Evaluación del insecticida del extracto de caléndula (*Calendula officinalis*) sobre larvas de mosquitos *Aedes aegypti*

Daniela Aguilar Barragán

Leidy Lorena Díaz Donoso

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES

TECNOLOGÍA EN SANEAMIENTO AMBIENTAL

BOGOTÁ D.C. 2023

Evaluación del insecticida del extracto de caléndula (*Calendula officinalis*) sobre larvas de mosquitos *Aedes aegypti*

Daniela Aguilar Barragán
Código 20172085009

Leidy Lorena Díaz Donoso
Código 20172085056

Proyecto de grado en modalidad de investigación-innovación presentado como requisito parcial para optar por el título de Tecnólogas en Saneamiento Ambiental

Diego Tomas Corradine Mora
Médico Veterinario – Msc. Salud Pública
Director

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
TECNOLOGÍA EN SANEAMIENTO AMBIENTAL
BOGOTÁ D.C. 2023

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarnos salud, fortaleza, sabiduría y paciencia para lograr el desarrollo del proyecto.

A mis padres por el apoyo incondicional que me brindaran cada día, la educación que me han ofrecido y las lecciones de vida.

A nuestro docente Diego Tomas Corradine Mora por su conocimiento, acompañamiento y su guía durante el desarrollo del proyecto.

A todos nuestros docentes por sus enseñanzas, conocimientos, apoyo y dedicación durante estos años.

A mi sobrino Alejandro por ser mi motivación cada día.

A la universidad distrital por brindarme las herramientas para culminar mis estudios.

A mi pareja Cristian por apoyarme todos estos años, por ayudarme, apoyarme y ser mí guía.

A mi abuela que, aunque no está conmigo me ha dado la bendición de tener una madre extraordinaria y una gran familia.

Agradecemos al laboratorio de ecología y zoonosis por su apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Este proyecto se lo dedico principalmente a mi madre, quien fue mi mayor apoyo en el transcurso de toda mi carrera, a mi papá por estar presente y ayudarme, a mi hija que es una de mis mayores motivaciones en este proceso de la vida y en este crecimiento personal y académico, a mi tía que a pesar de que no esté en este plano físico, estuvo durante gran parte de mi proceso y que está presente conmigo en el plano espiritual.

Agradezco a la vida principalmente y a la universidad pública, por permitirme culminar esta etapa y avanzar en mi vida profesional, por formarme académicamente, socialmente y políticamente, por enseñarme un poco más sobre el mundo y sus miles de adversidades, a que siempre debo luchar y reclamar mis derechos por sobre todo sin importar lo difícil que sea, a los profesores que estuvieron en el transcurso de este trayecto por formarme y enseñarme cada día sobre como conllevar esta carrera. Agradezco grandemente al profesor Diego Tomas Corradine por ser un apoyo tan especial e importante en este proceso, por ser un excelente docente para guiar este proyecto y por brindarnos especialmente de su tiempo para concluir esto.

Por Lorena Díaz y Daniela Aguilar

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN 8
ABSTRACT 9
INTRODUCCIÓN 10
1. OBJETIVOS 14
1.1 Objetivo general 14
1.2 Objetivos específicos 14
2. JUSTIFICACIÓN 15
3. MARCO TEÓRICO 17
3.1 MARCO DE REFERENCIA 17
3.1.1 Aedes aegypti 17
3.1.2 Ciclo de vida 18
Fase 1. Huevo 19
Fase 2. Larva 20
Fase 3. Pupa 21
Fase 4. Adulto 22
3.2 Distribución de *Aedes aegypti* 23
3.3 ENFERMEDADES DE SALUD PÚBLICA CAUSADAS POR *Aedes aegypti* 25
3.3.1 CHIKUNGUNYA 25
3.3.2 FIEBRE AMARILLA 26
3.3.3 ZIKA 26
3.3.4 DENGUE 27
3.3.5 MÉTODOS DE CONTROL DE *AEDES AEGYPTI* 28
3.4 Calendula officinalis 29
3.4.1 Aspectos químicos 30
3.5 MODELOS ESTADÍSTICOS 31
3.5.1 PROBIT 31
3.5.2 ANOVA 32
4. METODOLOGÍA 33
Tipo de estudio. 33
Enfoque de investigación. 33
Fase 1. Recopilación de la información para el estudio. 34
Fase 2. Obtención del material biológico 34
Fase 3. Obtención del extracto vegetal 35
Fase 4. Bioensayos 36
Fase 5. Realización de Bioensayos 37

Fase 6. Recolección de datos 38
Fase 7. Análisis de resultados.....39
5. RESULTADOS.....39
6. ANALISIS DE RESULTADOS.....44
6.1 COMPARACIÓN DE LA MORTALIDAD.....44
6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 45
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....50
8. RECOMENDACIONES.....53
9. BIBLIOGRAFÍA.....55
10. ANEXOS.....61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aedes aegypti 17
Figura 2. Etapas de la vida de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*..... 19
Figura 3. Huevos *Aedes aegypti* Figura 4. Huevos Aedes aegypti 20
Figura 5. Larva *Aedes aegypti*..... 21
Figura 6. Larvas *Aedes aegypti*..... 21
Figura 7. Pupa Aedes aegypti 22
Figura 8. *Aedes aegypti* macho y hembra adultos 23
Figura 9. Distribución de Aedes aegypti 24
Figura 10. Recipiente con huevos *Aedes aegypti*..... 34
Figura 11 y Figura 12. Preparación de concentraciones del extracto de *Caléndula officinalis*. 37
Figura 13 y Figura 14. Montaje Bioensayos. Fuente: Autoras 38
Figura 15. Individuos Muertos Figura 16. Recolección larvas 39
Figura 17. Resultados mortalidad a partir de las diferentes concentraciones de bioensayo. Fuente Autoras..... 42
Figura 18. Prueba Probit para la concentración letal CL50 y CL90..... 48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía Aedes aegypti 18
Tabla 2. Clasificación taxonómica de la caléndula. 30
Tabla 3. Concentraciones del extracto calendula officinalis..... 36
Tabla 4. Porcentajes mortalidad de larvas de Aedes aegypti 40
Tabla 5. Resultados obtenidos del análisis Probit 46
Tabla 6. Análisis de varianza. 50

ANEXOS

Anexo 1. Registro de Mortalidad Bioensayo Caléndula..... 61
Anexo 2. Resultados Probit..... 62
Anexo 3. Análisis estadístico ANOVA. 63
Anexo 4. Resultados Porcentaje de Mortalidad..... 64

RESUMEN

El *Aedes aegypti,* más conocido como el mosquito de la fiebre amarilla es uno de los vectores con mayor incidencia en Colombia, se ha visto en aumento en las zonas urbanas y representa un riesgo importante en la salud pública, donde se ve afectada más de la mitad de la población a nivel nacional; además esta especie tiene una ventaja en cuanto a adaptabilidad respecto a otras especies, lo cual indica que son una especie altamente invasora, debido a que sus huevos son resistentes a ambientes hostiles, además el medio de transporte de estos son los humanos lo cual facilita su reproducción y expansión. Por tal motivo en este proyecto buscamos una alternativa ecológica y sostenible para la eliminación de sus larvas, evaluando el efecto de la caléndula (*Calendula officinalis*) como insecticida, ya que esta planta contiene propiedades medicinales y pertenece a un grupo vegetal con actividad insecticida altamente efectiva en plagas. Este producto sería de gran innovación en agentes biológicos de organismos de interés en salud pública reduciendo el impacto químico en algunos ecosistemas donde *Aedes aegypti* habita y pone sus huevos. El extracto demostró tener un efecto de letalidad directamente proporcional a la concentración del extracto desde 33% hasta 99% sobre larvas de estadio cuatro al cabo de 48 horas, con concentraciones ascendentes desde 250 hasta 1250 ppm: La CL50 fue de 318ppm y la CL90 fue de 983ppm.

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

ABSTRACT

The *Aedes aegypti*, better known as the yellow fever mosquito, is the vector with the highest incidence in Colombia, has been increasing in urban areas and represents a major risk to public health, where more than half of the population is affected nationally; in addition, this species has an advantage in terms of adaptability over other species, which indicates that they are a highly invasive species, because their eggs are resistant to hostile environments, also the means of transport of these are humans which facilitates their reproduction and expansion. For this reason in this project we are looking for an ecological and sustainable alternative for the larvae elimination by evaluating the effect of caléndula *(Calendula officinalis)* as an insecticide, since this plant contains medicinal properties and belongs to a plant group with highly effective insecticidal activity on pests. This product would be of great innovation in biological agents of organisms of public health interest reducing the chemical impact in some ecosystems where *Aedes aegypti* inhabits and lays its eggs. The Extract show lethality effect directly proportional to the extract concentration from 33% until 99% over four stage larvae after 48 hours, with ascendent concentration from 250 until 1250 ppm. CL50 it was 318ppm and CL90 was 983ppm.

Key words: *Aedes aegypti*, insecticide, Caléndula, *Calendula Officinalis*, mosquitoes.

INTRODUCCIÓN

Colombia es un país agrícola por excelencia y el uso de plaguicidas se ha convertido en una necesidad básica para los cultivos de frutas y hortalizas, como herramienta de control efectivo de enfermedades, insectos, malezas y otros organismos que interfieren con la producción de cultivos. Sin embargo, su uso inadecuado, especialmente en exceso, su aplicación en momentos inadecuados y en cultivos no registrados, convierte a estas sustancias en potenciales riesgos para la salud humana y el medio ambiente en general, ya que suelen ser productos tóxicos que pueden dejar residuos en manos de los consumidores, manipuladores, así como en el producto final, reduciendo así su calidad. Los plaguicidas se utilizan indiscriminadamente en el país debido a que una de las prácticas agrícolas más comunes es el monocultivo no tecnificado, además del bajo nivel educativo de quienes manipulan el producto en el campo, lo que genera un mayor nivel de riesgo para los agricultores (Guerrero, 2003).

La agricultura moderna que implementa monocultivos a gran escala crea varios problemas en términos de resistencia de las plantas cultivadas, plagas y enfermedades específicas. El uso excesivo de plaguicidas de origen químico, sin asistencia técnica previa, en lugar de solucionar el problema, ha causado graves daños a la productividad agrícola, a las personas y a la naturaleza (Brechelt, 2004). La tendencia al alza en el uso de pesticidas es más pronunciada en los países en desarrollo, tanto en el sector agrícola como en la salud pública. La alta incidencia de intoxicaciones y muertes cada año, los daños a la salud por sus efectos crónicos (muchos de los cuales no se conocen del todo) y la contaminación ambiental son algunos de los principales problemas que

provocan (Pérez, 2010).

Actualmente, muchas instituciones están buscando alternativas menos dañinas, aprovechando las defensas naturales de los organismos y renovando por completo las técnicas agrícolas tradicionales (Brechelt, 2004). El control químico ha sido el principal método de control de plagas durante décadas, acumulándose un riesgo para el medio ambiente y la salud derivados del uso de plaguicidas que también comprometen la sostenibilidad de los sistemas agrícolas. A pesar de la preocupación pública por los daños que causan, su uso se ha incrementado en los últimos años, pero los daños causados por las plagas que atacan los cultivos no han disminuido, y globalmente estas pérdidas pueden alcanzar un valor superior al 50% (Oerke, 2006).

En diferentes partes del mundo, los sistemas agroalimentarios dependen en gran medida de los insumos químicos, pero la experiencia emergente en otros lugares sugiere que los problemas de plagas pueden abordarse desde una perspectiva ecológica y sostenible. Comprender los riesgos asociados con el uso de plaguicidas y las tecnologías y métodos alternativos para usarlos sin duda ayudará a aumentar la conciencia y reducir sus impactos negativos en la salud humana y el medio ambiente (Pérez, 2010).

La interacción de los insectos con las plantas ha dado lugar a una enorme variedad de metabolitos secundarios con actividad insecticida y estas propiedades han sido utilizadas por el hombre desde tiempos remotos para el control de plagas (Pascual, 1998). Así mismo, cabe señalar que los vectores tienen varias formas de propagación

como el transporte de mercancías de un lugar a otro del planeta o mediante el tráfico ilegal de flora y fauna que crea un puente de incidencia en su propagación (Estrada, 2015), lo cual, es de gran importancia para la salud pública, ya que como lo indica Gómez (2018). *Aedes aegypti* se considera como el principal vector del dengue, dada su preferencia por la sangre humana, siendo a su vez transmisor de otros virus como el chicungunya y el zika.

Para el control de insectos plaga es de vital importancia conocer su ciclo biológico, cuáles son sus enemigos naturales, en qué etapa de su desarrollo se produce el daño y cuándo es más susceptible, de manera que podamos utilizar medidas preventivas y realizar controles eficaces (Valenzuela, 2015).

Las especies vegetales poseen propiedades insecticidas, tal es el caso de la caléndula, que es una planta herbácea de olor desagradable; los extractos de sus raíces y flores se ha utilizado como repelentes e insecticidas contra mosquitos del género Aedes (Diptera: *Culicidae*);los metabolitos secundarios tiene interacciones ecológicas por lo que se determinó que dichos componentes cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, además actúan como agentes alelopáticos o atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas (Valenzuela, 2015).

La caléndula (*Calendula officinalis*) es una planta herbácea de unos 30 a 50 cm de altura originaria del sur de Europa y de Oriente próximo. La planta contiene calendulina, sustancia insípida de color amarillento y consistencia mucilaginosa, También se destaca en las flores de caléndula un aceite esencial, del cual se plantea

un rendimiento de 0.2% (Pascual, 1998).

Se ha estudiado la actividad anti-insectos, en ensayos de laboratorio, de extractos vegetales obtenidos a partir de especies de las familias *Solanaceae* y *Compositae* (género Caléndula), utilizando la plaga de almacén *Tribolium castaneum* (Coleóptera: *Tenebrionidae)* (Pascual,1998). Las hojas, tallos, flores y frutos de *C. officinalis* produjeron repelencia en larvas, al ser mezclados sus extractos en la dieta (dosis de 0,05%), si bien se apreciaron variaciones en función de la procedencia del material vegetal. El mayor índice de repelencia fue el de *C. arvensis* (Pascual, 1998).

En este trabajo, se presentan los resultados de la Evaluación del insecticida del extracto de caléndula (*Calendula officinalis*) sobre larvas de IV estadio de mosquitos *Aedes aegypti* de actividad insecticida, buscando alternativas naturales en el control del vector, ya que este es una extracto natural que no es nocivo para el medio ambiente, tomando como objetivo principal establecer si el extracto etanólico de la caléndula (*Calendula officinalis*) tiene propiedades como agente tóxico en la actividad larvaria del mosquito *Aedes aegypti*, fomentando el avance biológico para contrarrestar los insecticidas sintéticos utilizados actualmente en el país, así mismo, siendo amable con el ambiente y de fácil acceso.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

- Establecer si el extracto etanólico de la caléndula (C*alendula officinalis*) tiene propiedades como agente tóxico en la actividad larvaria del mosquito *Aedes aegypti.*

1.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración del extracto etanólico de la caléndula (*Calendula officinalis*) en la cual el 50 % de los individuos presenta letalidad (CL50) y el 90 % de los individuos presenta letalidad (CL90).
- Determinar los tiempos letales 50 y 90 con las diferentes concentraciones evaluadas.

2. JUSTIFICACIÓN

Aedes aegypti es un mosquito que presenta diferentes características biológicas las cuales son importantes en el tema de la transmisión de patógenos, en especial arbovirus. Según (García, 2018) en la última década se ha logrado establecer información sobre la transmisión de algunas enfermedades tales como la fiebre amarilla, fiebre del zika y chikungunya y el papel que toma en la transmisión de estas el mosquito *Aedes aegypti*, con ello también publicó diversas alternativas de control para algunas zonas con más índice de riesgo en Colombia. Esta especie tiene ciertas características las cuales le dan ventaja para adaptarse, respecto a otras especies, lo cual la convierte en una especie exitosamente invasora, esto se da gracias a que sus huevos son un poco resistentes a la desecación, lo cual los hace resistentes a más ambientes, y ayuda al transporte por medio de humanos, debido a la tendencia de alojarse en recipientes pequeños en la etapa inmadura (Rey, 2015).

Para contrarrestar esta problemática se buscan alternativas ecológicas, amigables con el medio ambiente y sostenibles, como lo son los extractos de plantas y aceites vegetales para la eliminación de larvas y mosquitos, a través de la extracción de proteínas con poder toxicológico sobre adultos e inmaduros como es el caso de acetogeninas y alcaloides los cuales se pueden encontrar en la corteza y la semilla de la planta, la raíz, el fruto y la hoja de las anonaceas. (Rey, 2015).

Los insecticidas y larvicidas utilizados corrientemente para controlar el vector transmisor del dengue (*Aedes aegypti*) son productos organofosforados y carbamatos ampliamente utilizados en varios países de América del Sur y Central, y por supuesto en Colombia, donde el clima es propicio para el mayor crecimiento de diversidad de mosquitos

incluido *Aedes aegypti*. Sin embargo, varios estudios realizados en diferentes regiones tropicales han demostrado que las poblaciones de mosquitos son resistentes o susceptibles a diversos insecticidas, incluido uno de los agentes de control de vectores más utilizados en nuestro país. Pero a través del uso de pesticidas químicos, el medio ambiente se contamina y puede afectar el ecosistema que habita el vector, lo que resulta en cambios en el medio ambiente, su ecología y en su equilibrio natural, trayendo cambios importantes ya sea en el suelo, en el agua, y en el aire. Tradicionalmente se han distribuido insecticidas químicos, pero más recientemente se han mencionado los insecticidas naturales, donde se sugiere utilizar las propiedades de las plantas para producir insecticidas (Cano, 2017).

Se busca aportar nuevos resultados a la investigación e innovación de posibles agentes para el control biológico de organismos de interés en salud pública, asimismo aportar opciones que representan menores riesgos a la salud humana y al medio por contaminación de químicos con posibles efectos de bioacumulación. Es por lo anteriormente mencionado, que la investigación se enfoca en el uso del extracto etanólico de caléndula como potencial larvicida del mosquito vector del dengue, *Aedes aegypti*.

Una de las soluciones más utilizadas es el uso de larvicidas, que interrumpen el ciclo reproductivo de *Aedes aegypti* y por tanto impiden la reproducción a largo plazo. Se sabe que muchos larvicidas son tóxicos para los seres humanos, los animales, la flora, el suelo y las fuentes de agua, y los vectores están desarrollando resistencia a los larvicidas químicos, lo que reduce la eficacia de los programas de control. Por otro lado, se buscan larvicidas basados en elementos naturales que sean amigables con el medio ambiente y que tengan un alto nivel de efectividad (Cano, 2017).

3. MARCO TEÓRICO

3.1 MARCO DE REFERENCIA

3.1.1 Aedes aegypti

Aedes aegypti se originó en África, debido a que sus ecosistemas selváticos y domésticos favorecieron su desarrollo. En América se caracteriza por ser un mosquito doméstico que se reproduce en recipientes artificiales de las viviendas (Bar, 2010). Para 1980 *Aedes aegypti* tomó fuerza en su crecimiento y desarrollo desmedido gracias a las condiciones en las que se encontraba, tales como sitios urbanos que facilitaban su reproducción, malas prácticas en saneamiento e insuficiencia en sanidad, así como el desarrollo de resistencia a ciertos insecticidas (García, 2018).

Aedes aegypti tiene un cuerpo pequeño de 5-10 mm es negro con escamas blancas plateadas, por lo cual las patas tienen un aspecto bandeado y su tórax presenta bandas con un diseño con apariencia similar a una lira (Gutiérrez, 2017).



Figura 1. Aedes aegypti Fuente: Osfatlyf, 2012

Como se puede observar en la figura 1, *Aedes aegypti* suele conocerse gracias

a sus patas con rayas blancas y porque se para con las patas traseras levantadas. Otro aspecto a resaltar es que solo las hembras son las que succionan sangre, pican en áreas expuestas del cuerpo en horas de la mañana de 7am a 10 am o a finales de la tarde tipo 4 pm a 7 pm (Gutiérrez, 2017).

La clasificación taxonómica la podemos ver en la tabla 1.

Taxonomía *Aedes Aegypti*	
Dominio Eukarya	Suborden Nematocera
Reino Animalia	Familia *Culicidae*
Filo Anthropoda	Sección *Culicini*
Clase Insecta	Género *Aedes*
Orden Diptera	Especie *Aegypti*

Tabla 1. Taxonomía Aedes aegypti Fuente: (Fundación charles Darwin, 1762)

3.1.2 Ciclo de vida

Aedes aegypti tarda de 3 a 10 días para desarrollarse, vive aproximadamente 1 mes, su ciclo de vida comienza en el agua estancada donde sus huevos se transforman en larvas que pasan por cuatro estadios aumentando progresivamente de tamaño y luego pasan a la fase de pupa, la cual es muy activa pero ya no se alimenta y finalmente evoluciona al mosquito que abandona el medio acuático, es un insecto volador con hábitos terrestres listo para reproducirse al cabo de 24 horas y cuya vida media oscila entre 15 días y más de 2 meses *(ver figura 2)* (Gutiérrez, 2017).

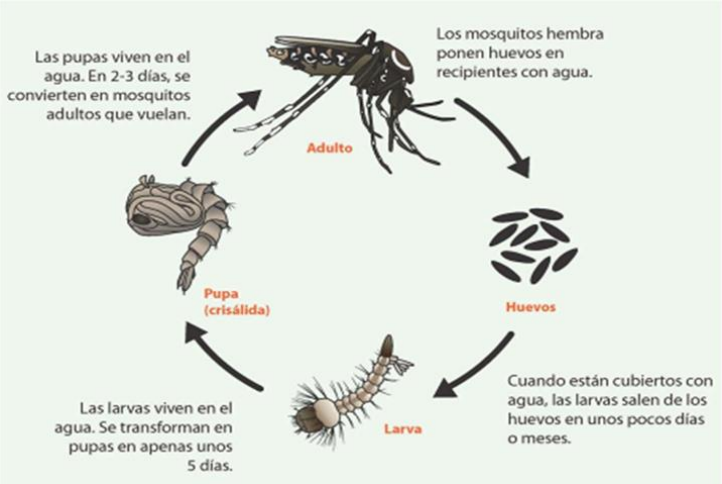
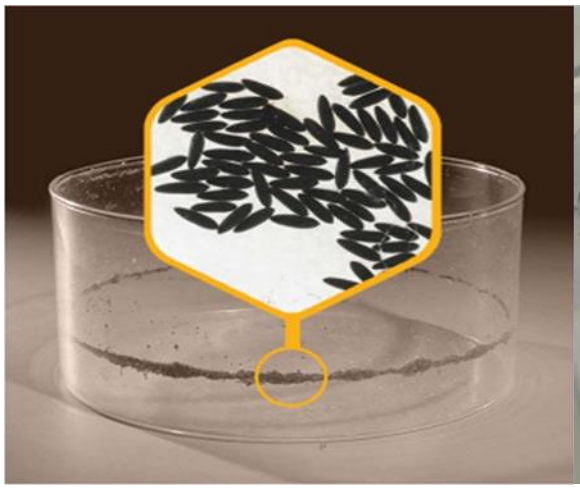


Figura 2. Etapas de la vida de los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

Fuente: Centros para el control y la prevención de Enfermedades, junio 2022.

Fase 1. Huevo

En cuanto a la etapa de huevos en *Aedes aegypti*, estos miden 1 mm de longitud, como podemos ver en la figura 3 y 4, son largos como la forma de un cigarrillo y su textura es suave y tersa; estos se depositan encima del nivel del agua de las paredes del recipiente que hayan elegido, usualmente eligen recipientes con agua estancada o con alta carga de materia orgánica, el ambiente también influye mucho ya que si es un ambiente húmedo y cálido se fecunda en 48 horas. Por el contrario, si el ambiente es más hostil a sus necesidades puede prolongarse a cinco días en caso de temperaturas bajas, estos huevos también resisten periodos prolongados de desecación, pueden resistir hasta un año, lo cual los hace ser un vector más difícil de controlar. En cuanto a su eclosión algunos eclosionan a los 15 minutos después de tener contacto con el agua, en otros casos deben ser mojados varias veces (Chico, 2019).



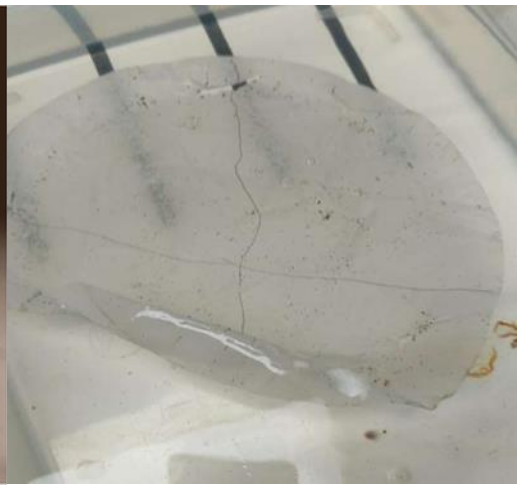


Figura 3. Huevos *Aedes aegypti* **Figura 4. Huevos Aedes aegypti**

Fuente: Unidad de control de vectores de puerto rico, enero 2018

Fuente: Autoras

Fase 2. Larva

Las larvas salen de los huevos y viven en el agua. Sin embargo, algunos huevos de mosquito deben secarse por completo antes de eclosionar. La mayoría de las especies, como los miembros del género *Aedes,* tienen un conducto de aire y respiran en la superficie la mayor parte del tiempo. Algunas especies tienen tubos de aire especiales y se adhieren a las plantas en el agua, utilizando tejido vegetal para el acceso al aire y la respiración (Chico, 2019).

Las larvas se caracterizan por ser exclusivamente de agua como podemos ver en la figura 5, siendo esta una fase de alimentación y crecimiento, las larvas del género *Aedes aegypti* se caracterizan a simple vista debido a que en la superficie del agua se mantienen verticales y nadan con un movimiento serpentino (ver figura 6) (Chico, 2019).



Figura 5. Larva *Aedes aegypti* Fuente: Nuestro clima, marzo 2020



Figura 6. Larvas *Aedes aegypti* Fuente: Autoras

Fase 3. Pupa

Como podemos ver en la figura 7 las pupas de *Aedes aegypti* son acuáticas, no tienen necesidad de alimentarse ya que su función es la metamorfosis de larva a adulto, se mantienen flotando en la superficie del agua, lo cual facilita que evolucione a etapa adulto, este estadio dura dos o tres días si no intervienen los factores ambientales (Chico, 2019). En su base la pupa tiene su tórax, el cual, por medio de un

par de tubos respiratorios o trompetas que atraviesan la superficie del agua, permite su respiración. Su base abdominal posee unos remos o aletas natatorias que le permiten nadar. Su temperatura favorable esta entre 28 y 32°C (coloma,2020).



Figura 7. Pupa Aedes aegypti Fuente: Salud Escolar, 2016

Fase 4. Adulto

Al salir de estadio pupa, el adulto debe permanecer en reposo mientras su exoesqueleto endurece al igual que sus alas toman consistencia, al cumplir las 24 horas ya pueden empezar con el apareamiento e iniciar su etapa reproductora, donde las hembras atraen al macho con su sonido de las alas. Sin embargo, una vez la hembra se ha alimentado con sangre ocurren pocos apareamientos, ya que ella debe batir sus alas con mayor rapidez, por su aumento de peso, lo cual no resulta atractivo para el macho (Coloma, 2020).

En la figura 8 podemos observar que *Aedes aegypti* tiene cabeza, tórax y abdomen, su periodo de vida se estima entre dos semanas a un mes. En cuanto al

macho, se alimenta de savia vegetal y la hembra de sangre esta puede poner en promedio 1500 huevos en toda su vida. (Coloma, 2020).



Figura 8. *Aedes aegypti* macho y hembra adultos. Fuente: (Mundo sano, abril 2018)

El macho se distingue de la hembra por sus antenas plumosas y sus palpos más largos, se alimentan de carbohidratos como néctar de las plantas. (Coloma, 2020).

3.2 Distribución de *Aedes aegypti*

Una de las problemáticas más graves de salud pública es la de las Américas, donde el mosquito *Aedes aegypti* sigue incrementando su población y así mismo las dificultades para su control. Junto con esta problemática está de la mano la presencia de dengue tipo 1 y 4, el cual se introduce en la zona del caribe en 1977 y 1981. En 1952, se había aislado el virus tipo dengue de Trinidad y Tobago. En 1993, se aisló de puerto rico. *Aedes aegypti* fue introducido al continente americano poco después de su descubrimiento mediante barcos que procedían de África. Este mosquito, es el vector

de varias enfermedades arbovirales, de las cuales tres generan gran impacto en la salud pública. En los últimos cinco años se han introducido en la región dos nuevos serotipos de dengue y se han infectado algunos países como Bolivia, Brasil, y Paraguay los cuales se encontraban libres de este vector, se han encontrado brotes de fiebre amarilla con amenaza de urbanizar especialmente en Colombia (Uribe, 1983).

Gracias a algunos estudios que se han llevado en Colombia, se puede decir que *Aedes aegypti* es un mosquito peri domiciliario tanto en ambientes urbanos como rurales, ya que se encuentra en cascos urbanos de grandes ciudades o pequeños poblados hasta zonas rurales apartadas tales como fincas o veredas (Uribe, 1983).

Aedes aegypti predomina en áreas urbanas y existe en periurbanas, su distribución (ver figura 9) se puede ver afectada por la distancia desde la costa (Uribe, 1983).

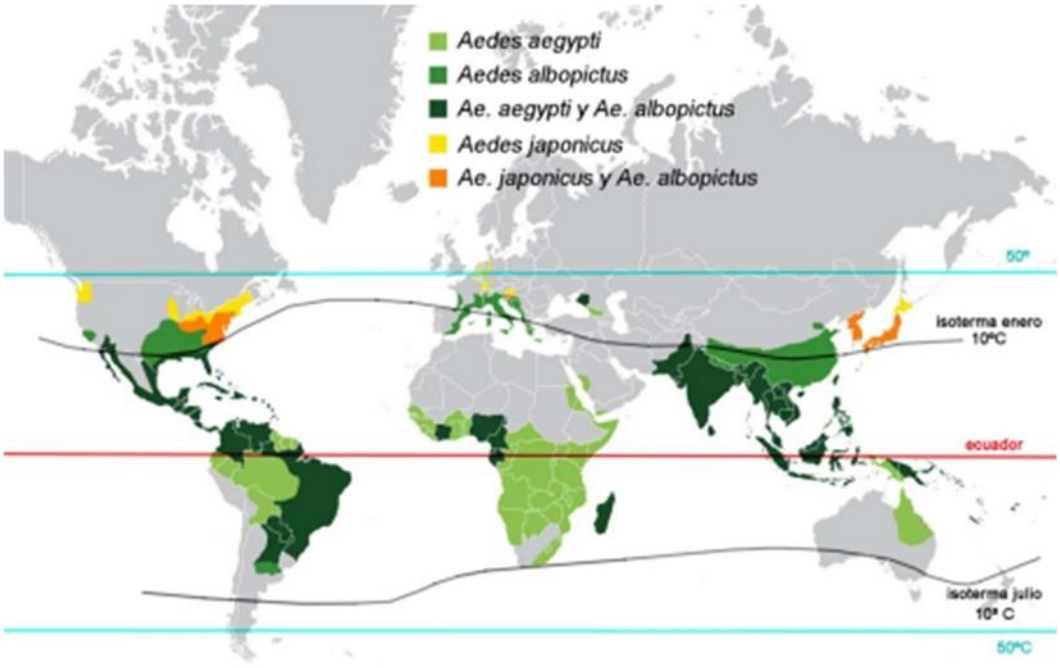


Figura 9. Distribución de Aedes aegypti Fuente: Pradera, 2016

3.3 ENFERMEDADES DE SALUD PÚBLICA CAUSADAS POR *Aedes aegypti*

La propagación de enfermedades transmitidas por vectores como el *Aedes aegypti* se ha convertido en un problema de salud mundial, ya que es el vector del dengue, la fiebre amarilla y ahora el chikungunya, que se transmiten a través de la picadura de mosquitos. Según la Organización Mundial de la Salud, el vector es muy importante para la salud pública porque gran parte de la población mundial padece casos de dengue y chikungunya (Ministerio de Protección Social, 2014).

Las organizaciones responsables de la salud pública en todo el mundo a menudo desarrollan planes y estrategias para controlar la propagación del *Aedes aegypti*, uno de los vectores más importantes de enfermedades a través de las picaduras. Colombia tiene un clima predominantemente tropical, con el 95% de su territorio por debajo de los 2.200 metros sobre el nivel del mar, por lo que es una zona propicia para el desarrollo y propagación de mosquitos, favoreciendo la aparición de enfermedades y alterando gravemente la salud de sus habitantes (Alfaro, et al, 2015).

3.3.1 CHIKUNGUNYA

Aedes aegypti es el único vector de la enfermedad epidémica. Su virus es un Alfa virus de la familia *Togaviridae,* y existe como enfermedad endémica en países como África, Oceanía y el Sudeste Asiático. Recientemente se ha informado que el virus se transmite en al menos 16 países de las Américas. Esta enfermedad puede causar el desarrollo de fiebre alta, dolor en las articulaciones, dolor de cabeza y dolor muscular. Aunque rara vez causa la muerte, esta enfermedad puede causar la muerte si no se trata la fiebre, el dolor en las articulaciones puede durar meses o años y en

ocasiones convertirse en un dolor crónico y causar discapacidad en algunas personas (Valiente, 2017).

3.3.2 FIEBRE AMARILLA

Es una enfermedad viral aguda contagiosa. El virus, que es endémico en regiones tropicales de África y América Latina, ha causado muchas epidemias con alta mortalidad a lo largo del tiempo, llegando al 50% de estos casos graves no tratados. Según la Organización Mundial de la Salud, el vector que transmite la fiebre amarilla es el mosquito de la especie *Aedes aegypti*, que transmite el virus de un huésped a otro, y la enfermedad es causada por el virus de la fiebre amarilla, que es un arbovirus del género Flavivirus (Alfaro, et al, 2015).

En Colombia la plaga se ha extendido al 70% del territorio nacional, especialmente en las provincias de Norte Santander, Guaviare, Cesar, Magdalena, Meta, Guajira, Amazonas. Hay tres tipos de transmisión de la fiebre amarilla que es la selvática, intermedia y urbana (Alfaro, et al, 2015).

3.3.3 ZIKA

El virus Zika es una enfermedad viral emergente causada por un arbovirus del género Zika virus (familia *Flaviviridae*), que se sabe desde la década de 1950 que se origina en la región ecuatorial desde África hasta Asia y es una enfermedad emergente febril; curso agudo, benigno y auto limitado; se origina en la selva y es transmitido por mosquitos del género *Aedes aegypti.* En los trópicos, sus manifestaciones clínicas son fiebre, exantema, cefalea, artralgia, mialgia, malestar general y conjuntivitis no supurativa. Según la OMS/OPS, los síntomas duran de 2 a 7 días. Después de que el virus ingresa al cuerpo humano, se excreta a través del sudor, la saliva y el semen. El

período de incubación es de 3 a 7 días. El virus se transmite a través de la picadura de mosquito *Aedes aegypti* infectado con el virus del Zika. Se ha descrito transmisión por la transfusión de sangre y nuevos estudios revelan la posible trasmisión sexual (Cabrera, et al., 2016).

Actualmente no existe vacuna ni cura para la enfermedad, el manejo es sintomático y se puede hacer en casa con descanso, uso de mosquiteros y considerable hidratación (Cabrera, et al, 2016).

3.3.4 DENGUE

La enfermedad se presenta generalmente en climas tropicales y subtropicales de todo el mundo, especialmente en áreas urbanas y semiurbanas. El virus pertenece a la familia *Flaviviridae* y puede dividirse en diferentes formas clínicas; entre las que se encuentran dengue sin signos de alarma, dengue con signos de alarma y dengue grave, una enfermedad que se ha propagado geográficamente en los últimos años de modo que cuatro serotipos del virus prevalecen en Asia, África y las Américas (OMS, 2015). La incidencia del dengue se ha multiplicado en los últimos 50 años, resultando en 390 millones de infecciones por dengue cada año, de las cuales 96 millones son clínicamente sintomáticas (Sánchez, 2017).

Según la Organización Mundial de la Salud, el dengue es la enfermedad arboviral más importante del mundo, con el mayor incremento en los últimos 20 años. Los mosquitos *Aedes* son portadores de los cuatro serotipos virales: DEN 1-4. *A. aegypti* es el principal vector asociado con la mayoría de las epidemias. (Sánchez Real, L. 2017)

3.3.5 MÉTODOS DE CONTROL DE *AEDES AEGYPTI*

Las estrategias para erradicar *Aedes aegypti* se han centrado tanto en el control de adultos como en sus formas larvarias, lo que a menudo resulta en la fumigación y el uso de larvicidas. Por lo tanto, se enfatiza que el control de vectores es la principal medida para evitar la transmisión. Dengue, Zika, Fiebre Amarilla y Chikungunya y otras enfermedades de relevancia en salud pública, para lo cual se requieren estrategias, acciones y control integrado de vectores, dicho control debe ser efectivo, eficiente y oportuno, adecuado a la situación y medio ambiente, tener un bajo impacto ambiental y debe permitir la participación de la comunidad. El método de control principal es la higiene básica, que intenta lograr todo lo anterior (OMS, 2015).

Las principales medidas de control son la eliminación de posibles criaderos y el uso de larvicidas donde hay agua estancada. Rociar mosquitos adultos con insecticida durante epidemias urbanas es otra opción, pero no se recomienda porque puede desarrollar resistencia. Se recomienda remover diariamente tanques de agua, llantas y otros lugares con agua acumulada, y fumigar casas, lugares de trabajo y estudio (Sánchez, 2017). Adicional a esto, actualmente para controlar este vector se utilizan diferentes métodos, como, el control químico, en el que se utilizan plaguicidas, insecticidas o plaguicidas químicos clasificados como organoclorados (DDT), organofosforados, carbonatos, piretroides y destinados a erradicar epidemias o brotes en lugares concentrados, específicamente depende del número de lesiones activas distribuidas en diferentes partes. Por lo tanto, la educación social es otro factor importante en la prevención. Las tasas de letalidad se pueden reducir a través del diagnóstico temprano y el manejo adecuado de casos (Sánchez, 2017). Otro método

utilizado para el control de vectores es el control biológico, en el que se induce la aplicación de enemigos naturales de plagas y enfermedades para reducir sus poblaciones, por medio de materias primas de origen vegetal, mediante extractos acuosos o extracción con alcohol o acetona (Sánchez, 2017).

Por último, el Control Físico consiste en destruir los posibles criaderos de mosquitos, tratando el agua en las fuentes y piscinas, usando flujo de aire en las entradas de las habitaciones, controlando la temperatura (manteniendo a 25°C) (Sánchez, 2017), colocando mosquiteros en puertas y ventanas de las casas, utilizando repelente sobre la piel potencialmente picada o sobre la misma prenda cada 3 horas, saliendo a la intemperie con camisas de manga larga y pantalón, con el fin de evitar la presencia y posibles picaduras de estos vectores (Min. Salud de Argentina, 2009). Así mismo, es importante evitar el almacenamiento de agua en contenedores artificiales como llantas, barriles, desechos sólidos, baldes y otros medios que pueden llegar a producir una gran cantidad de mosquitos (Rodríguez, 2002).

3.4 Calendula officinalis

Es una planta anual, cultivada en todo el mundo, sus flores forman grandes cabezuelas, tanto para uso ornamental como para la preparación de productos terminados en la industria farmacéutica y cosmética, también tienen propiedades como antiinflamatoria, antiséptica, calmantes, antibióticos y para tratar la indigestión, las úlceras gástricas y la conjuntivitis (Lastra & Piquet, 1999).

Esta planta, también conocida comúnmente como ranunculus, proviene de la familia Asteraceae en el Mediterráneo, ver clasificación taxonómica en la tabla 2. Se caracteriza

por una rápida expansión mundial, crece espontáneamente en el campo, tiene flores amarillas (únicamente hermafroditas o estériles), angulosas. Los tallos erectos y ramificados, que contienen hojas ramificadas lanceoladas, son de color verde intenso y algo pegajosas, tienen el follaje muy aromático característico de esta planta, alternas, sésiles y lanceoladas (Cáceres, 1996).

Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	*Asteraceae*
Subfamilia	*Asteroideae*
Género	Caléndula
Especie	*Caléndula officinalis L*

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la caléndula. Fuente: Agudelo, 2011

3.4.1 Aspectos químicos

La variedad de constituyentes químicos que presenta la caléndula ha demostrado ser acorde con la diversidad de acciones farmacológicas que presenta la planta y ha sido utilizada en la cocina como sustituto del azafrán, asumiendo el nombre de azafrán del pobre, ya que posee la capacidad de dar color y sabor a la comida. (Agudelo, 2011).

Calendula officinalis presenta una gran variedad de componentes químicos, de los que sobresalen algunos dadas sus características farmacéuticas y antiinflamatorias. Entre los compuestos químicos más abundantes, se encuentran alcaloides de pirrolizidina, ácido carboxílico, carbohidratos, terpenoides y esteres importantes por su efecto antiinflamatorio (Amaguaña & Churuchumbi, 2018). En cuanto a compuestos de interés farmacéutico se encuentran principalmente los carotenoides y flavonoides, los cuales se encuentran en su mayoría en las flores, en las que también se destaca la alta presencia de aceite esencial, compuesto por pedunculatina, a y b ionona, oxido-transcariofileno, carvona, cariofileno, 2 cardinoles, geranil acetona, b-ionona-5,6-epóxido, dihidroactinidiolido, oplopanona, g-mouroleno, a -cardineno, guaiol y torryol (Lastra & Piquet, 1999).

3.5 MODELOS ESTADÍSTICOS

3.5.1 PROBIT

Es una medida estadística de regresión en la cual la variable depende de las características del evento con dos posibles resultados, esta herramienta también nos ayuda a graficar los resultados para tiempo letal en base a los datos que se obtuvieron en los bioensayos, donde se puede calcular los tiempos necesarios para alcanzar la mortalidad del 50 y 90% de los ejemplares.

Constituye una alternativa logarítmica lineal para datos con variables dependientes o categóricas, se utiliza para analizar datos del tipo dosis- respuesta, los datos de los bioensayos son analizados con estadística cuantal donde un estímulo de

N unidades experimentales y R unidades responden y N-R no lo hacen; el objetivo de eso es evaluar el nivel de estímulo que se necesita para una respuesta más precisa. (Guisande, et al, 2006)

3.5.2 ANOVA

Es un método estadístico que pone a prueba dos hipótesis, la hipótesis nula (Ho) y una hipótesis alternativa (H_1).

Hipótesis Nula (Ho): Es la suposición al hacer la comparación No hubo diferencia significativa en las medias de mortalidad entre los diferentes tratamientos.

Hipótesis Alternativa (H_1): Se refiere a que existe una diferencia significativa en al menos un par entre las medias de mortalidad por tratamiento.

Al obtener los datos de significación, la hipótesis nula (Ho) es rechazada si en el análisis de varianza ANOVA se tiene un P-valor < 0.05, y se acepta la hipótesis alternativa por lo tanto, esto significa que la concentración del tratamiento sí afecta el porcentaje de mortalidad, en cambio, si los valores del P-valor >0.05, nos permite aceptar la hipótesis nula y rechazar la hipótesis alternativa, lo que significa que la concentración de los tratamientos no tiene variabilidad significativa para los resultados de mortalidad. (Guisande et all, 2006) Adicionalmente en la tabla de ANOVA una diferencia marcada entre el f calculado y el f crítico nos permite afirmar que existe diferencia entre los diferentes tratamientos y entre estos y el testigo.

4. METODOLOGÍA

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de ecología y zoonosis de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales como desarrollo de las actividades del semillero de investigación Zoovector.

Para la elaboración del Proyecto Evaluación insecticida del extracto de caléndula (*Calendula officinalis*) sobre la especie de mosquitos *Aedes aegypti* se utilizaron análisis estadísticos y gráficas comparativas, para determinar la correlación entre la mortalidad de larvas y la concentración del extracto de caléndula.

Tipo de estudio.

El tipo de estudio a realizar durante el desarrollo del proyecto fue experimental partiendo de los objetivos para llevar a cabo un diagnóstico funcional para la evaluación del insecticida, obteniendo una posible solución para el problema, realizando bioensayos y análisis estadísticos por medio de pruebas estadísticas PROBIT y ANOVA, de los datos de mortalidad larval obtenidos con los diferentes tratamientos.

Enfoque de investigación.

La investigación fue de tipo cuantitativo y cualitativo ya que para determinar las propiedades del extracto etanólico de *Calendula officinalis* como agente tóxico en la actividad larvaria del mosquito *Aedes aegypti* se requirió realizar la recolección de datos e información.

Fase 1. Recopilación de la información para el estudio.

Se recopiló la información bibliográfica que permitió determinar las bases conceptuales, aspectos metodológicos y las variables a tener en cuenta para el desarrollo del proyecto.

Fase 2. Obtención del material biológico

Con el fin de realizar cinco (5) bioensayos cada uno con 125 larvas de IV estadio, fue necesaria la recolección, durante varias semanas, de abundante cantidad de huevos del mosquito *Aedes aegypti* de la cepa Rockefeller criados en el laboratorio de ecología y zoonosis de la Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas sede Bosa Porvenir. Gracias a sus propiedades, los huevos se almacenaron desecados en papel filtro almacenándolos en bolsas zip lock y posteriormente fueron introducidos en un recipiente de polietileno con agua a una temperatura aproximada a 27°C – 30°C (ver figura 10) por el tiempo necesario (entre 6 a 8 días) hasta alcanzar el estadio 4 de desarrollo. Las larvas se alimentaban a base de comida para peces (pescadina), debido a que ésta contiene los nutrientes necesarios para su desarrollo.

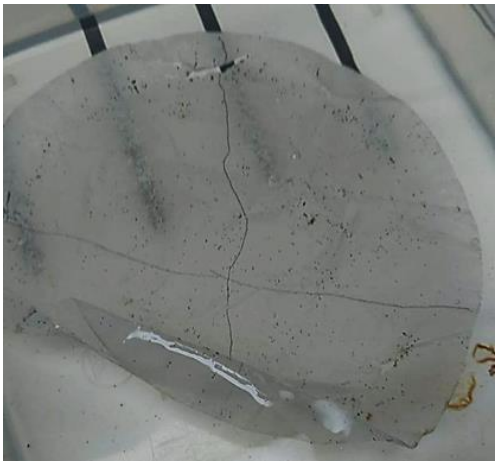


Figura 10. Recipiente con huevos de *Aedes aegypti* Fuente: Autoras

Fase 3. Obtención del extracto vegetal

Se trabajó con plantas enteras (tallo, hojas y flores) de caléndula *(Calendula officinalis),* adquiridas en estado fresco en la plaza mayorista de Paloquemao en la sección de plantas aromáticas. El material vegetal se sometió a secado a la sombra sobre papel periódico sobre los mesones del laboratorio de ecología y zoonosis por un espacio de tiempo de 2 semanas. Cuando se evidenció que el material vegetal se encontraba totalmente seco, se procedió a cortar en trozos pequeños el material vegetal y se realizó un tamizado manual descartando trozos muy gruesos, principalmente de tallos, hasta alcanzar un peso de 500 gramos. Se trituró el material con ayuda de un molino manual convencional marca Corona reduciendo el tamaño de las partículas. El material molido fue colocado en papel filtro que se enrolló alrededor y se formaron cartuchos cilíndricos de cerca de 80 a 100 gramos cada uno y se cerraron con grapas cobrizadas. Los cartuchos formados se colocaron en el extractor Soxhlet utilizando etanol al 96% como agente solvente para la extracción de los principios activos.

Posterior a esto se utilizó el equipo rota evaporador con baño maría a 60°C, velocidad de 100 RPM y vacío de 175 milibares, para remover el etanol utilizado como solvente, y obtener en el balón de extracción el extracto puro o solución madre de la caléndula *(Calendula officinalis)* para ser utilizada en los diferentes bioensayos. El extracto se almacenó en frascos de color ámbar a temperatura de refrigeración para evitar alteración o degradación de los principios activos presentes en la muestra.

Fase 4. Bioensayos

A fin de exponer las larvas en IV estadio de mosquito *A. Aegypti*, al extracto etanólico de caléndula, con posibles propiedades inhibidoras: se prepararon 5 diluciones a concentraciones ascendentes de 250 PPM, 500 PPM, 750 PPM, 1000 PPM y 1250 PPM del extracto puro en agua destilada. Para el grupo testigo de larvas sólo se usó agua reposada. Tanto a tratamientos experimentales como a testigo se les proporcionaron idénticas condiciones de alimentación, fotoperiodos de 12 horas luz/oscuridad, temperatura ambiente controlada de 26 a 28°C, humedad relativa entre 70 y 80%, en cámara ambiental de crecimiento durante el tiempo que duraron los bioensayos.

Para la preparación de las diferentes disoluciones se utilizó un balón aforado de 1000 ml en el cual se introdujo la concentración necesaria del extracto de caléndula según las diluciones en partes por millón (volumen a volumen) (ver tabla 3), después se llenó el balón con agua destilada hasta el aforo y se agitó hasta tener una mezcla homogénea como podemos observar en la figura 11 y 12.

VOLUMEN DEL EXTRACTO EN MILILITROS	CONCENTRACION EN PPM
0.25	250
0.50	500
0.75	750
1.00	1000
1.25	1250

Tabla 3. Concentraciones del extracto calendula officinalis Fuente: Autoras.



Figura 11 y Figura 12. Preparación de concentraciones del extracto de *Caléndula officinalis.*
Fuente: Autoras

Fase 5. Realización de Bioensayos

Como se puede observar en la figura 13 y 14, se utilizaron 5 vasos plásticos desechables por bioensayo, siendo un total de cuatro (4) repeticiones de cada tratamiento experimental y el grupo testigo, en cada vaso se colocaron 200 ml de la disolución del extracto a la concentración de cada tratamiento experimental, menos en el testigo donde se colocó agua reposada únicamente y en cada uno se le colocaron 25 larvas de *A. aegypti***,** se utilizaron larvas de IV estadio de *A. aegypti* en donde se evaluó la mortalidad a diferentes tiempos y se dejó el montaje de muestras dentro de la incubadora a 27° y 30° C, cuyas condiciones son las más favorables para el desarrollo larvario.



Figura 13 y Figura 14. Montaje Bioensayos. Fuente: Autoras

Fase 6. Recolección de datos

Se tomaron lecturas de mortalidad pasadas 2, 12, 24, 36 y 48 horas. Con la ayuda de una pipeta se procedió a tocar las larvas de mosquito *A. Aegypti* cómo se observa en la figura 15 y se contaron como muertas las que no presenten motilidad o reacción al contacto. En un formato se registraron los porcentajes acumulados de mortalidad obtenidos al momento de realizar la lectura del bioensayo en las horas establecidas, haciendo el conteo de los individuos muertos (ver figura 16), se extrajeron del bioensayo, dejando los sobrevivientes para continuar con el bioensayo hasta la lectura final al cabo de 48 horas.



Figura 15. Individuos Muertos
FUENTE AUTORAS

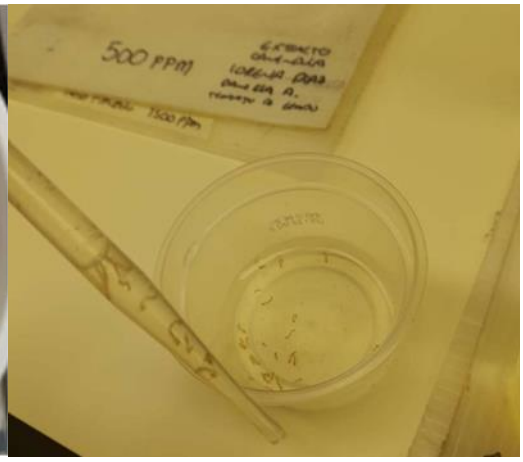


Figura 16. Recolección larvas
FUENTE AUTORAS

Fase 7. Análisis de resultados

Al obtener los resultados de mortalidad de cada bioensayo y todas las repeticiones, se procedió a hacer un análisis estadístico que permitió conseguir resultados confiables detallados y precisos; dicho análisis estadístico se realizó a través de la prueba estadística ANOVA que nos permite determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y el grupo testigo, lo que permite rechazar o comprobar la hipótesis alterna. También se utilizó la prueba Probit que es un método estadístico con el que se evalúa la concentración letal efectiva del bioensayo estimando la CL50 y CL90 y los tiempos letales para las concentraciones más efectivas.

5. RESULTADOS

En los bioensayos se evaluaron las concentraciones de 250, 500, 750, 1000 y 1250ppm del extracto de *Calendula officinalis*, tabulando y graficando la información obtenida del conteo de mortalidad larval en los diferentes tratamientos, evaluando los resultados obtenidos de las concentraciones del extracto con el fin de evaluar la

toxicidad sobre las larvas *Aedes aegypti* en IV estadio. Los resultados individuales podrán ser observados en el ANEXO 1

Se tabuló la información de las mortalidades en el tiempo establecido (tabla 4), donde se puede observar que al aumentar la concentración mayor es el porcentaje de mortalidad, detallando el conteo de larvas muertas durante los bioensayos realizados en las diferentes horas de lectura (0, 2, 12, 24, 36, 48 horas), además se presenta el porcentaje de mortalidad acumulado en el máximo intervalo de tiempo (48 horas), que se obtuvieron a partir del extracto analizado.

Mortalidad Larvas *Aedes aegypti* (%)						
TRATAMIENTO	0 HORAS	2 HORAS	12 HORAS	24 HORAS	36 HORAS	48 HORAS
TESTIGO	0	0	0	0	0	0
T1-250	0	0	8	18	28	37
T2-500	0	1	24	44	49	66
T3-750	0	2	38	60	68	82
T4-1000	0	0	68	85	86	92
T5-1250	0	14	93	99	99	99

Tabla 4. Porcentajes mortalidad de larvas de Aedes aegypti Fuente: Autoras

Los resultados obtenidos de estos tratamientos, se exponen en la Tabla 4, en donde se observa, como el tratamiento testigo no presenta ninguna muerte.

En el tratamiento T1 se expusieron 100 larvas de *Aedes aegypti* a una concentración de 250 PPM del extracto de caléndula, se observó una mortalidad final acumulada de 37% transcurridas 48 horas.

Para el tratamiento T2 con concentración a 500 PPM del extracto, se observa una mortalidad final acumulada del 66% transcurrida 48 horas de exposición, donde se

observó una mortalidad de más del 50% de las larvas de IV estadio expuestas.

En cuanto al tratamiento T3 con concentración de 750 PPM del extracto de la caléndula (*Calendula officinalis*), se observó una mortalidad final acumulada de 82% transcurridas 48 horas

Para el tratamiento T4 de 1000 PPM se alcanza una mortalidad del 85% transcurrida 24 horas de exposición, el cual presentó una alta tasa de mortalidad en comparación con los tratamientos anteriores, presentando una mortalidad final del 92% transcurrida las 48 horas.

En el tratamiento T5 con una concentración de 1250 PPM del extracto, se observó una mortalidad acumulada del 99% transcurridas 24 horas de exposición presentando una alta tasa de mortalidad, demostrando que es la concentración óptima para utilizar como larvicida ya que se alcanza el 99% de mortalidad transcurridas 36 horas.

Con respecto a las progresiones en las mortalidades con los diferentes tiempos de lectura, en el tratamiento T1 con una concentración de 250 PPM del extracto de *Calendula officinalis,* se obtuvo una mortalidad inicial del 8% a las 12 horas que se incrementa hasta 18% al cabo de 24 horas, sube al 28% a las 36 horas para llegar a una mortalidad final del 37% al cabo de 48 horas.

Para el tratamiento T2 con una concentración de 500ppm se obtuvo mortalidad del 1% a las 2 horas, subió al 24% a las 12 horas, incrementó a 44% a las 24 horas, subió al 49% a las 36 horas y terminó en 66% al cabo de las 48 horas.

Para el tratamiento T3 con una concentración de 750ppm se obtuvo mortalidad del 2% a las 2 horas, subió al 38% a las 12 horas, incrementó a 60% a las 24 horas, subió al 68% a las 36 horas y terminó en 82% al cabo de las 48 horas.

Para el tratamiento T4 con una concentración de 1000ppm se obtuvo mortalidad del 68% a las 12 horas, incrementó a 85% a las 24 horas, incrementó ligeramente hasta 86% a las 36 horas y terminó en 92% al cabo de las 48 horas.

Para el tratamiento T5 con una concentración de 750ppm se obtuvo mortalidad del 14% a las 2 horas, subió al 93% a las 12 horas, incrementó a 99% a las 24 horas y se mantuvo sin incremento al cabo de las 48 horas.

Además, se debe resaltar que el tratamiento T4 y tratamiento T5 alcanzó una mortalidad del 85% y 99 % respectivamente, en un periodo de 24 horas de las 48 horas posibles, estos resultados dejan ver sin duda alguna la toxicidad del extracto y su eficiencia en la eliminación de las larvas de estadio IV de *Aedes aegypti* (ver figura 17).

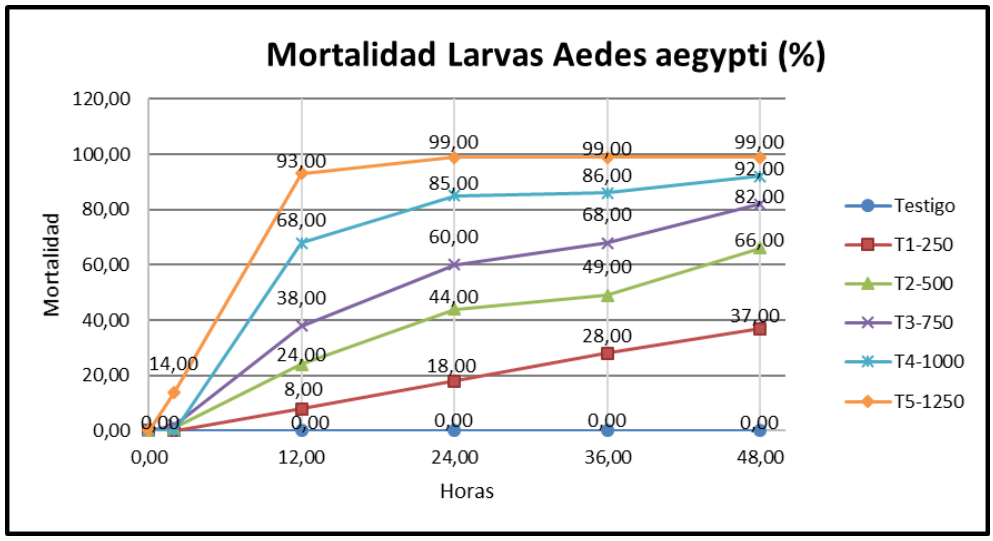


Figura 17. Resultados mortalidad a partir de las diferentes concentraciones de bioensayo. Fuente Autoras

Como se puede observar en la figura 17, a las 0 horas no se presentó ninguna letalidad durante los bioensayos, los dos primeros tratamientos (concentración 250 y 500 PPM), no alcanzaron el 50% de la mortalidad total acumulada, debido a esto los tiempos letales 50 y 90 (CL 50 y CL 90) para estos tratamientos no fue posible encontrarlos en las primeras horas de exposición al extracto, pero si se evidencio el CL50 en el T2 pasadas las 36 horas.

En la figura 17 se observa que el T3 correspondiente a una concentración de 750 PPM logro una mortalidad del 50% de los individuos expuestos al extracto en un periodo de 24 horas, siendo este el CL50. Para este tratamiento no fue posible encontrar el CL90 debido a que transcurridas las 48 horas hubo una mortalidad final del 82%.

Se observa que el T4 correspondiente a una concentración de 1000 PPM en las 12 primeras horas fue posible lograr una mortalidad del 50% de los individuos expuestos al extracto, siendo este el CL50. Para este tratamiento sí fue posible encontrar el CL 90 (mortalidad del 90%); que se observó al transcurrir un periodo de 48 horas.

Para el T5 con una concentración de 1250 PPM no fue posible encontrar el CL50 debido a que transcurridas las 12 horas hubo una mortalidad máxima del 93%. Para este tratamiento sí fue posible encontrar el CL 90 (mortalidad del 90%); en las 12 primeras horas con una mortalidad del 90% de los individuos expuestos al extracto.

En la tabla 4 se registran los resultados obtenidos en los bioensayos, los cuales se ajustaron mediante el promedio obtenido durante la realización del proyecto

teniendo en cuenta la mortalidad acumulada. Los resultados obtenidos a partir de la bitácora muestran el porcentaje obtenido sobre las larvas de *Aedes aegypti* de acuerdo con el tiempo de exposición y la concentración en PPM aplicada a cada tratamiento. Como se puede observar en la tabla 4, la mortalidad en el tratamiento testigo fue del 0%, lo que demuestra que la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* no fue por factores diferentes a los producidos del extracto.

6. ANALISIS DE RESULTADOS

6.1 COMPARACIÓN DE LA MORTALIDAD

En la figura 17 se observa que a las 2 horas solamente en dos de los tratamientos se obtuvo un porcentaje de mortalidad y se evidencia que casi todas las concentraciones tuvieron una diferencia mayor al 10% aproximadamente de mortalidad a excepción de la concentración 1250 PPM que alcanzó la máxima mortalidad en un 99% a las 24 horas y luego de ello se mantuvo; con respecto a la concentración a 1000 PPM comenzó a las 12 horas con una mortalidad del 68%, obteniendo la máxima mortalidad de un 92% a las 48 horas de exposición de las larvas al extracto, así mismo, las concentraciones a 500 y 750 PPM la máxima mortalidad fue de 66 % y 82% respectivamente transcurridas 48 horas de exposición al tratamiento, obteniendo excelente resultados. A partir de la curva se puede analizar que entre las 12 horas de 500 y 750 PPM, se obtuvo un resultado del 24% y 38% determinando que el extracto del extracto etanolico de la caléndula *(Calendula officinalis)* tiene propiedades como agente tóxico en la actividad larvaria del mosquito *Aedes aegypti* en larvas estadio IV y que en las 24 horas de todas las concentraciones del extracto etanólico tuvieron

la mayor tasa de mortalidad, sin embargo, la menor mortalidad se presentó con 250 PPM, ya que al pasar las 12 horas obteniendo un 8% y en 48 horas un 37% de mortalidad, concluyendo que a mayor concentración mayor es la mortalidad. (Guisande et all, 2006)

Como se puede observar en la figura, al cambiar las concentraciones, se presentaron cambios en los valores de la variable de mortalidad y que desde el punto de vista descriptivo se visualiza que unos tratamientos son más favorables que otros, pues para ellos se detectan mayores valores de mortalidad, siendo este un resultado importante en la efectividad del tratamiento, De manera general se observó que a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico de la caléndula (*Calendula officinalis*) tiene propiedades como agente tóxico en la actividad larvaria del mosquito *Aedes aegypti* , en larvas estadio IV aumenta el porcentaje de larvas muertas.

6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la verificación de la efectividad del extracto etanólico de la caléndula *(Calendula officinalis)* tiene propiedades como agente tóxico en la actividad larvaria del mosquito *Aedes aegypti* en larvas estadio IV en condiciones de laboratorio, se trataron los datos obtenidos en los bioensayos con herramientas estadísticas como Probit, Excel y ANOVA.

Con los datos tratados con la herramienta Probit se dieron a conocer valores más específicos en tanto a concentración letal y tiempos letales exactos para obtener porcentajes de mortalidad del 50% y 90%. Finalmente, el análisis estadístico ANOVA de un factor, en el cual se comparan dos hipótesis, la hipótesis nula (H0) y la

hipótesis alterna (H1) y así poder determinar si hubo una diferencia significativa sobre los promedios de mortalidad de las larvas en estadio IV de *Aedes aegypti* en los bioensayos.

Como podemos ver en la tabla 5, se realizó un análisis Probit, para determinar la concentración letal media (CL50) y (CL90), evaluando la efectividad del bioensayo y los tiempos letales en que las concentraciones sean más efectivas.

DOSIS	TAMAÑO	CASOS	PROBIT
250	25	37	4.67
500	25	66	5.41
700	25	82	5.92
1000	25	92	6.41
1250	25	99	7.33

Tabla 5. Resultados obtenidos del análisis Probit Fuente: Autoras

En el análisis de ANOVA se evaluó el factor de las concentraciones que inciden en la mortalidad de las larvas de *Aedes aegypti* y se concluye que el extracto tiene una alta efectividad larvicida en concentraciones altas.

Se realiza la comparación de las medias de dos datos a partir del contraste de hipótesis, esto sirve para comprobar la hipótesis con el fin de demostrar la existencia de diferencias significativas entre las mortalidades de las concentraciones establecidas durante el desarrollo del proyecto.

Al terminar los bioensayos planteados para el presente proyecto, se organizaron los resultados recopilados como concentración, tiempos de exposición y mortalidad, a partir de la utilización del extracto sobre larvas de *Aedes aegypti* en estadio IV, con el fin de analizar los porcentajes de mortalidad sobre los individuos tratados en diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos en el bioensayo del extracto Caléndula como larvicida contra *Aedes aegypti* se registraron en una bitácora durante la realización del experimento en el laboratorio, allí se plasmó la mortalidad de cada tratamiento ANEXO 1.

Con el porcentaje obtenido en la tabla 4 se realiza una transformación a porcentaje como podemos observar en la tabla 5, los resultados obtenidos por el análisis probit, nos muestra las concentraciones letales específicas para obtener la mortalidad del 50% y 90% del extracto *Calendula officinalis* sobre las larvas *Aedes aegypti* en IV estadio.

Para el cálculo de las concentraciones letales CL50 y CL 90 se construye una gráfica con la regresión lineal entre las mortalidades finales de los diferentes tratamientos evaluados (Ver figura 18). Los resultados obtenidos a través del modelo estadístico Probit muestra las concentraciones letales específicas para conocer la mortalidad del 50% y 90% (CL50 y CL90) del extracto sobre las larvas de *Aedes aegypti* en estadio IV.

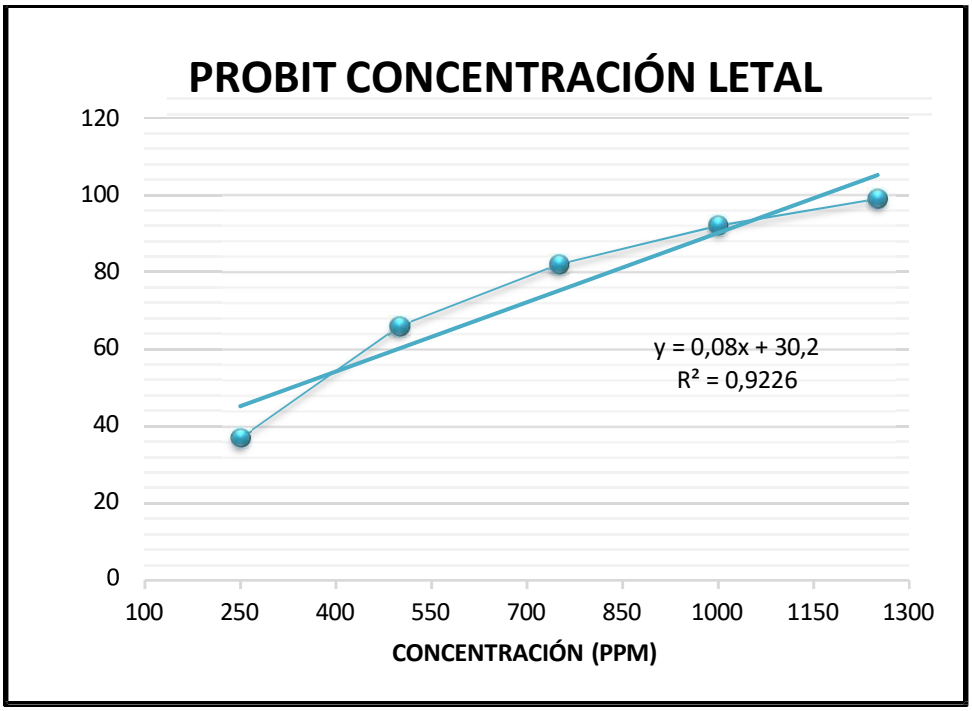


Figura 18. Prueba Probit para la concentración letal CL50 y CL90. Fuente: Autoras

La figura 18 fue realizada mediante la aplicación Microsoft Excel que nos permitió realizar la curva logarítmica, esta nos muestra un crecimiento gradual de las mortalidades que es directamente proporcional al aumento de las concentraciones en los tratamientos. En la parte inferior derecha de la gráfica se encuentra la ecuación de la línea de tendencia logarítmica, en la cual la variable independiente x se reemplazó en un rango de las concentraciones de 250 PPM A 1250 PPM, en donde, la ecuación fue aplicada desde la concentración mínima (250 PPM) aumentando las PPM hasta llegar a la concentración máxima (1250 PPM), tal como se puede observar en el ANEXO 1, esto con el propósito de calcular las dosis letales CL 50 y CL 90, cabe resaltar que se toma como concentración de punto de inicio 250 PPM, debido a que es la concentración adecuada para dar inicio a los bioensayos arrojando excelentes

resultados de la mortalidad (Guisande, et al, 2006).

Se determinó que la dosis letal CL 50 se encuentra en el rango de 250 a 400 PPM, por otro lado, para la dosis letal CL 90 encontramos que el rango de concentración se encuentra entre 800 a 1150 PPM, al hacer remplazo de datos en la ecuación de la regresión se precisan estos valores en CL 50 = 318 PPM y CL 90 = 983 PPM.

De acuerdo a la relación entre el porcentaje de mortalidad y el tiempo medido en horas, se puede determinar que casi todos los bioensayos superaron el 50% de mortalidad total acumulada, demostrando que desde 250 ppm se obtienen resultados favorables. Los tiempos letales 50 son alcanzados en 500 ppm a las 36 horas, en 750 ppm a las 18 horas, en 1000 ppm a las 10 horas y en 1.250 ppm a las 9 horas. El tiempo letal 90 solo puede ser estimado para los tres tratamientos con las más altas concentraciones. Se estima que T3 a concentración de 750 ppm alcanza el 90% de letalidad hacia las 54 horas, en T5 a concentración de 1000 ppm se alcanza a las 40 horas y en T5 a 1250 ppm a las 9 horas de iniciado el tratamiento. En las concentraciones de 250 y 500ppm estos tiempos nunca se alcanzarían ya que los ejemplares de mosquitos adultos habrían nacido antes de conseguir causar la mortalidad.

Para realizar el análisis estadístico ANOVA se utilizó el programa Excel, a través del cual se compararon dos hipótesis; hipótesis nula (H0) e hipótesis alternativa (H1), para poder demostrar si existe una diferencia significativa en la mortalidad media acumulada en cada tratamiento. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H0), y se

acepta la hipótesis alternativa (H1) cuando el valor de P es < 0.05; esto significa que la concentración de los tratamientos afecta la mortalidad de larvas de *Aedes aegypti* estadio IV. Sin embargo, si el valor de P-valor es <0.05 entonces se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula, lo que significa que la concentración de extracto caléndula *(Calendula officinalis)* no afecta la tasa de mortalidad (Guisande, et al, 2006).

La tabla 6 ilustra los resultados obtenidos del análisis estadístico que se realizó mediante el programa Excel, donde se observa los grados de libertad, suma de cuadrados, cuadrados medios, valor estadístico F, P valor, y el valor crítico para f teniendo en cuenta en análisis estadístico ANOVA para un factor, en la tabla 6 vemos que P-valor es igual a 0.0051639608381329, en el cual se observa que su valor es menor a 0.05, y que el f calculado es mayor al valor crítico para f podemos afirmar que se rechaza la hipótesis nula (H0),y se acepta la hipótesis alternativa; de esta manera, se demuestra que sí hubo una diferencia significativa en los promedios porcentuales de mortalidad acumulada de las larvas *Aedes aegypti* con las concentraciones utilizadas del extracto de caléndu*la (Calendula officinalis) como insecticida.*

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*F calculado*	*Probabilidad*	*Valor crítico para f*
Tratamientos	1138387,6	1	1138387,6	14,5147237	0,005163961	5,317655072
Error	627438,8	8	78429,85			
Total	1765826,4	9				

Tabla 6. Análisis de varianza. Fuente: Autoras

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Dentro de la búsqueda de literatura no se encontró la caléndula como larvicida,

sin embargo, se encontraron usos como insecticida para el manejo de poblaciones de ninfas de *T. vaporarioum en* cultivos de tomate (García, et al, 2014), así como para plagas de insectos como chinches, orugas y ácaros presentes en cultivos (Cárdenas, 2014), lo que permite prever un efecto inhibitorio en el desarrollo de determinados insectos por medio de la aplicación del extracto de *Calendula officinalis*.

En este estudio, se comparó el efecto de los aceites esenciales de mirto y caléndula como repelentes botánicos de amplio espectro que proporciona una protección más duradera contra muchas especies de artrópodos que pican, incluidos los mosquitos, que se ha utilizado en todo el mundo desde 1957 (USEPA 1998). El efecto de los aceites esenciales indica que incluyen ingredientes activos responsables del repelente de insectos. Los componentes principales de estos dos aceites esenciales son el monoterpenos, en comparación con un porcentaje más bajo < 0,5 % en caléndula (*C. officinalis*). Los efectos máximos del repelente de insectos se extraen en un bajo porcentaje en caléndula (*C. officinalis*), carvacrol y timol, e indican que tienen características insecticidas (Tavassoli, et al., 2011).

Otro de los componentes que puede generar efectos repelentes hacia las larvas de *Aedes aegypti* puede ser la pirrolizidina, que es un alcaloide abundante en *calendula officinalis*, el cual es una toxina natural, producida por el metabolismo secundario de las plantas como medio de protección contra la herbivoría, insectos y microorganismos (Alvarado, et al, 2022).

Así mismo, Pascual (1998), afirma que *calendula officinalis* presenta un alto potencial como repelente de insectos, dadas sus toxinas naturales y propiedades medicinales que resultan eficientes para la inhibición de algunos insectos de importancia agrícola , lo cual puede afirmarse *para Aedes aegypti* por medio de los

resultados presentados en este estudio, en el que se determinó que el extracto de *C. officinalis* posee capacidad repelente frente a mosquitos *A. aegypti* en condiciones controladas de humedad, luminosidad y temperatura, comprobando 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.* (Paiva A, D. A., & Ríos, Y. A. 2021).

Como se puede observar en el ANEXO 1, entre mayor sea la concentración de extracto del *Calendula officinalis*, este aumentará su potencial de insecticida, lo que puede deberse a una mayor presencia de componentes activos del extracto.

8. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de la caléndula (Caléndula officinalis) demostró tener propiedades larvicidas contra el mosquito Aedes aegypti, demostrando letalidad en todas sus concentraciones y presentando un aumento a medida que se aumenta la concentración del extracto.

Los mejores resultados del uso como larvicida del extracto de caléndula se lograron con una concentración de 1250 PPM a partir de las 12 horas de exposición.

A partir de los resultados obtenidos, se realizó análisis estadístico con el modelo Probit para determinar las concentraciones con mayor letalidad CL50 y CL90, donde se encontró que la dosis letal media corresponde a 318 PPM y la dosis letal noventa es de 983 PPM del extracto oleoso de la caléndula (Caléndula officinalis).

Los tiempos letales 50 fueron de 36 horas para T2 a concentración de 500ppm, de 18 horas para T3 con 750ppm, 10 horas para T4 a 1.000ppm y de 9 horas para T5 a concentración de 1.250ppm.

Los tiempos letales 90 para T3 a concentración de 750ppm se estima que se alcanza en 54 horas, en T4 a 1.000ppm se alcanza a las 40 horas y en T5 a 1.250ppm a las 11 horas.

9. RECOMENDACIONES

Realizar el estudio de la Evaluación del insecticida del extracto de caléndula *(Calendula officinalis)* sobre larvas de mosquitos *Aedes aegypti* en condiciones de campo, para determinar el comportamiento y la viabilidad, para el control del vector con relación a los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio.

Contar con los suficientes huevos de *Aedes aegypti* como base importante para la realización de los bioensayos, debido a que no todos los huevos eclosionan al mismo tiempo, algunos tardan un poco más y el proceso de obtención de larvas e mucho más tedioso, es por eso la importancia de tener suficientes suministros.

Evaluar la eficiencia del extracto de caléndula *(Calendula officinalis)* como insecticida para mosquitos adultos de *Aedes aegypti*, sabiendo que la toxicidad del extracto tiene efecto sobre las diferentes etapas de vida del mosquito.

Evaluar la eficiencia del extracto etanolico de la caléndula (C*alendula officinalis*) sobre otras especies de dípteros de la familia culicidae que representan también un escenario problemático en salud pública.

Tener presente el potencial larvicida del extracto natural de caléndula como planta aromática, ya que presenta propiedades insecticidas importantes, las cuales se deben suministrar en la concentración adecuada para alcanzar un 99% de efectividad, ya que si no se suministra el porcentaje adecuado podría no ser tan efectivo.

10. BIBLIOGRAFÍA

Agudelo Londoño, C. Y. (2011). Aprovechamiento Agroindustrial de la Caléndula (*Calendula officinalis*) mediante la producción de un gel des inflamatorio a partir de celulosa (Doctoral dissertation, Tesis. Santiago de Cali, Colombia: Universidad de San Buenaventura, Programa de ingeniería agroindustrial).

Alfaro, P., Clouet, D. & Rodríguez,M. (2015) Chikungunya, A. J. The emerging migratory rheumatism. Lancet Infect Dis 2015. 15. 510-512

Alvarado, L. Y. (2022). Presencia de alcaloides pirrolizidínicos en miel y los efectos de su consumo en humanos y abejas. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu 2022;13(3):787-802.

Amaguaña, F. J. & Churuchumbi, E. F. (2018). Estandarización fitouímica del extracto de caléndula. Universidad politécnica Salesiana. Sede Quito.

Bar, M. E. (2010). El *Aedes aegypti* y la transmisión del dengue. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste.

Brechelt, A. (2004). El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL). Fundación Agricultura y Medio Ambiente (FAMA). RD.

Cabrera Hernández, Y., Vega Jiménez, J., Miranda Folch, J. J., Martínez Rodríguez, S., García Cuervo, D., & Martínez Abreu, J. (2017). Infección por virus Zika como un reto para la Salud Pública. Revista médica electrónica, 39(2), 304-312.

Cano Piedrahíta, G. A. (2017). Evaluación de tres extractos vegetales para el control de plagas en el cultivo de frijol arbustivo Phaseolus vulgaris l.

Cárdenas, C. (2014). Las plantas alelopáticas. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Primera edición.

Centros para el control y la prevención de Enfermedades, junio 2022, Ciclos de la vida de los mosquitos de la especie Aedes https://www.cdc.gov/mosquitoes/es/about/life-cycles/aedes.html

Chico Aldama, P. (2019). Ciclo de vida del *Aedes aegypti* y manifestaciones clínicas del dengue.

Coloma Colquehuanca, Y. M. (2020). Análisis espacial de factores ambientales asociados a una potencial infestación domiciliaria por Aedes aegypti en la ciudad de Tacna, 2018.

Estrada-Peña, A. J. R. S. T. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics), 34(1), 53-65.

Fundación Charles Darwin, (2010), *Aedes aegypti* Linnaeus 1762, tomado de: https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=11720#species

García, G. F. G. (2018). *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Diptera: *Culicidae*) y su importancia en la salud humana. Revista Cubana de Medicina Tropical, 70(1), 55-70.

García, V. L., Soto, A. & Bacca, T. (2014). Efecto insecticida de productos alternativos en Trialeurodes vaporariorum (Hemiptera: Aleyrodidae). Revista

Colombiana de Entomología 40 (2): 143-147

Gómez, G. F. (2018). Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae) y su importancia en salud humana. Revista Cubana de Medicina Tropical. 2018;70(1):55-70.

Guisande, C., Barreiro, A., Maneiro, I., Riveiro, I., Vergara, A., y Vaamonde, A. (2006). Tratamiento de datos, España, Editorial Díaz de Santos.

Guerrero, J. A. (2003). Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia. Agronomía Colombiana, 21(3), 198-209.

Cáceres, A. (1996). Plantas de uso medicinal en Guatemala (No. 633.88097281 C118). Editorial Universitaria.

Gutiérrez Santis, R. (2017). Situación de mosquitos en Chile y sus implicancias en la salud pública del país.

Ministerio de salud de Argentina. (2009). Borrador de protocolo de acciones de control de Aedes aegypti. Recuperado el 26 de noviembre de 2017, Disponible en:

http://www.msal.gov.ar/images/stories/cofesa/2009/acta-02-09/anexo-7-controldevectores-02-09.pdf.

Ministerio de Salud de Colombia (2014). Chikungunya. Recuperado el 15 de Mayo de 2015, de http://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/chikunguna.aspx

Mundo Sano, (abril 2018), Mosquito Aedes aegypti, tomado

de: https://twitter.com/mundosano/status/983177752575651840

Nuestro clima, (12 del 03 de 2020), Alertan por larvas de *Aedes* y su resistencia a insecticidas, tomado de: https://nuestroclima.com/alertan-por-larvas-de-aedes-y-su-resistencia-a-insecticidas/

Lastra Valdés, H., & Piquet García, R. (1999). *Caléndula officinalis*. Revista cubana de farmacia, 33(3), 188-194.

Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science, 144(1), 31-43.

OMS. (2015). Enfermedades transmitidas por vectores. Colombia: Organización Mundial de la salud.

Osfatlyf, (2012), El *Aedes aegypti* el mosquito hogareño, tomado de: https://osfatlyf.org/portal/el-aedes-aegypti/

Paiva Aponte, D. A., & Ríos Rozo, Y. A. Evaluación del extracto de caléndula (Calendula officinalis) como repelente de mosquitos Aedes Aegypti (Bachelor's thesis).

Pascual, M. J. (1998). Repelencia, inhibición del crecimiento y toxicidad de extractos vegetales en larvas de Tribolium castaneum Herbst. (Coleoptera: Tenebrionidae). Boletín de sanidad vegetal. Plagas, 24, 143-154.

Pérez Consuegra, N. (2010). Alternativas al control químico de plagas. Revista Virtual REDESMA, 4, 45.

Pradera, Carlos. Barcelona, 07-02-2016, Mosquitos Invasores Aedes, tomado de: https://desinsectador.com/2016/02/07/mosquitos-invasores-aedes/

Rey, J. R., & Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*

en América y transmisión de enfermedades. *Biomédica*, *35*(2), 177-185.

Rodríguez Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del Aedes aegypti en las Américas. Revista Cubana de Medicina Tropical, 54(3), 189-201.

Salud Escobar, (2016), AEDES AEGYPTI y AEDES ALBOPICTUS, tomado de: https://www.dgeip.edu.uy/documentos/galerias/prensa/1243/pre_aedes_aegypti.pdf

Sánchez Real, L. (2017). Papel vectorial del mosquito *Aedes*.

Tavassoli, M., Shayeghi, M., Abai, M. R., Vatandoost, H., Khoobdel, M., Salari, M., & 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.

Unidad de Control de Vectores de Puerto Rico, (11 enero 2018), tomado de: https://es-la.facebook.com/PRVectorControl/photos/sab%C3%ADas-qu%C3%A9los huevos-del-mosquito-aedes-aegypti-pueden-sobrevivir-en-las-paredes/51993446839 9839

USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU.) DEET: decisión de elegibilidad de reinscripción. Washington DC; USEPA, Oficina de Programas de Pesticidas, División de Registro y Revisión Especial; 1998

Uribe, L. J. (1983). El problema del control de *Aedes aegypti* en América. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana (OSP); 94 (5), mayo 1983.

Valenzuela Vargas, D. F. (2015). Asesoramiento sobre control biológico de plagas y enfermedades a las familias beneficiarias de los hogares FAMI (Familia Mujeres e Infancia) para el desarrollo de las Huertas Urbanas Caseras Orgánicas en el municipio de la Plata Huila.

Valiente Jara, A. I., & González Valero, P. M. (2017). Evaluación Del Comportamiento De Los Eventos De Dengue, Chikungunya y zika asociados al vector Aedes Aegypti entre los años 2010-2015 para el fortalecimiento de la prevención de los brotes en el barrio el Centro del Municipio de Villeta Cundinamarca.

11. ANEXOS

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS FACULTAD DEL MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES
ESTUDIO DE LETALIDADES LARVAS AEDES AEGYPTI CON EXTRACTO DE _____ *Calendula officinalis* _____

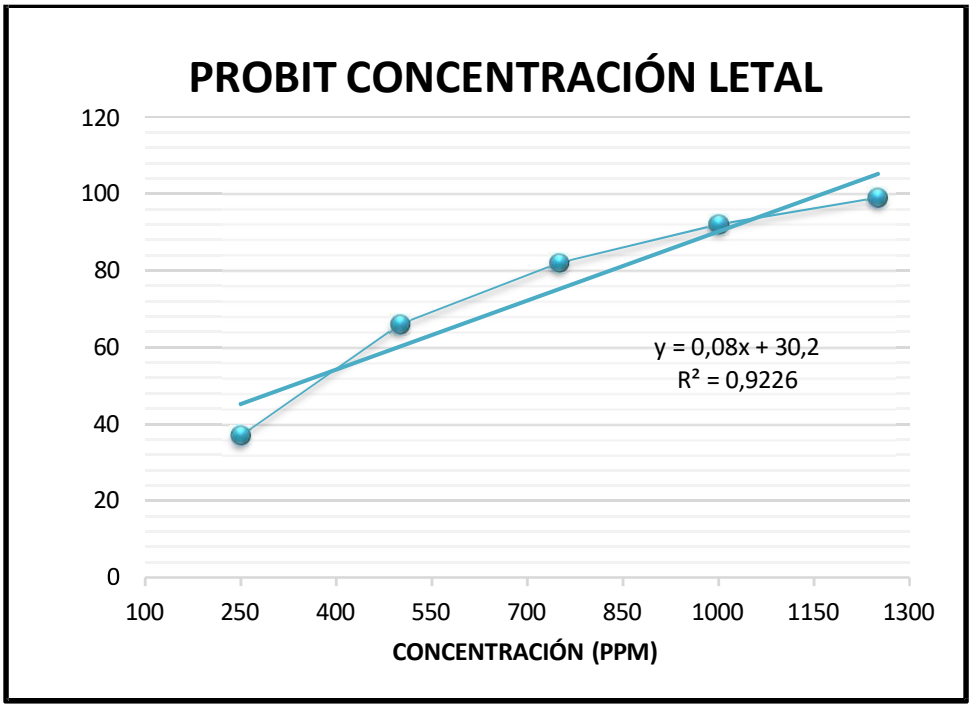
TRATAMIENTOS		Conteo inicial	MORTALIDADES EN EL TIEMPO												N° ACUMULADO TOTAL	% Mortalidad final	% PROMEDIO TTO
			0 HORAS		2 HORAS		12 HORAS		24 HORAS		36 HORAS		48 HORAS				
			N°	%	N°	% Acum	N°	% Acum	N°	% Acum	N°	% Acum	N°	% Acum			
TESTIGO	R1	25			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%
	R2	25			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	R3	25			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	R4	25			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T1 - 250 PPM	R1	25			0	0	2	8	3	20	1	24	2	32	8	32	37%
	R2	25			0	0	3	12	4	28	2	36	2	44	11	44	
	R3	25			0	0	2	8	0	8	4	24	3	36	9	36	
	R4	25			0	0	1	4	3	16	3	28	2	36	9	36	
T2 - 500PPM	R1	25			0	0	6	24	4	40	3	52	5	72	18	72	66%
	R2	25			0	0	6	24	8	56	0	56	2	64	16	64	
	R3	25			1	4	6	28	5	48	1	52	6	76	19	76	
	R4	25			0	0	5	20	3	32	1	36	4	52	13	52	
T3- 750PPM	R1	25			0	0	10	40	3	52	2	60	2	68	17	68	82%
	R2	25			0	0	10	40	2	48	2	56	7	84	21	84	
	R3	25			0	0	9	36	6	60	2	68	4	84	21	84	
	R4	25			2	8	7	36	11	80	2	88	1	92	23	92	
T4 - 1000PPM	R1	25			0	0	18	72	6	96	0	96	0	96	24	96	92%
	R2	25			0	0	17	68	4	84	0	84	1	88	22	88	
	R3	25			0	0	18	72	2	80	1	84	1	88	22	88	
	R4	25			0	0	15	60	5	80	0	80	4	96	24	96	
T5 - 1250 PPM	R1	25			4	16	20	96	1	100	0	100	0	100	25	100	99,00%
	R2	25			2	8	22	96	0	96	0	96	0	96	24	96	
	R3	25			3	12	20	92	2	100	0	100	0	100	25	100	
	R4	25			5	20	17	88	3	100	0	100	0	100	25	100	

Página 1

Anexo 1. Registro de Mortalidad Bioensayo Caléndula.

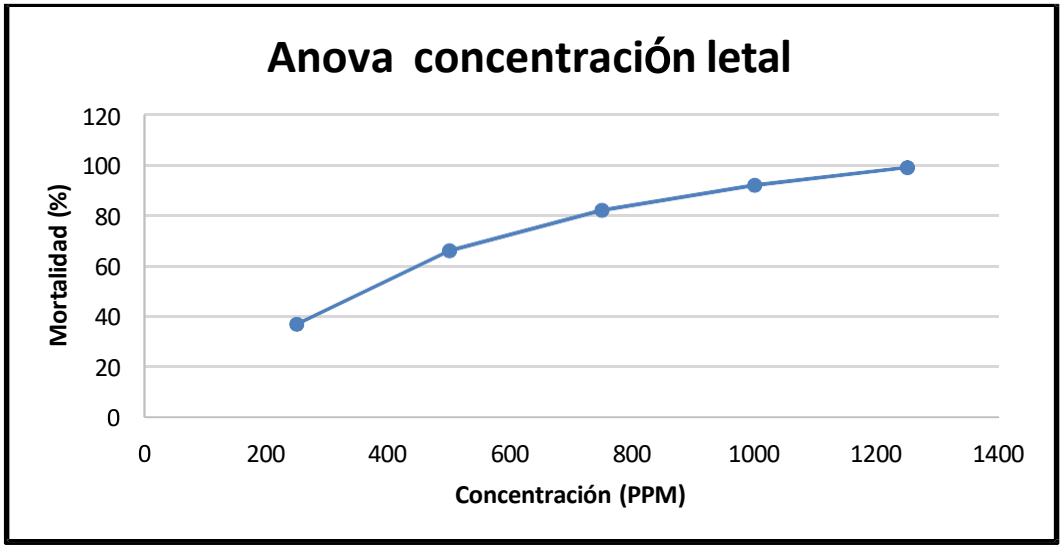
DOSIS	TAMAÑO	CASOS	PROBIT
250	25	37	4,67
500	25	66	5,41
750	25	82	5,92
1000	25	92	6,41
1250	25	99	7,33

MORTALIDAD (%)	CONCENTRACION (PPM)
4,67	250
5,41	500
5,92	750
6,41	1000
7,33	1250



Anexo 2. Resultados Probit.

Mortalidad y	Concentración x
37	250
66	500
82	750
92	1000
99	1250



Análisis de varianza de un factor RESUMEN

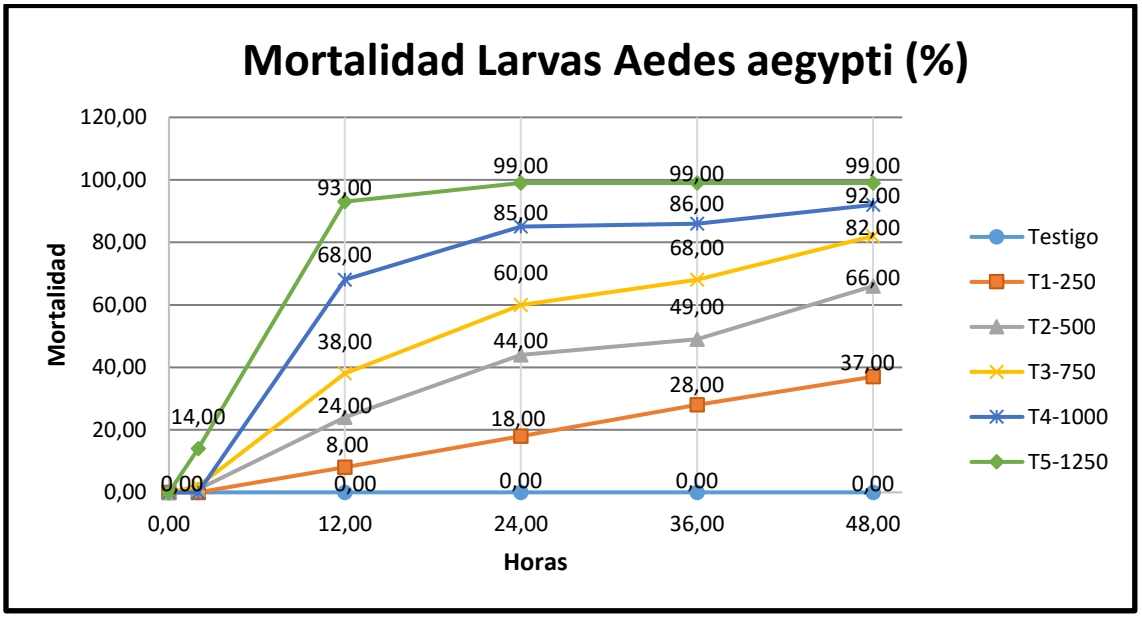
Grupos	*Cuenta*	*Suma*	*Promedio*	*Varianza*
Mortalidad Y	5	376	75,2	609,7
Concentración X	5	3750	750	156250

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	*Suma de cuadrados*	*Grados de libertad*	*Promedio de los cuadrados*	*p<*	*Probabilidad*	*Valor crítico para p<*
Tratamientos	1138387,6	1	1138387,6	14,5147237	0,005163961	5,317655072
Error	627438,8	8	78429,85			
Total	1765826,4	9				

Anexo 3. Análisis estadístico ANOVA.

Mortalidad Larvas *Aedes aegypti* (%)						
TRATAMIENTO	0 HORAS	2 HORAS	12 HORAS	24 HORAS	36 HORAS	48 HORAS
TESTIGO	0	0	0	0	0	0
T1-250	0	0	8	18	28	37
T2-500	0	1	24	44	49	66
T3-750	0	2	38	60	68	82
T4-1000	0	0	68	85	86	92
T5-1250	0	14	93	99	99	99



Anexo 4. Resultados Porcentaje de Mortalidad