solo se puede utilizar contra las formas inmaduras del vector, y su principal ventaja es que evita la contaminación química del ambiente. Tienen la desventaja, que algunas especies depredadoras de larvas no son nativas de las localidades donde se utilizan, y pueden generar una competencia y desplazamiento de especies autóctonas» (Organización Panamericana de la Salud, 2011)

3.6. Caléndula (*Calendula officinalis*)

La caléndula es una especie descrita por el botánico sueco Carl Von Linné, la cual responde al binomio *Calendula officinalis* (García et al., 1996), es una hierba perteneciente a la familia

Asteraceae, en la cual, una de sus características son sus flores, esta planta se ha cultivado desde la antigüedad por sus numerosas propiedades curativas, no se tiene muy claro su origen, según las investigaciones esta es originaria de Egipto, pero fue cultivada en Europa meridional, y con el tiempo se fue expandiendo a gran parte del planeta, (*de la Luz, 1999*) “Es una especie rústica, por lo que es poco exigente al tipo de suelo, crece bien en los de mediana fertilidad, pero se conoce que se dedican a este cultivo tierras ricas en materia orgánica. “(*de la Luz, 1999*), esta planta proporciona muchas características terapéuticas, desde propiedades antiinflamatorias hasta estimular la actividad hepática; hay diferentes tipos de especies de la caléndula, una de ellas es la *Calendula officinalis* esta es la más conocida, esta se distingue por la dimensión de sus flores y el largo de su tallo (Davoli, s. f.), La caléndula es una mata anual, erecta y aromática que se extiende de 50 a 70 cm. El nombre genérico caléndula deriva del latín calendulae que significa "a lo largo de los meses", con lo que se quiso subrayar el largo período de floración que tiene la planta, y el nombre específico *officinalis*, expresa su carácter medicinal.

Según Lastra y Piquet, 1999; los principios activos más importantes que se encuentran en el extracto de caléndula son:

- Alfa-cadinol (18,3%)
- Beta-eudesmol (14,5%)
- Tau-muurolol (13,0%)
- Flavonoides: 0,3% - 0,8%
- Aceite esencial: 0,12% - 0,4%, entre las cuales destacan la carvona, oxido-transcariofileno, cariofileno, etc.
- Saponósidos: 2% - 5% entre las cuales destacan la hexona, ácido urónico.
- Ácidos fenólicos: coumárico, gestísico, etc.
- Carvacrol y timol 0,18% - 0,28%

«Crece abundantemente en numerosos terrenos baldíos y jardines en forma de hierba mala (maleza)» (Heinerman, 1998)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Calendula
Especie	<i>C. officinalis</i>

Tabla 2 Clasificación taxonómica de la caléndula. Fuente: Catalogue of Life

3.7.Extracto de *Calendula officinalis*

«El extracto de Caléndula es utilizado usualmente para fines cosméticos, ya que por su naturalidad proporcionan propiedades calmantes y reparadoras, esta también tiene efectos de repelencia hacia los insectos, el extracto de caléndula varía según la parte de la planta de la cual se vaya a extraer los aceites, porque tienen diferentes composiciones y puede variar el uso que se le dé.» (Tavassoli M et al, 2011).

3.8.Extracción soxhlet

«El Soxhlet es un aparato de laboratorio diseñado para extraer sustancias de baja solubilidad en el disolvente de extracción. En el extractor Soxhlet, la muestra se empapa de un disolvente caliente que se extrae periódicamente, se destila y se devuelve a la muestra. Durante cada ciclo, una porción del compuesto no volátil se disuelve en el disolvente. Después de muchos ciclos, el compuesto deseado se concentra en el matraz de destilación. El disolvente del matraz se evapora y se mide la masa del lípido restante.» (Tecnilab, 2022), este método es utilizado en varias industrias, tales como: la farmacéutica, alimenticia, entre otras; ya que, ayuda a determinar el contenido graso de varias muestras, también proporciona avances a los controles de calidad, proporciona un buen ahorro de tiempo, la calidad del producto en buena y los costos según lo que se desea utilizar reducen.

4. Materiales y método

Se diseñará una metodología de trabajo segmentada en distintos procesos, tales como: la obtención y crianza de las colonias de mosquitos, la obtención del extracto de caléndula y los bioensayos. Este diseño metodológico está basado en la «OPPTS 810.3700: Repelentes de insectos aplicados en la piel humana» de la EPA, la «Guía para pruebas de eficacia de repelentes de mosquitos en piel humana» de la OMS, y la «Guía para la cría y mantenimiento de colonias de *Aedes aegypti* (Dipteria:Culicidae) en condiciones de insectario.» de la CENAPRECE.

4.1.Obtención y cría de colonias de *Aedes aegypti*

4.1.1. Fase de huevos

Se comenzó la colonia de ejemplares *Aedes aegypti* a partir de huevos desecados, aproximadamente 2400 de ellos con el fin de garantizar una población de larvas significativa. Estas fueron colocadas en un recipiente plástico de 6 litros de capacidad con agua potable limpia y reposada con anterioridad con el fin de no generar posibles pérdidas de huevos. Se procedió a colocar el recipiente dentro de una cámara de cría, en la cual, estuvieron bajo condiciones de laboratorio óptimas, tales como:

- Temperatura: 27°C ($\pm 2^\circ\text{C}$)
- Humedad relativa: $\geq 80\%$ (± 10)
- Periodo de fotoluminiscencia: Proporción 12:12 (Horas de luz:Horas oscuridad)

Todo esto, con el fin de obtener larvas de mosquito en tiempos ideales, según «Guía para pruebas de eficiencia de repelentes de mosquitos en piel humana» de la OMS, 2009.

Adicionalmente, se les agregó alimento de peces (pescadina) por si existía la posibilidad de eclosión temprana de larvas.

4.1.2. Fase larvaria

Pasado un periodo de 2 a 4 días desde la postura en agua de los huevos desecados, estos empezaron a eclosionar hasta formar una población representativa. Les fue suministrado alimento en cantidad proporcionada a la densidad poblacional de las larvas del primer día. Ya que, «Un exceso de alimento puede ocasionar mortalidad debido a la formación de una película grasosa formada sobre la superficie que impide la respiración de la larva. A su vez, una escasez de alimentación ocasiona una desnutrición en las larvas y por lo tanto se lleva más tiempo para el desarrollo hasta adultos, los cuales, además, serán de menor calidad» (CENTRO NACIONAL DE PROGRAMAS PREVENTIVOS Y CONTROL DE ENFERMEDADES, 2015)

Una vez alimentados, se procedió a transferir un aproximado de 250 larvas desde el recipiente original a otros 2 de menor tamaño y volumen mediante una Pipeta Pasteur (gotero) de 3 ml; colocando 125 larvas en cada nuevo recipiente con el propósito de evitar hacinamiento en la población.

Terminado el proceso anterior, fueron observados y registrados periódicamente el crecimiento de las larvas, además de alimentarlas lo suficiente cada 2 días aproximadamente para llegar a la siguiente fase, la fase pupal.

4.1.3. Fase pupal

En la fase pupal, se realizó un conteo periódico de las pupas en ambos recipientes cada 2 o 3 días. Además de eso, se le dio alimento a las larvas restantes en diferentes estadios que aún no pasaban a formar la pupa.

4.1.4. Fase adulta

Entrada la fase adulta de la población de mosquitos, se hizo un conteo de los especímenes durante 2 semanas. Fue determinado el sexo de los individuos, así como su proporción machos-hembras dentro de la colonia. Determinados los sexos de los individuos, con ayuda de un aspirador bucal con tubo de vidrio transparente y manguera de latex se realizó la separación de machos y hembras en diferentes jaulas entomológicas, debido al instinto hematófago de las hembras. Los machos se descartan y se trabaja solo con hembras.

Luego, se coloca un recipiente con una torunda de algodón humedecido con solución azucarada al 10% como fuente nutricional energética, esto con el fin de que sirva como sustituto del néctar. De esta forma fueron alimentados hasta el momento de realizar los bioensayos.

4.2. Obtención del extracto

4.2.1. Maceración en calor, método Soxhlet

Comenzando con la fase de obtención del extracto de Caléndula, este fue realizado mediante el método Soxhlet, un método de extracción sólido-líquido planteado en 1879 por el alemán Franz Ritter Von Soxhlet.

4.2.2. Preparación de material

En primera instancia, se procede a moler la caléndula entera (Tallo, hojas y flores) seca que fue adquirida en un vivero del Barrio San Carlos, localidad de Tunjuelito, Bogotá D.C. con un molino manual convencional marca Corona. Posteriormente, fue pesado en una balanza analítica hasta llegar a una libra de material.



Figura 7 Caléndula molida y molino convencional. Fuente: Autores

4.2.3. Elaboración de cartuchos Soxhlet

Molida la caléndula seca, continuamos con la elaboración de los cartuchos Soxhlet; para esto, con una cuchara colocamos un aproximado de 40 g de caléndula en un papel filtro. Luego tomamos uno de los costados del papel y lo superpusimos sobre el otro, una vez hecho esto, plegamos el extremo superior e inferior sobre sí mismos un total de 3 o 4 veces. Por último, colocamos grapas en los dobleces realizados anteriormente en los extremos con el fin de asegurar que el material no se salga del cartucho.



Figura 8 Cartuchos Soxhlet

Fuente: Autores

4.2.4. Extracción de las propiedades de la caléndula

Elaborados los cartuchos de papel filtro, fueron colocados uno por uno en dos extractores SOXHLET para iniciar y acelerar el procedimiento. Así mismo, se introdujo etanol al 96% en el balón de ambos extractores para actuar como disolvente. Luego, se calentaron los balones con el disolvente con la asistencia de una placa calefactora puesta a una temperatura de ± 400 °C por un aproximado de 50 minutos a 1 hora con 15 minutos para finalizar todo el proceso de extracción para un cartucho al cual se le realizaron entre 5 y 6 sifonajes.

Al finalizar el proceso, se obtuvo un aproximado de 2,5 litros de solución etanol+extracto de caléndula.

4.2.5. Destilación de la solución obtenida

Ejecutada la extracción de las propiedades de la caléndula en una solución, esta fue llevada al proceso de destilación a presión reducida con un rotavapor (IKA RV 10), con el fin de obtener un extracto puro. Para ello, se introdujo la solución obtenida en un balón aforado de fondo redondo a 100 rpm, utilizando un baño maría a 50°C y una presión de 150 milibares, con el fin de que el etanol llegue al punto de ebullición a una temperatura inferior a la habitual, acelerando el proceso. Una vez el etanol fue separado del extracto por destilación se retira el balón con el extracto puro de caléndula, el cual es colocado en un recipiente de vidrio de color ámbar obteniendo un aproximado de entre 40 a 55 ml de extracto de caléndula puro que se conservó hasta la realización de los bioensayos a temperatura de refrigeración entre 4 y 8°C.

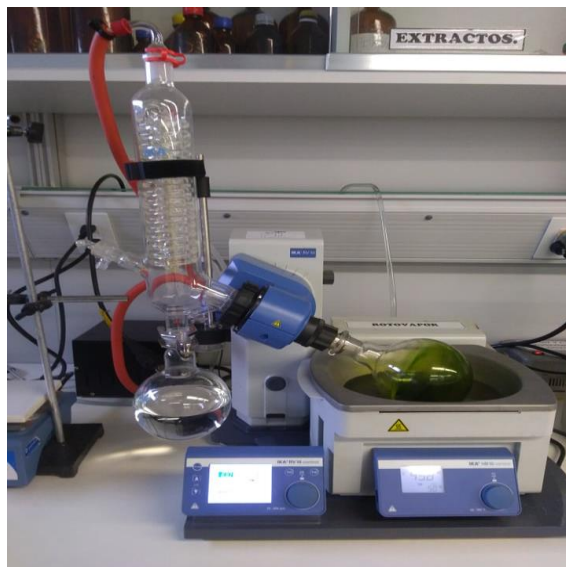


Figura 9 Rotovapor IKA RV10 Fuente: Autores

4.3. Bioensayos

Una vez terminada la crianza de los especímenes de mosquito, así como la obtención del extracto de *Calendula officinalis*, se dio inicio a los bioensayos correspondientes para la comprobación del efecto repelente.

4.3.1. Selección de voluntarios

Con respecto a la selección de voluntarios, fueron 10 los individuos que se escogieron como sujetos de prueba en los bioensayos, repartidos equitativamente por géneros (5 mujeres y 5 hombres) en condiciones óptimas de salud (que no posean enfermedades dermatológicas o sanguíneas, o posibles fumadores recurrentes).

4.3.2. Firma de formato de consentimiento

Una vez seleccionados los voluntarios, se les hizo entrega de un formato de consentimiento en donde autorizan de manera voluntaria su participación en el proceso experimental de la investigación; así mismo, en el mismo se les expuso que el extracto de *Calendula officinalis* no generará algún tipo de afectación a su piel y que los especímenes hembra de *Aedes aegypti* no están infectados con ninguna enfermedad que pueda afectar su salud (dengue, chikungunya, fiebre amarilla, etc.), además de los posibles riesgos (como alergia a los componentes activos de la caléndula, posibles picaduras y extracción sanguínea por parte de los mosquitos, etc. (Ver ANEXO n°1)

4.3.3. Aplicación de pruebas de alergia en los sujetos de prueba

Con el fin de asegurar un buen procedimiento en los bioensayos, a cada uno de los sujetos de prueba se les colocó en parte del antebrazo un aproximado de 1 ml de extracto de caléndula al 100% de pureza y se dejó transcurrir un total de 15 minutos; esto con el fin de observar posibles reacciones alérgicas a los componentes de la caléndula.

Finalizado este periodo de 15 minutos, solo uno de los sujetos de prueba mostró reacciones leves al extracto, por lo cual, bajo voluntad propia, decidió seguir adelante con los experimentos.

4.3.4. Cálculo área de aplicación

Antes de iniciar con la aplicación del repelente en los voluntarios, fue necesario conocer con anterioridad el área donde se aplicó este para los bioensayos con hembras hematófagas de *Aedes aegypti*. Debido a las posibles diferencias de longitud y diámetro del antebrazo entre los voluntarios seleccionados, es necesario calcular el área de aplicación del repelente en cada individuo, el cual, se realizará con la siguiente fórmula:

$$\text{Área} = \frac{1}{2} * (CW + CE) * DWE (*)$$

Donde:

CW: circunferencia de la muñeca dada en centímetros

CE: circunferencia del codo a la altura de la fosa cubital o sangría dada en centímetros

DWE: distancia dada en centímetros entre las variables anteriores (CE, CW)

Una vez realizados estos cálculos, procedimos a aplicar el repelente a cada voluntario.

(*)Ver medidas tomadas y el cálculo del área de aplicación en el ANEXO n°2, 3 y 4

4.4. Preparación del repelente

El repelente a utilizar fue realizado a base de aceite mineral y el extracto de caléndula obtenido con anterioridad. Para esto, en un recipiente con atomizador de 70 ml de capacidad, se colocó 1,4 ml de extracto de caléndula y 68,6 ml de aceite mineral; esto con el fin de hacer una disolución al 2% como repelente.



Figura 10 Solución repelente a 6% de concentración Fuente: Autores

4.5. Determinación de dosis efectiva

Antes de efectuar la determinación de la dosis efectiva, se comprueba que los especímenes hembra de *Aedes aegypti* dispongan de instinto hematófago, además de constatar que el aceite mineral no repela por sí solo los mosquitos. Para esto, en el brazo opuesto al cual se le aplicó el repelente a los voluntarios, se les colocó aceite mineral; seguido a esto, cada voluntario introdujo dicho brazo en la jaula entomológica donde se encuentran los mosquitos de prueba unos 30 segundos aproximadamente. Este proceso sirvió como testigo cero o blanco.

Luego de realizado el procedimiento del testigo cero en un brazo de cada voluntario, se aplica el repelente a una misma concentración en cada uno de los voluntarios, se les pide colocar el antebrazo en la jaula entomológica durante 30 segundos protegiendo la mano con guante de nitrilo. Se contabilizan las posaduras o aterrizajes de mosquitos en el antebrazo en ese periodo de tiempo, si hay más de 10 posaduras o aterrizajes se suspende la prueba con ese voluntario, de lo contrario, se contabiliza el número de aterrizajes.

Si los resultados no son satisfactorios con la primera concentración evaluada se incrementa la dosis de manera progresiva hasta encontrar la concentración ideal que proporcione efecto repelente en el 100% de los voluntarios, a esta se le denomina dosis efectiva de repelencia (DER).

4.6. Determinación tiempos de repelencia (tiempos de protección)

Obtenida la dosis efectiva del extracto de caléndula como repelente de mosquitos sólo queda establecer el tiempo de repelencia que ofrece al usuario. Para ello, se tomó el tiempo en el cual la dosis efectiva del repelente actuaba sobre los mosquitos hasta llegar a una cantidad alta de posaduras o aterrizajes en todos los sujetos de prueba. Tras la aplicación del repelente de caléndula en el antebrazo y verificar que en un lapso de 30 segundos no haya posaduras o aterrizajes por el efecto repelente de la solución de caléndula, sin nuevas aplicaciones o retiro de la solución se hacen nuevas lecturas cada 30 minutos pidiendo al voluntario introducir el antebrazo dentro de la jaula con las hembras de *Aedes aegypti* sin hematofagia. Se determina el tiempo máximo de repelencia con cada uno de los voluntarios.

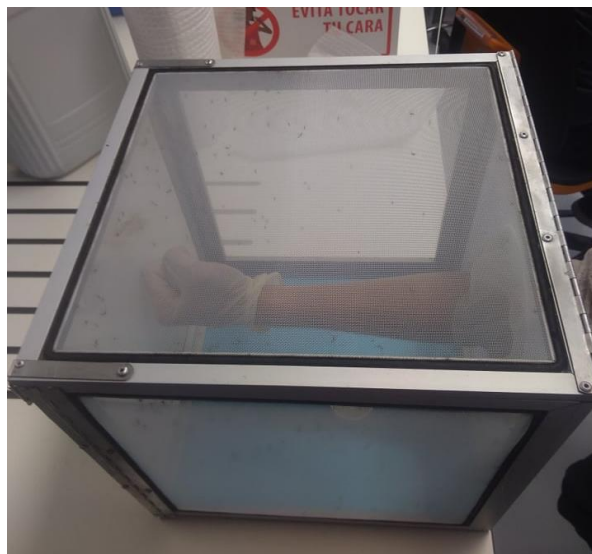


Figura 11 Bioensayos Fuente: Autores

Una vez obtenidos los datos de posaduras de mosquitos en los bioensayos, estos fueron promediados para facilitar la interpretación y manejo de los datos del estudio.

4.7. Formulación de hipótesis

Para este estudio fueron planteadas 2 hipótesis para la evaluación del efecto repelente del extracto de caléndula, una hipótesis nula y otra alterna, presentadas de la siguiente manera:

- **Hipótesis nula (H_0):** La solución de aceite mineral y extracto de *Calendula officinalis* no tendrá efecto repelente sobre las hembras del mosquito *Aedes aegypti* en ninguna concentración.
- **Hipótesis alterna (H_1):** La solución de aceite mineral y extracto de *Calendula officinalis* tendrá efecto repelente sobre las hembras del mosquito *Aedes aegypti*, ya sea en una o más concentraciones.

5. Resultados y análisis

Realizados los bioensayos, se tiene que la concentración inicial de 2% fue insuficiente para lograr las 2 horas de repelencia, pues pasados 60 minutos, el porcentaje de posaduras promedio superó el 80% recomendado por la «Guía para pruebas de eficacia de repelentes de mosquitos en piel humana» (OMS, 2009). Debido a esto, se decidió aumentar la cantidad de extracto de caléndula (*Calendula officinalis*) en la solución al 6%, teniendo como finalidad el probar si al incrementar la presencia del extracto de caléndula hay una mayor efectividad del repelente.

Los resultados obtenidos serán presentados en los siguientes subítems:

5.1. Efecto repelente a diferentes concentraciones de disolución del extracto.

En los bioensayos, fueron puestos a prueba concentraciones del 2% y 6% de la solución de extracto de caléndula.

En la tabla 3 se puede evidenciar los promedios de las posaduras o aterrizajes que hicieron los mosquitos en el antebrazo de los voluntarios una vez aplicada la solución en su respectiva concentración. Este promedio de posaduras se compara con el testigo 0 o blanco, al cual solo se aplicó aceite mineral en la piel del antebrazo opuesto al cual se le colocó el repelente.

Se puede evidenciar que en la repelencia ejercida sobre los mosquitos de la solución con 2% de concentración es efectiva, con un promedio de 0,4 posaduras sobre 5,6 del testigo 0, teniendo un 93,1% de repelencia. Sin embargo, al aumentar la concentración a un 6%, se visualiza un total de 0 posaduras en los voluntarios al momento de la aplicación, por lo cual se afirma que la repelencia es completa a los 0 minutos de los ensayos.

Porcentaje de protección		
% CONC	Blanco	0 minutos
2%	5,8	0,4
6%	5,8	0

Tabla 3. Promedio de posaduras de mosquito en el minuto 0. Fuente: Autores

5.2. Tiempos de repelencia

Como se pueden visualizar en la tabla 4, los resultados de las concentraciones utilizadas en los bioensayos (2% y 6%); a las cuales, se les hizo seguimiento del efecto repelente en intervalos de 30 minutos hasta evidenciar posaduras de 8 o más mosquitos en alguno de los voluntarios, según dicta la «Guía para pruebas de eficacia de repelentes en piel humana» de la OMS.

El tiempo de repelencia de la solución al 2% de concentración del extracto en los primeros 30 minutos, registra una repelencia cercana a 0, con valores de 0,4 y 0,5 a los 0 y 30 minutos respectivamente. Sin embargo, se puede denotar una gran caída en el efecto repelente a partir de los 60 minutos, con un promedio de posaduras de 3,2, aumentando así más de 6 veces las posaduras de los primeros 30 minutos. Mientras que, a los 90 minutos, sigue en tendencia ascendente, con un 5,2 de posaduras promedio, aumentando 1,6 veces más las posaduras en la piel de los voluntarios.

Por otra parte, el tiempo de repelencia de la solución al 6% de concentración presenta valores más lineales, presentando una repelencia total a los 0 minutos. En un periodo entre los 30 y 60 minutos, se evidencia un aumento lineal de los valores de posaduras, con un 0,7 posaduras a los 30 minutos y 1,4 posaduras llegados los 60 minutos. Esta linealidad llega a su fin pasados los 60 minutos, evidenciando un total de 2,6 y 2,8 posaduras, correspondientes a 90 minutos y 120 minutos respectivamente.

Cabe acotar que no se realizaron ensayos con concentración de 2% a los 120 minutos, debido a su nula capacidad repelente mostrada a los 90 minutos, con una repelencia de 10,34%.

Tiempos y promedio de posaduras							
% CONC	Blanco	0 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos	Promedio
2%	5,8	0,4	0,5	3,2	5,2	N/A	2,325
6%	5,8	0	0,7	1,4	2,6	2,8	1,5

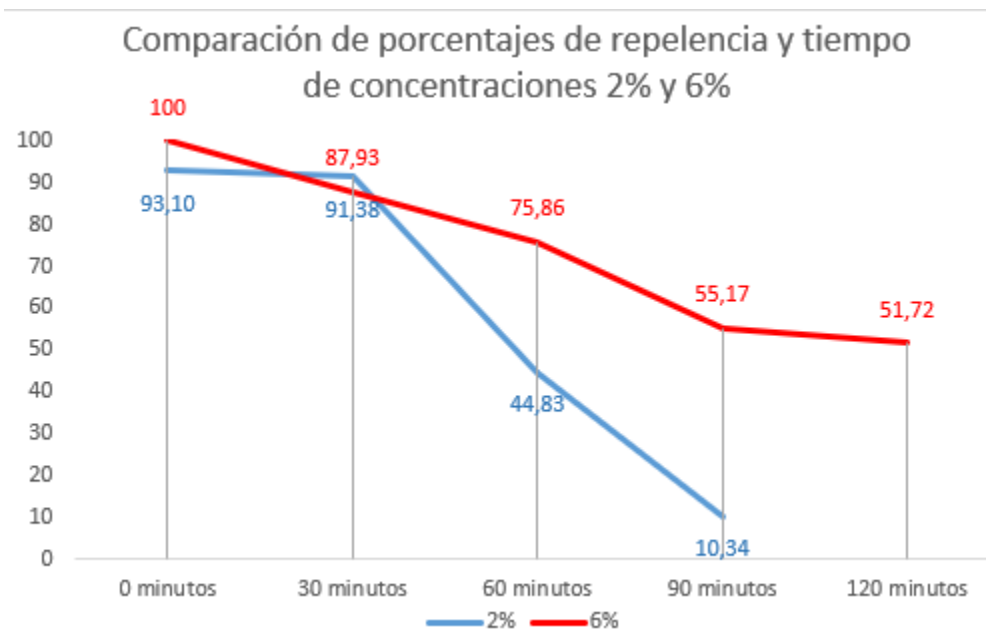
Tabla 4. Tiempos de repelencia a diversas concentraciones.

Fuente: Autores

5.3. Comparación tiempos de repelencia y porcentajes de repelencia

En el gráfico 1, se puede observar la comparativa de los resultados obtenidos de las disoluciones al 2% y 6%.

Se puede notar que la repelencia con 2% de concentración sufre una drástica disminución a partir de los 30 minutos, siendo insuficiente el efecto repelente a los 90 minutos de haberse aplicado la dosis en los voluntarios. En contraposición, la repelencia dada a concentración del 6%, ofrece valores más estables, casi lineales, en el tiempo, manteniendo un valor superior al 50% de protección pasados 120 minutos después de ser aplicada en los voluntarios.



Gráfica 1 Comparativa Tiempos de repelencia Fuente: Autores

5.4. Comprobación de Hipótesis

Para la comprobación de la hipótesis nula, fue utilizado el análisis estadístico ANOVA (Análisis de varianza de un factor). En este, el valor de la probabilidad es de 0,009404401; el cual es inferior al rango de error de 0,05. Con lo anteriormente mencionado, se rechaza la hipótesis nula, ya que, al comparar las concentraciones evaluadas en este estudio (2% y 6%) estas poseen efecto repelente sobre las hembras del mosquito *Aedes aegypti*; lo cual, a su vez, se ve reflejado en las variaciones de los promedios de las posaduras en la ‘Tabla 4’

Como se puede notar en la ‘Tabla 5’, el valor de significancia de este estudio es de 0,02500574, valor que es inferior al rango de error de 0,05, por lo tanto, se toma la hipótesis alterna como correcta. Por lo tanto, se evidencia la existencia de diferencias estadísticas significativas entre la concentración de 2% de extracto de *Calendula officinalis* y la concentración de 6%

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	Variable 1	Variable 2
Media	5,2	2,6
Varianza	2,62222222	5,37777778
Observaciones	10	10
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,18344801	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	9	
Estadístico t	2,68487072	
P(T<=t) una cola	0,01250287	
Valor crítico de t (una cola)	1,83311293	
P(T<=t) dos colas	0,02500574	
Valor crítico de t (dos colas)	2,26215716	

Tabla 5. Prueba T Student

Fuente: Autores

6. Discusión de resultados

Un posible compuesto causante del efecto repelente del extracto de *Calendula officinalis* se deba a tener al Alfa-cardinol como componente principal (18,3%). Este, es reconocido por estar en aceites esenciales de las plantas, puede poseer propiedades antibióticas, así como inhibidores de alimentación para herbívoros (Boligon et al., 2012). Y aunque su composición en la planta es poca, podría deberse también a compuestos como el cariofileno, carvacrol y el timol, probados en su efecto repelente; no obstante, y como se menciona anteriormente, estos se encuentran en bajas concentraciones en el aceite esencial, teniendo como máxima concentración un 0,5% (Tavassoli M et al., 2011).

Como se puede observar en las tablas de los ensayos (Ver anexos n°5 y 6), entre mayor sea la concentración de extracto de *Calendula officinalis* en la solución con aceite mineral, este aumentará su potencial de repelencia (protección del usuario). Esto puede deberse a una mayor presencia de componentes activos del extracto.

En cuanto a los tiempos de repelencia, podemos afirmar que posee una eficiencia superior a comparación de otros extractos naturales como el de *A. citriodora* (Cidrón), cuyo tiempo máximo de protección fueron de unos 90 minutos (Devia & Rodríguez, 2016). Sin embargo, comparándolo con el extracto de clavo de olor (*S. aromaticum*) tiene un rendimiento algo inferior, debido a su repelencia total a los 120 minutos (Abril; Mejía & Forero).

Realizando comparaciones con estudios anteriores, se puede afirmar que nuestra solución al 6% de concentración de extracto de *C. officinalis* posee un porcentaje de protección similar

al estudio realizado en la India en 2014 por Shubhangi S et al.; obteniendo un porcentaje del 56,90% al finalizar el estudio (90 minutos de duración), mientras los bioensayos realizados por la presente investigación en el mismo tiempo transcurrido, muestra un porcentaje del 55,2%. Las diferencias en los porcentajes pueden existir en la producción del repelente (aditivos y medio), debido a que, el estudio realizado en India probó con una crema acuosa con adiciones de alcohol cetil (2%), ácido esteárico (15%), glicerina (10%) e hidróxido de potasio (1%); en contraposición de diluir únicamente el extracto en aceite mineral del presente estudio. Así mismo, el estudio realizado en Irán en 2011 por Tavasolli M et al., cuyos componentes son aceites esenciales y etanol, no obstante, las proporciones utilizadas en este estudio es de 50:50, es decir, 50% aceites esenciales de *Calendula officinalis* y 50% de etanol, de la cual no se reporta el porcentaje de protección al usuario.

Así mismo, el repelente probado en este estudio, comparándolo con repelentes comerciales, tendrá un tiempo de repelencia menor, dependiendo siempre del repelente a comparar, según Barnard & Xue (2004). Teniendo estos, un efecto repelente sobre los mosquitos *Aedes aegypti* entre 3 a 8 horas de protección, debido a utilizar el DEET como componente principal.

7. Conclusiones

- El extracto de *C. officinalis* posee capacidad repelente frente a mosquitos *A. aegypti* en condiciones controladas de humedad, luminosidad y temperatura.
- El porcentaje de protección incrementa conforme se aumente la concentración del aceite esencial de *Calendula officinalis*.
- Se comprobó que el extracto de caléndula (*Calendula officinalis*) posee una repelencia mayor al 50% hasta las 2 horas al 6% de concentración sobre mosquitos *Aedes aegypti*.
- El efecto repelente, así como el tiempo de repelencia de la solución al 6% de concentración es inferior al repelente DEET, mostrando ($\frac{1}{4}$) de efectividad de este último.
- Se concluye que las propiedades activas del aceite esencial de caléndula pueden significar una alternativa natural a los repelentes sintéticos.

8. Recomendaciones

- Realizar los bioensayos en un periodo comprendido entre 6 y 10 horas de trabajo, con el fin de garantizar una mejor obtención de resultados.
- Poseer un número de hembras de *Aedes aegypti* igual o superior a 100 para evitar la inactividad de estas en caso de picadura.
- Efectuar pruebas en campo para garantizar la efectividad del repelente en condiciones cambiantes.
- En lo posible, llevar a cabo los bioensayos en horario crepuscular, nocturno o inicios del alba (5:30 pm - 5:30 am) para una mayor actividad en los mosquitos.
- Elaborar el repelente a una mayor concentración de extracto de caléndula.

- Elaborar el repelente en otro medio de disolución con el fin de comprobar si tanto la dosis efectiva como los tiempos de referencia cambian.
- Desarrollar este estudio con otra especie o género de mosquito.

9. Referencias

1. Acosta-Reyes, J., Navarro-Lechuga, E., & Martínez-Garcés, J. C. (2015, 26 junio). Enfermedad por el virus del Chikungunya: historia y epidemiología. Scielo.
2. Barnard DR, Xue RD. (2004) Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus* and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae).
3. Barrera, R. (2011). Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. CDC.
4. Bates, M. (1970). The natural history of mosquitoes. Gloucester, Massachusetts. The Macmillan Company.
5. Boligon, AA et al. (2012). *Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Leaves. Natural Product Research
6. Cámara Argentina de Especialidades Medicinales INSTITUCIONAL. (2021, 2 diciembre). El dengue: qué es, su historia y cómo se transmite. CAEME innovacion para la salud
7. CENTRO NACIONAL DE PROGRAMAS PREVENTIVOS Y CONTROL DE ENFERMEDADES. (2015). Guía para la cría y mantenimiento de colonias de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) en condiciones de insectario. México .
8. Centro Nacional para Enfermedades Infecciosas Emergentes y Zoonóticas. (2014). Ciclo de vida: el mosquito.
9. Davoli, M. G. (s. f.). Calendula - Información sobre la planta - Propiedades y cultivo. elcristo.
10. de la Luz, A. L. (1999, 9 septiembre). Instructivo técnico de Calendula officinalis. Revista Cubana de Plantas Medicinales.
11. EPA. (2010). Rendimiento de un producto Guía de pruebas OPPTS 810.3700: Repelentes de insectos aplicados en piel humana. Washington D.C.
12. García, D., Sanchez, E., Crespo, M., & Carballo, C. (1996, 25 septiembre). ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE CALÉNDULA. Scielo.
13. Heinerman, J. (1998). *Enciclopedia de Frutas, Vegetales y Hierbas*. New Jersey: Prentice Hall
14. Hogarmania. *Calendula, planta medicinal con grandes beneficios*. (2022, 17 marzo).
15. Icaza, J. T. (2010). El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. México D.F.: Bayer Environmental Science.
16. Instituto Nacional de Salud. (Septiembre de 2014). *Vectores de Dengue - Chikungunya, estado actual*
17. ITIS. (2009). *Catalogue of Life*.
18. Lastra Valdés, Humberto, & Piquet García, Rosario. (1999). *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Farmacia*, 33(3), 188-194.
19. Llorens Molina, Juan A. (2019). Extracción sólido-líquido con equipo soxhlet: determinación del contenido en grasas de la semilla de girasol. Universitat Politecnica de Valencia.
20. Mayo Clinic. (2020, 22 septiembre). Fiebre amarilla - Síntomas y causas. Mayo Foundation for Medical Education and Research.

21. Mousson, L. (2005, 28 julio). Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations | Genetics Research. Cambridge Core
22. Nelson, M. J. (1986). *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Washington D.C.: Organización Panamericana de la Salud.
23. Núñez, E., Vásquez, M., Beltrán-Luque, B., & Padgett, D. (2016, marzo). Virus Zika en Centroamérica y sus complicaciones.
24. O.P.S. (2014, noviembre). Chikungunya. OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.
25. O.P.S.O.M.S. (s. f.). Dengue. OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.
26. Organización Panamericana de la Salud. (2017). Zika. OPS.
27. Organización Panamericana de la Salud. (s. f.). Fiebre amarilla. OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud.
28. Organización Mundial de la Salud. (2009). Guía para pruebas de eficacia de repelentes de mosquito en piel humana. Ginebra.
29. Organización Panamericana de la Salud. (2011). Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión del dengue. Bogotá D.C.
30. Pinheiro, F. (1989). El dengue en las Américas. PAHO.

31. Placeres Hernández JF. (2016) Reducir las poblaciones del mosquito *Aedes aegypti*, estrategia para evitar tres enfermedades virales que incrementan su incidencia. *Rev Méd Electrón.* 2016 Feb-Mar;38(2).
32. Rigau-Pérez, J. G., Duante, J., & Clark, G. (2007, 21 mayo). Capítulo 4 – Prevención de enfermedades infecciosas específicas. Centers for Disease Control and Prevention.
33. Rossi, G., & Almirón, W. (2004). Clave ilustrada para la identificación de larvas de mosquitos de interés sanitario encontradas en criaderos artificiales en la Argentina. Buenos Aires, Argentina: Fundación Mundo Sano.
34. Ruiz-López, F. (2016, 1 junio). *Presencia de Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) y su infección natural con el virus del dengue en alturas no registradas para Colombia | Biomédica.* *Revista Biomédica.*
35. Shubhangi, S., & al, e. (2014). Development of Mosquito Repellent Formulations and Evaluation for its Activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2910-2917.

36. Suárez FM, Nelson JM. Registro de altitud del *Aedes aegypti* en Colombia. *Biomédica.* 1981;1:225. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v1i4.1809>
37. Tecnilab. (2022, 8 marzo). *Funcionalidades y Ventajas del Extractor Soxhlet*
38. Tavassoli, M., Shayeghi, M., Abai, M., Vatandoost, H., Khoobdel, M., Salari, M., Ghaderi, A., & Rafi, F. (2011). Repellency Effects of Essential Oils of Myrtle (*Myrtus communis*), Marigold (*Calendula officinalis*) Compared with DEET against *Anopheles stephensi* on Human Volunteers. *Iranian journal of arthropod-borne diseases*, 5(2), 10–22
39. Tomislav Meštrović, M. D. (2021, 23 abril). Historia del virus de Zika. *NEWS Medical Life Sciences.*
40. Tuellsa, J., & Massóc, P. (2019, 31 octubre). Colonialismo, trasiegos y dualidades: la fiebre amarilla. *Vacunas / Asociación Española de Vacunología.*

41. UNICEF. (2016). Control del vector *Aedes aegypti* y medidas preventivas en el contexto del zika. UNICEF.
42. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. (s.f.). *Ficha técnica No 1 - Zancudo - mosquito Aedes aegypti*. San Luis: LaGES.
43. Uribe, J. L. (1983). El problema del control del *Aedes aegypti* en América. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana, 473-481.
44. Vacuna contra Fiebre Amarilla: MedlinePlus medicinas. (2011, 15 julio). Vacuna contra Fiebre Amarilla. Recuperado 16 de enero de 2022, de <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a607030-es.html>
45. World Mosquito Program En Colombia. (2019, 04 marzo). Qué enfermedades transmite el mosquito *Aedes aegypti*. ¿Qué Enfermedades Transmite El Mosquito *Aedes Aegypti*?
46. World Mosquito Program. (2019, 18 octubre). Mosquito *Aedes aegypti*. <http://www.eliminatedengue.com/colombia/Mosquito-aedes-aegypti>

Anexos

Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Proyecto curricular Tecnología en Saneamiento Ambiental

Evaluación del Extracto de Caléndula (*Calendula officinalis*) como repelente de mosquitos
Aedes aegypti

Por medio de la presente, yo _____ identificado con el documento _____, indico que se me fueron informados los riesgos que pueden presentarse al participar de manera voluntaria en la realización de bioensayos para la terminación de este trabajo de investigación, los cuales son:

- Posible alergia picadura.
- Posible alergia componentes activos del extracto.
- Posible picadura de los mosquitos.
- Posible extracción sanguínea.

Por lo tanto, entendiendo lo anteriormente mencionado, autorizo a los tesisistas a realizar los bioensayos en los cuales, fueron puestos en mi conocimiento:

- Duración de las pruebas.
- Características físicas y químicas del extracto, así como sus componentes.
- Posibles riesgos y/o efectos secundarios.
- La colonia de mosquitos utilizada pertenece a una cepa libre de patógenos.

De igual manera, manifiesto total libertad y autonomía para suspender las pruebas en mi persona en el dado caso que mi integridad se vea vulnerada o amenazada de una u otra manera con la realización de estos bioensayos.

Firma

Fecha:

Bogotá D.C. |



Anexo 2. Toma de medida de la muñeca

Fuente: WikiHow



Anexo 3. Toma de medida circunferencia del antebrazo y longitud entre muñeca y codo.

Fuente: Dietfarma e WikiHow

sujeto	sexo	medicion			alergia
		muñeca	codo	distancia entre puntos	
1	H	17	26	23	NO
2	M	15,5	25,5	20,7	NO
3	H	16	22,8	23,3	LEVE
4	H	19,4	27,2	26	NO
5	H	15,9	24,9	24,7	NO
6	M	15,5	23	20,7	NO
7	M	15	22	20,7	NO
8	M	14,6	24,5	21	NO
9	H	15	24	23,2	NO
10	M	16,4	26	20,6	NO

Anexo 4. Tabla con medidas de los voluntarios y resultados pruebas de alergia. Fuente: Autores

Ensayo n°1 - 2% concentración						
Voluntario	n° de posaduras de mosquito					
	Control	0 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos
1	5	0	1	4	8	N/A
2	7	0	0	4	5	N/A
3	5	1	0	2	7	N/A
4	4	0	1	4	4	N/A
5	6	1	0	3	5	N/A
6	5	0	0	4	7	N/A
7	5	0	0	2	4	N/A
8	7	0	1	3	3	N/A
9	6	1	1	4	5	N/A
10	8	1	1	2	4	N/A
Total	58	4	5	32	52	N/A

Anexo 5. Ensayo n°1 a 2% de concentración.

Fuente: Autores

Ensayo n°2 - 6% concentración						
Voluntario	n° de posaduras de mosquito					
	Control	0 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos
1	5	0	0	0	5	3
2	7	0	1	2	3	6
3	5	0	0	0	0	2
4	4	0	0	1	2	2
5	6	0	1	0	0	1
6	5	0	1	0	1	2
7	5	0	0	1	0	2
8	7	0	1	4	5	4
9	6	0	3	4	4	4
10	8	0	0	2	6	2
Total	58	0	7	14	26	28

Anexo 6. Ensayo n°2 al 6% de concentración.

Fuente: Autores