EVALUACIÓN DEL EFECTO LARVICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ***Syzygium aromaticum*** (CLAVO DE OLOR) SOBRE LARVAS DE CUARTO ESTADIO DE *Aedes aegypti* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

LUISA FERNANDA MANRIQUE LOPEZ.

ELIANA GISELLE SUAREZ MORENO.

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
TECONOLOGÍA EN SANEAMIENTO AMBIENTAL
BOGOTÁ
2015

EVALUACIÓN DEL EFECTO LARVICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE ***Syzygium aromaticum*** (CLAVO DE OLOR) SOBRE LARVAS DE CUARTO ESTADIO DE *Aedes aegypti* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Presentado por:

Eliana Giselle Suárez Moreno

Cód. 20101085053

Luisa Fernanda Manrique López

Cód. 20112085047

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DE INVESTIGACIÓN, PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE TECNÓLOGAS EN SANEAMIENTO AMBIENTAL.

Director:
DIEGO TOMAS CORRADINE

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
TECNOLOGIA EN SANEAMIENTO AMBIENTAL
BOGOTÁ D.C.
2015

Nota de aceptación:

_____

_____

_____

_____

_____

Firma del director

_____

Firma del jurado.

Bogotá D.C 2015

DEDICATORIA

Con gran esfuerzo y dedicación se culmina un logro importante para mi vida luego de tanto anhelar ser una persona brillante y auténtica, es por eso que indudablemente le agradezco a Dios con todo mi corazón por su incondicional apoyo, por darme la sabiduría y la paciencia para llegar a ésta meta sabiendo que es apenas el inicio de muchos sueños más por cumplir. Además dedico éste triunfo y todos los que vendrán a mi madre quien me cuida desde su cielo; ella es mi inspiración, mi motivación y mis ganas de seguir luchando.

Luisa Fernanda Manrique López

Al llegar a la meta de cualquier proyecto que se plantea en la vida lo mejor que se tiene es mirar en retrospectiva y ver desde donde inicio todo, por donde se transitó y a donde se llegó, esa sin duda alguna es la mejor enseñanza de todas, y al pasar por este momento no se puede dejar de lado a quienes estuvieron siempre ahí, por eso dedico este logro principalmente a Dios por quien estoy acá y quien ha guiado cada uno de mis pasos en este gran viaje, a mi mamá, papá a mi hermana y a mis tías quienes de la mano y con un amor inmenso me han sabido apoyar.

Eliana Suárez Moreno Suárez

AGRADECIMIENTOS

A Dios principalmente quien fue el arquitecto desde un inicio de todo lo planeado, a la Universidad Distrital y a todos los maestros que compartieron su enseñanza y conocimiento través de la carrera, a nuestro director de proyecto el Profesor Diego Tomas Corradine y a cada una de las personas, amigos y compañeros que nos dieron su aporte de alguna manera.

Eliana Giselle Suárez Moreno, Luisa Fernanda Manrique López

TABLA DE CONTENIDO

RESÚMEN……1

ABSTRACT……2

INTRODUCCIÓN……3

1. **OBJETIVOS** ……5

1.1 Objetivo General ……5

1.2 Objetivos Específicos ……5

2. **MARCO TEÓRICO**……6

2.1 Mosquito *Aedes aegypti* ……6

2.1.1 Ciclo Vital ……7

- Huevos……7
- Las larvas……8
- La pupa…… 9
- El adulto ……10

2.1.2 Distribución Geográfica del Mosquito *Aedes aegypti*……11

2.1.3 Distribución de *Aedes aegypti* en Colombia……12

2.1.4 Acción Patógena……13

- El Dengue …… 13
- La fiebre amarilla ……14
- La Fiebre del Chikungunya ……14

2.1.5 Mecanismos de control para el *Aedes aegypti* ……15

- Control Químico ……15
- Control Integrado …… 16
- Control Biológico ……...16

2.2 *Syzygium aromaticum* (Clavo de Olor) ……...18

2.1.1Eugenol……18

2.3 Antecedentes……..19

3. **METODOLOGIA**……21

4. **RESULTADOS** …… 29

4.1 Eficiencia del extracto natural de ***Syzygium aromaticum*** (Clavo de Olor) como larvicida a las diferentes concentraciones experimentales…….....29

4.1.1 Análisis de mortalidades en los distintos tratamientos experimentales en relación con el tiempo de exposición...……...30

4.1.2 Análisis de regresión logarítmica para el cálculo de las concentraciones letales CL 50 y CL 90 ……31

4.2. Análisis de tiempos letales TL 50 y TL 90……33

5. **ANALISIS ESTADISTICO ANOVA DE UN FACTOR**……34

6. **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**……35

7. **CONCLUSIONES**……..37

8. **RECOMENDACIONES**……38

9. **BIBLIOGRAFIA**……..39

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación taxonómica del ***Aedes aegypti***……..7

TABLA 2. Principios activos del ***Syzygium aromaticum*** (Clavo de Olor)……19

TABLA 3. Porcentaje de mortalidad corregido con la fórmula de Abbott……....28

TABLA 4. Análisis de varianza ANOVA de un factor……..34

ÍNDICE DE FIGURAS

IMAGEN 1. Huevos de *Aedes aegypti*……...8

IMAGEN 2. Larvas de *Aedes aegypti*…….9

IMAGEN 3. Pupa de *Aedes aegypti*…..……10

IMAGEN 4. Adulto de *Aedes aegypti*…….....11

IMAGEN 5. Distribución geográfica del mosquito *Aedes aegypti* a nivel mundial……12

IMAGEN 6. Distribución de *Aedes aegypti* en Colombia……..12

IMAGEN 7. Jaula de cría de ***Aedes aegypti***……..22

IMAGEN 8. Equipo Rotaevaporador……....23

IMAGEN 9. Nevera de almacenamiento del extracto ……26

IMAGEN 10. Montaje de bioensayos a diferentes concentraciones……...27

GRAFICA 1. Regresión logarítmica para porcentaje de mortalidad y concentración ……..31

GRAFICA 2. . Porcentajes de mortalidad corregidos con Abbott en relación con el tiempo ……...33

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Registro de mortalidades en los tratamientos ……43

ANEXO 2. Calculo de las aproximaciones de las concentraciones letales……...46

ANEXO 3. Formato registro para porcentajes de mortalidades acumuladas durante los bioensayos……48

RESÚMEN

Considerando la búsqueda de soluciones alternativas que no afecten el medio ambiente y a su vez que controlen la reproducción del mosquito *Aedes aegypti* teniendo en cuenta su responsabilidad en la transmisión de enfermedades que aquejan a gran parte de la población mundial como lo son el dengue, la fiebre amarilla y la fiebre del chikungunya se desarrolló bajo condiciones de laboratorio el presente proyecto evaluando el efecto larvicida del *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) como medida de control biológico sobre larvas de IV estadio del vector *Aedes aegypti.*

En la presente investigación se realizaron bioensayos con larvas vivas sometidas a seis tratamientos con concentraciones seriadas desde 100ppm hasta 600ppm del extracto de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), con cuatro repeticiones diferentes cada una y un grupo testigo por tratamiento. En todos los bioensayos de las diferentes concentraciones se utilizaron 25 larvas de IV estadio por repetición, realizando observaciones para valorar su efecto toxico iniciando desde 0 horas aumentando a 2,12, 24, 36 y 48 horas.

Los resultados evidencian una eficiencia de mortalidad satisfactoria de los tratamientos, teniendo en cuenta que al finalizar los mismos hay un alcance de mortalidad acumulada del 100% a las 48 horas de exposición al extracto con una concentración de 400 ppm, la cual es realmente baja en comparación con otros estudios realizados.

Se concluye que el extracto de ***Syzygium aromaticum*** al ser utilizado como larvicida es muy eficiente; por lo cual hay la probabilidad que al ser estudiado en campo muestre resultados positivos, logrando controlar la reproducción del mosquito ***Aedes aegypti*** reduciendo así los casos de personas infectadas de los virus del dengue y chikungunya.

Palabras clave: Mosquito, Aedes aegypti, Bioensayos, Larvicida, control biológico, bioinsecticida, *Syzygium aromaticum.*

ABSTRACT

Considering the research of any alternative solution that doesn't affect the environment and at the same time control the reproduction of the Aedes aegypti mosquito having on mind the responsibility on the transmission of diseases that attack big part of the population from all around the world as it is the dengue, yellow fever, and chikungunya fever, we developed under laboratory conditions this project evaluating the larvicidal effect of the Syzygium aromaticum (clove) as a biological control over the larvae of the IV vector stage of aedes aegypti.

In the present investigation was performed bioassays with live larvae subjected to six treatments with serial concentrations from 100 ppm to 600 ppm of extract of Syzygium aromaticum (clove) with four different repetitions and a control group for each treatment. In each bioassay with the different concentrations They were used 25 larvae fourth stage per repiclate, making observations to assess their toxic effect starting from 0 hours increased to 2.12, 24, 36 and 48 hours.

The results show a satisfactory efficiency of mortality in the treatments , considering that at the end of the same there reaches a cumulative mortality of 100% within 48 hours of exposure to the extract with a concentration of 400 ppm which it is really low compared to other studies made .

It is concluded that the extract of Syzygium aromaticum when is used as a larvicide is very efficient ; whereby there is the likelihood that being studied in field show positive results , achieving to control mosquito breeding Aedes aegypti reducing cases of people infected with the dengue virus and chikungunya

keywords: Mosquito, *Aedes aegypti*, bioessay, larvicide, biologic control, bioinsecticide, *Syzygium aromaticum.*

INTRODUCCIÓN.

Aedes aegypti es un mosquito de la familia Culicidae negro con rayas blancas en el dorso y patas, encontrándose en una altitud promedio entre los 1200 y 2400 sobre el nivel del mar. Es de hábitos normalmente domiciliarios, mostrando también su existencia en sitios periurbanos y silvestres. Los lugares pueden ser urbanos (basurales, cementerios, baldíos), domésticos (floreros, botellas, neumáticos, vasijas en desuso, albercas), o sitios naturales como plantas y huecos en los árboles. (MinSalud, Argentina).

Presenta metamorfosis completa con una fase larvaria en el agua y otra en el aire que es cuando es adulto y busca reproducirse. Las hembras pueden realizar una ovoposición de 100 huevos buscando siempre aguas limpias, acumuladas y tranquilas en sitios frescos y con sombra. Las larvas presentan cuatro estadios de desarrollo necesitando vivir una semana en el agua para convertirse en pupas, que al cabo de dos días serán mosquitos adultos. (Plan Ceibal, Uruguay).

Éste mosquito pica principalmente durante el día siendo más activo las 2 primeras horas de sol y antes de atardecer, tanto a seres humanos como animales mamíferos especialmente. Como forma de prevención se recomienda a las personas expuestas revisar los recipientes de agua de las viviendas semanalmente asegurándose que no estén estancadas, a la vez que se debe hacer uso de repelentes y mantener toldillos a la hora de dormir. (California Department of Public Health, 2014).

El mosquito transmite los virus que ocasionan las enfermedades nombradas a continuación:

El dengue es una de las patologías infecciosas con mayor impacto en Colombia y constituye un evento cuya vigilancia, prevención y control revisten especial interés en salud pública. (Minsalud, 2013). Se transmite a través de la picadura de un mosquito de la especie Aedes infectado por alguno de los cuatro virus del dengue. (OMS, 2014); Una persona puede infectarse y enfermar hasta 4 veces. (Minsalud, 2013). La epidemiología que presenta se debe principalmente a la intensa transmisión viral con tendencia creciente, ciclos epidémicos cada vez más cortos, aumento en la frecuencia del dengue hemorrágico, infestación por *Aedes aegypti* de más del 90% del territorio nacional situado por debajo de los 2200 m.s.n.m. Su comportamiento cíclico se ha caracterizado por picos epidémicos cada tres o cuatro años relacionado con el reingreso de nuevos serotipos al país. (Minsalud, 2013).

La fiebre de Chikungunya es causada por el virus de tipo alfavirus de nombre Chikungunya, transmitido a través de la picadura del mosquito de los géneros *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus.* La enfermedad puede ser aguda, subaguda y crónica; se

caracteriza por fiebre, cefalea, mialgia, artralgia, exantema maculopapular acompañado por dolor en las articulaciones, la artralgia y la rigidez articular puede persistir de forma intermitente durante varias semanas a meses. No hay cura para esta enfermedad y el tratamiento se concentra en aliviar los síntomas. El principal factor de riesgo para la expansión del Chikungunya son los criaderos de mosquitos cerca a los lugares donde viven las personas, al igual que otras enfermedades vectoriales. (Minsalud, 2014).

Debido a la gran problemática que se ha desencadenado con el vector, distintas comunidades a nivel mundial han debido aumentar campañas de prevención para disminuir los casos de incidencia de estas enfermedades, a la vez que se han hecho investigaciones buscando alternativas para el control de estadios inmaduros de larvas utilizando larvicidas con el fin de interrumpir drásticamente el ciclo reproductivo del ***Aedes aegypti,*** y así evitar su prolongada reproducción siendo la mayoría de éstos tóxicos para la naturaleza. Es por eso que en el presente trabajo se evaluó el efecto larvicida del extracto etanólico de ***Syzygium aromaticum*** (clavo de olor), extracto natural que no es nocivo para el medio ambiente, sobre larvas de IV estadio del mosquito ***Aedes aegypti*** en condiciones de laboratorio; demostrando una excelente efectividad lo cual indica que en un futuro puede ser utilizado para controlar la proliferada reproducción de este vector.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto larvicida del extracto etanólico de *Syzygium aromaticum,* para el control biológico de larvas de *Aedes aegypti* en condiciones de laboratorio.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto larvicida del extracto etanólico de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor) a concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 ppm.
- Determinar las concentraciones letales LC 50 y LC 90 de los extractos etanólicos de *Syzygium aromaticum,* sobre larvas de *Aedes aegypti* de cuarto estadio.
- Evaluar los tiempos letales TL 50 y TL 90 de los extractos etanólico de *Syzygium aromaticum,* para larvas de *Aedes aegypti* de cuarto estadio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Mosquito *Aedes aegypti*

Dentro del *Phylum Arthrópoda: Clase Insecta (II)* se encuentra el orden Dipteria que comprende los insectos de mayor importancia sanitaria que a pesar de su aspecto y tamaño varían considerablemente, pueden distinguirse de otros insectos por su aparato bucal, por la presencia de un único par de alas funcionales y por su ciclo vital. (Gallego, 2006).

Únicamente las hembras son hematófagas. Activas durante todo el año en los climas tropicales, sólo aparecen en las zonas templadas durante los meses cálidos del año. Su ciclo biológico y postura de huevos se realiza siempre en el agua (dulce o salobre; soleada o protegida de la luz solar directa por la vegetación superficial o circundante; corriente o estancada; de grande o pequeña superficie. Durante su desarrollo larvario las larvas eclosionan de los huevos pasando por cuatro estadios larvarios, incrementando su tamaño después de sufrir la muda consiguiente. (Gallego, 2006).

Dentro de los géneros y especies de interés sanitario se encuentra *Aedes,* quien agrupa culicinos de aspecto muy característico por la morfología anillada de sus patas y la ornamentación de sus pronotos con dibujos blancos o plateados, formado por escamas que resaltan sobre el resto de las que los recubren, y por el aspecto aguzado del abdomen de las hembras, provistas de cercos muy prominentes. (Gallego, 2006).

El mosquito es de origen africano iniciando desde hace siglos una dispersión cosmopolita, acompañando los viajes del hombre a través del globo. Es un eficaz vector de arbovirosis como la fiebre amarilla y el dengue, motivando con esta última enfermedad una de las grandes problemáticas de salud pública mundial, con alta morbilidad capaz de bloquear las actividades de ciudades y países en picos epidémicos de esta enfermedad viral. Además es un ejemplo de adaptación de una especie de mosquito al ámbito humano, con criaderos, hábitat, fuente de alimentación, desplazamientos activos y pasivos ligados al ámbito domiciliario. (OPS/OMS en Uruguay, 2014).

Aedes aegypti, que se caracteriza por el dibujo blanco en forma de lira de su pronoto, es agente vector del dengue, la fiebre amarilla y la fiebre del chikungunya, alarmantes arbovirosis que están presentes a nivel mundial. (Linnaeus, 1762)(Díptera, Culicidae).

Reino	Animal
Phyllum	Artrópoda
Orden	Díptera
Suborden	Nematócera
Familia	Culicidae
Subfamilia	Culicini
Tribu	Aedini
Género	Aedes
Subgénero	Stegomya
Especie	*Aedes aegypti*

Tabla 1. **Clasificación taxonómica de *Aedes aegypti.*** (Knight & Stone, 1977)

2.1.1 Ciclo Vital

- **Huevos.**

Menores al milímetro de largo, son inicialmente de color blanco, para tornarse negros con el desarrollo del embrión, que evoluciona en óptimas condiciones de temperatura y humedad en un lapso de 2 a 3 días. Con posterioridad a ese período, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas con sobrevida de 7 meses a un año. La mayor parte de cada postura es de eclosión rápida, mientras un porcentaje reducido, constituyen los llamados huevos resistentes, inactivos o residuales, capaces de largas sobrevidas. (OPS/OMS en Uruguay, 2014).

Una vez completado el desarrollo embrionario, un porcentaje reducido de huevos pueden resistir largos periodos de desecación y, pueden prolongarse por más de un año en algunas ocasiones.

La capacidad de resistencia a la desecación es uno de los principales obstáculos para el control del mosquito y ésta condición, además, permite transportarlos a grandes distancias en recipientes secos. (Montero, 2009).



Imagen 1. Huevos de *Aedes aegypti*
Fuente: www.scidev.net del BMC Developmental Biology.

- **Las Larvas.**

Las larvas que emergen inician un ciclo de cuatro estados larvarios, creciendo a lo largo de tres mudas desde un largo de 1 mm a los 6,7 mm finales. Estas larvas, que poseen como caracteres morfológicos típicos (fuertes espículas torácicas laterales quitinizadas, peine de escamas unilineal en 8º segmento y sifón con forma de oliva corta, que destaca por su color negro, se alimentan con el zoo y fitoplancton de los recipientes que habitan. (OPS/OMS en Uruguay, 2014).

Se asemejan a otras larvas de mosquito por la cabeza y el tórax ovoide y el abdomen de 9 segmentos. El segmento posterior (anal) del abdomen tiene 4 branquias lobuladas para la regulación osmótica y un sifón, para la respiración en la superficie del agua. La posición de reposo en el agua es casi vertical. En cuanto al desplazamiento acuático, lo hacen con un movimiento serpenteante característico.

Son fotosensibles (sensibles a la luz), desplazándose hacia el fondo del recipiente, aun cuando son perturbados. La duración del desarrollo larval depende de la temperatura, la disponibilidad de alimentos y la densidad de larvas en el recipiente. En condiciones óptimas con temperaturas de 25° a 29°C, el periodo desde la eclosión hasta la pupacion puede ser de 5 a 7 días, pero comúnmente dura de 7 a 14 días. (Nelson, M.J. 1986).

Los tres primeros estadios se desarrollan rápidamente, mientras que el cuarto demora más tiempo con mayor aumento de tamaño y peso. En condiciones rigurosas (baja temperatura, escasez de alimento) el cuarto estadio larval puede prolongarse por varias semanas, hasta 7 meses, previo a su transformación en pupa.

Son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10°C, superiores a 45°C, impidiéndose a menos de 13°C su pasaje a estadio papal.

Las larvas del *Aedes aegypti* pueden diferenciarse a simple vista de las larvas de otras especies por su sifón más corto que el de la mayoría de los otros culícidos. (Nelson, M.J. 1986).



Imagen 2. Larvas de *Aedes aegypti*
Fuente: Gobierno Rio de Janeiro, Movimiento Rio de Janeiro contra el Dengue recuperado de http://www.riocontradengue.rj.gov.br/site/Conteudo/Porque.aspx

- **La Pupa**

Se completa en condiciones favorables de nutrición y con temperaturas de 25 a 29ºC, en 5 a 7 días, estando dotadas de movimientos característicos verticales, entre fondo y superficie, disponiéndose en forma de S durante los mismos. Son incapaces de resistir temperaturas inferiores a 10ºC, o superiores a 44 o 46ºC, impidiéndose a 13ºC su pasaje a estadio pupal. No requiere alimentación y entre 28 y 32ºC, completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en 1 a 3 días. Las variaciones extremas de temperatura pueden dilatar este período. (OPS/OMS en Uruguay, 2014).

Las pupas no se alimentan, presentan un estado de reposo donde se producen importantes modificaciones anatómico-fisiológicas hasta la aparición de los adultos.

Reaccionan inmediatamente a estímulos externos tales como vibraciones y se desplazan activamente por todo el recipiente. Se mantienen en la superficie del agua debido a su flotabilidad y esta propiedad facilita la emergencia del insecto adulto.

La pupa tiene en la base del tórax un par de tubos respiratorios o trompetas que atraviesan la superficie del agua y permiten la respiración. En la base del abdomen poseen un par de remos, paletas o aletas natatorias que sirven para nadar. (Montero, 2009)



Imagen 3. Pupa de *Aedes aegypti*

Fuente: Life Cycle Of *Aedes aegypti* recuperado de (Dengue Virus Net.com) http://www.denguevirusnet.com

- **El Adulto**

Es un mosquito de color negro, con diseños blanco-plateados formados por escamas claras que se disponen simulando la forma de una "lira", en el dorso del tórax, y mostrando un anillado característico a nivel de tarsos, tibia y fémures de las patas. (OPS/OMS en Uruguay, 2014).

El macho se distingue de la hembra por sus antenas plumosas y sus palpos más largos. Sus partes bucales no están adaptadas para chupar sangre, procuran su alimento de carbohidratos como el néctar de las plantas.

Al emerger de la pupa, el insecto adulto permanece en reposo permitiendo el endurecimiento del exoesqueleto y las alas. Dentro de las 24 horas siguientes pueden aparearse iniciándose la etapa reproductiva del insecto.

Los mosquitos hembras son los únicos que succionan sangre. Las hembras vuelan en sentido contrario al viento, siguiendo los olores y gases emitidos por el huésped. Cuando están cerca utilizan estímulos visuales para localizar al huésped y guiarse hacia el sitio de alimentación. Esta alimentación sanguínea es necesaria como fuente de proteína para el desarrollo de los huevos. (Nelson, 1986).

Si una hembra completa su alimentación (2 a 3mg de sangre) desarrollara y pondrá aproximadamente 200 huevos, dispersos en diferentes lugares por eso el periodo entre alimentación sanguínea y postura es de 3 días en condiciones óptimas de temperatura. La ovoposición generalmente, se produce hacia el final de la tarde, la hembra es atraída hacia recipientes oscuros o sombreados con paredes duras, sobre las que deposita sus huevos y prefiere aguas relativamente limpias con poco contenido de

materia orgánica. Los huevos son pegados a las paredes del recipiente en la zona húmeda a pocos mm de la superficie del agua.

La distribución de los huevos en varios recipientes asegura la viabilidad de la especie. La posición de los huevos a pocos mm de la superficie del agua permite que estos maduren, y en la próxima lluvia, al subir el nivel de agua del recipiente. Los huevos eclosionan en el momento de contacto con el líquido. (Nelson, 1986).

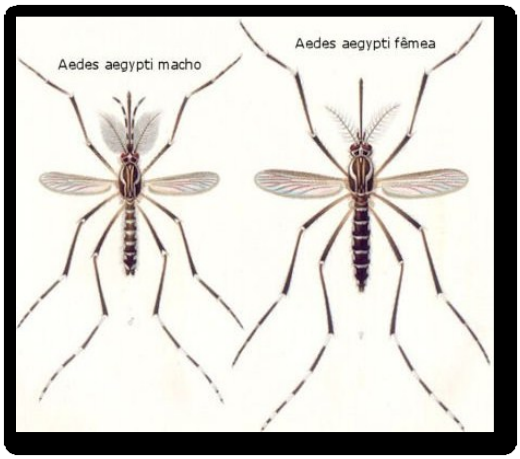


Imagen 4. Adulto de *Aedes aegypti macho (izq.) y Aedes aegypti hembra (der.)*
Fuente: Sociedad Venezolana de Salud Pública. Julio 2014.

2.1.2. Distribución Geográfica del Mosquito *Aedes aegypti:*

Se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales de América, África y Asia, así como sudeste de los EE.UU., las Islas del Océano Índico y el norte de Australia. La especie es el principal vector del virus del dengue y está involucrada en las principales epidemias de dengue en la región de América, Asia sudoriental y el Pacífico Occidental. Igualmente fue responsable de las grandes epidemias de dengue en Grecia en 1927-1928. Es el vector del virus Chikungunya en zonas de África y el virus de la fiebre amarilla en África y América del Sur. A continuación podemos evidenciar la información en la imagen 5:

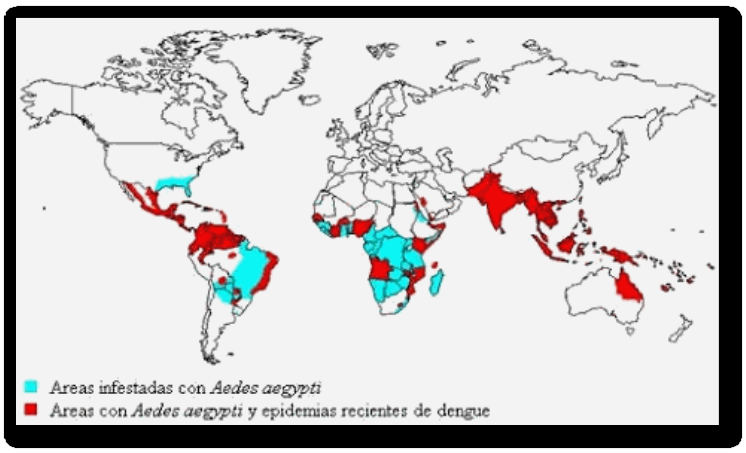


Imagen 5. Distribución Geográfica del Mosquito *Aedes aegypti* a nivel mundial.
Fuente*:* OMS, recuperado de www.who.int/topics/dengue/en

2.1.3 Distribución de *Aedes aegypti* en Colombia.

La distribución del ***Aedes aegypti*** en Colombia al año 2014 según el Instituto Nacional de Salud (INS) registra la presencia del vector en 1138 localidades de 30 departamentos de Colombia. (INS, 2014). Véase imagen 6

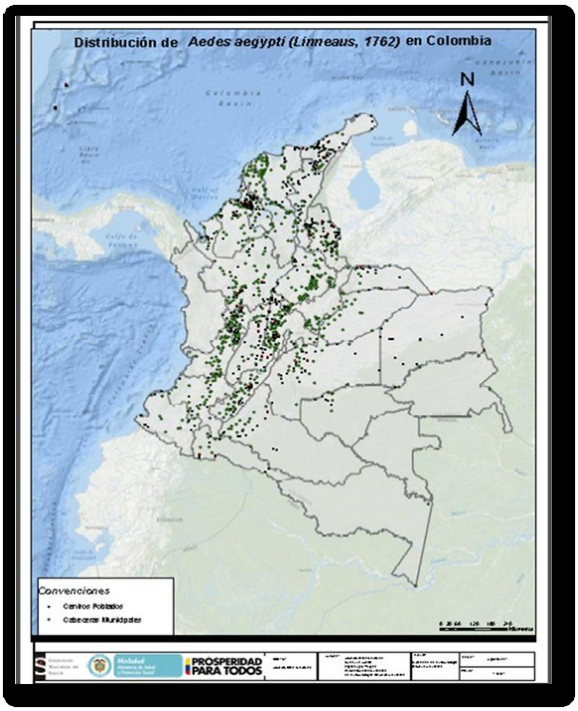


Imagen 6. Distribución de *Aedes aegypti* en Colombia (INS, 2014).
Fuente: Instituto Nacional de salud, dirección redes en salud pública. Grupo entomología vectores de dengue. Chikungunya estado actual, octubre 2014

2.1.4. Acción patógena.

Aedes aegypti a través del tiempo se ha dado a conocer por ser un vector de enfermedades las cuales han afectado al ser humano alrededor del mundo. Las más conocidas son el dengue, la fiebre amarilla y la fiebre del chikungunya. El dengue es una enfermedad viral aguda, endemo-epidémica, causada por un arbovirus de la familia Flaviviridae y transmitida por la picadura de hembras de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *aegypti.* (Parra GJ, 2007).

La fiebre amarilla es una enfermedad vírica aguda, hemorrágica, transmitida por mosquitos infectados. La vacunación es la medida preventiva más importante contra la fiebre amarilla. La vacuna es segura, asequible, muy eficaz, y una sola dosis es suficiente para conferir inmunidad y protección de por vida, sin necesidad de dosis de recuerdo.(OMS,2014).

La fiebre chikungunya es una enfermedad vírica transmitida al ser humano por mosquitos infectados. Además de fiebre y fuertes dolores articulares, produce otros síntomas, tales como dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. (OMS, 2014).

- **El Dengue**

El Dengue es una enfermedad grave de impacto epidemiológico, social y económico que se ha constituido como un problema creciente, y es una amenaza para la salud pública mundial, teniendo en cuenta que este es un cuadro viral del cual aproximadamente 2,5 millones de personas están en alto riesgo de infección en más de 100 países endémicos a través de las zonas de clima tropical y subtropical.

Es transmitido por la picadura de la hembra *Aedes aegypti* infectada. El virus del Dengue (DENV) es miembro de la Flaviviridae y el género Flavivirus, es un virus que tiene envoltura ARN positivo con cuatro serotipos (DENV1-4), y se relaciona con otros flavivirus incluidos Nilo Occidental, la encefalitis japonesa y virus de la fiebre amarilla. (INS, 2014).

El dengue y el dengue grave son endémicos; se encuentra distribuido en territorios que tienen hasta 1800msnm en áreas tropicales y subtropicales, y los cuatro serotipos de dengue circulan de forma concomitante en los humanos y en el Aedes. La infección tiene un espectro amplio, que va desde un síndrome viral no específico, a enfermedad fatal. La incidencia anual se estima en unos 40 millones de personas, con unas 500.000 hospitalizaciones por dengue hemorrágico o shock del dengue. El 90% de los casos generales se presentan en menores de 15 años. La tasa promedio de mortalidad es del 5%, con unas 24.000 muertes anuales por esta enfermedad y sus complicaciones.

En Colombia en los años 90 se presentaban cada año 30.000 reportes en promedio. Durante la última década ese índice se elevó a 50.000, donde el 76.1% de los casos de dengue proceden de 10 entidades territoriales: Tolima, Valle, Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Meta, Cesar, Huila, Antioquia y Putumayo. (INS, 2014).

- **La Fiebre Amarilla**

La fiebre amarilla es una enfermedad vírica aguda, hemorrágica, transmitida por mosquitos infectados. El término "amarilla" alude a la ictericia que presentan algunos pacientes. La mortalidad de los casos graves no tratados puede llegar al 50%.(OMS, 2014).

Se calcula que cada año se producen en el mundo 200 000 casos de fiebre amarilla que causan unas 30 000 muertes con un 90% de ellas en África.

El virus es endémico en las zonas tropicales de África y América Latina, con una población de más de 900 millones de habitantes. No hay tratamiento curativo para la fiebre amarilla. El tratamiento es sintomático y consiste en paliar los síntomas y mantener el bienestar del paciente.

Una vez contraído el virus y pasado el periodo de incubación de 3 a 6 días, la infección puede cursar en una o dos fases. La primera, aguda, suele causar fiebre, mialgias con dolor de espalda intenso, cefaleas, escalofríos, pérdida de apetito y náuseas o vómitos. Posteriormente, la mayoría de los pacientes mejoran y los síntomas desaparecen en 3 o 4 días.

Sin embargo, el 15% de los pacientes entran a las 24 horas de la remisión inicial en una segunda fase, más tóxica. Vuelve la fiebre elevada y se ven afectados diferentes sistemas orgánicos. El paciente se vuelve ictérico rápidamente y se queja de dolor abdominal con vómitos. Puede haber hemorragias orales, nasales, oculares o gástricas, con sangre en los vómitos o las heces. (OMS, 2014).

- **La fiebre del Chikungunya**

Es una enfermedad vírica transmitida al ser humano por el mosquito *Aedes aegypti*. Se trata de un virus ARN del genero Alfavirus, familia Togaviridae.

La fiebre chikungunya se ha detectado en más de 60 países de Asia, África, Europa y las Américas, la enfermedad suele aparecer entre 4 y 8 días después de la picadura de un mosquito infectado, aunque el intervalo puede oscilar entre 2 y 12 días. Algunos signos clínicos de esta enfermedad son iguales a los del dengue, con el que se puede confundir en zonas donde este es frecuente. (OMS, 2015).

El chikungunya se caracteriza por un brote súbito de fiebre, acompañado por dolor en las articulaciones o artritis severa de inicio agudo, en personas que residen o han visitado áreas endémicas o epidémicas durante las dos semanas anteriores al inicio de los síntomas. La mayoría de los pacientes se recuperan totalmente, pero en algunos casos, la afectación de las articulaciones puede persistir de manera crónica. Aunque las complicaciones serias no son frecuentes, en el caso de adultos mayores, niños y mujeres embarazadas. (Min Salud, 2014).

Además de fiebre y fuertes dolores articulares, produce otros síntomas, tales como dolores musculares, dolores de cabeza, náuseas, cansancio y erupciones cutáneas. (OMS, 2015). La enfermedad está presente en África, Asia y en India y desde el 2007 se reportaron los primeros casos autóctonos en Europa, en un brote localizado al noroeste de Italia. En diciembre del 2013, la OPS/OMS recibió la confirmación de los primeros casos de transmisión autóctona del Chikungunya en las Américas. (Min Salud, 2014).

2.1.5. Mecanismos de control para *Aedes aegypti:*

Las acciones dirigidas al vector siempre incluirán saneamiento del medio, educación, movilización social y medidas de control biológico. El control químico se restringe a situaciones de brote y donde se tenga una clara delimitación del foco de transmisión. Adicionalmente, debe sostenerse el monitoreo y evaluación de los indicadores epidemiológicos y entomológicos, para mantener actualizado el análisis de la situación y la continuidad de las medidas correspondientes. (Min Salud, 2014). A continuación se muestran 3 diferentes tipos de control para el vector:

- **Control Químico**

El control químico es una herramienta más, pero sus resultados además de antiecológicos, molestos y caros son efímeros si no se asocian a la eliminación de las formas larvarias acuáticas que permiten la reproducción rápida del vector. El empleo de insecticidas está destinado a erradicar una epidemia o brote de dengue o Chikungunya en sitios focalizados dependiendo del número de focos activos distribuidos en diferentes partes. El objetivo es la destrucción rápida y masiva de la población del vector *Aedes aegypti*. (Minsalud, 2014). Si llamamos foco a un recipiente con agua y larvas, se recomienda el tratamiento focal con larvicidas y uno perifocal con adulticidas, constituido por los sitios de descanso de las hembras en ovipostura, superficies externas de los recipientes y paredes a su alrededor. (OPS/OMS, 2011).

En el control químico se realizan 3 métodos de aplicación que los cuales se describen a continuación:

Focal:

Control de adultos: 1. Aplicación espacial Ultra Bajo Volumen ULV (3 ciclos: 1, 4 y 7 días), con equipo montado en vehículo. Recomendado para control del vector extra domiciliariamente. 2. Tipo Motomochilas para lugares de difícil acceso vehicular, en control intradomiciliar.

Control focal de formas inmaduras en sitios de cría: 1. Aplicación de biolarvicidas-biopesticidas de *Bacillus thuringensis israeliensis* que son reguladores de crecimiento inhibidores de quitina. 2. Aplicación de larvicidas químicos. 3. Aplicación perifocal de insecticidas sólo cuando esté indicado. (Minsalud, 2014).

Perifocal: Consiste en el rociado de los recipientes que no se pueden eliminar, siempre y cuando el agua que contenga no sea para consumo o lavado de alimento. El rociado se realiza cubriendo las paredes alrededor de los recipientes con agua que no se puedan acondicionar de otro modo. Los mosquitos adultos que frecuentan estos sitios se intoxican al tomar contacto con el producto. Los insecticidas que se emplean son órgano fosforado o piretroides. (OPS /OMS, 2011).

Aplicación Espacial: Es importante resaltar que este tratamiento sólo debe ser implementado en casos de brotes o epidemias de dengue. Consiste en la aplicación de pequeñas gotitas de insecticida en el aire para matar las formas adultas. Las nieblas pueden ser frías (UBV) o calientes (termoniebla), los equipos pueden ser portátiles o de arrastre. Los productos utilizados son órganofosforados o piretroides.

Los rociados espaciales solo matan mosquitos en vuelo cuando una microgota impacta en el insecto, por eso su efectividad es relativa. Se debe tener en cuenta: 1. Hora de aplicación de 6 a 8.30 y 17 a 19.30 pm. 2. Condiciones meteorológicas: viento, temperatura y humedad. 3. Evaluar las condiciones del área a tratar por la presencia de muros o casas muy pegadas. 4. La población debe colaborar abriendo puertas y ventanas, para ello debe conocer los días y horarios de la aplicación. 5. Deben repetirse cada 3 días para cortar la transmisión (OPS/OMS, 2011).

- **Control integrado:**

Es la combinación lógica de todos los métodos de control disponibles de la manera más eficaz, económica y segura para mantener las poblaciones de vectores en niveles aceptables. Este componente incluye todas las acciones de control (físico, químico, biológico y comportamentales) que se deberán adelantar con el fin de disminuir las poblaciones de mosquitos infectantes y de larvas en las áreas de mayor riesgo. (Min Salud, 2014). Se caracteriza por su efectividad, eficiencia, oportunidad, adecuado a la situación y ambiente, bajo impacto negativo a la naturaleza, posible desarrollo con participación comunitaria y racionalidad de planteo y ejecución.

- **Control Biológico:**

El control biológico es un método que emplea organismos vivos para reducir la densidad de una población de organismos plaga. Una plaga es cualquier organismo que produce un daño o reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano. (OPS/OMS, 2011). Su aplicación se limita a determinadas circunstancias como aguas de recreación, azoteas inundadas, fuentes, entre otros y consiste en: 1. Emplear sistemas de micro crustáceos copépodos larvíparos. 2. La siembra de *Bacillus thuringiensis*. 3. La producción de peces larvífagos como madrecitas de agua, de la especie *Poecilia reticulata*. 4. Transformar materia prima a base de plantas botánicas o de origen vegetal mediante extractos de plantas de forma acuosa, o con extracción de alcohol y acetona, consistiendo en inducir la aplicación de los enemigos naturales a una plaga para reducir su población. (Gutiérrez, 2012).

Tradicionalmente se ha aprovechado la actividad orgánica de algunas plantas para su aplicación como insecticidas botánicos, por lo que se les denomina fitoinsecticidas. En estudios recientes, se ha comprobado que los metabolitos secundarias de plantas con efectos insecticidas, pueden actuar como inhibidores de la alimentación de insectos o de quitina o perturbadores del crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento. Los insecticidas se obtienen de extracto de flores, raíces, tallos, hojas o de la planta completa. (Min Agricultura, sf).

Algunas plantas de las cuales se ha encontrado dicho efecto insecticida son el Ajenjo (*Artemisia Absynthium*), Aji Chile (*Capsicum Frutences*), Albahaca (*Ocimum Bacilicum*), Hierbabuena (*Mentha Piperita*), Higuerilla (*Ricinus Comunis*), Citronella (*Cymbopogon nardus*), Ajo (*Allium sativum*). (Min Agricultura, sf).

Respecto a la presente investigación se tuvieron en cuenta estudios y artículos de interés en relación a los insectos con mayor importancia en salud pública como lo son *Aedes aegypti, Culex , Anopheles* entre otros, y las diferentes estrategias de control biológico que se utilizan para contrarrestar su efecto en la población.

Considerando que el principal objetivo de este estudio corresponde a evaluar el efecto larvicida del extracto etanólico de *Syzygium aromaticum*, para el control biológico de larvas de *Aedes aegypti* se consideraron estudios donde se mostró su eficacia al ser probado contra dichas especies. De acuerdo con un estudio realizado por Affonso se muestra la actividad insecticida del *S. aromaticum* contra *Pediculus capitis, Culex pipiens, Tribolium castaneum, Sitophilus zeamais, Dermatophagoides farinae, D. pteronyssinus, Psoroptes cuniculi* y termitas japoneses. Mediante pruebas de la actividad de repelencia de los aceites esenciales contra *A. aegypti, Culex, quinquefasciatus* y *Anopheles dirus*, el extracto de *S. aromaticum* era uno de los más eficaces en mayores concentraciones contra *A. aegypti*. Sin embargo, su eficacia se demostró comparativamente mayor para especies *quinquefasciatus y A. dirus.* (Affonso, R. S, 2012).

Adicionalmente se resalta que los aceites derivados de productos naturales tienen el mayor potencial como repelentes de insectos, tales son la citronella, el clavo de olor, la verbena, el cedro, la lavanda, el pino, la canela, el romero, la albahaca, la pimienta y la pimienta de Jamaica. La actividad larvicida del eugenol contra el *Aedes aegypti* se identificó en (CL50 44,5 ppm) en extracto acuoso del *S. aromaticum* , donde la repelencia alcanzó un nivel de 60 a 80% en 30 minutos de exposicion. (Affonso, R. S, 2012).
Otro estudio comparativo realizado esta vez por Bhat, sobre huevos y larvas de IV estadio de la especie *A. albopictus* donde se utilizó extracto tanto de la hoja como del botón (yemas) del *S. aromaticum* dio como resultado que la capacidad de eclosión de los huevos se ve afectada por la presencia de los aceites, los huevos tratados no eclosionaron incluso a las 48 h de exposición, mientras que todos los huevos en el control

y los viales no tratados sí. Los síntomas de toxicidad en larvas se manifiesta por un movimiento de enrollamiento de los individuos, junto con el temblor y la convulsión, como una reacción instantánea a la exposición a la concentración de LC 95 de cada aceite. De los resultados de la toxicidad de los ensayos, es evidente que el aceite de las hojas es más potente que el aceite de yema. (Bhat, 2009).

Comparando los resultados del estudio realizado por Affonso y Bhat con los reportes obtenidos a través de este proyecto de investigación, se encuentran mejores resultados en cuando al tiempo de exposición en el cual empiezan a registrarse mortalidades en muy corto tiempo (antes de las 12 horas) y también en concentraciones muy menores alcanzando un 100% de efectividad. Lo anterior indica lo promisorio y eficaz que puede ser el extracto de *Zyzygium aromaticum* como larvicida contra e*l Aedes aegypti* demostrando su letalidad aguda progresiva durante la investigación.

2.2 *Syzygium aromaticum* (Clavo de Olor).

De la familia de las Mirtáceas el clavo o clavero es un árbol que tarda unos 20 años en desarrollarse, con un altura entre 12 y 15 metros. Puede seguir produciendo fruto hasta 50 años. Sus hojas se parecen bastante a las del laurel. Posee flores regulares de cinco pétalos y numerosos estambres. El rudimento del fruto se sitúa debajo de la flor y no en su seno; de manera que cuando aquel llega a su madurez, el cáliz que suele persistir lo corona. Los pétalos plegados con los estambres dentro forman la cabeza del clavo.
Son las flores del árbol de clavo perteneciente a la familia *Myrtáceae* nativo de Indonesia que aún no se abren. Está Compuesto del 72% al 90% de Eugenol, del 15% al 20% de aceite esencial, y del 20% de Ésteres y otros aceites como ácido cratególico y el salicilato de metilo. (Raina VK, 2001).

2.2.1 Eugenol

El Eugenol es un derivado fenólico conocido comúnmente como esencia de clavo, presente en algunos plaguicidas e insecticidas por contar con un efecto que ataca un neurotransmisor especial de los mosquitos e insectos por lo cual se utiliza en la industria química. (Sumangala, 2009).

Proporciona potentes propiedades antisépticas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, analgésicas y carminativas a los frutos. En altas dosis es depresor del sistema nervioso, neurotóxico e irritante de las mucosas digestivas. (Botanical-Online SL, 2015).

Compuestos del Eugenol en la tabla 2.

Tabla 2. **Principios Activos del *Syzygium aromaticum* (Clavo de Olor)**

Principios Activos del *Syzygium aromaticum* (Clavo de Olor)	
Eugenol (72 – 90%)	Fenoles.
Acetileugenol	Óxidos.
Eugenil acetato (2-20%)	Flavonoides.
Cariofileno (5 – 12%)	Esteroles.
Pineno	Ácidos fenoles.
Taninos (10 – 13%)	Triterpenos
Esteres (20%).	Sesquiterpenos

Tabla 2.

Fuente: Recuperado en http://www.hierbitas.com/combrecomun/Clavo_de_olor.htm.

2.3 ANTECEDENTES.

Dado que la toxicidad es algo inherente al efecto plaguicida, insecticida o larvicida en sí mismo en este sentido, cabe aclarar que lo que se busca son compuestos que sean eficaces para la plaga que se pretende controlar pero inocuos para el hombre y que afecten lo menos posible al ambiente. Ambas características parecen combinarse en productos derivados de las plantas, también llamados insecticidas botánicos, cuyo uso no es nuevo sino que data de hace al menos dos milenios.. Por lo tanto, en los últimos años se está retornando al uso de las plantas como fuente de plaguicidas más seguros para el ambiente y la salud humana. Actualmente existen cuatro grupos de productos botánicos usados para el control de insectos plagas y vectores, que son el piretro y el neem, junto a la rotenona y los aceites esenciales tales como el mentol, derivado de diferentes especies de menta, el eugenol, presente en el aceite esencial del clavo de olor (*Syzy-gium aromaticum*) y el 1,8-cineol, constituyente principal del aceite derivado del eucalipto (*Eucalyptus globus*). (Revista ciencia en desarrollo, 2013).

En un estudio realizado en el Syzygium aromaticum (Clavo de Olor) se demostró la capacidad larvicida sobre larvas de Aedes albopictus en huevos y larvas de cuarto estadio mostrando CL50 y CL95 (Concentración letal 50 y 95) del aceite de hoja de 5,3 y 7,03 mg/ml. respectivamente, mientras que los valores de CL50 y CL 95 del aceite de brote fueron de 17,84 y 23,99 mg/ml, respectivamente, lo que indica niveles comparables a los de praletrina (insecticida de uso doméstico). (Sumangala, 2009) En otro estudio similar utilizando el extracto de éter del brote de flores de clavo de olor, también sobre *Aedes*

albopictus, se encontró que la CL50 a las 24 y 48 horas fue de 403,4 ppm y 342,2 ppm respectivamente. En cuanto a los tiempos letales se encontró una letalidad superior al 50% a partir de las 17,99 horas. (Bilal, 2012).

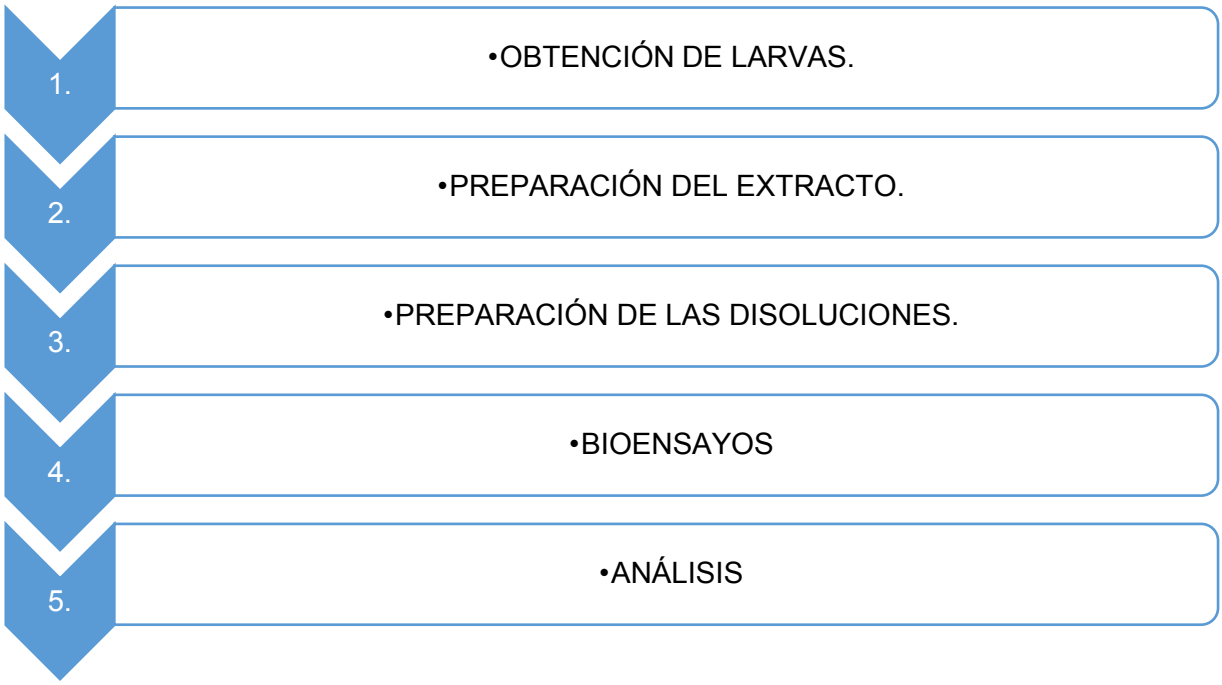
Un estudio desarrollado por la sociedad de industria química (Society of Chemical Industry) en 2012 donde se buscó la relaciones estructura-actividad de derivados eugenol contra larvas del *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) arrojo que cuatro compuestos que representan 99,05% de aceite esencial de *S. aromaticum* han sido identificados. El aceite esencial era activo contra *Ae. aegypti* (LC (50) = 62,3 y 77,0 ppm, campo recolectados y larvas Rockefeller, respectivamente). La actividad larvicida del eugenol, el compuesto principal del aceite esencial, se evaluó adicionalmente (LC (50) = 93,3 y 71,9 ppm, campo recolectados y larvas Rockefeller respectivamente). También se evaluaron las relaciones de actividad larvicida y estructura-actividad de derivados sintéticos de eugenol. La actividad larvicida de los derivados varió entre 62,3 y 1614,9 ppm. (NCBI, 2012).

Otro estudio realizado sobre el efecto larvicida de la mezcla de aceites esenciales extraídos de las hojas de la especie *Pimenta dioica* Lindl (hojas) y las ramas *Aniba duckei Kostermans* fueron evaluadas contra el mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1792), donde se observó la actividad larvicida basado en el porcentaje de larvas muertas.
La acción se evaluó 24 horas después del tratamiento, donde la mezcla de aceites esenciales mostraron una actividad larvicida con CL50 de 113,95 (± 2,11) ml mg^{-1}, eugenol 90.86 (± 0,03) mg ml^{-1} y linalol (305,42 ± 0 03) mg L^{-1}.
Los resultados indican que la mezcla de aceites esenciales, el Eugenol y el linalol proporcionan un mayor efecto larvicida contra *Aedes aegypti*. (Pereira, 2014).

2 METODOLOGÍA.

El procedimiento consta de cinco partes por separado los cuales estuvieron relacionados entre sí. La investigación se basó en condiciones experimentales de laboratorio, con seis tratamientos a diferentes concentraciones y uno testigo realizados cada uno con cuatro repeticiones.

A continuación se muestra la metodología de la investigación llevada a cabo:



1. •OBTENCIÓN DE LARVAS.

•La evaluación del efecto larvicida del clavo de olor ***Syzygium aromaticum***, se realiza obteniendo larvas de ***Aedes aegypti*** cepa Rockefeler proveniente de colonias del Instituto Nacional de Salud, en el laboratorio de Zoonosis de la Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Paso 1.

Paso 2.

•Para criar las larvas se introdujeron los huevos en recipientes de polietileno con agua a una temperatura de 27°C – 30 °C, alcanzando en una semana el estadio IV de desarrollo.

•Se alimentaron con comida para peces ya que contienen los nutrientes necesarios para su desarrollo.

Paso 3.

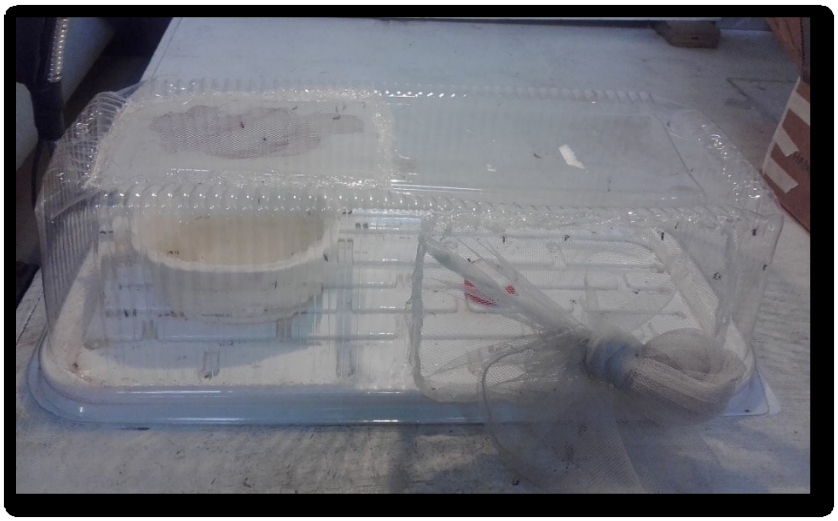


Imagen 7. Jaula de cría de *Aedes aegypti*.

Fuente: Autores.

2. •PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.

Paso 1.
•La preparación del extracto se hizo con 600 gramos de clavo adquirido en la plaza de mercado del restrepo, el cual no pasó por ningún proceso de secado ya que se encontró en esa condición en el momento de su compra.

Paso 2.
•El material seco se pulverizó utilizando un molino convencional y se pesó 500 gramos del material el cual se colocó en 3 litros de etanol al 96% para remover los aceites esenciales, dejándose en reposo durante un tiempo de 72 horas.

Paso 3.
•Una vez pasado el tiempo de reposo se realizó un proceso de filtrado con un equipo de ultrafiltración al vacío con embudo Buchner y papel filtro número 1, con el fin de retirar los residuos del procedimiento.



Imagen 8. Equipo Rotaevaporador

Fuente: Autores.

•El resultado del proceso de filtración se concentró en un Rotaevaporador IKA RV10, con baño maría a 40ºC, velocidad de rotación de 100 rpm y presión reducida de 140 milibars, para evaporar y destilar el etanol y así de esta manera obtener el extracto o solución madre.

Paso 4.

Paso 5.

•Se determinó mediante pesaje el rendimiento final obtenido a partir de 500 gr de materia prima.

•El extracto obtenido se almacenó en un frasco color ámbar a temperatura de refrigeración para evitar cambios en su composición por la alteración de sus principios activos debido a la influencia de la luz o choques térmicos hasta el momento de su utilización.

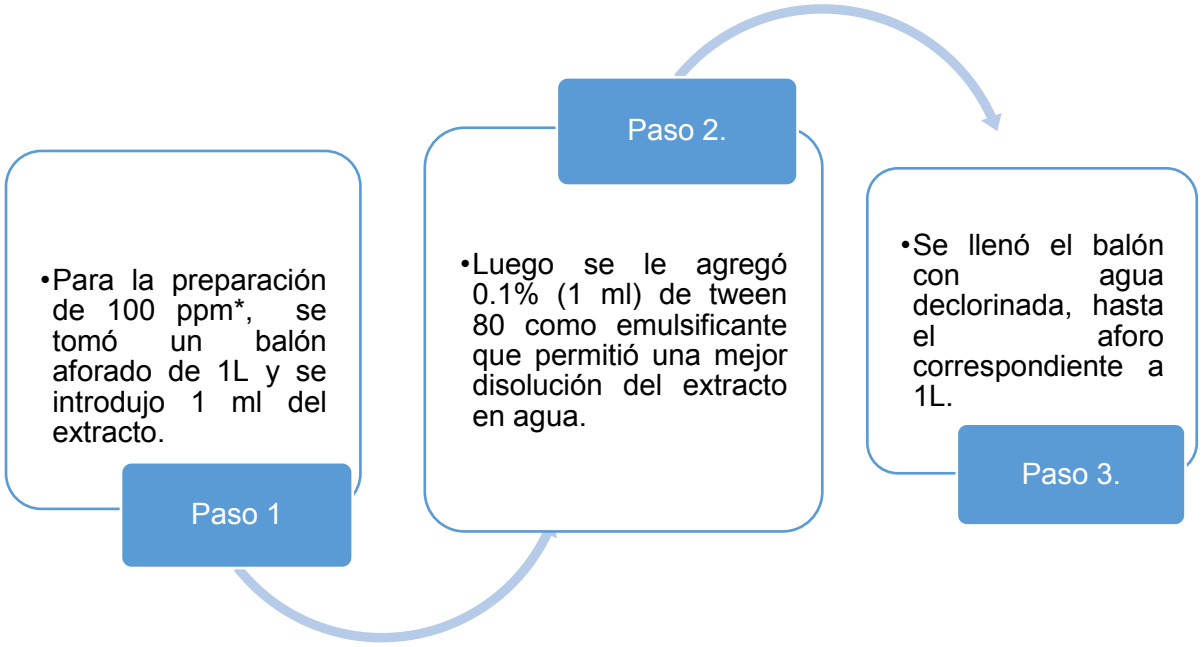
Paso 6.



Imagen 9. Nevera de almacenamiento del extracto .

Fuente: Autores.

3. •PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES.



Anotación especial*: Para la preparación de 200 ppm, se introdujeron 2 ml del extracto en el balón aforado continuando el procedimiento anterior equivalentemente para 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm y 600 ppm.

4. •BIOENSAYOS

Paso 1.

•Se sirvió el extracto diluido en vasos de plástico con capacidad de 200 ml; utilizando 750 larvas de IV estadio de *Aedes aegypti.*

Paso 2.

•Se repartió 25 larvas para cada una de las repeticiones de los 6 tratamientos experimentales y el grupo testigo.

Paso 3.

•Para el grupo testigo no se agregó extracto, es decir, sólo se adicionó 0.1% de tween 80 en el balón aforado y se completó el volumen con agua hasta 1 litro.



Imagen 10. Montaje de Bioensayos a diferentes concentraciones

Fuente: Autores.

5. •ANÁLISIS

Lecturas de mortalidad.

•Se realizaron lecturas de mortalidad a las 0, 2, 12, 24, 36 y 48 horas, tomando como criterio las indicaciones de la OMS.

Mortalidad.

•Se considera como muerta una larva que no presente movimientos natatorios y no reaccione al ser tocada con una aguja de punta roma y aquellas que se muestren moribundas (OMS, 2005).

Paso 1.

•Se tomaron los datos completos (tiempo, concentraciones y mortalidad) durante cada bioensayo, para evaluar los análisis con herramientas y programas que permiten un análisis más preciso y detallado.

Paso 2.

•Primero se organizó los datos en Excel donde se aplicó la formula de Abbott para corregir el porcentaje de mortalidad, además de encontrar las dosis letales efectivas en los ensayos biológicos. (CL 50 - CL 90). Después de tenerlos organizados se utilizó el programa SPSS para el análisis estadístico ANOVA de un factor.

4. RESULTADOS.

Después de finalizar los bioensayos establecidos para este proyecto se procedió a organizar los resultados en una tabla en Excel general por tiempos de exposición, concentración y mortalidad, dónde se utilizó el extracto del ***Syzygium aromaticum*** sobre larvas de ***Aedes aegypti*** en estadio IV, con el fin de analizar los porcentajes de mortalidad sobre los individuos tratados en diferentes concentraciones. A éstos resultados se les aplico la fórmula de Abbott para ajustarlos corrigiendo las mortalidades de acuerdo a las muertes naturales del grupo testigo. Véase tabla 3.

Tabla 3: Porcentajes de mortalidad corregidos con la fórmula de Abbott.

TRATAMIENTOS	% de mortalidad corregido con Abbott					
	0 Horas.	2 Horas.	12 Horas.	24 Horas.	36 Horas.	48 Horas.
	% Promedio	% Promedio	% Promedio	% Promedio	% Promedio	% Promedio
Testigo	0	0	0	0,667	2,667	4
100PPM	0	0	1	5,4	20,9	39,6
200 PPM	0	0	1	12,4	30,1	54,2
300 PPM	0	0	6	59,7	82,5	86,5
400 PPM	0	0	95	100	100	100
500 PPM	0	89	100	100	100	100
600 PPM	0	100	100	100	100	100

Fuente: Autores.

Dónde,

$$\% \text{ MC} = \frac{\% \text{ Mtratamiento} - \%\text{M testigo}}{100 - \% \text{ Mtestigo}} * 100$$

% M. tratamiento: mortalidad acumulada del tratamiento
% M. testigo: Mortalidad acumulada del testigo
% M. C: Mortalidad corregida en porcentaje.

4.1 Eficiencia del extracto natural de *Syzygium aromaticum* como larvicida a las diferentes concentraciones experimentales.

En los bioensayos experimentales se midió la eficiencia como larvicida del extracto de ***Syzygium aromaticum*** en las concentraciones de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 partes por millón (ppm) en un tiempo de 48 horas, evidenciando resultados satisfactorios mostrados a continuación:

Tratamiento 1 (100 ppm):

Se evidencia a las 12 horas de exposición al tratamiento una mortalidad del 1% de las larvas, aumentando paulatinamente hasta llegar al 39,6% de muertes al finalizar el bioensayo a las 48 horas, mostrando la menor efectividad respecto a los otros tratamientos.

Tratamiento 2 (200 ppm):

El tratamiento tuvo un porcentaje de mortalidad acumulada del 54,2% al cabo de 48 horas de exposición, evidenciando una eficiencia superior al 50% indicando que a partir de esta concentración se comenzaron a tener resultados positivos.

Tratamiento 3 (300 ppm):

Con un porcentaje de mortalidad del 86,5% al cabo de 48 horas de tratamiento, éste bioensayo nos demuestra nuevamente la eficacia del extracto empleado, teniendo en cuenta que con tan baja concentración casi se llega al 90% de eficiencia del extracto.

Tratamientos 4 (400 ppm), 5 (500 ppm) y 6 (600 ppm):

Para los tres últimos tratamientos al cabo de 48 horas de exposición al extracto, se presenta un porcentaje de mortalidad del 100%, con lo cual se concluye que los resultados obtenidos en la investigación son de una excelente eficiencia.

Bioensayos en los grupos testigo:

Hubo una mortalidad acumulada del 4%. Pudo ser por causas naturales y con seguridad no altera los resultados obtenidos en los grupos experimentales porque es un porcentaje muy inferior.

4.1.1 Análisis de mortalidades en los distintos tratamientos experimentales en relación con el tiempo de exposición.

Tratamiento 1 (100 ppm):

En este primer bioensayo se evidencia la primer mortalidad a las 12 horas con una mortalidad acumulada del 1%, seguidamente a las 24 horas éste porcentaje aumenta al 5,4%, para luego a las 36 horas subir al 20,9%. Al cabo de 48 horas hay un 39,6 % de mortandad.

Tratamiento 2 (200 ppm):

Al igual que el bioensayo de 100 ppm la primer muerte se da a las 12 horas representando el 1% , a las 24 horas aumenta significativamente al 12,4% y posteriormente a las 24 horas de exposición el porcentaje acumulado de mortalidad aumenta al 30,1%. Finalmente a las 48 horas con el 54,2% de los individuos muertos se logra una efectividad superior al 50%.

Tratamiento 3 (300 ppm):

En este bioensayo se registra el porcentaje de letalidad nuevamente a las 12 horas al igual que los dos anteriores pero esta vez del 6% de muertes de los individuos tratados. Es de resaltar que los resultados mostrados a partir de las 24 horas aumentan considerablemente hasta el 59,7% dando indicios de la toxicidad del extracto en relación al tiempo de exposición, finalizando con el 86,5% de mortalidad acumulada a las 48 horas.

Tratamiento 4 (400 ppm):

En este tratamiento a las cero y dos horas aún las larvas presentan movimientos natatorios normales, sin embargo, a las 12 horas nuevamente al igual que en los tratamientos anteriores se presenta mortalidad , pero esta vez del 95% demostrando que al aumentar la concentración hay mayor cantidad de especímenes muertos en relación con el tiempo de exposición. Cabe resaltar que a partir de las 24 horas de observación la letalidad es del 100%.

Tratamiento 5 (500 ppm):

A partir de este bioensayo la toxicidad en los tratamientos se muestra de manera aguda debido a que en tan sólo con dos horas de exposición el 89 % de las larvas se encontraron muertas, llegando a una mortalidad acumulada del 100% a las 12 horas.

Tratamiento 6 (600 ppm):

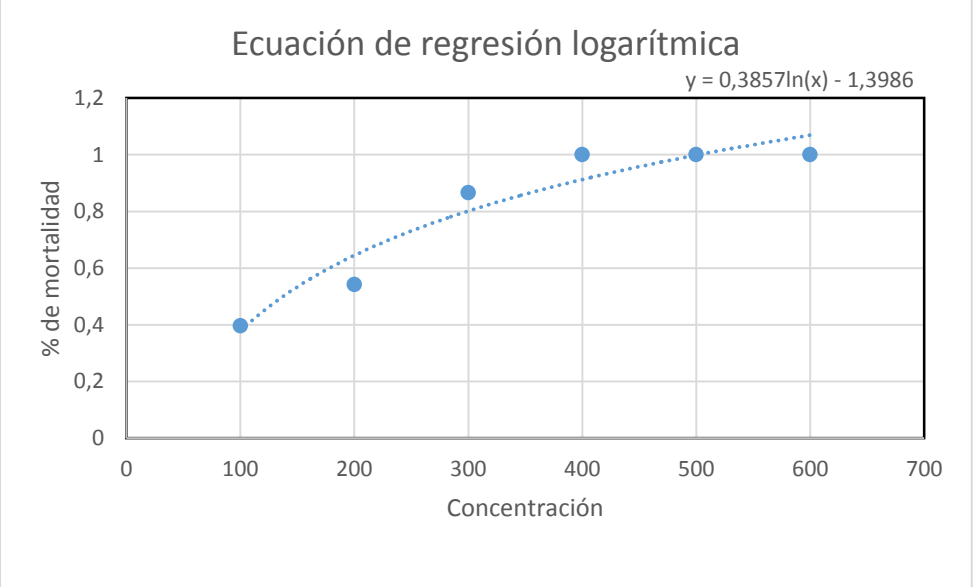
El nivel agudo de toxicidad es corroborado en este bioensayo al arrojar el mejor resultado, ya que al ser la concentración más alta del estudio realizado se logra el 100% de mortalidad acumulada a las 2 horas de tratamiento.

4.1.2 Análisis de regresión logarítmica, para el cálculo de las concentraciones letales CL 50 y CL 90.

Mediante la herramienta de Excel se desarrolló la regresión logarítmica con el fin de graficar el aumento progresivo de las mortalidades a las diferentes concentraciones.

La grafica muestra el aumento gradual a través de una curva logarítmica con la cual se evidencia el crecimiento de las mortalidades al incrementar la concentración de cada tratamiento. Cabe resaltar que el punto más alejado de la curva corresponde a 200 ppm.

Gráfica 1. Regresión logarítmica para porcentaje de mortalidad y concentración.



En la parte superior derecha de la gráfica se encuentra la ecuación con la cual se remplazó X por las diferentes concentraciones con el fin de calcular las dosis letales CL 50 y CL 90. Una vez aplicada la ecuación los datos arrojados fueron ordenados como se muestra en la tabla del anexo (2), allí se muestra que para el CL 50 la concentración está

en el rango del 49.3% en 135ppm y el 50.7% en 140ppp y para el CL 90 la concentración está en el rango del 89.9% en 385ppm y el 90.2% en 390ppm.

Con el fin de hallar la dosis de concentración exacta para CL50 y CL 90, se despejo la formula como se muestra a continuación:

- Si, y= 0.50

$$\boldsymbol{y}=\mathbf{0.3}857\ \boldsymbol{ln}\ (\boldsymbol{X})-\mathbf{1}.3986$$

$$\mathbf{0.50}=\mathbf{0.3}857\boldsymbol{ln}\ (\boldsymbol{X})-\mathbf{1}.3986$$

$$= \frac{0.50+1.3986}{0.3857} = \boldsymbol{e}\ .\ \boldsymbol{ln}\ \boldsymbol{X}$$

$$\boldsymbol{e}\ \frac{0.50+1.3986}{0.3857} = \boldsymbol{ln}\ \boldsymbol{X}$$

$$\boldsymbol{X}=\mathbf{137.34}$$

- Si, y= 0.90

$$\boldsymbol{y}=\mathbf{0.3}857\ \boldsymbol{ln}\ (\boldsymbol{X})-\mathbf{1}.3986$$

$$\mathbf{0.90}=\mathbf{0.3}857\boldsymbol{ln}\ (\boldsymbol{X})-\mathbf{1}.3986$$

$$= \frac{0.90+1.3986}{0.3857} = \boldsymbol{e}\ .\ \boldsymbol{ln}\ \boldsymbol{X}$$

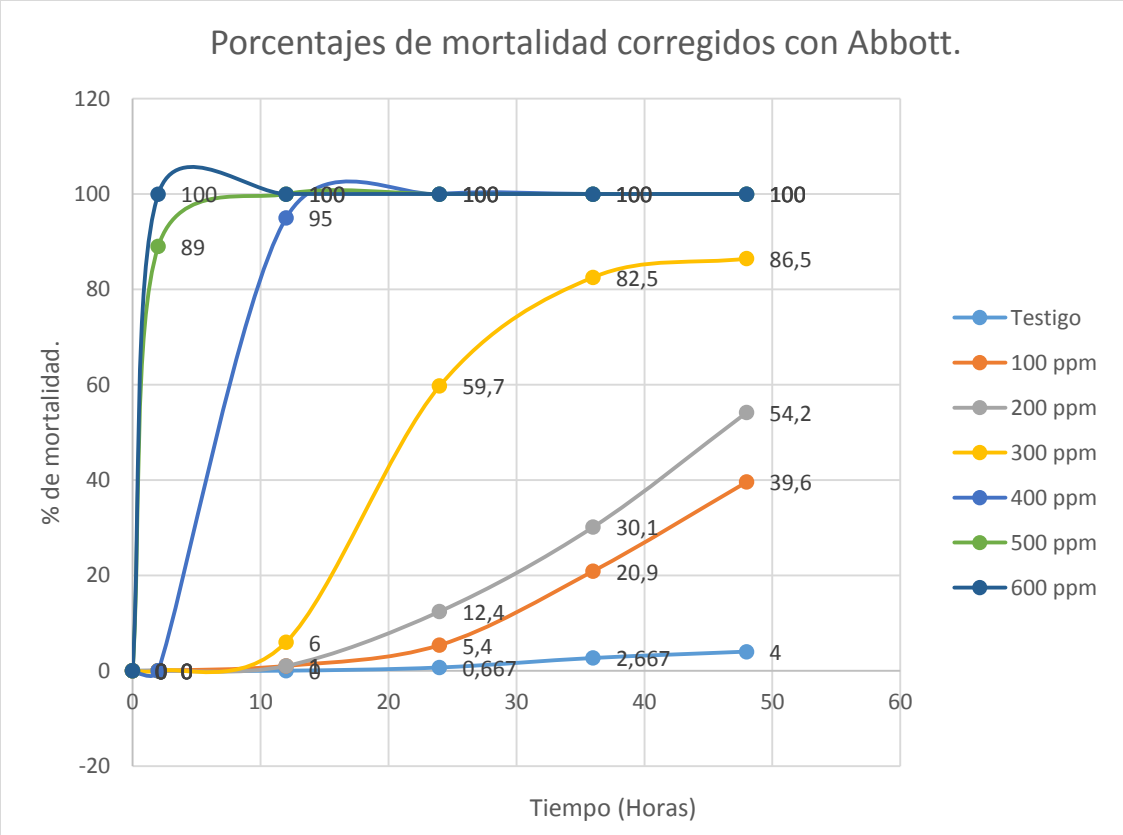
$$\boldsymbol{e}\ \frac{0.90+1.3986}{0.3857} = \boldsymbol{ln}\ \boldsymbol{X}$$

$$\boldsymbol{X}=\mathbf{387.43}$$

Donde; **CL 50** = 137.34 ppm y **CL90** = 387.43ppm.

4.2 Análisis de tiempos letales TL 50 y TL 90.

Gráfica 2. Porcentajes de mortalidad corregidos con Abbott en relación con el tiempo.



Con la anterior gráfica se puede analizar que de acuerdo a la relación entre el porcentaje de mortalidad corregida y el tiempo medido en horas, únicamente el bioensayo de 100 ppm no alcanza el 50 % de mortalidad total acumulada, indicando que los TL 50 y TL 90 para este tratamiento no se encontró.

Los tiempos letales TL 50 son alcanzados en 200 ppm a las 44 horas, en 300 ppm a las 22 horas y en 400 ppm a las 7 horas de los tratamientos; a diferencia que en 500 ppm y 600 ppm se alcanza el 50 % de la mortalidad total acumulada en menos de 1 hora de tratamiento.

El tiempo letal TL 90 fue alcanzado en 400 ppm a las 11 horas, en 500 ppm a las 3 horas y en 600 ppm a las 2 horas de tratamiento, indicando que los últimos 3 bioensayos fueron los únicos en lograr alcanzar los porcentajes de mortalidad TL 50 y TL 90 en menos de 12 horas.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ANOVA DE UN FACTOR.

Para realizar el análisis ANOVA de un factor se utilizó el software estadístico SPSS versión 17.0, para comparar una hipótesis nula (H0) y una hipótesis alternativa (H1), con el fin de demostrar si hubo una diferencia significativa sobre los promedios de mortalidad en la investigación. La Hipótesis nula (H_0) observa que los promedios de mortalidad sobre los tratamientos realizados no difieren significativamente, mientras la hipótesis alternativa (H_1) es válida cuando por lo menos un par de los promedios de los tratamientos tienen diferencias significativas, es decir, se observa un efecto significativo del insecticida para al menos una de las concentraciones empleadas.

Entonces si se rechazara la hipótesis alternativa (H_1) la concentración de los tratamientos no tiene alguna significancia en los resultados de las mortalidades, y en caso que se rechazara la hipótesis nula (H_0), las concentraciones de los tratamientos si inciden o tienen mucha significancia en el porcentaje de mortalidad de las larvas. Es importante tener en cuenta que la hipótesis alternativa (H_1) no es tenida en cuenta cuando un P-valor es decir la significancia es mayor a 0.05; en cambio es válida cuándo el P-valor es menor a 0.05.

En la tabla 4 se evidencia el análisis realizado en el programa teniendo como variable dependiente las concentraciones del insecticida tomadas de la regresión lineal desde 100 ppm hasta 600 ppm y también el testigo. Además como variable de respuesta se operó con la mortalidad acumulada de cada tratamiento al cabo de 48 horas.

Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA de un factor.

ANOVA de un factor

Concentración

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	336712,500	1	336712,500	33,182	,000
Intra-grupos	811800,000	80	10147,500		
Total	1148512,500	81			

Tras verificar el efecto significativo del insecticida se muestra que el P-valor es de 0.00, resaltando que es menor a 0.05; lo cual implica la no aceptación de la hipótesis nula (H0), suponiendo que por lo menos un par de las concentraciones empleadas en los tratamientos tuvieron una gran significancia sobre los promedios de las mortalidades de cada uno.

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La actividad larvicida del extracto etanólico de ***Syzygium aromaticum*** (Clavo de olor) para las larvas de IV estadio del ***Aedes aegypti*** muestra los primeros resultados de muertes desde el primer bioensayo de 100ppm a las 12 horas de tratamiento con una mortalidad acumulada del 1%, a las 24 horas éste porcentaje aumenta al 5,4% a las 24 horas, y al cabo de 48 horas hay un 39,6 % de mortandad lo que va mostrando su efecto larvicida de forma positiva. Una vez se aumenta la concentración a 200ppm a las 24 horas aumenta significativamente al 12,4% de mortalidad y a las 48 horas con el 54,2% de los individuos muertos se logra una efectividad superior al 50%, logrando así el efecto toxico del extracto a una concentración baja comparada con la concentración final del estudio. Ya en el bioensayo de 300ppm los resultados mostrados a partir de las 24 horas aumentan considerablemente hasta el 59,7% dando indicios de una toxicidad aguda del extracto en relación al tiempo de exposición, finalizando con el 86,5% de mortalidad acumulada a las 48 horas. En los tres últimos bioensayos de 400ppm, 5000ppm y 600ppm al cabo de 48 horas de exposición al extracto, se presenta un porcentaje de mortalidad del 100%, con lo cual se concluye que los resultados obtenidos en la investigación son positivos en cuanto al uso del extracto como un larvicida efectivo y de alta toxicidad.

De los seis bioensayos realizados los tiempos letales TL 50, se alcanzaron en los tratamientos número 2 y 3 donde la concentración del extracto fue de 200ppm con el 54,2% a las 48 horas, y para 300ppm el 59,7% a las 24 horas, indicando que el TL 50 se presenta en promedio a las 24 horas de exposición al tratamiento. Para los tiempos letales TL 90 la concentración de 400ppm muestra el porcentaje de 95% a las 12 horas de exposición alcanzando el 100% a las 24 horas, el tratamiento de 500ppm muestra el 89% de mortalidad a las 2 horas de exposición y el 100% a las 2 horas nuevamente al aumentar la dosis a 600ppm lo que indica su alta toxicidad y efectividad al eliminar la totalidad de los individuos expuestos.

A través de la regresión logarítmica se buscó establecer el valor exacto de la dosis de concentración para así obtener el valor para la CL50 y CL90, dichos valores se encuentran en la anexo N° (2), allí se muestra que en el rango de 135ppm a 140ppm se logra la CL 50 y en el rango de 385ppm y 390ppm se alcanza el CL 90. Sin embargo este

resultado debe ser precisado a través de la fórmula de regresión logarítmica que aparece en la página N° 33, donde se muestra que para alcanzar la CL 50 se necesita una concentración de 137.34ppm y para la CL 90 una concentración de 387.43

Se comprueba a través de esta investigación la eficiencia y eficacia de las propiedades larvicidas del extracto por arrojar datos altamente favorables a muy bajas concentraciones en un tiempo muy corto y en comparación con los estudios realizados por Affonso y Bhat se obtienen mejores resultados en cuanto al potencial larvicida en las larvas de IV estadio de Aedes aegypti en relación a las de la especie *Aedes albopictus*.

CONCLUSIONES.

- El extracto etanólico de ***Syzygium aromaticum*** muestra una alta eficiencia tóxica sobre larvas de IV Estadio de ***Aedes aegypti*** al cabo de 48 horas en condiciones de laboratorio, especialmente en concentraciones superiores a 300 ppm.

- El extracto etanólico de ***Syzygium aromaticum*** puede ser una excelente medida de control biológico contra mosquitos de ***Aedes aegypti,*** teniendo en cuenta los óptimos resultados de la presente investigación.

- 137.34 ppm es la concentración letal 50 y 387.43ppm es la concentración letal 90, según el método de regresión logarítmica.

- Las concentraciones empleadas en los diferentes tratamientos sí tienen efectos nocivos significativos sobre larvas de IV estadio de ***Aedes aegypti,*** según el análisis estadístico de varianza ANOVA de un factor.

- La única concentración en alcanzar el 100% de mortalidad en un periodo de 2 horas es la de 600 ppm, siendo muy favorable teniendo en cuenta que lo establecido por la OMS es que la concentración no puede pasar las 2000 ppm.

- Se establece que a mayor concentración del extracto mayor será la mortalidad, teniendo en cuenta que los tiempos de exposición para el efecto larvicida cada vez serán menores.

- El extracto de ***Syzygium aromaticum*** actúa como un tóxico agudo a muy bajas concentraciones causando casi un 100% de letalidad en las 2 primeras horas de exposición a concentraciones desde 500 ppm.

RECOMENDACIONES.

- Realizar una óptima producción de huevos de ***Aedes aegypti,*** puesto que se evidenció en las pruebas de laboratorio que al almacenarlos durante un periodo de tiempo al momento de ponerlos en el agua a eclosionar menos de la mitad de los mismos se convierten el larvas, dificultando la realización de los bioensayos.

- Evaluar la eficiencia del extracto para el control de mosquitos adultos mediante aplicación en superficies de reposo con la ventaja adicional que puede ser utilizado como aromatizante natural y control de plagas.

- En futuras investigaciones realizar pruebas del efecto larvicida del extracto etanólico de ***Syzygium aromaticum*** a nivel de campo en reservorios naturales para verificar su efectividad y su impacto ambiental.

- En caso de realizarse de nuevo este estudio, evaluar con concentraciones menores a 400 ppm debido a que demuestra una eficiencia del 100% antes de las 48 horas, y no es necesario realizarse en 500ppm y 600 ppm.

- Evaluar extractos acetónicos u otro medio de suspensión de dilución, dado que los extractos etanólicos sólo remueve principios activos no polares mientras que otros remueven polares como no polares.

- Evaluar la eficiencia del extracto en larvas de otras especies de mosquitos e insectos plaga como ***Aedes albopictus, Culex quinquefasciatus y Anopheles albimanus.***

- Es recomendable que en futuros estudios con el extracto etanólico de ***Syzygium aromaticum*** se evalúe el efecto larvicida sobre larvas de ***Aedes aegypti*** combinándose con otros extractos etanólicos tóxicos, con el fin de potencializar el efecto larvicida.

BIBLIOGRAFÍA.

Affonso, R. S.; Rennó, M. N.; Slana, G. B. C. A (2012), Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia, Revista Virtual de Quimica, Data de publicação na Web, Vol 4, No. 2, 146-161.Brasil 14 de Mayo de 2012. Recuperado en file:///C:/Users/Asistente/Downloads/254-2074-4-PB%20(1).pdf.

Bilal, H. (2012) Larvicidal activity of selected plant extract against Aedes albopictus Skuse (Diptera: Culicidae). African Entomology. 20(1):8-12.

Bhat S.K, (2009), African Journal of Biotechnology Vol. 8 (24), pp. 6933-6937, 15 December, 2009.

Gallego B. Jaime, (2006), Manual de parasitología, Morfología y biología de los parasitos de interés sanitario. Publicaciones I ediciones de la Universidad de Barcelona, Titulo II, 2006.

Kenneth L. Knight and Alan Stone (1977), A Catalog Of The Mosquitoes Of The World (Diptera: Culicidae), ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, trustees and editorial boar, Volume VI. Washington, D. C. Recuperado en http://www.mosquitocatalog.org/files/pdfs/070700-0.PDF.

Montero Guillermo, (Recopilación). Blog FCA, UNR, 11.09, 2009.

Nelson, M.J, Aedes aegypti: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud. Washington, DC. 50 pp. (1986).

Parra GJ, García CM, Cotes JM. (2007) Actividad insecticida de extractos vegetales sobre Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) vector del dengue en Colombia. Rev CES Med 2007; 21(1): 47-54.

Pereira, Álvaro Itauna Schalcher . Actividad antimicrobiana en la lucha contra el mosquito y larvas de Aedes aegypti: Homogeneización de los aceites esenciales de linalol y. Eugenol Educ. chem . 2014, vol.25, n.4, pp. 446-449. ISSN 0187-893X.Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-893X2014000400007&script=sci_abstract.

Raina VK, Srivastava SK, Aggarwal KK, Syamasundar KV, Kumar S (2001). Essential oil composition of Syzygium aromaticum leaf from Little Andaman, India. Flav. Fragr. J. 16: 334-336.

Salvatella Agrelo,R, (2009). Consultor nacional de OPS/OMS en Uruguay,Instituto de Higiene, Aedes aegypti (Linnaeus,1762)(Diptera, Culicidae), el vector del dengue y la fiebre amarilla. http://www.higiene.edu.uy/dengue.htm.

Sumangala B, Vivek K. (2009) Biocidal potential of clove oils against Aedes albopictus – A comparative study. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (24), pp. 6933-6937.

Vargas V. Mario, (1998) El mosquito, un enemigo peligroso (Diptera:culicidae), Titulo II, editorial de la Universidad de Costa Rica; 15-49,110,116,161.

MinSalud.Ministerio de Salud de Colombia (2014). http://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/chikunguna.aspx.

MinSalud. (2013). Ministerio de Salud y Protección Social. Recuperado el 26 de Agosto de 2014, de https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/INFORME%20SITUACION%20DE%20DENGUE.pdf.

Ministerio de Salud de Argentina (2009) Borrador de protocolo de acciones de control de Aedes aegypti en http://www.msal.gov.ar/images/stories/cofesa/2009/acta-02-09/anexo-7-control-de-vectores-02-09.pdf.

Ministerios de Salud de Colombia (2013) Dengue en Colombia Epidemiologia de la reemergencia http://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/INEC/INV/Dengue%20en%20Colombia.pdf.

MinSalud (2013). Ministerio de Salud de Colombia. Recuperado de https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/abc-chicungunya.pdf.

MinSalud. (2014). Ministerio de Salud de Colombia http://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/chikunguna.aspx.

MinSalud. (2014). Ministerio de Salud de Colombia. Recuperado en Agosto de 2014, https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/PLAN%20NACIONAL%20DE%20RESPUESTA%20CHIKUNGUNYA%20COLOMBIA%202014.pdf

MinSalud. (2014). Ministerio de Salud de Colombia. Recuperado del anexo 5, https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/Anexo%205%20%20Instrucciones%20para%20la%20Prevenci%C3%B3n%20y%20control%20integral%20de%20vectores%20CHIKV%202014.pdf.

MinSalud. Ministerio de Salud de Argentina, Directrices para la prevención y control de Aedes aegypti. Recuperado en http://www.msal.gob.ar/dengue/images/stories/pdf/boton-institucional/directrices/guia %20acciones%20 prevencion control aedes%20 aegypti.pdf.

MinAgricultura, Ministerio de Agricultura. Colombia. Plaguicidas Organicos, Plantas con acción insecticida Recuperado en http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/20067199296_Plantas%20con%20accion%20insecticida.pdf.

OPS.OMS. (2011). Ormagizacion panamericana de salud/ Organización mundial de la salud, división de epidemiologia Uruguay 2011. Recuperado en http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Manual%20de%20Vigilancia%20y%20Control%20de%20Aedes%20aegypti%202011_0.pdf.

OMS. (2014). Organización mundial de la Salud. Recuperado el 12 de 08 de 2014, de Dengue: http://www.who.int/topics/dengue/es/.

OMS. (2014). Organización mundial de la Salud. Recuperado en Marzo de 2014, nota informativa N° 100, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/es/.

OMS. (2015). Organización mundial de la Salud. Recuperado en Mayo de 2015, nota descriptiva N° 327 http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/.

INS. (Junio 2014). Instituto Nacional de Salud. recuperado de http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/sivigila/Protocolos%20SIVIGILA/PRO%20Dengue.pdf.

INS. Instituto Nacional de Salud, Octubre de (2014), dirección redes en salud publica, grupo entomología, vectores de Dengue – chikungunya estado actual, recuperado de http://www.ins.gov.co/Noticias/SiteAssets/Paginas/Reuni%C3%B3n-nacional-lineamientos-Chikungunya-y-%C3%89bola/presentacion_vectores_Dengue-CHK-oct-1-2014.ppt.

Clavo de olor - clavero - árbol del clavo, recuperado en http://www.hierbitas.com/nombrecomun/Clavo_de_olor.htm.

Botanical-Online SL. (1999 – 2015), Toxicidad del clavo de olor, recuperado en http://www.botanical-online.com/clavo_toxicidad.htm.

NCBI. (2012). Biblioteca Nacional de Medicina / Institutos Nacionales de Salud. Relaciones de estructura-actividad de derivados del eugenol contra larvas de Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). Recuperado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674880.

Plan Ceibal. Fiebre del Dengue (Montevideo - Uruguay), recuperado en http://www.ceibal.edu.uy/contenidos/areas_conocimiento/cs_naturales/dengue_090225/propa.htm.

Revista Ciencia en Desarrollo, La química verde como fuente de nuevos compuestos para el control de plagas agrícolas Vol. 4 No. 2. ISSN 0121-7488 – Enero-Diciembre de 2013, pp.83-91.

State Of California—Health And Human Services Agency (2014). California Department of Public Health Division of Communicable Disease Control. Hoja Informativa sobre Aedes aegypti – (Mosquito de la Fiebre Amarilla). Recuperado en https://www.cdph.ca.gov/HealthInfo/discond/Documents/AeaegyptiFactSheetSPA.pdf.

ANEXOS.

ANEXO 1. Registro de mortalidades en los tratamientos.

Registro de mortalidades en el tratamiento de 100 ppm entre las 0 y 48 horas.

100 PPM	Hora 0	Hora 2	12 Horas	24 Horas	36 Horas	48 Horas
Testigo	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	1 Larva muerta	1 Larva muerta
Vaso 1	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	2 Larvas muertas	3 Larvas muertas	6 Larvas muertas
Vaso 2	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	1 Larva muerta	1 Larva muerta	4 Larvas muertas	4 Larvas muertas
Vaso 3	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	2 Larvas muertas	6 Larvas muertas	3 Larvas muertas
Vaso 4	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	5 Larvas muertas	6 Larvas muertas

Fuente: Autores del proyecto.

Registro de mortalidades en el tratamiento de 200 ppm entre las 0 y 48 horas.

200 PPM	Hora 0	Hora 2	12 Horas	24 Horas	36 Horas	48 Horas
Testigo	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	1 Larva muerta	0 larvas muertas	2 Larvas muertas.	1 larva muerta
Vaso 1	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	1 Larva Muerta	3 larvas muertas	2 Larvas muertas.	8 larvas muertas
Vaso 2	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	3 larvas muertas	4 Larvas muertas.	3 larvas muertas
Vaso 3	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	4 larvas muertas	5 Larvas muertas.	6 larvas muertas
Vaso 4	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	2 larvas muertas	8 Larvas muertas.	7 larvas muertas

Fuente: Autores del proyecto.

Registro de mortalidades en el tratamiento de 300 ppm entre las 0 y 48 horas.

300 PPM	Hora 0	Hora 2	12 Horas	24 Horas	36 Horas	48 Horas
Testigo	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas.	1 larva muerta	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas.
Vaso 1	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	2 Larvas muertas.	14 larvas muertas	4 larvas muertas	0 Larvas muertas.
Vaso 2	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	1 Larvas muertas.	16 larvas muertas	5 larvas muertas	1 Larvas muertas.
Vaso 3	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	2 Larvas muertas.	9 larvas muertas	7 larvas muertas	2 Larvas muertas.
Vaso 4	0 Larvas muertas	0 Larvas muertas	1 Larvas muertas.	15 larvas muertas	7 larvas muertas	1 Larvas muertas.

Fuente: Autores del proyecto.

Registro de mortalidades en el tratamiento de 400 ppm entre las 0 y 48 horas.

400 PPM	Hora 0	Hora 2	12 Horas	24 Horas	36 Horas	48 Horas
Testigo	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 1	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	25 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 2	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	25 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 3	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	23 Larvas muertas.	2 larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 4	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	22 Larvas muertas.	3 larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.

Fuente: Autores del proyecto.

Registro de mortalidades en el tratamiento de 500 ppm entre las 0 y 48 horas.

500 PPM	Hora 0	Hora 2	12 Horas	24 Horas	36 Horas	48 Horas
Testigo	0 larvas muertas	0 muertas	0 muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 1	0 larvas muertas	23 larvas muertas	2 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 2	0 larvas muertas	22 larvas muertas	3 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 3	0 larvas muertas	21 larvas muertas	4 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 4	0 larvas muertas	23 larvas muertas	2 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.

Fuente: Autores del proyecto.

Registro de mortalidades en el tratamiento de 600 ppm entre las 0 y 48 horas.

600 PPM	Hora 0	Hora 2	12 Horas	24 Horas	36 Horas	48 Horas
Testigo	0 larvas muertas	25 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 1	0 larvas muertas	25 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 2	0 larvas muertas	25 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 3	0 larvas muertas	25 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.
Vaso 4	0 larvas muertas	25 larvas muertas	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.	0 Larvas muertas.

Fuente: Autores del proyecto.

Anexo 2. Cálculo de las aproximaciones de las concentraciones letales CL 50 y CL 90. (Véase tabla 10).

concentración	Mortalidad en valores de probabilidad	concentración	Mortalidad en valores de probabilidad
100	0,377614141	355	0,866275831
105	0,396432507	360	0,871670325
110	0,414375277	365	0,876990409
115	0,431520322	370	0,882238109
120	0,447935565	375	0,887415368
125	0,463680608	380	0,892524052
130	0,478808038	385	0,897565954
135	0,493364482	390	0,902542797
140	0,507391482	395	0,90745624
145	0,520926204	400	0,912307876
150	0,534002033	405	0,917099242
155	0,546649068	410	0,921831816
160	0,558894541	415	0,926507025
165	0,570763169	420	0,931126242
170	0,582277457	425	0,935690792
175	0,59345795	430	0,940201955
180	0,604323457	435	0,944660964
185	0,614891242	440	0,949069012
190	0,625177185	445	0,953427251
195	0,63519593	450	0,957736793
200	0,644961008	455	0,961998714
205	0,654484949	460	0,966214057
210	0,663779375	465	0,970383827
215	0,672855087	470	0,974509
220	0,681722145	475	0,97859052
225	0,690389925	480	0,9826293
230	0,698867189	485	0,986626227
235	0,707162133	490	0,990582159
240	0,715282433	495	0,994497929
245	0,723235292	500	0,998374344
250	0,731027476	505	1,002212186
255	0,738665349	510	1,006012217
260	0,746154905	515	1,009775174
265	0,753501794	520	1,013501773
270	0,76071135	525	1,01719271

275	0,767788612	530	1,020848661
280	0,77473835	535	1,024470284
285	0,781565077	540	1,028058217
290	0,788273072	545	1,031613081
295	0,794866395	550	1,03513548
300	0,8013489	555	1,038626001
305	0,807724252	560	1,042085217
310	0,813995935	565	1,045513685
315	0,820167267	570	1,048911944
320	0,826241408	575	1,052280525
325	0,832221373	580	1,05561994
330	0,838110037	585	1,058930689
335	0,843910146	590	1,062213262
340	0,849624325	595	1,065468134
345	0,855255082	600	1,068695768
350	0,860804818		

Fuente: Autores.

Anexo 3. Formato registro para porcentajes de mortalidades acumuladas durante los bioensayos.

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS FACULTAD DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
ESTUDIO DE MORTALIDADES DE LARVAS
Aedes Aegypti *CON EXTRACTO DE* ***Syzygium aromaticum*** *(clavo de olor).*

TRATAMIENTOS		Conteo inicial	MORTALIDADES EN EL TIEMPO												Nº ACUMULADO TOTAL	% Mortalidad final	% PROMEDIO TTO
			0 HORAS		2 HORAS		12 HORAS		24 HORAS		36 HORAS		48 HORAS				
			Nº	%	Nº	% Acum	Nº	% Acum	Nº	% Acum	Nº	% Acum	Nº	% Acum			
TESTIGO	R1	25	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	1	8	2	8	4
	R2	25	0	0	0	0	0	0	0	0	2	8	1	12	3	12	
	R3	25	0	0	0	0	0	0	1	4	0	4	0	4	1	4	
	R4	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	R5	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	R6	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Promedio testigo				0		0		0		0,667		2,667		4		4	
T 1 - 100 PPM	R1	25	0	0	0	0	0	0	2	8	2	16	6	40	10	40	42
	R2	25	0	0	0	0	1	4	1	8	4	24	4	40	10	40	
	R3	25	0	0	0	0	0	0	2	8	6	32	3	44	11	44	
	R4	25	0	0	0	0	0	0	0	0	5	20	6	44	11	44	
promedio 100PPM				0		0		1		6		23		42		42	
T2 - 200PPM	R1	25	0	0	0	0	1	4	3	16	2	24	8	56	14	56	56
	R2	25	0	0	0	0	0	0	3	12	4	28	3	40	10	40	
	R3	25	0	0	0	0	0	0	4	16	5	36	6	60	15	60	
	R4	25	0	0	0	0	0	0	2	8	8	40	7	68	17	68	

Promedio 200 PPM				0		0		1		13		32		56		56	
T3-300PPM	R 1	25	0	0	0	0	2	8	14	64	4	80	0	80	20	80	87
	R 2	25	0	0	0	0	1	4	16	68	5	88	1	92	23	92	
	R 3	25	0	0	0	0	2	8	9	44	7	72	2	80	20	80	
	R4	25	0	0	0	0	1	4	15	64	7	92	1	96	24	96	
Promedio 300 PPM				0		0		6		60		83		87		87	
T4 - 400PPM	R 1	25	0	0	0	0	25	100	0	100	0	100	0	100	25	100	100
	R 2	25	0	0	0	0	25	100	0	100	0	100	0	100	25	100	
	R 3	25	0	0	0	0	23	92	2	100	0	100	0	100	25	100	
	R4	25	0	0	0	0	22	88	3	100	0	100	0	100	25	100	
Promedio 400 PPM				0		0		95		100		100		100		100	
T5 - 500 PPM	R 1	25	0	0	23	92	2	100	0	100	0	100	0	100	25	100	100
	R 2	25	0	0	22	88	3	100	0	100	0	100	0	100	25	100	
	R 3	25	0	0	21	84	4	100	0	100	0	100	0	100	25	100	
	R4	25	0	0	23	92	2	100	0	100	0	100	0	100	25	100	
Promedio 500 PPM				0		89		100		100		100		100		100	
T56 - 600 PPM	R 1	25	0	0	25	100	0	100	0	100	0	100	0	100	25	100	100
	R 2	25	0	0	25	100	0	100	0	100	0	100	0	100	25	100	
	R 3	25	0	0	25	100	0	100	0	100	0	100	0	100	25	100	
	R4	25	0	0	25	100	0	100	0	100	0	100	0	100	25	100	
Promedio 600 PPM				0		100		100		100		100		100		100	

Fecha de Inicio	01/04/2015
Fecha de Finalización	01/07/2015
Responsable(s) de la prueba	Eliana Suárez Moreno - Luisa Fernanda Manrique López