

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE UN POTENCIAL INSECTICIDA NANOPARTICULADO
DE *Schinus molle* PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti***

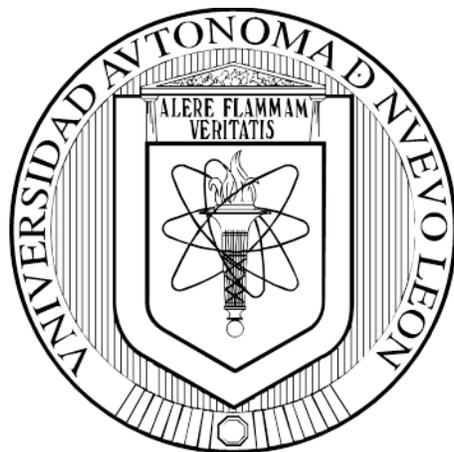
POR

HÉCTOR ISABEL SALAS CEDILLO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA
BIOMÉDICA**

NOVIEMBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE UN POTENCIAL INSECTICIDA NANOPARTICULADO
DE *Schinus molle* PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti***

POR

Q.C.B. HÉCTOR ISABEL SALAS CEDILLO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA
BIOMÉDICA**

NOVIEMBRE, 2016

**DESARROLLO DE UN POTENCIAL INSECTICIDA
NANOPARTICULADO DE *Schinus molle* PARA EL CONTROL DE
*Aedes aegypti***

Aprobación de Tesis:



DRA. ROCÍO ÁLVAREZ ROMÁN
Directora de Tesis



DR. SERGIO ARTURO GALINDO RODRÍGUEZ
Co-Director de Tesis



DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO
Comisión de Tesis



DR. med. RAQUEL GARZA GUAJARDO
Subdirectora de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico con mucho amor a mi familia y mi novia, quienes con su apoyo y consejos, me motivaron y alentaron para alcanzar una meta más en mi vida

*“Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como la oportunidad para penetrar en el
bello y maravilloso mundo del saber”*

Albert Einstein

Agradecimientos

Durante mi andar en este proyecto que emprendí hace dos años, fueron muchas las personas que se cruzaron en mi camino y que de una u otra forma, me apoyaron y entusiasmaron para seguir adelante.

A mis papas por su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida, que con sus enseñanzas y regaños me han guiado. A mi papa Narciso por ser ese ejemplo de disciplina y constancia. A mi mama Josefina por ser un ejemplo de sacrificio y entrega total.

A mis hermanos Marlon, Alain y Lluvia por estar siempre ahí para mí y por su apoyo, por cuidarme y procurarme siempre.

A mi novia Laura por su amor y paciencia, por ser parte fundamental de mi vida y ser mi soporte. Por enseñarme el verdadero amor y ser un ejemplo de entrega profesional.

A mis amigos QCB's, por ser diferentes y mantener esa alegría intacta desde el día en que los conocí.

A la Dra. Rocío Álvarez por todas sus enseñanzas durante todos estos años trabajando para ella. Por su apoyo constante y siempre motivarme a sacar ese ingenio necesario en el trabajo de laboratorio. Por siempre contagiarme con su alegría y lo más importante por introducirme en el mundo de las nanopartículas.

Al Dr. Sergio por siempre recibirme con esa amabilidad y por compartir sus conocimientos. Por siempre ponerme en jaque con sus preguntas.

A la Dra. Vero por siempre estar disponible para sus alumnos y por esa picardía que la caracteriza. Por siempre brindar una sonrisa.

Al Dr. Ponce por todo el apoyo que me brindo durante la realización de los ensayos desarrollados en su laboratorio y por siempre estar pendiente de mis avances.

A mis compañeros del Nanolab por siempre recibirme amablemente y por su apoyo. En especial a Lore por todos sus consejos y su apoyo.

A mis amigos y compañeros de maestría Erick, Daniel, Roque, Claudia, Sonia, Elda y Yolanda por su amistad y alegría, porque su presencia amenizó mi estancia en este posgrado. A mi amigui Yolanda por ser una arrastrada igual que yo y compartir los buenos y malos momentos que pasamos en estos dos años.

A los Pokemones de Analítica por todos esos momentos compartidos en el cubículo de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Por la beca de manutención que me fue otorgada durante mis estudios de posgrado en el programa de la Maestría en Ciencias con orientación en Química Biomédica, con el número de beca 632093.

Por los fondos otorgados para el proyecto CONACyT-Problemas Nacionales 2014/248560 para el desarrollo de este trabajo.

A la **Red Multidisciplinaria para el Tratamiento y Control de Enfermedades Infecciosas**. PRODEP/103.5/15/14156.

**DESARROLLO DE UN POTENCIAL INSECTICIDA
NANOPARTICULADO DE *Schinus molle* PARA EL CONTROL DE
*Aedes aegypti***

Presentado por:

Q.C.B. HÉCTOR ISABEL SALAS CEDILLO

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina en colaboración con el Laboratorio de Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Rocío Álvarez Román y co-dirección del Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez.

FIRMAS:

DIRECTOR



Dra. Rocío Álvarez Román

Resumen

Q.C.B. Héctor Isabel Salas Cedillo
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de presentación: Noviembre / 2016

Título del Estudio: **DESARROLLO DE UN POTENCIAL INSECTICIDA NANOPARTICULADO DE *Schinus molle* PARA EL CONTROL DE *Aedes aegypti***

Número de páginas: 101

Candidato para obtener el título de Maestro en Ciencias con orientación en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica/Química de Producto Naturales

Propósito y Método de estudio: Históricamente el mosquito *Aedes aegypti* es identificado como el principal vector de virus como los virus del dengue, zika y chikungunya. Debido a características naturales de esta especie, ha podido adaptarse a múltiples climas y se ha propagado por gran parte del planeta, trayendo consigo un gran problema de salud pública con la propagación y el aumento en el número de infecciones año con año. Los productos naturales, específicamente los aceites esenciales (EO) se presentan como una alternativa para el desarrollo de nuevos biopesticidas. El EO de *Schinus molle*, ha mostrado tener múltiples actividades como antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, repelente e insecticida; sin embargo los componentes activos son susceptibles a degradación por diversos factores como el oxígeno y rayos UV, además de ser compuestos volátiles. Sistemas acarreadores como las nanopartículas poliméricas (NP), son una alternativa que permite la encapsulación de estos compuestos para favorecer su protección y estabilidad. Las NP son sistemas acarreadores de principios activos que presentan tamaños de partículas entre 1-600 nm aumentando el área superficial y la biodisponibilidad de los activos encapsulados.

Este trabajo constó de cuatro etapas: 1) Optimización de la técnica de nanoprecipitación para la encapsulación del EO de *Schinus molle*, 2) Validación de un método de microextracción en fase sólida por headspace (HS-SPME) para la cuantificación de los componentes del EO de *Schinus molle* por cromatografía de gases (FID-GC), 3) Caracterización fisicoquímica del sistema de NP y evaluación del perfil de liberación de los componentes del EO de *Schinus molle*, 4) Evaluación de la actividad larvicida de los componentes del EO de *Schinus molle* frente a larvas de *Aedes aegypti*. En la primera etapa, se optimizó la técnica de nanoprecipitación para obtener NP cargadas con EO de *Schinus molle*, se utilizó la técnica de diálisis para su purificación. Para la segunda etapa, se validó el método de HS-SPME para cuantificar los componentes del EO de *Schinus molle* por FID-GC evaluando linealidad, límite de detección y de cuantificación, precisión y exactitud. En la tercera etapa, se caracterizó las NP obtenidas evaluando tamaño de partícula, índice de polidispersión (IPD), estabilidad, porcentaje de eficiencia de encapsulación, porcentaje de encapsulación, además de un análisis por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y el perfil de liberación *in vitro* de los componentes del EO de *Schinus molle* a partir de las NP cargadas. Finalmente, se evaluó la actividad larvicida de las NP cargadas con el EO de *Schinus molle* frente a larvas de *Aedes aegypti* para obtener la LC₅₀ mediante un estudio de regresión probit de mortalidad/log de concentración.

Conclusiones y Contribuciones: La técnica de nanoprecipitación permitió obtener un sistema de NP cargadas con EO de *Schinus molle* con un tamaño de 160 ± 11 nm, un IPD de 0.177 ± 0.006 y estables. El método cromatográfico de HS-SPME por FID-GC validado permitió cuantificar de forma lineal, exacta y precisa los componentes del EO de *Schinus molle* nanoencapsulados. Se demostró que el mircenolol, α -felandreno y limoneno nanoencapsulados presentaron una liberación controlada durante 72 horas. Cabe mencionar que es la primera vez que se realiza un estudio *in vitro* de liberación de EO de *Schinus molle* nanoencapsulado. Finalmente, las NP cargadas con EO de *Schinus molle* fueron activas frente a las larvas de *Aedes aegypti* con una LC₅₀ de 0.80 ppm con lo que se establece su potencial aplicación como larvicida en el control del mosquito vector de enfermedades como dengue, zika y chikungunya.



Dra. Rocío Álvarez Román

Directora de Tesis

ÍNDICE

Contenido	Página
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	
1.1 <i>Aedes aegypti</i>	1
1.1.1 Ciclo biológico del <i>Aedes aegypti</i>	3
1.1.2 <i>Aedes aegypti</i> como vector de enfermedades.	7
1.1.3 Métodos de control de <i>Aedes aegypti</i>	9
1.2 Productos naturales: Aceites esenciales	15
1.3 <i>Schinus molle</i>	18
1.4 Sistemas de nanopartículas poliméricas	21
1.5 Justificación	25
1.6 Objetivo general	26
1.7 Objetivos específicos	26
CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 Materiales, equipos y reactivos	27
2.1.1 Materiales	27
2.1.2 Equipos	27
2.1.3 Reactivos	28
2.2 Optimización de la técnica de nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> y purificación de la suspensión.	29
2.2.1 Optimización de la formulación de nanopartículas	29
2.2.2 Purificación de la formulación de nanopartículas.	29

2.2.3 Tamaño de partícula e Índice de polidispersión	30
2.3 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad headspace (HS-SPME) para la cuantificación del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> nanoencapsulado por FID-GC.	30
2.3.1 Validación del sistema	31
> Linealidad	31
> Límite de detección	32
> Límite de cuantificación	33
> Precisión	33
2.3.2 Validación del método	35
> Exactitud	36
> Precisión	36
2.4 Caracterización fisicoquímica del sistema de NP y evaluación del perfil de liberación del aceite esencial de <i>Schinus molle</i>	38
2.4.1 Estabilidad.	38
2.4.2 Análisis por FT-IR.	38
2.4.3 Contenido de aceite esencial de <i>Schinus molle</i> en la NP.	39
2.4.4 Perfil de liberación del aceite esencial de <i>Schinus molle</i>	40
2.5 Determinación de la actividad larvica del sistema nanoparticulado cargado con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	40

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Optimización de la técnica de nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> y purificación de la suspensión	42
3.2 Caracterización fisicoquímica del sistema de NP y evaluación del perfil de liberación del aceite esencial de <i>Schinus molle</i>.	46
3.3 Determinación de la actividad larvica del sistema nanoparticulado cargado con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>.	52

3.4 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad headspace (<i>HS-SPME</i>) para la cuantificación del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> nanoencapsulado por <i>FID-GC</i>	56
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	
4.1 Optimización de la técnica de nanoprecipitación: obtención, purificación y caracterización de la suspensión de NP.	58
4.2 Determinación de la actividad larvicida del sistema nanoparticulado cargado con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	68
4.3 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad headspace (<i>HS-SPME</i>) para la cuantificación del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> nanoencapsulado por <i>FID-GC</i>	71
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.	74
CAPÍTULO 6: PERSPECTIVAS.	76
BIBLIOGRAFÍA.	77
ANEXOS.	86

Índice de figuras

Figura	Página
1.1 Curvas de las isotermas de Enero y Julio que indican los posibles límites geográficos de los hemisferios norte y sur para la supervivencia de <i>Aedes aegypti</i>	2
1.2 Ciclo biológico de la especie <i>Aedes aegypti</i>	4
1.3 Hembra adulta de la especie <i>Aedes aegypti</i>	6
1.4 Estrategias de control de <i>Aedes aegypti</i>	10
1.5 Tipos de nanopartículas y su incorporación de principios activos	22
3.1 Efecto de la cantidad de polímero sobre el tamaño de partícula en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, X mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada). (Media \pm D.E., n=6).	42
3.2 Efecto de la cantidad de polímero sobre el índice de polidispersión en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, X mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada). (Media \pm D.E., n=6).	43
3.3 Efecto de la cantidad de Aceite esencial (EO) de <i>Schinus molle</i> sobre el tamaño de partícula en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, X mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada). (Media \pm D.E., n=2).	43
3.4 Efecto de la cantidad de Aceite esencial (EO) de <i>Schinus molle</i> en el índice de polidispersión en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, X mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada). (Media \pm D.E., n=2).	44

3.5 Variación del tamaño de partícula durante el estudio de la estabilidad de la formulación de NP cargadas con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> . (Media \pm D.E., n=2).	46
3.6 Variación del índice de polidispersión durante el estudio de la estabilidad de la formulación de NP cargadas con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> . (Media \pm D.E., n=2).	47
3.7 Señales en el espectro de infrarrojo obtenido para el polímero Eudragit L100-55.	48
3.8 Señales obtenidas en el espectro infrarrojo obtenido para el pululano.	49
3.9 Señales obtenidas en el espectro de infrarrojo obtenido para el aceite esencial de <i>Schinus molle</i>	49
3.10 Señales obtenidas en el espectro de infrarrojo de las NP sin el aceite esencial de <i>Schinus molle</i>	50
3.11 Señales obtenidas en el espectro de infrarrojo de las NP cargadas con el aceite esencial de <i>Schinus molle</i>	50
3.12 Perfil de liberación de mirceno. Porcentaje de mirceno liberado de las NP cargadas con el aceite esencial de <i>Schinus molle</i> en función del tiempo (Media \pm D.E., n=3).	51
3.13 Perfil de liberación de α -felandreno. Porcentaje de α -felandreno liberado de las NP cargadas con el aceite esencial de <i>Schinus molle</i> en función del tiempo (Media \pm D.E., n=3).	51
3.14 Perfil de liberación de limoneno. Porcentaje de limoneno liberado de las NP cargadas con el aceite esencial de <i>Schinus molle</i> en función del tiempo (Media \pm D.E., n=3).	52
3.15 Gráfica del modelo de regresión Probit obtenida en la evaluación de la actividad larvícida del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> libre.	53
3.16 Gráfica del modelo de regresión Probit obtenida en la evaluación de la actividad larvícida de las NP cargadas con el aceite esencial de <i>Schinus molle</i>	55

Índice de tablas

Tabla	Página
1.1 Compuestos identificados en la especie <i>Schinus molle</i>	20
1.2 Formulaciones de NP para aceites esenciales.	23
3.1 Efecto de la cantidad de pululano en el grado de sedimentación en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, 87.5 mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada, X mg de Pululano).	44
3.2 Valores optimizados de los componentes de la formulación de NP para la encapsulación del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> por la técnica de nanoprecipitación.	45
3.3 Valores obtenidos para el tamaño de partícula e índice de polidispersión de la formulación de NP cargadas con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> . (Media \pm D.E., n=30).	45
3.4 Porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación obtenidos para los compuestos analizados del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> (Media \pm D.E., n=3).	47
3.5 Actividad larvicida definitiva del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> libre frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i> después de 24 horas de la aplicación de la emulsión. (Media \pm D. E., n=3).	53
3.6 Concentración Letal 50 del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> libre (Media \pm D.E., n=3).	54
3.7 Actividad larvicida definitiva de las NP cargadas con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> frente a larvas de <i>Aedes aegypti</i> después de 24 horas de contacto con las NP. (Media \pm D.E., n=3).	54

3.8 Concentración Letal 50 de las NP cargadas con el aceite esencial de <i>Schinus molle</i> (Media \pm D.E., n=3).	55
3.9 Parámetros de validación del sistema para cuantificar los tres componentes “huella” del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> con <i>HS-SPME</i> por <i>FID-GC</i>	57
3.10 Parámetros de validación del método para cuantificar los tres componentes “huella” del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> con <i>HS-SPME</i> por <i>FID-GC</i>	57

Índice de fórmulas

Fórmula	Página
2.1 Estadístico $S_{y/x}$	32
2.2 Desviación estándar de la ordenada al origen (S_a)	32
2.3 Límite de detección	33
2.4 Límite de cuantificación	33
2.5 Media	34
2.6 Desviación estándar	34
2.7 Desviación estándar relativa	35
2.8 Porcentaje de recuperación	36
2.9 Porcentaje de encapsulación	39
2.10 Porcentaje de eficiencia de encapsulación.	39

Abreviaturas

%E	Porcentaje de encapsulación
%EE	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
%R	Porcentaje de recuperación
C_a	Concentración en la muestra adicionada
CA	Concentración adicionada
CU	Concentración en la muestra sin adicionar
D.E ó s	Desviación estándar
DER	Desviación estándar relativa
EO	Aceite(s) esencial(es)
EO_n	Gramos de aceite esencial no encapsulados
EO_t	Gramos de aceite esencial totales
<i>FID</i>	Detección de ionización en llama
<i>FT-IR</i>	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
<i>HS</i>	Headspace
IPD	Índice de polidispersión
LC_{50}	Concentración letal 50
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
n	Número de mediciones
NP	Nanopartículas poliméricas
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
P	Gramos de polímero
pH	Potencial de hidrógeno
S_a	Desviación estándar de la ordenada al origen
SSA	Secretaría de Salud
$S_{y/x}$	Valor estadístico de los errores aleatorios
x_i	Valor de cada medición
\bar{x}	Media
y_i	Valor de la respuesta obtenida
\bar{y}_i	Valor de la respuesta calculada

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 *Aedes aegypti*

La especie *Aedes aegypti* es originaria del continente africano, es un artrópodo que pertenece a la familia *Culicidae* del orden *Diptera*, de esta especie se conocen tres subespecies: *aegypti*, *queenslandensis* y *formosus*. La subespecies *aegypti* y *queenslandensis* pueden ser encontradas en el continente Americano, mientras que la subespecie *formosus* se encuentra estrictamente en el continente Africano y es exclusivo de zonas selváticas (Thirion J., 2003).

Aedes aegypti es una especie de zonas tropicales y subtropicales ampliamente distribuida en todo el mundo, principalmente entre las latitudes 35°N y 35°S, las cuales corresponden a los límites geográficos de una isoterma invernal de 10°C (Figura 1.1). Durante las estaciones más cálidas, *Aedes aegypti* ha podido sobrepasar estos límites hasta una latitud de 45°N, sin embargo su subsistencia se ve limitada por las bajas temperaturas durante las épocas invernales. Esta

misma susceptibilidad a las bajas temperaturas, hace que el espacio de vuelo de esta especie no sobrepase los 1000 metros de altura (WHO, 2009).



Figura 1.1 Curvas de las isotermas de Enero y Julio que indican los posibles límites geográficos de los hemisferios norte y sur para la supervivencia de *Aedes aegypti*

Este mosquito está íntimamente relacionado con el humano. La ecología que presenta este insecto es un claro ejemplo de adaptación de una especie silvestre al ámbito humano (Sanabria L. *et al.*, 2009). Las hembras de *Aedes aegypti* son hematófagas, por lo que la especie es predominantemente doméstica, se alimentan de sangre humana o de animales domésticos y proliferan en hábitats artificiales en las viviendas y sus alrededores. La sangre es necesaria para las hembras para la maduración de sus óvulos, lo que da inicio al ciclo biológico de este mosquito (Thirion J., 2003).

Existen dos factores de gran importancia para la distribución y establecimiento de esta especie. El primero relacionado con lo inherente a la propia especie

como: a) su capacidad de interrumpir temporalmente su desarrollo en su fase de huevo, b) plasticidad genética dada por su ciclo de vida rápido y la alta tasa generacional, c) preferencia de las hembras por ovopositar en pequeños cuerpos de agua en recipientes manufacturados por el hombre (Ibáñez S. y Gómez H., 1995) y d) la resistencia de los huevos de esta especie a la desecación, lo cual les permite sobrevivir en ambientes inhóspitos, así como facilitar su transporte por medio de humanos (Rey J. y Lounibos P., 2015).

El segundo factor, se relaciona con variables ambientales como: a) el crecimiento poblacional, b) los movimientos migratorios, como los viajes internacionales e intercontinentales, c) la urbanización descontrolada y d) la pobreza reflejada en problemas de vivienda, educación, abasto de agua y recolección de desechos (De la Mora-Covarrubias A. *et al.*, 2010).

1.1.1 Ciclo Biológico del *Aedes aegypti*

El ciclo de vida completo de esta especie, de huevo a adulto, se completa en 10 días en óptimas condiciones de temperatura y alimentación (Figura 1.2). Son insectos que presentan una metamorfosis completa (holometabolía), y su desarrollo comprende cuatro fases: huevo, larva (cuatro estadios), pupa y adulto (Nelson M.J., 1986).

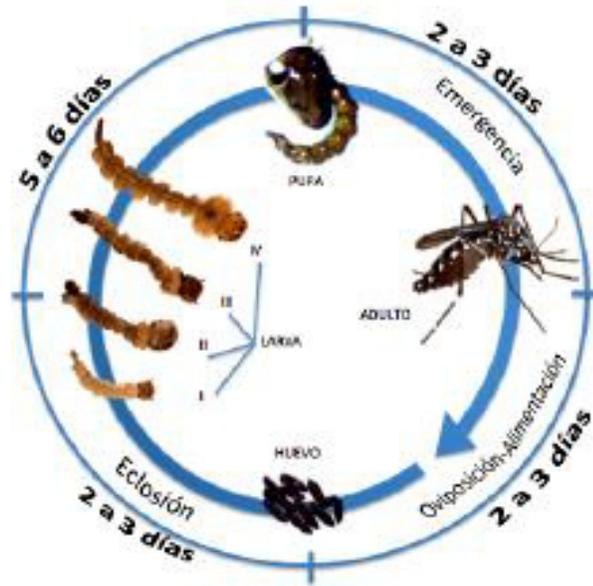


Figura 1.2 Ciclo biológico de la especie *Aedes aegypti*

Huevo: Miden aproximadamente 1 mm de longitud. El desarrollo embrionario se lleva a cabo en alrededor de 48 h en condiciones óptimas de humedad y temperatura, pudiendo prologarse hasta 5 días si la temperatura es menor de 24°C, posterior a esto se da la eclosión. Una vez completado su desarrollo, el embrión dentro del huevo es capaz de resistir largos periodos de desecación por meses o por más de un año, permaneciendo viable para la eclosión al volver a tener contacto con el agua y la flora bacteriana (Nelson M.J., 1986).

Larva: Esta fase de desarrollo del mosquito es acuática y representa la fase de crecimiento y desarrollo. Las larvas se mantienen alimentándose de la materia orgánica disponible en el agua mediante sus cuerdas bucales en forma de abanico. La duración de esta etapa depende de factores como temperatura, disponibilidad de alimento y densidad de larvas. En condiciones óptimas el desarrollo desde la eclosión de la larva hasta la pupación puede llevarse a cabo

en 5 días, pero normalmente este ocurre en un periodo de 7-14 días. Como se mencionó con anterioridad esta fase consta de cuatro estadios, los primeros tres estadios se desarrollan rápidamente, mientras que el cuarto estadio toma más tiempo ya que hay un aumento considerable de tamaño y peso en la larva. En condiciones limitantes para el desarrollo del cuarto estadio, este puede prolongarse hasta por varias semanas (Nelson M.J., 1986).

Pupa: Esta fase es metabólicamente inactiva. Su función es la metamorfosis de la fase larvaria a la fase adulta. Las pupas de los mosquitos presentan reacciones a estímulos como vibraciones y cambios en la intensidad de la luz, desplazándose activamente por todo el criadero. Cuando estas están inactivas flotan en la superficie, lo que facilita la emergencia del adulto. Este estadio de desarrollo tiene una duración de aproximadamente dos a tres días, emergiendo aproximadamente el 88% de los adultos en un tiempo de 48 h (Nelson M.J., 1986).

Adulto: Su función es la reproducción y dispersión de la especie. Al emerger de la pupa, el adulto se posa sobre la pared del criadero durante unos minutos para permitir el endurecimiento del exoesqueleto y las alas. Antes de las primeras 24 h ambos sexos están listos para el apareamiento; el macho es atraído por el sonido generado por las alas de la hembra durante el vuelo. El apareamiento ocurre por lo general durante el vuelo, aunque puede ocurrir sobre superficies; una sola inseminación es suficiente para fecundar todos los huevos que la hembra producirá en toda su vida (Nelson M.J., 1986).

Las hembras se alimentan de sangre, la cual les proporciona proteínas para el desarrollo de los huevos (Figura 1.3), mientras que los machos se alimentan de carbohidratos de frutos o néctar de flores. Es común que después de cada alimentación la hembra desarrolle un lote de huevos. La alimentación y postura ocurren principalmente durante el día, registrando mayor actividad durante las primeras horas del día, a media mañana, a media tarde o al anochecer; el intervalo de tiempo que transcurre entre ambos procesos es de 48 h en condiciones óptimas de temperatura. La mayoría de las posturas ocurren cerca del crepúsculo, las hembras prefieren recipientes oscuros y sombreados que contienen agua limpia. Los huevos quedan adheridos a la pared del recipiente en la zona húmeda justo encima de la superficie del agua (Nelson M.J., 1986).



Figura 1.3 Hembra adulta de la especie *Aedes aegypti*

1.1.2 *Aedes aegypti* como vector de enfermedades

Una forma de entender la capacidad de esta especie como vector de enfermedades, es la asociación de aspectos tanto entomológicos como demográficos. Para conocer el potencial epidémico de este mosquito, la biología del propio vector es, principalmente la característica que permite estimar el riesgo entomológico de transmisión. Además, las fases del ciclo de vida del mosquito aportan información de la dinámica de transmisión (Fernández *et al.*, 1995) y los factores genéticos permiten establecer la susceptibilidad y habilidad de esta especie a infectarse y transmitirlo (Thirion, 2003).

Esta especie es conocida por ser implicada en la transmisión del virus del dengue y de la fiebre amarilla, además de otros agentes como el virus del chikungunya, del zika, del oeste del Nilo y varios tipos de encefalitis. Esta especie es conocida como el mosquito de la fiebre amarilla, a pesar de no haber transmitido esta enfermedad en más de 50 años, gracias a las campañas de vacunación y de control de este vector (Rey J. y Lounibos P., 2015).

En la actualidad, la importancia de *Aedes aegypti* como vector de enfermedades, radica en que es el principal vector en la transmisión del virus del dengue (Powell J. R. y Tabachnick W. J. 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) declara que dos quintas partes de la población mundial se encuentran en riesgo de ser infectada por el virus del dengue a lo largo de 100 países, los cuales han sido afectados por epidemias de fiebre del dengue y

fiebre hemorrágica por dengue. Se estima que anualmente se presentan más de 50 millones de casos de infecciones por dengue, de los cuales 500 mil requieren hospitalización y se presentan 20 mil defunciones, con tasas de infección de hasta 64 por cada 1000 habitantes (WHO, 2012).

En México, la primera epidemia de dengue hemorrágico ocurrió en 1995. A partir de entonces, el número de casos de dengue ha aumentado y la incidencia pasó de 5,220 casos en 2003 a 40,559 en 2007. Aunque en la actualidad en México circulan los cuatro serotipos virales, el número de muertes por dengue se ha mantenido por debajo del 1% del total de casos de dengue hemorrágico. La OMS coloca a México como el país que ocupa el quinto lugar de incidencia en América Latina (De la Mora-Covarrubias A. *et al.*, 2010).

Recientemente, las infecciones por el virus del Chikungunya han ido en aumento, donde *Aedes aegypti* ha tenido un papel determinante ya que es el vector de este virus. Países como Brasil, Canadá, Estados Unidos y Guyana francesa han reportado un gran número de casos importados desde la reemergencia de este virus. A finales de 2013 se confirmaron los primeros casos autóctonos de infección por este virus en islas del Caribe. La fiebre de Chikungunya se ha extendido progresivamente poniendo en riesgo de epidemias a regiones en donde el mosquito *Aedes aegypti* está ampliamente diseminado (Vega-Rua A. *et al.*, 2014).

1.1.3 Métodos de control de *Aedes aegypti*

El control de *Aedes aegypti* ha sido la principal estrategia para disminuir la transmisión del virus del dengue y el chikungunya al humano. En la actualidad aún no se cuenta con un medicamento específico para el tratamiento de estas infecciones (Sanabria L.*et al.*, 2009; Brathwaite D.*et al.*, 2012). Existen ejemplos históricos bien documentados de la reducción o eliminación significativa de la fiebre amarilla y el dengue a través del control del vector. Recientemente, en Singapur y Cuba se ha reducido considerablemente la transmisión del dengue mediante la promulgación de leyes y a través de acciones sostenidas contra el *Aedes aegypti* (Gubler D.J.,2011).

Actualmente, la mayoría de los programas buscan reducir las densidades de las poblaciones de vectores tanto como sea posible, así como mantener estos niveles bajos. Al mismo tiempo se busca hacer esfuerzos para reducir la longevidad de los mosquitos hembra adultos con el uso de métodos insecticidas a fin de disminuir el riesgo de transmisión de virus.

El control de *Aedes aegypti* se logra principalmente mediante la eliminación de posibles hábitats artificiales que sean potenciales sitios de ovoposición y que permitan el desarrollo de las fases acuáticas. Los hábitats son eliminados para evitar el acceso de los mosquitos a estos contenedores, ya sea mediante el vaciado o la limpieza de los mismos con una frecuencia considerable, por la eliminación de las etapas de desarrollo del vector con insecticidas o agentes de control biológico o la eliminación de los mosquitos adultos con insecticidas, o

por combinación de los métodos mencionados (Figura 1.4) (Rodríguez-Cruz, 2002; WHO, 2009).



Figura 1.4 Métodos de control de *Aedes aegypti*

Para seleccionar el método o combinación de métodos de control vectorial más adecuados, se deben considerar la ecología local y el comportamiento de las especies objetivo, los recursos disponibles para la ejecución, el contexto cultural, la viabilidad de aplicar en tiempo y forma así como la adecuación de cobertura territorial. Los métodos de control de vectores incluyen la eliminación o la gestión de los hábitats larvarios, larvicidas con insecticidas, el uso de agentes biológicos y la aplicación de adulticidas (WHO, 2009).

Las acciones tienen que ver principalmente con dos áreas específicas: agua y residuos sólidos. Cuando el suministro de agua potable no existe, es irregular o de baja calidad, es común el almacenamiento de agua en tanques, barriles y

otros recipientes, y estos pueden producir grandes cantidades de mosquitos. Cuando la recolección de basura es irregular o de baja calidad, la acumulación de materiales inservibles en los patios como latas, botellas y llantas es más frecuente y con iguales consecuencias, mayor producción de mosquitos (Rodríguez-Cruz, 2002).

- **Control químico: Larvicidas**

Aunque los productos químicos son ampliamente utilizados, los larvicidas deben ser considerados como complementarios a la gestión ambiental y salvo en situaciones de emergencia debe limitarse a los contenedores que no pueden de otra manera ser eliminados o manejados. El uso de larvicidas puede ser poco práctico para alcanzar ciertos hábitats naturales(axilas de hojas y cavidades en árboles) y algunos hábitats interiores (contenedores de almacenamiento de agua y maceteros para plantas), lo cual es una limitación importante. Debido a que *Aedes aegypti* a menudo deposita los huevos en recipientes de almacenamiento de agua, los larvicidas deben tener baja toxicidad para otras especies y no deben cambiar significativamente el sabor, olor o color del agua (Rodríguez-Cruz, 2002; WHO, 2009).

Uno de los larvicidas de mayor aplicación a nivel mundial es el temephos, también conocido como abate, este producto es un organofosforado el cual es aplicado en forma de granos de arena y es considerado uno de los mejores químicos para el control de larvas de *Aedes aegypti* (Álvarez *et al.*, 2006). Este

producto es aplicado en todos aquellos depósitos de agua que no pueden ser eliminados y/o destruidos dentro y alrededor de las casas en dosis de 1 ppm (Rodríguez-Cruz, 2002; WHO, 2009).

Los ciclos de tratamiento dependerán de la especie de mosquito, la estacionalidad de la transmisión, los patrones de las precipitaciones, duración de la eficacia del larvicida y tipos de hábitat de larvas. Son recomendadas dos ó tres rondas de aplicación por año con el adecuado seguimiento de la eficacia de los productos, sobre todo en las zonas donde la temporada de transmisión principal es corta (WHO, 2009).

- **Control químico: Adulticidas**

La aplicación de este tipo de productos está destinada a tener un impacto en las densidades de mosquitos, la longevidad y otros parámetros de transmisión. Los adulticidas se aplican ya sea como tratamientos superficiales residuales o como tratamiento de espacios (WHO, 2009). De acuerdo al Plan Continental establecido por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), los insecticidas adulticidas deben emplearse fundamentalmente durante brotes epidémicos de alguna de las enfermedades que transmite el vector, como medida de emergencia, no deben aplicarse como medida de rutina (Rodríguez-Cruz, 2002).

Cuando se necesita una rápida reducción de la densidad del vector, tales como en situaciones de emergencia, el periodo de tratamiento idealmente debe

llevarse a cabo cada 2-3 días durante 10 días. En casos en los que no es muy urgente la reducción de la densidad del vector se deben realizar aplicaciones una ó dos veces a la semana para mantener la represión de la población adulta del vector. La vigilancia entomológica y epidemiológica continua debe llevarse a cabo para establecer el calendario de aplicación adecuada y la eficacia de la estrategia de control (WHO, 2009).

Así, a pesar de que existen diferentes productos para el control del *Aedes aegypti*, muchos de los cuales han demostrado ser eficaces en diferentes situaciones, su inconveniente radica en que deben aplicarse constantemente, siendo su costo elevado. Asimismo, se han reportado casos de reacciones alérgicas en individuos en contacto con los insecticidas, especialmente en niños y ancianos. Otros trabajos reportan que los insecticidas utilizados actualmente, además de eliminar al *Aedes aegypti*, también lo hacen con su predador natural, otro mosquito no hematófago del género *Toxorhynchites*, que en su estado adulto se alimenta de las larvas del *Aedes aegypti* (Sanabria L. *et al.*, 2009).

Los insecticidas se han utilizado ampliamente para el control del vector del dengue, como resultado, se han detectado poblaciones de mosquito resistentes a los insecticidas en distintos países (WHO, 2009; Maestre R. *et al.*, 2009). Se estableció resistencia a productos organofosforados, piretroides, carbamatos y organoclorados. Con la finalidad de aportar bases para definir una estrategia de manejo regional de insecticidas, Chino-Cantor *et al.* (2014) identificaron poblaciones de *Aedes aegypti* susceptibles a los insecticidas malatión, temefos,

clorpirifósétilico, pirimifós-metil, permetrina, λ -cialotrina, propoxur, y espinosina. Además, establecieron que las tres poblaciones del vector provenientes de tres regiones de Guerrero (México) resultaron resistentes al insecticida λ -cialotrina.

- **Control biológico**

El control biológico se basa en la introducción de organismos que parasitan, compiten con o, de cierta manera, reducen las poblaciones de las especies objetivo. Contra el vector del dengue, sólo ciertas especies de peces larvívoros y copépodos predadores (pequeños crustáceos de agua dulce) han demostrado su eficacia en los hábitats de contenedores específicos. Si bien con el control biológico se evita la contaminación química del medio ambiente, existen limitaciones operacionales como el gasto y la tarea de la crianza de los organismos a gran escala, la dificultad en su aplicación y la utilidad limitada en sitios acuáticos debido a que condiciones de temperatura, pH y contaminación orgánica, pueden exceder los requisitos de supervivencia del organismo.

Cabe mencionar que, los métodos de control biológico son efectivos sólo contra las etapas inmaduras del vector, principalmente contra las larvas. Se debe tener en cuenta que los organismos de control biológico no son resistentes a la desecación, por lo que su utilidad se limita principalmente a los hábitats de contenedores que rara vez se vacían o limpian (contenedores de hormigón o recipientes de almacenamiento de agua de arcilla esmaltada o pozos) (WHO, 2009).

1.2 Productos naturales: Aceites Esenciales

La necesidad de encontrar nuevas alternativas viables para el control de vectores de enfermedades que afectan a la población, y que además sean opciones amigables con el ambiente, ha llevado a los investigadores a enfocarse en obtener y desarrollar productos que provengan de la naturaleza. Diferentes estudios se basan principalmente en el uso tradicional de plantas, a partir de las cuales es posible obtener extractos o aceites esenciales, los cuales han mostrado tener potencial antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatorio y repelente, entre otras.

Los aceites esenciales son producto del metabolismo secundario de las plantas. Estos son compuestos volátiles, naturales y complejos, caracterizados por un fuerte olor, por lo general obtenidos por vapor o hidrodestilación. Químicamente, son mezclas naturales muy complejas que puede contener alrededor de 20 a 60 componentes en diferentes concentraciones.

Se caracterizan por contener dos o tres componentes principales en concentraciones altas (entre 20 y 70%) y otros componentes presentes en cantidad de traza. Los componentes incluyen dos grupos de origen biosintético distinto, el grupo principal se compone de terpenos y terpenoides y el otro grupo de componentes son compuestos aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por su bajo peso molecular (Bakkali *et al.*, 2008). Normalmente, los componentes principales determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales.

La composición de estos aceites es muy variable, y depende de una serie de factores como son: la localización geográfica de la planta, la época en que se colecta, la hora del día en que se realiza la colecta, la técnica o forma de recolección utilizada y la técnica de extracción usada para obtener los aceites esenciales (Domínguez, 1985).

En la naturaleza, los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la protección de las plantas ya que funcionan como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y, además, pueden atraer a algunos insectos para favorecer la dispersión de polen y semillas, o repeler otros insectos indeseables (Bakkali *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales son conocidos por sus propiedades medicinales, principalmente como bactericidas, antivirales y fungicidas. En su investigación Inouye *et al* (2001) demostraron la actividad antibacterial de catorce aceites esenciales frente a patógenos como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. Además, los aceites esenciales han sido utilizados como conservadores de alimentos, antimicrobianos, analgésicos, sedantes, antiinflamatorios, anestésicos locales y espasmolíticos (Bakkali *et al.*, 2008).

La actividad repelente e insecticida de los aceites esenciales ha sido demostrada en múltiples investigaciones, probando ser efectivos en contra de diversos vectores de agentes infecciones. Kumar *et al* (2014) demostraron el potencial larvicida del aceite esencial de semillas de *Apium graveolens* en

contra de larvas de *Aedes aegypti*. De igual forma, Krishnamoorthy *et al*(2015) demostraron que el aceite esencial de semillas de *Nigella sativa* tenía actividad en contra de larvas de las especies *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Culex quinquefasciatus*.

En su trabajo de investigación, Prajapati *et al*(2005) demostraron la actividad larvicida y ovicida del aceite esencial de *Pimpinella anisum* frente a las especies *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*. Por su parte, Amer y Mehlhorn (2006) probaron el potencial larvicida de aceites esenciales de diversas especies entre las cuales se encontraban el *Cinnamo muncamphora*, *Amyris balsamifera* y *Citrus limon*, los cuales fueron probados frente a larvas de la especie *Aedes aegypti*.

En particular, entre los productos naturales utilizados para el control de plagas, aquellos que han mostrado un mejor desempeño son los terpenoides, los cuales se encuentran relacionados o son derivados de monoterpenos. Estos compuestos tienen la función de proteger a las plantas haciendo frente a organismos herbívoros o patógenos. De igual forma este tipo de compuestos han sido utilizados durante muchos años como aditivos alimenticios, fragancias, anticongestionantes, analgésicos y antimicrobianos (Tong, 2012).

Los monoterpenoides se consideran una buena alternativa para su uso como pesticidas debido a que: 1) tienen buena actividad insecticida, acaricida y repelente, además de mostrar actividad frente a una amplia gama de insectos; y 2) son seguros para mamíferos, organismos acuáticos y organismos no blanco,

además de que la mayoría de estos compuestos son biodegradables y amigables con el medio ambiente(Tong, 2012).

A través del tiempo diversos grupos de trabajo se han dedicado a estudiar los efectos de los aceites esenciales y sus constituyentes, sus dosis letales y los tiempos en que estos productos son letales, sin embargo el mecanismo de acción, en general no se encuentra totalmente elucidado. En general, se conoce que los aceites esenciales y sus constituyentes afectan el balance endocrinológico de los insectos y presentan un efecto neurotóxico, lo que provoca síntomas como hiperactividad seguida de hiperexcitación y un rápido estado de shock e inmovilización del insecto (Sahayaraj K., 2014)

En la literatura actual, se menciona que insecticidas monoterpénoides, pueden actuar sobre diversas dianas en insectos, especialmente en el sistema nervioso sobre el receptor ácido γ -aminobutírico (GABA), también al cerrar canales de cloruro y de sodio, modulando receptores de octopamina, de tiramina, de acetilcolina esterasa y nicotínicos de acetilcolina (nAChR) entre otros (Tong, 2012).

1.3 *Schinus molle*

Es una planta que pertenece a la familia *Anacardiaceae*, la cual es originaria de Perú, que está presente en climas cálido, semicálido, semiseco y templado desde los 900 hasta los 3900 metros sobre el nivel del mar. Crece a orilla de caminos, adaptada a distintos hábitats, en matorral xerófilo, pastizal, zona de

transición entre bosque mesófilo de montaña y bosque de encino, bosque de pino, mixto de pino y encino y bosque de juníperus.

Es un árbol que llega a medir 15 metros de altura, siempre verde con ramas colgantes, aromático resinoso, con tronco grueso. Las hojas están divididas en hojitas como plumitas, las flores son pequeñas de color crema parecen encaje, con los frutos globosos y de color rojo-rosa.

Las hojas y frutos de *Schinus molle* contienen un aceite esencial rico en monoterpenos y sesquiterpenos. El compuesto α -amirina se ha detectado en toda la planta, así como el esteroide β -sitosterol, sin embargo la composición del aceite esencial varía de acuerdo a la parte de la planta. El fruto es el mejor estudiado, y se sabe contiene un aceite esencial, gomorresina y taninos (UNAM, 2009). En la Tabla 1.1 se muestran los compuestos que han sido encontrados en dichos aceites.

Tradicionalmente, esta planta ha sido utilizada para padecimientos de índole cultural, como los malos aires, susto y mal de ojo, entre otras. Destaca su empleo, principalmente en el centro y sur del país, en la realización de limpiezas para tratar dichos padecimientos.

Tabla 1.1 Compuestos identificados en la especie *Schinus molle*.

Parte de la planta	Composición del Aceite esencial
Fruto	<p><i>Monoterpenos:</i> α-cadineno, canfeno, carvacrol, <i>para</i>-gimeno, butirato de geraniol, limoneno, mirceno, hexanoato de nerol, α y β-felandreno, α y β-pineno, sabineno, α y γ-terpineno, α-terpineol y el éster del ácido fórmico y terpinoleno.</p> <p><i>Sesquiterpenos:</i> <i>trans</i>-ene-alfa-bergamont, bouboneno, α, β y T-cadinol, α y γ-calacoreno, β-cariofileno, α-copaeno, α-cubeneno, β y γ-endesmol, germacreno D, β-guaieno, α-gurjuneno, α y γ-mouroleno. T-mourolol y β-spatuleno.</p> <p><i>Triterpenos:</i> iso-mas-ticadienólico y el 3 epi-isómero, y el alcaloide piperina.</p>
Hoja	<p><i>Monoterpenos:</i> car-3-ene, carvacrol, α-fenandreno.</p> <p><i>Lignano:</i> croweacín.</p> <p><i>Sesquiterpenos:</i> iso-precalamenediol.</p> <p><i>Flavonoides:</i> quercetín y rutín.</p> <p><i>Esteroles:</i> β-sitosterol.</p>
Semilla	<p><i>Sesquiterpenos:</i> ácido iso-3-epi-masticadienólico.</p> <p><i>Triterpenos:</i> ácidos β-elemónico, iso-masticadienólico y el 3-epi-isómero.</p>

Por otro lado, esta planta se ha utilizado en el padecimiento de cólicos, dolor de estómago, estreñimiento y en casos de bilis. En el dolor de muelas o dientes, dientes picados y para endurecer las encías se aplica la savia. Como anti-reumático se prescriben baños locales con el macerado acuoso o infusión del fruto y las ramas, o bien, frotando el área doliente con el alcohol en que se han macerado las ramas del pirú por tres días (UNAM, 2009).

En casos de artritis e inflamación de las articulaciones, se elabora un preparado a base de alcohol, alcanfor, gasolina blanca y diez plantas diferentes. Algunos otros usos son contra malestares o enfermedades respiratorias, como tuberculosis, asma y enfriamiento; ojos irritados por conjuntivitis y cataratas.

Múltiples investigaciones realizadas por distintos grupos de trabajo, han demostrado las propiedades que presentan los aceites esenciales obtenidos a partir de *Schinus molle*. De Mendonça Rocha *et al* (2012) demostraron la actividad antibacterial de aceite esencial de *Schinus molle* en contra de cepas de *Staphylococcus aureus*. De igual forma Guerra-Boone *et al* (2012) comprobaron que el aceite de *Schinus molle* presenta actividad antimicrobiana en contra de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. En el 2013, Martins *et al* demostraron la propiedad antioxidante del aceite esencial de *Schinus molle* en ensayos con DPPH.

A pesar del gran potencial biológico que presentan los aceites esenciales, su uso se ha visto limitado por su inestabilidad química atribuida a la degradación de sus componentes por la luz y el oxígeno del aire, así como por la elevada volatilidad de sus componentes activos disminuyendo su efectividad terapéutica.

1.4 Sistemas de Nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas (NP) funcionan como sistemas acarreadores de principios activos, permitiendo un mayor aprovechamiento de sus propiedades.

Desde el punto de vista farmacéutico, las NP son sistemas coloidales sólidos con un tamaño de partícula en el rango de los 10 a los 500 nm. Estas NP están formadas por un polímero y un principio activo el cual puede estar disuelto, adherido o encapsulado en la estructura polimérica de las partículas. De

acuerdo a su morfología, se pueden diferenciar dos tipos de NP (Figura 1.5): las nanoesferas, un sistema matricial donde el principio activo es adsorbido o incorporado a la matriz polimérica; y las nanocápsulas, un sistema vesicular donde el principio activo esta disuelto o disperso en el núcleo o en la pared polimérica formada (Fessi *et al.*, 1989).

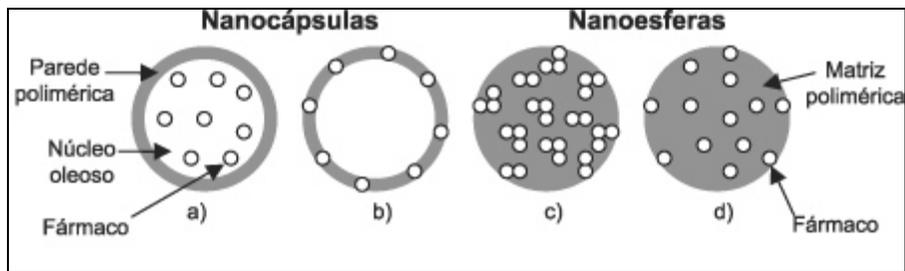


Figura 1.5 Tipos de nanopartículas y su incorporación de principios activos

Los sistemas de nanopartículas presentan ciertas propiedades fisicoquímicas, que les brindan mayores beneficios y ventajas sobre otros sistemas particulados como micropartículas y liposomas:

Tamaño nanométrico.- Esta escala tan pequeña de tamaño le permite entrar a las células a través de su membrana o por el proceso de endocitosis.

Recubrimiento sólido.- El recubrimiento brindado por el polímero permite proteger al principio activo de agentes de degradación como el oxígeno, enzimas hidrolíticas, pH, luz y otros. Esta protección permite aumentar la estabilidad de dichos activos.

Gran área superficial.- La gran área de contacto que pueden tener y conferirle a los principios activos, aumenta la biodisponibilidad y posiblemente la bioactividad del mismo en los sistemas biológicos.

Una característica importante de estos sistemas de NP, es que existe la posibilidad de modificar la liberación de los activos encapsulados y de biodireccionar estas partículas para la entrega de principios activos en sus dianas. Este hecho ha enfocado los esfuerzos en utilizar estos sistemas acarreadores para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer, vacunas y antibióticos (Gómez-Gaete, 2014).

En la actualidad se pueden encontrar diversas formulaciones de NP para encapsular aceites esenciales, esto debido a la complejidad de este tipo de compuestos volátiles, buscando mejorar sus propiedades y estabilidad. En la Tabla 1.2 se muestran ejemplos de formulaciones para aceites esenciales.

Tabla 1.2 Formulaciones de NP para aceites esenciales.

Aceite esencial	Polímero(s)
<i>Mentha piperita</i>	Quitosan-Ácido cinámico
<i>Zataria multiflora</i>	Quitosan
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	Goma de anacardo
<i>Malaleuca alternifolia</i>	-----
<i>Lantana camara</i>	-----

*Maryam et al (2015)

De forma particular, el incorporar un insecticida en un sistema nanoparticulado genera diversas ventajas como son: 1) el compuesto se incluye en una matriz que lo protege de factores ambientales que lo pueden degradar; 2) el compuesto activo puede ser liberado de forma controlada; 3) se puede aumentar la posibilidad de contacto y la retención en las superficies donde se aplique; y por último, 4) se pueden hacer formulaciones tanto para compuestos hidrofílicos como lipofílicos (i.e. compuestos presentes en extractos vegetales) (Figuroa, 2014).

1.5 Justificación

La especie *Aedes aegypti* es el vector principal de los virus del Virus del Dengue, Chikungunya y Zika. La diseminación, endemismo y aumento en la incidencia de las infecciones por estos virus, están íntimamente relacionadas con la diseminación de poblaciones de este mosquito.

En la actualidad no se cuenta con una cura aprobada para estas infecciones virales y solo se da tratamiento a la sintomatología durante el curso de la enfermedad. Por esta razón, las organizaciones de salud buscan combatir y reducir el número de infecciones que se presentan por año, donde la estrategia principal es el control del mosquito vector *Aedes aegypti*. Sin embargo, a pesar de contar con productos eficaces para el control de este vector, el uso indiscriminado y la mala rotación de estos productos ha ocasionado una pérdida de eficacia con la aparición de cepas del vector resistentes.

Los aceites esenciales, específicamente el de la especie *Schinus molle*, surgen como una alternativa para la investigación y el desarrollo de nuevos bioinsecticidas. Sin embargo, la elevada volatilidad de sus componentes, así como su susceptibilidad a degradación por diversos factores ambientales, limitansu aplicación como insecticida.

Las formulaciones acarreadoras, como las NP, proveen de características especiales como la protección de activos frente a factores de degradación y son una alternativa eficaz e innovadora que pueden favorecerel desarrollo de un bioinsecticida nanoparticulado de EO de *Schinus molle*para su futura aplicación en el control de *Aedes aegypti*.

1.6 Objetivo general

Desarrollar una formulación de nanopartículas poliméricas cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* para evaluar su uso como un potencial insecticida para el control de *Aedes aegypti*.

1.7 Objetivos específicos

1. Optimizar la técnica de Nanoprecipitación para la encapsulación del aceite esencial de *Schinus molle*.
2. Validar un método de microextracción en fase sólida en la modalidad headspace (*HS-SPME*) para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* nanoencapsulado por cromatografía de gases con detección de ionización en llama (*CG-FID*).
3. Caracterizar fisicoquímicamente el sistema nanoparticulado obtenido y evaluar el perfil de liberación del aceite esencial de *Schinus molle*.
4. Determinar la actividad larvicida del sistema nanoparticulado cargado con aceite esencial de *Schinus molle* contra larvas de *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Materiales, Reactivos y Equipos

2.1.1 Materiales

- >Columna HP-5MS [(5% Fenil)-metilpolisiloxano], Dimensiones (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m), Agilent Technologies
- >Membrana de celulosa regenerada
- >Portafibra, Supelco

2.1.2 Equipos

- >Cromatógrafo de Gases con inyector *split/splitless* y detector de ionización en llama, *Autosystem XL*, Perkin Elmer
- >Baño termocirculador, *LabTech*
- >Purificador de agua, *PureLab UHQ*
- >Zetasizer Nanoseries, Nano-Zs90, Malvern Instruments
- >Centrifuga Spectrafuge 24D, Labnet
- >Espectrofotómetro Frontier Óptica, Perkin Elmer

2.1.3 Reactivos

- >Aceite esencial de *Schinus molle*
- >Acetona, grado HPLC
- >Eudragit L100-55, Evonik Industries
- > α -felandreno, Chromadex
- >Isopropanol, grado HPLC
- >Metanol, grado HPL
- >Mirceno y Limoneno, Sigma Aldrich
- >Pululano, Hayasibara

2.2 Optimización de la técnica de nanoprecipitación para obtener NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*

2.2.1 Optimización de la formulación de NP

La suspensión de NP fue obtenida mediante la técnica de nanoprecipitación, la cual consistió en inyectar una fase orgánica compuesta por una mezcla de Acetona:Isopropanol con Eudragit L100-55 disuelto y el aceite esencial de *Schinus molle*, en una fase acuosa con una agitación constante (700 rpm).

Para la optimización de la técnica de nanoprecipitación con la finalidad de obtener un sistema de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*, se llevó a cabo la modificación de tres variables: i) cantidad de Eudragit L100-55, ii) cantidad de aceite esencial de *Schinus molley* iii) cantidad de pululano. Los parámetros que fueron evaluados para elegir la mejor formulación fueron el tamaño de partícula e índice de polidispersión (IPD).

2.2.2 Purificación de la formulación de NP

Una vez obtenidas las NP, fueron sometidas a un proceso de diálisis durante dos horas para la eliminación de los solventes orgánicos y así obtener una suspensión de NP purificadas

Para esto la formulación de NP fue colocada en una membrana de celulosa regenerada, la cual fue suspendida en un recipiente con agua destila en agitación a 25°C durante un tiempo previamente establecido y con los cambios de agua necesarios.

2.2.3 Tamaño de partícula e índice de polidispersión

Se determinó el tamaño de partícula e índice de polidispersión a la suspensión de NP por medio de la técnica de espectroscopía de correlación fotónica con un equipo Nanosizer de Malvern (modelo Nano-Zs90). Esto fue llevado a cabo en el laboratorio de Nanotecnología del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL).

2.3 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad *headspace (HS-SPME)* para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* nanoencapsulado por *FID-GC*

El método analítico de *HS-SPME* para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Schinus molle*, desarrollado por Lugo-Estrada (2016)(Anexo A), se validó en base a los criterios estipulados en la Guía para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de la Cobertura de la Secretaría de Salud (SSA, 2011).

Para validar el sistema se determinaron los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión; mientras que para la validación del método se determinaron los parámetros de precisión y exactitud.

2.3.1 Validación del sistema

Linealidad

Se realizó la construcción de una curva de calibración con cinco niveles de concentración total por triplicado. Los estándares se prepararon en mezclas de estándares de los componentes “huella” seleccionados para dar seguimiento en las diferentes evaluaciones de las NP. Los componentes “huella” se utilizaron en diferente proporción en base a la abundancia de estos en el aceite esencial de *Schinus molle* previamente establecido. Los cinco niveles de concentración total utilizados fueron: 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$.

La mezcla de estándares fueron sometidos al proceso de *HS-SPME* por *CG-FID* previamente establecido (Lugo-Estrada, 2016) (Anexo A). Con los datos obtenidos, se realizó un análisis de regresión lineal de las áreas obtenidas en función de la concentración. Los criterios analizados para evaluar la linealidad de las respuestas de la curva fueron:

Coeficiente de correlación (r): Este parámetro indica que tanto se ajustan los datos obtenidos de los estándares a una línea recta y nos dice que entre más cercano sea este coeficiente a 1, mayor será el grado de correlación lineal de la respuesta cromatográfica obtenida con las concentraciones analizadas. El coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99 (SSA, 2011).

Coeficiente de determinación (r^2): Este parámetro indica la variación de la respuesta cromatográfica obtenida con respecto de la variación de la concentración analizada. Este coeficiente es el cuadrado del coeficiente de

correlación. El coeficiente de determinación deber ser mayor a 0.99 (SSA, 2011).

Límite de detección

Para establecer el límite de detección del sistema, se procesaron los valores obtenidos a partir de la curva de calibración y se utilizaron los valores de la ordenada al origen y la pendiente que se obtuvieron del análisis de regresión.

Como primer paso de procesamiento de los datos, se llevó a cabo el cálculo del valor estadístico $S_{y/x}$, para estimar los errores aleatorios. Se utilizó la fórmula 2.1:

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (2.1)$$

Donde:

y_i = Valor de la respuesta obtenida

\hat{y}_i = Valor de la respuesta calculada

n = Número de mediciones

Posteriormente a este cálculo, se continuó con la determinación de la desviación estándar de la ordenada al origen (S_a) con la fórmula 2.2:

$$S_a = S_{\frac{y}{x}} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.2)$$

Donde:

S_a = Desviación estándar de la ordenada al origen

\bar{x} = Media

x_i = Valor de cada medición

n = Número de mediciones

Por último, el límite de detección se obtuvo por medio de la fórmula 2.3:

$$LD = \frac{3.3 * S_a}{m} \quad (2.3)$$

Donde:

LD = Límite de detección

S_a = Desviación estándar de la ordenada al origen

m= Pendiente de la curva de calibración

Límite de cuantificación

Para establecer el límite de cuantificación, se utilizaron los datos obtenidos de la curva de calibración, así como los valores de la ordenada al origen y la pendiente obtenidos mediante el análisis de regresión.

Primero, se llevó a cabo el cálculo del valor estadístico S_{y/x}, para estimar los errores aleatorio con la fórmula 2.1. Después, se determinó la desviación estándar de la ordenada al origen (S_a) con la fórmula 2.2.

Por último, el límite de detección se obtuvo por medio de la fórmula 2.4:

$$LQ = \frac{10 * S_a}{m} \quad (2.4)$$

Donde:

LQ = Límite de cuantificación

S_a = Desviación estándar de la ordenada al origen

m= Pendiente de la curva de calibración

Precisión

Se evaluó la precisión del sistema llevando a cabo la determinación de la repetibilidad y la precisión intermedia.

Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad del sistema se analizaron sextuplicados de mezclas de los estándares en la proporción que fue definida de los componentes seleccionados a tres niveles de concentración total. Se analizaron mezclas de los estándares a 0.25, 1 y 4µg/mL. El análisis se llevó a cabo por el mismo analista y el mismo día. Los estándares fueron sometidos al proceso *HS-SPME* previamente establecido.

Se calcularon los porcentajes de recuperación con la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de linealidad. De estos datos se calculó:

Media (\bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (2.5)$$

Donde:

\bar{x} = Media

x = Valor de cada lectura

n= Número de muestras analizadas

Desviación estándar (s)

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.6)$$

Donde:

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media

x_i = Valor de cada lectura

n= Número de lecturas

Desviación estándar relativa (*DER*)

$$DER = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \quad (2.7)$$

Donde:

DER = Desviación estándar relativa

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media

Precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia del sistema se analizaron sextuplicados de mezclas de los estándares en la proporción que fue definida de los componentes seleccionados a tres niveles de concentración. Se analizaron mezclas de los estándares a 0.25, 1 y 4 µg/mL. El análisis se llevó a cabo por el mismo analista, durante tres días no consecutivos.

Los estándares fueron sometidos al proceso de *HS-SPME* por *FID-GC* previamente establecido. Se calcularon los porcentajes de recuperación con la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de linealidad. Una vez obtenidos estos datos, se realizó el cálculo de la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa con las Fórmulas 2.5, 2.6 y 2.7, respectivamente.

2.3.2 Validación del método

Para validar el método de cromatografía de gases con microextracción en fase sólida por *headspace* se utilizaron muestras de la formulación de NP obtenidas (cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle*) adicionadas con la mezcla de estándares de los componentes “huella”.

Exactitud

Para determinar la exactitud, se adicionaron muestras de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* con la mezcla de los estándares, en la proporción ya establecida, a cinco niveles de concentración total. Los niveles de concentración total utilizados fueron 0.3, 0.6, 0.9, 1.8 y 3.6 µg/mL.

Las muestras adicionadas con la mezcla de estándares fueron sometidas al procedimiento de *HS-SPME* previamente establecido para su análisis por *CG-FID*. Una vez analizadas todas las muestras, se realizó el cálculo del porcentaje de recuperación (%R):

$$\%R = \left(\frac{C_a - CU}{CA} \right) * 100 \quad (2.8)$$

Donde:

C_a = Concentración en la muestra adicionada

CU = Concentración en la muestra sin adicionar

CA = Concentración adicionada

Precisión

Se evaluó la precisión del método con la determinación de la repetibilidad y la precisión intermedia en muestras de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* adicionadas con la mezcla de estándares.

Repetibilidad

Para determinar la repetibilidad del método se analizaron muestras de NP adicionadas con la mezclas de los estándares de los componentes “huella” a

tres niveles de concentración total. Se adicionaron los estándares a una concentración total de 0.3, 0.9 y 3.6 $\mu\text{g/mL}$. El análisis se llevó a cabo por el mismo analista, el mismo día. Las muestras adicionadas fueron sometidas al proceso de *HS-SPME* por *FID-GC* previamente establecido.

Se calcularon los porcentajes de recuperación (Fórmula 2.8) utilizando la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de linealidad. A partir de estos datos se calculó: la media (Fórmula 2.5), desviación estándar (Fórmula 2.6) y desviación estándar relativa (Fórmula 2.7).

Precisión intermedia

Para determinar la precisión intermedia del método se analizaron sextuplicados de muestras de NP adicionadas con la mezcla de los estándares “huella” a tres niveles de concentración. Se analizaron muestras adicionadas con la mezcla de los estándares a una concentración de 0.3, 0.9 y 3.6 $\mu\text{g/mL}$. El análisis se llevó a cabo por el mismo analista, durante tres días no consecutivos.

Las muestras adicionadas fueron sometidas al proceso de *HS-SPME* por *FID-GC* previamente establecido. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de recuperación (Fórmula 2.8) utilizando la ecuación de la recta obtenida en el ensayo de linealidad. Una vez obtenidos estos datos, se realizó el cálculo de la media (Fórmula 2.5), desviación estándar (Fórmula 2.6) y desviación estándar relativa (Fórmula 2.7).

2.4 Caracterización fisicoquímica del sistema de NP y evaluación del perfil de liberación del aceite esencial de *Schinus molle*

Para caracterizar la formulación de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* previamente purificadas, se evaluaron los siguientes parámetros: estabilidad, análisis por espectroscopía de infrarrojo (*FT-IR*), contenido de aceite esencial de *Schinus molle* y evaluación del perfil de liberación del aceite esencial encapsulado.

2.4.1 Estabilidad

Para determinar la estabilidad, muestras de la formulación de NP fueron colocadas en viales ámbar y fueron almacenadas durante dos meses a una temperatura de 25°C protegidas de la luz. Durante este periodo se llevaron a cabo determinaciones del tamaño de partícula e índice de polidispersión cada 15 días, además de evaluaciones visuales de presencia de agregados y sedimentos en las formulaciones.

2.4.2 Análisis por *FT-IR*

Para el análisis de la suspensión de NP por *FT-IR* se obtuvieron los espectros de cada uno de los componentes de la formulación por separado (Eudragit L100-55, pululano, aceite esencial de *Schinus molle*), así como de la suspensión de NP sin aceite esencial (blanco) y la suspensión de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*. Para la obtención de los espectros, se obtuvieron las películas tanto de los componentes de la formulación (con excepción del aceite esencial) como de las suspensiones de NP. El análisis se

llevó a cabo realizando 200 barridos en un rango de los 4000-700 cm^{-1} de películas formadas con los componentes de la formulación en un espectrofotómetro Frontier Óptica de Perkin Elmer en el laboratorio de Nanotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL).

2.4.3 Contenido de aceite esencial de *Schinus molle* en la NP

Muestras de la suspensión de NP fueron centrifugadas (Centrífuga Spectrafuge 24D, Labnet) para obtener una pastilla y un sobrenadante. Las pastillas fueron sometidas a extracciones sucesivas con metanol y se realizaron las diluciones necesarias. Muestras de la extracción de las pastillas y muestras del sobrenadantes fueron analizadas por el método de *HS-SPME* por *FID-GC* previamente validado.

Se calcularon los porcentajes de encapsulación (%E) y eficiencia de encapsulación (%EE) con las siguientes fórmulas:

$$\%E = \left(\frac{EO_t - EO_n}{P + EO_t} \right) * 100 \quad (2.9)$$

Donde:

%E = Porcentaje de encapsulación

EO_t = Gramos de aceite esencial totales

EO_n = Gramos de aceite esencial no encapsulados

P = Gramos de polímero

$$\%EE = \left(\frac{EO_t - EO_n}{EO_t} \right) * 100 \quad (2.10)$$

Donde:

%EE = Porcentaje de eficiencia de encapsulación

EO_t = Gramos de aceite esencial totales

EO_n = Gramos de aceite esencial no encapsulados

2.4.4 Perfil de liberación del aceite esencial de *Schinus molle*

Para evaluar el perfil de liberación de los componentes “huella” del aceite esencial de *Schinus molle* a partir de las NP. Se colocaron muestras de NP independientes en agitación y se realizaron muestreos a 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 48 y 72 h en un medio de liberación a pH de 6.5. Las muestras obtenidas fueron centrifugadas (Centrífuga Spectrafuge 24D de Labnet) y los sobrenadantes obtenidos fueron analizados por el método de *HS-SPME* por *CG-FID* previamente validado.

2.5 Actividad larvicida del sistema nanoparticulado cargado con aceite esencial de *Schinus molle* contra larvas de *Aedes aegypti*

Para evaluar la actividad larvicida de las NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*, se obtuvieron larvas de *Aedes aegypti* en estadio III. Para cada ensayo, 20 larvas de *Aedes aegypti* se colocaron en frascos con un volumen total de 100 mL de agua (incluido el volumen de la formulación a evaluar) y fueron incubadas por 24 h. Posteriormente, se realizó un conteo del número de larvas vivas y muertas en cada ensayo. Se determinó la actividad larvicida del aceite esencial de *Schinus molle* libre y encapsulado en las NP.

Como etapa preliminar, se realizó un ensayo con un rango amplio de concentraciones del aceite esencial y se determinó el rango de concentración en el cual se obtiene una mortalidad entre el 10 y 90%. Para el ensayo definitivo, se realizó la misma metodología con cinco concentraciones dentro del rango de concentraciones previamente establecidas. Con los resultados

obtenidos se realizó un análisis de regresión Probit de mortalidad *versus* el logaritmo base diez de la concentración para la obtención de la curva. Una vez obtenida la curva del análisis Probit, se pudo obtener la concentración letal 50 (LC₅₀). Todos los ensayos fueron realizados de acuerdo a la guía para pruebas de campo y laboratorio de larvicidas de la OMS (2005) en el laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Optimización de la técnica de nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* y purificación de la suspensión

Para llevar a cabo la optimización de la formulación de NP, se estudiaron tres variables experimentales:

- 1) Cantidad de Eudragit L100-55 en la fase orgánica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.1.

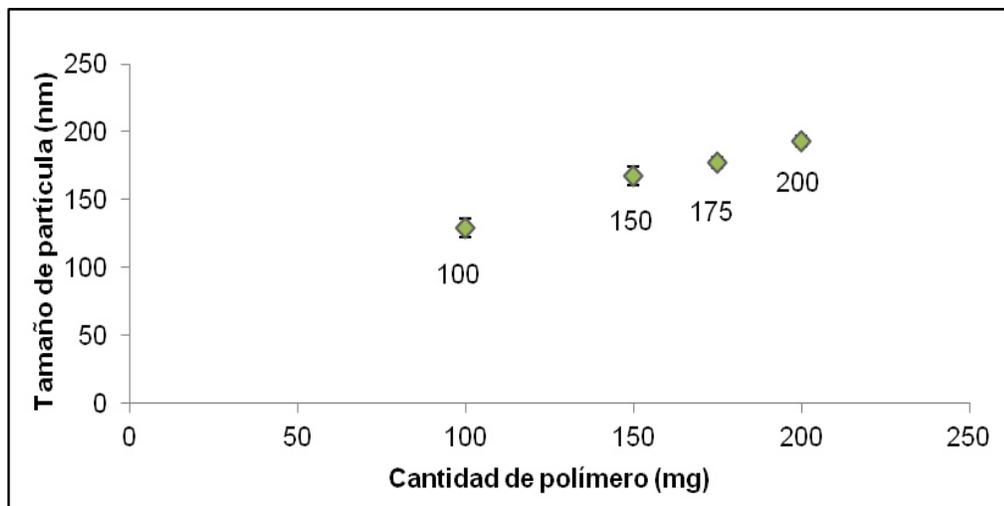


Figura 3.1 Efecto de la cantidad de polímero sobre el tamaño de partícula en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, X mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada). (Media \pm D.E., n=6).

En la Figura 3.2 se muestran los resultados obtenidos del índice de polidispersión.

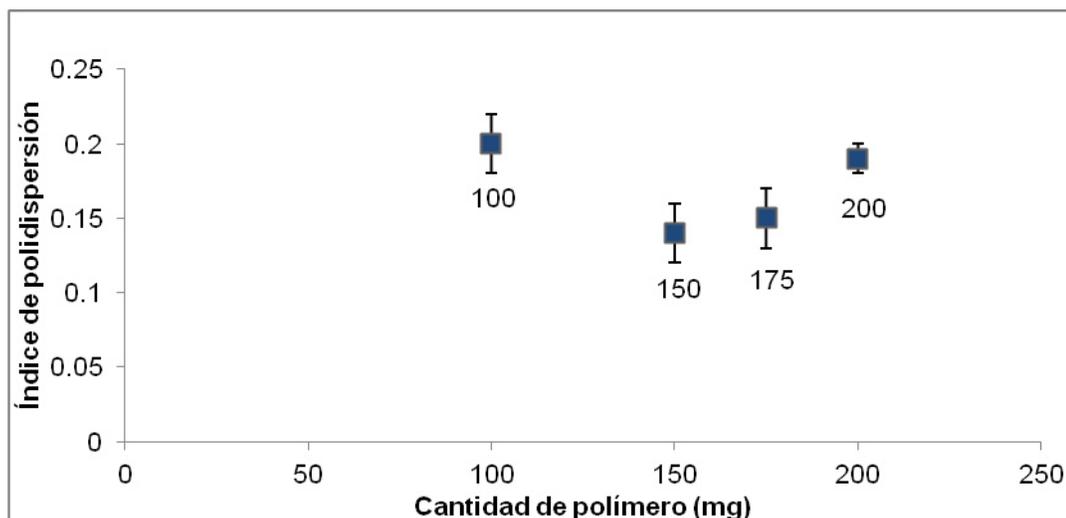


Figura 3.2 Efecto de la cantidad de polímero sobre el índice de polidispersión en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, X mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada). (Media \pm D.E., n=6).

2) Cantidad de aceite esencial de *Schinus molle* en la fase orgánica. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.3.

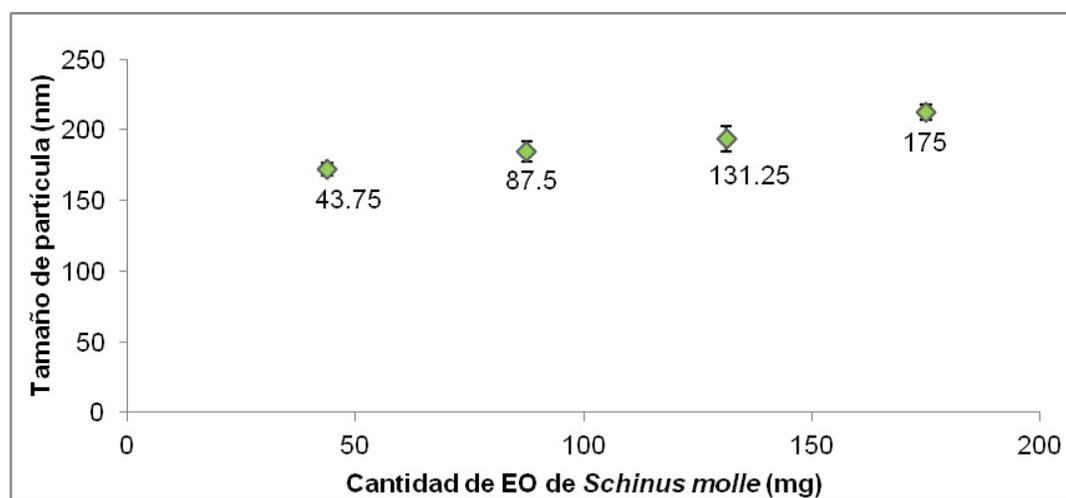


Figura 3.3 Efecto de la cantidad de Aceite esencial (EO) de *Schinus molle* sobre el tamaño de partícula en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, X mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada). (Media \pm D.E., n=2).

En la Figura 3.4 se observan los resultados obtenidos del índice de polidispersión.

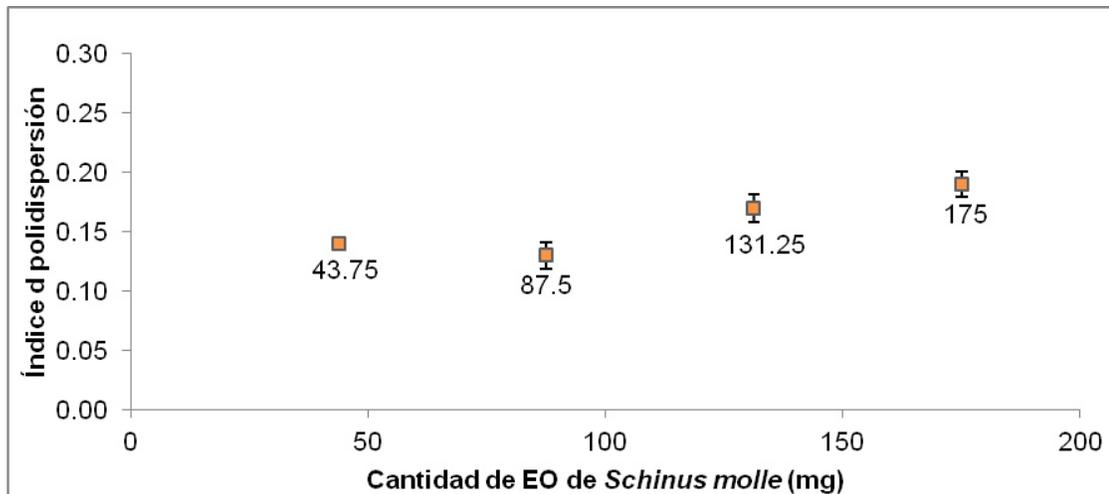


Figura 3.4 Efecto de la cantidad de Aceite esencial (EO) de *Schinus molle* en el índice de polidispersión en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, X mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada). (Media \pm D.E., n=2).

3) Cantidad de pululano en el sistema de NP. Los resultados se muestran en la

Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Efecto de la cantidad de pululano en el grado de sedimentación en la formulación preparada por la técnica de nanoprecipitación (Fase orgánica: 15 mL de Acetona:Isopropanol, 87.5 mg de polímero, Fase acuosa: 25 mL de agua destilada, X mg de Pululano).

Cantidad de pululano (mg)	Grado de sedimentación
87.5	Moderada
175.0	Poca
350.0	Poca
525.0	Casi nula

La formulación optimizada de NP para la encapsulación del aceite esencial de *Schinus molle* se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Valores optimizados de los componentes de la formulación de NP para la encapsulación del aceite esencial de *Schinus molle* por la técnica de nanoprecipitación.

Componente	Especificaciones	Volumen (mL)	Cantidad (mg)
Polímero	Eudragit L100-55	-----	175
Fase orgánica	Acetona:Isopropanol	15	-----
Fase acuosa	Agua	25	-----
Aceite esencial	<i>Schinus molle</i>	-----	87.5
Plastificante	Pululano	-----	525

Una vez obtenidas la NP, fue necesario la eliminación de los solventes orgánicos de la formulación. Las NP fueron sometidas a un proceso de diálisis previamente establecido.

El tamaño de partícula e índice de polidispersión del sistema de NP fueron determinados por espectroscopía de correlación fotónica, los valores obtenidos para ambos parámetros se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Tamaño de partícula e índice de polidispersión de la formulación de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*. (Media \pm D.E., n=30).

Tamaño de partícula	Índice de polidispersión
160 \pm 11 nm	0.177 \pm 0.006

3.2 Caracterización fisicoquímica del sistema de NP y evaluación del perfil de liberación del aceite esencial de *Schinus molle*

Como parte de la caracterización fisicoquímica de las NP se evaluó: estabilidad, contenido de aceite esencial de *Schinus molle* en las NP, análisis por FT-IR y perfil de liberación de los componentes “huella” del aceite esencial de *Schinus molle*.

La estabilidad de la suspensión de NP se evaluó midiendo el tamaño de partícula y el índice de polidispersión durante dos meses. En la Figura 3.5 se observan los valores obtenidos del tamaño de partícula y en la Figura 3.6 los valores obtenidos del índice de polidispersión de las muestras analizadas.

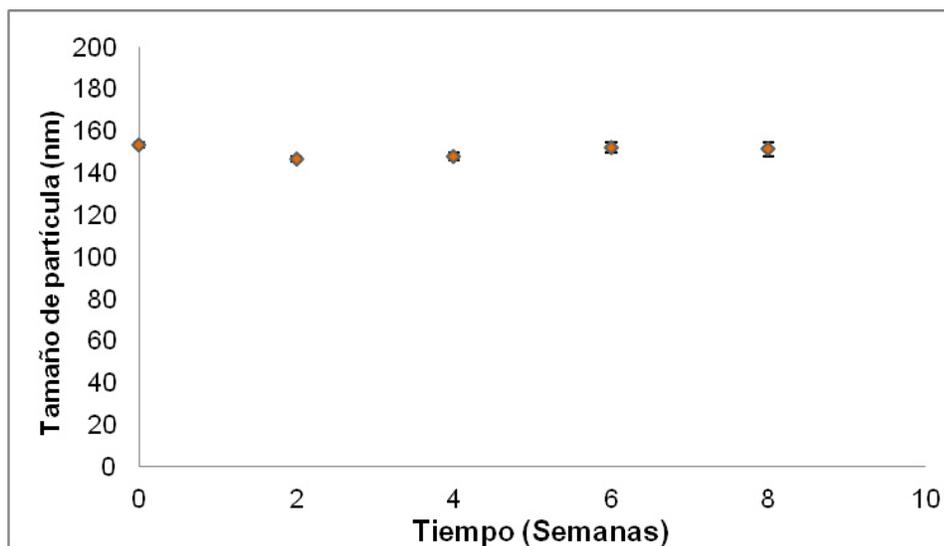


Figura 3.5 Variación del tamaño de partícula durante el estudio de la estabilidad de la formulación de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*. (Media \pm D.E., n=2).

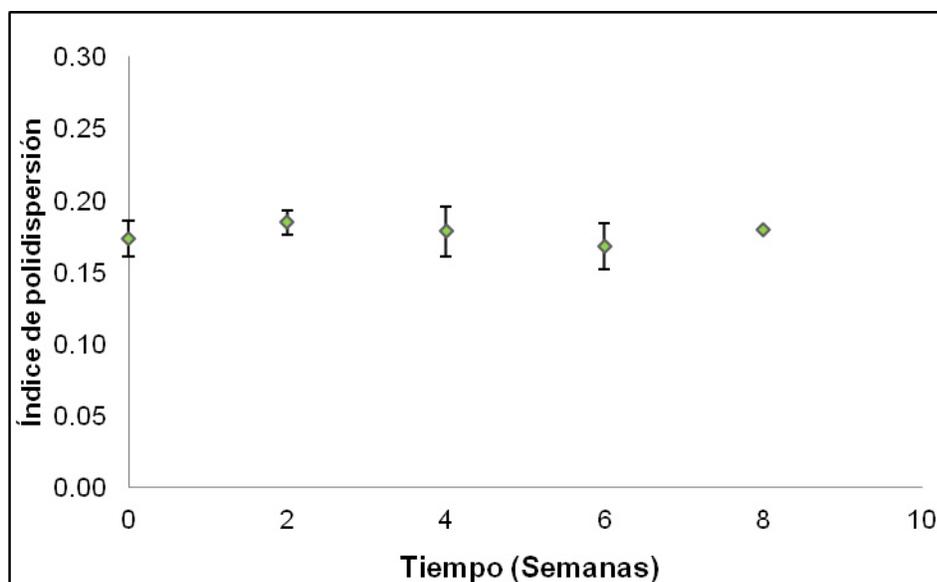


Figura 3.6 Variación del índice de polidispersión durante el estudio de la estabilidad de la formulación de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*. (Media ± D.E., n=2).

Para evaluar el contenido de aceite esencial en las NP, se obtuvo el porcentaje de encapsulación (%E) y el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) de cada uno de los tres componentes “huella”. En la Tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 3.4 Porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación obtenidos para los compuestos analizados del aceite esencial de *Schinus molle* (Media ± D.E., n=3).

Compuesto	Porcentaje de encapsulación ^a	Porcentaje de eficiencia de encapsulación ^b
Mirceno	2.99 ± 0.01	6.22 ± 0.01
α-felandreno	2.06 ± 0.01	4.29 ± 0.01
Limoneno	2.78 ± 0.01	5.79 ± 0.01

^aFórmula 2.9

^bFórmula 2.10

Se realizó un estudio por espectroscopía de infrarrojo, analizando cada uno de los componentes de la formulación por separado, las NP sin aceite esencial (blanco) y las NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*. A continuación se muestran los espectros de infrarrojo obtenidos para el polímero Eudragit L100-55 (Figura 3.7), el pululano (Figura 3.8), el aceite esencial de *Schinus molle* (Figura 3.9), las NP sin aceite esencial (Figura 3.10) y las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* (Figura 3.11).

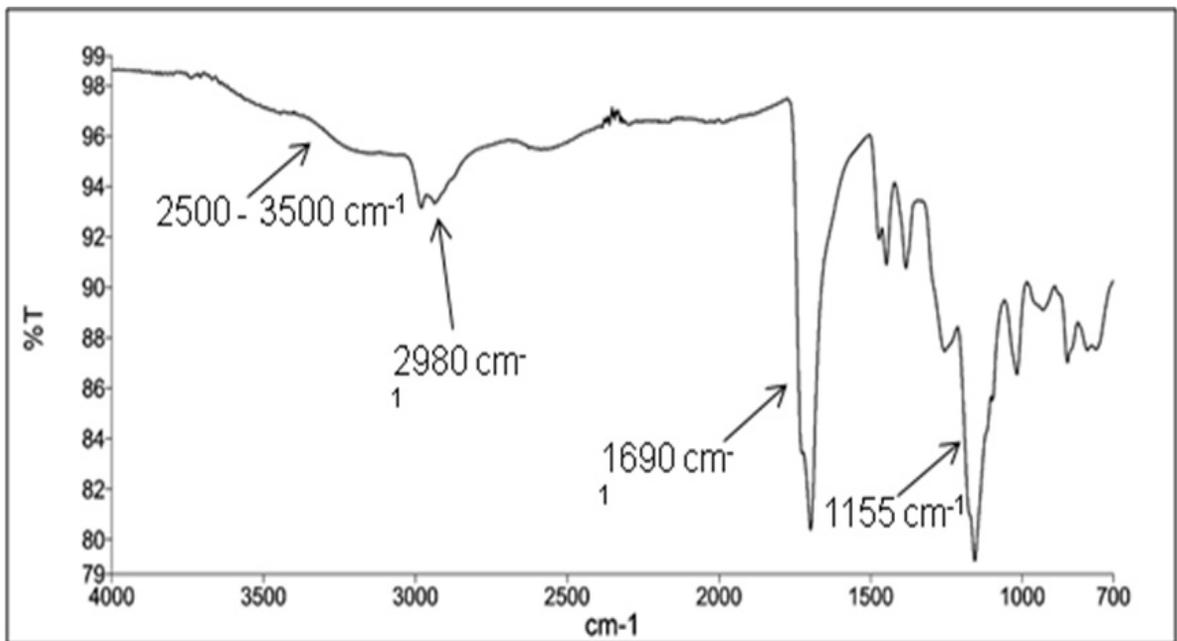


Figura 3.7 Señales en el espectro de infrarrojo obtenido para el polímero Eudragit L100-55.

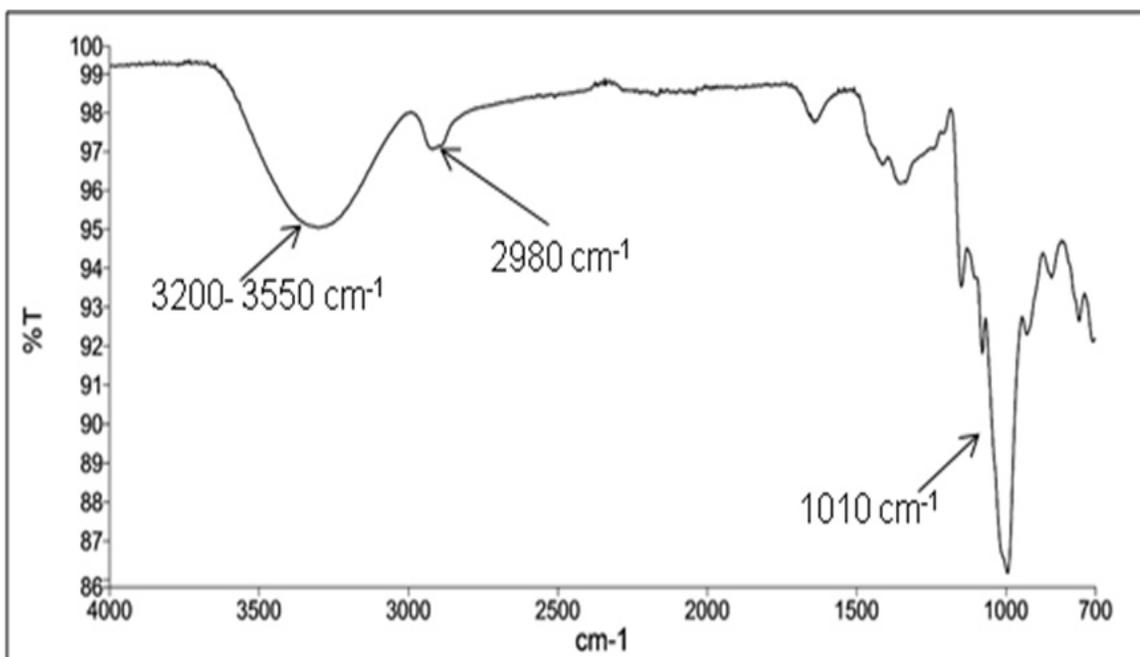


Figura 3.8 Señales obtenidas en el espectro infrarrojo obtenido para el pululano.

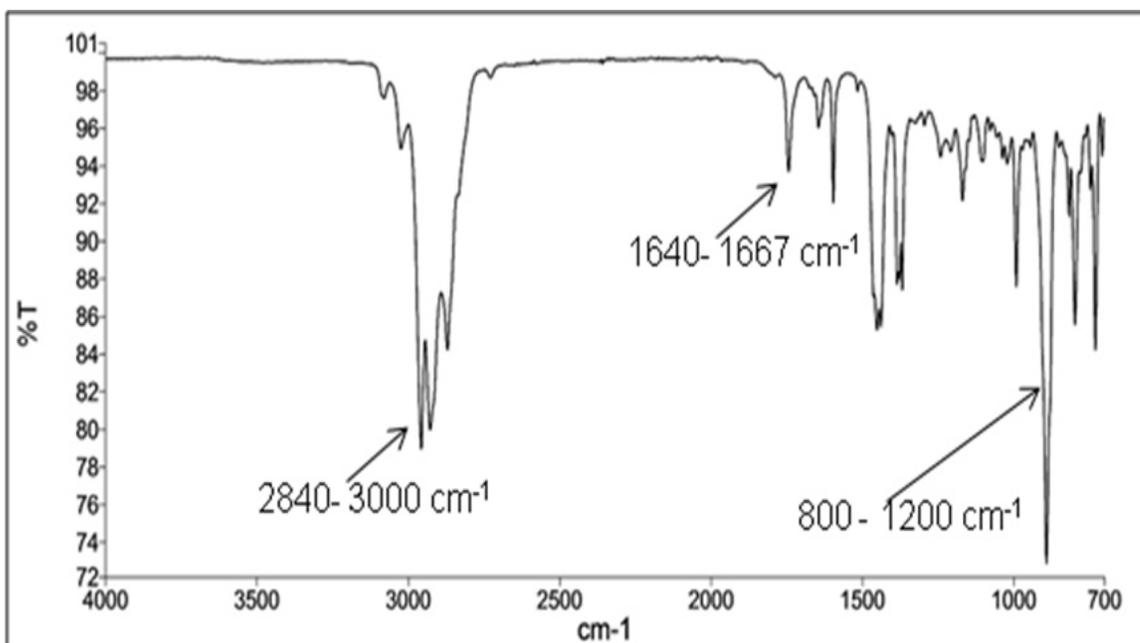


Figura 3.9 Señales obtenidas en el espectro de infrarrojo obtenido para el aceite esencial de *Schinus molle*.

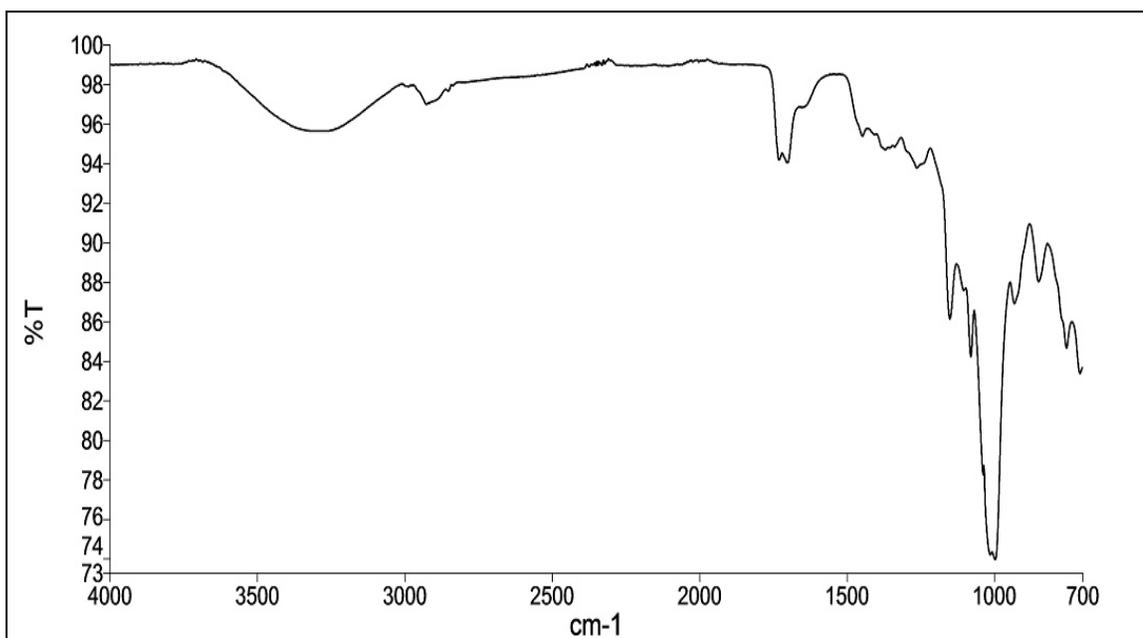


Figura 3.10 Señales obtenidas en el espectro de infrarrojo de las NP sin el aceite esencial de *Schinus molle*.

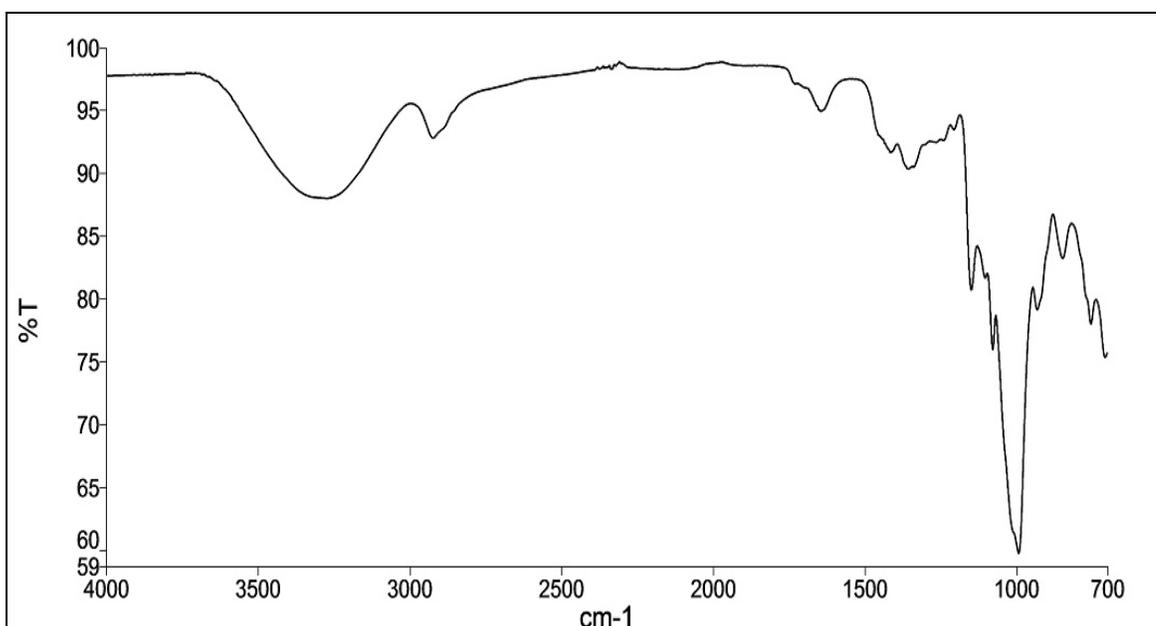


Figura 3.11 Señales obtenidas en el espectro de infrarrojo de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle*.

Se obtuvo el perfil de liberación de los tres componentes “huella” del aceite esencial de *Schinus molle* encapsulado en las NP. A continuación se muestran los perfiles de liberación del mirceno (Figura 3.12), α -felandreno (Figura 3.13) y limoneno (Figura 3.14).

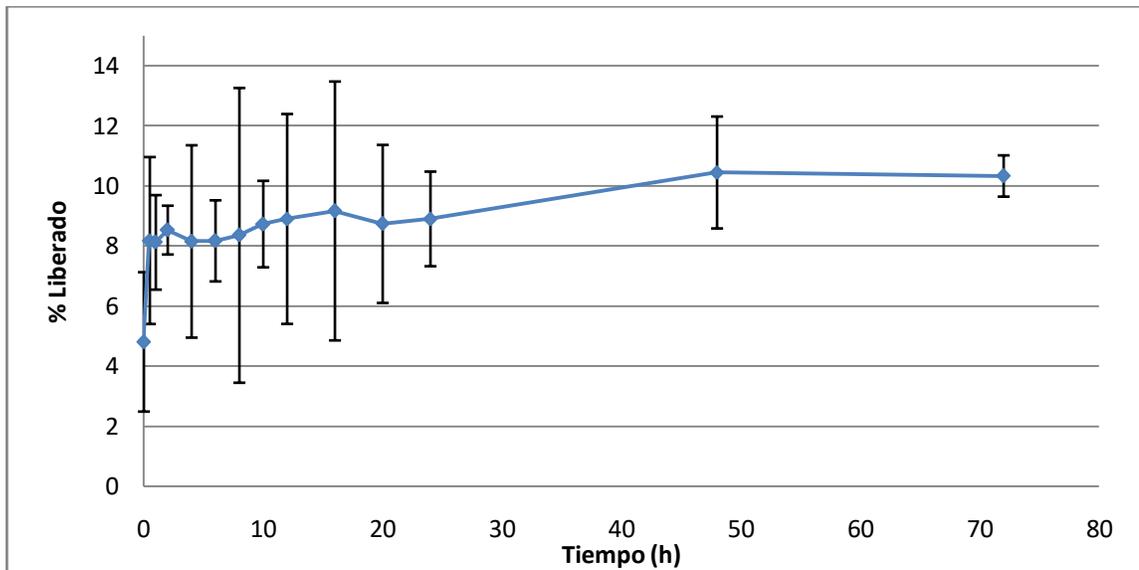


Figura 3.12 Perfil de liberación de mirceno. Porcentaje de mirceno liberado de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* en función del tiempo (Media \pm D.E., n=3).

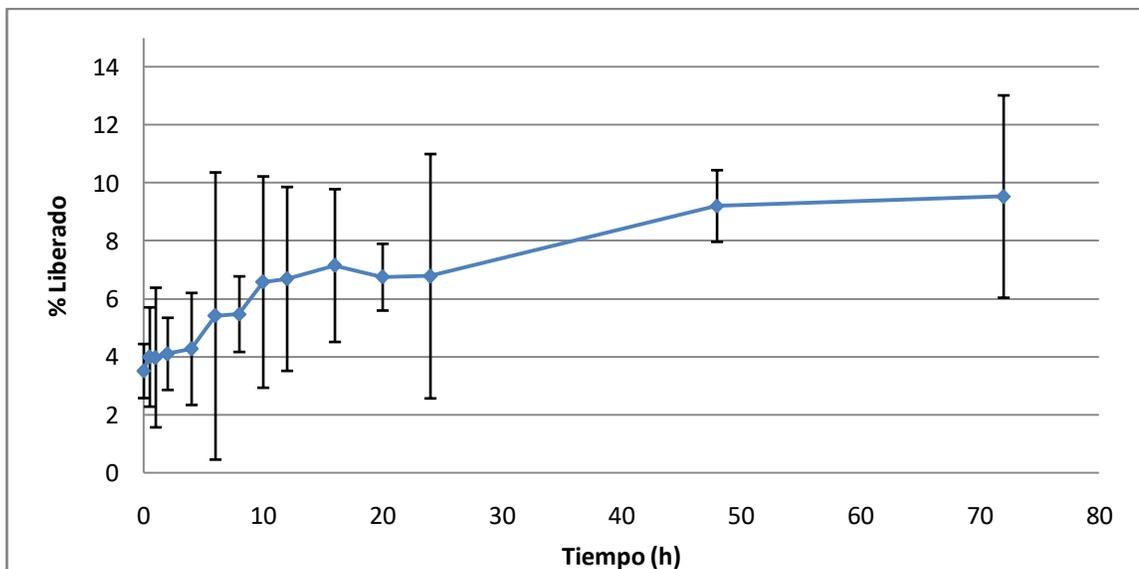


Figura 3.13 Perfil de liberación de α -felandreno. Porcentaje de α -felandreno liberado de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* en función del tiempo (Media \pm D.E., n=3).

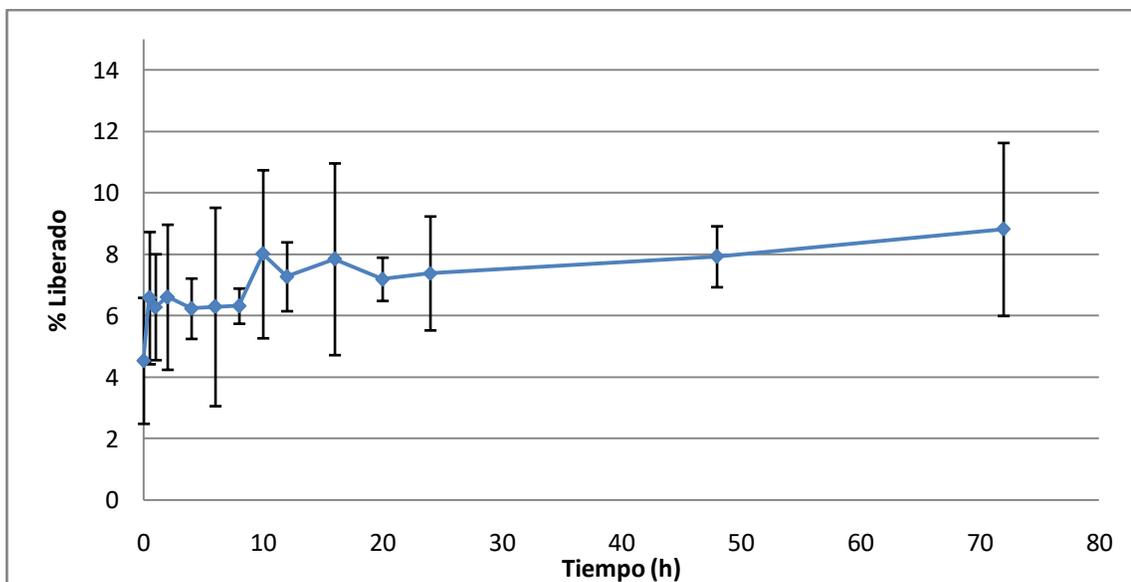


Figura 3.14 Porcentaje de limoneno liberado de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* en función del tiempo (Media \pm D.E., n=3).

En el Anexo B se muestran los gráficos obtenidos de la cantidad liberada (Q) de los tres componentes “huella”.

3.3 Determinación de la actividad larvicida del sistema nanoparticulado cargado con aceite esencial de *Schinus molle* contra larvas de *Aedes aegypti*

Para establecer la LC_{50} del aceite esencial de *Schinus molle* libre se utilizó una emulsión (Anexo C). En la Tabla 3.5 se muestran los resultados definitivos en el ensayo para el aceite libre frente a las larvas del mosquito después de 24 h.

Tabla 3.5 Actividad larvica definitiva del aceite esencial de *Schinus molle* libre frente a larvas de *Aedes aegypti* después de 24 h de la aplicación de la emulsión. (Media \pm D.E., n=3).

Dosis (ppm)	Larvas vivas (%)	Larvas muertas (%)
7.5	95.50 \pm 7.70	4.50 \pm 7.70
10.0	62.20 \pm 3.85	37.80 \pm 3.85
12.5	56.00 \pm 3.85	44.00 \pm 3.85
15.0	26.60 \pm 11.55	73.40 \pm 11.55
17.5	8.89 \pm 15.40	91.11 \pm 15.40

Se realizó un análisis de los resultados mediante una regresión Probit (Figura 3.15).

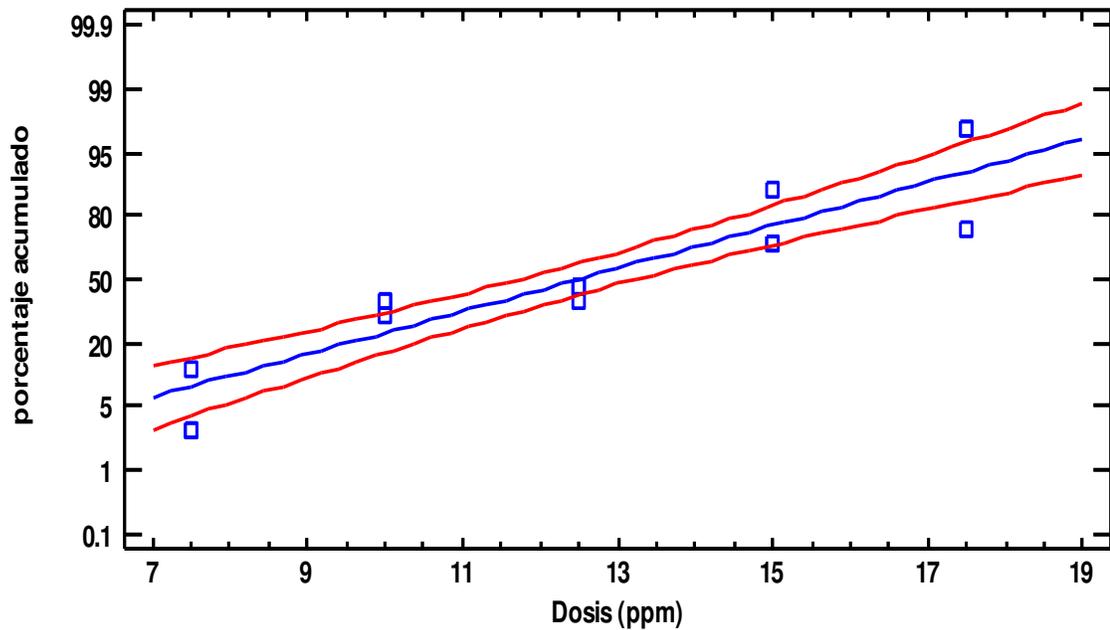


Figura 3.15 Gráfica del modelo de regresión Probit obtenida en la evaluación de la actividad larvica del aceite esencial de *Schinus molle* libre.

A partir de este análisis de regresión Probit se estimó la LC_{50} , los datos se muestran en la Tabla 3.6:

Tabla 3.6 Concentración Letal 50 del aceite esencial de *Schinus molle* libre (Media \pm D.E., n=3).

		LC Inferior 95.0%	LC Superior 95.0%
Porcentaje	DOSIS (ppm)	Límite Conf.	Límite Conf.
50.0	12.48	11.73	13.22

Se realizó el mismo experimento con la formulación de NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle*. En la Tabla 3.7 se muestran los resultados definitivos obtenidos en el ensayo de actividad larvica con las NP cargadas frente a larvas de *Aedes aegypti*.

Tabla 3.7 Actividad larvica definitiva de las NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* frente a larvas de *Aedes aegypti* después de 24 h de contacto con las NP. (Media \pm D.E., n=3).

Dosis (ppm)	Larvas vivas (%)	Larvas muertas (%)
0.45	96.67 \pm 2.89	3.33 \pm 2.89
0.5	85.00 \pm 5.00	15.00 \pm 5.00
0.6	78.33 \pm 2.89	21.67 \pm 2.89
0.7	63.33 \pm 2.89	36.67 \pm 2.89
0.8	41.67 \pm 5.77	58.33 \pm 5.77
0.9	26.67 \pm 2.89	73.33 \pm 2.89
1.0	18.33 \pm 2.89	81.67 \pm 2.89
1.5	8.33 \pm 2.89	91.67 \pm 2.89

Se realizó el análisis de los resultados mediante una regresión Probit (Figura 3.16).

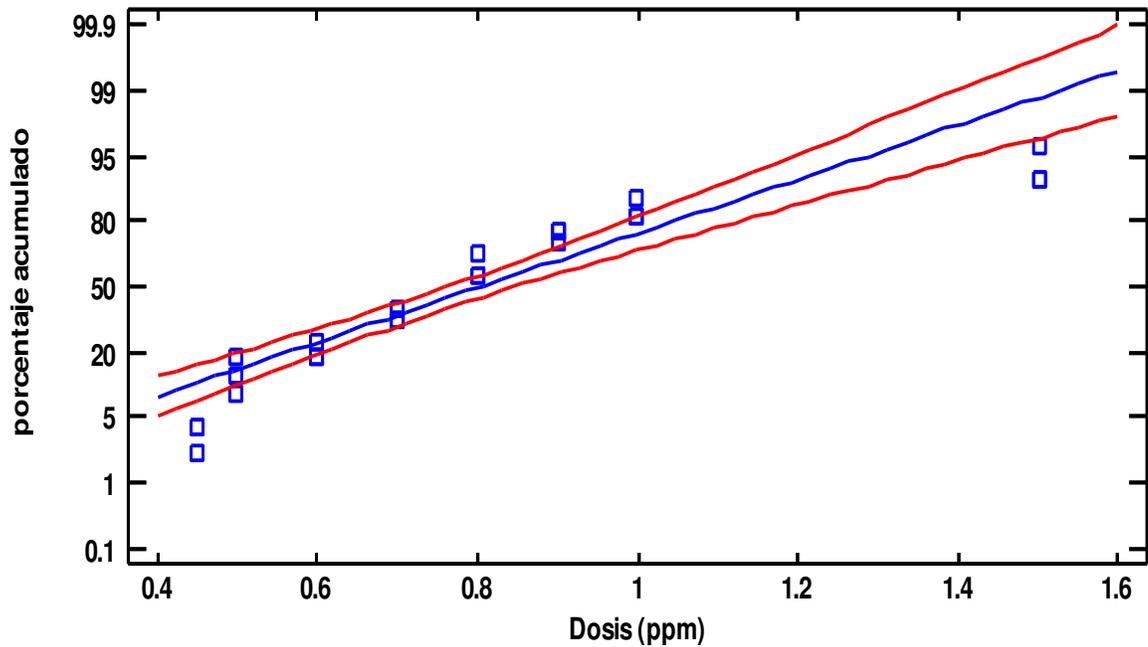


Figura 3.16 Gráfica del modelo de regresión Probit obtenida en la evaluación de la actividad larvícida de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle*.

A partir de este análisis de regresión Probit se estimó la LC_{50} (Tabla 3.8).

Tabla 3.8 Concentración Letal 50 de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle*. (Media \pm D.E., n=3).

		LC Inferior 95.0%	LC Superior 95.0%
Porcentaje	DOSIS (ppm)	Límite Conf.	Límite Conf.
50.0	0.80	0.76	0.84

3.4 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad *headspace* (HS-SPME) para la cuantificación del aceite esencial de *Schinus molle* nanoencapsulado por FID-GC

Para cuantificar de los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* se validó el método mencionado en la sección 2.3, bajo los criterios previamente mencionados (SSA, 2011).

Para la validación del sistema se determinó la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión (repetibilidad y precisión intermedia). Los resultados obtenidos para los parámetros evaluados se muestran en la Tabla 3.9. En el Anexo D se muestran los gráficos de las curvas de calibración obtenidos para cada uno de los componentes analizados del aceite esencial de *Schinus molle*.

Para la validación del método se utilizaron muestras (NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*) adicionadas con los estándares de mirceno, α -felandreno y limoneno. Se determinaron los parámetros de exactitud y precisión (repetibilidad y precisión intermedia). Los valores obtenidos para los parámetros evaluados se muestran en la Tabla 3.10.

Tabla 3.9 Parámetros de validación del sistema para cuantificar los tres componentes “huella” del aceite esencial de *Schinus molle* con *HS-SPME* por *FID-GC*.

Parámetro	Mirceno	α -felandreno	Limoneno	Referencia
Linealidad (r)	0.995	0.997	0.996	≥ 0.99
L.D. (ppm)	0.006	0.014	0.023	< Concentración más baja del intervalo de trabajo
L.C. (ppm)	0.02	0.049	0.077	< Concentración más baja del intervalo de trabajo
Repetibilidad (CV)	12.56 %	12.54 %	12.45 %	≤ 15 %*
Reproducibilidad (CV)	14.64 %	12.98 %	13.01 %	≤ 15 %*

* Jimenez C. *et al*, 2002

Tabla 3.10 Parámetros de validación del método para cuantificar los tres componentes “huella” del aceite esencial de *Schinus molle* con *HS-SPME* por *FID-GC*.

Parámetro	Mirceno	α -felandreno	Limoneno	Referencia
Exactitud (%REC)	108.0	98.0	101.0	70 – 120 %*
Repetibilidad (CV)	13.98 %	14.67 %	13.82 %	≤ 15 %**
Reproducibilidad (CV)	14.47 %	12.50 %	11.45 %	≤ 15 %**

* AOAC, 2002

** Jimenez C. *et al*, 2002

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Optimización de la técnica de nanoprecipitación, obtención, purificación y caracterización de la suspensión de NP.

La técnica de nanoprecipitación o también llamada técnica de desplazamiento de solvente fue descrita por primera vez y patentada por Fessi *et al*(1987), la cual fue descrita como un procedimiento novedoso y simple para la preparación de nanocápsulas a partir de polímeros preformados, tanto biodegradables como no biodegradables (Fessi *et al*, 1989).

La formación de las NP por medio de esta técnica, está basada en el mecanismo de turbulencia interfacial, fenómeno producido durante el desplazamiento de un solvente orgánico en una de las fases. Debido a la miscibilidad de ambas fases se presenta un esparcimiento de la fase orgánica en la acuosa con la subsecuente formación de gotas de tamaño nanométrico, durante este proceso se generan continuamente remolinos de solvente. Así, durante la formación de las gotas nanométricas de solvente existen cadenas poliméricas que tenderán a agregarse y formar NP, debido al desplazamiento

del mismo solvente y a que estarán presentes en un medio en el que son insolubles (Quintanar-Guerrero *et al*, 1998).

Para el desarrollo de la formulación establecida en este trabajo, se utilizó como polímero el Eudragit L100-55, copolímero aniónico basado en ácido metacrílico y etil acrilato. Este copolímero presenta una relación de grupos carboxilo libres y grupos éster de aproximadamente 1:1, además los monómeros están distribuidos de manera aleatoria a lo largo de la cadena polimérica. (Evonik, 2015). El Eudragit L100-55 se utiliza principalmente en formulaciones de liberación controlada a nivel entérico (Harikumar y Kadian, 2009).

En la bibliografía existen reportes de formulaciones de NP elaboradas con Eudragit L100-55, tal es el caso del trabajo de Hao *et al* (2013) en el que desarrollaron una formulación de NP para encapsular omeprazol obteniendo NP estables con una eficiencia de encapsulación del activo entre el 70 y 90%.

Durante la etapa de desarrollo y optimización de la técnica de nanoprecipitación para obtener NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*, se determinó que al incrementar la cantidad de polímero en el sistema (de 100 a 200 mg) se produjo un aumento en el tamaño de la partícula obtenida (Figura 3.1). Esto puede explicarse considerando que al existir una mayor cantidad de cadenas poliméricas disponibles durante la agregación polimérica, el núcleo de las NP tiende a tener un mayor tamaño y por lo tanto el tamaño final de las NP aumenta.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores quienes también determinaron que la cantidad de polímero presente en la fase orgánica es uno de los factores que más influyen en el tamaño de la partícula (Santos-Magalhaes *et al*, 2000; Zili *et al*, 2005). Es importante mencionar que al utilizar cantidades mayores de 200 mg de polímero se observó formación de agregados poliméricos, debido probablemente a la sobresaturación del medio con cadenas poliméricas durante la difusión. Por lo anterior, se eligió utilizar cantidades de polímero por debajo de los 200 mg para asegurar que el 100% de las cadenas poliméricas participen en la formación de NP.

Otro de los parámetros que se evaluó durante el proceso de la formulación fue el índice de polidispersión, el cual indica la homogeneidad de las partículas presentes en el sistema; se considera que mientras el valor es más cercano a cero, el sistema presenta una mayor homogeneidad en el tamaño de la partícula. En general, los índices de polidispersión con valores menores a 0.2 son considerados aceptables (Galindo-Rodríguez *et al*, 2004).

En la Figura 3.2 se muestra el efecto de la cantidad de polímero sobre el índice de polidispersión. Se observa el IPD no cambia significativamente con la concentración del polímero. En base a esto se eligió utilizar 175 mg del polímero.

Otra de las variables a optimizar fue la cantidad de aceite esencial de *Schinus molle* en la fase orgánica. Se probaron cinco cantidades de aceite esencial en un rango de 43.75 a 175 mg. En la Figura 3.3 se observa el efecto de la

cantidad de aceite esencial de *Schinus molle* sobre el tamaño de la NP. Se observó que al incrementar la cantidad del aceite esencial, el tamaño de la NP también aumentó. Este comportamiento se puede atribuir a una mayor cantidad de aceite esencial disponible en el medio para ser captado por el polímero, al momento de la formación de las NP.

En la Figura 3.4 se muestra el efecto de la cantidad de aceite esencial de *Schinus molle* sobre el índice de polidispersión. Se observó que el índice de polidispersión también aumenta con una mayor cantidad de aceite esencial incorporado en la fase orgánica.

Una de las innovaciones importantes que se realizaron durante el desarrollo de esta formulación, fue la inclusión del polisacárido pululano como agente viscosante. Se probaron cuatro cantidades de pululano en las nanoformulaciones en un rango de 87.5 a 525.0 mg. Se observó que el aumento de la cantidad de pululano en la formulación de NP provocó una disminución en el grado de sedimentación de la misma, favoreciendo así su estabilidad (Tabla 3.1).

En relación a esto, no se encontraron trabajos donde se enfoquen en el efecto de aditivos en las nanoformulaciones desarrolladas. Sin embargo, se propone que la adición del pululano como agente viscosante y plastificante, aumenta la viscosidad del medio en el que se encuentran suspendidas las NP favoreciendo su suspensión y evitando su agregación debido a la disminución del movimiento Browniano (Martin A, 1967; Rezende *et al*, 2003),

De esta forma, las condiciones experimentales que permitieron obtener la mejor formulación de NP con un tamaño entre 150-200 nm y libre de agregados fueron: una fase orgánica compuesta por 15 mL de una mezcla de acetona:isopropanol, 175 mg de Eudragit L100-55 y 87.5 mg de aceite esencial de *Schinus molle*; y una fase acuosa de 25 mL de agua destilada. Posterior a la formación de las NP, se agregaron 525.0 mg de pululano (Tabla 3.2).

La purificación del sistema de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* se realizó por la técnica de diálisis. Otros investigadores ya han utilizado la diálisis para purificar de forma efectiva NP cargadas con compuestos volátiles (Sohn *et al*, 2007). Cabe mencionar que en nuestro grupo de investigación, se obtuvieron NP cargadas con aceite esencial de tomillo libres de solventes residuales después de un proceso de diálisis previamente establecido (Lugo-Estrada, 2012).

Como se observa en las Figuras 3.5 y 3.6, el diámetro de partícula y el índice de polidispersión de las NP no presentaron cambios significativos. Se estableció que la formulación es estable al menos durante dos meses. En el Anexo E, se presentan los gráficos de las curvas de distribución del tamaño de las NP.

En relación a la estabilidad de las suspensiones de NP, es sabido que depende de diversos factores inherentes a la formulación, tal como el tamaño de partícula. Los sistemas de NP con bajos tamaños de partícula e índices de polidispersión presentan alta estabilidad debido a una menor probabilidad de fenómenos de agregación entre las partículas al disminuir las colisiones que

podieran darse por el movimiento Browniano que presentan las mismas (Rezende *et al*, 2003).

De forma paralela, se realizó una inspección visual de las formulaciones de NP para identificar la ausencia o presencia de aceite esencial en la superficie. Durante los dos meses, no se observó sedimentación ni formación de agregados en los sistemas de NP, ni presencia de aceite en la superficie.

Con la finalidad de evaluar los porcentajes de encapsulación y de eficiencia de encapsulación del aceite esencial del *Schinus molle* en las NP, se eligieron tres componentes "huella": mirceno, α -felandreno y limoneno. Estos componentes fueron elegidos en base a su abundancia en el aceite esencial de *Schinus molle*: 1.93%, 3.79% y 2.28% respectivamente y por la evidencia que existe de dichos compuestos de su actividad frente a diversidadde organismos (Sahayaraj, 2014). En el Anexo F se muestra el cromatograma obtenido para el aceite esencial de *Schinus molle*.

Cabe mencionar que para determinar los porcentajes de encapsulación y de eficiencia de encapsulación, se validó un método analítico de *HS-SPME* por *GC* (2.3). El análisis de los resultados relacionados con la validación del método y sistema serán discutidos en la sección 4.3 de este capítulo.

Para calcular el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE) de los componentes "huella" en las NP se utilizó la Fórmula 2.10. En la Tabla 3.4 se observa que los %EE del mirceno, α -felandreno y limoneno fueron de 6.22, 4.29 y 5.79% respectivamente, es decir el %EE total del aceite esencial de *Schinus*

molle fue de $16.3\% \pm 0.006\%$. Lo anterior indica que el 16.3% del aceite esencial de *Schinus molle* añadido a la formulación logró ser encapsulado en las NP. Diferentes publicaciones mencionan que los porcentajes de eficiencia de encapsulación de activos por la técnica de nanoprecipitación se encuentran alrededor del 80% (Mora-Huertas *et al*, 2010). Sin embargo, en nuestro caso se trató particularmente de la encapsulación de compuestos muy volátiles.

Cabe mencionar que si bien los tres componentes “huella” del aceite esencial de *Schinus molle* son mayoritarios, únicamente representan el 8% del total de los componentes presentes en el aceite. Específicamente, el aceite esencial de *Schinus molle* es una mezcla de 65 componentes con diferente peso molecular, volatilidad y polaridad (Abdel-Sattar *et al*, 2010). El bajo %EE del aceite esencial de *Schinus molle* podría ser debido a que los otros componentes existentes en el aceite esencial estarían compitiendo con los componentes “huella” en el proceso de difusión del solvente, haciendo más lenta su interacción con el polímero en el proceso de formación de las NP (Mora-Huertas *et al*, 2010).

En cuanto al porcentaje de encapsulación (%E) de los componentes “huella” en las NP (Fórmula 2.9), en la Tabla 3.4 se reporta que fue de 2.99% de mircenol, 2.07% de α -felandreno y 2.79% de limoneno, con un %E total del 7.84% con una variación de 0.006%. Esto indica que aproximadamente el 7.84% de la NP está formada por los tres componentes “huella” del aceite esencial de *Schinus molle* y el resto corresponde al Eudragit L100-55. En anexo F, se muestran los cromatogramas obtenidos durante la determinación de los %EE y %E y.

Con el propósito de determinar las posibles interacciones entre los componentes de la formulación de NP, se realizó un análisis por espectroscopia de *FT-IR* tanto de los componentes como de las formulaciones de NP con y sin aceite esencial de *Schinus molle*. En la Figura 3.7, se observa el espectro del polímero Eudragit L100-55, se identificaron cuatro señales importantes de los principales grupos químicos presentes en la unidad polimérica de este copolímero (Anexo G). En la región de 1690 cm^{-1} se observa el estiramiento correspondiente a los grupos carbonilo (C=O) presentes en la cadenas laterales del ácido carboxílico y de del éster. En la región de 1155 cm^{-1} se observa el estiramiento correspondiente al grupo C-O-C presente en la cadena lateral del éster, además en la región entre 2500 y 3500 cm^{-1} se observa el estiramiento del grupo hidroxilo (O-H) perteneciente al ácido carboxílico presente en la cadena lateral de la unidad polimérica y finalmente, en la región de 2980 cm^{-1} aparecen las señales C-H. Las señales antes mencionadas coinciden con lo reportado en la ficha técnica del polímero Eudragit L100-55 (Evonik, 2015).

En la Figura 3.8 se observa el espectro del pululano, se identificaron tres señales características de este polisacárido. En la región de 1010 cm^{-1} , se observa el estiramiento perteneciente al grupo C-O-C, en la zona entre 3200 y 3550 cm^{-1} se observa una banda ancha la cual corresponde al estiramiento del grupo hidroxilo (O-H) y en la región de 2980 cm^{-1} , se observa los estiramientos C-H. Estas señales coinciden con la presencia de estos grupos funcionales en la estructura del pululano (Anexo G).

En la Figura 3.9 se presenta el espectro obtenido para el aceite esencial de *Schinus molle*. En la región de 800-1200 cm^{-1} se observan estiramientos dados por el enlaces C-C, en la región de 1640 a 1667 cm^{-1} se observan estiramientos pertenecientes a enlaces C=C y en la región de 2840 a 3000 cm^{-1} se observan estiramientos pertenecientes a los enlaces C-H, todos estos estiramientos relacionados con los compuestos alifáticos identificados en el aceite esencial de *Schinus molle* en las figuras del anexo G.

En la Figuras 3.10 y 3.11 se observan los espectros obtenidos para las formulaciones de NP sin y con aceite esencial de *Schinus molle* incorporado. En ambos espectros se puede observar que las señales que se obtuvieron corresponden principalmente a las señales obtenidas en el espectro del pululano. Este hecho, se podría atribuir a que en el momento de adicionar el pululano a la suspensión de NP, las cadenas de este polisacárido se organizan sobre la pared polimérica de las NP. Sin embargo, al no observarse señales atribuidas al espectro del aceite esencial de *Schinus molle*, se infiere que los componentes del aceite se encuentran encapsulados en las NP y no de forma libre.

En cuanto al estudio *in vitro* de liberación de los componentes “huella” a partir de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle*, se estableció utilizar un pH de 6.5 en base a que esta formulación podría ser utilizada como potencial larvicida en cuerpos de agua de lluvia estancada. Facundo-Torres *et al* (2009) reportaron que el agua de lluvia presenta un pH en un rango de 6.5-6.9 en diferentes puntos de la ciudad de Monterrey.

Diferentes investigaciones, mencionan que NP de Eudragit L100-55 presentan una liberación *in vitro* controlada en medios con pH's cercanos a 7. Jelvehgari *et al* (2010) reportó la elaboración de una formulación de NP de Eudragit L100-55-quitosano como sistema de liberación a un pH de 7.4. De igual forma Hao *et al* (2013) realizó un estudio *in vitro* de liberación a un pH de 6.8 para NP de Eudragit L100-55.

Después de establecer las mejores condiciones del estudio *in vitro* de liberación de los componentes “huella” a partir de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle*, se realizó la cinética de liberación durante 72 h.

En las figuras 3.12, 3.13 y 3.14, se presenta el perfil de liberación *in vitro* de los tres componentes “huella”: mirceno, α -felandreno y limoneno, respectivamente. Se observa que, al inicio del estudio el 4.8% de mirceno, 3.5% de α -felandreno y 4.5% de limoneno se encontraba libre, esto probablemente atribuido a los componentes no encapsulados en las NP.

Después de los primeros 30 min, se observó un ligero aumento en la cantidad liberada de los tres componentes “huella”. A las 24 h, la cantidad liberada de los tres componentes presentó ligeras variaciones: 8.18 - 8.90% de mirceno, 3.99 - 6.78% de α -felandreno y 6.58 - 7.38% de limoneno con respecto a la cantidad encapsulada en las NP. Después de 48 h, la cantidad liberada de mirceno y felandreno aumentó entre el 9 y 10%, lo que no fue observado para el limoneno.

La liberación *in vitro* de los tres componentes encapsulados en las NP, concuerda con lo encontrado en la bibliografía, donde se menciona que

sistemas de nanocápsulas obtenidos por la técnica de nanoprecipitación se comportan como sistemas bifásicos de liberación con una fase inicial rápida, seguida por una segunda fase más lenta (Cauchetier *et al*, 2003).

La fase inicial es llamada efecto *Burst* y es dado por la desorción de los activos de la superficie de las NP (Cruz *et al*, 2006). La segunda fase descrita, corresponde a la difusión de los activos (i.e. mirceno, α -felandreno y limoneno) desde el núcleo de la NP al medio. Esta segunda fase está influenciada por el coeficiente de partición de los activos entre el núcleo oleoso de las partículas y el medio acuoso externo, además de otros factores como las interacciones entre los activos y las cadenas poliméricas (Zili *et al*, 2005).

4.2 Determinación de la actividad larvicida del sistema nanoparticulado cargado con aceite esencial de *Schinus molle* contra larvas de *Aedes aegypti*.

La finalidad de desarrollar un sistema de NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* se centró en obtener un sistema nanoparticulado como potencial larvicida en el control del mosquito vector *Aedes aegypti*. Se propuso que al encapsular los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* en las NP, se proveería de un vehículo protector, a partir del cual dichos componentes puedan liberarse al medio y llevar a cabo su actividad larvicida.

La actividad larvicida del aceite esencial de *Schinus molle* se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa, se evaluó la actividad larvicida del aceite

esencial de *Schinus molle* libre frente a larvas de *Aedes aegypti*. Se utilizó una emulsión del aceite esencial de *Schinus molle* como formulación libre (Anexo C).

En el ensayo preliminar fueron probadas concentraciones en un rango de concentración amplio (de 1 a 500 ppm). Posteriormente, para el ensayo definitivo se utilizó un rango de concentración de 7.5 a 17.5 ppm (Tabla 3.5). A partir de los resultados obtenidos en este ensayo, se realizó el cálculo de regresión Probit (Figura 3.15). Con estos datos, se obtuvo que la LC_{50} para el aceite esencial libre fue de 12.5 ppm (Tabla 3.6). Los resultados concuerdan con lo reportado por Masseur *et al* (2009) donde se estableció que la LC_{50} para el aceite esencial de *Schinus molle* de hojas y semillas fue de 9.6 y 14.5 ppm respectivamente.

En una segunda etapa, se estableció la LC_{50} de la formulación de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*, el ensayo preliminar de igual forma se realizó en un rango amplio de concentración total de los componentes “huella” del aceite esencial encapsulado (1 a 500 ppm). Las concentraciones de los componentes “huella” se establecieron en base al porcentaje de encapsulación total.

Posteriormente, en el ensayo definitivo se utilizó un rango de concentración total de 0.45 a 1.5 ppm. En la Tabla 3.7 se presenta la actividad larvicida a las concentraciones definitivas. Se realizó el análisis de regresión Probit (Figura

3.16) y se estableció una LC₅₀ de 0.80 ppm para la formulación de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* (Tabla 3.8).

Con las LC₅₀ obtenidas, se puede observar que la LC₅₀ determinada para las NP cargadas es aproximadamente 16 veces menor que la del aceite libre, existiendo una marcada diferencia. Previos reportes mencionan no haber encontrado cambios significativos entre los activos libres y encapsulados, Yang *et al* (2009) mencionan en su trabajo que la efectividad del aceite esencial de ajo libre e incorporado en NP frente al *Tribolium casteneum*(gorgojo de harina) es prácticamente igual. Sin embargo, también mencionan que se observó una mayor pérdida de efectividad del aceite esencial libre que encapsulado en las NP, conforme al tiempo.

Con esto se demuestra que los sistemas de NP funcionan como sistemas acarreadores, permitiendo la liberación de los activos encapsulados y que estos lleven a cabo su efecto. En este caso, se propone que los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* encapsulados en las NP, son liberados al medio, y las larvas de *Aedes aegypti* al estar en un estadio metabólicamente activo (alimentándose) ingieren NP y los componentes del aceite esencial liberados. Una vez ingeridos por la larva, los componentes del aceite llegan al sistema circulatorio a través del aparato digestivo de la larva. Una vez en el sistema circulatorio, los componentes alcanzan el sistema nervioso del insecto y llevan a cabo su efecto.

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de acción insecticida de los componentes de los aceites esenciales (*i.e* mirceno y limoneno) actúan principalmente como inhibidores en la recaptación de acetilcolinesterasa. Esta acción impide la transmisión de los impulsos nerviosos en las larvas, inmovilizándolas al provocarles un estado de *shock* y como consecuencia de esto, provocar su muerte (Sahayaraj, 2014).

En resumen, la formulación de NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* presentó una menor LC_{50} que el aceite esencial libre. Este comportamiento podría ser atribuido a que la incorporación del aceite esencial de *Schinus molle* en NP favorece: i) la estabilidad de los componentes activos (*i.e.*: mirceno y limoneno), ii) la liberación controlada de los activos en el medio permitiendo la interacción de estos con las larvas de *Aedes aegypti* y iii) la biodisponibilidad de los componentes activos al mantener una concentración constante de activos en el medio que pudieran ser ingeridos por las larvas del mosquito (Mora-Huertas et al, 2010).

4.3 Validación de un método de microextracción en fase sólida en la modalidad headspace (HS-SPME) para la cuantificación del aceite esencial de *Schinus molle* nanoencapsulado por FID-GC.

Con el propósito de cuantificar los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Schinus molle*, se llevó a cabo la validación del método de HS-SPME por FID-GC desarrollado por Lugo-Estrada en el 2016 (Anexo A). Para la validación

del sistema se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, límite de detección y límite de cuantificación, mientras que para llevar a cabo la validación del método se evaluaron los parámetros de precisión y exactitud.

De esta forma, en la Tabla 3.9 se observan los valores que fueron obtenidos para los parámetros de validación del sistema. Con respecto a la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación mayor de 0.99 para cada uno de los estándares analizados (mirceno, α -felandreno y limoneno). Se estableció que los datos obtenidos para la curva de calibración en el rango de 0.25-4.0 ppm son lineales de acuerdo a la guía para la validación de métodos fisicoquímicos de la Secretaria de Salud (SSA, 2011).

Los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación de los tres componentes analizados se encuentran por debajo del nivel más bajo de concentración de la curva de calibración. En base a la guía de validación de la Secretaria de Salud (SSA, 2011), estos valores cumplen con los criterios estipulados. En relación a la precisión del sistema, se calculó los valores de la DER respecto a la curva de calibración y se obtuvieron valores menores al 15% para los tres componentes estableciendo la precisión del sistema (Jimenez, 2002).

En la Tabla 3.10 se muestran los valores de los parámetros evaluados en la validación del método. Para evaluar la exactitud, se determinaron los porcentajes de recuperación de muestras de NP adicionadas con estándares de los tres componentes "huella". Se obtuvieron porcentajes de recuperación del

108% para mirceno, 98% para α -felandreno y 101% para limoneno. En el Anexo D se muestra un cromatograma representativo para esta evaluación.

En base a los criterios estipulados por la AOAC (2002), se estableció que el método es exacto. Estos datos concuerdan con lo reportado por Lugo-Estrada (2012), donde se obtienen porcentajes de recuperación entre el 98 y 109% de tres de los componentes de *Thymus vulgaris* a partir de NP aplicando un método de *HS-SPME* por *FID-GC* previamente validado

Para establecer la precisión del método, se calculó la DER a partir de los porcentajes de recuperación obtenidos con las muestras de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*, adicionadas con estándares de los tres componentes “huella”. Los valores obtenidos fueron menores al 15%, lo cual de acuerdo a los criterios utilizados, se estableció que el método fue preciso (Jimenez, 2002). En el Anexo F, se muestran cromatogramas de muestras de NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle*, adicionadas con los estándares de los componentes “huella”.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se obtuvo un sistema de nanopartículas para la encapsulación del aceite esencial de *Schinus molle*, con un diámetro de partícula de 160 ± 11 nm, índice de polidispersión de 0.177 ± 0.006 , porcentaje de encapsulación del 7.84 ± 0.006 , un porcentaje de eficiencia de encapsulación de 16.31 ± 0.006 y una estabilidad superior a las 4 semanas. Estas características obtenidas permitieron la evaluación de la actividad larvicida en un modelo con larvas de *Aedes aegypti*.
- Se demostró que el incremento en la cantidad de polímero y de aceite esencial producen un aumento en el tamaño de partícula en las NP. La adición de un agente viscosante favoreció su estabilidad.
- Se implementó un estudio de liberación *in vitro*, el cual permitió establecer de forma progresiva la liberación de los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* a partir de las NP, de una manera confiable.
- Se determinó que el perfil de liberación *in vitro* de los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* lleva a cabo de forma controlada al menos durante 72 h.

- Se estableció que la liberación de los componentes, se ajusta a un modelo de liberación bifásico, donde se observaron dos etapas de liberación, una primera etapa que se dio de forma lenta y una segunda etapa más rápida acompañada con un aumento en la concentración de componentes liberados en el medio.
- Se estableció la actividad larvicida de una emulsión de aceite esencial de *Schinus molle* libre frente a larvas de *Aedes aegypti*, con una LC_{50} de 12.48 ppm.
- Se demostró la actividad larvicida del aceite esencial de *Schinus molle* encapsulado en las NP frente a larvas de *Aedes aegypti*, con una LC_{50} de 0.80 ppm, demostrando que este tipo de sistemas mejoran la bioactividad y biodisponibilidad de los activos.
- Se validó un método de *HS-SPME* para la cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* por *FID-GC* para cuantificar los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* de forma lineal, precisa y exacta.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

- Complementar la caracterización de la formulación de NP obtenida por medio de otras técnicas como microscopía y calorimetría.
- Realizar un estudio de la estabilidad de la formulación en un lapso de tiempo mayor a los 2 meses estudiados en este trabajo.
- Desarrollar ensayos de ecotoxicidad en modelos de organismos no blanco, como por ejemplo implementado los modelos de *Artemia salina* o el *Daphnia magna*.
- Continuar con la optimización de la formulación para mejorar los %E y %EE, mediante la reducción de la cantidad de aceite esencial de *Schinus molle*.
- Evaluar la aplicación del sistema de NP cargado con el aceite esencial de *Schinus molle* desarrollado frente a otros estadios del *Aedes aegypti*.
- Buscar incorporar aceites esenciales de otras especies en la formulación desarrollada

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-sattar, E., Zaitoun, A. A., Farag, M. A., El, S. H., & Harraz, F. M. H. (2010). Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L .leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. Nat. Prod. Res. 6419.
- Álvarez, L., Briceño, A., & Oviedo, M. (2006). Resistance to Temephos in populations of *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) of the west of Venezuela. Rev. Colomb. Entomol.,32(2), 172–175.
- Amer, A., & Mehlhorn, H. (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex larvae* (Diptera, *Culicidae*). Parasitol. Res., 99(4), 466–472.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. Food Chem Toxicol, 46(2), 446–475.
- Brathwaite Dick, O., San Martin, J. L., Montoya, R. H., del Diego, J., Zambrano, B.,& Dayan, G. H. (2012). The History of Dengue Outbreaks in the Americas, Am J Trop Med Hyg, 87(4), 584–593.
- Cauchetier, E., Deniau, M., Fessi, H., Astier, A., & Paul, M. (2003). *Atovaquone*-loaded nanocapsules : influence of the nature of the polymer on their *in vitro* characteristics, Int J Pharmaceut, 250, 273–281.

- Chino-Cantor, A. A., Sánchez-Arroyo, H., Ortega-Arenas, D., & Castro-hernández, E. (2014). Insecticide Susceptibility of *Aedes aegypti* L (Diptera: *Culicidae*) in Guerrero, México. *Southwest Entomol*, 39(3), 601–612.
- Cruz, L., Soares, L. U., Dalla, T., Mezzalira, G., Nadya, P., Guterres, S., & Pohlmann, A. R. (2006). Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *Int J Pharmaceut.* 313, 198–205.
- De la Mora-Covarrubias, A., Jiménez-Vega, F., & Treviño-Aguilar, S. M. (2010). Distribución geoespacial y detección del virus del dengue en mosquitos *Aedes (Stegomyia) aegypti* de Ciudad Juárez, Chihuahua, México. *Salud Publica de México*, 52(2), 127–133.
- De Mendonça Rocha, P. M., Rodilla, J. M., Díez, D., Elder, H., Silvia Guala, M., Silva, L. a., & Baltazar Pombo, E. (2012). Synergistic antibacterial activity of the essential oil of aguaribay (*Schinus molle* L.). *Molecules*, 17, 12023–12036.
- Domínguez X. (1985). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa S.A.
- Evonik Industries. (2015). Eudragit® L100-55, 1–6.
- Facundo-Torres, D. M., Ramirez-Lara, E., Garcia-Vazquez, Y., Miranda-Guardiola, R., Gómez-Gonzalez, R., & López-Chuken, U. (2009). Análisis fisicoquímico del agua de lluvia en 2 zonas diferentes. *Revista Salud Pública Y Nutrición*.

- Fernandez-Salas, I., & Flores-Leal, A. (1995). El papel del vector *Aedes aegypti* en la epidemiología del dengue en México. *Salud Pública de México*.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharmaceut*, 55(1), R1–R4.
- Fessi, H., Puisieux, F. y, & Devissaguet, J.-P. (1987). United States Patent, Patent Number : 5, 049,322, 3–7.
- Figueroa Espinoza, A. (2014). *Incorporación de extractos de semillas de Anona muricata L. (ANNONACEAE) en Nanopartículas poliméricas para uso en el control de Aedes aegypti L. (DIPTERA: CULICIDAE)*. Tesis de Maestría. UANL.
- Galindo-Rodriguez, S., Alle, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2004). Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Nanoprecipitation Methods, 21(8), *Pharm Res-Dordr*. 1428–1439.
- Gómez-Gaete, C. (2014). Polymeric nanoparticles: technologie and pharmaceutical applications. *Rev Farmacol Chile*, 7(2), 7–16.
- Gubler, D. J. (2011). Prevention and Control of *Aedes aegypti* -borne Diseases : Lesson Learned from Past Successes and Failures. *sPac J. Mol. Biol. Biotechn.* 1969.
- Guerra-Boone, L., Alvarez-Roman, R., Salazar-Aranda, R., Torres-Cirio, A., Rivas-Galindo, V. M., Waksman de Torres, N., Perez-Lopez, L. A. (2013). Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactinia*

mexicana, and *Schinus molle* found in northeast Mexico. *Nat Prod Commun*, *8*(1), 135–138.

- Hao, S., Wang, B., Wang, Y., Zhu, L., Wang, B., & Guo, T. (2013). Preparation of Eudragit L 100-55 enteric nanoparticles by a novel emulsion diffusion method. *Colloid Surface B*, *108*, 127–133.
- Hao, S., Wang, Y., Wang, B., Deng, J., Liu, X., & Liu, J. (2013). Rapid preparation of pH-sensitive polymeric nanoparticle with high loading capacity using electrospray for oral drug delivery. *Mat Sci Eng C-Mater*, *33*(8), 4562–4567.
- Harikumar, S. L., & Kadian, S. S. (2009). Eudragit and its Pharmaceutical Significance, (October).
- Ibañez Bernal, S., & Gómez Dantés, H. (1995). Los vectores del dengue en México: Una revisión crítica. *Salud Pública de México.*, *37*(JANUARY 1995), 53–63.
- Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemoth*, *47*(5), 565–573.
- Jelvehgari, M., Zakeri-milani, P., Siahi-shadbad, M. R., Loveymi, B. D., Nokhodchi, A., Azari, Z., & Valizadeh, H. (2010). Development of pH-sensitive Insulin Nanoparticles using Eudragit L100-55 and Chitosan with Different Molecular Weights, *AAPS PharmSciTech*. *11*(3).
- Jimenez C., Ventura R., Segura J. (2002) Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. *J Chromatogr B.*, *767*, 341-51.

- Krishnamoorthy, S., & Chandrasekaran, M. (2015). Identification of chemical constituents and larvicidal activity of essential oil from *Murraya exotica* L (Rutaceae) against *Aedes aegypti* , *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae). Parasitol Res. 1839–1845.
- Kumar, S., Mishra, M., Wahab, N., & Warikoo, R. (2014). Larvicidal, Repellent, and Irritant Potential of the Seed-Derived Essential oil of *Apium graveolens* against Dengue Vector, *Aedes aegypti* L. (Diptera: *Culicidae*). *Frontiers in Public Health*, 2(September), 1–6.
- Lugo-Estrada, L., (2012). *Obtención y caracterización de nanopartículas poliméricas para la encapsulación de aceites esenciales por la técnica de nanoprecipitación*. Tesis de maestría. UANL.
- Lugo-Estrada, L. (2016). *Nanoencapsulación de aceites esenciales para el control de insectos vectores de importancia médica*. Tesis doctoral. UANL.
- Maestre, R., Rey, G., Salas, J., Vergara, C., Santacoloma, L., Goenaga, S., & Carrasquilla, M. (2009). Susceptibilidad de *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*) a temefos en Atlántico-Colombia. *Rev Colomb Entomol*, 35(2), 202–205.
- Martin, A. N. (2006). *Principios de Fisicoquímica para farmacia y biología*. Editorial Alhambra.
- Martins, R., Arantes, S., Candeias, F., & Teresa, M. (2013). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *J Ethnopharmacol*, 1–8.

- Maryam, I., Huzaiifa, U., Hindatu, H., & Zubaida, S. (2015). Nanoencapsulation of essential oils with enhanced antimicrobial activity: A new way of combating antimicrobial Resistance. *JPharmacogn Phytochem.*4(3), 165–170.
- Masseur, F., Tadesse, M., Bekele, T., Balkew, M., & Gebre-michael, T. (2009). Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, *Culicidae*) in Ethiopia. *Afr. J. Biotechnol.*8(17), 4183–4188.
- Montero, G., & Fca, B. (2009). Biología de *Aedes aegypti*. Retrieved from <http://www.produccion-animal.com>.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., & Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int J Pharmaceut*,385, 113–142.
- Nelson M.J. (1986). *Aedes aegypti*: Biología y Ecología. Organización Panamericana de la Salud, REF: PNSP/86-93.
- Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 108(August), 11–17.
- Prajapati, V., Tripathi, A. K., Aggarwal, K. K., & Khanuja, S. P. S. (2005). Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technol*, 96(16), 1749–1757.

- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers, *Drug Dev Ind Pharm.*24(12).
- Rey, J., & Lounibos, P. (2015). Ecología de *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* en América y la transmisión de enfermedades. *Biomédica*,35(2), 1–27.
- Rezende, S., Stanisçuaski, S., Lucca, L. De, & Raffin, A. (2003). Caracterización y estabilidad fisicoquímica de sistemas poliméricos nanoparticulados para la administración de fármacos, *Quim. Nova.* 26(5), 726–737.
- Rodríguez-Cruz, R. (2002). Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. *Rev Cubana Med Trop*, 54(3), 189–201.
- Sahayaraj, K. (2014). *Basic and Applied Aspects of Biopesticides* (Springer).
- Sanabria, L., Ea, S., González, N., Alcaraz, P., & Bilbao, V. N. De. (2009). Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos) Larvicidal activity of aqueous plants extracts on *Aedes aegypti* larva (first trials). *Mem. Inst Investig Cienc Salud*,5(1), 26–31.
- Santos-Magalhaes, N. S., Pontes, A., Pereira, V. M. W., & Caetano, M. N. P. (2000). Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules, *Int J Pharmaceut.* 208, 71–80.

- Sohn, S. O., Lee, S. M., Kim, Y. M., Yeum, J. H., Choi, J. H., & Ghim, H. Do. (2007). Aroma Finishing of PET Fabrics with PVAc Nanoparticles Containing Lavender Oil, *8*(2), *Fiber Polym.* 163–167.
- SSA. (2011). Guía para la validación de métodos fisicoquímicos de la comisión de control analítico y ampliación de la cobertura de la Secretaria de Salud (CCAYAC-P-058).
- Thirion, J. (2003). El mosquito *Aedes aegypti* y el dengue en México. *Bayer Environmental Science*, *1*, 151.
- Tong, F., Gross, A. D., Dolan, C., & Coats, J. R. (2012). The phenolic monoterpene carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor, *Pest Manag Sci.*
- UNAM. (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Retrieved November 11, 2015, from <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., & Lourenco-de-Oliveira, R. (2014). High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J Virol*, *88*(11), 6294–6306.
- WHO. (2012). Global Strategy for Dengue Prevention and Control 2012–2020. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO. (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Health Organization, 1–41.

- WHO. (2009). Dengue: Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New Edition 2009 (Vol. 409).
- Yang, F.-L., Li, X.-G., Zhu, F., & Lei, C.-L. (2009). Structural Characterization of Nanoparticles Loaded with Garlic Essential Oil and Their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera : *Tenebrionidae*), J. Agric. Food Chem.
- Zili, Z., Sfar, S., & Fessi, H. (2005). Preparation and characterization of *poly-ε-caprolactone* nanoparticles containing griseofulvin, Int J Pharmaceut. 294, 261–267.

ANEXO A

MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LA MODALIDAD *HEADSPACE* POR CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN DE IONIZACIÓN EN LLAMA (*HS-SPME* POR *FID-GC*).

A.1. Condiciones *SPME*:

- Fibra de PDMS
- Volumen de muestra: 4 mL
- Volumen del vial: 7 mL
- Velocidad de agitación: 250 rpm
- Distancia de la fibra sobre la muestra: 0.5 cm
- Tiempo de equilibrio: 10 min
- Temperatura de extracción: 70°C
- Tiempo de extracción: 10 min

A.2. Condiciones cromatográficas:

- Cromatógrafo Perkin Elmer, Clarus 480 (Tu pon Autosystem XL, Perkin Elmer)
- Columna HP-5MS (30m x 0.25µm x 0.32mm)
- Inyector: 250 °C
- Horno:
 - 1) 60 °C- 86 °C (3 °C/min)
 - 2) 86 °C-100 °C (10 °C/min)
 - 3) 100-178 °C (6 °C/min)
- Detector: 250 °C

ANEXO B

GRÁFICOS DE LIBERACIÓN

B.1. Gráfico obtenido para la cantidad liberada de mirceno de las NP cargadas con aceite esencial de *Schinus molle* en función del tiempo.

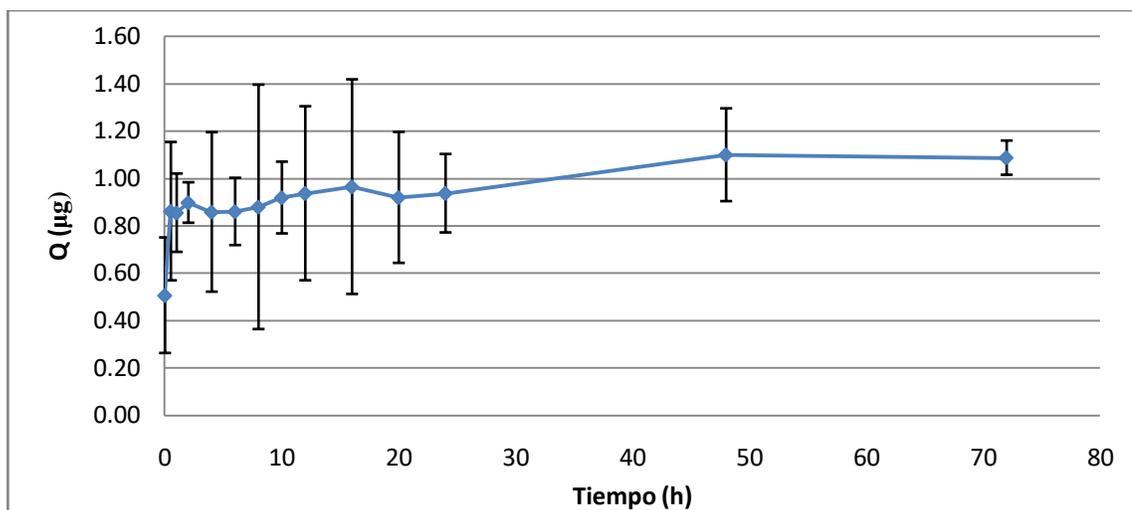


Figura B.1 Perfil de liberación de mirceno. Cantidad liberada de mirceno en función del tiempo de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* (Media \pm D.E., n=3).

B.2. Gráfico para la cantidad liberada de α -felandreno de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* en función del tiempo.

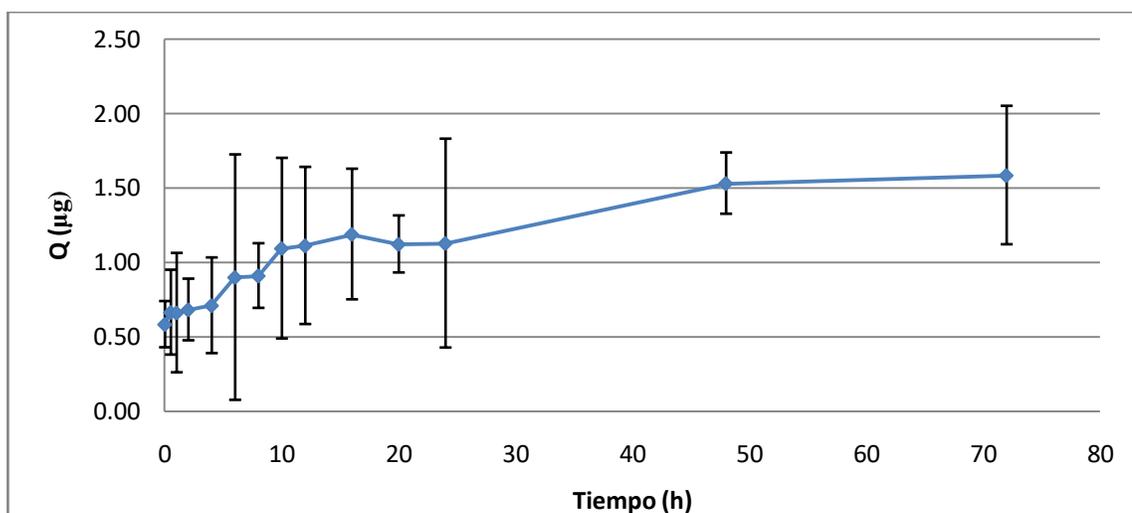


Figura B.2 Perfil de liberación de α -felandreno. Cantidad liberada de α -felandreno en función del tiempo de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* (Media \pm D.E., n=3).

B.3. Gráfico obtenido para la cantidad liberada de limoneno de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* en función del tiempo.

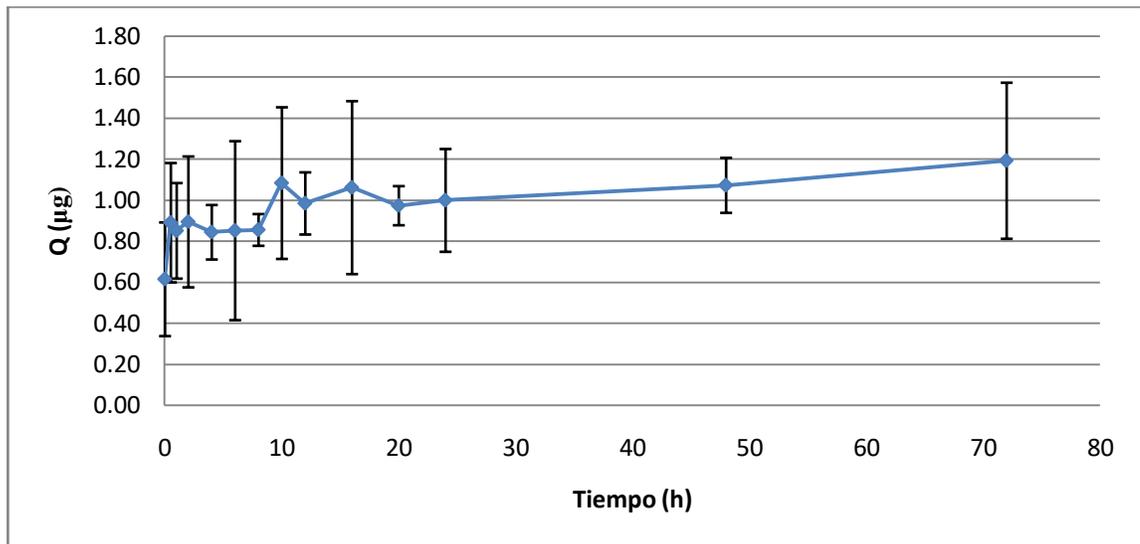


Figura B.3 Perfil de liberación de limoneno. Cantidad liberada de limoneno en función del tiempo de las NP cargadas con el aceite esencial de *Schinus molle* (Media \pm D.E., n=3).

ANEXO C

EMULSIÓN PARA EL MODELO DE ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* LIBRE.

C.1. Reactivos y Equipos:

- Aceite esencial de *Schinus molle*
- Emulsificante
- Agitador de propela

C.2. Procedimiento:

- Se incorpora la fase oleosa en la fase acuosa por goteo y se mantiene en agitación por 10 min.

ANEXO D

CURVAS DE CALIBRACIÓN

D.1. Mirceno

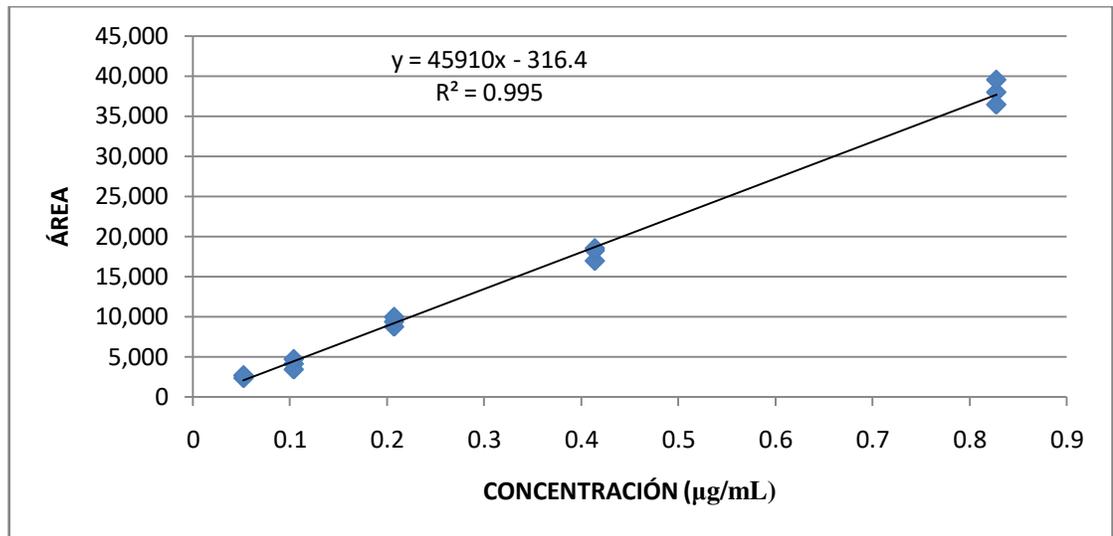


Figura D.1 Curva de calibración obtenida para el mirceno.

D.2. α -felandreno

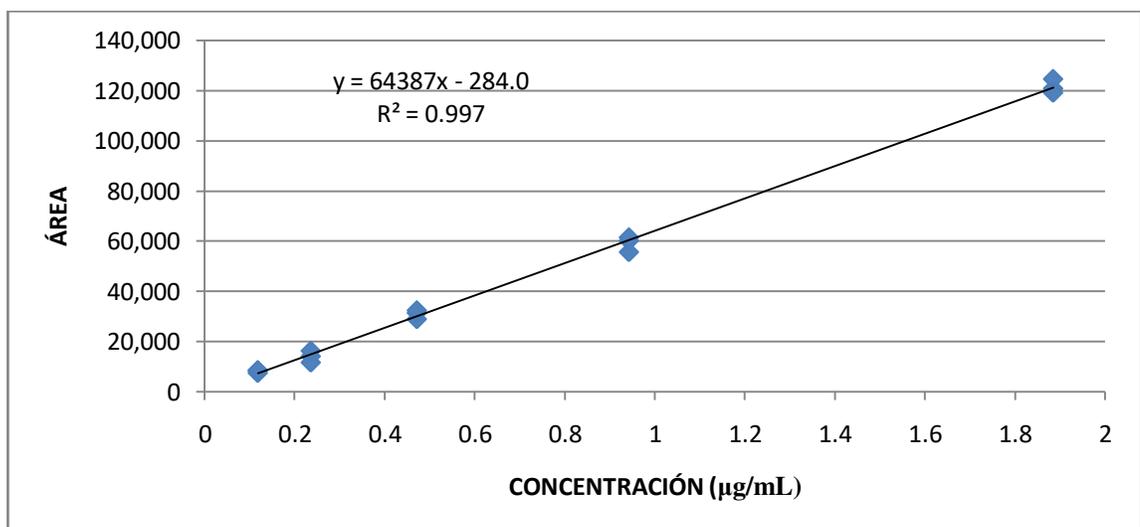


Figura D.2 Curva de calibración obtenida para el α -felandreno.

D.3. Limoneno

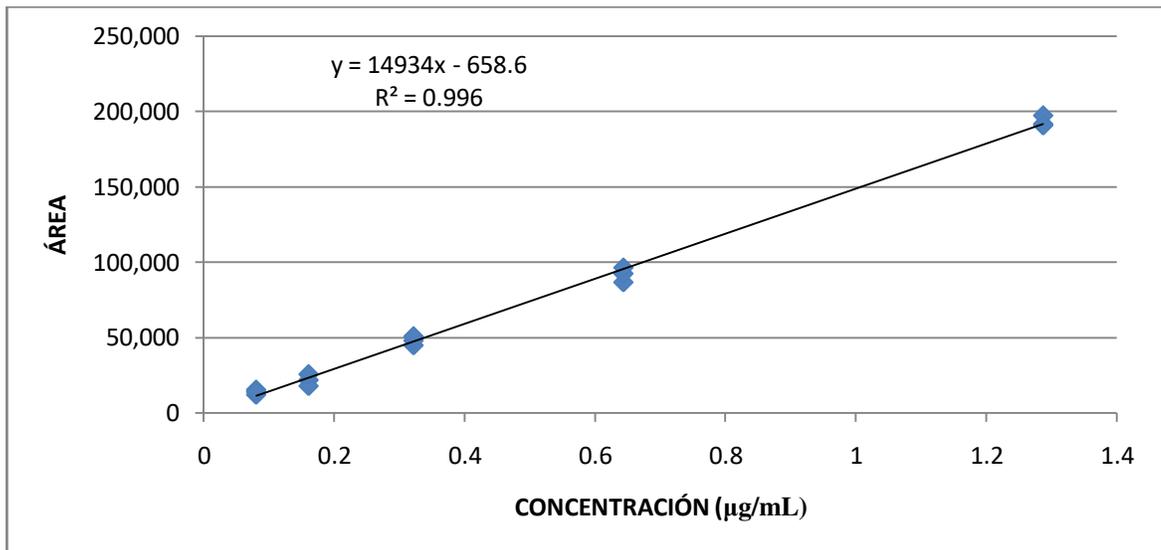


Figura D.3 Curva de calibración obtenida para el limoneno

ANEXO E

CURVAS DE DISTRIBUCIÓN

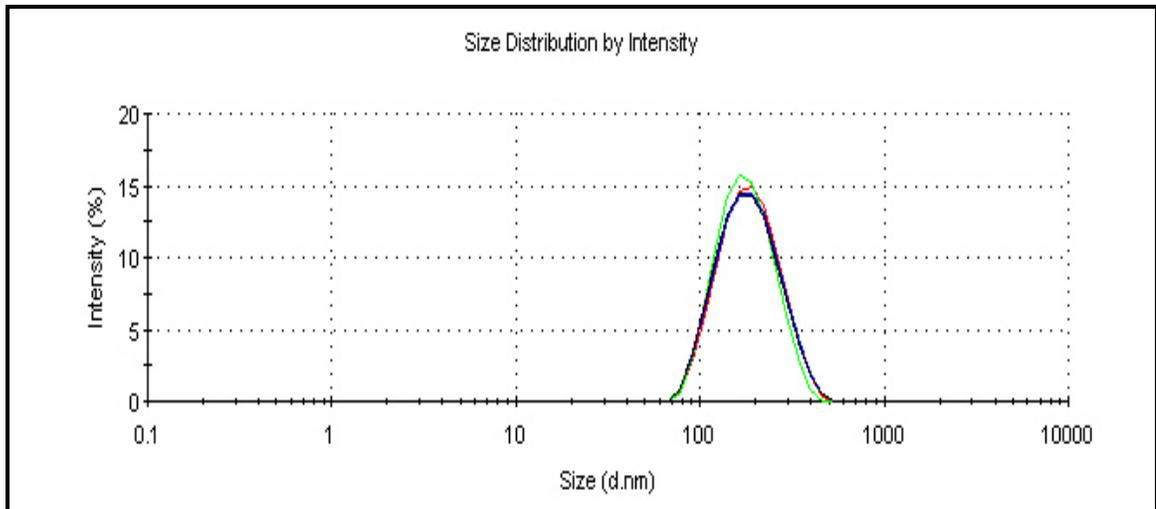


Figura E.1 Curvas de distribución para el lote de NP 29022016.M16 durante los dos meses del estudio de estabilidad.

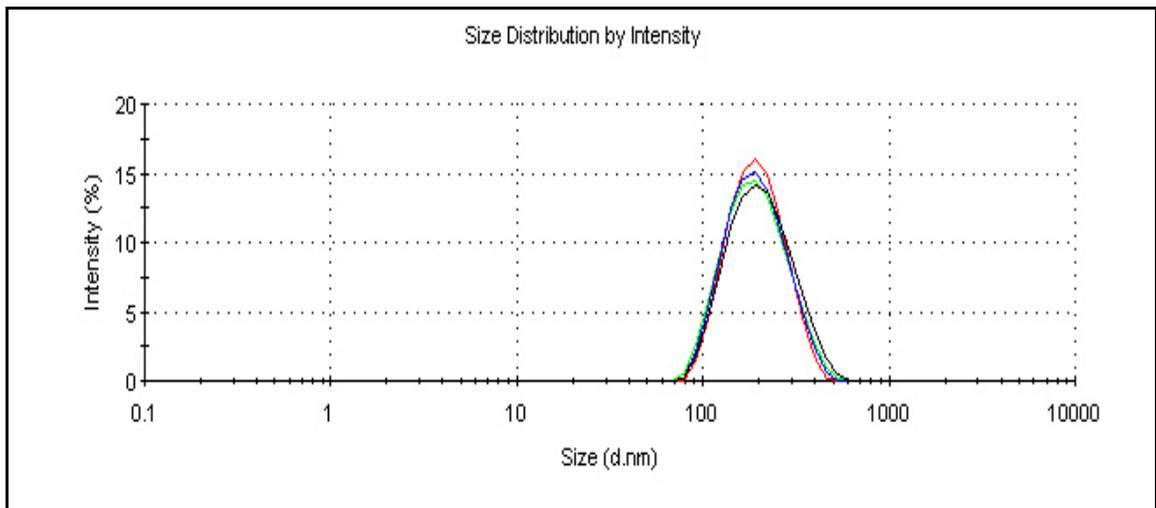


Figura E.2 Curvas de distribución para el lote de NP 29022016.M17 durante los dos meses del estudio de estabilidad.

ANEXO F

CROMATOGRAMAS

F.1. Aceite esencial de *Schinus molle*

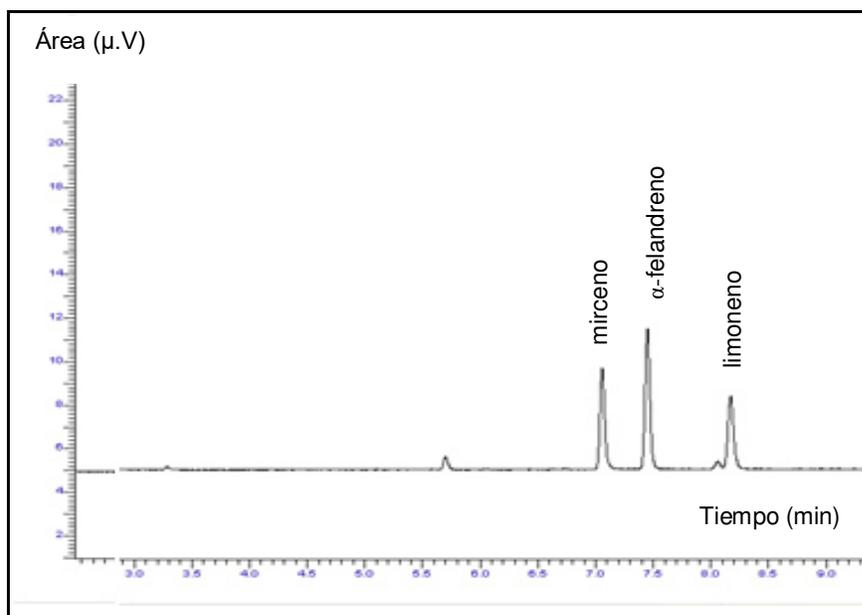


Figura F.1 Cromatograma del aceite esencial de *Schinus molle* (20 ppm).

Tabla F.1 Componentes mayoritarios identificados en el aceite esencial de *Schinus molle*.

<u>Compuestos mayoritarios</u>
α-Felandreno
Limoneno
Mirceno
α-Cadinol
o-Cimeno
δ-Cadineno
α-Pineno
epi-α-Muurolol

F.2. Estándares de linealidad y precisión

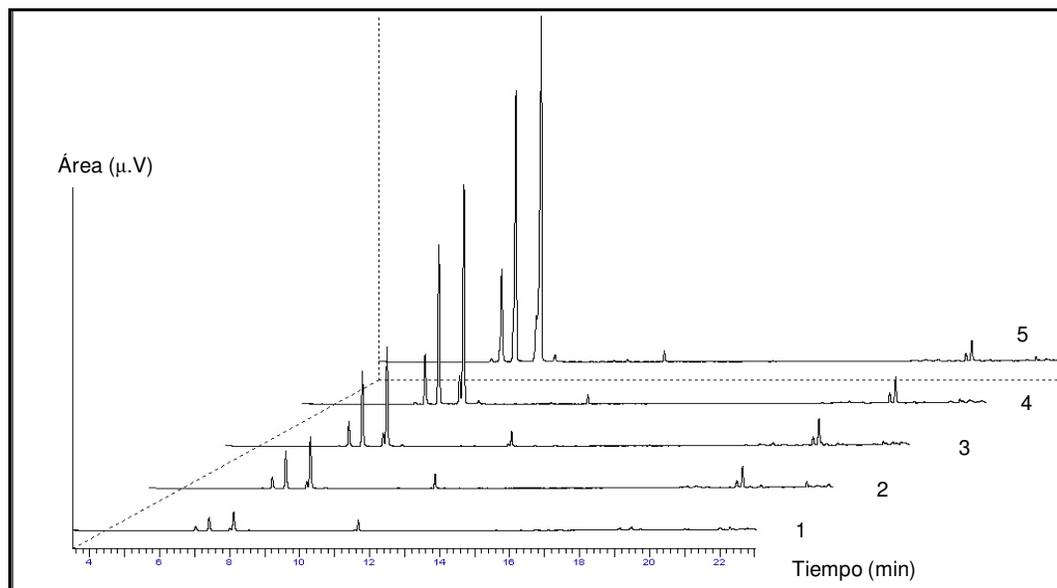


Figura F.2 Cromatograma de los estándares de linealidad, donde 1)0.25ppm, 2)0.5ppm, 3)1ppm, 4)2ppm y 5)4ppm.

F.3. Muestras de NP adicionadas con la mezcla de estándares.

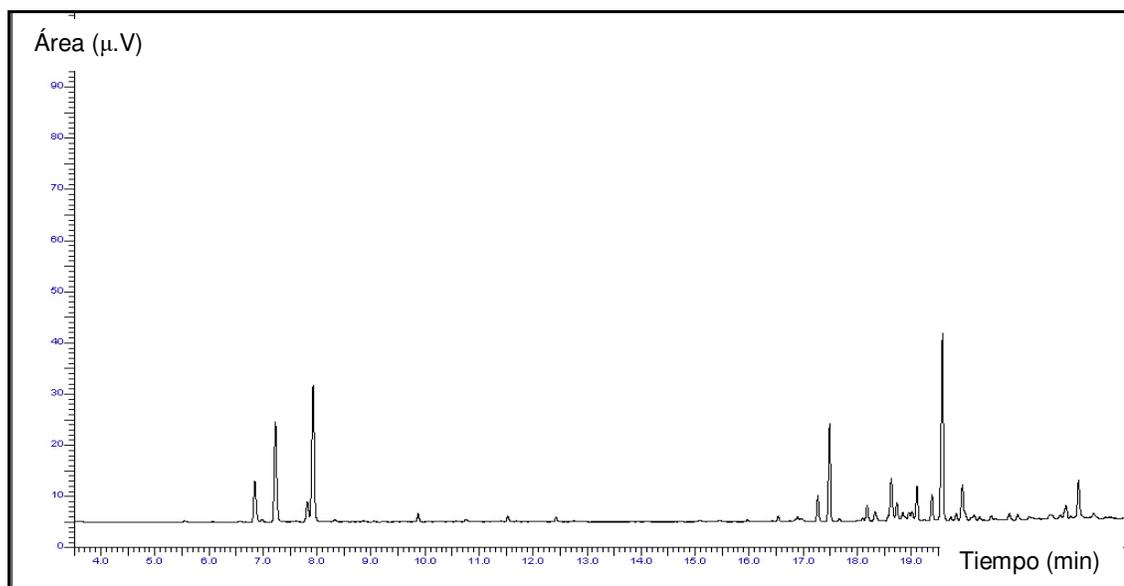


Figura F.3 Cromatograma de una muestra de NP adicionada con el estándar de 1.8 ppm.

F.4. Contenido de aceite esencial de Schinus molle: pastilla.

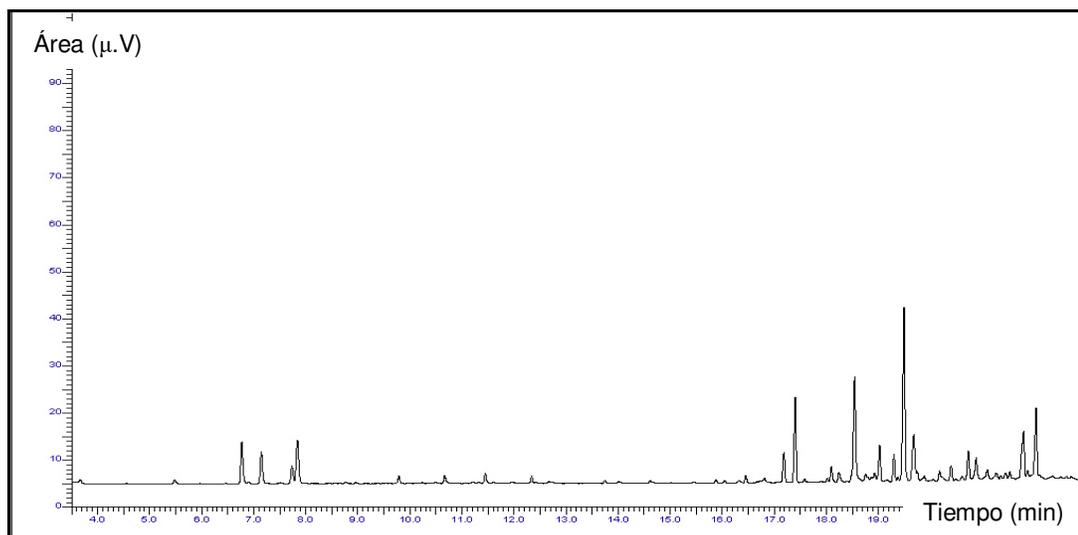


Figura F.4 Cromatograma obtenido del análisis de la pastilla en el estudio del contenido de aceite esencial en las NP.

F.5. Contenido de aceite esencial de Schinus molle: sobrenadante.

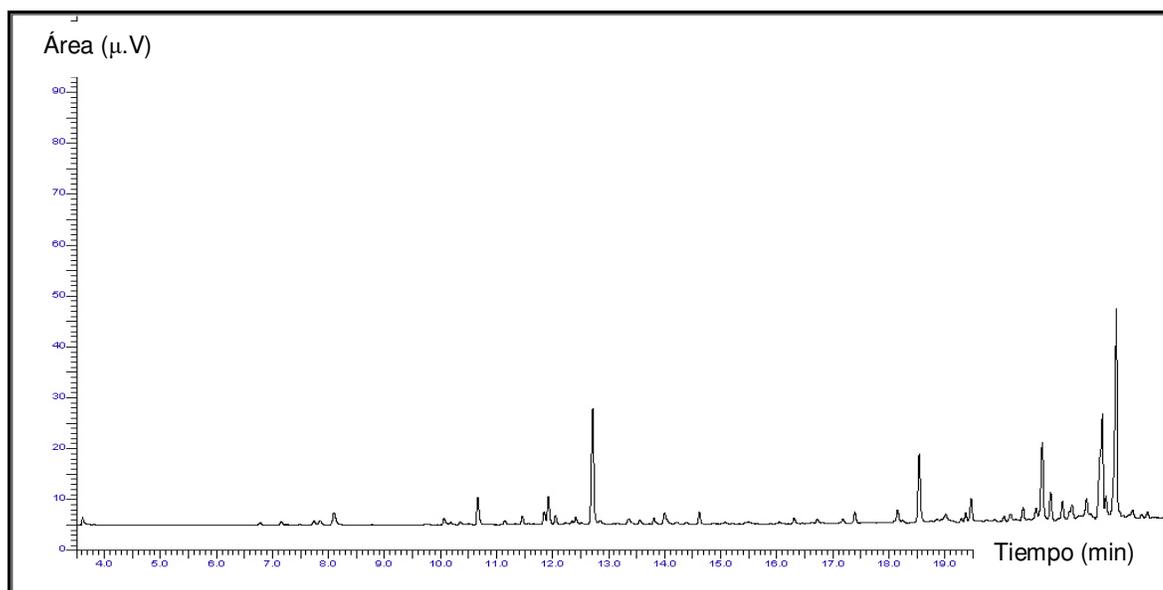


Figura F.5 Cromatograma obtenido del análisis del sobrenadante en el estudio del contenido de aceite esencial en las NP.

F.6. Perfil de liberación de los componentes del aceites esencial de *Schinus molle*.

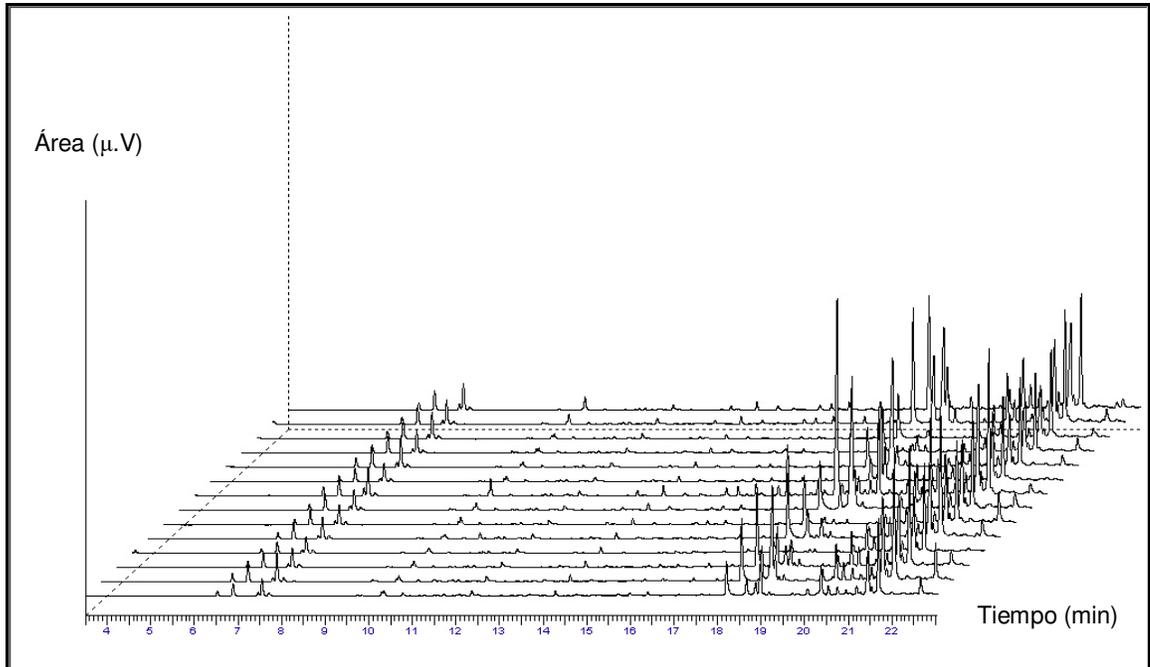


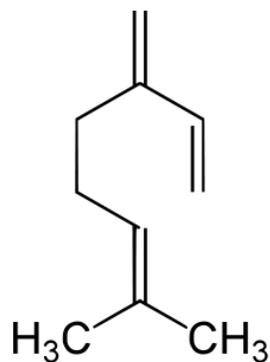
Figura F.6 Cromatograma obtenido del análisis del perfil de liberación de los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* de las NP en los distintos tiempos de estudio.

ANEXO G

ESTRUCTURAS QUÍMICAS Y GENERALIDADES DE LOS MATERIALES UTILIZADOS.

G.1. Mirceno

Estructura:



Nombre químico: 7-metil-3-metilen-1,6-octadieno

Nombre común: mirceno, β-mirceno

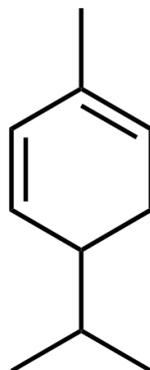
Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción ó Valor
Fórmula molecular	C ₁₀ H ₁₆
Peso molecular	136.23 g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.794 g/cm ³
Punto de ebullición	166-168 °C
Coefficiente de partición	4.17
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: fabricación de fragancias.

G.2. α -felandreno

Estructura:



Nombre químico: 2-metil-5-(1-metiletil)-1,3-ciclohexadieno

Nombre común: felandreno, α -felandreno

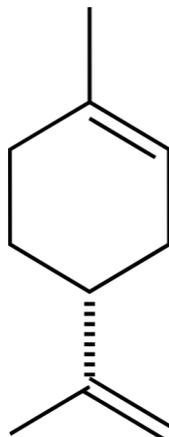
Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción ó Valor
Fórmula molecular	$C_{10}H_{16}$
Peso molecular	136.23 g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.85 g/cm^3
Punto de ebullición	$171.5 \text{ }^\circ\text{C}$
Coefficiente de partición	3.16
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: fabricación de fragancias.

G.3. Limoneno

Estructura:



Nombre químico: 1-metil-4-(1-metiletenil)-ciclohexeno

Nombre común: limoneno

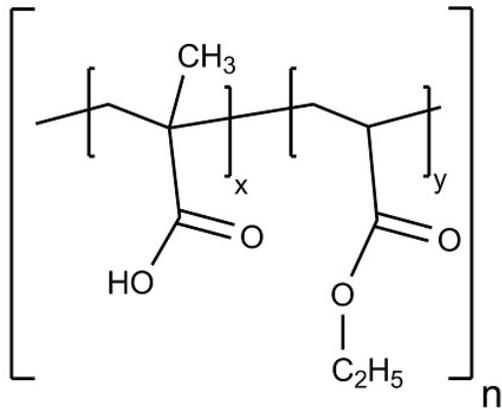
Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción ó Valor
Fórmula molecular	$C_{10}H_{16}$
Peso molecular	136.23 g/mol
Estado	Líquido
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.8411 g/cm ³
Punto de ebullición	176 °C
Coeficiente de partición	3.30
Solubilidad	Solventes orgánicos, ligeramente en agua

Aplicaciones: fabricación de fragancias, en la industria farmacéutica y alimenticia.

G.4. Eudragit L100-55

Estructura:



Nombre químico: copolímero ácido metacrílico-etil acrilato (1:1)

Nombre común: Eudragit L100-55

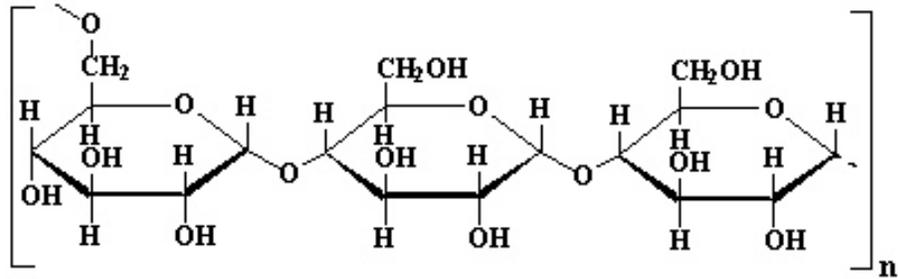
Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción ó Valor
Fórmula molecular	-----
Peso molecular	320,000 g/mol
Estado	Polvo
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.821-0.841 g/cm ³
Punto de ebullición	-----
Coefficiente de partición	-----
Solubilidad	Solventes orgánicos

Aplicaciones: excipiente en la industria farmacéutica.

G.5. Pululano

Estructura:



Nombre químico: α -1,4'-, α -1,6'-glucano

Nombre común: pululano

Propiedades físicas y químicas:

Propiedad	Descripción ó Valor
Fórmula molecular	$(C_6H_{12}O_5)_n$
Peso molecular	50,000-100,000 g/mol
Estado	Polvo
Color	Incoloro
Densidad relativa	0.05 g/cm ³
Punto de ebullición	-----
Coefficiente de partición	-----
Solubilidad	Agua

Aplicaciones: fabricación de capsulas en la industria farmacéutica y películas en la industria alimenticia.