

Evaluación del regulador de crecimiento Pyriproxyfen en poblaciones de *Aedes aegypti* de Trujillo, Venezuela

Evaluation of the insect growth regulator Pyriproxyfen against populations of *Aedes aegypti* from Trujillo, Venezuela

JORGE SUÁREZ¹, MILAGROS OVIEDO², LESLIE ÁLVAREZ³, ADALBERTO GONZÁLEZ⁴ y AUDREY LENHART⁵

Resumen: Se han propuesto los reguladores de crecimiento de insectos como alternativa para el control de insectos plaga, debido a que interfieren con el desarrollo normal, mimetizando la hormona juvenil y la hormona de la muda o interfiriendo con la síntesis de quitina. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia y persistencia de Sumilarv 0,5 G (pyriproxyfen) a las dosis 0,01 ppm y 0,05 ppm sobre poblaciones de *A. aegypti* de Trujillo, Venezuela. Los bioensayos se realizaron por inmersión usando larvas de IV estadio de tres localidades: Tres Esquinas, Paramito y Hatico y la cepa Rockefeller como referente. En la población de Tres Esquinas el porcentaje de inhibición de emergencia (%IE) fue de 76% a 0,01 ppm y 96% a 0,05 ppm. En las poblaciones Hatico y Paramito se obtuvieron bajos %IE (66 y 69%) con 0,01 ppm y 79 y 77% con 0,05 ppm respectivamente, mostrando una mayor eficacia del compuesto a la mayor dosis empleada. La persistencia del pyriproxyfen al 0,05 ppm a lo largo del ensayo arrojó IE superiores al 90% en todas las poblaciones durante las cuatro primeras semanas y luego de ocho semanas disminuyeron a un 59% en Tres Esquinas, 73% en Paramito y 83% en Hatico; la cepa de referencia Rockefeller mantuvo el IE al 99%. Nuestros resultados muestran la eficacia y persistencia del pyriproxyfen a la dosis 0,05 ppm sugiriendo su uso para el control de *Aedes aegypti* en las localidades estudiadas.

Palabras clave: Eficacia. Control alternativo. Dengue. Inhibición de emergencia.

Abstract: Insect growth regulators have been proposed as an alternative for the control of insect pests because they interfere with normal development, mimicking juvenile hormone and molting hormone or interfering with chitin synthesis. The objective of this study was to evaluate the efficacy and persistence of Sumilarv 0.5 G (pyriproxyfen) at the doses 0.01 ppm and 0.05 ppm on *Aedes aegypti* populations from Trujillo, Venezuela. Bioassays were carried out with the immersion technique, using fourth instar larvae from three localities: Tres Esquinas, Paramito and Hatico and the Rockefeller strain for reference. In the Tres Esquinas population the percent inhibition of emergence (%IE) was 73.5% at 0.01 ppm and 94.7% at 0.05 ppm. In the Paramito and Hatico populations the %IE were low (66 and 69%) at 0.01 ppm, and 79 and 77% at 0.05 ppm, respectively showing a higher efficacy of the compound at the higher dose used. The persistence of pyriproxyfen at 0.05 ppm over the course of the test yielded IE above 90% in all populations during the first four weeks after treatment and after eight weeks decreased to 59% in Tres Esquinas, 73% in Paramito and 83% in Hatico; the Rockefeller reference strain maintained an IE at 99%. Our results show the effectiveness and persistence of pyriproxyfen at the dose of 0.05 ppm suggesting its use for the control of *Aedes aegypti* in the study areas.

Key words: Efficacy. Alternative control. Dengue. Emergence inhibitors.

Introducción

En Venezuela, los estudios de monitoreo de susceptibilidad a insecticidas han revelado que *Aedes aegypti* (L., 1792) principal vector del dengue, ha desarrollado resistencia a diferentes líneas de insecticidas a través del tiempo. Quaterman y Schoof (1958) y Mouchet (1967) en la décadas del 50 y 60 reportaron poblaciones resistentes al DDT y al dieldrin/BHC y para los años 90 Mazzarri y Georgiou (1995) detectaron poblaciones de *Aedes aegypti* de los estados Aragua y Falcón resistentes a temefos, malatión, pirimifos metil, clorpirifos, propoxur, permetrina y lambdacialotrina. Pérez y Fernández (2001) refieren resistencia a los piretroides lambdacialotrina, cyflutrina y deltametrina en poblaciones del estado Aragua y recientemente Álvarez *et al.* (2006) encuentran en una cepa de *A. aegypti*, procedente del Estado Trujillo, resistencia al temefos, principal larvicida utilizado por el programa de control a nivel nacional.

Con estos antecedentes para el estado Trujillo y para Venezuela, se hace necesario monitorear las poblaciones de *A. aegypti* con otros controladores químicos y el uso de reguladores de crecimiento sería una alternativa con un mejor perfil de seguridad para el ambiente y para los vertebrados. La Organización Mundial de la Salud recomienda el grupo de insecticidas de cuarta generación como metopreno y pyriproxyfen (4-phenoxyphenyl (RS)-2 (2-pyridyloxy propyl ether) de los reguladores del crecimiento que mimetizan la hormona juvenil afectando la morfogénesis, reproducción y embriogénesis. Estudios recientes revelan que el pyriproxyfen es un regulador eficaz de poblaciones de *A. aegypti* en Brasil y Perú (Resende y Gama 2006; Ihuincha *et al.* 2006) con una persistencia de 45 a 90 días a concentraciones 0,01 a 0,05 ppm respectivamente.

En el presente estudio nos planteamos monitorear bajo condiciones de laboratorio la eficacia y persistencia del regu-

¹ Técnico Superior Universitario. Instituto Exp. José Witremundo Torrealba. Núcleo Universitario Rafael Rangel. Universidad de los Andes. Apdo. 214 Trujillo Venezuela. suarez23@cantv.net. ² Dra. en Ciencias Entomológicas. Investigador. Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba". Núcleo Universitario "Rafael Rangel". Universidad de los Andes. Apdo. 214 Trujillo Venezuela. Teléfono 582722362177. longipalpis@cantv.net ³ M. Sc. en Protozoología. Investigador. Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba". Núcleo Universitario "Rafael Rangel". Universidad de los Andes. Apdo. 214 Trujillo Venezuela. Teléfono 582722362177. hleslieag@hotmail.com, lesliejj@ula.ve. Autora para correspondencia. ⁴ Técnico Superior Universitario. Instituto Experimental "José Witremundo Torrealba". Núcleo Universitario "Rafael Rangel" Universidad de los Andes. Apdo. 214 Trujillo Venezuela. arelis_briceño@hotmail.com ⁵ Doctora en Ciencias. Universidad de Liverpool, UK. alenhart@liverpool.ac.uk.

lador de crecimiento Sumilarv® 0,5G (Pyriproxyfen) en tres poblaciones de *A. aegypti* procedentes de áreas de alta endemicidad por Dengue en el Estado Trujillo que han mostrado resistencia o susceptibilidad al temefos, y así poder contar con una medida alternativa para el control de estas poblaciones.

Materiales y Metodos

Poblaciones de *A. aegypti*. Se tomaron muestras de cuatro poblaciones así: Cepa ROCKEFELLER, cepa de referencia susceptible, que fue gentilmente cedida por los Drs. Gary Clark y Roberto Barrera del Laboratorio del CDC de San Juan de Puerto Rico. Población Paramito, sector urbano adyacente al centro de la ciudad de Trujillo, a una altitud de 771 msnm. a (9°22'29" N, 70°26'04" O), con 19,4°C de temperatura media anual en un Bosque Seco premontano. Población Hatico, sector urbano al noreste de la ciudad de Trujillo a una altitud de 601 msnm (9°23'32" N, 70°25'46" O), temperatura promedio de 21,5°C zona de vida Bosque Húmedo premontano. Población Tres Esquinas, urbanización al noreste de la ciudad capital con una altitud de 472 msnm. a (9°25'48" N, 70°26'51" O) y temperatura media de 21,5°C, en un Bosque Húmedo premontano.

Establecimiento de colonias en el laboratorio. En diferentes contenedores de agua de cada localidad se recolectaron estadios inmaduros del insecto los cuales fueron trasladados separadamente en bandejas plásticas al Insectario del Instituto Experimental J.W. Torrealba del Núcleo Universitario "Rafael Rangel" de la Universidad de los Andes para establecer las respectivas colonias bajo condiciones controladas de temperatura (26°C), humedad relativa y fotoperíodo de 12h luz: 12h oscuridad. Alcanzado el estadio de pupa éstas fueron transferidas a pequeños envases dentro de una jaula para la emergencia de los adultos los cuales se mantuvieron durante 48 horas con solución de sacarosa. Transcurrido este tiempo a las hembras se les ofreció una ingesta sanguínea sobre ave para obtener las oviposuras. Simultáneamente se verificó la identidad de los especímenes por comparación de los caracteres morfológicos con claves convencionales (Rueda 2004).

Preparación de las soluciones de Sumilarv® 0,5%G (Pyriproxyfen). Se probaron dos soluciones de Sumilarv® 0,5%G 0,01ppm y 0,05 ppm las cuales fueron preparadas en contenedores metálicos de 200 L de capacidad, por ser los más utilizados por los pobladores para almacenamiento de agua en las localidades estudiadas. En ambos casos el contenido se agitó vigorosamente con una varilla de vidrio y se

dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas con tapa de tul para evitar la oviposura de mosquitos externos. Estas soluciones fueron mantenidas bajo sombra y resguardadas de la lluvia hasta la finalización de los ensayos.

Bioensayos de eficacia. Se emplearon ocho contenedores de plástico con capacidad de 400 ml a los cuales se les adicionaron 250 ml de la solución a ensayar y 20 a 25 larvas de *A. aegypti* de cuarto estadio temprano, para un total aproximado de 200 larvas. Las larvas fueron alimentadas diariamente con alimento para bebe Nestúm®.

Diariamente se contabilizaron las larvas muertas, las cuales fueron removidas de los contenedores. Las pupas vivas fueron trasladadas cuidadosamente a otros contenedores cubiertos con tul para la emergencia del adulto; las pupas muertas se observaron bajo lupa para determinar la presencia de malformaciones y se clasificaron según criterios de Yodbutra *et al.* (1985). El grupo control estuvo conformado por cuatro réplicas con 20 a 25 larvas, las cuales fueron tratadas bajo las mismas condiciones experimentales, con la diferencia que se utilizó agua en lugar de la solución del regulador. Este procedimiento se siguió con cada una de las cepas bajo estudio y con ambas dosis (0,01 y 0,05 ppm). Los bioensayos se realizaron bajo condiciones de temperatura entre 25-28°C y fotoperíodo de 12:12.

Los resultados se expresaron así: % de Larvas muertas = $[(Lm/Lexp) \times 100]$; % de mortalidad de pupas = $[(Pm/(Pm+Ad)) \times 100]$; Inhibición de emergencia = $[1 - (Ad/Lexp)]$. Donde: Lm: larvas muertas, L. exp.: larvas inicialmente expuestas, Pm: pupas muertas, Ad: adultos emergidos. Se realizaron ANOVA con pruebas posteriores de Tukey ($\alpha = 0,05$) para determinar diferencias significativas en los valores de inhibición de emergencia a la dosis 0,01 y 0,05 ppm en las poblaciones evaluadas.

Bioensayos de persistencia. Para evaluar la acción residual del compuesto luego de una, dos, cuatro y ocho semanas de preparadas las soluciones; se realizaron bioensayos siguiendo la metodología anteriormente descrita, teniendo el cuidado de agitar vigorosamente las soluciones para su completa homogenización.

Resultados

Bioensayos de eficacia. Hubo un mayor efecto tóxico sobre la pupa en ambas dosis para todas las poblaciones, registrándose mayor mortalidad en los ejemplares de la localidad de Tres Esquinas a la dosis de 0,01 ppm y de 0,05 ppm respectivamente (Tabla 1). La dosis de 0,01 ppm causó un bajo por-

Tabla 1. Eficacia de Sumilarv® (pyriproxyfen) 0.5 G a las concentraciones 0,01 ppm y 0,05 ppm sobre larvas de *A. aegypti*.

Población	0,01 ppm			0,05 ppm		
	% Mortalidad		% IE	% Mortalidad		% IE
	Larvas	Pupas		Larvas	Pupas	
Tres Esquinas	10,9	73,5	76	12,8	94,7	95*
Hatico	6,4	63,2	66	3,2	78,5	79
Paramito	4,2	67,4	69	4,8	75,5	77
Rockefeller	9,8	96,6	97	7,4	90,9	92

IE = Inhibición de Emergencia. * El incremento en los porcentajes IE es significativo al 5%.

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad total de *A. aegypti* según las alteraciones morfológicas presentadas por el efecto de dos concentraciones de Sumilarv®.

FASE	0,01 ppm	0,05 ppm
Larva	3,3%	3,2%
Prepupa	5,4%	1,8%
Pupa blanca	3,3%	1,8%
Pupa melanizada	3,8%	2,1%
Pupa con adulto visible	42,7%	53,2%
Pupa con adulto parcialmente emergido	41,5%	37,8%

centaje de inhibición de la emergencia (%IE) en las poblaciones de campo Hatico (66%), Paramito (69%) y Tres Esquinas (76%) no encontrándose diferencia significativa entre ellas ($\alpha=0,05$), pero si con la población susceptible Rockefeller (97%) (Tabla 1).

De acuerdo con la clasificación de Yodbutra *et al.* (1985) se encontraron casos de incompleta pupación (prepupa), pupas blancas, pupas melanizadas y pupas con adulto interno; hubo mayor mortalidad cuando el adulto se hace visible dentro de la pupa y al momento de la emergencia del mismo (42,7% y 41,5% respectivamente a la concentración de 0,01ppm y a 0,05ppm 53,2% y de 37,8% (Tabla 2).

Bioensayos de persistencia. Al evaluar el efecto residual del regulador se encontraron porcentajes de IE en las poblaciones de campo que oscilaron entre 58 y 99% durante las primeras cuatro semanas disminuyendo significativamente a las ocho semanas encontrándose menor efecto residual con la dosis 0,01 ppm sobre la población Tres Esquinas (36%). Con la dosis 0,05 ppm el porcentaje de inhibición de la emergencia se mantuvo por encima del 90% hasta las cuatro semanas post-tratamiento y luego a las ocho semanas disminuyó a un 59% para la población Tres Esquinas, 83% para Hatico y 73% para la población Paramito. En la cepa de referencia Rockefeller el porcentaje de inhibición se mantuvo por encima de 75% durante todo el ensayo (Figs. 1 y 2).

Discusión

Actualmente el uso de productos con baja toxicidad, alto efecto residual y elevada eficacia son los más recomendados en el control de formas inmaduras de Culicidae, por lo que los reguladores de crecimiento Pyriproxyfen y Methopreno son de gran importancia por su eficacia a baja dosificación (Resende y Gama 2006). Estudios realizados en Sri Lanka para el control de larvas de anofelinos demostraron que el Pyriproxyfen aplicado en dosis de 0,01 ppm dos veces al año sería un método más efectivo y económico que la utilización de los larvicidas tradicionales (Yapabandara y Curtis 2002).

En Estados Unidos y Japón se han llevado a cabo investigaciones para evaluar la eficacia del larvicida Pyriproxyfen contra especies de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*; estas investigaciones han demostrando claramente la superior actividad del pyriproxyfen contra un gran número de mosquitos vectores (WHO 2001). Así, tenemos que en condiciones de campo y semicampo en Florida, Estados Unidos, el pyriproxyfen a dosis de 0,02 y 0,05 ppm de ingrediente activo inhibe la emergencia de *A. aegypti* durante seis semanas

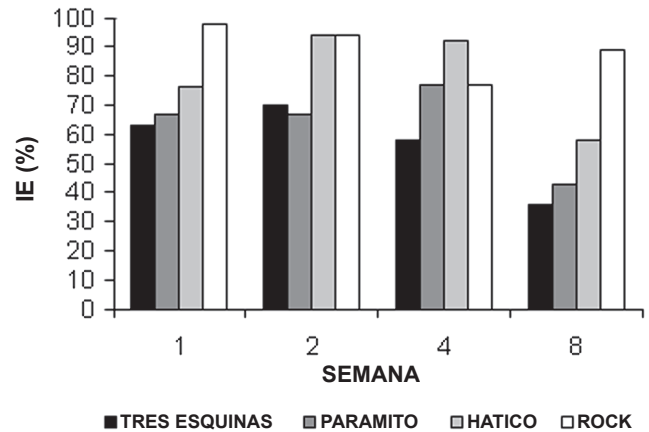


Figura 1. Inhibición de la emergencia (%) de larvas de *Aedes aegypti* en larvas tratadas con Sumilarv® 0,01ppm.

(94-100%), *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (100%), *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann, 1821) (98-100%), *Anopheles quadrimaculatus* (Say, 1824) (77-100%) y *Culex nigripalpus* (Theobal, 1901) (WHO 2001). En Perú también se ha demostrado el efecto de este regulador contra *Aedes aegypti* a una concentración letal media de 12×10^{-5} ppm.

En campo la eficacia y persistencia del Pyriproxyfen también ha sido reportada sobre *Aedes albopictus* (Vythilingam *et al.* 2005) logrando controlar la especie en un 100% hasta las 10 semanas luego de la aplicación de 0,02 ppm. Los bioensayos para evaluar el efecto del Pyriproxyfen en las tres poblaciones locales de *A. aegypti* del estado Trujillo demostraron que éste actúa en los estadios inmaduros tardíos inhibiendo la emergencia de adultos en más del 75% cuando se utiliza la concentración de 0,05 ppm; similares resultados han sido reportados por Resende y Gama (2006) en poblaciones de *A. aegypti* de Brasil, sin embargo en esta misma especie Vythilingam *et al.* (2005) encuentran porcentajes de inhibición de emergencia cercanos al 100% a concentraciones de 0,01 y 0,02 ppm durante cuatro meses bajo condiciones de laboratorio con reemplazo y sin reemplazo del 20% de agua.

Con respecto a la persistencia del compuesto durante las ocho semanas, se pudo observar una respuesta variable con la

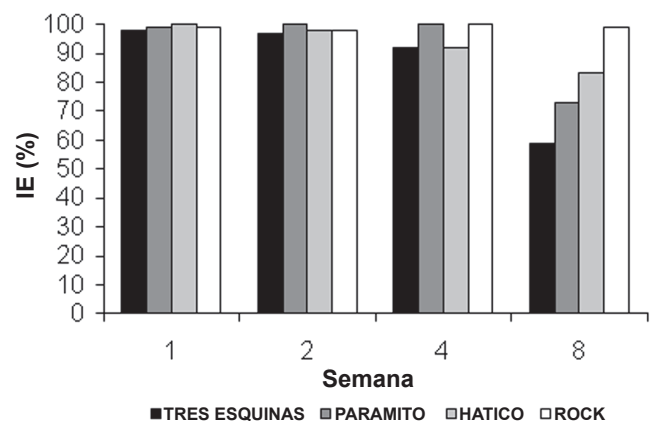


Figura 2. Inhibición de la emergencia (%) de larvas de *Aedes aegypti* en larvas tratadas con Sumilarv® 0,05ppm.

dosis 0,01 ppm tanto en las poblaciones de campo como en la Rockefeller debiéndose posiblemente a que no es la adecuada para estas poblaciones y su uso podría inducir mecanismos bioquímicos que confieran resistencia al regulador, por lo que se recomienda evaluar dosis superiores y cercanas a 0,05 ppm con la que si se obtuvieron respuestas homogéneas y porcentajes de inhibición de emergencia estadísticamente superiores en las poblaciones de campo. Los resultados de este trabajo concuerdan con los referidos por Dong-Kyu Lee (2001) en Corea, utilizando la formulación del granulado al 0,5% a concentración de 0,05 ppm sobre *Aedes togoi* (Theobald 1907) logran una inhibición de la emergencia del 80% hasta los 40 días, por lo que el autor sugiere la dosis de 0,05 ppm para el control de la especie.

Aun cuando el presente estudio fue realizado en condiciones de laboratorio, los resultados son similares a los obtenidos por Okazawa *et al.* (2002), al aplicar Pyriproxyfen en criaderos naturales y temporales para *Anopheles punctulatus*; estos autores observaron regulación de la población hasta dos meses post-tratamiento. La eficacia del Pyriproxyfen en las tres poblaciones de *A. aegypti* del estado Trujillo ponen de manifiesto la posibilidad de su utilización para el control vectorial; más aún cuando Alvarez *et al.* (2006), refieren pérdida de susceptibilidad al Temefos para la población Paramito con un FR₅₀ de 6,34. Esta zona del Paramito es altamente urbanizada, sujeta a constante presión con insecticidas y con altos índices de infestación del vector y de donde proceden la mayoría de los casos de dengue en el estado Trujillo. Otra alternativa sería la utilización de tabletas generadoras de humo que contienen Pyriproxyfen (2%) y permetrina (10%) una vez comprobada la susceptibilidad de las poblaciones al piretroide, debido a que esta formulación ha ocasionado más de 90% de inhibición de emergencia y 100% de mortalidad en adultos de *A. aegypti* en campo (Harburguer *et al.* 2009).

Finalmente, es importante acotar que la OMS reconoce que el Pyriproxyfen GR a bajas concentraciones es muy efectivo para el control de mosquitos que se crían en recipientes de agua (WHO 2001), por lo que sería un compuesto con potencial importancia para el control de las poblaciones de *A. aegypti*, susceptibles a la acción del regulador, ya que en el estado Trujillo frecuentemente este vector se cría en contenedores o recipientes para el almacenamiento de agua de consumo entre los que destacan las pipas pequeñas y grandes (Lenhart *et al.* 2006).

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Compañía SUMITOMO por la donación del Sumilarv → 0,5%G, a los árbitros por los comentarios realizados a este manuscrito y al proyecto Misión Ciencia 2008000911-1, Venezuela por el apoyo financiero al presente estudio.

Literatura citada

- ÁLVAREZ, L.; BRICEÑO, A. y OVIEDO, M. 2006. Resistencia al temefos en poblaciones de *Aedes aegypti* del occidente de Venezuela. Revista Colombiana de Entomología 32 (2): 37-53.
- DONG-KYU LEE. 2001. Field evaluation of an insect growth regulator, pyriproxyfen, against *Aedes togoi* larvae in brackish water in South Korea. Journal of Vector Ecology 26(1): 39-42.
- HARBURGUER, L.; SECCACINI, H.; ZERBA, E.; LICASTRO, S. 2009. In Gary G. Clark and Yasmin Rubio-Palis. Mosquito Vector Biology and Control in Latin America—A 19TH Symposium. Journal of the American Mosquito Control Association 25:4, 486-499.
- IHUINCHA, M.; ZAMORA-PEREA, E.; ORELLANA-RIOS, W.; STANCIL, J.D.; LOPEZ-SIFUENTES, C. VIDAL-ORE. 2005. Potential use of pyriproxyfen for the control of *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. Journal of Medical Entomology 42(4): 620-30.
- LENHART, A.; CASTILLO, C.; OVIEDO, M. y VILLEGAS, E. 2006. Use of the pupal/demographic-survey technique to identify the epidemiologically important types of containers producing *Aedes aegypti* (L.) in a dengue-endemic area of Venezuela. Annals of Tropical Medicine & Parasitology 100 (Supplement 1): S53-S59.
- MAZZARRI, M.B.; GEORGHIOU, G. P. 1995. Characterization of resistance to organophosphate, carbamate and pyrethroid insecticides in field populations of *Aedes aegypti* from Venezuela. Journal of the American Mosquito Control Association 11: 315-322.
- MOUCHET, J. 1967. La resistance aux insecticides chez *Aedes aegypti* et les espèces voisines. Bulletin of the World Health Organization 36: 569-577.
- OKAZAWA, T.; BAKOTEE, B.M.; SUZUKI, H.; KAWADA, H.; KERE, N. 2002. Field evaluation of an insect growth regulator, pyriproxyfen, against *Anopheles punctulatus* on north Guadalcanal, Solomon Islands. Journal of the American Mosquito Control Association 18:196-201.
- PEREZ, E.; FERNANDEZ, M.D. 2001. Resistance of *Aedes aegypti* to pyrethroids in municipalities of Aragua state, Venezuela. In Clark, G., Quiroz M.H. Mosquito Control and Biology in Latin America- AN Eleventh Symposium. Journal of the American Mosquito Control Association 17(3): 166-180.
- QUATERMAN, K.D.; SCHOOF, H.F. 1958. The status of insecticide resistance in arthropods of public health importance in 1956. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 7: 74-83.
- RESENDE, M. y GAMA, R. 2006. Persistence and efficacy of growth regulator pyriproxyfen in laboratory conditions for *Aedes aegypti*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39 (1): 72-75.
- RUEDA, L. 2004. Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. Magnolia Press, New Zealand. 60 p.
- YAPABANDARA, A. y CURTIS C. 2002. Laboratory and field comparisons of pyriproxyfen, polystyrene beads and other larvicidal methods against malaria vectors in Sri Lanka. Acta Tropica 81:211-223.
- YODBUTRA S.; KETAVAN. C.; UPATHAM ES.; AREEKUL S. 1985. Effects of a juvenile hormone analogue on the morphology and biology of *Aedes scutellaris malayensis* Colless (Diptera: Culicidae). The southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 16: 41-48.
- VYTHILINGAM I.; BELLEZA M.; ROCHANI H.; TAN S.; TAN CH. 2005. Laboratory and field evaluation of the insect growth regulator pyriproxifen (Sumilarv 0.5G) against dengue vectors. Journal of the American Mosquito Control Association 21(3): 296-300.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. Review of: IR3535, KBR3023, (RS)-Methoprene 20% EC, Pyriproxyfen 0.5% GR, Lambda-cyhalothrin 2.5% CS. Report of the fourth WHOPES Working Group Meeting, WHO/HQ, Geneva, 4-5 December 2000. WHO/CDS/WHOPES/2001.2, 2001.

Recibido: 14-jul-2010 • Aceptado: 14-mar-2011