

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“NANOENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA  
EL CONTROL DE *Aedes aegypti*”

POR

M.C. LORENA LUGO ESTRADA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE  
PRODUCTOS NATURALES

MAYO, 2018



NANOENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE  
*Aedes aegypti*

**DIRECCIÓN DE TESIS**

---

**Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez**  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Director

---

**Dra. Rocío Álvarez Román**  
Facultad de Medicina  
Directora externa

Mayo, 2018



NANOENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES PARA EL CONTROL DE  
*Aedes aegypti*

**COMITÉ DE TESIS**

---

**Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez**  
**Presidente**

---

**Dr. Gustavo Ponce García**  
**Secretario**

---

**Dra. Rocío Álvarez Román**  
**Vocal**

---

**Dr. Ramiro Quintanilla Licea**  
**Vocal**

---

**Dr. Juan Gabriel Baez González**  
**Vocal**

Mayo, 2018

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dar infinitas gracias a todos los que me apoyaron en este largo proceso de formación y aprendizaje, Jorge, familia, amigos, maestros y todas las valiosas personas que formaron parte de esta etapa de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias con acentuación en Química de Productos Naturales, con número de becario 247621.

Así también, este trabajo fue apoyado con:

- CB-CONACYT-Méjico 2009-129961
- PN-CONACYT-Méjico 2014-248560
- PRODEP-SEP Netwoeks DSA 103.5/15/14156

# ÍNDICE

	Página
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	2
<b>Enfermedades desatendidas u olvidadas</b>	2
<b>Productos naturales con actividad insecticida y/o repelente</b>	6
<b>Sistemas de liberación de aceites esenciales</b>	9
<b>Ánálisis cuantitativo de los aceites esenciales en sistemas coloidales</b>	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>HIPÓTESIS</b>	17
<b>OBJETIVOS</b>	17
<b>Objetivo General</b>	17
<b>Objetivos Específicos</b>	17
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	18
<b>Materiales</b>	18
<i>Material biológico</i>	18
<b>Métodos</b>	18
<b>Obtención y caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales</b>	18
<i>Obtención de los aceites esenciales</i>	18
<i>Caracterización química</i>	19
<i>Caracterización física</i>	20
Índice de refracción	20
Rotación óptica	20
Densidad relativa	20
<b>Desarrollo del método con Microextracción en fase sólida en modo <i>headspace (HS-SPME)</i> por cromatografía de gases (CG-FID)</b>	21
<i>Acondicionamiento de las fibras de SPME</i>	21
<i>Selección de la fibra de SPME</i>	21
<i>Optimización del método de extracción por HS-SPME</i>	21
<i>Validación para la cuantificación de los aceites esenciales en NP</i>	22
<i>Validación del sistema</i>	22
Linealidad	22
Límite de detección	23
Límite de cuantificación	24
Precisión	25
<i>Repetibilidad</i>	25

<i>Precisión Intermedia</i>	26
<i>Validación del método</i>	26
Exactitud	26
Precisión	27
<i>Repetibilidad</i>	27
<i>Precisión Intermedia</i>	27
Robustez	27
<b>Obtención y caracterización de las formulaciones de nanopartículas</b>	28
<i>Obtención de las nanopartículas</i>	28
<i>Caracterización de las nanopartículas</i>	30
<i>Tamaño de partícula y potencial Z</i>	30
<i>Contenido de aceite esencial en NP</i>	30
<i>Estudio de la liberación de aceites esenciales en atmósfera controlada</i>	30
<i>Ánálisis de las NP por FT-IR</i>	31
<b>Evaluación las actividades biológicas de los aceites esenciales en NP y libres</b>	33
<i>Obtención de nanoemulsiones con aceites esenciales</i>	32
<i>Actividad insecticida (larvicida) de los aceites esenciales en NP y libres contra Ae. aegypti</i>	32
<i>Actividad repelente espacial de los aceites esenciales en NP y libres contra Ae. aegypti .</i>	33
<i>Toxicidad de los aceites esenciales en NP y libres contra A. salina</i>	35
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	36
<b>Obtención y caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales</b>	36
<i>Desarrollo del método con Microextracción en fase sólida en modo headspace (HS-SPME) por cromatografía de gases (CG-FID)</i>	43
<b>Sistemas de liberación con aceites esenciales</b>	53
<i>Obtención y caracterización de NP</i>	53
<i>Estudio de la liberación de aceites esenciales en atmósfera controlada</i>	62
<i>Ánálisis de las NP por FT-IR</i>	65
Formulaciones con el aceite esencial de los frutos y hojas de <i>S. molle</i>	65
Formulaciones con el aceite esencial de las hojas de <i>O. basilicum</i>	68
<b>Evaluaciones biológicas de los aceites esenciales libres y encapsulados en NP</b>	71
<i>Actividad larvicida contra Ae. aegypti</i>	71
<i>Actividad repelente contra Ae. aegypti</i>	75
<i>Toxicidad contra A. salina</i>	78
<b>CONCLUSIÓN</b>	81
<b>PERSPECTIVAS</b>	82
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	83
<b>ANEXOS</b>	94

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Reportes de actividades biológicas de <i>S. molle</i> y <i>O. basilicum</i> contra diversos insectos.	7
2	Técnicas analíticas utilizadas para la cuantificación de aceites esenciales en sistemas de liberación.	14
3	Parámetros iniciales utilizados en la técnica de <i>HS-SPME</i> .	21
4	Variables utilizadas en el diseño experimental de Plackett-Burman para la optimización de la extracción por <i>HS-SPME</i> .	22
5	Variables utilizadas en el diseño experimental de Plackett-Burman para la optimización de la extracción por <i>HS-SPME</i> en la evaluación de la robustez.	28
6	Componentes identificados de cada aceite esencial, contenido porcentual e índices de Kovats por <i>CG-MS</i> y <i>CG-FID</i> .	39
7	Optimización del programa de temperatura por <i>CG-FID</i> (inyección directa) para la caracterización química del aceite esencial de <i>S. molle</i> y <i>O. basilicum</i> .	42
8	Caracterización física de los aceites esenciales y del anetol (control) según la FEUM.	43
9	Variables del diseño experimental de Plackett-Burman para la optimización del método de extracción con la fibra de PDMS para la <i>HS-SPME</i> .	47
10	Condiciones de extracción óptimas para la extracción de $\alpha$ -pineno, $\alpha$ -cimeno y limoneno a partir del aceite esencial de <i>S. molle</i> con <i>HS-SPME</i> por CG.	50
11	Parámetros de validación establecidos en la validación del sistema para cuantificar los componentes del aceite esencial de <i>S. molle</i> con <i>HS-SPME</i> por <i>CG-FID</i> .	50
12	Parámetros de validación establecidos en la validación del método para cuantificar los componentes del aceite esencial de <i>S. molle</i> con <i>HS-SPME</i> por <i>CG-FID</i> .	51
13	Evaluación de la robustez en la validación de los métodos para cuantificar los componentes del aceite esencial de <i>S. molle</i> con <i>HS-SPME</i> por <i>CG-FID</i> .	51
14	Parámetros de validación establecidos en la validación del sistema para cuantificar los componentes del aceite esencial de <i>O. basilicum</i> con <i>HS-SPME</i> por <i>CG-FID</i> .	52
15	Parámetros de validación establecidos en la validación del método para cuantificar los componentes del aceite esencial de <i>O. basilicum</i> con <i>HS-SPME</i> por <i>CG-FID</i> .	52

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
16	Formulaciones de NP cargadas con aceites esenciales y diferentes polímeros.	62
17	Evaluaciones biológicas de los aceites esenciales libres y encapsulados en NP.	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i> .	3
2 Compuestos presentes comúnmente en los aceites esenciales.	8
3 Tipos de Nanopartículas poliméricas. A) Nanoesferas y B) Nanocápsulas.	11
4 Técnica de <i>HS-SPME</i>	15
5 Técnica de Nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con aceites esenciales.	29
6 Evaluación de la actividad larvicida con larvas de <i>Aedes aegypti</i> .	31
7 Sistema HITSS para el ensayo de repelencia espacial de mosquitos. 1) Tapa, 2) Cilindro de metal (cámara sin luz), 3) Soporte para tratamiento, 4) Cilindro de acrílico (cámara con luz) y 5) Válvula de mariposa.	33
8 Cromatogramas de los aceites esenciales (2mg/mL) obtenidos por CG-MS. A) Hojas de <i>O. basilicum</i> , B) Frutos de <i>S. molle</i> y C) Hojas de <i>S. molle</i>	34
9 Cromatogramas de los estándares a una concentración total de 10 $\mu\text{g/mL}$ con las cuatro fibras de SPME. 1) Estándares para aceite esencial de <i>O. basilicum</i> : A) eucaliptol, B) linalilo y C) alilanisol; 2) Estándares para aceite esencial de <i>S. molle</i> : D) pineno, E) címeno y F) limoneno.	38
10 Comparación de las áreas de los tres estándares (concentración total de 10 $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidas con las fibras de SPME evaluadas por GC-FID ( $\bar{x} \pm s$ ; $n=3$ ).	45
11 Comparación de las áreas de los tres estándares (concentración total de 10 $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidas con las fibras de SPME evaluadas por GC-FID ( $\bar{x} \pm s$ ; $n=3$ ).	46
12 Diferencias de áreas entre los niveles altos y bajos de las variables en la optimización de la técnica de <i>HS-SPME</i> con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> (10 $\mu\text{g/mL}$ ) y la fibra de PDMS ( $n=2$ ). NP blanco = NP sin aceite esencial.	49
13 Efecto de algunos parámetros sobre el tamaño de NP obtenidas por nanoprecipitación con Eudragit L100-55. A) Metanol, B) Metanol:Acetona (1:1), ( $\bar{x} \pm \sigma$ , $n = 3$ ).	55
14 Comparación de los EE% de NP obtenidas con diferentes Eudragit (100-55, S100, L100 y mezcla del S100 con L100-55), ( $\bar{x} \pm \sigma$ , $n = 3$ ).	57
15 Efecto de la cantidad de polímero y aceite esencial en la fase orgánica sobre el tamaño y eficiencia de encapsulación de NP obtenidas por nanoprecipitación con Eudragit S100 ( $\bar{x} \pm \sigma$ , $n = 3$ ).	58
16 Efecto de la cantidad de tensoactivo y volumen de la fase de entrecruzamiento sobre el tamaño y eficiencia de encapsulación de NP de quitosano obtenidas por nanoprecipitación y gelificación iónica ( $\bar{x} \pm \sigma$ , $n = 3$ ).	60

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
17	Liberación de aceites esenciales (libres y nanoencapsulados) a diferentes temperaturas con 40% de HR. A) Aceite esencial de <i>S. molle</i> fruto, B) Aceite esencial de <i>S. molle</i> hoja y C) Aceite esencial de <i>O. basilicum</i> hoja ( $\bar{x} \pm \sigma$ , $n = 2$ ).	64
18	Espectros FT-IR de las NP cargadas con el aceite esencial de los frutos de <i>S. molle</i> y sus componentes.	68
19	Espectros FT-IR de las NP cargadas con el aceite esencial de las hojas de <i>S. molle</i> y sus componentes.	69
20	Espectros FT-IR de las NP cargadas con el aceite esencial de las hojas de <i>O. basilicum</i> y sus componentes.	70

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%E	Porcentaje de encapsulación
%EE	Porcentaje de eficiencia de la encapsulación
%R	Porcentaje de recuperación
AE	Aceite esencial
AEObh	Aceite esencial de hojas de <i>Ocimum basilicum</i>
AESmh	Aceite esencial de hojas de <i>Schinus molle</i>
AESmf	Aceite esencial de fruto de <i>Schinus molle</i>
A <sub>n</sub>	Gramos de aceite esencial no encapsulado
A <sub>t</sub>	Gramos de aceite esencial total
C	Peso del agua en gramos medida en la calibración
CU	concentración del analito medida en la muestra sin adicionar
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenceno/Carboxen(polidimetilsiloxano)
HS	Headspace
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en modo de headspace
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
SPME	Microextracción en fase sólida

## RESUMEN

*Aedes aegypti* es un mosquito vector de enfermedades como dengue, fiebre amarilla, y últimamente, Chikungunya y Zika. En general, existen diversas medidas de control para estos vectores que hasta hace algunos años eran efectivas, sin embargo, en algunos se basan en el uso de productos nocivos para el ambiente, y además los insectos han desarrollado resistencia a algunos de ellos, por lo cual se requiere encontrar alternativas nuevas y eficaces para el control de estos organismos. Una alternativa natural para reducir este problema es el uso de aceites esenciales (AE) obtenidos de plantas como pirul, tomillo, cempasúchil y albahaca, principalmente porque se ha encontrado que tienen actividad tanto insecticida como repelente, además de ser de fácil obtención y baja toxicidad para organismos no blanco. Sin embargo, sus componentes son inestables por lo que la nanoencapsulación podría ser una alternativa innovadora para el uso de estos aceites. El objetivo de este trabajo fue desarrollar formulaciones a base de nanopartículas (NP) cargadas con AE de *Schinus molle* y *Ocimum basilicum*, y evaluar su actividad insecticida y repelente contra *Ae. aegypti*. Los AE fueron obtenidos por hidrodestilación con un rendimiento de extracción  $\geq 0.2\%$ , para después ser caracterizados químicamente en base a su composición por CG-MS. Se determinó que los compuestos mayoritarios del AESmh fueron limoneno (15%), cadineno (9.1%) y canfeno (8.7%); los de AESmf felandreno (31%), limoneno (25.5%) y mirceno (10.6%); y los de AEObh fueron cinamato de metilo (37.5 %), linalool (26.1%) y eucaliptol (6.2%). La técnica de HS-SPME fue optimizada por medio del diseño experimental de Plackett-Burman. Posteriormente, fue validado un método de cuantificación para cada planta por medio de HS-SPME-GC. De lo cual se obtuvieron métodos lineales, precisos, exactos y no robustos. NP fueron obtenidas por la técnica de nanoprecipitación con quitosano y Eudragit S100; con porcentaje % EE mayor al 50%, tamaño  $< 800$  nm y sin agregados. Los AE tuvieron efecto tóxico contra larvas de *Ae. aegypti*, LC<sub>50</sub> de 56.6 ppm (AEObh), 21.3 ppm (AESmf) y 14.2 ppm (AESmh). El AEObh tuvo la mayor actividad repelente (SAI mayores a 0.3), seguido de AESmf y AESmh (AE y NP). Los AE y NP de *Ocimum basilicum* presentaron toxicidad contra *Artemia salina* (LC<sub>50</sub>  $< 1000$  ppm). Mientras que los demás no fueron tóxicos. Los resultados podrían usarse para buscar nuevas sustancias como una alternativa para controlar *Ae. aegypti*.

## ABSTRACT

*Aedes aegypti* is an insect that transmits several diseases such as dengue, yellow fever, and lately, Chikungunya and Zika. Even insecticides have been used widely for these vectors, they produce damage to the environment and insects have developed resistance to some of them. Furthermore, it's necessary to find new and effective alternatives for the control of these organisms. A natural alternative to reduce this problem is the use of essential oils (AE) obtained from plants such as pirul, thyme, cempasúchil and basil, mainly because they have been found to have both insecticidal and repellent activity, as well as being easy to obtain and have low toxicity for non-target organisms. However, its components are unstable, so nanoencapsulation could be an innovative alternative for the use of these oils. The objective of this work was to develop formulations based on NP loaded with AE from *Schinus molle* and *Ocimum basilicum*, and evaluate their insecticidal and repellent activity against *Ae. aegypti*. AE were obtained by hydrodistillation with an extraction yield of  $\geq 0.2\%$ , they were chemically characterized by their composition by CG-MS. AESmh major compounds were limonene (15%), cadinene (9.1%) and camphene (8.7%); from AESmf were phellandrene (31%), limonene (25.5%) and myrcene (10.6%); and from AEObh were methyl cinnamate (37.5%), linalool (26.1%) and eucalyptol (6.2%). *HS-SPME* technique was optimized by Plackett-Burman experimental design. Subsequently, a quantification method for each plant was developed and validated by *HS-SPME-GC*, obtaining linear, precise, accurate and non-robust methods. NP were obtained by the nanoprecipitation technique with chitosan and Eudragit S100; with % EE  $> 50\%$ , size  $< 800$  nm and without aggregates. Every AE had toxic effects against larvae of *Ae. aegypti*, with LC<sub>50</sub> of 56.6 ppm (AEObh), 21.3 ppm (AESmf) and 14.2 ppm (AESmh). The AEObh had the highest repellent activity (SAI  $> 0.3$ ), followed by AESmf and AESmh (AE and NP). AE and NP of *Ocimum basilicum* showed toxicity against *Artemia salina* (LC<sub>50</sub>  $< 1000$  ppm). While the others were not toxic. The results could be used to search new substances as an alternative to control of *Ae. aegypti*.

## INTRODUCCIÓN

Algunas de las enfermedades desatendidas u olvidadas son transmitidas por insectos, los cuales actúan como portadores. *Aedes aegypti* ha sido desde hace tiempo un problema sanitario a nivel mundial, transmitiendo enfermedades como la fiebre amarilla y el dengue, y recientemente, Chikungunya y Zika. Debido a su rápida reproducción, calentamiento global y migración poblacional, los casos de enfermos aumentan año con año, así también como su aparición en países de primer mundo, en los que las condiciones, normalmente, no son favorables para este mosquito. Ya que a la fecha no hay tratamientos contra estas enfermedades o vacunas aprobadas para la aplicación en la población, la OMS recomienda un conjunto de medidas tanto físicas como químicas para el control de *Ae. aegypti*. Uso de mallas, evitar estancamientos de agua y uso de insecticidas/repelentes. Éstos últimos, al ser usados indiscriminadamente, han provocado un daño irreparable al ambiente, además de que ha provocado que los insectos desarrollen resistencia a ellos. Es por ello que es importante la búsqueda de nuevas sustancias como repelentes e insecticidas.

Los productos naturales, o sustancias obtenidas de materia prima de la naturaleza (plantas, insectos, animales), como los aceites esenciales contenidos en las plantas, son metabolitos secundarios y sustancias volátiles que han mostrado tener sustancias con actividad repelente y/o insecticida contra un buen número de insectos (mosquitos, chinches, escarabajos). Sin embargo, debido a la naturaleza de sus componentes, se podría ver afectada su aplicación en condiciones ambientales. Las nanopartículas poliméricas son sistemas de liberación controlada que ayudan a liberar y proteger a los principios activos encapsulados, formando una red polimérica donde éstos quedan atrapados, y van siendo liberados a través del tiempo. Estos sistemas podrían contrarrestar las desventajas de la naturaleza de los aceites esenciales (alta volatilidad, oxidación, fotosensibilidad). En base a esto, en este trabajo se busca desarrollar formulaciones a base de NP cargadas con aceites esenciales de *S. molle* y *O. basilicum* por la técnica de nanoprecipitación y gelificación ionotrópica, y evaluar su actividad insecticida y/o repelente (HITSS) contra *Ae. aegypti*; así como también su toxicidad contra organismos no blanco (*Artemia salina*).

## ANTECEDENTES

### Enfermedades desatendidas u olvidadas

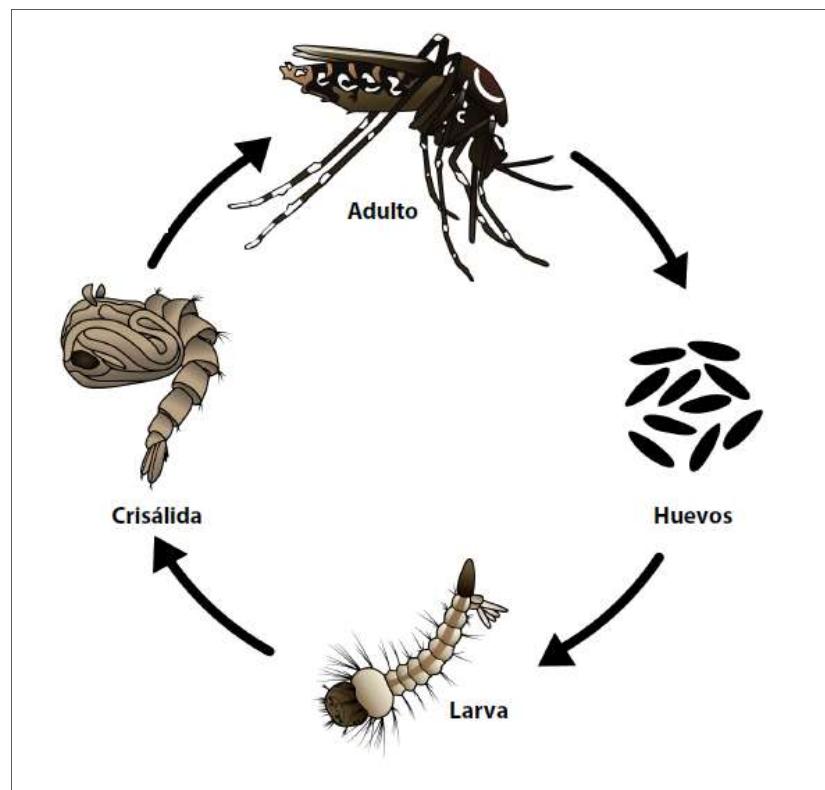
Las enfermedades desatendidas u olvidadas son un grupo de 17 infecciones causadas por bacterias, helmintos, protozoarios y virus. Estas afecciones son diseminadas principalmente por insectos, los cuales las propagan alrededor del mundo (i.e. dengue, fiebre amarilla, tripanosomiasis), jugando así un papel importante en el ciclo parasítico, ya sea como reservorios o como parte de él. Dichas enfermedades son endémicas en 149 países con importantes zonas de pobreza (países tercera mundistas), donde la incidencia es del 100%, con 534,000 muertes al año. Aunque estas enfermedades están comúnmente delimitadas a zonas con condiciones favorables para el desarrollo de los vectores, en años recientes se han diseminado hacia países o zonas donde sus condiciones normalmente no son las adecuadas para estar presentes, como los países de primer mundo; esto debido principalmente a factores como el cambio climático y la migración poblacional (OMS, 2013).

Los mosquitos se encuentran entre los principales insectos que participan en la transmisión de estas enfermedades alrededor del mundo. Específicamente, *Ae. aegypti* ha sido identificado desde hace décadas como portador de algunas enfermedades como la fiebre amarilla y el dengue. Aunado a esto, en años recientes han surgido dos nuevos virus transmitidos por este mosquito, Chikungunya y Zika.

Las cifras en el número de casos de estas enfermedades son alarmantes, y año con año van en aumento. Para el dengue se estima que cada año de 50 a 100 millones de personas son infectadas en 100 países endémicos, además existe el riesgo de volverse dengue hemorrágico (WHO, 2015). Por otro lado, para el virus Chikungunya fueron registrados ante la OMS 349 936 (sospechosos) y 146 914 casos (confirmados), solamente para el continente americano. Los países con mayor incidencia fueron Brasil (265 000 sospechosos), Bolivia y Colombia (19 000 sospechosos cada uno), mientras que en Argentina, hubo por primera vez un brote con más de 1000 casos sospechosos (WHO, 2017a). Recientemente, el virus del Zika se ha diseminado desde África y Asia a otros

continentes, en los cuales la más reciente e importante infección se ha dado en Brazil en 2015, con más de 1.5 millones de casos. Esta enfermedad es altamente riesgosa para mujeres embarazadas, debido a que puede causar microcefalia a los productos (CDC, 2016).

La transmisión de enfermedades por este mosquito se ve favorecida debido a que se alimenta tanto de día como de noche, se reproduce rápidamente (Figura 1.) y transmite el virus de una persona infectada a otra, por lo que aumenta la probabilidad de contraer estas infecciones. Una de las principales medidas de control de estas enfermedades es la prevención del contacto vector-humano, sobre todo porque no existen tratamientos efectivos contra estas enfermedades y tampoco hay muchas posibilidades de prevención por vacunación (Tabanca *et al.*, 2012; LaDeau *et al.*, 2015; Auysawasdi *et al.*, 2016; Younoussa *et al.*, 2016; WHO, 2017b).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Ae. aegypti* (CDC, 2015).

Actualmente, no existe un tratamiento antiviral específico para el dengue, solamente se tratan los síntomas, reduciendo la tasa de letalidad de hospitalizados por dengue a menos del 1% (WHO, 2017b). Aunque existe una vacuna contra el dengue probada y aceptada (*CYD-TDV*), la OMS recomienda que se aplique solamente a la población con una seroprevalencia del 70% o más para maximizar el impacto en la salud pública y la rentabilidad. La vacunación en poblaciones con 50 a 70% es aceptable. Sin embargo, no es recomendable aplicarla cuando la seroprevalencia es inferior al 50% debido a su baja eficacia y los posibles riesgos a largo plazo (dengue hemorrágico) en individuos seronegativos vacunados. Esto con base a los criterios de seroprevalencia para la introducción de la vacuna, los cuales se basan en el rendimiento diferencial de la *CYD-TDV* en personas seronegativas en comparación con personas seropositivas (WHO, 2016). Por otro lado, existen otras vacunas que se han estado desarrollando y están en investigación en fase clínica.

Al día de hoy, la OMS recomienda que el mejor método de control de estas enfermedades es a través de la prevención, por medio del control de los insectos transmisores de estas enfermedades (WHO, 2016). La estrategia global se basa en un conjunto de medidas preventivas. Por ejemplo, las medidas de control físicas, incluyen evitar tener agua estancada y acumulamiento de objetos, limpiar patios y usar mosquiteros que eviten el contacto de los insectos con las personas. Por otro lado, están las medidas químicas que consisten en el uso de insecticidas.

Para el control químico, algunos de los productos más utilizados son los carbamatos, los organofosforados y los piretroides, sin embargo, son dañinos para el ambiente y los organismos no blanco, principalmente acuáticos (Tabanca *et al.*, 2013; Giesy *et al.*, 2014; Pauley *et al.*, 2015). Existen diversos reportes que muestran esta problemática. Pereira y col. (2009) determinaron la toxicidad a organismos no blanco acuáticos y terrestres (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* y *Eisenia andrei*) de diferentes pesticidas, entre los que se encontraba un insecticida de tipo carbamato (Lannate®). Este producto resultó ser altamente tóxico para *D. magna* y repelente para *E. andrei* (lombriz de tierra). Por otro lado, en Arkansas, se realizó una comparación de toxicidad entre siete

insecticidas comunes, Dursban® (ingrediente activo del clorpirifos, *O,O*- dietil *O*-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato), malation (*O,O*-dimetil S-(1,2-dicarbetoxietil) ditiofosfato), Abate® (ingrediente activo del temefos, *O,O,O',O'*-tetrametil *O,O'*-tiodi-*p*-fenileno fosforotioato), Scourge® (ingrediente activo de la resmetrina, 5-benzil-3-furilmetil-2-2-dimetil-3-(2,2-dimetilvinil) ciclopropano carboxilato), Biomist® y Permanone® (ingrediente activo de la permetrina, 3-fenoxibenzil (1 RS)-*cis,trans*-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato) y *B.t.i.* (*Bacillus thuringiensis* subespecie *israelensis*), con organismos no blanco (*Ceriod. dubia*, *D. magna*, *D. pulex* y *Pimephales promelas*) en ensayos de campo y de laboratorio durante 24 y 48 h para observar el impacto de éstos en el agua después de una tormenta (agua movilizada y agua estancada). Se observó una mortalidad sustancial de algunos organismos no blanco, por lo que se sugirió que hubo una toxicidad acumulativa (Milam *et al.*, 2000).

Generalmente, el uso de piretroides es preferido sobre otro tipo de insecticidas por su alta eficacia, baja toxicidad y fácil degradación. Sin embargo, se ha observado que en ratas intoxicadas con estos productos se aumentó el estrés oxidativo (lipoperoxidación), algunas enzimas antioxidantes fueron alteradas en los eritrocitos y también fue inhibida la actividad de la acetilcolinesterasa sérica. Todo esto es muestra de toxicidad (Kale *et al.*, 1999). Aunado a la toxicidad de los insecticidas comúnmente utilizados, se tiene registro de que la resistencia a ellos se incrementa rápidamente, por lo que los insecticidas van perdiendo su eficacia.

El IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), encargado de ayudar a controlar o evitar que se desarrolle resistencia hacia los insecticidas, reportó que existen 586 especies de insectos resistentes a uno o varios insecticidas, teniendo registro de un total de 325 insecticidas a los que se han tenido resistencia (Sparks y Nauen, 2014). En Colombia, por ejemplo, fue demostrada la resistencia de *Ae. aegypti* a organoclorados, organofosfatos y piretroides (Maestre-Serrano *et al.*, 2014). Así también, en Tailandia e India encontraron una fuerte correlación entre la mutación L1014F kdr y el fenotipo resistente a deltametrina de *Culex quinquefasciatus* de campo (Yanola *et al.*, 2015) y para *Ae. aegypti* la mutación F1534C (Yanola *et al.*, 2011).

Debido a esto, desde la década pasada se han incrementado los esfuerzos por encontrar alternativas menos tóxicas y más eficaces para el control de estos vectores (SSA, 2001; Silva *et al.*, 2008; Nenaah y Ibrahim, 2011; Lee y Ahn, 2013).

### **Productos naturales con actividad insecticida y/o repelente**

Una gran cantidad de plantas y sus derivados han sido utilizados tradicionalmente en muchos países para tratar diversas afecciones o como parte de ritos ceremoniales en la mayor parte de las culturas. El interés en el uso de plantas se ha incrementado en las últimas décadas con la finalidad de encontrar nuevos tratamientos más eficaces y menos dañinos a problemas actuales, no solo relacionados con la salud sino también en otros ámbitos como la agricultura (Isman, 2000; Yang *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2015) y la conservación de alimentos (Hyldgaard *et al.*, 2012; Paes *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2014). En particular, los productos naturales que han sido estudiados como insecticidas han mostrado ser eficaces contra un gran número de especies de insectos que afectan áreas importantes para la sociedad.

Algunos aceites han sido evaluados como insecticidas contra mosquitos. Por ejemplo, en un estudio realizado en República Checa, se evaluó la actividad insecticida del aceite esencial de *Pimpinella anisum* contra larvas y adultos de *C. quinquefasciatus* y su toxicidad contra *D. magna* (organismo no blanco). El aceite mostró tener actividad larvicida ( $DL_{50}=26-27 \mu L/L$ ), mientras que la actividad adulticida tuvo diferencias de acuerdo al modo de aplicación (aspersión ( $DL_{50}=9.3 \mu L/mL$ ), fumigación ( $DL_{50}= 1.9 \mu L/L$ ) y por contacto ( $DL_{50}= 0.6 \mu g/cm^2$ )). Se observó que las concentraciones altas (35-50  $\mu L/L$ ) resultaron tóxicas para *D. magna* (62-92% de mortalidad), sin embargo, a concentraciones menores de 20  $\mu L/L$  no presentó toxicidad. Por lo que, se sugirió que este aceite podría ser usado en estas condiciones (Pavela, 2014). Otros aceites esenciales también han mostrado actividad larvicida contra géneros como *Culex*, *Anopheles* y *Aedes*, los cuales son responsables de transmitir la malaria, la fiebre amarilla, el dengue y la encefalitis viral (Prajapati *et al.*, 2005; Nerio *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Park y Park, 2012; Govindarajan *et al.*, 2013).

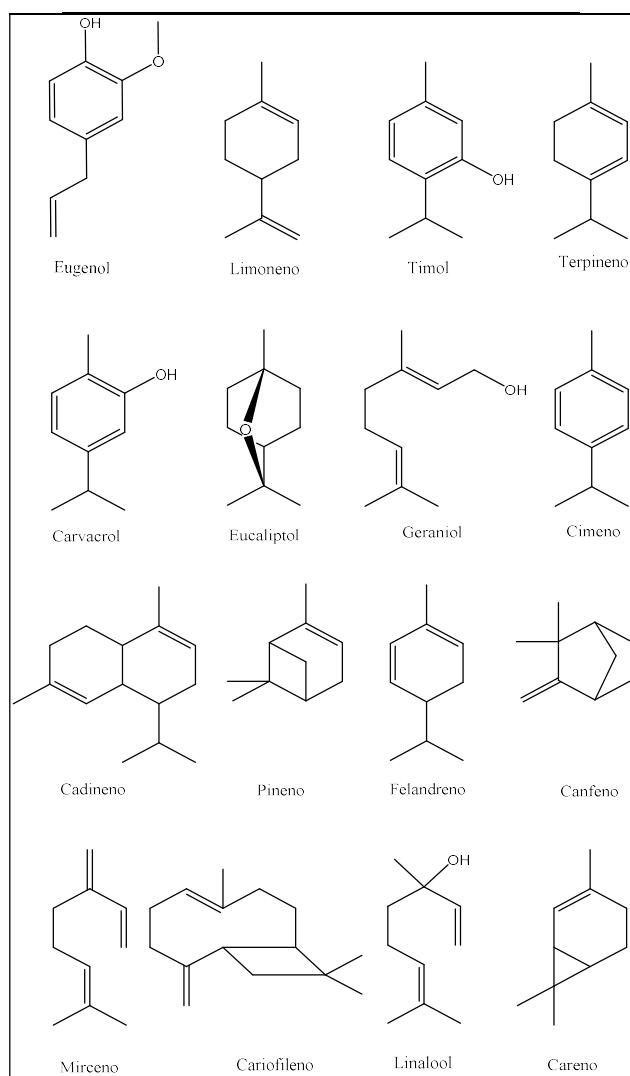
Particularmente, *S. molle* y *O. basilicum* han mostrado actividades biológicas como insecticidas (ovocida, larvicia, pupicida, adulticida) y repelentes contra una gran diversidad de insectos, como por ejemplo contra varios géneros de mosquitos y chinches, como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Reportes de actividades biológicas de *S. molle* y *O. basilicum* contra diversos insectos.

Planta	Tipo de extracto	Insecto	Actividad	Referencia
<i>S. molle</i>	Acuoso Etanólico	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Larvicida Pupicida	(Girmay <i>et al.</i> , 2014)
		<i>Xanthogaleruca luteola</i>	Larvicida	(Chiffelle <i>et al.</i> , 2013)
	Hexánico	<i>Triatoma infestans</i>	Larvicida Repelente	(Ferrero <i>et al.</i> , 2006)
		<i>Nezara viridula</i>	Repelente	(González, Gutiérrez, <i>et al.</i> , 2011)
	Aceite esencial	<i>Tribolium castaneum</i> <i>Trogoderma granarium</i>	Adulticida Repelente	(Abdel-Sattar <i>et al.</i> , 2010)
		<i>Ae. aegypti</i>	Larvicida	(Massebo <i>et al.</i> , 2009)
		<i>Haematobia irritans</i>	Adulticida	(López <i>et al.</i> , 2014)
		<i>Sitophilus oryzae</i>	Repelente Anti-alimentaria	(Benzi <i>et al.</i> , 2009)
		<i>Blatella germanica</i>	Repelente	(Sánchez-Chopa <i>et al.</i> , 2006)
<i>O. basilicum</i>	Fracciones de aceite esencial	<i>Sitophilus oryzae</i>	Adulticida	(López <i>et al.</i> , 2008)
	Clorofórmico Etéreo	<i>Anopheles stephensi</i>	Larvicida	(Maurya <i>et al.</i> , 2012)
	Metanólico	<i>Ae. aegypti</i>	Larvicida Pupicida	(Murugan <i>et al.</i> , 2007)
	Aceite esencial	<i>Ae. aegypti</i> <i>Culex quinquefasciatus</i>	Repelente	(Sritabutra y Soonwera, 2013)
		<i>Lymantria dispar</i>	Larvicida Anti-alimentaria	(Kostić <i>et al.</i> , 2008)
		<i>Callosobruchus maculatus</i>	Adulticida Ovocida	(Kéita <i>et al.</i> , 2001)
		<i>Sitophilus oryzae</i>	Adulticida	(Follett <i>et al.</i> , 2014)
		<i>Tribolium castaneum</i> <i>Ephestia kuehniella</i>	Larvicida	(Mikhail, 2011)

Específicamente, existen reportes de aceites esenciales que han mostrado una buena actividad contra *Ae. aegypti*. Smith-Vera y col. (2014) evaluaron 9 aceites esenciales (*Tagetes lucida*, *Lippia alba*, *Lippia origanoides*, *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon*

*citratus*, *Cymbopogon flexuosus*, *Citrus sinensis*, *Swinglea glutinosa* y *Cananga odorata*) contra *Ae. aegypti* y observaron que las larvas del insecto fueron susceptibles a todos ellos con DL<sub>50</sub> de 17 a 123 ppm, siendo *C. flexuosus* el más activo.



**Figura 2.** Compuestos presentes comúnmente en los aceites esenciales.

Por otro lado, los aceites esenciales de clavo, hierba de limón y citronela tuvieron actividad repelente contra *Ae. aegypti* y *C. quinquefasciatus* (Sritabutra y Soonwera, 2013), así también los de *Rosmarinus officinalis*, *Cinnamomum zeylanicum* y *O. basilicum* contra *Ae. aegypti* (Prajapati *et al.*, 2005). También fue demostrada la actividad larvicida del aceite esencial de *Mentha x villosa* (DL<sub>50</sub> = 45.0 ppm) (Lima *et al.*, 2014), del aceite

esencial de las hojas y frutos de *S. molle* (DL<sub>50</sub> de 9.6 a 14.5 ppm) (Massebo *et al.*, 2009) y del aceite esencial de *O. basilicum* (DL<sub>50</sub> de 11.4 ppm) (Govindarajan *et al.*, 2013) contra *Ae. aegypti*. Cabe mencionar que estos aceites se han utilizado tradicionalmente para el control de insectos (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2010; González *et al.*, 2011). Considerando su uso potencial como bioinsecticidas (Bakkali *et al.*, 2008), los aceites esenciales tienen las ventajas de ser de fácil obtención y, generalmente, de baja toxicidad en organismos no blanco (Kostić *et al.*, 2008; Koul *et al.*, 2008; Nerio *et al.*, 2010). De acuerdo a esto, su caracterización fisicoquímica es fundamental para conocer sus componentes y su probable actividad biológica de acuerdo a su composición, la cual incluye principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y fenil propanos (Figura 2). Estos compuestos volátiles actúan como mensajeros químicos en las plantas, y son parte fundamental del metabolismo vegetal (metabolitos secundarios).

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, se puede decir que los aceites esenciales pueden ser usados como una alternativa más amigable con el ambiente. Sin embargo, su aplicación es limitada debido a las características fisicoquímicas de sus componentes, los cuales tienden a oxidarse y degradarse fácilmente al estar expuestos a condiciones ambientales como la luz y el oxígeno del aire (Lai *et al.*, 2006).

### **Sistemas de liberación de aceites esenciales**

Las limitaciones que presentan los aceites esenciales en su aplicación pueden evitarse mediante su encapsulación en sistemas coloidales. En particular, los sistemas particulados brindan protección a los componentes de los aceites esenciales de las condiciones externas, además de que sirven como vehículos o acarreadores de estos y los liberaran controladamente. Existen diversos sistemas con diferentes tamaños, aplicaciones y composición, incluyendo nanoemulsiones, liposomas y nanopartículas poliméricas.

Los liposomas son partículas esféricas constituidas de fosfolípidos, los cuales encapsulan sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Estos sistemas tienen diferentes aplicaciones, por ejemplo, fueron desarrolladas formulaciones de liposomas para encapsular aceite de ajo, las cuales tuvieron un porcentaje de encapsulación del 20.4% y

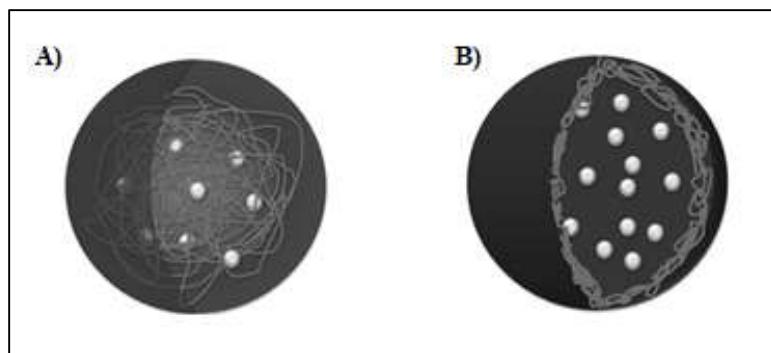
actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, causando cambios morfológicos y deterioro de la pared celular (Cui *et al.*, 2015)

Por otra parte, las nanoemulsiones son sistemas de dos fases, en las que la fase discontinua o externa está desintegrada en forma de glóbulos dentro de una fase continua, la cual tiene un agente tensoactivo disperso con la finalidad de reducir la tensión interfacial y mejorar la distribución de los glóbulos y la estabilidad del sistema. Se les denomina nanoemulsiones debido al tamaño final obtenido de los glóbulos dispersos y su homogenidad. Nuchuchua y col. (2009) desarrollaron nanoemulsiones (150 a 220 nm) con una combinación de aceites esenciales (*C. nardus*, *O. americanum* y *Vetiveria zizanioides*) mediante homogenización de alta presión y evaluaron su liberación en celdas de Franz horizontales y la actividad repelente directamente en brazo. Los investigadores observaron que a menor tamaño de partícula se mejoraba la estabilidad y el tiempo de actividad repelente de los aceites esenciales contra *Ae. aegypti*, probablemente debido a una mayor integración de la formulación sobre la piel.

De acuerdo a los principios básicos de las emulsiones, con la finalidad de mejorar su estabilidad y controlar la liberación de los compuestos activos, se han desarrollado otros sistemas como las micropartículas y las nanopartículas poliméricas. Estos sistemas particulados usan un polímero que brinda soporte a la fase discontinua, formándose partículas sólidas dispersas en las que están incorporados los compuestos activos. De acuerdo a la aplicación y al método de preparación, es posible obtener micropartículas o nanopartículas.

Las micropartículas poliméricas son sistemas particulados ( $>1000\mu\text{m}$ ) constituidos por polímero y principios activos hidrofóbicos. Las micropartículas poliméricas confieren protección al principio activo evitando su degradación y facilitando su transporte en el organismo. Martins y col. (2011) desarrollaron una formulación de micropartículas con el aceite esencial de tomillo, mediante la técnica de coacervación, para la conservación y protección de saborizantes y aromas en alimentos, obteniendo micropartículas de ácido poliláctico (PLA) de aproximadamente 36  $\mu\text{m}$ .

Aunque generalmente las micropartículas poliméricas son sistemas homogéneos y tienen una aplicación eficiente, las nanopartículas poliméricas (NP) brindan ciertas ventajas que los demás sistemas no tienen debido a su tamaño nanométrico (1-600 nm). Como se puede ver en la Figura 3, en base a su morfología y arquitectura, existen dos tipos de NP: las nanoesferas (sistema monolítico matricial donde el principio activo sólido es adsorbido o incorporado) y las nanocápsulas (sistema vesicular donde el principio activo líquido está disuelto o disperso en el núcleo o en la pared polimérica) (Fessi *et al.*, 1989).



**Figura 3.** Tipos de nanopartículas poliméricas. A) Nanoesferas y B) Nanocápsulas (Lugo Estrada, 2012).

En lo que se refiere a su tamaño nanométrico, posiblemente éste les permite entrar a las células atravesando su membrana o por endocitosis; además, la estructura matricial o el recubrimiento sólido permiten proteger a los compuestos encapsulados de la degradación por oxígeno del aire, enzimas hidrolíticas, pH, luz y algunos otros factores externos, aumentando así su estabilidad. Aunado a esto, las NP presentan una mayor área superficial lo que aumenta la interacción con los sustratos biológicos (célula o tejido) y, posiblemente, la bioactividad del principio activo en su sitio de acción. La estabilidad de estas formulaciones suele ser mayor a los demás sistemas, evitando la formación de agregados y/o separación de fases. Además, pueden ser direccionadas y usar dosis más bajas (Peteu *et al.*, 2010).

Las NP pueden ser obtenidas por diferentes técnicas, entre las que destaca la técnica de nanoprecipitación, la cual permite encapsular sustancias hidrófobas con altos porcentajes de encapsulación. De manera general, esta técnica consiste en la incorporación de una fase orgánica compuesta por un polímero y la sustancia a encapsular disueltos en un solvente orgánico miscible en agua; esta fase se incorpora con agitación constante a una fase acuosa compuesta por un tensoactivo disuelto en agua. Después de que entran en contacto las dos fases, mientras que el solvente orgánico difunde hacia la fase acuosa, las cadenas poliméricas se agregan con las moléculas del principio activo, quedando formadas las NP. Posteriormente, el solvente orgánico debe ser eliminado para evitar desestabilizar el sistema o formar agregados y, por lo tanto, aumentar el tamaño de partícula y en el índice de polidispersidad (Chorny *et al.*, 2002).

Comúnmente, el solvente orgánico es eliminado por medio de evaporación a presión reducida, permitiendo una purificación rápida y controlada para obtener, finalmente, complejos matriciales de tamaño nanométrico en donde queda atrapado el principio activo (Fessi *et al.*, 1989). Por último, las NP deben ser caracterizadas de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas: tamaño, índice de polidispersidad, apariencia física, porcentaje de encapsulación, eficiencia de encapsulación y comportamiento térmico (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004, 2005).

Actualmente, existen reportes de nanopartículas con aceites esenciales preparadas por distintas técnicas y destinadas a diferentes aplicaciones. Por ejemplo para la industria alimentaria, Yang *et al.* (2009) prepararon NP con aceite esencial de ajo y estabilizadas con un recubrimiento de polietilenglicol (PEG). Las formulaciones de NP tuvieron tamaños menores a 240 nm y estaban destinadas al control de *Tribolium castaneum*, un insecto que afecta gravemente los granos almacenados. Por otro lado, se han desarrollado diferentes películas de nanopartículas con aceites esenciales (con actividades antimicrobianas y antioxidantes) para el empacado y conservación de alimentos, como el aceite de orégano incorporado en NP de quitosano (Hosseini *et al.*, 2013).

En el área agrícola se han desarrollaron formulaciones para el control de *Bemisia tabaci*, el cual es un insecto que infesta cultivos de varios granos como el frijol. Las NP con el aceite esencial de *Zanthoxylum rhoifolium* fueron obtenidas por la técnica de nanoprecipitación, logrando partículas menores a 500 nm y con un alto porcentaje de encapsulación; además presentaron 95% de inhibición en huevos y ninfas del insecto (Christofoli *et al.*, 2015). En el área de la industria textil también se han desarrollado formulaciones de NP para conservar por más tiempo el aroma en la ropa. Uno de estos estudios se enfocó a obtener una formulación con más estabilidad y más resistencia, ya que las basadas en micropartículas tendían a destruirse por la fricción. En el estudio fueron preparadas, por el método de emulsificación-difusión, NP con aceite esencial de lavanda (244 nm) que resultaron ser más estables que las micropartículas (Sohn *et al.*, 2007).

Por otro lado, en el área de la salud se han desarrollado formulaciones de NP para el control de insectos transmisores de enfermedades. Lugo Estrada (2012) desarrolló, por la técnica de nanoprecipitación, formulaciones estables de NP cargadas con aceite esencial de *Thymus vulgaris*, obteniendo partículas de 117-140 nm con potencial uso como repelentes de insectos. Los estudios anteriores muestran que las NP ofrecen una opción versátil como vehículo de aceites esenciales de fácil uso y administración.

### **Análisis cuantitativo de los aceites esenciales en sistemas coloidales**

Para determinar los porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación, en sistemas de liberación particulados (micropartículas y nanopartículas), es necesario desarrollar un método analítico para la cuantificación del aceite incorporado en el acarreador polimérico.

En general, existen dos maneras principales de cuantificar estos componentes, por técnicas espectroscópicas como espectroscopía UV (no selectiva) o por técnicas cromatográficas acopladas a técnicas espectroscópicas (selectiva), algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Técnicas analíticas utilizadas para la cuantificación de aceites esenciales en sistemas de liberación.

Aceite esencial	Formulación	Técnica analítica	Referencia
<i>Carapa guianensis</i>	micropartículas de poly(hidroxibutirato- <i>co</i> -hidroxivalerato)	Espectroscopía de <i>UV/Vis</i>	(Senhorini <i>et al.</i> , 2012)
<i>Lippia sidoides</i>	micropartículas de quitosano con goma de marañón	Espectroscopía de <i>UV/Vis</i>	(Paula <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lavandula hybrida</i>	liposomas de lecitina de soya y colesterol	<i>CG-MS*</i>	(Varona <i>et al.</i> , 2009)
<i>Origanum vulgare</i> y <i>Syzygium aromaticum</i>	micropartículas de almidón de maíz	<i>TGA**</i>	(Glenn <i>et al.</i> , 2010)
<i>Jassminum spp.</i>	nanocápsulas de gelatina y goma arábiga	<i>HS-SPME***</i> con <i>CG-MS*</i>	(Lv <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lippia sidoides</i>	nanogel de quitosano con goma de marañón	<i>UV/Vis</i>	(Abreu <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. nardus</i> , <i>O. americanum</i> y <i>Vetiveria zizanioides</i>	Nanoemulsión	<i>HS-CG-MS*</i>	(Nuchuchua <i>et al.</i> , 2009)
<i>Zanthoxylum limonella</i>	micropartículas de gelatina y glutaralehído	Gravimetría	(Maji <i>et al.</i> , 2007)
<i>C. nardus</i>	Micropartículas	<i>CG-MS*</i>	(Solomon <i>et al.</i> , 2012)
<i>Allium sativum</i>	Nanopartículas	<i>CG-MS*</i>	(Yang <i>et al.</i> , 2009)

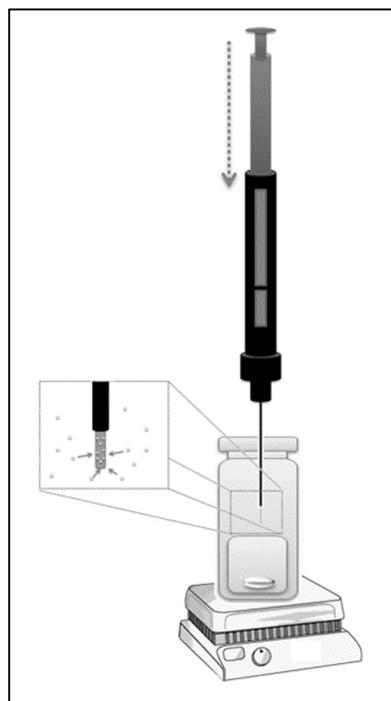
\**CG-MS*: Cromatografía de gases con identificación por espectrometría de masas.

\*\**TGA*: Análisis termogravimétrico.

\*\*\**HS-SPME*: Microextracción en fase sólida en modo de *headspace*

Cabe mencionar que es fundamental la determinación de la composición y cuantificación del contenido de los compuestos con actividad biológica que se incorporaron en las NP. Tal información es indispensable, ya que, hay que tenerla en cuenta para calcular las dosis, en este caso en las pruebas biológicas de repelencia, actividad insecticida y toxicidad.

Específicamente, al ser una mezcla de compuestos, para los aceites esenciales es necesario el uso de técnicas selectivas como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) o la Cromatografía de gases (CG). Adicionalmente, por tratarse de analitos volátiles podemos mejorar la sensibilidad del método analítico usando técnicas de preparación de muestras como, por ejemplo, la microextracción en fase sólida en modo de *headspace* (*HS-SPME*), la cual se basa en el uso de una fibra de sílice recubierta (Figura 4) de materiales de diferentes polaridades. La fibra se expone en el *headspace* de un vial que contiene a los analitos en fase gaseosa, los cuales se adsorben a la fibra. Posteriormente, los analitos se desorben en el inyector del *CG* a una temperatura adecuada para llevarse a cabo el análisis (Bicchi *et al.*, 2000).



**Figura 4.** Técnica de *HS-SPME*

Esta técnica es muy eficiente, sensible, específica, rápida y, además, al analizar el *headspace* se elimina el efecto matriz y posibles contaminaciones de la fase líquida. Por lo que, es ideal para el análisis de los compuestos volátiles de los aceites esenciales (Pawliszyn, 1997; Bicchi *et al.*, 2008).

## JUSTIFICACIÓN

Debido a su gran biodiversidad, en México existe una amplia gama de insectos vectores de enfermedades que afectan a los humanos y que aún presentan una importante prevalencia, destacándose entre ellas el paludismo, el dengue, la leishmaniasis, la oncocercosis y la tripanosomiasis americana conocida como enfermedad de Chagas (OMS, 2013). En los últimos años, se ha incrementado notablemente el número de casos de enfermedades transmitidas por *Ae. aegypti*, como son dengue, fiebre amarilla, Chikungunya y Zika (WHO, 2015), lo cual se debe, entre otras cosas a la falta de tratamientos eficaces, la resistencia que han desarrollado los insectos hacia los insecticidas y repelentes sintéticos, y a los cambios climáticos (Tabanca *et al.*, 2012; LaDeau *et al.*, 2015; Auysawasdi *et al.*, 2016; Younoussa *et al.*, 2016; WHO, 2017b). Aunque existen diversas medidas de control para estos vectores, que hasta hace algunos años eran efectivas, algunas se basan en productos nocivos para el medio ambiente (insecticidas sintéticos). En este contexto, es prioritario encontrar alternativas menos contaminantes y más efectivas que permitan el control de insectos vectores de importancia médica (SSA, 2001; Silva *et al.*, 2008; Nenaah y Ibrahim, 2011; Lee y Ahn, 2013).

Los productos naturales, como los aceites esenciales, han surgido como una alternativa “amigable” al medio ambiente para ser utilizados como insecticidas y repelentes efectivos, ya que son de fácil obtención y presentan baja toxicidad para organismos no blanco (Kostić *et al.*, 2008; Koul *et al.*, 2008; Nerio *et al.*, 2010). Sin embargo, al ser sus componentes activos inestables en condiciones ambientales (Lai *et al.*, 2006), su aplicación puede verse limitada. Esto puede ser superado al incorporar a los aceites esenciales en NP, las cuales han demostrado que pueden funcionar como acarreadores de compuestos activos biológicos, mejorando su biodisponibilidad y su actividad en el sustrato biológico blanco.

En base a lo anterior, en el presente trabajo se propone la incorporación de aceite esencial de albahaca (*O. basilicum*) y pirul (*S. molle*) en nanopartículas poliméricas con la finalidad de mejorar sus aplicaciones como bioinsecticidas y/o repelentes contra *Ae. aegypti*.

## HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de *S. molle* y *O. basilicum* tienen actividad insecticida y/o repelente contra *Ae. aegypti*; así también sus encapsulados (NP) mejoran su aplicación al liberarlos controladamente.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Desarrollar formulaciones a base de NP cargadas con aceites esenciales de *S. molle* y *O. basilicum* y evaluar su actividad insecticida y/o repelente contra *Ae. aegypti*.

### Objetivos Específicos

1. Determinar las características físicas y químicas del aceite esencial de *S. molle* y *O. basilicum* obtenido por hidrodestilación.
2. Optimizar y validar un método analítico por cromatografía de gases con microextracción en fase sólida para la cuantificación de los componentes de los aceites esenciales de *S. molle* y *O. basilicum* encapsulados en NP.
3. Obtener formulaciones de NP cargadas con los aceites esenciales de *S. molle* y *O. basilicum* con eficiencia de encapsulación mayor al 20% para aplicarlas como formulados insecticidas o repelentes.
4. Evaluar la actividad y efectividad insecticida y/o repelente *in vivo* de las NP cargadas con los aceites esenciales contra *Ae. aegypti*.
5. Evaluar la toxicidad de las formulaciones de NP cargadas con los aceites esenciales libre contra *A. salina*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Materiales

#### *Material biológico*

Especies vegetales en prueba:

- Ramas del árbol de *S. molle* (Pirul) colectadas en el municipio de Arteaga, Coahuila, México.
- Planta de *O. basilicum* (Albahaca) del Mercado Juárez, en Monterrey, México (Colectada en Matehuala, SLP).

Especies usadas en modelo biológico

- *Ae. aegypti* (larvas del tercer estadio y adultos) de tipo Rockefeller.
- *A. salina* (huevos).

### Métodos

#### *Obtención y caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales*

##### *Obtención de los aceites esenciales*

Las hojas de *O. basilicum* y *S. molle* fueron cortadas en trozos pequeños (menores a 1 cm<sup>2</sup>). Los frutos de *S. molle* fueron molidos en un procesador de alimentos. Se colocaron en un equipo Clevenger modificado durante 4 h.

Los aceites fueron guardados en viales de vidrio ámbar a 0°C. El rendimiento de extracción de cada aceite se calculó de acuerdo a la Ecuación 1.

$$\%Rendimiento = \left( \frac{Peso\ del\ aceite\ esencial}{Peso\ de\ la\ planta} \right) * 100 \quad (1)$$

### *Caracterización química*

Para identificar los componentes de los aceites esenciales, se utilizó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N (St. Clara, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas selectivo, 5973 INERT (HP5MS), con una columna capilar Elite-5 (30m x 0.25mm x 0.2 $\mu$ m). La temperatura de la fuente de ionización fue de 230°C, la temperatura del cuadrupolo fue de 150°C y la temperatura del inyector 220°C. Para cada corrida, el programa de temperatura del horno del CG fue: 35°C por 9 min, incrementando 3°C /min hasta 150°C por 10 min; después se incrementó 10°C /min hasta 250°C y, finalmente, se incrementó 3°C /min hasta 270°C por 16 min. El flujo del gas acarreador (helio, 99.9% de pureza) fue de 0.5 mL/min. La energía de ionización fue de 70 eV. Las muestras fueron inyectadas en modo *splitless* y el EM fue empleado en modo de barrido. Los componentes de los aceites esenciales fueron identificados por comparación de sus índices de retención relativos con los *n* alkanos C8–C20 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) y por comparación de su espectro de masas con los datos de referencia de la librería *US National Institute of Standards and Technology* (NIST) y en la literatura (Adams, 2007). Para el análisis cuantitativo, se utilizó un cromatógrafo de gases con detección de ionización de flama (CG-FID) (Clarus 480 GC, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) con una columna capilar Elite-5 (30m x 0.25mm x 0.2 $\mu$ m) con el mismo programa de temperatura del horno y mismo flujo del gas acarreador anteriormente mencionado. La composición porcentual por CG-FID de cada componente, se analizó por el método de normalización de áreas.

Para cuantificar los componentes del aceite esencial de *S. molle* por Cromatografía de gases con detector de ionización en flama (CG-FID) con inyección directa, se utilizaron las condiciones cromatográficas previamente establecidas por Guerra-Boone L. (Guerra-Boone, 2011). Donde el programa del horno inició a 60 °C durante 1 min, después se calentó hasta 120 °C (a 8 °C/min) y se mantuvo durante 1min, posteriormente se elevó a 150 °C (a 25 °C/min) y se mantuvo por 1 min, para finalmente aumentar hasta 250°C (8 °C/min) y esperar 1 min. La temperatura del inyector fue de 280 °C en modo *Split* (1:20). La temperatura del detector *FID* fue de 280°C. Para el aceite esencial de *O. basilicum*, el programa del horno inició a 50 °C, después se calentó hasta 117 °C (a 6 °C/min) y se mantuvo durante 1 min. Posteriormente, se elevó a 119 °C (a 0.5 °C/min), y a 280 °C (45

°C/min), manteniéndose después por 1 min. La temperatura del inyector fue de 270 °C en modo *Split* (1:20). La temperatura del detector *FID* fue de 250°C. Para ambos métodos se usó el helio como gas acarreador, con un flujo de 2 mL/min y con una pureza del 99.9%.

Finalmente, se seleccionaron tres componentes de seguimiento en base a su área y actividad biológica para ser monitoreados en las formulaciones de NP. Se estableció la proporción de cada uno de ellos en base a la normalización de las áreas de los tres componentes.

#### *Caracterización física*

##### Índice de refracción

Para obtener el índice de refracción se empleó un refractómetro Anton Paar y se realizó en base a la ficha MGA 0741 de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Previo a la determinación, el equipo fue calibrado con agua destilada a 25°C. La evaluación se realizó por triplicado y se utilizó el anetol como control (SSA, 2004b).

##### Rotación óptica

Se realizó en base a la ficha MG 0771 de la FEUM con un polarímetro 341 Perkin Elmer. Previo a la determinación, el equipo fue calibrado a 25°C con una solución de sacarosa de 260 mg/mL. La evaluación del aceite esencial se realizó por sextuplicado. Se utilizó el anetol como control (SSA, 2004c).

##### Densidad relativa

Se realizó en base a la ficha MG 0251 de la FEUM con un picnómetro de 1 mL. La evaluación se realizó por triplicado usando la Ecuación 2. Se utilizó el anetol como control (SSA, 2004a).

$$D.R. = \frac{D}{C} \quad (2)$$

Donde:

D.R. = densidad relativa de la muestra (g/mL)

D = peso de la muestra en gramos y

C = peso del agua en gramos medida en la calibración

### ***Desarrollo del método con Microextracción en fase sólida en modo headspace (HS-SPME) por cromatografía de gases (CG-FID)***

Se desarrollo un método analítico de *CG* con *HS-SPME* para cuantificar los tres componentes del aceite esencial en las formulaciones de NP

#### ***Selección de la fibra de SPME***

Para seleccionar la fibra de SPME, se evaluaron cuatro fibras de diferente polaridad y espesor del recubrimiento. Se eligió la fibra que permitiera la mejor extracción de los componentes de seguimiento de cada aceite esencial de forma reproducible.

Para los experimentos de *HS-SPME* se utilizó una solución de estándares de los tres componentes seleccionados y las condiciones experimentales establecidas por Rodríguez-Lafuente A. (2009) (Tabla 3). El análisis por *CG-FID* se realizó usando el método cromatográfico previamente optimizado.

**Tabla 3.** Parámetros iniciales utilizados en la técnica de *HS-SPME*.

Parámetro	Condiciones
<i>HS</i> : muestra	1:1
Velocidad de agitación	250 rpm
Temperatura	55 °C
Tiempo de equilibrio	10 min
Extracción	10 min

#### ***Optimización del método de extracción por HS-SPME***

Con la finalidad de optimizar el método de extracción por *HS-SPME*, se estableció un diseño experimental de Plackett Burman (Anexo I). Se establecieron ocho experimentos con la combinación ordenada de siete variables a niveles altos y bajos. Las variables evaluadas se presentan en la Tabla 4. Se analizaron por duplicado, soluciones de cada aceite esencial (10 µg/mL). La respuesta de cada una de las variables fue el área de los picos obtenidos con el método cromatográfico previamente optimizado. Para establecer el efecto de cada variable sobre la respuesta, se obtuvieron las diferencias entre los promedios de las respuestas de los niveles bajos y los altos de cada variable. Cuanto menor sea la diferencia, menor será la influencia de esa variable sobre la respuesta.

**Tabla 4.** Variables utilizadas en el diseño experimental de Plackett-Burman para la optimización de la extracción por *HS-SPME*.

Variables	Nivel	
	Alto	Bajo
Polímero (µg/mL)	150	84
A,a		
Agitación (rpm)	350	250
B,b		
Distancia de fibra (cm)	1.0	0.5
C,c		
Tiempo de equilibrio (min)	15	5
D,d		
Temperatura de extracción (°C)	70	55
E,e		
Tiempo de extracción (min)	15	5
F,f		
Volumen de headspace (mL)	3	4
G,g		

#### ***Validación del método analítico para cuantificar los aceites esenciales en NP***

Para validar los métodos, se evaluó los parámetros de validación en base a los criterios de validación de métodos fisicoquímicos expedidos por la comisión de control analítico y ampliación de cobertura de la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058). Para ello, fueron determinados linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, exactitud y robustez (SSA, 2011).

#### ***Validación del sistema***

##### **Linealidad**

La linealidad se determinó por la construcción de una curva de calibración con 5 niveles de concentración por triplicado. Se prepararon mezclas de los estándares de los componentes de seguimiento previamente seleccionados. Los niveles de concentración total de los estándares fueron: 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL. Los 15 estándares fueron sometieron al procedimiento de SPME-HS previamente establecido. Con los datos obtenidos, se

graficó la respuesta cromatográfica (área) en función de la concentración y se realizó un análisis de regresión lineal.

Los criterios de linealidad determinados para la curva de calibración fueron:

- *Coeficiente de correlación (r)*: para estimar la bondad con que se ajustan los puntos experimentales en una línea recta. Entre más cercano a 1 indica una mayor correlación lineal de la concentración con la respuesta cromatográfica. El coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99 (Secretaría de Salud, CCAYAC-P-058, 2011).
- *Coeficiente de determinación ( $r^2$ )*: es el cuadrado del coeficiente de correlación y nos indica la variación de la respuesta cromatográfica respecto a la variación de la concentración. El coeficiente de determinación debe ser mayor a 0.99 (Secretaría de Salud, CCAYAC-P-058, 2011).

#### Límite de detección

Para determinar el límite de detección del sistema se utilizaron los valores obtenidos en la curva de calibración.

La pendiente y la ordenada al origen se obtuvieron a partir del análisis de regresión. Primero, se estimaron los errores aleatorios en la dirección calculando el estadístico  $S_{y/x}$  con la siguiente ecuación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad (3)$$

Donde:

$\hat{y}_i$  = valor de la respuesta calculada  
 $y_i$  = valor de la respuesta  
 $n$  = número de mediciones

Después, se determinó la desviación estándar de la ordenada al origen (Sa)

$$S_a = \frac{S_y}{x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4)$$

Donde:

Sa = desviación estándar de la ordenada al origen

$\bar{x}$  = media

$x_i$  = valor de cada medición

n = número de mediciones

Para finalmente, estimar el límite de detección con la siguiente ecuación:

$$LDD = \frac{3.3 * S_a}{m} \quad (5)$$

Donde:

LDD = límite de detección

Sa = desviación estándar de la ordenada al origen

m = pendiente de la curva de calibración

### Límite de cuantificación

Para determinar el límite de cuantificación, se utilizaron los valores obtenidos en la curva de calibración. La pendiente y la ordenada al origen se obtuvieron a partir del análisis de regresión. Primero, se estimaron los errores aleatorios en la dirección calculando el estadístico  $S_y/x$  con la Ecuación 3. Despues, se determinó la desviación estándar de la ordenada al origen (Sa) con la Ecuación 4. Para finalmente, estimar el límite de cuantificación con la siguiente ecuación:

$$LDQ = \frac{10 * S_a}{m} \quad (6)$$

Donde:

LDQ = límite de cuantificación

Sa = desviación estándar de la ordenada al origen

m = pendiente de la curva de calibración

## Precisión

### *Repetibilidad*

La repetibilidad se determinó usando 3 niveles de concentración por sextuplicado. Se prepararon mezclas de los estándares de los componentes en la proporción previamente establecida.

Los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 6 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , se analizaron el mismo día y por el mismo analista. Se calcularon los porcentajes de recuperación por medio de la ecuación de la recta obtenida en la linealidad. Posteriormente, se calculó:

### Media ( $\bar{x}$ )

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (7)$$

Donde:

$\bar{x}$  = media

$x_i$  = valor de cada medición

$n$  = número de mediciones

### Desviación estándar (s)

$$s = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}} \quad (8)$$

Donde:

$s$  = desviación estándar

$\bar{x}$  = media

$x_i$  = valor de cada medición

$n$  = número de mediciones

### El coeficiente de variación o desviación estándar relativa (CV o DER)

$$\text{DER} = 100 s / \bar{x} \quad (9)$$

Donde:

DER = desviación estándar relativa

$s$  = desviación estándar

$\bar{x}$  = media

### *Precisión Intermedia*

La repetibilidad se determinó usando 3 niveles de concentración por sextuplicado. Se prepararon mezclas de los estándares seleccionados en la proporción previamente establecida. Los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 6 y 10 µg/mL y se analizaron por el mismo analista, el mismo día, en 3 días no consecutivos. Los estándares se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido. Se calcularon los porcentajes de recuperación por medio de la ecuación de la recta obtenida en la linealidad. Posteriormente, se calculó: la media ( $\bar{x}$ ) con la Ecuación 7, la desviación estándar (s) con la Ecuación 8, y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (CV o DER) con la Ecuación 9.

### *Validación del método*

Para la validación del método con *HS-SPME*, se usaron muestras (NP cargadas con aceite esencial) adicionadas con estándares de los componentes del aceite esencial en la proporción previamente establecida.

### *Exactitud*

La exactitud se determinó usando 5 niveles de concentración por triplicado. La concentración total de los estándares fueron 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL (en la proporción previamente establecida) y se adicionaron a la muestra. Los estándares se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido.

Posteriormente, se calculó el porcentaje de recobro (%R):

$$\%R = \left( \frac{Ca-CU}{CA} \right) * 100 \quad (10)$$

Donde:

Ca = concentración del analito medida en la muestra adicionada  
CU = concentración del analito medida en la muestra sin adicionar  
CA = concentración del analito añadido

## Precisión

### *Repetibilidad*

La repetibilidad se determinó usando 3 niveles de concentración por sextuplicado. Se prepararon mezclas de los estándares seleccionados en la proporción previamente establecida. Los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 6 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , los cuales fueron adicionados a la muestra. Se analizaron el mismo día y por el mismo analista. Las muestras adicionadas se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido.

Posteriormente, se calculó: la media ( $\bar{x}$ ) con la Ecuación 7, la desviación estándar (s) con la Ecuación 8, y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (CV o DER) con la Ecuación 9. Finalmente, se calcularon los porcentajes de recuperación de acuerdo a la Ecuación 10.

### *Precisión Intermedia*

La repetibilidad se determinó usando 3 niveles de concentración por sextuplicado. Se prepararon mezclas de los estándares seleccionados en la proporción previamente establecida. Los niveles de concentración total de los estándares fueron 2, 6, y 10  $\mu\text{g/mL}$ , los cuales se adicionaron a la muestra. Se analizaron por el mismo analista el mismo día, en 3 días no consecutivos. Los estándares se sometieron al procedimiento de extracción previamente establecido.

Posteriormente, se calculó: la media ( $\bar{x}$ ) con la Ecuación 7, la desviación estándar (s) con la Ecuación 8, y el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (CV o DER) con la Ecuación 9. Finalmente, se calcularon los porcentajes de recuperación de acuerdo a la Ecuación 10.

## Robustez

Para evaluar que tan robusto era el método por *HS-SPME* desarrollado, fue usado un diseño experimental de Plackett Burman, planteando 8 experimentos con la combinación ordenada de 7 variables a niveles altos y bajos (Tabla 5). En el Anexo I se puede observar

la matriz de experimentos utilizada. Cabe mencionar que cada experimento fue realizado por duplicado, a una concentración de 6  $\mu\text{g/mL}$  de la mezcla de estándares adicionado a la muestra. La respuesta de cada una de las variables fue el área de los picos cromatográficos obtenidos con el programa de temperatura previamente optimizado.

Para establecer el efecto de cada variable sobre la respuesta, se obtuvieron las diferencias entre los promedios de los niveles bajos y los altos de cada variable. Cuanto menor sea la diferencia, menor será la influencia de esa variable sobre la respuesta. Si cualquiera de estas diferencias entre los promedios de los subgrupos de cada variable es mayor que  $2^{1/2}\text{s}$ , entonces esa variable tendrá una influencia significativa sobre el método.

**Tabla 5.** Variables utilizadas en el diseño experimental de Plackett-Burman para la optimización de la extracción por *HS-SPME* en la evaluación de la robustez.

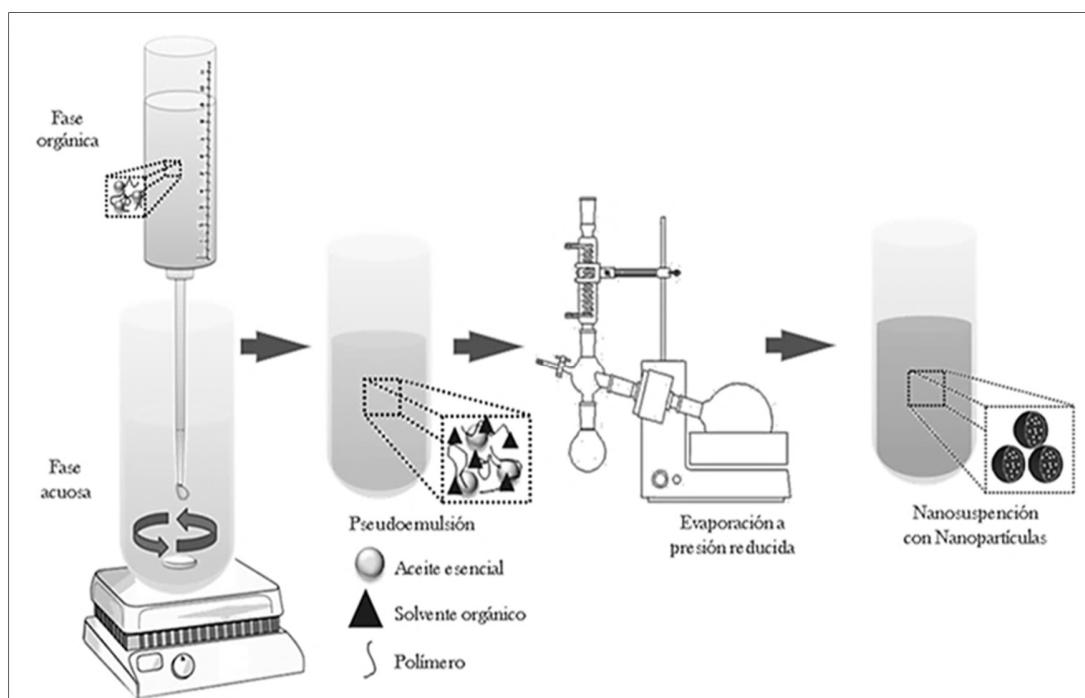
Variables	Nivel	
	Alto	Bajo
Presión de gas acarreador, He (psi)	8.5	8.7
A,a		
Distancia de fibra de <i>SPME</i> sobre muestra (cm)	0.4	0.6
B,b		
Volumen de <i>headspace</i> (mL)	3.1	2.9
C,c		
Temperatura de la muestra ( $^{\circ}\text{C}$ )	69	54
D,d		
Placa de agitación	Nueva	Vieja
E,e		
Split	1:19.9	1:20.1
F,f		
Inmersión del vial en el baño María	1 cm afuera	Totalmente
G,g		

## Obtención y caracterización de las formulaciones de nanopartículas

### *Obtención de las nanopartículas*

Las NP se obtuvieron por la técnica de nanoprecipitación (Fessi *et al.*, 1989). Se incorporó la fase orgánica que contenía el solvente orgánico, polímero y el aceite esencial, a una fase

acuosa con tensoactivo, con agitación constante. Una vez formadas las NP, se eliminó el solvente orgánico por evaporación a presión reducida obteniendo finalmente una dispersión acuosa de NP purificadas. En la Figura 5, se muestra el procedimiento para la obtención de NP.



**Figura 5.** Técnica de nanoprecipitación para la obtención de NP cargadas con aceites esenciales.

Con el fin de optimizar la obtención de NP cargadas con los aceites esenciales, se modificaron las siguientes variables en las formulaciones: la cantidad de aceite esencial (mg), el tipo de solvente (acetona y metanol), el tipo de polímero (Eudragit L100-55, Eudragit S100, Eudragit L100 y Quitosano), la cantidad de polímero (mg), el tipo de tensoactivo (PVA, Poloxamer y Tween 80), la cantidad de tensoactivo (mg) y los volúmenes de las fases acuosa y orgánica. Este procedimiento se utilizó en las formulaciones de NP preparadas con Eudragit® y Poloxamer como formadores de las nanocápsulas. Por su parte, para la obtención de NP de quitosano se adicionó un paso, en el que una solución de entrecruzamiento (TPP 1 mg/mL de agua) fue añadida para

estabilizar la formulación. Para seleccionar la mejor formulación de NP se evaluó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad.

### ***Caracterización de las nanopartículas***

#### ***Tamaño de partícula y potencial Z***

A las NP cargadas con los aceites esenciales se les midió el tamaño, por espectroscopía de correlación fotónica, y el potencial Z, por microelectroforesis con láser Doppler con un Zetasizer Nanoseries, Nano-Zs90 (Malvern Instruments).

#### ***Contenido de aceite esencial en NP***

Las NP cargadas con los aceites se centrifugaron a 25,000 rpm durante 2 horas en una Ultracentrífuga Allegra™, obteniendo una pastilla y un sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en agua, analizándola por el método validado con *HS-SPME* por *CG*. Posteriormente, se calcularon los porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación con las siguientes ecuaciones:

$$\%E = \left( \frac{A_t - A_n}{P + A_t} \right) * 100 \quad (11)$$

Donde:

%E = porcentaje de encapsulación

A<sub>t</sub> = gramos de aceite esencial total

A<sub>n</sub> = gramos de aceite esencial no encapsulado

P = gramos de polímero

$$\%EE = \left( \frac{A_t - A_n}{A_t} \right) * 100 \quad (12)$$

Donde:

%EE = porcentaje de la eficiencia de encapsulación

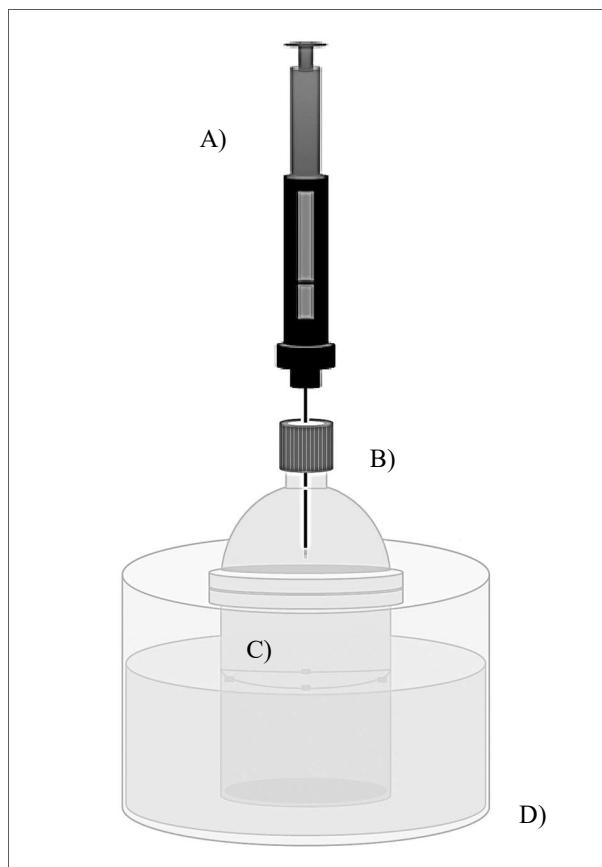
A<sub>t</sub> = gramos de aceite esencial total

A<sub>n</sub> = gramos de aceite esencial no encapsulado

#### ***Estudio de liberación de aceites esenciales en atmósfera controlada***

Con la finalidad de evaluar la persistencia de los aceites esenciales (libres y nanoencapsulados) en una superficie después de ser aplicados, se diseñó un dispositivo

para determinar la liberación del aceite esencial desde la superficie de aplicación a la atmósfera (Figura 6).



**Figura 6.** Dispositivo diseñado para la evaluación de la liberación de los aceites esenciales en una atmósfera controlada. A) Fibra de SPME, B) Recipiente con una atmósfera controlada, C) Base para muestra y C) Baño de agua para el control de la temperatura.

#### *Análisis de las NP por FT-IR*

Para obtener los espectros de FT-IR, se utilizaron las formulaciones de NP sin aceite esencial (NP blanco) y NP con aceite esencial liofilizadas por 12 h. Posteriormente cada formulación fue colocada en el prisma del ATR del espectrómetro FT-IR, (Perkin Elmer) y se obtuvieron los espectros de IR. Además, se evaluaron los componentes de los aceites esenciales previamente establecidos.

## **Evaluación las actividades biológicas de los aceites esenciales libres y en NP.**

### ***Obtención de nanoemulsiones con aceites esenciales***

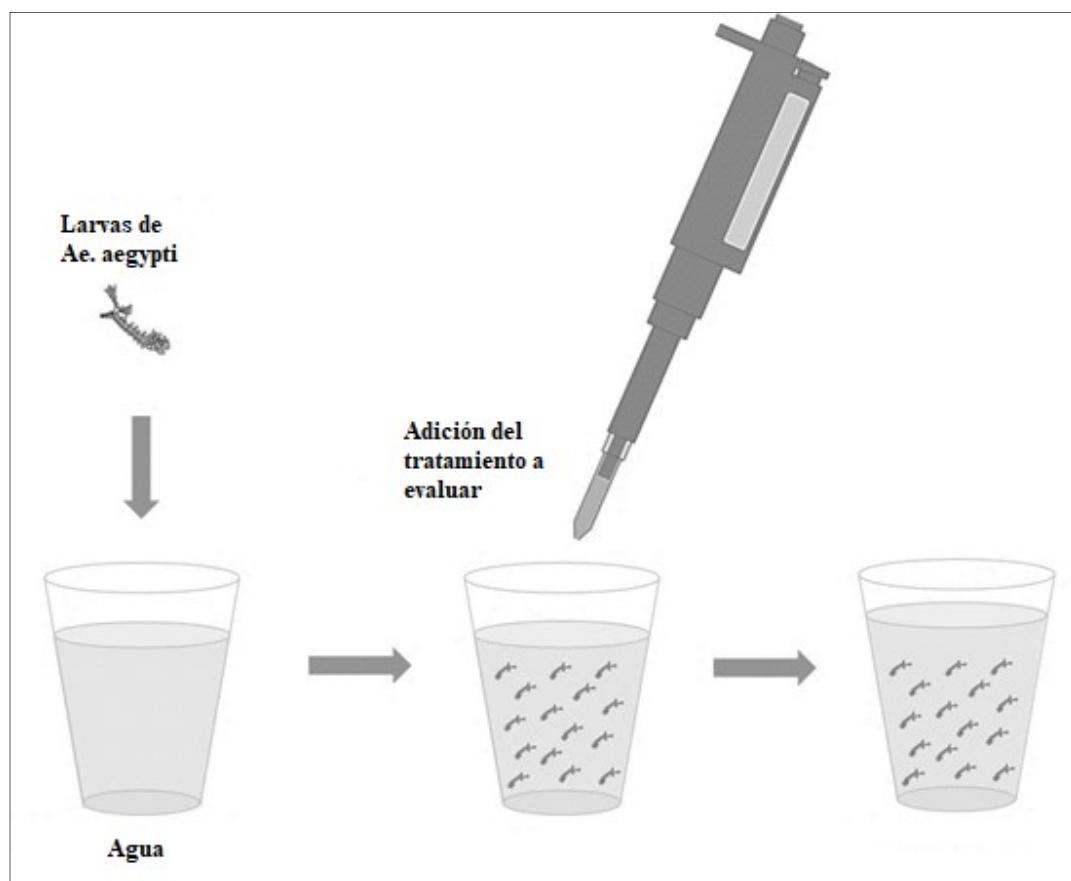
Con el fin de evaluar la actividad larvicida contra *Ae. aegypti* de los aceites esenciales, sin usar solventes orgánicos, se prepararon nanoemulsiones (NE) para cada aceite esencial (4 mg/mL). Las NE fueron obtenidas emulsionando cada aceite con una solución acuosa de Poloxamer (0.4% v/v) con un homogenizador a 13,000 rpm. Posteriormente, se determinó su tamaño y potencial Z por espectroscopía de correlación fotónica.

### ***Actividad insecticida (larvicida) de los aceites esenciales libres y en NP contra Aedes aegypti***

Fue evaluada la actividad larvicida de cada aceite esencial libre (NE) y encapsulado en las NP. El Laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias Biológicas (UANL) proporcionó una cepa de *Ae. aegypti* susceptible (Rockefeller). Los huevecillos de esta especie de mosquito eclosionaron a las 12 h en agua, posteriormente, las larvas fueron alimentadas con hígado liofilizado.

Para el ensayo de actividad larvicida fueron utilizadas larvas del tercer estadío de acuerdo por lo indicado por la (WHO, 1981). Cada repetición fue hecha con 15 larvas, las cuales fueron puestas en un volumen final de agua con los tratamientos de 100 mL a 25°C (Figura 7.).

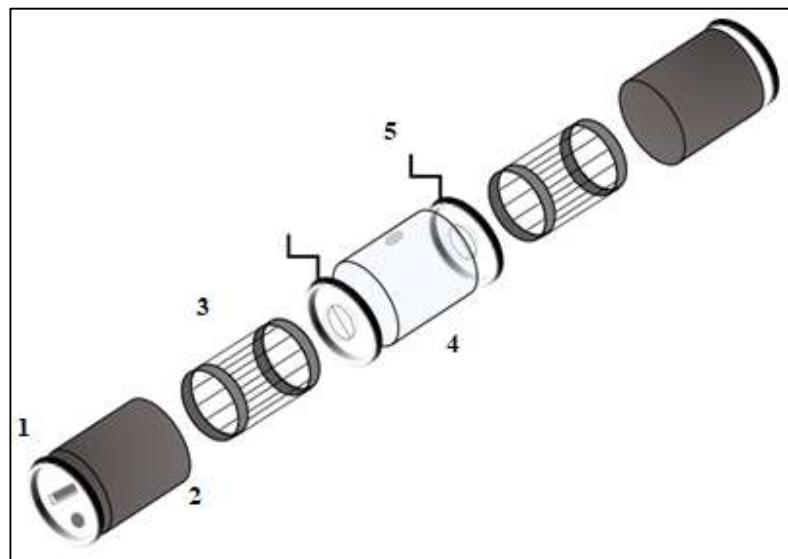
Fueron evaluadas diferentes concentraciones de aceites esenciales libres y encapsulados en NP (10, 30, 50, 70, 90, 110, 130 y 150 ppm) por triplicado y como control fue usado el tensoactivo y el agua. Las larvas fueron observadas después de 24 h y se registró la mortalidad. Los datos de mortalidad de larvas se sometieron a un análisis PROBIT para el cálculo de la DL<sub>50</sub> y los límites de confianza del 95% (superior e inferior). Estos datos se calcularon utilizando el software SPSS v20.0. Los resultados con p <0.05 se consideraron estadísticamente significativos.



**Figura 7.** Evaluación de la actividad larvicida con larvas de *Ae. aegypti* .

#### **Actividad repelente espacial de los aceites esenciales libres y en NP contra *Ae. aegypti***

La actividad repelente fue evaluada por medio del sistema HITSS (Sistema de Investigación de Alto-rendimiento de Procesamiento), el cual es un sistema modular que cuenta con 3 cilindros. Dos de ellos son metálicos con un soporte para el tratamiento, y uno de acrílico (Figura 8). El ensayo fue hecho con hembras de *Ae. aegypti* de 2 a 4 días de edad. Fueron utilizadas 15 hembras por dosis de acuerdo a lo reportado por (Grieco *et al.*, 2005). Se aplicó a una concentración de 250, 750 y 1,500 ppm. Se utilizaron telas de algodón delgadas ( $275 \text{ cm}^2$ ), las cuales fueron impregnadas de forma homogénea con 3 mL de cada tratamiento 15 min. previos a la evaluación.



**Figura 8.** Sistema HITSS para el ensayo de repelencia espacial de mosquitos. 1) Tapa con ventanillas, 2) Cilindro de metal (cámara sin luz), 3) Soporte para tratamiento, 4) Cilindro de acrílico (cámara con luz) y 5) Válvula de mariposa.

En el soporte de uno de los cilindros metálicos se puso la tela tratada, mientras que en el otro se puso la tela control (solo con acetato de etilo). Posteriormente, fueron ensamblados al cilindro de acrílico (transparente) por medio de las uniones con válvulas de mariposa. Los cilindros metálicos fueron tapados con las tapas con ventanillas. Después, teniendo las válvulas mariposa cerradas, los mosquitos fueron transferidos al cilindro de acrílico, el cuál fue cubierto totalmente con una tela negra para no dejar pasar la luz. Las ventanillas quedaron sin cubrir, con la finalidad de que la luz sirviera como atractivo para los mosquitos en los extremos del sistema. Posteriormente, a los 30 s las válvulas de mariposa fueron abiertas durante 10 min, y posteriormente cerradas. Los mosquitos que se quedaron en cada compartimiento fueron contados. Cada una de las pruebas, con los tratamientos evaluados y con los controles, se llevaron a cabo por sextuplicado.

El índice de actividad espacial varía de -1 a 1. El 0 indica que no hay respuesta. Los compuestos con un índice arriba de +0.3 se consideran como repulsivos, mientras que con -0.3 y debajo de ésta se considera como atractantes.

### ***Toxicidad de los aceites esenciales libres y en NP contra A. salina***

Los huevos de *A. salina* se incubaron a  $28\pm1$  °C en solución salina con pH=7.5 y oxigenación. Los nauplios eclosionados fueron utilizados después de 24 h. En placas de 96 pozos se colocaron 10 nauplios con cada tratamiento (por triplicado) y fueron observados después de 24 h. En el grupo control, las larvas se incubaron en solución salina.

Con los datos obtenidos, se realizó un análisis PROBIT para determinar la DL<sub>50</sub> y los límites de confianza del 95%, superior e inferior. Estos datos se calcularon utilizando el software SPSS v20.0. Los resultados con  $p <0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas son fuente de nuevos compuestos o grupos de compuestos con diversas actividades biológicas, por lo que cada vez hay más estudios acerca de ellas como alternativas a tratamientos tradicionales. El interés en este trabajo fue el uso de los productos obtenidos de plantas (aceites esenciales) para el control de insectos vectores de enfermedades. El uso de estos productos puede ser benéfico debido a que generalmente son menos tóxicos hacia organismos no blanco en comparación con los insecticidas o repelentes sintéticos (Kostić *et al.*, 2008; Koul *et al.*, 2008). Además, en base a que los aceites esenciales son una mezcla de componentes con diferentes grupos químicos, los insectos no desarrollarían resistencia a estos o tardarían más en presentarla (Koul *et al.*, 2008).

Se han reportado distintas actividades biológicas contra insectos. Por ejemplo, los aceites esenciales de clavo de olor, hierba de limón y hierba de citronela tuvieron actividad repelente contra *Ae. aegypti* y *C. quinquefasciatus* (Sritabutra y Soonwera, 2013), así como el de *Rosmarinus officinalis*, *Cinnamomum zeylanicum* y *O. basilicum* contra *Ae. aegypti* (Prajapati *et al.*, 2005). Por otro lado, fue reportada la actividad larvicida del aceite esencial de *Mentha x villosa* ( $DL_{50} = 45.0$  ppm) (Lima *et al.*, 2014), del aceite esencial de las hojas y frutos de *S. molle* ( $DL_{50}$  de 9.6 a 14.5 ppm) (Massebo *et al.*, 2009) y del aceite esencial de *O. basilicum* ( $DL_{50} = 11.4$  ppm) (Govindarajan *et al.*, 2013) contra *Ae. aegypti*. Estos aceites se han utilizado tradicionalmente para el control de insectos (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2010; González *et al.*, 2011).

Para este trabajo se eligió evaluar las actividades insecticidas y repelentes de los aceites esenciales de *S. molle* (frutos y hojas) y de *O. basilicum*, tanto en su forma libre como formulados en NP.

### Obtención y caracterización fisicoquímica de los aceites esenciales

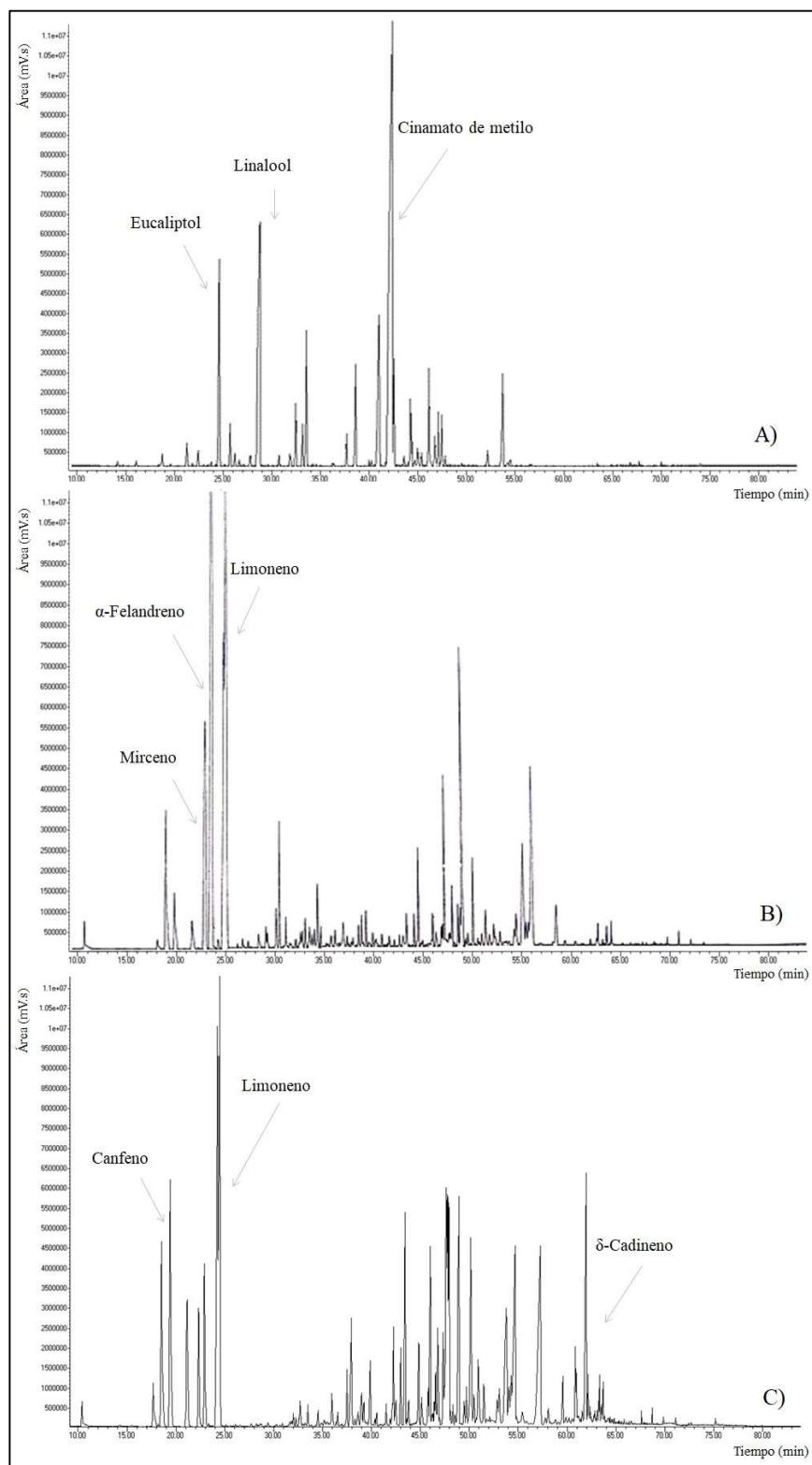
Inicialmente, los aceites esenciales de las hojas y frutos de *S. molle*, y de las hojas de *O. basilicum*, fueron obtenidos por medio de la técnica de hidrodestilación con un equipo

Clevenger modificado. Posteriormente, se calcularon los rendimientos de extracción para cada aceite. Específicamente, para el aceite esencial de las hojas de *S. molle* se presentó un rendimiento de 0.75%, mientras que para los frutos fue de 2.0%. Por otro lado, para el aceite de *O. basilicum* el rendimiento fue de solamente 0.2%.

Los rendimientos obtenidos concuerdan con lo reportado para las mismas plantas, donde previamente se obtuvieron rendimientos del 0.1 al 0.3% para el aceite esencial de *O. basilicum* en diferentes épocas del año (Al-Maskri *et al.*, 2011), mientras que para el aceite esencial de *S. molle* fue del 2.1% (Belhamel *et al.*, 2008).

Los rendimientos de extracción pueden variar dependiendo de la planta, inclusive entre la misma especie y en la misma región. Comúnmente, para los aceites esenciales, son reportados rendimientos de extracción menores comparados con otros tipos de extractos de plantas como metanólicos o hexánicos. Debido a que los aceites esenciales son metabolitos secundarios, la variación en la cantidad de estos y su proporción en cada planta se debe principalmente a factores ambientales como temperatura, luz solar, minerales en el suelo, agua y hora de recolección, entre otros (Al-Maskri *et al.*, 2011), por lo que siempre habrá variaciones entre lo obtenido de diferentes plantas de la misma especie.

En una primera etapa, la caracterización química de los aceites esenciales se realizó por CG-MS. En la Figura 9 se observan los cromatogramas obtenidos para cada aceite esencial.



**Figura 9.** Cromatogramas de los aceites esenciales (2mg/mL) obtenidos por CG-MS. A) Hojas de *O. basilicum*, B) Frutos de *S. molle* y C) Hojas de *S. molle*

Posteriormente, se analizó por *CG-FID* utilizando el mismo método cromatográfico para calcular el contenido porcentual de cada uno de los componentes de los aceites esenciales. En la Tabla 6 se observan los componentes, el contenido porcentual así como la comparación de los índices de Kovats calculados con los de la literatura.

**Tabla 6.** Componentes identificados de cada aceite esencial, contenido porcentual e índices de Kovats por *CG-MS* y *CG-FID*.

Componentes	Abundancia (%)			Índice de Kovats (KI)			
	AESmH	AESmF	AEObH	Ref.*	AESmH	AESmF	AEObH
Hexenol	-	-	0.13	844	-	-	842
Tricicleno	1.27	0.12	-	921	916	919	-
$\alpha$ -Pineno	5.79	3.13	0.09	932	930	933	931
Canfeno	8.71	1.26	-	946	945	948	-
$\beta$ -Pineno	4.42	0.4	0.07	974	972	975	973
Mirceno	3.75	10.6	0.45	988	991	994	989
$\alpha$ -Felandreno	3.27	30.96	-	1002	1001	1006	-
$\alpha$ -Terpineno	-	1.48	0.14	1014	-	1017	1015
$\alpha$ -Cimeno	8.53	3.78	0.71	1022	1025	1028	1020
Limoneno	15.64	25.53	-	1024	1029	1032	-
Eucaliptol	-	-	6.16	1033	-	-	1030
$\beta$ -E-Ocimeno	-	0.04	-	1044	-	1052	-
$\gamma$ -Terpineno	-	0.05	0.14	1054	-	1061	1055
Terpinoleno	-	0.22	0.17	1086	-	1088	1089
Linalool	-	0.45	26.14	1095	-	1099	1094
Canfor	-	-	0.2	1141	-	-	1140
Borneol	-	0.01	0.48	1165	-	1166	1163
Terpin-4-ol	0.33	-	-	1174	1176	-	-
Criptona	0.42	-	-	1183	1184	-	-
$\alpha$ -Terpineol	-	-	1.7	1186	-	-	1186
cis-Piperitol	-	0.08	-	1195	-	1194	-
Metil chavicol	-	-	2.41	1195	-	-	1194
$\gamma$ -Terpineol	-	-	1.07	1199	-	-	1199
Trans-piperitol	-	0.03	-	1207	-	1207	-
Acetato de octanol	-	-	0.01	1211	-	-	1210
Piperitona	-	0.56	-	1249	-	1255	-
Acetato de fenchilo	-	-	0.05	1229	-	-	1232
Chavicol	-	-	0.04	1247	-	-	1249
Metil citronelato	-	0.04	-	1257	-	1263	-
p-Ment-1-en-7-al	-	0.11	-	1273	-	1275	-
Acetato de isobornilo	-	0.2	0.62	1283	-	1286	1285
Acetato de bornilo	0.07	-	-	1284	1285	-	-

Carvacrol	-	0.35	-	1298	-	1301	-
(Z)Cinamato de metilo	-	-	1.62	1299	-	-	1300
Geranato de metilo	-	0.18	-	1322	-	1325	-
Elemeno	-	-	0.17	1335	-	-	1340
Eugenol	-	-	5.55	1356	-	-	1356
Acetato de nerilo	-	0.07	-	1359	-	1365	-
$\alpha$ -Copaeno	0.2	0.16	-	1374	1376	1377	-
(E)Cinamato de metilo	-	-	37.51	1376	-	-	1378
$\beta$ -Elemeno	0.99	0.26	0.03	1389	1392	1392	1390
$\alpha$ -Gurjeneno	0.63	0.28	-	1409	1410	1410	-
E-Cariofileno	0.94	1.43	-	1417	1421	1420	-
$\beta$ -Cedreno	-	-	0.02	1419	-	-	1417
$\alpha$ -trans-Bergamoteno	-	-	1.26	1432	-	-	1440
$\alpha$ -Guaieno	-	-	0.32	1437	-	-	1439
cis-Muurola-3,5-dieno	-	-	0.01	1448	-	-	1449
$\alpha$ -Humuleno	-	0.26	0.49	1452	-	1455	1455
alo-Aromadendreno	-	0.33	-	1458	-	1462	
cis-Cadina-1(6),4-dieno	-	-	0.24	1475	-	-	1475
$\gamma$ -Muroleno	-	0.23	1.07	1478	-	1478	1479
Germacreno D	-	0.63	-	1480	-	1483	-
cis- $\beta$ -Guaieno	1.14	-	-	1492	1487	-	-
Biciclogermacreno	-	-	0.48	1500	-	-	1502
$\alpha$ -Muroleno	-	0.55	-	1500	-	1500	-
$\alpha$ -Bulneseno	-	-	0.94	1509	-	-	1510
$\gamma$ -Cadineno	1.31	0.39	0.96	1513	1513	1513	1515
$\delta$ -Cadineno	9.05	3.54	0.24	1522	1520	1523	1523
$\alpha$ -Cadineno	-	0.08	-	1537	-	1535	-
Hedicariol	2.78	0.11	-	1546	1549	1547	-
Germacreno D-4-ol	4.21	1.07	-	1574	1575	1574	-
Globulol	-	0.14	-	1590	-	1591	-
Ledol	0.37	0.13	-	1602	1603	1603	-
1,10-di,epi-Cubenol	0.43	-	-	1618	1612	-	-
10-epi- $\gamma$ -Eudesmol	-	0.03	-	1622	-	1617	-
1-epi-Cubenol	0.04	0.01	-	1627	1624	1625	-
$\gamma$ -Eudesmol	0.26	1.04	-	1630	1627	1628	-
epi- $\alpha$ -Cadinol	-	-	2.73	1638	-	-	1640
epi- $\alpha$ -Muurolol	3.26	2.38	-	1640	1652	1637	-
Cubenol	-	-	0.39	1645	-	-	1645
$\beta$ -Eudesmol	-	-	0.02	1649	-	-	1651
$\alpha$ -Cadinol	4.29	4.17	0.17	1652	1652	1652	1653
Identificados (%)	82.11	95.83	88.71				
No identificados (%)	17.89	4.17	11.29				

\*(Adams, 2007)

Los componentes mayoritarios del aceite de *O. basilicum* fueron cinamato de metilo (37.5%), linalool (26.1%) y eucaliptol (6.2%). Un estudio mostró la presencia de linalool (26.5-56.3%), geraniol (12.1-16.5%), eucaliptol (2.5-15.1%), *p*-alilanisol (0.2-13.8%) y limoneno (0.2-10.4%) como componentes mayoritarios del aceite de *O. basilicum* en diferentes zonas climáticas (Al-Maskri *et al.*, 2011). Otros estudios mostraron también como compuestos mayoritarios el linalool y el cinamato de metilo (Ismail, 2006; Telci *et al.*, 2006), lo cual coincide con nuestros resultados.

El aceite esencial del fruto de *S. molle* tuvo como compuestos mayoritarios el  $\alpha$ -felandreno (31.0%), limoneno (25.5%) y mircenol (10.6%), mientras que el aceite esencial de la hoja de *S. molle* tuvo como compuestos mayoritarios el limoneno (15.6%),  $\delta$ -cadineno (9.1%) y canfeno (8.7%). El limoneno y el  $\alpha$ -felandreno ya han sido reportados como los componentes mayoritarios de los aceites de frutos y hojas de *S. molle* (Zahed *et al.*, 2011). Otros reportes también concuerdan en que el limoneno es uno de los componentes mayoritarios en estos aceites (Belhamel *et al.*, 2008; Benzi *et al.*, 2009; Zahed *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2014). Es importante conocer la composición de un aceite esencial y sus compuestos mayoritarios, ya que, generalmente son los que brindan la actividad biológica así como para estimar su uso potencial como insecticida. Se ha reportado que algunos de los componentes mayoritarios de estos aceites, como el limoneno y el linalool, tienen actividad contra *Ae. aegypti* (Pandey *et al.*, 2013).

Para cuantificar los componentes de cada aceite esencial, los métodos de *CG-FID* fueron optimizado (Tabla 7) variando los tiempos y las temperaturas de la rampa del horno. Posteriormente, para cada planta se eligió el método que presentara la mejor separación de las señales atribuidas a los componentes de los aceites.

Cabe mencionar que para los aceites esenciales de fruto y hoja del *S. molle* se usó el mismo método debido a que se observaron el mismo número de señales cromatográficas y solo diferían en la proporción de sus componentes. Tanto para el aceites esencial de fruto y hojas de *S. molle* y de *O. basilicum* se eligió el programa 8 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Optimización del programa de temperatura por *CG-FID* (inyección directa) para la caracterización química del aceite esencial de *S. molle* y *O. basilicum*.

Planta	Programa de temperatura	Condiciones
<i>S. molle</i>	1	Inició en 50 °C y esperó 1 min, aumentó a 120 °C (8 °C/min) y esperó 1 min, después aumentó a 150 °C (25 °C/min) y esperó 1 min, y por último hasta 250 °C (8 °C/min) y esperó 1 min.
	2	Inició en 50 °C y esperó 1 min, aumentó a 70 °C (3 °C/min) y esperó 3 min, después aumentó a 120 °C (4 °C/min) y esperó 1 min, y por último hasta 250 °C (45 °C/min) y esperó 1 min.
	3	Inició en 55 °C, aumentó a 70 °C (3 °C/min), después aumentó a 100 °C (10 °C/min), y por último hasta 250 °C (7 °C/min) y esperó 1 min.
	4	Inició en 55 °C, aumentó a 84 °C (3 °C/min) y esperó 0.5 min, después aumentó a 100 °C (10 °C/min), y por último hasta 178 °C (6 °C/min).
	5	Inició en 60 °C, aumentó a 83 °C (3 °C/min) y esperó 1 min, después aumentó a 100 °C (10 °C/min), y por último hasta 178 °C (6 °C/min).
	6	Inició en 55 °C, aumentó a 70 °C (3 °C/min), después aumentó a 100 °C (9 °C/min), y por último hasta 178 °C (6 °C/min).
	7	Inició en 60 °C, aumentó a 70 °C (3 °C/min), después aumentó a 100 °C (10 °C/min), y por último hasta 178 °C (6 °C/min).
	8	Inició en 60 °C, aumentó a 86 °C (3 °C/min), después aumentó a 100 °C (10 °C/min), y por último hasta 178 °C (6 °C/min).
<i>O. basilicum</i>	1	Inició en 70 °C, aumentó a 100 °C (6 °C/min) y esperó 1.5 min, después aumentó a 119 °C (2 °C/min), y por último hasta 270 (45 °C/min).
	2	Inició en 70 °C, aumentó a 90 °C (6 °C/min) y esperó 3 min, después aumentó a 119 °C (2 °C/min), y por último hasta 270 °C (45 °C/min).
	3	Inició en 70 °C, aumentó a 95 °C (6 °C/min) y esperó 3 min, después aumentó a 119 °C (2 °C/min), y por último hasta 270 °C (45 °C/min).
	4	Inició en 75 °C, aumentó a 100 °C (6 °C/min) y esperó 3 min, después aumentó a 119 °C (2 °C/min), y por último hasta 270 °C (45 °C/min).
	5	Inició en 75 °C, aumentó a 106 °C (6 °C/min) y esperó 3 min, después aumentó a 119 °C (2 °C/min), y por último hasta 270 °C (45 °C/min).
	6	Inició en 75 °C, aumentó a 110 °C (6 °C/min) y esperó 3 min, después aumentó a 119 °C (2 °C/min), y por último hasta 270 °C (45 °C/min).
	7	Inició en 75 °C, aumentó a 110 °C (6 °C/min) y esperó 3 min, después aumentó a 119 °C (2 °C/min), y por último hasta 270 °C (20 °C/min).
	8	Inició en 75 °C, aumentó a 110 °C (6 °C/min) y esperó 3 min, después aumentó a 119 °C (10 °C/min), y por último hasta 270 °C (55 °C/min).

Posteriormente, se evaluó la actividad óptica, el índice de refracción y la densidad relativa de los aceites esenciales, de acuerdo a la FEUM (SSA, 2004). El anetol se estableció como control en la determinación de las propiedades físicas en base a sus características fisicoquímicas descritas en la FEUM. En la Tabla 8 se muestran los valores obtenidos en la caracterización física de los aceites esenciales de *S. molle* y *O. basilicum* y del anetol (control). Estos parámetros son utilizados para determinar la pureza y estabilidad de los estos aceites utilizados en la industria de perfumes y de alimentos (Agnieszka y Gantner, 2012; Boukhatem *et al.*, 2014). Específicamente, la actividad óptica, es una evaluación primordial de los aceites esenciales en la industria para su control de calidad, es decir para verificar que el producto sea estable. Por su parte, un índice de refracción mayor a 1.47

indica que el aceite esencial contiene principalmente compuestos alifáticos y/o aromáticos oxigenados, lo que nos puede dar una idea preliminar de la composición del aceite. En este trabajo los aceites obtenidos contenían terpenos alifáticos como, por ejemplo, pineno, mirceno, canfeno, felandreno y cadineno, entre otros.

**Tabla 8.** Caracterización física de los aceites esenciales y del anetol (control) según la FEUM.

Parámetro físico	AESmf***	AESmh***	AEObh***	Control (anetol)	FEUM
Actividad Óptica (°)*	53.76	35.1	-4.46	-0.15	-0.15 y +0.15
Densidad Relativa (g/mL)	0.84	0.876	0.966	0.987	0.983 - 0.988
Índice de Refracción**	1.481	1.486	1.516	1.539	1.557 y 1.561

\*\*Refractómetro Abbe, Anton Paar

\*\*\* Polarímetro Perkin Elmer 341

\*\*\*Todos los valores tuvieron DE<0.006

Por otro lado, la selección de los componentes del aceite esencial se realizó en base a su abundancia (Tabla 6) y a su actividad biológica. Para el aceite de fruto y hoja de *S. molle*, se seleccionaron el  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -cimeno y limoneno con una proporción de 10:18:72, respectivamente. Mientras que para el aceite de *O. basilicum*, se seleccionaron el linalool, eucaliptol y alilanisol (20:65:15, respectivamente).

### **Desarrollo del método con Microextracción en fase sólida en modo *headspace (HS-SPME)* por cromatografía de gases (CG-FID)**

Un método analítico deseable tiene que ser lineal, sensible, preciso, exacto y robusto; además, debe ser capaz de cuantificar al analito o analitos (Brown y Lister, 2014). Algunos de los métodos comúnmente usados para el análisis de aceites esenciales involucran análisis cromatográficos (i.e. *HPLC, CG*) (Baranauskien *et al.*, 2005; Rivero-Cruz *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2014; Ruíz-García *et al.*, 2015) así como técnicas de separación (i.e. *SPE, SPME*).

Para el caso de muestras que contienen varios analitos, se debe utilizar métodos cromatográficos ya que separan y brinda la señal analítica de forma más confiable. En este caso, por tratarse de componentes volátiles, la técnica más utilizada para el análisis cualitativo de los aceites esenciales es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría

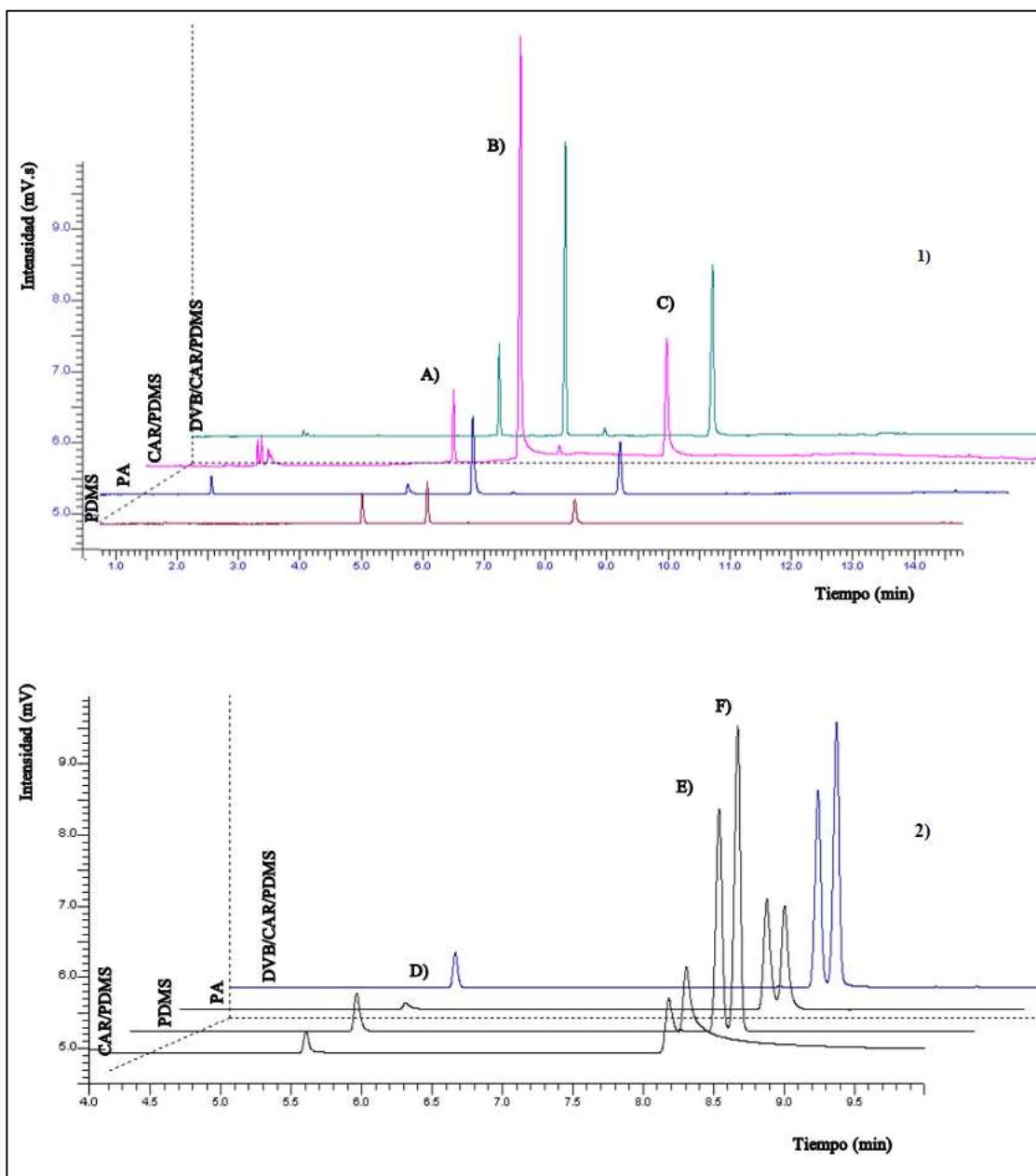
de masas (*CG-MS*), y para el análisis cuantitativo la cromatografía de gases con detector de ionización en flama (*CG-FID*).

De igual forma, para el análisis cuantitativo de los aceites esenciales incorporados en NP, es necesaria realizar una etapa de extracción y preconcentración de la muestra antes de ser analizada debido a su complejidad (Hallier *et al.*, 2013).

La *SPME* es una técnica rápida, fácil, sensible y precisa para extraer compuestos volátiles a partir de muestras con matrices complejas, reduciendo interferencias no volátiles y concentrando los analitos para un posterior análisis (Pawliszyn, 1997; Ruíz-García *et al.*, 2015).

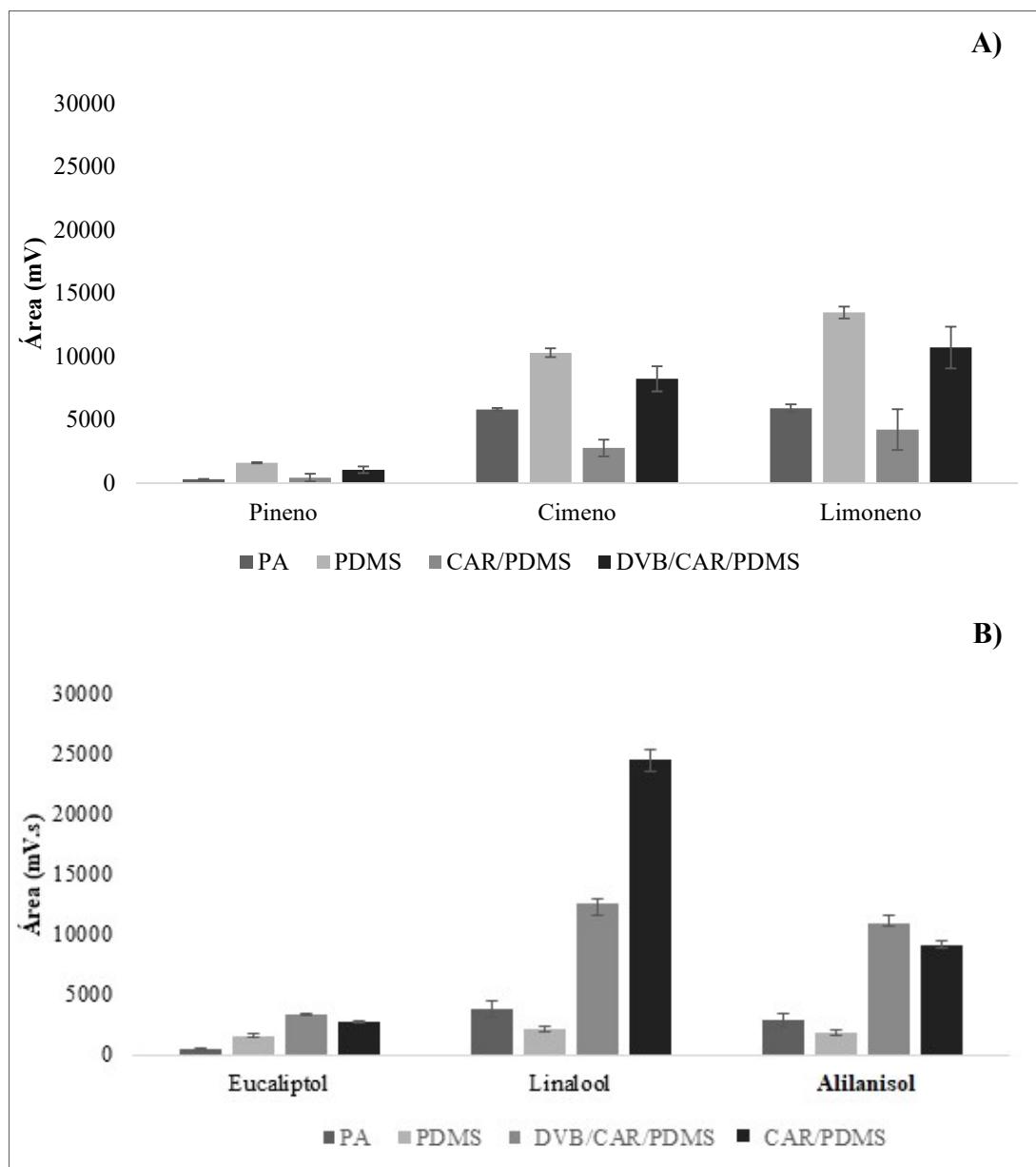
En este trabajo se utilizó la técnica de *SPME* con la finalidad de eliminar posibles interferencias de la formulación de las NP. La *SPME* se realizó en modalidad de *headspace* (*HS*) debido a su alta selectividad para compuestos volátiles y semivolátiles, como son los componentes de los aceites esenciales (Bicchiet *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2015). Aunado a esto, la fibra de *SPME* no tiene contacto directo con la muestra, por lo que se reducen los efectos de matriz e interferencias, especialmente en muestras complejas como las formulaciones de NP (Ruíz-García *et al.*, 2015).

Para el desarrollo del método analítico para cuantificar los componentes del aceite esencial por *HS-SPME* con *CG*, fue necesario seleccionar la fibra que permita la mejor extracción de los componentes seleccionados con la menor variabilidad. Se evaluaron cuatro fibras de diferente polaridad y composición. En la Figura 10, se muestran los cromatogramas de la solución de estándares a una concentración total de 10 µg/mL obtenidos con las cuatro fibras bajo las condiciones de *HS-SPME* mostradas en la Tabla 3 y con el programa de temperatura optimizado previamente.



**Figura 10.** Cromatogramas de los estándares a una concentración total de 10  $\mu\text{g/mL}$  con las cuatro fibras de SPME. 1) Estándares para aceite esencial de *O. basilicum*: A) eucaliptol, B) linalool y C) alilanisol; 2) Estándares para aceite esencial de *S. molle*: D)  $\alpha$ -pineno, E) o-cimeno y F) limoneno.

En la Figura 11 se muestran las áreas de los estándares con las cuatro fibras con *HS-SPME* por *CG-FID* para cada aceite esencial. En base a la mayor señal (área) de los tres componentes con la menor variabilidad en los resultados, se seleccionaron las fibras para cada aceite.



**Figura 11.** Comparación de las áreas de los tres estándares (concentración total de 10 µg/mL) obtenidas con las fibras de SPME evaluadas por CG-FID ( $\bar{x} \pm s$ ; n=3). A) Estándares para el aceite esencial de *S. molle*, y B) Estándares para el aceite esencial de *O. basilicum*.

De manera general, se puede observar que la extracción de cada componente fue diferente en cada una de las cuatro fibras. Este comportamiento es debido a las características específicas de cada fibra, como su polaridad, composición, espesor del recubrimiento y el tipo de extracción (partición o adsorción) (Pawliszyn, 1997; Ouyang y Pawliszyn, 2008).

Teóricamente, las fibras con una composición mixta (DVB/CAR/PDMS y CAR/PDMS) son mejores para extraer compuestos con diferentes características que las que están compuestas solo por un tipo de recubrimiento (PA y PDMS). Esto es debido a que permiten tener dos tipos de extracción, por partición y adsorción, permitiendo extraer mayor cantidad de compuestos (Baranauskien *et al.*, 2005). Lo anterior se pudo observar para los componentes del aceite de *O. basilicum*, los cuales fueron extraídos mayormente con la fibra de CAR/PDMS, pero con mayor variabilidad en la respuesta para el alilanisol posiblemente por su alta hidrofobicidad, por lo que se eligió la fibra de DVB/CAR/PDMS, como fibra de extracción. Esto concuerda con un estudio realizado para observar la influencia que tenían los tipos de recubrimientos en la extracción de compuestos de plantas aromáticas y medicinales (Bicchi *et al.*, 2007). Así también, se observó que la fibra de PDMS fue la más indicada para la extracción del aceite esencial de *S. molle* (mayor respuesta con menor variabilidad), debido probablemente al carácter no polar de la fibra y de los compuestos principales (terpenos alifáticos (Díaz-Maroto *et al.*, 2002).

**Tabla 9.** Variables del diseño experimental de Plackett-Burman para la optimización del método de extracción con la fibra de PDMS para la *HS-SPME*.

Variable	Nivel bajo	Nivel alto
<i>HS:Muestra</i>	1:0.85	1:1.33
Velocidad de agitación (rpm)	250	350
Distancia fibra-muestra (mm)	4	6
Tiempo de equilibrio (min)	5	20
Temperatura de extracción (°C)	55	70
Tiempo de extracción (min)	5	20
Concentración de polímero en NP blanco (μg/mL)	11.25	16.5

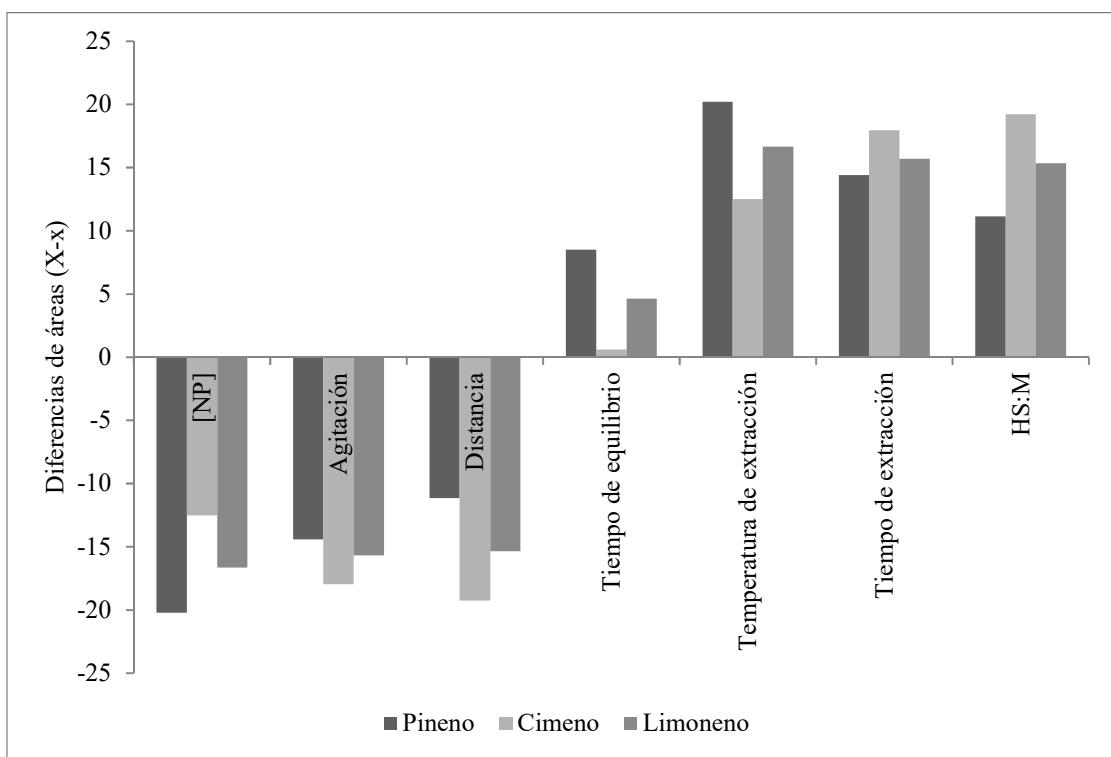
Posteriormente, un diseño experimental de Plackett-Burman fue utilizado para optimizar las condiciones de *HS-SPME-CG*. Este diseño experimental permite evaluar parámetros en niveles altos y bajos con el menor número de experimentos posible con una respuesta significativa (Tabla 9). Es conocido que las variables que más influyen en la *HS-SPME* son la relación entre el headspace y la muestra (*HS:MS*), la temperatura de extracción y el tiempo de extracción (Pawliszyn, 1997). También se han reportado otras variables que

afectan directamente la transferencia de los compuestos hacia la fibra de *SPME*, como el tiempo y temperatura de equilibrio, efecto matriz, velocidad de agitación y distancia a la que se coloca la fibra sobre la muestra (Kovačević y Kač, 2001; Cabredo-Pinillos *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2006; Rodriguez-Lafuente *et al.*, 2009).

Para evaluar los resultados del diseño experimental de Plackett-Burman, se calcularon las diferencias entre las respuestas de los niveles altos y bajos, restando los promedios de las respuestas de los niveles altos menos los promedios de las respuestas de los niveles bajos para cada variable, obtenidos con el método cromatográfico optimizado previamente. La diferencia obtenida se graficó para evaluar la influencia que ejercía cada variable sobre la *HS-SPME* (Figura 12.). Entre mayor sea la diferencia mayor será la influencia sobre el sistema de extracción. Se observa como todos los parámetros evaluados influencian al sistema *HS-SPME* debido a que está basado en varios equilibrios (Romero *et al.*, 2007).

A niveles bajos, los parámetros, que afectan, son: concentración de polímero, velocidad de agitación y distancia de la fibra sobre la muestra. La concentración de polímero probablemente hace un efecto matriz sobre la muestra, cuando está en baja concentración permite a los analitos migrar fácilmente a la fase gaseosa. Sin embargo, cuando aumenta la concentración, los componentes pueden quedar atrapados o adsorbidos por las cadenas poliméricas debido a su carácter hidrofóbico. En relación a

la distancia a la que se colocó la fibra de *SPME* sobre la muestra, fue observado que a nivel bajo la influencia fue mayor, esto puede ser debido a la adsorción del vapor de agua a la fibra que pudo haber modificado la polaridad de la fibra y, consecuentemente, la forma de extracción. Adicionalmente, el resultado obtenido a nivel bajo de la velocidad de agitación es debido a la influencia directa que ejerce sobre la transferencia de los componentes a la fase gaseosa en el espacio de cabeza y desde el espacio de cabeza a la fibra, entre menor sea la agitación habrá menos homogeneidad en la migración.



**Figura 12.** Diferencias de áreas entre los niveles altos y bajos de las variables en la optimización de la técnica de HS-SPME con aceite esencial de *S. molle* (10 µg/mL) y la fibra de PDMS (n= 2). NP blanco = NP sin aceite esencial.

Por otro lado, los niveles altos que tuvieron mayor influencia fueron los tiempos de equilibrio y extracción, la temperatura de extracción y el volumen del espacio de cabeza. Tanto el tiempo de equilibrio como de extracción tuvieron una influencia alta, debido a que, a alta temperatura la transferencia de los compuestos volátiles hacia la fase gaseosa es más rápida y si se deja más tiempo habrá una mayor variabilidad ya que los analitos estarán moviéndose rápidamente entre las distintas fases al incrementarse la energía cinética de las moléculas (Pawliszyn, 1997).

El tiempo de extracción depende del tipo de los analitos y la muestra, por ejemplo, esta reportado que de 10 a 20 min es suficiente tiempo para extraer compuestos volátiles, como los aceites esenciales. Sin embargo, la variabilidad puede ser más evidente a un tiempo de extracción mayor (Bicchi *et al.*, 2005). Finalmente, la influencia del espacio de cabeza fue probablemente debido a que, al cambiar este volumen, se cambia la proporción entre

las fases acuosa y gaseosa, por lo que los equilibrios cambian radicalmente. Considerando que cuanto menor sea la diferencia, menor será la influencia de esa variable sobre la respuesta; las condiciones óptimas en la extracción de estos compuestos con *HP-SPME* se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Condiciones de extracción óptimas para la extracción de  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -cimeno y limoneno a partir del aceite esencial de *S. molle* con *HS-SPME* por CG.

Variable	Valor
Volumen de muestra (mL)	4
Velocidad de agitación (rpm)	250
Distancia fibra-muestra (cm)	0.5
Tiempo de equilibrio (min)	10
Temperatura de extracción (°C)	70
Tiempo de extracción (min)	10
Concentración de polímero en NP ( $\mu$ g/mL)	84

Dentro de la caracterización de las NP, es fundamental desarrollar y validar métodos analíticos que permita cuantificar la cantidad de aceite encapsulado. Debido a que los aceites esenciales son una mezcla de componentes con grupos funcionales diferentes, su cuantificación simultanea representa todo un reto.

**Tabla 11.** Parámetros de validación establecidos en la validación del sistema para cuantificar los componentes del aceite esencial de *S. molle* con *HS-SPME* por *CG-FID*.

Parámetro de validación	$\alpha$ -pineno	$\alpha$ -cimeno	Limoneno	Referencia
Linealidad	0.9902	0.9921	0.9913	$r \geq 0.99^*$
LDL (ppm)	0.65	0.58	0.61	--
LDQ (ppm)	1.97	1.76	1.85	$L \leq$ nivel inferior estimado en la linealidad*
Repetibilidad (D.E.R.)	9.49	11.38	12.23	DER<15%**
Precisión intermedia (D.E.R.)	15.03	10.12	11.62	

\*Secretaría de Salud, CCAYAC-P-058, 2011; \*\* Jimenez C., *et al.*, 2002

Con el propósito de validar el método de *HS-SPME* por *CG* para cuantificar los aceites esenciales en formulaciones de NP, se evaluaron los siguientes parámetros de calidad de acuerdo a lo establecido por la Secretaría de Salud de México (SSA, 2011). Para validar el sistema para *S. molle* se determinó linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y precisión (repetibilidad y precisión intermedia). En la Tabla 11. se muestran los resultados obtenidos de los parámetros evaluados.

Para la validación del método con *HS-SPME*, se usaron NP cargadas con aceite esencial adicionadas con estándares de  $\alpha$ -pineno, o-cimeno y limoneno. Se determinó exactitud, precisión y robustez, de acuerdo a la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058). En las Tablas 12 y 13 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros evaluados para la validación del método del aceite esencial de hoja y fruto de *S.molle*.

**Tabla 12.** Parámetros de validación establecidos en la validación del método para cuantificar los componentes del aceite esencial de *S. molle* con *HS-SPME* por *CG-FID*.

Parámetro de validación	$\alpha$ -pineno	o-cimeno	Limoneno	Referencia
Exactitud (%R)	96.83	99.26	94.70	70-110%*
Repetibilidad (D.E.R.)	11.37	8.36	8.70	
Precisión intermedia (D.E.R.)	11.24	10.28	11.57	DER<15%**

\*AOAC, 2002

\*\* Jimenez C., et al., 2002

**Tabla 13.** Evaluación de la robustez en la validación de los métodos para cuantificar los componentes del aceite esencial de *S. molle* con *HS-SPME* por *CG-FID*.

Parámetro de validación	$\alpha$ -pineno	o-cimeno	Limoneno	Referencia
Robustez	Tiempo de equilibrio	No	No	No
	Distancia de la fibra sobre la muestra	No	No	No
	Cantidad de muestra	Si	Si	Si
	Flujo de He	No	No	No
	Temperatura	No	No	No
	Split	No	No	No
	Tiempo de extracción	Si	Si	Si

Diferencias entre niveles altos y bajos  
NO FUE ROBUSTO

Para validar el sistema para *O. basilicum*, se determinó linealidad, límite de detección y límite de cuantificación. En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos de los parámetros evaluados.

**Tabla 14.** Parámetros de validación establecidos en la validación del sistema para cuantificar los componentes del aceite esencial de *O. basilicum* con *HS-SPME* por *CG-FID*.

Parámetro de validación	Eucaliptol	Linalool	Alilanisol	Referencia
Linealidad	0.9911	0.9945	0.9919	$r \geq 0.99^*$
LDQ	0.61 ppm	0.48 ppm	0.58 ppm	--
LDQ	1.87 ppm	1.47 ppm	1.78 ppm	$L \leq$ nivel inferior estimado en la linealidad*

\*Secretaría de Salud, CCAYAC-P-058, 2011

Para la validación del método con *HS-SPME* se usaron NP cargadas con aceite esencial, adicionadas con estándares de eucaliptol, linalool y alilanisol. Se determinó exactitud y precisión, de acuerdo a la Secretaría de Salud (CCAYAC-P-058). En la Tabla 15 se muestran los parámetros evaluados para la validación del método del aceite esencial de *O. basilicum*.

**Tabla 15.** Parámetros de validación establecidos en la validación del método para cuantificar los componentes del aceite esencial de *O. basilicum* con *HS-SPME* por *CG-FID*.

Parámetro de validación	Eucaliptol	Linalool	Alilanisol	Referencia
Exactitud (%R)	109.67%	74.73%	81.35%	70-110%*
Repetibilidad (D.E.R.)	6.18%	5.69%	7.11%	DER<15%**
Precisión intermedia (D.E.R.)	6.93%	7.24%	14.52%	

\*AOAC, 2002

\*\* Jimenez C., et al., 2002

Como se puede observar, todos los parámetros de validación evaluados fueron aceptables para ambas plantas. Específicamente, para la linealidad, fueron obtenidos coeficientes de determinación ( $r^2$ ) mayores a 0.99 para los componentes de los aceites esenciales, esto

indica que el método de *HS-SPME-CG* tiene un comportamiento lineal y una concentración correlacionada con la respuesta analítica obtenida por *CG* (áreas de los picos cromatográficos). Los valores obtenidos para el LDD y LDQ fueron menores que el menor nivel de concentración de la linealidad, lo cual asegura la exactitud y precisión (Pramod *et al.*, 2013). La precisión intermedia y repetibilidad resultaron ser menores del 15% (%DER), lo cual es aceptable para productos naturales, y establece que el método es preciso durante el mismo día y en días no consecutivos (Jiménez *et al.*, 2002). La exactitud fue calculada de acuerdo a los porcentajes de recuperación (%R), los cuales fueron obtenidos dentro de lo aceptable entre 70 y 110% (SSA, 2011).

Para establecer las variables que afectan significativamente el método y su robustez, se usó un diseño experimental de Plackett-Burman. Las diferencias obtenidas entre los niveles altos y bajos deben ser menores al valor de  $2 \frac{1}{2}$  DE (FAO, 2005). Las variables que afectaron significativamente al método con *HS-SPME* por *CG* fueron el tiempo de equilibrio, la distancia de la fibra, el flujo de la fase móvil, la temperatura y el modo *Split*; por lo que el método no fue robusto. Estos resultados nos indican que el analista debe de realizar cuidadosamente el análisis y el manejo de las muestras para obtener resultados confiables con la menor variabilidad (Sousa *et al.*, 2011).

### **Sistemas de liberación con aceites esenciales**

#### ***Obtención y caracterización de NP***

Las nanopartículas poliméricas (NP) son sistemas versátiles compuestos por materiales poliméricos que atrapan a uno o varios tipos de moléculas (Rao y Geckeler, 2011). Específicamente, el tipo de polímero es uno de los parámetros más importantes en la obtención de NP, ya que una de sus funciones principales es dar soporte a las NP, además de proteger y liberar controladamente al principio activo (Maitz, 2015).

El polímero seleccionado debe tener las propiedades adecuadas de acuerdo a la aplicación deseada; también se debe tomar en cuenta si es necesario que sea, por ejemplo, biodegradable o biocompatible (Naha *et al.*, 2012). Existe una variedad muy grande de

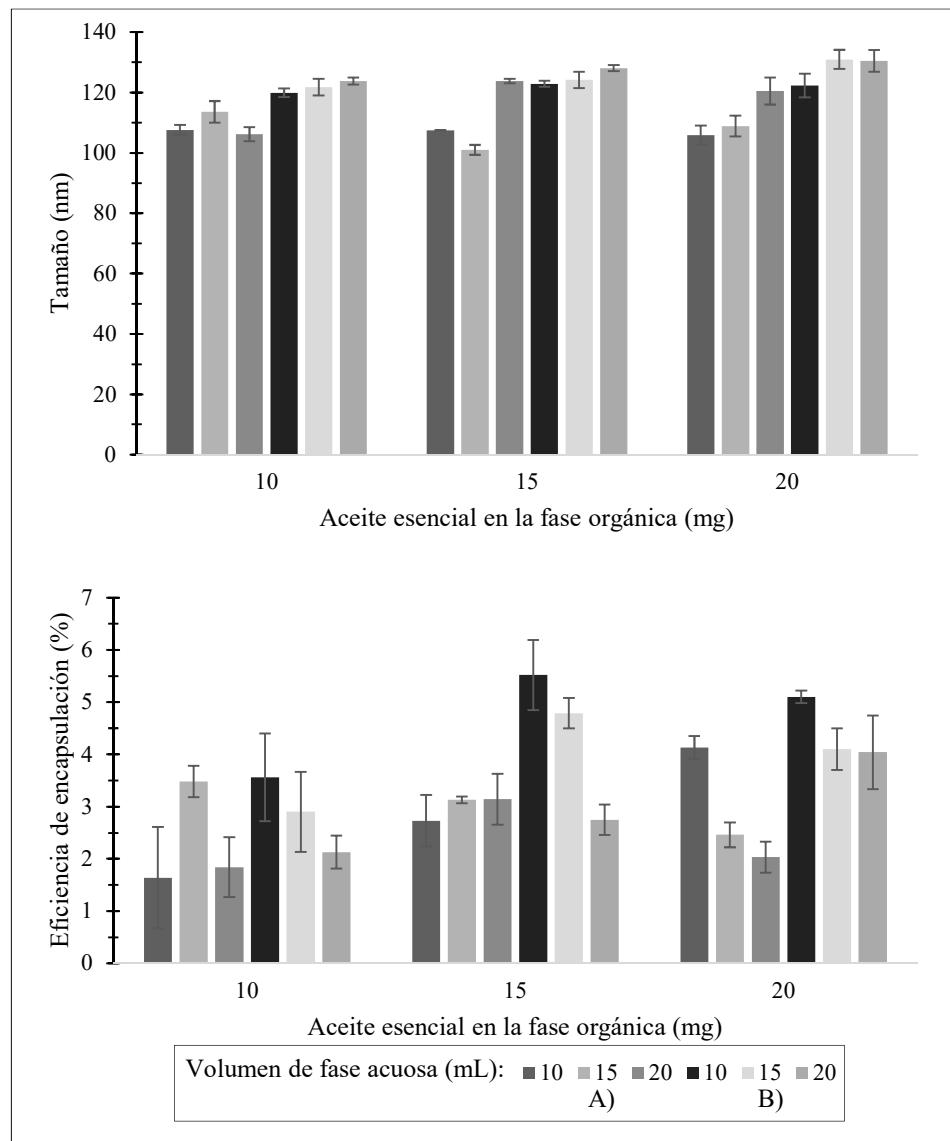
polímeros con diferentes propiedades fisicoquímicas (i.e. polaridad, peso molecular, tipo de degradación) (Liechty *et al.*, 2010), entre los que se encuentran: i) compuestos macromoleculares de origen natural, como, alginato de sodio, gelatina y quitosano; ii) polímeros semisintéticos, por ejemplo, derivados de celulosa iii) polímeros sintéticos, como polietilenglicoles, poloxámeros, polilactidas, poliamidas, acrilatos iv) productos de fermentación, como la goma de xantano (Karolewicz, 2016). En este trabajo se usaron polímeros de acrilatos y quitosano.

Los polímeros acrílicos (derivados del ácido metacrílico, ésteres acrílicos o metacrílicos) son biocompatibles, por lo que han sido aprobados para su uso farmacéutico. Estos polímeros son conocidos comercialmente como Eudragit® y se han usado ampliamente debido a su estabilidad química, propiedades adhesivas y plásticas, capacidad de recubrimiento, compatibilidad con diferentes activos y su variedad, teniendo una amplia gama de opciones en base a su solubilidad y permeabilidad (Rowe *et al.*, 2009). Debido a lo anterior son usados comúnmente para la preparación de micropartículas y nanopartículas con fármacos, además de que han mostrado que pueden encapsular eficientemente diversas moléculas, tanto sólidas como líquidas (Lee *et al.*, 2001; Pankaj *et al.*, 2017).

Con el objetivo de mejorar la aplicación de los aceites esenciales, se prepararon NP con Eudragit® L100-55 y aceite esencial de los frutos de *S. molle* por la técnica de nanoprecipitación. Debido a que este aceite tuvo un alto rendimiento, durante su extracción, fue usado como modelo para la optimización de la obtención de NP.

El volumen de la fase acuosa, cantidad de aceite esencial y solvente orgánico fueron los parámetros evaluados con el fin de obtener las mejores condiciones de preparación. Posteriormente, el método validado de *HS-SPME-CG* fue utilizado para cuantificar, directamente, el aceite esencial encapsulado en las NP preparadas y así determinar el %EE de las formulaciones.

En la Figura 13 se muestran las formulaciones obtenidas con diferentes condiciones de preparación. Esta información fue confirmada con una t de student y un análisis de Levene, con los cuales se compararon las medias y las varianzas (Piccapietra *et al.*, 2008).



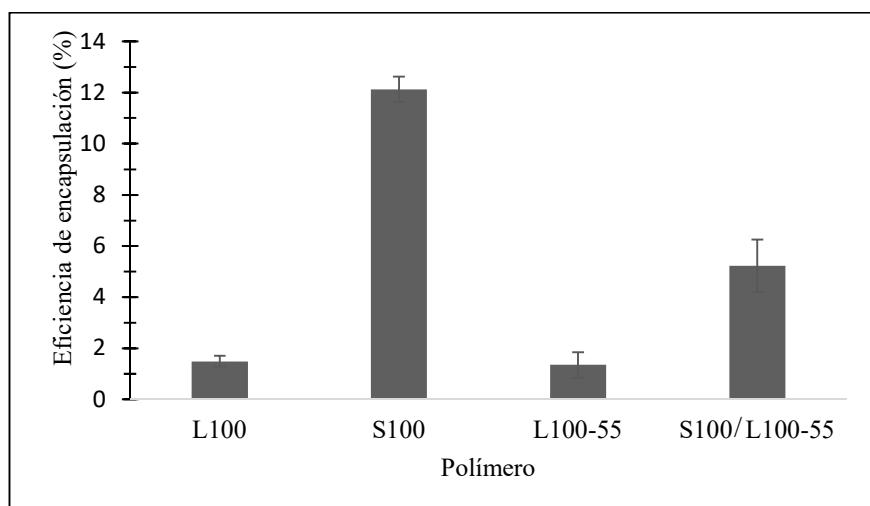
Como se puede ver, los diámetros de partícula obtenidos para las NP con metanol fueron ligeramente menores que las preparadas con la mezcla de solventes. Este comportamiento pudo deberse a la solubilidad del polímero en los solventes orgánicos de la fase orgánica.

Si las cadenas poliméricas eran más afines al metanol al poner en contacto la fase orgánica con la acuosa, éstas difundieron más fácil con el solvente hasta agregarse y formar NP más pequeñas (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004). con respecto al %EE, es probable que el aceite esencial hubiera tenido mayor afinidad por la mezcla de solventes que al metanol solo, por lo que, pudo haber difundido con el frente del solvente evitando ser atrapado en la NP. Esto pudo haber provocado valores de %EE más bajos en la mezcla de solventes en relación con el metanol solo.

Por otra parte, el volumen de fase acuosa actúa directamente sobre las interacciones entre las cadenas poliméricas y los componentes del aceite esencial, sin embargo, no se observa una diferencia significativa. Por otro lado, la cantidad de aceite esencial afecta en la relación y la manera en que se agrega el polímero. En relación a ésto, a mayor cantidad de aceite se espera un tamaño mayor de partícula (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004), sin embargo, en este caso no hubo una diferencia significativa en el tamaño de partícula, probablemente, debido a que la poca cantidad de aceite esencial encapsulado no afectó al tamaño. En general, los índices de polidispersidad de todos los lotes de NP fueron aceptables (datos no mostrados). Estos valores resultan aceptables si se considera que este puede variar en un rango de 0 a 1, en donde el valor más cercano al 0 indica una distribución homogénea de tamaño de partícula (Galindo-Rodríguez S.A., *et al.*, 2004). Todas las formulaciones tuvieron índices de polidispersidad menores a 0.200.

En relación al %EE, se determinó que ninguno de los lotes preparados con Eudragit® L100-55 (Figura 13) tuvieron un valor mayor a 10%. Por lo tanto, se decidió evaluar otros polímeros para mejorar la encapsulación. Los polímeros empleados, Eudragit® L100 y Eudragit® S100 (Figura 14), son copolímeros aniónicos a base de ácido metacrílico y metacrilato de metilo. La relación de los grupos carboxilo libres y los grupos éster es de aproximadamente de 1:1 en Eudragit® L100 y de 1:2 en Eudragit® S100 (Evonik, 2011). Estos polímeros fueron elegidos debido a que se disuelven a pH básicos, mismas características de basicidad presentan los insectos en su aparato digestivo y en la superficie de su exoesqueleto (Pérez-de-Luque y Rubiales, 2009), por ello son comúnmente utilizados para la liberación de diversas moléculas en el intestino (Cetin *et al.*, 2010; Silva

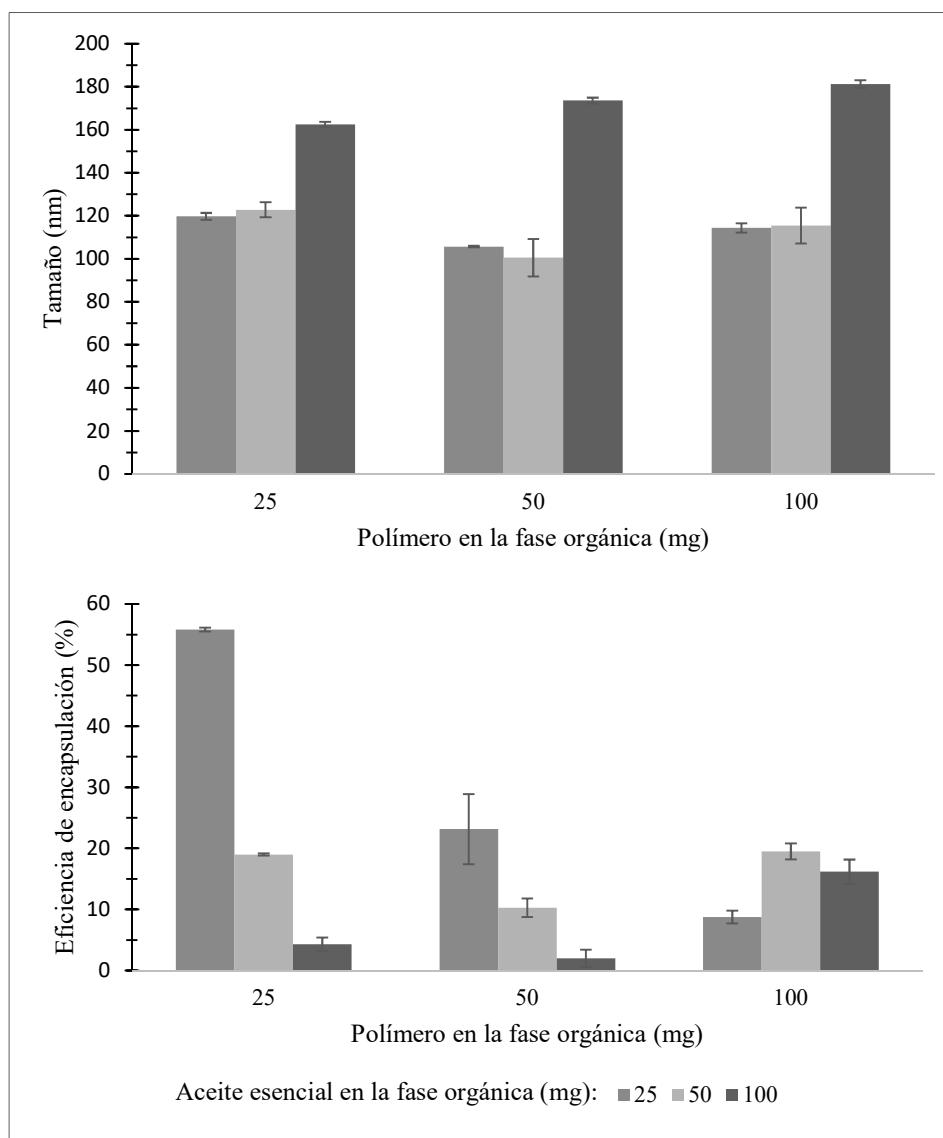
*et al.*, 2015). La formulación de NP preparada con Eudragit S100 fue la única que tuvo un %EE mayor al 10%, por lo que los siguientes estudios de formulación se hicieron sólo con este polímero.



**Figura 14.** Comparación de los EE% de NP obtenidas con diferentes Eudragit® (100-55, S100, L100 y mezcla del S100 con L100-55), ( $\bar{x} \pm \sigma$ ,  $n = 3$ ).

En la técnica de nanoprecipitación, la naturaleza y concentración del polímero en la fase orgánica, la polaridad del solvente, la naturaleza y la relación de las fases son factores relacionados con el tamaño de las nanocápsulas (Mora-Huertas *et al.*, 2010). En la Figura 15 se puede observar la relación entre los componentes de la fase orgánica con el tamaño y el % de eficiencia de encapsulación de las NP preparadas con Eudragit® S100. Se puede ver como el aumento en la cantidad de aceite esencial afecta directamente en el tamaño de partícula, donde a mayor cantidad se obtuvieron mayores tamaños. Este comportamiento se hace más evidente al pasar de 25 a 100 mg de aceite esencial en la fase orgánica. Debido a que en la técnica de nanoprecipitación el solvente orgánico difunde a la fase acuosa, la red polimérica atrapa al principio activo (aceite esencial), y habiendo mayor cantidad, quedará atrapado mayormente, reflejándose en un mayor tamaño de partícula (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2010). Estos resultados son similares a los obtenidos en algunos trabajos donde usaron este polímero para encapsular diferentes tipos de aceites, tanto volátiles como no volátiles (Averina y Allémann, 2013a; Fiel *et al.*,

2014). Por otro lado, la cantidad de polímero en este caso no tuvo un efecto significativo sobre el tamaño de partícula de las formulaciones.



**Figura 15.** Efecto de la cantidad de polímero y de aceite esencial en la fase orgánica sobre el tamaño y eficiencia de encapsulación de NP obtenidas por nanoprecipitación con Eudragit S100 ( $\bar{x} \pm \sigma$ ,  $n = 3$ ).

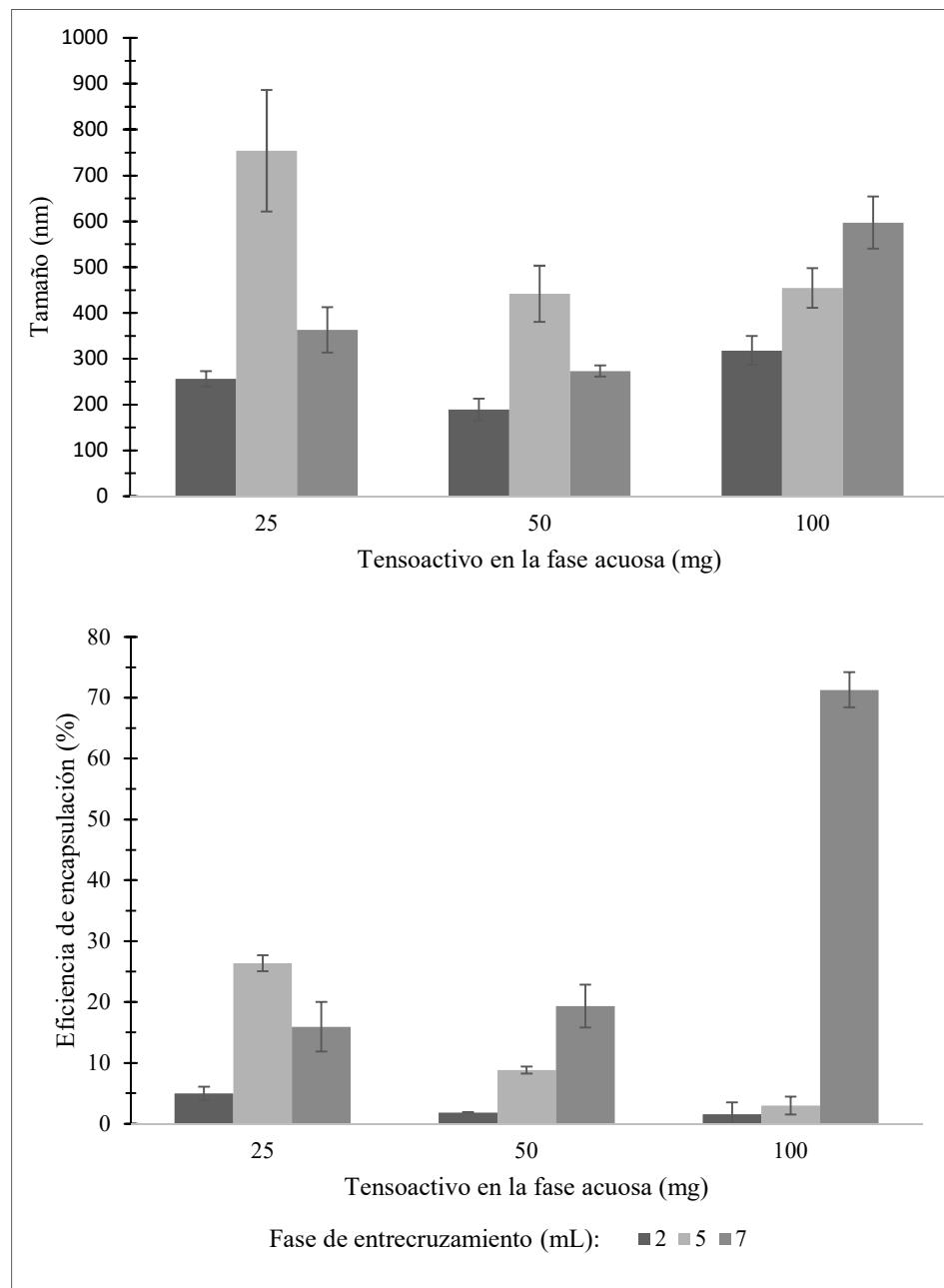
Con respecto a los porcentajes de eficiencia de encapsulación, se obtuvo el valor más alto al utilizar 25 mg de polímero y 25 mg de aceite esencial. No existen muchos reportes sobre la aplicación del Eudragit® S100 en la encapsulación de aceites esenciales, sin embargo, en una publicación se reportaron formulaciones de NP con Eudragit® S100 y aceite de

pino (no volátil), obteniendo 94% de EE. Cabe mencionar que las NP presentaban índices de polidispersidad de 0.3, (Averina y Allémann, 2013b).

Por otro lado, en el presente estudio se logró encapsular componentes de los aceites esenciales de carácter no polar, como el limoneno, el mirceno y el eugenol. Existen trabajos en los que se han reportado %EE elevados (> al 70%) para compuestos hidrofóbicos (Ma *et al.*, 2001). Particularmente, Ephrem y col.(2014) prepararon NP de ácido poliláctico cargadas con aceite esencial de romero y obtuvieron altos %EE (99%), sugiriendo que esto se deba a la elevada hidrofobicidad de los compuestos encapsulados. Este comportamiento no coincidió con nuestros resultados, probablemente debido a que, si bien los tres componentes son hidrofóbicos, también son altamente volátiles favoreciendo su evaporación durante la purificación de las NP.

Por otro lado, fueron preparadas NP de quitosano con los aceites esenciales. Específicamente, el quitosano, copolímero catiónico no ramificado, es un polisacárido básico con un pKa aproximado de 6.3, es por ello que es soluble en soluciones acuosas ligeramente ácidas (pH aproximado de 6), donde a partir de un pH de 6.2 empieza a asociarse como gel. Esta capacidad se debe a la formación de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares de sus cadenas (Rithidej *et al.*, 2002), gelificando espontáneamente al contacto de polianiones polivalentes mediante la formación de entrecruzamientos intramoleculares. En particular, el tripolifosfato (TPP) es el agente de entrecruzamiento más usado debido a que no es tóxico y ayuda a gelificar rápidamente mediante fuerzas electrostáticas. Está reportado que el quitosano es degradado por algunas enzimas en vertebrados, como lisozimas y enzimas bacterianas en el colon (Kean y Thanou, 2010). Debido a esta ventaja se ha usado como base de diversas formulaciones como micropartículas, películas y nanopartículas con aceites esenciales con diferentes aplicaciones (Fan *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017). En la Figura 16 se puede observar el efecto de parámetros como la cantidad de tensoactivo y el volumen de la fase de entrecruzamiento (TPP, 1mg/mL) sobre el tamaño y el %EE de las NP preparadas con quitosano. Se puede observar, de manera general, qué al aumentar la cantidad de tensoactivo, aumentó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad, los

cuales teóricamente deberían de haber bajado. Cabe mencionar que, tanto el tamaño de partícula como el índice de polispersidad, podrían haber incrementado debido a la alta concentración del surfactante en la fase acuosa. Este comportamiento podría deberse a que un exceso de surfactante podría conllevar a la formación de núcleos micelares que afecten el índice de polidispersidad.



**Figura 16.** Efecto de la cantidad de tensoactivo y volumen de la fase de entrecruzamiento sobre el tamaño y eficiencia de encapsulación de NP de quitosano obtenidas por nanoprecipitación y gelificación iónica ( $\bar{x} \pm \sigma$ ,  $n = 3$ ).

Durante la preparación de las NP, el tensoactivo tiene el propósito de proveer estabilidad a estos sistemas. Los agregados y la difusión rápida de los activos puede ser evitada usando tensoactivos con alto equilibrio hidrofílico-hidrofóbico, mientras que los que tienen un equilibrio bajo, se usan para obtener partículas homogéneas y pequeñas (Christofoli *et al.*, 2015).

Actualmente, existen reportes de NP de quitosano con aceites esenciales, como el aceite esencial de *Lippia sidoides* encapsulado en un gel compuesto de una mezcla de quitosano y goma, con tamaños de partícula entre 35 y 558 nm (Abreu *et al.*, 2012). En otro estudio se obtuvieron NP del aceite esencial de cúrcuma con tamaños de aproximadamente 520 nm (Lertsutthiwong *et al.*, 2009). Estos tamaños son similares a lo obtenido en este trabajo. Para las NP de quitosano, se menciona que, aunque tengan un tamaño aparentemente grande, tienen realmente un tamaño menor, ya que las NP están “hinchadas” por estar en un medio acuoso. (Hosseini *et al.*, 2013).

Por otro lado, Hosseini y col. (2013) desarrollaron formulaciones de NP de quitosano encapsulando aceite de orégano, con las cuales obtuvieron eficiencias de encapsulación entre 21 y 47% y relacionaron estos porcentajes con la capacidad del polímero para contener al aceite esencial, es decir a mayor cantidad de aceite esencial, el polímero se satura y se refleja en una menor eficiencia de encapsulación.

En este trabajo la mayoría de los %EE fueron menores al 50%, lo cual puede atribuirse, en primera instancia, a la saturación del polímero por los componentes del aceite esencial, y en una segunda estancia a las características fisicoquímicas del polímero formador de las NP. Probablemente, el carácter iónico del quitosano pudo limitar la incorporación de los compuestos hidrofóbicos del aceite esencial; y, de la misma forma, evitar la formación de formulaciones más homogéneas (Tabla 16).

**Tabla 16.** Formulaciones de NP cargadas con diferentes polímeros y distintos aceites esenciales.

Aceite esencial	Polímero	Tamaño* (nm)	I.P.**	Potencial $\zeta$ ***	%EE****
<i>S. molle</i> (frutos)	ES100	119.7	0.173	-13.5	55.8
	CS	597	0.406	33.1	71.3
<i>S. molle</i> (hojas)	ES100	154.5	0.128	-21.4	52.8
	CS	796.1	0.404	23.4	62.4
<i>O. basilicum</i> (hojas)	ES100	96.1	0.181	-11.5	30.3
	CS	488.7	0.531	30.1	21.2

\*DE: ES100 < 1.6 nm, CS < 61

\*\*DE < 0.055

\*\*\*DE < 4

\*\*\*\*DE < 5

Las formulaciones preparadas con Eudragit® S100, presentaron tamaños menores a 200 nm e IP menores a 0.2 (Tabla 17), indicando con ello que las poblaciones de NP eran homogéneas (Cetin *et al.*, 2010). La formulación óptima para las NP obtenidas con Eudragit® S100 fue: i) Fase acuosa: 50 mg de poloxamer en 15 mL de agua, ii) Fase orgánica: 2.5 mL de metanol, 25 mg de polímero y 25 mg de aceite esencial.

Por otro lado, las formulaciones obtenidas con quitosano (Tabla 17), resultaron tener un mayor tamaño de partícula y menor homogeneidad. Sin embargo, sus %EE fueron mayores que los obtenidos con las de Eudragit® S100. Para esta formulación fueron utilizadas las mismas condiciones establecidas anteriormente utilizando quitosano y 7 mL de TPP (1mg/mL) para la gelificación iónica.

#### ***Estudio de la liberación de aceites esenciales en atmósfera controlada***

En la Figura 17 se pueden observar los comportamientos de liberación en ambientes controlados a diferentes temperaturas y 40% de humedad relativa.

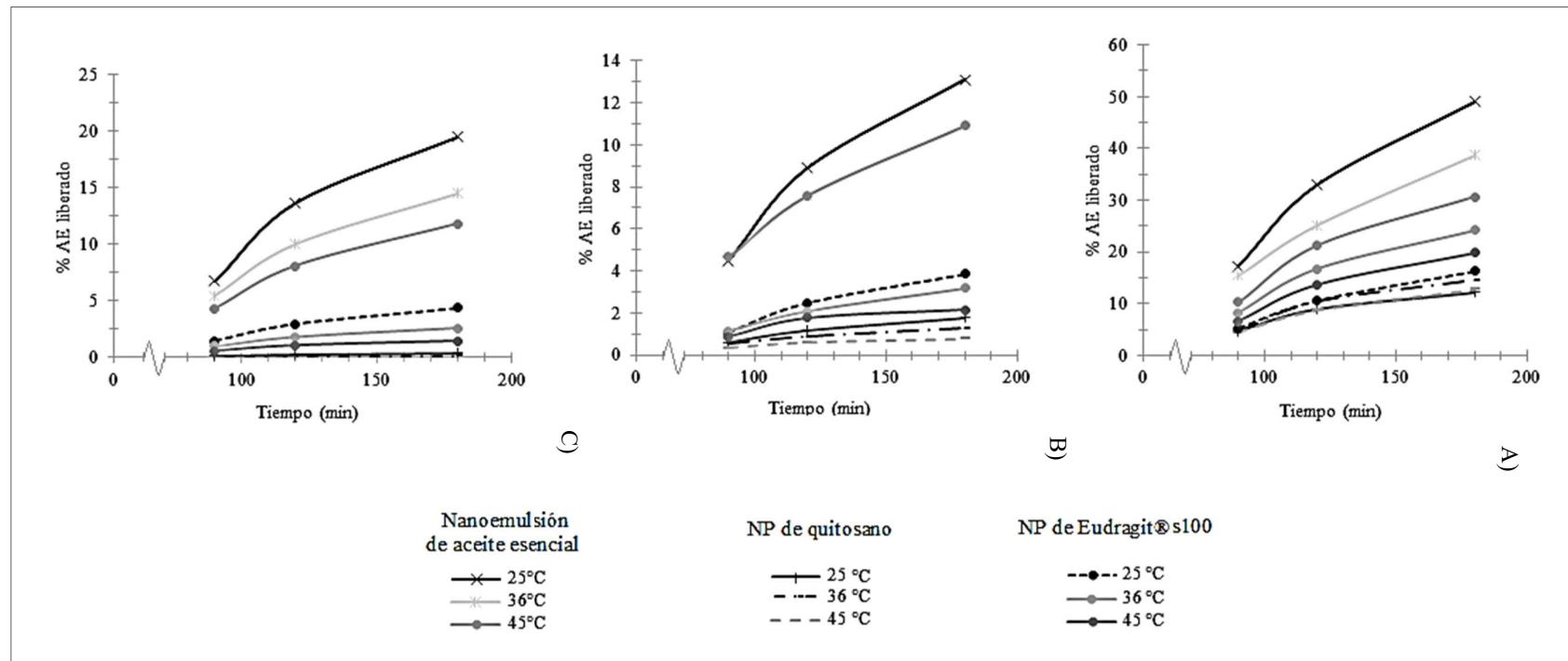
La liberación de los componentes activos encapsulados en NP depende de diversos factores: i) las propiedades fisicoquímicas de los componentes activos (solubilidad, presión de vapor, coeficiente de partición octanol/agua, pesos molecular); ii) características de las NP (tamaño, %EE, tipo de polímero, estructura); y iii) medio de

liberación (%HR, fuerza iónica y pH del medio) (Zambito *et al.*, 2012; Cota-Arriola *et al.*, 2013).

Se ha reportado que las NP obtenidas por puedes comportarse como sistemas bifásicos con una fase de liberación inicial rápida seguida de una segunda fase de liberación más lenta, lo cual coincide a lo observado en este trabajo. En la fase inicial, se liberan los componentes del aceite esencial que están más próximos a la superficie de la partícula, por lo que se observa una liberación rápida. Mientras que, en la siguiente fase, la liberación será más lenta, debido a que los componentes difunden desde la parte más interna de la NP. En esta segunda fase, intervienen otro tipo de interacciones relacionadas con la solubilidad de los componentes, del tensoactivo y presencia de polímero (Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Asimismo, se pudo apreciar que las NE no solo liberaron a mayor velocidad, sino que también liberaron un porcentaje mayor de aceite esencial en comparación con las NP. Este comportamiento se debió a qué en el caso de las nanocápsulas, la membrana polimérica que recubre al aceite encapsulado funciona como una barrera que controla su salida de la nanocápsula, controlando así su liberación. Dicho de otra forma, la nanoencapsulación de los aceites esenciales ayuda a prolongar la persistencia del aceite esencial en la superficie de aplicación.

Finalmente, se pudo observar que en los tres aceites las formulaciones de NP de Eudragit® S100 tuvieron porcentajes de liberación mayores que la NP de quitosano, lo cual pudo deberse a la estructura polimérica que forma a la nanocápsula. Es probable que la pared de polímero del quitosano tuviera menos porosidad debido al entrecruzamiento con el TPP, lo cual favoreció la retención del aceite esencial en el interior de la nanocápsula.



### *Análisis de las NP por FT-IR*

Con el objetivo de observar las interacciones entre los componentes de las NP, se realizó un análisis de FT-IR tanto de los aceites esenciales como de las formulaciones de nanocápsulas con los aceites esenciales incorporados. Las señales para cada formulación se observan en las Figuras 18-20. Cabe mencionar que la identificación de estructuras y grupos funcionales se hicieron con base en la comparación de espectros reportados por el *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology* de Japón (2018) y las longitudes de onda reportadas en la literatura (Silverstein *et al.*, 1980; Evonik, 2011).

#### Formulaciones con el aceite esencial de los frutos y hojas de *S. molle*

En las Figuras 18 y 19 se observan bandas características del estiramiento O-H del Eudragit S100 después de 3000 cm<sup>-1</sup>, además de los estiramientos C-H para los grupos metilos y metilenos del polímero, del aceite esencial y del limoneno. La banda presente en 1726 cm<sup>-1</sup> es dada por el estiramiento C=O de los grupos éster y carboxilo del polímero. Mientras que alrededor de 1450 cm<sup>-1</sup>, se observa una banda dada por el estiramiento C-C del polímero, el limoneno, el poloxamer y el aceite esencial.

En el caso de las formulaciones de NP con Eudragit® S100, se puede observar que las bandas presentes en la región de estiramientos C-H aumentaron, debido a que tanto el aceite como el polímero presentan estiramientos en esa área, por lo que se van acumulando la intensidad de las señales. Como los aceites esenciales de fruto y hojas difieren en la proporción de sus componentes mayoritarios, teniendo la misma composición, los espectros de las NP de estos aceites son casi iguales. Sin embargo, es posible observar pequeñas diferencias con base a la proporción de sus componentes. En la región de 1370 cm<sup>-1</sup> se observa que aumentó ligeramente la banda respecto al aceite de hoja, posiblemente por la presencia del mirceno. En la región de 1452 cm<sup>-1</sup> se observa que aumentó ligeramente la banda respecto al aceite de fruto, posiblemente por la presencia del limoneno como componente mayoritario. Posteriormente, es posible observar que la banda en 1279 cm<sup>-1</sup>, tiene mayor intensidad que las NP con aceite de frutos, posiblemente debido a la presencia del canfeno y mirceno. Posteriormente, es posible observar que la

banda en 1241 cm<sup>-1</sup>, tiene mayor intensidad que las NP con aceite de hojas, posiblemente debido a la presencia del felandreno como componente mayoritario.

Para las NP de quitosano con el aceite esencial de los frutos de *S. molle*, se observan bandas características del estiramiento O-H y N-H del quitosano después de 3000 cm<sup>-1</sup>, además de los estiramientos C-H para los grupos metilos y metilenos del polímero, del aceite esencial y del limoneno. La banda presente en 1640 cm<sup>-1</sup> es dada por el estiramiento C=O de la parte acetilada del quitosano. Mientras que en 1588 cm<sup>-1</sup>, se observa el aumento de la banda en el espectro de las NP con respecto a la banda localizada en la misma área en el espectro del quitosano, esto posiblemente a la interacción dada entre el quitosano y el TPP (entre cruzamiento), el cual une sus oxígenos con la parte amina del polímero, modificando así la flexión de los NH. Por otro lado, se observan los estiramientos C-C del limoneno y el aceite esencial.

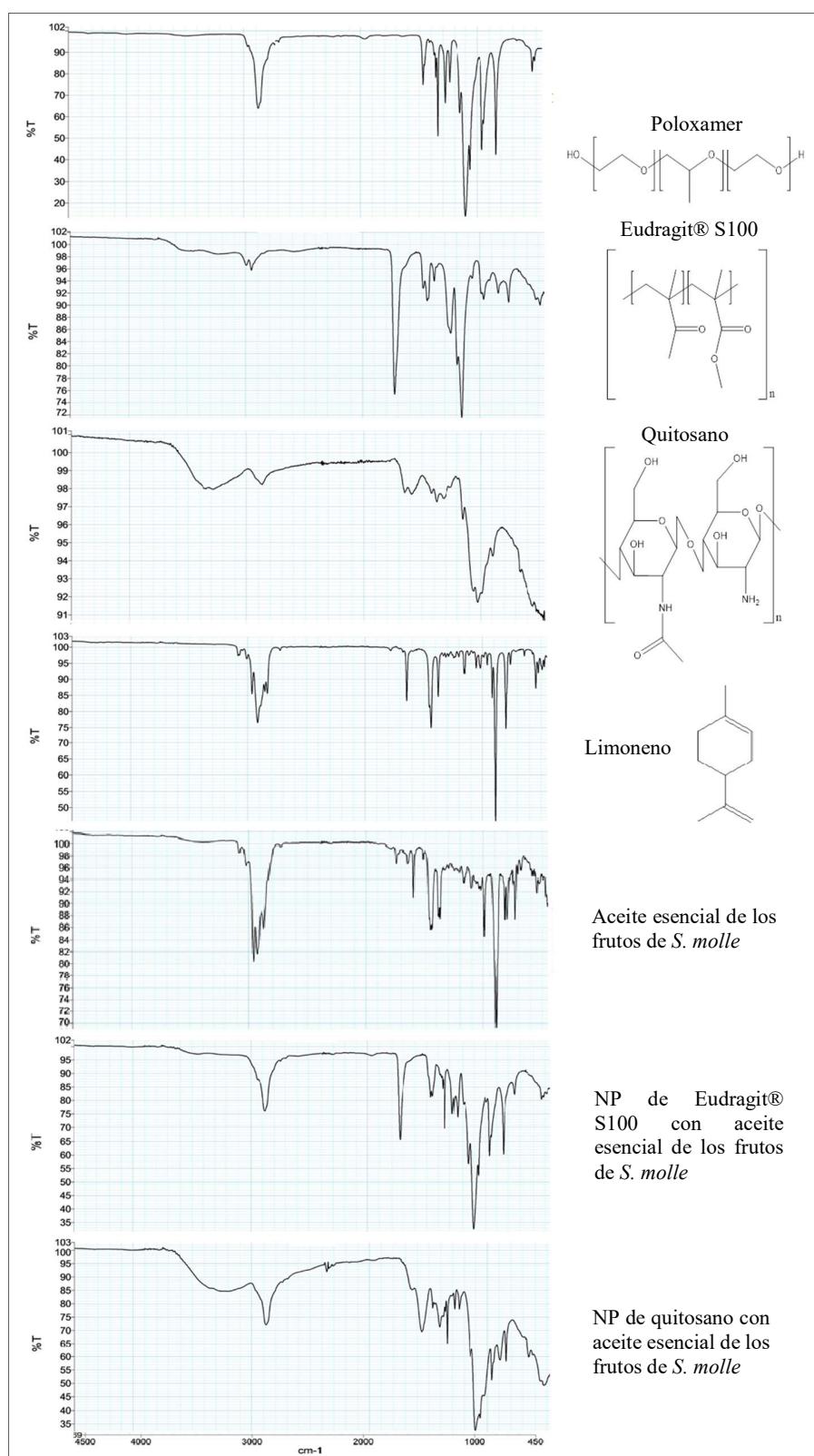
Se puede ver que las bandas presentes en la región de estiramientos C-H aumentaron, debido a que, tanto el aceite como el polímero presentan estiramientos en esa área, por lo que se va acumulando la intensidad de la señal. Como los aceites esenciales de fruto y hojas difieren en la proporción de sus componentes mayoritarios, teniendo la misma composición, los espectros de las NP de estos aceites son casi iguales. Sin embargo, es posible observar pequeñas diferencias con base a la proporción de sus componentes. En la región de 1407 cm<sup>-1</sup> se observa que aumentó ligeramente la banda respecto a al aceite de hoja, posiblemente por la presencia del mirceno. Posteriormente, es posible observar que la banda en 1279 cm<sup>-1</sup>, tiene mayor intensidad que las NP con aceite de frutos, posiblemente debido a la presencia del canfeno y mirceno. Finalmente, es posible observar que la banda en 1241 cm<sup>-1</sup>, tiene mayor intensidad que las NP con aceite de hojas, posiblemente debido a la presencia del felandreno como componente mayoritario.

#### Formulaciones con el aceite esencial de las hojas de *O. basilicum*

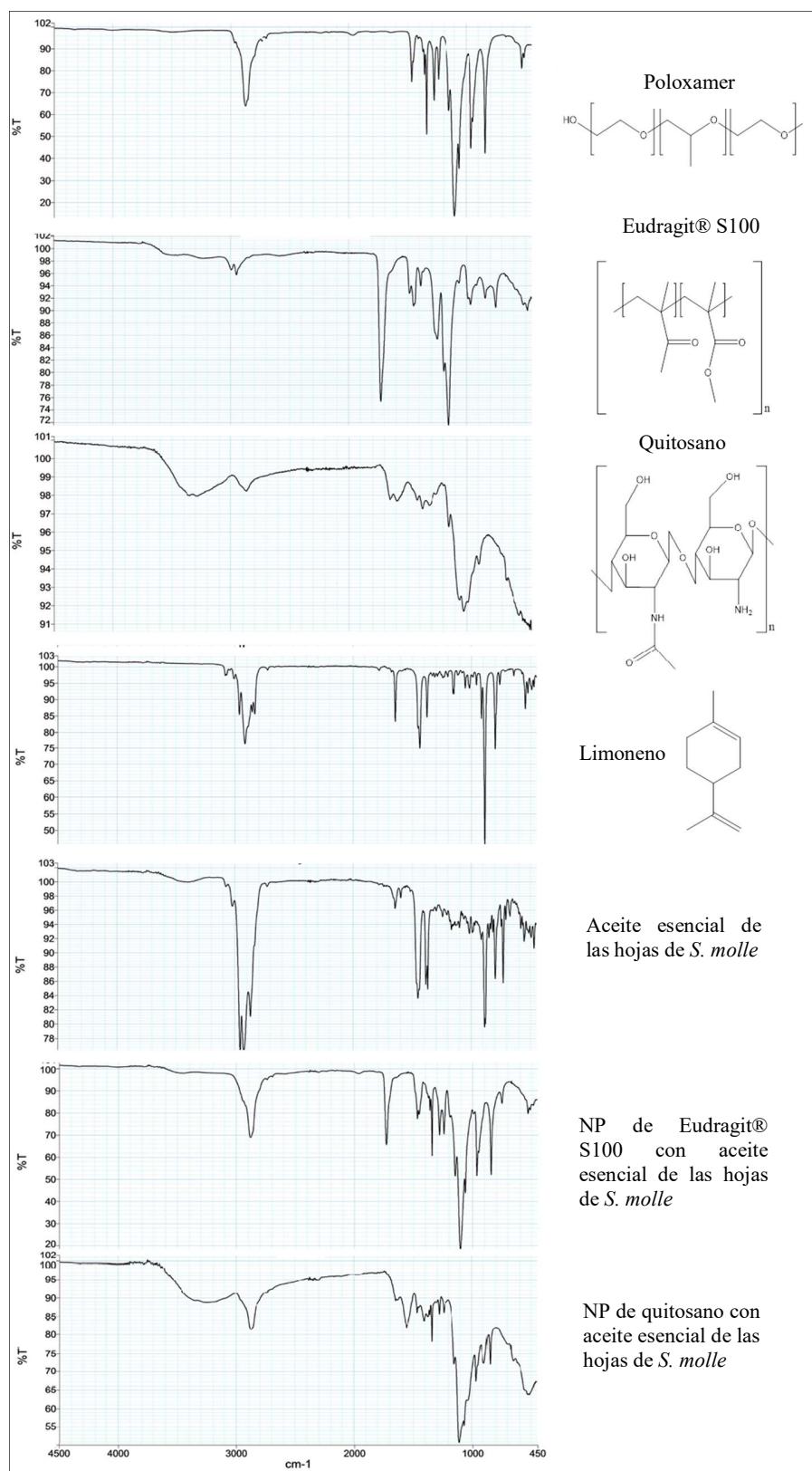
Para las NP de Eudragit S100 con el aceite esencial de hojas de *O. basilicum* (Figura 20), se observan bandas características del estiramiento O-H del Eudragit S100 y del linalool después de 3000 cm<sup>-1</sup>, además de los estiramientos C-H para los grupos metilos y

metilenos tanto del polímero, del aceite esencial y del linalol. La banda presente en 1726  $\text{cm}^{-1}$  es dada por el estiramiento C=O del éster y carboxilo del polímero. Mientras que alrededor de 1450  $\text{cm}^{-1}$ , se observa una banda dada por el estiramiento C-C del polímero, el linalool, el poloxamer y el aceite esencial. Se puede observar que las bandas presentes en la región de estiramientos C-H aumentaron, debido a que, tanto el aceite, como el polímero presentan estiramientos en esa área, por lo que se va acumulando, aumentando la señal. En comparación con las NP de aceite esencial de *S. molle*, se puede observar que la banda en 1637  $\text{cm}^{-1}$  es ligeramente mayor debido al cinamato de metilo como componente mayoritario, además de que en el área de huella digital de alrededor de 600  $\text{cm}^{-1}$  es diferente a la de las otras NP.

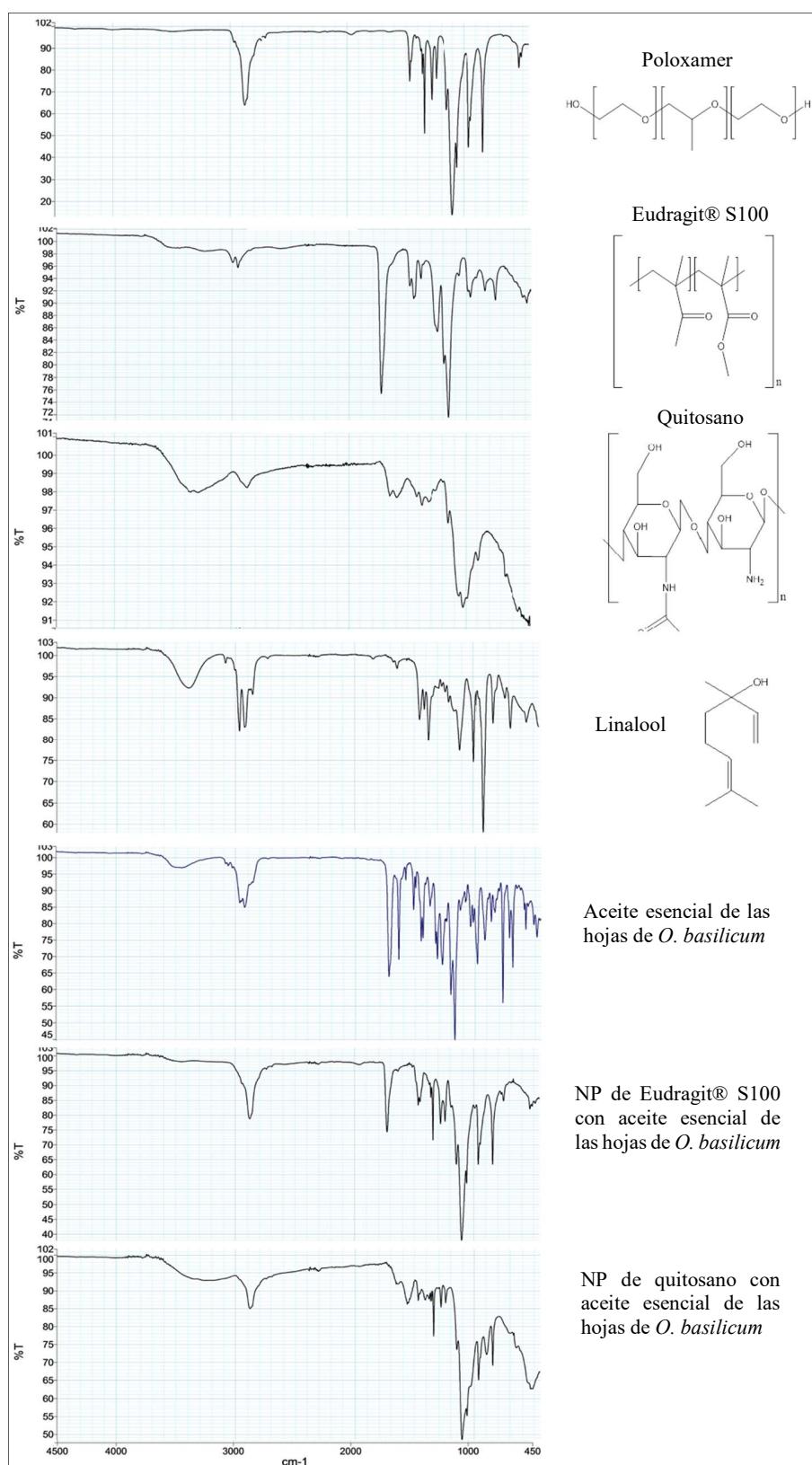
Para las NP de quitosano con el aceite esencial de las hojas de *O. basilicum*, se observan bandas características del estiramiento O-H y N-H del quitosano después de 3000  $\text{cm}^{-1}$ , además de los estiramientos C-H para los grupos metilos y metilenos tanto del polímero, del aceite esencial y del linalool. La banda presente en 1640  $\text{cm}^{-1}$  es dada por el estiramiento C=O de la parte acetilada del quitosano. Mientras que en 1588  $\text{cm}^{-1}$ , se observa el aumento de la banda en las NP respecto a la banda localizada en la misma área en el espectro del quitosano, esto posiblemente a la interacción dada entre el quitosano y el TPP (entrecrezamiento), el cual une sus oxígenos con la parte amina del polímero, modificando así la flexión de los NH. Por otro lado, se observan los estiramientos C-C del limoneno y el aceite esencial. Se puede ver que las bandas presentes en la región de estiramientos C-H aumentaron, debido a que tanto el aceite como el polímero presentan estiramientos en esa área, por lo que se va acumulando, aumentando la señal. En comparación con las NP de aceite esencial de *S. molle*, se puede observar que las bandas en 1466 son menores, debido a que uno de sus componentes mayoritarios no es el mirceño. También se puede observar que la banda en 1280 y en 841  $\text{cm}^{-1}$  aumentaron ligeramente respecto a las otras NP debido al metil cinamato, que es el componente mayoritario. El análisis completo se muestra en el Anexo II.



**Figura 18.** Espectros FT-IR de las NP cargadas con el aceite esencial de los frutos de *S. molle* y sus componentes.



**Figura 19.** Espectros FT-IR de las NP cargadas con el aceite esencial de las hojas de *S. molle* y sus componentes.



**Figura 20.** Espectros FT-IR de las NP cargadas con el aceite esencial de las hojas de *O. basilicum* y sus componentes

## Evaluaciones biológicas de los aceites esenciales libres y encapsulados en NP

Como se mencionó anteriormente, es fundamental conocer la composición de un aceite esencial para estimar su potencial uso como insecticida. Está reportado que algunos de los componentes mayoritarios (limoneno y el linalool) de los aceites esenciales evaluados tienen actividad contra *Ae. aegypti* (Pandey *et al.*, 2013). La presencia de linalool y eucaliptol en el aceite de *O. basilicum* es muy común, así también como el limoneno en el aceite esencial de *S. molle*. Los componentes principales del aceite de *O. basilicum* resultaron ser compuestos oxigenados (monoterpenos y derivado del fenilpropano), mientras que los mayoritarios de los aceites de *S. molle* fueron terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) con insaturaciones. Es conocido que los compuestos oxigenados de los aceites esenciales son más efectivos contra insectos (Koul *et al.*, 2008), como por ejemplo el linalool (Tiwary *et al.*, 2007). Sin embargo, otros compuestos como el limoneno, acetato de bornilo y pineno también han demostrado tener una buena actividad insecticida por sus insaturaciones (Park *et al.*, 2003).

### *Actividad larvicida contra Ae. aegypti*

La evaluación de la actividad larvicida fue realizada con larvas del tercer estadio de *Ae. aegypti* a diferentes concentraciones. Como se puede ver en la Tabla 17 el aceite esencial de las hojas de *S. molle* fue el más activo ( $DL_{50} = 14.2$  ppm), después el aceite de los frutos de *S. molle* ( $DL_{50} = 21.3$  ppm), y por último el aceite de *O. basilicum* ( $DL_{50} = 87.5$  ppm). El aceite de los frutos de *S. molle* resultó ser rico en  $\alpha$ -felandreno, mientras que el de las hojas tuvo mayormente limoneno. Es probable que estos compuestos hayan sido los responsables de la mayor actividad larvicida de los aceites esenciales de *S. molle* con respecto al de *O. basilicum*. En particular, Cheng y col. (2003) reportaron que las  $DL_{50}$  del limoneno y el felandreno contra *Ae. aegypti* fueron de 18.2 y 16.6 ppm, lo cual refuerza nuestra suposición. Por su parte, aunque tuvo menor actividad larvicida que los aceites esenciales de *S. molle*, el aceite de *O. basilicum* de este estudio mostró tener mayor actividad larvicida ( $DL_{50} = 87$  ppm) que los reportados previamente para esta especie, como los obtenidos por Prajapati y col. (2005) y Murugan y col. (2007) con valores de 171 y 313 ppm, respectivamente. Estas diferencias pudieran deberse a la composición de

los aceites. Cabe señalar que la actividad de este aceite esencial es dada, principalmente, por el linalool, el cual ha mostrado tener una DL<sub>50</sub> de 50 ppm contra larvas de *Ae. aegypti*.

En general, los aceites esenciales libres y encapsulados en NP usados en este trabajo pueden considerarse seguros para su uso tanto para su actividad larvicida como repelente, ya que, la Agencia Alemana de Cooperación Técnica (GTZ) recomienda una concentración máxima de 5.000 ppm en condiciones de laboratorio.

Por otro lado, es importante mencionar que las diferentes actividades de los aceites esenciales evaluados se deben a la naturaleza de su composición. Los compuestos de estos aceites, como el limoneno, el eugenol y el eucaliptol, podrían actuar como toxinas, impidiendo la alimentación y la ovoposición (Koul *et al.*, 2008). Los mecanismos de acción de los aceites esenciales no están bien definidos. Sin embargo, se conoce que las actividades biológicas de los aceites esenciales están relacionadas con los grupos funcionales, abundancia y propiedades fisicoquímicas (i.e. estructura, tamaño molecular) de cada compuesto.

En particular, el cambio en el comportamiento del insecto, como falta de coordinación e hiperactividad, es un indicativo de actividad neurotóxica de los componentes de los aceites esenciales, especialmente los monoterpenos (Palacios *et al.*, 2009; Chaubey, 2012). En este caso, compuestos como el limoneno (*S. molle*) y el eucaliptol (*O. basilicum*) pudieron ser tóxicos al penetrar el cuerpo del insecto por la vía respiratoria o a través de las articulaciones, tanto en larvas como en adultos (Park *et al.*, 2003). Está reportado que los insecticidas naturales afectan la fisiología del organismo de diferente maneras y en varios receptores (Rattan, 2010), siendo el principal modo de acción el bloqueo del sistema octopaminérgico y colinérgico (Kostyukovsky *et al.*, 2002; Ismail, 2006; Yeom *et al.*, 2012).

Por ejemplo, un estudio mostró que el eugenol, compuesto de tipo fenilpropano, evaluado contra cucarachas, actúa como mimético de la octopamina (neurotransmisor, neuromodulador y neurohormona en invertebrados) o antagonista, ya que actuó sobre la

neurona DUM (*Dorsal Unpaired Median neuron*) (Price y Berry, 2006). Por otro lado, se observó que el aceite esencial de *Citrus aurantium* (con 87% de limoneno) en *Bemisia* el aceite esencial de *Tabaci* y *Pinus densiflora* en *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* y *C. pipiens*, afecta al sistema colinérgico, bloqueando la actividad de la acetilcolinesterasa; además se observó una correlación entre este bloqueo y la actividad larvicida (Lee y Ahn, 2013; Zarrad *et al.*, 2015). La acetilcolinesterasa juega un papel en la sinapsis colinérgica, una función biológica esencial. El bloqueo de este sistema causa una acumulación de acetilcolina, por lo que la membrana postsináptica estaría continuamente estimulada. Finalmente, aunque los efectos físicos pueden ser posibles, como la disrupción de membrana o el bloqueo del sistema traqueal, aún no hay una evidencia concluyente (Rattan, 2010).

Hay pocos reportes de la relación entre la actividad y la estructura de los componentes de los aceites esenciales. Sin embargo, se ha estudiado la acción de algunos de estos compuestos (i.e. carvacrol, eugenol, eucaliptol y geraniol) contra el receptor de octopamina y de acetilcolinesterasa en *Ae. aegypti* por simulación (modelamiento homólogo y estudios de unión). Se observó que son neurotóxicos, actuando sobre los receptores de la acetilcolinesterasa y de la octopamina. Ambos receptores son proteínas que tienen en sus sitios activos algunos aminoácidos como serina, histidina y glutamato, por lo que se ha sugerido que la inhibición de los receptores en los sistemas colinérgico y octopaminérgico se da en la parte polar, específicamente con el grupo hidroxilo de la serina, a través de una interacción electrostática con un grupo amino (Khanikor *et al.*, 2013). En general, la actividad insecticida de los compuestos de los aceites esenciales está dada por sus partes polares y dobles enlaces presentes en sus estructuras (Miyazawa y Yamafuji, 2005; López y Pascual-Villalobos, 2010; Pandey *et al.*, 2013).

**Tabla 17.** Evaluaciones biológicas de los aceites esenciales libres y encapsulados en NP.

Tratamiento		<i>Ae. aegypti</i>		<i>A. salina</i>
		Repelencia espacial	Actividad larvicida	Toxicidad
		Tratamiento (mg/mL)	SAI* (SD) n=6	DL <sub>50</sub> (ppm) (CI 95%, LI**-LS***) n=3
Aceite esencial	<i>O. basilicum</i> (hojas)	0.25	0.11 (0.39)	
		0.75	0.79 (0.26)	87.5 (1.7-56.6)
		1.5	0.92 (0.20)	34.2 (27.6-46.8)
	<i>S. molle</i> (frutos)	0.25	0.11 (0.30)	
		0.75	0.31 (0.30)	21.3 (2.7-21.3)
		1.5	0.82 (0.27)	976.5 (592.7-3857.9)
	<i>S. molle</i> (hojas)	0.25	0.21 (0.37)	
		0.75	0.45 (0.39)	14.2 (1.9-14.1)
		1.5	0.68 (0.21)	963.2 (939.3-2834)
Nanopartículas (Eudragit S100)	<i>O. basilicum</i> (hojas)	0.25	0.28 (0.26)	
		0.75	0.33 (0.28)	71.60 (60.5-83.0)
		1.5	0.38 (0.22)	507.9 (371.4-743.9)
	<i>S. molle</i> (frutos)	0.25	0.17 (0.18)	
		0.75	0.24 (0.27)	95.9 (86.5-106.5)
		1.5	0.28 (0.14)	2107.3 (967.2-6790.2)
	<i>S. molle</i> (hojas)	0.25	0.21 (0.23)	
		0.75	0.21 (0.21)	40.9 (33.6-47.8)
		1.5	0.26 (0.22)	2765.9 (1432.8-18036.0)
Nanopartículas (Quitosano)	<i>O. basilicum</i> (hojas)	0.25	0.28 (0.31)	
		0.75	0.30 (0.29)	66.6 (59.8-73.6)
		1.5	0.42 (0.34)	666.2 (360.0-7422.1)
	<i>S. molle</i> (frutos)	0.25	0.23 (0.11)	
		0.75	0.28 (0.33)	92.5 (84.7-100.6)
		1.5	0.34 (0.18)	2635.8 (1040.9-1.0x10 <sup>6</sup> )
	<i>S. molle</i> (hojas)	0.25	0.18 (0.28)	
		0.75	0.23 (0.11)	50.6 (44.3-56.6)
		1.5	0.25 (0.15)	2166.4 (1006.9-53403.6)

\*SAI: Spatial Activity Index; \*\* P < 0.5

\*\*Límite inferior

\*\*\*Límite superior

En general, los aceites encapsulados en NP de Eudragit® S100 y quitosano tuvieron menor actividad larvicida, con DL mayores a 50 ppm (Tabla 17). La diferencia entre las actividades de los aceites libres y encapsulados se debe, principalmente, a que al estar

contenidos en la estructura polimérica se van liberando lentamente conforme pasa el tiempo, por lo que su efecto no es inmediato (López *et al.*, 2014). Algo similar fue reportado por Ahmadi y col. (2017) para el aceite esencial de *A. millefolium* encapsulado en NP de quitosano. En el estudio determinaron la actividad insecticida contra *T. urticae* y observaron una  $DL_{50}=5$  ppm para el aceite libre, mientras que para los encapsulados fue mayor ( $DL_{50}= 18-127$  ppm). Este comportamiento coincide con el ensayo de liberación de los aceites esenciales libres (NE) y encapsulados en NP (Figura 17), en el que se puede observar que las formulaciones de NP en comparación a la NE liberan controladamente a los aceites esenciales, lo que resulta en una menor actividad larvicia aparente, ya que a largo plazo tendrá una actividad biológica sostenida durante más tiempo que los aceites esenciales libres.

#### ***Actividad repelente contra Ae. aegypti***

La repelencia espacial se evaluó en base al SAI (*Spatial Activity Index*), el cuál varía en un intervalo de -1 a 1. El 0 indica que no hay respuesta, mientras que valores cercanos a -1 indican atracción y los cercanos a 1 repelencia. Se observó (Tabla 17) que todos los aceites tuvieron actividad repelente. En particular, el aceite de *O. basilicum* mostró tener la actividad más alta de los tres, seguido por el de los frutos de *S. molle* y, por último, el de las hojas de *S. molle*.

En un estudio realizado en 2013, se evaluaron diferentes plantas aromáticas para conocer su actividad repelente contra *Anopheles arabiensis*. Entre estas plantas evaluaron a *S. molle* y *O. suave*. Al igual que en el presente trabajo, se observó que el aceite esencial de la especie de *O. suave* tuvo una repelencia del 100% en 5 min a su dosis más baja (0.05%), mientras que la obtenida con el aceite de *S. molle* en el mismo tiempo fue a una dosis mucho mayor (2%) (Massebo *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos para *O. basilicum* concuerdan con lo reportado en la literatura (Prajapati *et al.*, 2005; Amer y Mehlhorn, 2006), donde se ha registrado una alta actividad repelente tanto para esta especie como para otras del mismo género, como *O. americanum* (Kweka *et al.*, 2008; Boonyuan *et al.*, 2014; Sathantriphop *et al.*, 2015), *O. suave* (Massebo *et al.*, 2013) y *O. kilimandscharicum* (Kweka *et al.*, 2008).

Existen pocos reportes, específicamente, de la actividad repelente espacial de aceites esenciales y/o de sus componentes con el sistema HITSS. En uno de estos estudios, fue evaluada la repelencia espacial contra *Ae. aegypti* de varios aceites esenciales (*C. nardus*, *Ocimum americanum*, *Nepeta cataria* y *Vetiveria zizanoides*) e insecticidas comúnmente utilizados (DEET y picaridina). Ellos observaron que con *C. nardus* y *O. americanum* (1-3%) obtuvieron valores de SAI similares al DEET (~1) (Sathantriphop *et al.*, 2015). Por otro lado, se estudió la repelencia espacial de los aceites esenciales de clavo y patchouli, así como también de algunos de sus componentes principales (guaieno, buleseno, cariofileno, longifoleno e isocariofileno), obteniendo valores de SAI de 0.34 a 0.77, siendo el aceite esencial de clavo el más repelente (0.77) (Zhang *et al.*, 2003). Algunos de estos compuestos están presentes en nuestros aceites esenciales, aunque se encuentran en menor proporción con respecto a los mayoritarios. No obstante, al estar como una mezcla de compuestos existe la posibilidad que actúen simultáneamente teniendo un efecto sinérgico.

Se ha demostrado que otras plantas, que tienen como componentes mayoritarios al linalool y/o al eucaliptol, presentan una actividad repelente alta contra mosquitos de diferentes especies (*Aedes*, *Culex* y *Anopheles*). Por ejemplo, se evaluaron seis plantas entre las cuales se encontraban tres ricas en limoneno (*Citrus sinensis*, *Foeniculum vulgare* y *Pinus pinea*) y una rica en eucaliptol y linalool (*Eucalyptus globulus*), para ver su actividad larvicida y repelente contra *C. pipiens*. El aceite de eucalipto mostró mejor actividad repelente que los ricos en limoneno, sin embargo, éstos mostraron una mejor actividad larvicida. Por otro lado, fue evaluada la repelencia espacial del linalool, determinando que cuando era usado como adyuvante de otro insecticida (1-octenol-3-ol), aumentaba en un 50% la actividad (Kline *et al.*, 2003). Así también, ya ha sido demostrada la actividad del eugenol, uno de los compuestos en *O. basilicum*, como repelente de mosquitos (Isman, 2000; Del Fabbro y Nazzi, 2008).

Aunque no existan muchos reportes de actividad repelente de *S. molle* contra mosquitos, si hay diversos estudios que han reportado su actividad repelente contra otro tipo de

insectos: *Blattella germanica*, *Trogoderma granarium*, *Tribolium castaneum*, *Nezara viridula*, *Sitophilus oryzae*, *Triatoma infestans* y *Xanthogaleruca luteola*, entre otros (Sánchez-Chopa *et al.*, 2006; Benzi *et al.*, 2009; Abdel-Sattar *et al.*, 2010; Huerta *et al.*, 2010; González, Gutiérrez, *et al.*, 2011). Específicamente, para *Sitophilus oryzae* mostró índices de 0.3 a 0.4 de repelencia (Benzi *et al.*, 2009), similares a los obtenidos en los niveles medios de las dosis contra *Ae. aegypti*.

Al igual que para la actividad insecticida, aún no está bien elucidado el modo de acción de los aceites esenciales repelentes en insectos (Paluch *et al.*, 2010; Bohbot y Dickens, 2012). Las propiedades fisicoquímicas de los componentes de los aceites esenciales, como estructura, insaturaciones, punto de ebullición y grupos funcionales, entre otros, afectan la manera en la que se mueven e interactúan los compuestos con los insectos (Rice y Coats, 1994). Las moléculas volátiles llegan al insecto, específicamente a las quimiosensillas, donde se unen a proteínas transportadoras hacia las neuronas del olfato (Paluch *et al.*, 2010). Se llevó a cabo un estudio de los efectos moleculares de 10 repelentes y un piretroide con *Ae. aegypti* y éstos mostraron modular la función de los receptores de los mosquitos a través de múltiples mecanismos moleculares, observando efectos en uno o más receptores de olores (Bohbot *et al.*, 2011). Posiblemente, los repelentes de insectos reducen el contacto entre el mosquito y el humano al interactuar con los receptores de olores (RUP), afectando su olfato (Ditzen *et al.*, 2008). Por otro lado, fue realizado un análisis QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*) para entender un poco acerca del mecanismo de acción de los repelentes con *Ae. aegypti*. En el estudio se usaron algunos sesquiterpenos presentes comúnmente en los aceites esenciales (santalol, bisabolol, farnesol, elemol, eudesmol, hederanol, valerenol, fokienol, nerolidol, elemeno y 10-epi- $\gamma$ -eudesmol), así también como el DEET. De acuerdo a las propiedades electrónicas y electrotiológicas de los sesquiterpenos evaluados, llegaron a la conclusión de que una presión de vapor baja en un compuesto es favorable para la repelencia, los carbonos 1 y 7 afectan la actividad, y por último, que los compuestos con mejor actividad fueron el heilcario y el 10-epi- $\gamma$ -eudesmol (Paluch *et al.*, 2009). Cabe mencionar que estos últimos están presentes en *S. molle* en baja proporción. En otro estudio, evaluaron diversos componentes de los aceites esenciales de geranio y jengibre, de los cuales el limoneno,

linalool y eucaliptol resaltaron como componentes activos en el análisis de detección electroantoeográfica, esto quiere decir que las antenas del insecto respondieron a la presencia de estos compuestos, los cuales podrían ser utilizados como posibles repelentes (Campbell *et al.*, 2011). La mayoría de los compuestos reportados como repelentes están oxigenados (García *et al.*, 2005; Ceferino Toloza *et al.*, 2006; Nerio *et al.*, 2010), en el caso de nuestros aceites concuerda con la actividad más alta que fue de *O. basilicum*, con compuestos mayoritarios oxigenados.

Por otra parte, tanto la actividad larvicida como la repelente disminuyeron en el caso de los aceites esenciales nanoencapsulados. Esta disminución de actividad biológica realmente es aparente, ya que al estar encapsulados y protegidos del medio exterior, los componentes del aceite esencial no tienen interacción al mismo tiempo con el insecto, como cuando están de forma libre (López *et al.*, 2014). Al estar incorporados en nanocápsulas, los compuestos se van liberando de la NP paulatinamente, teniendo una liberación controlada (Figura 17). Cabe mencionar, que esto es importante para la protección de los componentes de los aceites esenciales del medio exterior, ya que se evitaría que los compuestos se oxidén o degraden prematuramente al estar expuestos a factores como el oxígeno del aire, la luz solar y la humedad (Ribeiro *et al.*, 2013). Esto es comparable con lo reportado por López y col. (2014), quienes evaluaron el aceite esencial de *S. molle* libre y encapsulado en micropartículas contra *H. irritans*. Observaron que la actividad se veía disminuida en comparación con la actividad del aceite libre. Sin embargo, también observaron que conforme pasaba el tiempo la actividad del aceite encapsulado aumentaba, demostrando que tenía liberación controlada (López *et al.*, 2014). Este comportamiento fue parecido al obtenido en este trabajo, ya que mientras a las 24 h sólo algunas larvas estaban muertas, mientras que a las 48 h se obtuvo el 100% de mortalidad.

### **Toxicidad contra *A. salina***

Comúnmente, se piensa que, por su origen natural, los productos derivados de las plantas son seguros para ser utilizados como tratamientos alternativos en diversas aplicaciones. Por ejemplo, una de estas aplicaciones es su uso como insecticidas o repelentes para

sustituir compuestos como el DEET (Trumble, 2000). Por lo tanto, aunque los componentes principales o mayoritarios de los productos naturales con actividad repelente puedan tener baja toxicidad, se debe tener cuidado con la toxicidad de los demás componentes (Leal, 2014). Debido a esto es fundamental la determinación de la toxicidad de los productos naturales y sus derivados.

En este trabajo, se realizó un ensayo con *A. salina* para evaluar la toxicidad de los aceites esenciales (libres y nanoencapsulados) en organismos no blanco. En la Tabla 17 se puede observar que el aceite de *O. basilicum* tuvo una alta toxicidad con DL<sub>50</sub> alrededor de 30 ppm. La toxicidad de esta planta, y de otras de su mismo género, ya han sido reportadas con DL<sub>50</sub> de 9 a 18 ppm (Parra *et al.*, 2001).

En Perú fue determinada la toxicidad en *A. salina* de extractos etanólicos y acuosos de 341 plantas. Dos de estas plantas fueron *O. basilicum* y *S. molle*. El extracto metanólico de la primera resultó medianamente tóxica (DL<sub>50</sub>=274), mientras que ninguno de los extractos la segunda presentaron toxicidad (DL<sub>50</sub> > 10,000) (Bussmann *et al.*, 2011). En base a lo anterior, se recomendó tener cuidado en la manera de aplicación de estos productos naturales (Maia y Moore, 2011). Por ejemplo, se sugiere que el aceite esencial tóxico no sea usado directamente en la piel (Del Fabbro y Nazzi, 2008).

Al igual que en este estudio, la toxicidad para *S. molle* resultó ser mucho menor que la de *O. basilicum*, con DL<sub>50</sub> muy cercanas a 1000 ppm; similar a los reportes en algunos estudios (DL<sub>50</sub>=450-1179 ppm) (Oliva *et al.*, 2007; Dos Santos *et al.*, 2010). Así, los dos aceites de *S. molle* pueden considerarse no tóxicos ( $\geq$ 1000 ppm) según los criterios reportados en la literatura (Franssen *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 2007).

Cabe señalar que la DL<sub>50</sub> contra *A. salina* fue mayor que la DL<sub>50</sub> contra *Ae. aegypti*, es decir, que se podría aplicar con cierta seguridad debido a que las dosis larvicidas y repelentes son mucho menores que las DL<sub>50</sub> de toxicidad.

Respecto a lo obtenido con las NP, se puede ver claramente como disminuye la toxicidad cuando están encapsulados. Específicamente, la toxicidad del aceite de *O. basilicum* que había resultado altamente tóxico, al probarse en su forma libre disminuyó considerablemente al ser nanoencapsulado. Esto muestra que este tipo de NP, no solo protegen a los componentes de los aceites esenciales, sino que también pueden ayudar a modular sus propiedades biológicas.

Actualmente, no existen estudios con *A. salina* de productos naturales encapsulados. Sin embargo, se han desarrollado varios ensayos para pruebas ecotoxicológicas (organismos no blanco) con otro tipo de nanoencapsulados. En India, evaluaron la toxicidad de 16 formulaciones de NP (NP metálicas, con fármaco, lípidas, geles) con *A. salina* y MTT. Observaron que el ensayo de *A. salina* arrojó resultados más confiables, por lo que reportan que es una técnica fiable para la evaluación de la ecotoxicidad de las NP.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, los aceites de *O. basilicum* y *S. molle* están compuestos por moléculas activas (i.e. limoneno, linalool,  $\alpha$ -felandreno) contra *Ae. aegypti* con potencial para ser usados como bioinsecticidas. El aceite esencial de *O. basilicum* tuvo la mejor actividad repelente, sin embargo, resultó ser tóxico para organismos no blanco acuáticos, por lo que se deberá tener cuidado con su aplicación. Por su parte, los aceites de *S. molle* tuvieron una buena actividad larvicida y no fueron tóxicos a organismos no blanco acuáticos. Este estudio reveló la importancia de los aceites esenciales encapsulados en NP como alternativa a tratamientos ineficientes debido a que prolongan la permanencia de los aceites esenciales por su liberación controlada. Se puede considerar, de acuerdo a la Agencia de cooperación Técnica Alemana, que tanto las formulaciones de aceites esenciales libres y encapsulados tienen un potencial uso como bioinsecticidas y/o repelentes, ya que estuvieron por debajo de los 5000 pm.

## **PERSPECTIVAS**

- ✓ Evaluar distintos polímeros para la preparación de NP cargadas con los aceites esenciales de *S. molle* y *O. basilicum*.
- ✓ Encapsular otros aceites esenciales con actividad insecticida.
- ✓ Evaluar la actividad insecticida en adultos de *Ae. aegypti*.
- ✓ Probar las formulaciones con otro tipo de insectos vectores.
- ✓ Evaluar la toxicidad de las formulaciones obtenidas y los aceites esenciales utilizados con otro tipo de organismos no blanco.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABDEL-SATTAR, E., A.A. ZAITOUN, M.A. FARAG, S.H. EL GAYED, F.M.H. HARRAZ, P. TAYLOR, E. ABDEL-SATTAR, ET AL. 2010. Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. *Natural Product Research* 24: 226–235.
- ABREU, F.O.M.S., E.F. OLIVEIRA, H.C.B. PAULA, R.C.M. DE PAULA, and R.C.M. DE PAULA. 2012. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. *Carbohydrate Polymers* 89: 1277–1282.
- ADAMS, R. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Allured Publishing Corporation, USA.
- AGNIESZKA, N., and M. GANTNER. 2012. Chemical composition of essential oils from the buds and leaves of cultivated hazelnut. *Acta Scientiarum Polonorum* 11: 91–100.
- AHMADI, Z., M. SABER, M. BAGHERI, and G.R. MAHDAVINIA. 2017. *Achillea millefolium* essential oil and chitosan nanocapsules with enhanced activity against *Tetranychus urticae*. *Journal of Pest Science* 1–12.
- AL-MASKRI, A.Y., M.A. HANIF, M.Y. AL-MASKARI, A.S. ABRAHAM, J.N. AL-SABAHI, and O. AL-MANTHERI. 2011. Essential oil from *Ocimum basilicum* (Omani Basil): a desert crop. *Natural product communications* 6: 1487—1490.
- AMER, A., and H. MEHLHORN. 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research* 99: 466–472.
- AUYSAWASDI, N., S. CHUNTRANULUCK, S. PHASOMKUSOLSIL, and V. KEERATINIJAKAL. 2016. Improving the effectiveness of three essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). *Parasitology Research* 115: 99–106.
- AVERINA, E., and E. ALLÉMANN. 2013. Encapsulation of alimentary bioactive oils of the Baikal Lake area into pH-sensitive micro- and nanoparticles. *LWT - Food Science and Technology* 53: 271–277.
- BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK, and M. IDAOMAR. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446–475.
- BARANAUSKIEN, R., P. RIMANTAS, A. GALDIKAS, D. SENULIENÉ, and A. SETKUS. 2005. Food Chemistry Testing of microencapsulated flavours by electronic nose and SPME-GC. *Food Chemistry* 92: 45–54.
- BELHAMEL, K., A. ABDERRAHIM, and R. LUDWIG. 2008. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Schinus molle* L. grown in Algeria. *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 2: 175–177.
- BENZI, V., N. STEFANAZZI, and A. A FERRERO. 2009. Biological Activity of Essential Oils from Leaves and Fruits of Pepper Tree (*Schinus molle* L.) to Control Rice Weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Chilean journal of agricultural research* 69: 154–159.
- BICCHI, C., C. CORDERO, E. LIBERTO, P. RUBIOLO, B. SGORBINI, and P. SANDRA. 2005. Impact of phase ratio , polydimethylsiloxane volume and size , and sampling temperature and time on headspace sorptive extraction recovery of some volatile compounds in the essential oil field. *Journal of Chromatography A* 1071: 111–118.
- BICCHI, C., C. CORDERO, E. LIBERTO, P. RUBIOLO, B. SGORBINI, and P. SANDRA. 2007. Sorptive tape extraction in the analysis of the volatile fraction emitted from biological solid matrices. *Journal of Chromatography A* 1148: 137–144.
- BICCHI, C., C. CORDERO, E. LIBERTO, B. SGORBINI, and P. RUBIOLO. 2008. Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. *Journal of Chromatography A* 1184: 220–233.

- BICCHI, C., C. CORDERO, E. LIBERTO, B. SGORBINI, and P. RUBIOLO. 2007. Reliability of fibres in solid-phase microextraction for routine analysis of the headspace of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 1152: 138–149.
- BICCHI, C., S. DRIGO, and P. RUBIOLO. 2000. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction – gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A* 892: 469–485.
- BOHBOT, J.D., and J.C. DICKENS. 2012. Odorant receptor modulation: Ternary paradigm for mode of action of insect repellents. *Neuropharmacology* 62: 2086–2095.
- BOHBOT, J.D., L. FU, T.C. LE, K.R. CHAUHAN, C.L. CANTRELL, and J.C. DICKENS. 2011. Multiple activities of insect repellents on odorant receptors in mosquitoes. *Medical and Veterinary Entomology* 25: 436–444.
- BOONYUAN, W., J.P. GRIECO, M.J. BANGS, A. PRABARIPAI, S. TANTAKOM, and T. CHAREONVIRIYAPHAP. 2014. Excito-repellency of essential oils against an *Aedes aegypti* (L.) field population in Thailand. *Journal of Vector Ecology* 39: 112–122.
- BOUKHATEM, M.N., F.M. AMINE, A. KAMELI, F. SAIDI, K. WALID, and S.B. MOHAMED. 2014. Quality Assessment of the Essential Oil from *Eucalyptus globulus* Labill of Blida (Algeria) Origin. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy* 36: 303–315.
- BROWN, P.N., and P. LISTER. 2014. Current initiatives for the validation of analytical methods for botanicals. *Current Opinion in Biotechnology* 25: 124–128.
- BUSSMANN, R.W., G. MALCA, A. GLENN, D. SHARON, B. NILSEN, B. PARRIS, D. DUBOSE, ET AL. 2011. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 137: 121–140.
- CABREDO-PINILLOS, S., T. CEDRÓN-FERNÁNDEZ, A. PARRA-MANZANARES, and C. SÁENZ-BARRO. 2004. Determination of volatile compounds in wine by automated solid-phase microextraction and gas chromatography. *Chromatographia* 59: 733–738.
- CAMPBELL, C., R. GRIES, and G. GRIES. 2011. Forty-two compounds in eleven essential oils elicit antennal responses from *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 138: 21–32.
- CDC. 2015. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*. 3. Available at: <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/spanish/MosquitoLifecycle-sp.pdf>.
- CDC. 2016. Efectos y riesgos en la salud. El virus del Zika. CDC. Available at: <https://espanol.cdc.gov/enes/zika/healtheffects/index.html>.
- CEFERINO TOLOZA, A., J. ZYGADLO, G.N. MOUGABURE CUETO, F. BIURRUN, E. ZERBA, and M.A. INÉS PICOLLO. 2006. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J. Med. Entomol* 43: 889–895.
- CETIN, M., A. ATILA, and Y. KADIOGLU. 2010. Formulation and in vitro characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA nanoparticles containing diclofenac sodium. *AAPS PharmSciTech* 11: 1250–1256.
- CHAUBEY, M.K. 2012. Acute, lethal and synergistic effects of some terpenes against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ecologia Balkanica* 4: 53–62.
- CHENG, S.S., H.T. CHANG, S.T. CHANG, K.H. TSAI, and W.J. CHEN. 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology* 89: 99–102.
- CHIFFELLE, I., A. HUERTA, M. CELIS, and J.E. ARAYA. 2013. Proximal analysis and insecticidal effects of extracts from pepper tree (*Schinus molle*) leaves on elm leaf beetle (*Xanthogaleruca luteola*) larvae. *Industrial Crops and Products* 43: 523–528.

- CHORNY, M., I. FISHBEIN, H.D. DANENBERG, and G. GOLOMB. 2002. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release* 83: 389–400.
- CHRISTOFOLI, M., E. CRISTINA CANDIDA COSTA, K. U. BICALHO, V. DE CASSIA DOMINGUES, M. FERNANDES PEIXOTO, C. CRISTINA FERNANDES ALVES, W. ARAÚJO, and C. DE MELO CAZAL. 2015. Insecticidal effect of nanoencapsulated essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) in *Bemisia tabaci* populations. *Industrial Crops and Products* 70: .
- COTA-ARRIOLA, O., M. ONOFRE CORTEZ-ROCHA, A. BURGOS-HERNÁNDEZ, J. MARINA EZQUERRA-BRAUER, and M. PLASCENCIA-JATOMEA. 2013. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: Development of new strategies for microbial control in agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 1525–1536.
- CUI, H., C. ZHAO, and L. LIN. 2015. The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu. *Food Control* 56: 128–134.
- DAS, S., M. PHARM, P.K. SURESH, R. DESMUKH, and M. PHARM. 2010. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 6: 318–323.
- DÍAZ-MAROTO, M.C.D., P.-C.M. S., and C.M. D. 2002. Headspace Solid-Phase Microextraction Analysis of Volatile Components of Spices Volatile compounds in spices. *Chromatographia* 55: 729–735.
- DITZEN, M., M. PELLEGRINO, and L.B. VOSSHALL. 2008. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science (New York, N.Y.)* 319: 1838–1842.
- EPHREM, E., H. GREIGE-GERGES, H. FESSI, and C. CHARCOSSET. 2014. Optimisation of rosemary oil encapsulation in polycaprolactone and scale-up of the process. *Journal of Microencapsulation* 31: 746–753.
- EVONIK. 2011. EUDRAGIT L 100 and EUDRAGIT S 100. 1–7.
- DEL FABBRO, S., and F. NAZZI. 2008. Repellent effect of sweet basil compounds on *Ixodes ricinus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 45: 219–228.
- FAN, W., W. YAN, Z. XU, and H. NI. 2012. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 90: 21–27.
- FAO. 2005. Desarrollo de un sistema integral de aseguramiento de calidad para laboratorios de análisis de alimentos en América del Sur. *TCP/RLA/3013 (A)* 3013: 1–85.
- FERRERO, A. A., J.O. WERDIN GONZÁLEZ, and C. SÁNCHEZ CHOPA. 2006. Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia* 77: 381–383.
- FESSI, H., F. PUISIEUX, J.P. DEVISSAGUET, N. AMMOURY, and S. BENITA. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55: R1–R4.
- FIEL, L.A., R.V. CONTRI, J.F. BICA, F. FIGUEIRÓ, A.M.O. BATTASTINI, S.S. GUTERRES, and A.R. POHLMANN. 2014. Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies. *Nanoscale Research Letters* 9: 1–11.
- FOLLETT, P. A., K. RIVERA-LEONG, and R. MYERS. 2014. Rice weevil response to basil oil fumigation. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17: 119–121.
- FRANSSEN, F.F.J., L.J.J.W. SMEIJSTERS, I. BERGER, and B.E. MEDINILLA ALDANA. 1997. In vivo and in vitro antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1500–1503.
- GALINDO-RODRÍGUEZ, S., E. ALLE, H. FESSI, and E. DOELKER. 2004. Associated with nanoparticle formation in the salting-out, nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical Research* 21: 1428–1439.

- GALINDO-RODRÍGUEZ, S., E. ALLÉMANN, E. DOELKER, and H. FESSI. 2005. Versatility of three techniques for preparing ibuprofen-loaded methacrylic acid copolymer nanoparticles of controlled sizes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 15: 347–354.
- GARCÍA, M., O.J. DONADEL, C.E. ARDANAZ, C.E. TONN, and M.E. SOSA. 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science* 61: 612–618.
- GIESY, J.P., K.R. SOLOMON, D. MACKAY, and J. ANDERSON. 2014. Evaluation of evidence that the organophosphorus insecticide chlorpyrifos is a potential persistent organic pollutant (POP) or persistent, bioaccumulative, and toxic (PBT). *Environmental Sciences Europe* 1–20.
- GIRMAY, K., B. FIKRE, A. ASMELASH, B. GETACHEW, E. TEKLE, and N. RAJA. 2014. Evaluation of water and ethanol extracts of *Schinus molle* Linn. against immature *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Journal of Coastal Life Medicine* 2: 471–477.
- GLENN, G.M., A.P. KLAMCZYNSKI, D.F. WOODS, B. CHIOU, W.J. ORTS, and S.H. IMAM. 2010. Encapsulation of Plant Oils in Porous Starch Microspheres. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 4180–4184.
- GONZÁLEZ, J., M. GARCÍA-BARRIUSO, M. GORDALIZA, and F. AMICH. 2011. Traditional plant-based remedies to control insect vectors of disease in the Arribes del Duero ( western Spain ): An ethnobotanical study. *Journal of Ethnopharmacology* 138: 595–601.
- GONZÁLEZ, J.W., M.M. GUTIÉRREZ, and A.A. FERRERO. 2011. Repellency assays with plant extracts and essential oils from *Schinus molle* var. areira (L.) (Anacardiaceae) and DEET against *Nezara viridula* L. (Hemiptera : Pentatomidae). *BioAssay* 6: 1–4.
- GOVINDARAJAN, M., R. SIVAKUMAR, M. RAJESWARY, and K. YOGALAKSHMI. 2013. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology* 134: 7–11.
- GRIECO, J.P., N.L. ACHEE, M.R. SARDELIS, K.R. CHAUHAN, and D.R. ROBERTS. 2005. A novel high-throughput screening system to evaluate the behavioral response of adult mosquitoes to chemicals. *Journal of the American Mosquito Control Association* 21: 404–411.
- GUERRA-BOONE, L., and L. GUERRA BOONE. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina tradicional. UANL.
- HALLIER, A., V. NOIROT, B. MEDINA, L. LEBOEUF, and S. CAVRET. 2013. Development of a method to determine essential oil residues in cow milk. *Journal of Dairy Science* 96: 1447–1454.
- HO, C.W., W.M. WAN AIDA, M.Y. MASKAT, and H. OSMAN. 2006. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compound in palm sugar (*Arenga pinnata*). *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 822–830.
- HOSSEINI, S.F., M. ZANDI, M. REZAEI, F. FARAHMANDGHAVI, S. FAKHREDDIN, M. ZANDI, M. REZAEI, and F. FARAHMANDGHAVI. 2013. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles : Preparation , characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* 95: 50–56.
- HUERTA, A., I. CHIFFELLE, K. PUGA, F. AZÚA, and J.E. ARAYA. 2010. Toxicity and repellence of aqueous and ethanolic extracts from *Schinus molle* on elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola*. *Crop Protection* 29: 1118–1123.
- HYLDGAARD, M., T. MYGIND, and R.L. MEYER. 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3: 1–24.
- ISMAIL, M. 2006. Central properties and chemical composition of *Ocimum basilicum* essential oil. *Pharmaceutical Biology* 44: 619–626.
- ISMAN, M.B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603–608.

- JIMÉNEZ, C., R. VENTURA, and J. SEGURA. 2002. Validation of qualitative chromatographic methods: strategy in antidoping control laboratories. *Journal of Chromatography B* 767: 341–351.
- KALE, M., N. RATHORE, S. JOHN, and D. BHATNAGAR. 1999. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes : a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology Letters* 105: 197–205.
- KAROLEWICZ, B. 2016. A review of polymers as multifunctional excipients in drug dosage form technology. *Saudi Pharmaceutical Journal* 24: 525–536.
- KEAN, T., and M. THANOU. 2010. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62: 3–11.
- KÉITA, S.M., C. VINCENT, J.P. SCHMIT, J.T. ARNASON, and A. BÉLANGER. 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. *Journal of Stored Products Research* 37: 339–349.
- KHANIKOR, B., P. PARIDA, R.N.S. YADAV, and D. BORA. 2013. Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and docking studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3: 6–12.
- KLINÉ, D.L., U.R. BERNIER, K.H. POSEY, and D.R. BARNARD. 2003. Olfactometric evaluation of spatial repellents for *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology* 40: 463–467.
- KOSTIĆ, M., Z. POPOVIĆ, D. BRKIĆ, S. MILANOVIC, I. SIVČEV, and S. STANKOVIĆ. 2008. Larvicidal and antifeedant activity of some plant-derived compounds to *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Limantriidae). *Bioresource Technology* 99: 7897–7901.
- KOSTYUKOVSKY, M., A. RAFAELI, C. GILEADI, N. DEMCHENKO, and E. SHAAYA. 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: Possible mode of action against insect pests. *Pest Management Science* 58: 1101–1106.
- KOUL, O., S. WALIA, and G.S. DHALIWAL. 2008. Essential oils as green pesticides: Potential and constraints. *Biopesticides International* 4: 63–84.
- KOVAČEVIĆ, M., and M. KAČ. 2001. Solid-phase microextraction of hop volatiles. *Journal of Chromatography A* 918: 159–167.
- KUMAR, S., N. WAHAB, and R. WARIKOO. 2011. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1: 85–88.
- KWEKA, E.J., F. MOSHA, A. LOWASSA, A.M. MAHANDE, J. KITAU, J. MATOWO, M.J. MAHANDE, ETAL. 2008. Ethnobotanical study of some of mosquito repellent plants in north-eastern Tanzania. *Malaria Journal* 7: 152.
- LADEAU, S.L., B.F. ALLAN, P.T. LEISNHAM, and M.Z. LEVY. 2015. The ecological foundations of transmission potential and vector-borne disease in urban landscapes. *Functional Ecology* 29: 889–901.
- LAI, F., S.A. WISSING, R.H. MÜLLER, and A.M. FADDA. 2006. *Artemisia arborescens* L essential oil – loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application : preparation and characterization. *AAPS PharmSciTech* 7: 1–9.
- LEAL, W.S. 2014. The enigmatic reception of DEET - The gold standard of insect repellents. *Current Opinion in Insect Science* 6: 93–98.
- LEE, D.C., and Y.J. AHN. 2013. Laboratory and simulated field bioassays to evaluate larvicidal activity of *Pinus densiflora* Hydrodistillate, its constituents and structurally related compounds against *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* in relation to their inhibition. *Insects* 4: 217–229.
- LEE, J.-H., T.G. PARK, Y.-B.. LEE, T.G. PARK, Y.-B. LEE, S.-C. SHIN, and H.-K. CHOI. 2001. Effect of adding

- non-volatile oil as a core material for the floating microspheres prepared by emulsion solvent diffusion method. *Journal of Microencapsulation* 18: 65–75.
- LERTSUTTHIWONG, P., P. ROJSITTHISAK, and U. NIMMANNIT. 2009. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. *Materials Science and Engineering C* 29: 856–860.
- LIECHTY, W.B., D.R. KRYSCIO, B. V SLAUGHTER, and N.A. PEPPAS. 2010. Polymers for Drug Delivery Systems. *The Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 1: 149–73.
- LIMA, T.C., T.K.M. DA SILVA, F.L. SILVA, J.M. BARBOSA-FILHO, M.O.M. MARQUES, R.L.C. SANTOS, S.C. DE H. CAVALCANTI, and D.P. DE SOUSA. 2014. Larvicidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. *Chemosphere* 104: 37–43.
- LIU, Y., S. WANG, R. ZHANG, W. LAN, and W. QIN. 2017. Development of poly(lactic acid)/chitosan fibers loaded with essential oil for antimicrobial applications. *Nanomaterials* 7: 194.
- LÓPEZ, A., S. CASTRO, M.J. ANDINA, X. URES, B. MUNGUÍA, J.M. LLABOT, H. ELDER, ET AL. 2014. Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. *Industrial Crops and Products* 53: 209–216.
- LÓPEZ, M.D., M.J. JORDÁN, and M.J. PASCUAL-VILLALOBOS. 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *Journal of Stored Products Research* 44: 273–278.
- LÓPEZ, M.D., and M.J. PASCUAL-VILLALOBOS. 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products* 31: 284–288.
- LUGO ESTRADA, L. 2012. Obtención y caracterización de nanopartículas poliméricas para la encapsulación de aceites esenciales por la técnica de nanoprecipitación. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- LV, Y., F. YANG, X. LI, X. ZHANG, and S. ABBAS. 2014. Formation of heat-resistant nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation. *Food Hydrocolloids* 35: 305–314.
- MAESTRE-SERRANO, R., D. GOMEZ-CAMARGO, G. PONCE-GARCÍA, and A.E. FLORES. 2014. Susceptibility to insecticides and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from the Colombian Caribbean Region. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 116: 63–73.
- MAIA, M.F., and S.J. MOORE. 2011. Plant-based insect repellents : a review of their efficacy , development and testing. *Malaria Journal* 10: 1–14.
- MAITZ, M.F. 2015. Applications of synthetic polymers in clinical medicine. *Biosurface and Biotribology* 1: 161–176.
- MAJI, T.K., I. BARUAH, S. DUBE, and M.R. HUSSAIN. 2007. Microencapsulation of *Zanthoxylum limonella* oil (ZLO) in glutaraldehyde crosslinked gelatin for mosquito repellent application. *Bioresource Technology* 98: 840–844.
- MARTINS, I.M., S.N. RODRIGUES, M.F. BARREIRO, and A.E. RODRIGUES. 2011. Release of thyme oil from polylactide microcapsules. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 50: 13752–13761.
- MARTINS, M.D.R., S. ARANTES, F. CANDEIAS, M.T. TINOCO, and J. CRUZ-MORAIS. 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology* 151: 485–492.
- MASSEBO, F., M. TADESCSE, M. BALKEW, and T. GEBRE-MICHAEL. 2013. Bioactivity of essential oils of local plants against adult *Anopheles arabiensis* ( Diptera : Culicidae ) in Ethiopia \*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2013: 805–809.
- MASSEBO, F., M. TADESCSE, T. BEKELE, M. BALKEW, and T. GEBRE-MICHAEL. 2009. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus ( Diptera , Culicidae ) in Ethiopia. *African Journal of Biotechnology* 8: 4183–4188.

- MAURYA, P., P. SHARMA, L. MOHAN, M.M. VERMA, and C.N. SRIVASTAVA. 2012. Larvicidal efficacy of *Ocimum basilicum* extracts and its synergistic effect with neonicotinoid in the management of *Anopheles stephensi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2: 110–116.
- MIKHAIEL, A. A. 2011. Potential of some volatile oils in protecting packages of irradiated wheat flour against *Ephestia kuehniella* and *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research* 47: 357–364.
- MILAM, C.D., J.L. FARRIS, and J.D. WILHIDE. 2000. Evaluating mosquito control pesticides for effect on target and nontarget organisms. *Archives of environmental contamination and toxicology* 39: 324–328.
- MIYAZAWA, M., and C. YAMAFUJI. 2005. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1765–1768.
- MORA-HUERTAS, C.E., H. FESSI, and A. ELAISSARI. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385: 113–142.
- MORRIS, G. A., J. CASTILE, A. SMITH, G.G. ADAMS, and S.E. HARDING. 2011. The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP) – chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers* 84: 1430–1434.
- MURUGAN, K., P. MURUGAN, and A NOORTHEEN. 2007. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). *Bioresource Technology* 98: 198–201.
- NAHA, P., H. BYRNE, and H.J. BYRNE. 2012. Role Of polymeric excipients on controlled release profile of glipizide from PLGA and Eudragit RS 100 nanoparticles. *Cellulose* 9: 1–9.
- NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. 2018. No Title. *SDBSWeb*. Available at: <http://sdbs.db.aist.go.jp>.
- NENAAH, G.E., and S.I.A. IBRAHIM. 2011. Chemical composition and the insecticidal activity of certain plants applied as powders and essential oils against two stored-products coleopteran beetles. *Journal of Pest Science* 84: 393–402.
- NERIO, L.S., J. OLIVERO-VERBEL, and E. STASHENKO. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101: 372–378.
- NUCHUCHUA, O., U. SAKULKU, N. UAWONGYART, S. PUTTIPIPATKHACHORN, A. SOOTTITANTAWAT, and U. RUKTANONCHAI. 2009. In vitro characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. *AAPS PharmSciTech* 10: 1234–1242.
- OLIVA, M. DE LAS M., N. GALLUCCI, J.A. ZYGADLO, and M.S. DEMO. 2007. Citotoxic activity argentinean essential oils .pdf. *Pharmaceutical Biology* 45: 259–262.
- OMS. 2013. Centro de prensa La enfermedad de Chagas (trípanosomiasis americana).
- OUYANG, G., and J. PAWLISZYN. 2008. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* 7: 184–197.
- PAES, J.L., L.R.D.A. FARONI, O.D. DHINGRA, P.R. CECON, and T.A. SILVA. 2012. Insecticidal fumigant action of mustard essential oil against *Sitophilus zeamais* in maize grains. *Crop Protection* 34: 56–58.
- PALACIOS, S.M., A. BERTONI, Y. ROSSI, R. SANTANDER, and A. URZÚA. 2009. Efficacy of essential oils from edible plants as insecticides. *Molecules* 19: 1938–1947.
- PALUCH, G., L. BARTHOLOMAY, and J. COATS. 2010. Mosquito repellents: A review of chemical structure diversity and olfaction. *Pest Management Science* 66: 925–935.
- PALUCH, G., J. GRODNITZKY, L. BARTHOLOMAY, and J. COATS. 2009. Quantitative structure-activity relationship of botanical sesquiterpenes: Spatial and contact repellency to the yellow fever mosquito, *aedes aegypti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 7618–7625.

- PANDEY, S.K., S. TANDON, A. AHMAD, A.K. SINGH, and A.K. TRIPATHI. 2013. Structure-activity relationships of monoterpenes and acetyl derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest Management Science* 69: 1235–1238.
- PANKAJ, N., M. HITENDRA, I. PRADUM, and P. RAJPUT. 2017. Development and in vitro evaluation of Eudragit RLPO based polymeric nanoparticles of Lansoprazole. *Indian Journal of Novel Drug Delivery* 8: 165–174.
- PARK, H., and I. PARK. 2012. Larvicidal activity of Amyris balsamifera, Daucus carota and Pogostemon cablin essential oils and their components against *Culex pipiens pallens*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15: 631–634.
- PARK, I.-K., S.-G. LEE, D.-H. CHOI, J.-D. PARK, and Y.-J. AHN. 2003. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Stored Products Research* 39: 375–384.
- PARRA, A.L., R.S. YHEBRA, I.G. SARDIÑAS, L.I. BUELA, A. LOGARTO PARRA, R. SILVA YHEBRA, I. GUERRA SARDIÑAS, and L. IGLESIAS BUELA. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD<sub>50</sub> value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8: 395–400.
- PAULA, H.C.B., F.M. SOMBRA, R. DE F. CAVALCANTE, F.O.M.S. ABREU, and R.C.M. DE PAULA. 2011. Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil. *Materials Science and Engineering: C* 31: 173–178.
- PAULEY, L.R., J.E. EARL, and R.D. SEMLITSCH. 2015. Ecological Effects and Human Use of Commercial Mosquito Insecticides in Aquatic Communities. *Journal of Herpetology* 49: 28–35.
- PAVELA, R. 2014. Insecticidal properties of *Pimpinella anisum* essential oils against the *Culex quinquefasciatus* and the non-target organism *Daphnia magna*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17: 287–293.
- PAWLISZYN, J. 1997. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. Wiley.
- PEREIRA, J.L., S.C. ANTUNES, B.B. CASTRO, C.R. MARQUES, A.M.M. GONC, and R. PEREIRA. 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18: 455–463.
- PÉREZ-DE-LUQUE, A., and D. RUBIALES. 2009. Nanotechnology for parasitic plant control. *Pest Management Science* 540–545.
- PETEU, S.F., F. OANCEA, O.A. SICUIA, F. CONSTANTINESCU, and S. DINU. 2010. Responsive Polymers for Crop Protection. *Polymers* 2: 229–251.
- PICCAPIETRA, F., F. PICCAPIETRA, B. WAGNER, B. WAGNER, F. MARCONI, F. MARCONI, R. KAEGI, ET AL. 2008. Toxicity of silver nanoparticles. *Environmental Science & Technology* 42: 8959–8964.
- PRAJAPATI, V., A. K. TRIPATHI, K.K. AGGARWAL, and S.P.S. KHANUJA. 2005. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrant activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology* 96: 1749–1757.
- PRAMOD, K., U.K. ILYAS, Y.T. KAMAL, S. AHMAD, S.H. ANSARI, and J. ALI. 2013. Development and validation of RP-HPLC-PDA method for the quantification of eugenol in developed nanoemulsion gel and nanoparticles. *Journal of Analytical Science and Technology* 4: 16/1-16/6.
- PRICE, D.N., and M.S. BERRY. 2006. Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *Journal of Insect Physiology* 52: 309–319.
- RAO, J.P., and K.E. GECKELER. 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* 36: 887–913.
- RATTAN, R.S. 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop*

*Protection* 29: 913–920.

- RIBEIRO, W.L.C., I.T.F. MACEDO, J.M.L. DOS SANTOS, E.F. DE OLIVEIRA, A.L.F. CAMURÇA-VASCONCELOS, H.C.B. DE PAULA, and C.M.L. BEVILAQUA. 2013. Activity of chitosan-encapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil on *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology* 135: 24–29.
- RICE, P.J., and J.R. COATS. 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Physiology, toxicology and biochemistry* 85: 1172–1179.
- RIVERO-CRUZ, B., I. RIVERO-CRUZ, J.M. RODRÍGUEZ, C.M. CERDA-GARCÍA-ROJAS, and R. MATA. 2006. Qualitative and quantitative analysis of the active components of the essential oil from *Brickellia veronicaefolia* by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Natural Products* 69: 1172–1176.
- RODRIGUEZ-LAFUENTE, A., C.N. DE LA PUERTA, and R. BATLLE. 2009. Determination of fifteen active compounds released from paraffin-based active packaging in tomato samples via microextraction techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395: 203–211.
- ROMERO, I., D.L. GARCÍA-GONZÁLEZ, R. APARICIO-RUIZ, and M.T. MORALES. 2015. Validation of SPME-GC/MS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects. *Talanta* 134: 394–401.
- ROMERO, J., P. LÓPEZ, C. RUBIO, R. BATLLE, and C. NERÍN. 2007. Strategies for single-drop microextraction optimisation and validation application to the detection of potential antimicrobial agents. *Journal of Chromatography A* 1166: 24–29.
- ROWE, R., P. SHESKEY, and M. QUINN. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients. *Handbook of pharmaceutical excipients, Sixth edition* 549–553.
- RUÍZ-GARCÍA, Y., J.A. PINO, L. LAMI, and Y. MARTÍNEZ-PÉREZ. 2015. Development and validation of a solid-phase microextraction method for the determination of total flavouring content in encapsulated flavouring. *Food Analytical Methods* 8: 2228–2234.
- SÁNCHEZ-CHOPA, C., R. ALZOGARAY, and A. FERRERO. 2006. Repellency Assays with *Schinus molle* var. areira (L.) (Anacardiaceae) essential oils against *Blattella germanica* L. (Blattodea: Blattellidae). *BioAssay* 1: 1–3.
- DOS SANTOS, H.M., D.F. OLIVEIRA, D.A. DE CARVALHO, J.M.A. PINTO, V.A.C. CAMPOS, A.R.B. MOURÃO, C. PESSOA, ET AL. 2010. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. *Journal of Natural Medicines* 64: 231–238.
- SATHANTRIPHOP, S., N.L. ACHEE, U. SANGUANPONG, and T. CHAREONVIRIYAPHAP. 2015. The effects of plant essential oils on escape response and mortality rate of *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus*. *Journal of Vector Ecology* 40: 318–326.
- SENHORINI, G.A., S.F. ZAWADZKI, P. V. FARAGO, S.M.W. ZANIN, and F.A. MARQUES. 2012. Microparticles of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) loaded with andiroba oil: Preparation and characterization. *Materials Science and Engineering: C* 32: 1121–1126.
- SILVA, C.O., P. RIJO, J. MOLPECERES, I.V. FIGUEIREDO, L. ASCENSÃO, A.S. FERNANDES, A. ROBERTO, and C.P. REIS. 2015. Polymeric nanoparticles modified with fatty acids encapsulating betamethasone for anti-inflammatory treatment. *International Journal of Pharmaceutics* 493: 271–284.
- SILVA, W.J., G.A.A. DORIA, R.T. MAIA, R.S. NUNES, G.A. CARVALHO, A.F. BLANK, P.B. ALVES, ET AL. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresource Technology* 99: 3251–3255.
- SILVERSTEIN, R.M., G.C. BASSLER, and T.C. MORRILL. 1980. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. Diana, México.
- SMITH-VERA, S., D.F. ZAMBRANO, S.C. MÉNDEZ-SANCHEZ, F. RODRÍGUEZ-SANABRIA, E.E. STASHENKO,

- and J.E. DUQUE LUNA. 2014. Essential oils with insecticidal activity against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 113: 2647–2654.
- SOHN, S.O., S.M. LEE, Y.M. KIM, J.H. YEUM, J.H. CHOI, and H. DO GHIM. 2007. Aroma finishing of PET fabrics with PVAc nanoparticles containing lavender oil. *Fibers and Polymers* 8: 163–167.
- SOLOMON, B., F.F. SAHLE, T. GEBRE-MARIAM, K. ASRES, and R.H.H. NEUBERT. 2012. Microencapsulation of citronella oil for mosquito-repellent application: Formulation and in vitro permeation studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 80: 61–66.
- SOUZA, J.P.B., A.P.S. BRANCALION, A.B. SOUZA, I.C.C. TURATTI, S.R. AMBRÓSIO, N. A J.C. FURTADO, N.P. LOPES, and J.K. BASTOS. 2011. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54: 653–659.
- SPARKS, T.C., and R. NAUEN. 2014. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121: 122–128.
- SRITABUTRA, D., and M. SOONWERA. 2013. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 3: 271–276.
- SSA. 2011. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. México.
- SSA. 2004a. Densidad relativa (Ficha No. MG 0771). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* 8a edición: .
- SSA. 2004b. Índice de refracción (Ficha No. MGA 0741). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* 8a edición: .
- SSA. 2001. Programa de Acción: Enfermedades Transmitidas por Vector Programa de Acción Enfermedades Transmitidas por Vector. *Secretaría de Salud*.
- SSA. 2004c. Rotación óptica (Ficha No. MG 0771). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* 8a edición: .
- TABANCA, N., A. ALI, U.R. BERNIER, I.A. KHAN, B. KOCYIGIT-KAYMAKCIOLU, E.E. ORUÇ-EMRE, S. UNSALAN, and S. ROLLAS. 2012. Biting deterrence and insecticidal activity of hydrazide-hydrazone and their corresponding 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles against *Aedes aegypti*. *Pest Management Science* 69: 703–708.
- TABANCA, N., C. AVONTO, M. WANG, J.F. PARCHER, A. ALI, B. DEMIRCI, V. RAMAN, and I.A. KHAN. 2013. Comparative investigation of *Umbellularia californica* and *Laurus nobilis* leaf essential oils and identification of constituents active against *aedes aegypti*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 12283–12291.
- TELCI, I., E. BAYRAM, G. YILMAZ, and B. AVCI. 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basil (Ocimum basilicum L.). *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 489–497.
- TIWARY, M., M. TIWARY, S.N. NAIK, S.N. NAIK, D.K. TEWARY, D.K. TEWARY, P.K. MITTAL, ET AL. 2007. Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylum armatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors Mohini. *Medecine Et Hygiene* 198–204.
- TRUMBLE, J.T. 2000. Caveat Emptor: Safety Considerations for Natural Products Used in Arthropod Control. *American entomologist* 48: 7–13.
- VARONA, S., Á. MARTÍN, and M.J. COCERO. 2009. Formulation of a natural biocide based on lavandin essential oil by emulsification using modified starches. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48: 1121–1128.
- VILLAVICENCIO-NIETO, M.Á., and B.E. PÉREZ-ESCANDÓN. 2010. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica* 193–238.
- WEI, H., J. LIU, B. LI, Z. ZHAN, Y. CHEN, H. TIAN, S. LIN, and X. GU. 2015. The toxicity and physiological effect of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against the diamondback moth, *Plutella*

- xylostella (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection* 76: 68–74.
- WHO. 2017a. Chikunguya-Nota descriptiva. *Enfermedades tropicales*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/es/>.
- WHO. 2015. Dengue and severe dengue. *WHO*. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
- WHO. 2017b. Dengue y dengue grave-Nota descriptiva. *Enfermedades tropicales*.
- WHO. 1981. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides.
- WHO. 2016. Weekly Epidemiological Report.
- YANG, F.L., X.G. LI, F. ZHU, and C.L. LEI. 2009. Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera : Tenebrionidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 10156–10162.
- YANG, N., A. LI, F. WAN, W. LIU, and D. JOHNSON. 2010. Effects of plant essential oils on immature and adult sweetpotato white fly, *Bemisia tabaci* biotype B. *Crop Protection* 29: 1200–1207.
- YANOLA, J., S. CHAMNANYA, N. LUMJUAN, and P. SOMBOON. 2015. Insecticides resistance in the *Culex quinquefasciatus* populations from northern Thailand and possible resistance mechanisms. *Acta Tropica* 149: 232–238.
- YANOLA, J., P. SOMBOON, C. WALTON, W. NACHAIWIENG, P. SOMWANG, and L. PRAPANTHADARA. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 16: 501–9.
- YEOM, H.J., J.S. KANG, G.H. KIM, and I.K. PARK. 2012. Insecticidal and Acetylcholine Esterase Inhibition Activity of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against Adults of German Cockroach (*Blattella germanica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 7194–7203.
- YOUNOUSSA, L., E.N. NUKENINE, S.P.Y. DANGA, and C.O. ESIMONE. 2016. Repellent activity of the creams formulated from *Annona senegalensis* and *Boswellia dalzielii* leaf fractions and essential oils against *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae).
- ZAHED, N., K. HOSNI, N. BEN BRAHIM, and H. SEBEI. 2011. Essential oil composition of *schinus molle* L. Fruits: An ornamental species used as condiment. *Journal of Food Biochemistry* 35: 400–408.
- ZAMBITO, Y., E. PEDRESCHI, and G. DI COLO. 2012. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?— A case study. *International Journal of Pharmaceutics* 434: 28–34.
- ZARRAD, K., A. BEN, I. CHAIEB, A. LAARIF, J.M. JEMÂA, A. BEN HAMOUDA, I. CHAIEB, ET AL. 2015. Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. *Industrial Crops and Products* 76: 121–127.
- ZHANG, Q., A. MARGARYAN, and R.G. SCHNEIDMILLER. 2011. Methods for repelling insects using sesquiterpene hydrocarbons and their derivatives. *United States Patent* 1–14.

## ANEXOS

### Matriz para el diseño experimental de Plackett-Burman

Variables	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A*,a**	+	+	+	+	-	-	-	-
B*,b**	+	+	-	+	+	+	-	-
C*,c**	+	-	+	+	+	-	+	-
D*,d**	+	+	-	+	-	-	+	+
E*,e**	+	-	+	+	-	+	-	+
F*,f**	+	-	-	+	+	-	-	+
G*,g**	+	-	-	+	-	+	+	-
Resultados	s	t	u	V	W	x	y	z

\*Letra mayúscula: nivel alto

\*\*Letra minúscula: nivel bajo

Signo (+) : Nivel alto

Signo (-) : Nivel bajo

## Perfiles de las formulaciones con aceites esenciales por FT-IR

Nanopartículas de Eudragit S100 del aceite esencial de los frutos de *S. molle*.

Banda	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Concordancia (Banda)	Concordancia (Compuesto)	Grupo funcional
1	3466	3488.5	Eudragit S100	Estiramiento OH
2	2946.6	2952.33/2959.02/2917	Eudragit S100/AEPF/Limoneno	Estiramiento CH
3	2880.46	2879.86/2928-2872/2334	Poloxamer/AEPF/Limoneno	Estiramiento CH
4	2753.5	2726	Limoneno	
5	2693	2695.18	Poloxamer	
6	2390.8	2383	AEPF	
7	2364.9	2359.7	AEPF	
8	2309.3	2306.4	AEPF	
9	1963.39	1962.93	Poloxamer	
10	1727.58	1726.79	Eudragit S100	Estiramiento C=O (éster y ac. carboxílico)
11	1466.5	1438.78/1466.67	Eudragit S100/Poloxamer	
12	1451.32	1448.84/1435.97/1455.35/1450.54	Eudragit S100/Limoneno/Poloxamer/AEPF	Estiramiento C-C
13	1372.71	1376.29/1372.74/1377.19	Limoneno/Poloxamer/AEPF	Flexión CH
14	1359.79	1359.8	Poloxamer	
15	1342.52	1342.03	Poloxamer	Flexión OH
16	1278.8	1279.44	Poloxamer	
17	1241.33	1247.51/1241.46/1241.97	Eudragit S100/Poloxamer/Limoneno	Torsión de C=O (ac. Carboxílico)
18	1190.54	1192.05	Eudragit S100	Estiramiento del C-O del éster
19	1145.82	1152.04/1146.15	Eudragit S100/Poloxamer	
20	1101.43	1097/1101.27	Poloxamer/AEPF	Estiramiento C-O
21	1060.42	1059.89	Poloxamer	
22	990.27	990	AEPF	
23	962.12	961.69	Poloxamer	
24	946.79	946.37	Poloxamer	
25	841.47	841.36	Poloxamer	
26	749.49	744.79	AEPF	
27	528.18	529.01/527.56	Poloxamer/AEPF	
28	510.27	509.69	Poloxamer	
29	483.67	488.56/490	Limoneno/AEPF	

Nanopartículas de Eudragit S100 del aceite esencial de las hojas de *S. molle*.

<b>Banda</b>	<b>Frecuencia (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concordancia (Banda)</b>	<b>Concordancia (Compuesto)</b>	<b>Grupo funcional</b>
1	3452.02	3488.5/3403.78	Eudragit S100/AEPH	Estiramiento OH
2	2946.6	2952.33/2957.44/2965	Eudragit S100/AEPH/Limoneno	Estiramiento CH
3	2882.46	2879.86/2927.69-2870.69/2917.57-2856.47	Poloxamer/AEPF/Limoneno	Estiramiento CH
4	2741.67	2726	Limoneno	
5	2694.3	2695.18	Poloxamer	
6	2386.9	2384.3	AEPH	
7	2360.3	2371.4	AEPH	
8	2309.07	2304.8	AEPH	
9	1966.21	1962.93	Poloxamer	
10	1728.98	1726.79	Eudragit S100	Estiramiento C=O (éster y ac. carboxílico)
11	1466.58	1438.78/1466.67	Eudragit S100/Poloxamer	
12	1452.85	1448.84/1435.97/1455.35/1450.3	Eudragit S100/Limoneno/Poloxamer/AEPH	Estiramiento C-C
13	1372.85	1376.29/1372.74/1367.48	Limoneno/Poloxamer/AEPH	Flexión CH
14	1359.85	1359.8	Poloxamer	
15	1342.69	1342.03	Poloxamer	Flexión OH
16	1279.16	1279.44	Poloxamer	
17	1241.46	1241.46/1241.65/1241.97	Poloxamer/AEPH/Limoneno	
18	1190.48	1192.05	Eudragit S100	Estiramiento del C-O del éster
19	1146.07	1152.04/1146.15/1130	Eudragit S100/Poloxamer/AEPH	
20	1102.2	1098.4	AEPH	Estiramiento C-O
21	1060.46	1059.89	Poloxamer	
22	990.86	989.24	AEPH	
23	962.57	961.69	Poloxamer	
24	946.87	946.37	Poloxamer	
25	841.63	841.36	Poloxamer	
26	749.39	744.79	AEPH	
27	671.67	669.97	AEPH	
28	528.59	529.01	Poloxamer	
29	509.75	509.69	Poloxamer	
30	483.52	488.56/490	Limoneno/AEPH	

Nanopartículas de Eudragit S100 del aceite esencial de las hojas de *O. basilicum*.

<b>Banda</b>	<b>Frecuencia (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concordancia (Banda)</b>	<b>Concordancia (Compuesto)</b>	<b>Grupo funcional</b>
1	3454.2	3488.5/3452.03/392.1	Eudragit S100/AEOB/Linalool	Estiramiento OH
2	2951.1	2952.33/2966.37/2969.78	Eudragit S100/AEOB/Linalool	Estiramiento CH
3	2881.72	2879.86/2882.2	Poloxamer/AEOB	Estiramiento CH
4	2739.8	2731.7	AEOB	
5	2695.3	2695.18	Poloxamer	
6	2360.2	2360.8	AEOB	
7	2383.8	2382.4	AEOB	
8	2309.63	2296.2	AEOB	
9	1957.72	1962.93	Poloxamer	
10	1727.63	1726.79/1719.18	Eudragit S100/AEOB	Estiramiento C=O (éster y ac. carboxílico)
11	1637.26	1637.17	AEOB	
12	1516.1	1513.16	AEOB	
13	1466.58	1438.78/1466.67	Eudragit S100/Poloxamer	
14	1451.78	1448.84/1455.35/1450.36/1451.27	Eudragit S100/Poloxamer/AEOB/Linalool	
15	1373	1377.19/1375.67/1375.34	Poloxamer/AEOB/Linalool	Flexión CH
16	1359.76	1359.8	Poloxamer	
17	1342.57	1342.03	Poloxamer	
18	1278.93	1279.44/1272.16	Poloxamer/AEOB	
19	1241.32	1247.51/1241.46/1247	Eudragit S100/Poloxamer	Torsión de C=O (ac. Carboxílico)
20	1190.75	1192.05	Eudragit S100	Estiramiento del C-O del éster
21	1146	1152.04/1146.15	Eudragit S100/Poloxamer	
22	1101.8	1122.74	AEOB	
23	1060.36	1059.89	Poloxamer	
24	991.7	995	Linalool	
25	962.3	961.69	Poloxamer	
26	946.71	946.37	Poloxamer	
27	841.5	841.36	Poloxamer	
28	770.07	767.47	AEOB	
30	528.57	529.01	Poloxamer	
31	509.93	509.69	Poloxamer	
32	484.27	482.16	AEOB	

Nanopartículas de quitosano del aceite esencial de los frutos de *S. molle*.

<b>Banda</b>	<b>Frecuencia (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concordancia (Banda)</b>	<b>Concordancia (Compuesto)</b>	<b>Grupo funcional</b>
1	3200.74	3279.01	Quitosano	Estiramiento OH y NH
2	2878.18	2868.02/2879.86/2965.58/2872.32	Quitosano/Poloxamer/Limoneno/AEPF	Estiramiento CH
3	2744.3	2741.23/2726.34	Poloxamer/Limoneno	
4	2696.9	2695.18	Poloxamer	
5	2360.69	2365.98/2361.2	Limoneno/AEPF	
6	2342.96	2349/2340.32	Limoneno/AEPF	
7	2309.49	2311.23/2310	Limoneno/AEPF	
8	1964.4	1962.93	Poloxamer	
9	1640.21	1640	Quitosano	Estiramiento C=O
10	1559.88	1588.04	Interacción TPP-CS	Flexión NH
11	1466.55	1466.67	Poloxamer	
12	1447.4	1452.06/1450.54	Limoneno/AEPF	Estiramiento C-C
13	1360.25	1376.29/1359.8/1367.96	Limóneno/Poloxamer/AEPF	Flexión CH
14	1342.62	1342.03	Poloxamer	Flexión OH
15	1305.2	1312	AEPF	
16	1280.01	1279.44/1287.88	Poloxamer/Limoneno	
17	1241.33	1241.46/1241.97	Poloxamer/Limoneno	
18	1146.46	1147.96/1146.15/1149.85/1167.67	Limóneno/Poloxamer/Quitosano/AEPF	
19	1101.3	1097.91/1101.27	Poloxamer/AEPF	Estiramiento C-O
20	1060.49	1067, 1026	Quitosano	Flexión OH (Alcohol secundario y terciario)
21	962.52	961.69	Poloxamer	
22	892.42	885.72/890.87	Limoneno/AEPF	
23	841.78	841.36	Poloxamer	
24	649.93	677.5	AEPF	
25	555.56	542.13	Limoneno	
26	522.91	529.01/527.56	Poloxamer/AEPF	

Nanopartículas de quitosano del aceite esencial de las hojas de *S. molle*.

<b>Banda</b>	<b>Frecuencia (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concordancia (Banda)</b>	<b>Concordancia (Compuesto)</b>	<b>Grupo funcional</b>
1	3265.95	3279.01/3084.11/3088.99	Quitosano/Limoneno	Estiramiento OH y NH
2	2878.05	2868.02/2879.86/2965.58/2870.56	Quitosano/Poloxamer/Limoneno/AEPH	Estiramiento CH
3	2740.5	2741.23/2726.34	Poloxamer/Limoneno	
4	2697.4	2695.18	Poloxamer	
5	2383.78	2365.98/2360.4	Limoneno/AEPH	
6	2349.29	2349/2341.3	Limoneno/AEPH	
7	2309.59	2311.23/2389	Limoneno/AEPH	
8	1963.4	1962.93/.	Poloxamer	
9	1653.11	1640/1644.81/1643.68/1644.27	Quitosano/Limoneno/AEPH	Estiramiento C=O
10	1560.09	1588.04	Interacción TPP-CS	Flexión NH
11	1466.53	1466.67	Poloxamer	
12	1453.9	1452.06/1450.39	Limoneno/AEPH	Estiramiento C-C
13	1360	1376.29/1359.8/1367.48/1374.34	Limoneno/Poloxamer/AEPH/Quitosano	Flexión CH
14	1342.66	1342.03	Poloxamer	Flexión OH
15	1307	1309	AEPH	
16	1280.06	1279.44/1287.88	Poloxamer/Limoneno	
17	1241.39	1241.46/1241.97	Poloxamer/Limoneno	
18	1146.36	1147.96/1146.15/1149.85/1167.67	Limoneno/Poloxamer/Quitosano/AEPH	
19	1103.24	1097.91/1098.49	Poloxamer/AEPH	Estiramiento C-O
20	1060.91	1059.89	Poloxamer	Flexión OH (Alcohol secundario y terciario)
21	962.64	961.69	Poloxamer	
22	892.97	885.72/885.98	Limoneno/AEPH	
23	842	841.36	Poloxamer	
24	648.01	669.97	AEPH	
25	551.47	542.13/550.63	Limoneno/AEPH	
26	508.36	529.01/512.05	Poloxamer/AEPH	

Nanopartículas de quitosano del aceite esencial de los frutos de *O. basilicum*.

<b>Banda</b>	<b>Frecuencia (cm-1)</b>	<b>Concordancia (Banda)</b>	<b>Concordancia (Compuesto)</b>	<b>Grupo funcional</b>
1	3251.37	3279.01/3392.1/3063.06	Quitosano/Linalool/AEOB	Estiramiento OH y NH
2	2878.61	2868.02/2879.86/2857.75/2925.77	Quitosano/Poloxamer/Linalool/AEOB	Estiramiento CH
3	2736.2	2741.23	Poloxamer	
4	2701.7	2695.18	Poloxamer	
5	2384.07	2365.98/2379.3	Linalool/AEOB	
6	2343.06	2325.61	Linalool	
7	2309.5	2301	Linalool	
8	1954.7	1962.93	Poloxamer	
9	1653.2	1640/1641.01/1637.17	Quitosano/Linalool/AEOB	Estiramiento C=O
10	1559.94	1588.04	Interacción TPP-CS	Flexión NH
11	1466.66	1466.67	Poloxamer	
12	1374.62	1375.34/1375.67	Linalool/AEOB	Flexión CH
13	1342.45	1342.03	Poloxamer	Flexión OH
14	1302.7	1314.35	AEOB	
15	1280.02	1279.44/1289.62/1272.16	Poloxamer/Linalool/AEOB	
16	1241.36	1241.46	Poloxamer	
17	1146.45	1146.15/1149.85/1168.88	Poloxamer/Quitosano/AEOB	
18	1102.61	1097.91/1079.33	Poloxamer/AEOB	Estiramiento C-O
19	1060.24	1059.89	Poloxamer	Flexión OH (Alcohol secundario y terciario)
20	962.35	961.69	Poloxamer	
21	892.55	863.48	/AEOB	
22	841.96	841.36	Poloxamer	
23	671.82	684.15/688.7	AEOB/Linalool	
24	647.39	648.15	AEOB	
25	555.78	553.93/555.71	Linalool/AEOB	
26	527.16	529.01/527.56	Poloxamer/AEOB	