

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS REPELENTES DE INSECTOS EN EL
DISEÑO DE UN PARCHE COMO FORMA FARMACÉUTICA

Por

MARIA GUADALUPE FARFÁN TAVERA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en
Farmacia

Diciembre, 2007

**UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS REPELENTES DE INSECTOS EN EL
DISEÑO DE UN PARCHES COMO FORMA FARMACÉUTICA**

Aprobación de la Tesis:

**Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño.
Asesor de la Tesis**

**-Nombre-
Evaluador de la Tesis**

**-Nombre-
Evaluador de la Tesis**

**Dra. Ma. Teresa Garza González.
Subdirector de Estudios de Posgrado**

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, le doy gracias a Dios, mi Señor, por todos los beneficios que de él he recibido.

Quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño, quien fungió como asesor de esta Tesis por permitirme desarrollar este proyecto y confiar en mí plenamente, dándome las facilidades y apoyo en todo momento para desarrollarme tanto como persona así como profesional. Así mismo, por permitirme contar con su amistad.

Agradezco infinitamente a la Dra. Mónica Noel Sánchez González por todo su apoyo, paciencia y sapiencia, sin su ayuda y amistad no habría podido llevar a cabo este proyecto.

A los profesores que integraron parte fundamental en mi formación académica en esta Universidad.

A la Facultad de Ciencias Químicas por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al Centro de Laboratorios Especializados por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio. En especial al Laboratorio de Biología Molecular que me abrió las puertas para realizar los trabajos experimentales. Gracias a los integrantes del Laboratorio de Biotecnología, en especial a la Dra. Martha Suárez y el QFB David Melgoza por facilitarme el acceso a dicho lugar y materiales para trabajar.

A mi familia (mamá, Laura y Oswaldo, tíos y primos) por el apoyo moral que siempre me ha brindado, por darme la oportunidad de ser lo que soy hoy. Y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo. A mi nueva familia quienes han confiado en mí y esperan con ansia el fin de esta etapa.

A todos aquellos amigos que me alentaron en algún momento y que esperan con ansia nuestro retorno. También quiero agradecer a mis nuevos amigos, quienes han sabido ser excelentes colegas en el transcurso de esta odisea.

Sobre todo, quiero agradecer inmensamente a mi amado esposo Roberto, porque sin él no me habría animado a estudiar una Maestría, y también jamás habría terminado mi Tesis sin su apoyo, consejo, paciencia y amor.

Dedicado a mi amado esposo Roberto
A mi mamá Laura Elena Tavera que me espera con Dios
A mis hermanos Laura y Oswaldo
A mi tío y primos, Juan, Hansel y Gretel
A mi nueva familia
Y a mis adorados amigos.

RESUMEN

María Guadalupe Farfán Tavera

Fecha de Graduación: Diciembre, 2007

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas**

Título del Estudio: UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS REPELENTES DE INSECTOS EN EL DISEÑO DE UN PARCHES COMO FORMA FARMACÉUTICA.

Número de páginas: 113

**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con Orientación en
Farmacia**

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: Hoy en día, reducir o eliminar la exposición a los vectores tiene una mayor importancia en Salud Pública. En este proyecto de investigación se plantea el diseño, formulación, elaboración y evaluación de un parche de liberación prolongada de compuestos con efecto repelente de mosquitos. Se llevaron a cabo pruebas experimentales con distintos compuestos de origen natural como lo son la citronela, limoneno y eugenol para la elaboración de la formulación de efecto repelente, la cual fue evaluada en bioensayos tanto en laboratorio como en prueba de campo, de igual forma se evaluó cuantitativamente por HPLC dichos compuestos después de haber sido sometida la muestra a tratamientos de Temperatura. Por último se ensamblaron los parches con la formulación y se sometieron a efecto de temperatura y movimiento para escoger los mejores materiales que lo conformarían.

Contribuciones y Conclusiones: Con este estudio, se logró diseñar y elaborar un parche que contenía una formulación con actividad repelente contra mosquitos *Aedes aegypti* con una duración de más de 8 horas. Se estableció que la formulación de efecto repelente estuviese constituida por una matriz a base de carbopol y glicerina, así como la incorporación de aceites esenciales tales como el de hierba limón, limón y clavo. Se diseñó y construyó un equipo llamado *olfatómetro* para los bioensayos. Se desarrolló un método de cuantificación por HPLC para los terpenos citronela, limoneno y eugenol, validándose dicho método, así como también se desarrolló un método de extracción con ultrasonido para dichos compuestos. Se determinó que la formulación de citronela y limoneno es 87.67 % efectiva en pruebas de laboratorio en un tiempo de 8 horas y es 100 % efectiva en pruebas de campo. Los parches ensamblados son resistentes al efecto del movimiento y la temperatura, así como que los materiales usados para el producto son compatibles con la formulación.

FIRMA DEL ASESOR: Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.1.1 Problemática	1
1.1.2 Los Mosquitos como Transmisores de Enfermedades	3
1.1.3 Importancia en Salud Pública	4
1.2 Biología del Mosquito	5
1.2.1 Generalidades	5
1.2.2 Ciclo de Vida de los Mosquitos	7
1.2.2.1 Mosquitos del Género <i>Anopheles</i>	10
1.2.2.2 Mosquitos del Género <i>Aedes</i>	10
1.2.2.3 Mosquitos del Género <i>Culex</i>	11
1.2.3 Biología de la Picadura del Mosquito	11
1.2.4 Factores Determinantes del Comportamiento	11
1.2.5 Señales de Inducción en la Búsqueda y Picadura de Hospederos	13
1.2.5.1 CO ₂	13
1.2.5.2 Octenol	13
1.2.5.3 Acido Láctico	14
1.3 Métodos de Control de Mosquitos	14
1.3.1 Repelentes	16
1.4 Aceites Esenciales	19
1.4.1 Definiciones	19
1.4.2 Características	19
1.4.3 Precauciones en el Manejo	20
1.5 Terpenos	21
1.5.1 Definición	21
1.5.2 Estructura.	21
1.5.3 Clasificación.	21
1.6 Propósito del Proyecto.	22
1.7 Antecedentes.	23

2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	28
2.1	Hipótesis	28
2.2	Objetivos	29
2.2.1	Objetivo General.	29
2.2.2	Objetivos Específicos.	29
3	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1	Desarrollo y Selección de Formulación de Efecto Repelente . .	30
3.2	Diseño y Construcción del Dispositivo de Soporte para la Formulación de Efecto Repelente	35
3.2.1	Resistencia del Producto al Efecto del Movimiento y Temperatura	37
3.3	Evaluaciones	38
3.3.1	Desarrollo de un Método para la Cuantificación de Principios Activos	38
3.3.2	Desarrollo de un Método para la Extracción de los Terpenos	39
3.3.3	Validación del Método	40
3.3.4	Estabilidad de la Formulación	41
3.4	Bioensayos	43
3.4.1	Diseño y Construcción de un Olfatómetro	43
3.4.2	Establecimiento de la Cría de Mosquitos <i>Aedes aegypti</i> .	45
3.4.3	Pruebas de Repelencia	45
3.5	Pruebas de Campo	47
3.6	Presentación del Producto	48
4	RESULTADOS	49
4.1	Desarrollo y Selección de Formulación de Efecto Repelente . .	49
4.2	Construcción y Resistencia del Producto	54
4.2.1	Diseño y Construcción del Dispositivo de soporte para la Formulación de Efecto Repelente	54
4.2.2	Resistencia del Producto al Efecto del Movimiento y Temperatura	56
4.3	Evaluaciones	58
4.3.1	Desarrollo de un Método para la Extracción de los Terpenos	58
4.3.2	Validación del Método	59
4.3.3	Estabilidad de la Formulación	60
4.4	Bioensayo	67
4.4.1	Pruebas de Repelencia	67
4.5	Pruebas de Campo	69
4.6	Presentación del Producto	74

5	DISCUSIONES	75
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
	6.1 Conclusiones	85
	6.2 Recomendaciones	87
7	BIBLIOGRAFÍA	88
	APÉNDICES	92
	APÉNDICE A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA VALIDACIÓN	93
	APÉNDICE B. CUESTIONARIO DE OPCIÓN MULTIPLE . .	98
	APÉNDICE C. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA PÉRDIDA POR SECADO	101
	APÉNDICE D. RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL ANÁLISIS POR HPLC DE LOS TERPENOS .	103
	APÉNDICE E. RESULTADOS DEL BIOENSAYO	110

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Enfermedades Transmitidas por Picaduras de Mosquitos . . .	2
2	Tipos de Repelentes según su Origen	17
3	Extractos Repelentes Naturales	18
4	Componentes de las Formulaciones de Efecto Repelente del Grupo I	32
5	Componentes de las Formulaciones de Efecto Repelente del Grupo II	33
6	Componentes de las Formulaciones de Efecto Repelente del Grupo III	33
7	Observaciones Registradas para el Grupo I de Formulaciones Desarrolladas	50
8	Observaciones Registradas para el Grupo II de Formulaciones Desarrolladas	51
9	Observaciones Registradas para el Grupo III de Formulaciones Desarrolladas	53
10	Resultados Obtenidos de la Evaluación Visual del Producto al Haber sido Sometido a Condiciones de Temperatura y Movimiento	56
11	Resultados de la Prueba de Mandel para Validación de Terpenos	60

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Detalles Anatómicos de Mosquitos de los Géneros <i>Anopheles</i> , <i>Aedes</i> y <i>Culex</i>	7
2	Representación Gráfica de la Fase Acuática del Ciclo Biológico de los Mosquitos	8
3	Diagrama que Representa los Factores que Intervienen en la Búsqueda de Hospederos	12
4	Representación Gráfica de la Disposición de los Materiales Utilizados en el Diseño y Construcción del Dispositivo del Soporte para la Formulación de Efecto Repelente	36
5	Representación Gráfica del Dispositivo Ensamblado para Soporte de la Formulación de Efecto Repelente	37
6	Representación Gráfica del Diseño Empleado en la Construcción de un <i>Olfatómetro</i> para la Realización de las Pruebas de Repelencia de Mosquitos a Nivel Laboratorio	44
7	Representación Gráfica del <i>Olfatómetro</i> Ensamblado	46
8	Imágenes Fotográficas del Ensamblado del Parche para uso Externo que Funge como Soporte a la Formulación de Efecto Repelente de Mosquitos	55
9	Gráfica de Tiempo contra Porcentaje de Pérdida al Secado de la Formulación Sometida a las Temperaturas de 25, 35 y 45 °C	58
10	Cromatograma Obtenido de la Mezcla de los Estándares de Referencia Primaria Analizados por HPLC	61
11	Cromatograma de una Muestra Extraída después de las dos Primeras Horas de Tratamiento a una Temperatura de 25 °C	62

12	Gráfica de Tiempo contra Porcentaje de Evaporación de la Cinética de Citronela Realizada a la Muestra en un Lapso de Tiempo de 8 h, a las Temperaturas de 25, 35 y 45 °C	63
13	Gráfica de Tiempo contra Porcentaje de Evaporación del Terpeno Limoneno en la Formulaci3n Sometida a Tratamiento con tres Temperaturas	65
14	Gráfico Obtenido para el Terpeno Eugenol después de haber Recibido Tratamiento de Temperatura de 25. 35 y 45 °C	66
15	Gráfica que Representa los Porcentajes de Repelencia de las tres Formulaciones Evaluadas en el Laboratorio Empleando un <i>Olfatómetro</i>	68
16	Gráfico de Pastel que Muestra los Porcentajes y Rangos de Edades de los Voluntarios que Participaron en el Estudio de Campo	69
17	Gráfico de Pastel que Indica el Porcentaje de los Voluntarios Masculinos y Femeninos que Participaron en el Estudio	70
18	Gráfico de Pastel que Señala los Ambientes de Estudio en los que se llevó a cabo el Estudio de Campo	71
19	Gráfico de Pastel que Muestra los Porcentajes de Participantes que Usaron el Producto en un Lapso de Tiempo menor de 5 horas, entre 5 y 8 horas o por más de 8 horas . .	72
20	Gráfico que Expresa el Porcentaje de Personas a las que les Gustó o no la Presentaci3n del Producto	74
21	Fotografía de una Colecci3n de Parches Terminados	74

NOMENCLATURA

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
A	Área
<i>Ad libitum</i>	A consideración
cm	Centímetro
CM	Cuadrado Medio
Conc.	Concentración
DEET	N,N-dietil-toluamida
<i>et al.</i>	Y colaboradores
F	F calculada
F _c	F crítica
g	Gramos
gl	Grados de Libertad
h	Horas
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (del inglés: High Performance Liquid Chromatography)
LOD	Límite de Determinación (del inglés: Limit of Determination)
LOQ	Límite de Cuantificación (del inglés: Limit of Quantification)
mg	Miligramos

min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
μm	Micrómetros
mm/mes	Milímetros por mes
N/A	No Aplica
NaCl	Cloruro de Sodio
NaHCO_3	Bicarbonato de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
p. a.	Principio Activo
rpm	Revoluciones por minuto
SRP	Estándar de Referencia Primaria
SS	Sumatoria de Cuadrados
t	Tiempo
TEA	Trietanolamina
TR	Tiempo de Retención

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

1.1.1 Problemática

Las infecciones parasitarias causadas por virus, protozoarios o helmintos patógenos afectan a más de 3,000 millones de personas a nivel mundial y constituyen una enorme carga para la salud y la economía, sobre todo en países subdesarrollados en donde se presentan con mayor frecuencia. Entre los factores que permiten la aparición de ellas se pueden contar las deficiencias sanitarias, desaseo personal e inadecuada enseñanza de aspectos de salud; debilidad y menor resistencia del huésped; gran densidad poblacional; control inadecuado de vectores parásitos y reservorios de infección; aumento de migración de poblaciones e incremento de la densidad poblacional, viajes internacionales, así como resistencia a los fármacos utilizados en quimioterapia y en el control de los vectores. Algunas parasitosis demandan mayor atención porque sin tratamiento pueden alcanzar índices de morbilidad y mortalidad muy altos (Tabla 1). A pesar de esfuerzos importantes por la creación de vacunas, la quimioterapia persiste como el medio único, más eficaz y económico para controlar casi todas las parasitosis. Se necesitan todavía fármacos,

insecticidas, vacunas y métodos, todos ellos prácticos, económicos, eficaces e inocuos para el huésped (Goodman-Gilman, 2001).

TABLA 1
ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR PICADURAS DE MOSQUITOS

Enfermedad	Vector	Agente causal	Importancia
Paludismo o Malaria.	<i>Anopheles sp</i> en México existen 3 especies de mosquitos <i>A. quadrimaculatus</i> , <i>A. pseudopunctipennis</i> y <i>A. albimanu</i>).	<i>Plasmodium vivax</i> , <i>P. malariae</i> , <i>P. falciparum</i> , <i>P. ovale</i> , de los cuales el de mayor peligro es el <i>falciparum</i> .	120 millones de casos clínicos y 1.2 millones de muertes/año en 91 países (OMS, 2002).
Dengue.	<i>Aedes aegypti</i>	<i>Flavivirus (ser. Dengue 1, 2, 3 y 4)</i> .	Pandemia de 1998: 1.2 millones de afectados. Con 100 países endémicos: 2.5 billones de afectados/año (OMS, 2002).
Fiebre del Nilo.	<i>Culex pipiens</i>	<i>Flavivirus</i> .	En 2003 se detectaron 9,858 casos en EEUU, con 262 muertes. En México no se diagnostica (Secretaría de Salud, 2004).

1.1.2 Los Mosquitos como transmisores de Enfermedades

Los insectos actúan como vectores o portadores de microorganismos principalmente de dos formas. La primera es por transmisión mecánica, los insectos portan en sus partes externas, tales como patas o alas, los agentes infecciosos. Cuando los insectos hospedan en su organismo algún virus, bacteria o protozooario, pueden propagar enfermedades por un segundo medio, sus picaduras. Los mosquitos son vectores de muchas de las enfermedades de mayor importancia clínica que actualmente se conocen y temen (Pelczar, 1998; Tay-Lara, 1996).

El paludismo persiste como la parasitosis de seres humanos más devastadora del mundo; afecta a más de 120 millones de personas y provoca 1.2 millones de muertes al año según informes de la Organización Mundial de la Salud. Es la infección por *Plasmodium falciparum* la que causa gran parte de esta mortalidad, en la que predominan menores de cinco años, mujeres embarazadas e individuos no inmunes. Aunque el paludismo transmitido por mosquitos se ha eliminado de la parte no latina de América, y de Europa y Rusia, su prevalencia cada vez mayor en muchas partes de los trópicos, en especial el África subsahariana, representa un enorme riesgo para quienes viajan desde áreas no endémicas (Goodman-Gilman, 2001; Katzung, 1999).

1.1.3 Importancia en Salud Pública

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informa: “De todos los insectos que transmiten enfermedades, los mosquitos representan la mayor amenaza al propagar el paludismo (malaria), el dengue, la fiebre amarilla y el virus del Oeste del Nilo , que juntos son responsables de varios millones de muertes y de cientos de millones de casos cada año”. Al menos el 40% de la población mundial corre el riesgo de contraer paludismo, y otro 40% el dengue. Esto es un dato importante a tomar en cuenta si se considera que en algunos lugares del mundo pueden contraerse ambas infecciones (OMS, 2002). Actualmente, las epidemias por dengue son uno de los problemas de salud pública más relevantes en la mayor parte de las comunidades urbanas de los países tropicales (Espinoza-Gómez, 2003).

Ordinariamente las picaduras de mosquitos y otros insectos son solo un fastidio para quien las padece, aunque la picadura puede causar molestias del tipo picazón o hinchazón. Debido a la picadura de los mosquitos se producen reacciones en el cuerpo como prurito, escozor, irritación y enrojecimiento de la zona afectada, se presenta un proceso de inflamación que puede llegar a casos extremos de alergia, intensa reacción inflamatoria local e inclusive en casos severos anafilaxis (Falabella, 1991; Pérez-Pacheco, 2004).

1.2 Biología del Mosquito

1.2.1 Generalidades

Los mosquitos son los insectos más importantes de los numerosos tipos de artrópodos hematófagos que molestan al hombre. Pertenecen a la familia *Culicidae* y tienen un aspecto que se describe a continuación:

Aspecto:

- Longitud de 3,5 a 5,0 mm.
- Cuerpo cubierto de escamas.
- 2 antenas.
- 2 alas.
- 3 pares de patas.
- Probóscide o trompa que utiliza para picar y succionar sangre.

Las características más evidentes que separan a los mosquitos adultos de todos los otros dípteros son una combinación de alas con escamas en las venas alares, margen posterior y proboscis alargada. Las antenas son largas y filamentosas con 14 ó 15 divisiones, con sedas en espirales, plumosas en los machos de la mayoría de las especies.

Las larvas de los mosquitos son acuáticas sin excepción. Se pueden diferenciar de insectos acuáticos no relacionados por la falta de patas y por un

tórax en forma de bulbo, que es más ancho que la cabeza o el abdomen. Difieren de otras larvas de dípteros por una cápsula cefálica completa además de un solo par de estigmas funcionales situados dorsalmente en el octavo segmento abdominal, algunos aspectos de la morfología de los mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex* se presentan en la Figura 1.

Los mosquitos se dividen en tres subfamilias:

1. Toxorhynchitinae (Megarhininae), adultos grandes con escamas de colores metálicos, proboscis fuertemente curvada hacia abajo, se alimentan de flores y las larvas son depredadoras, por ejemplo, *Toxorhynchites rutilus*.
2. Culicinae con los palpos de las hembras de menos de la mitad de largo de la proboscis, escutelo trilobulado y hembras hematófagas, por ejemplo, *Culex pipiens* y *Aedes aegypti*.
3. Anophelinae con los palpos de ambos sexos tan largos o casi tan largos como la proboscis, escutelo en forma de banda, con raras excepciones y las hembras también hematófagas, por ejemplo, *Anopheles maculipennis*.

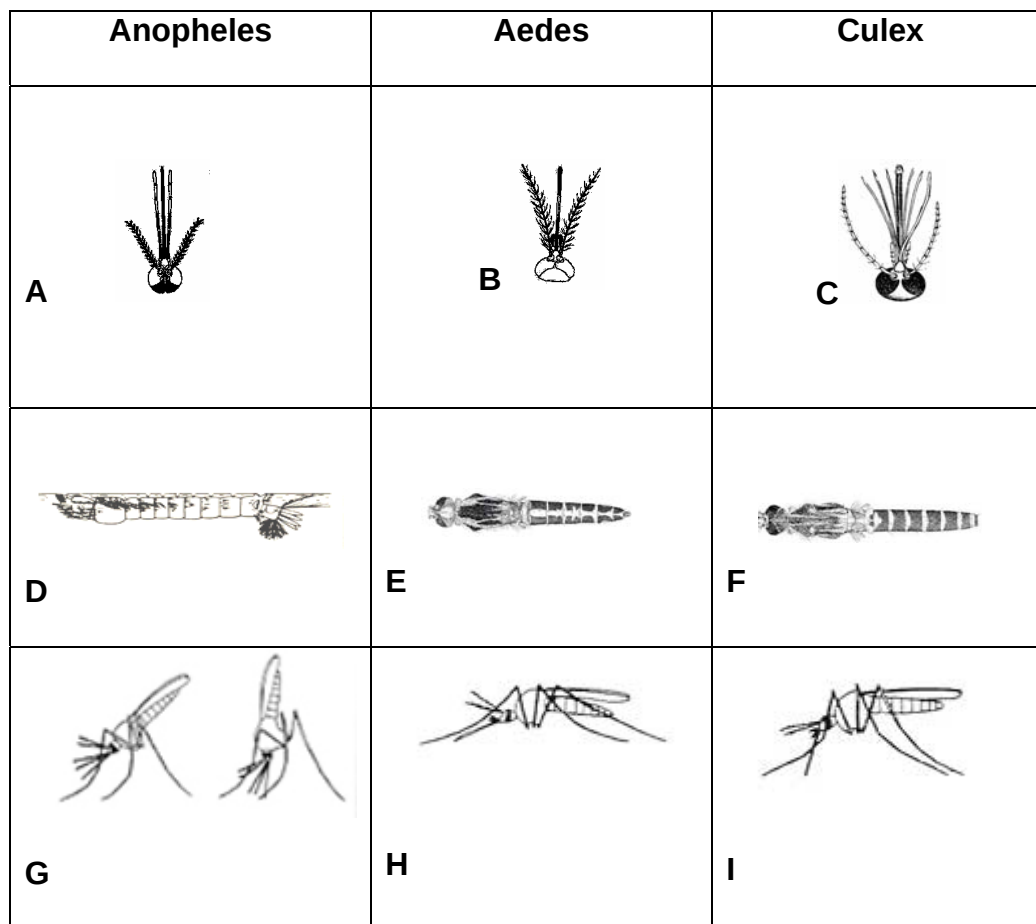


Figura 1. Detalles anatómicos de mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*. A, B y C representan la morfología de la cabeza del adulto. Para cada uno de los ejemplares se presenta la morfología en los estadios de larva y adulto (Adaptado de Eldridge, 2001; Harwood, 1993).

1.2.2 Ciclo de vida de los mosquitos

El ciclo de vida del mosquito tiene 4 estadios: huevo, larva, pupa y adulto. Tres de estos estadios transcurren y se transforman durante la fase acuática del ciclo. Estos cambios se muestran en la Figura 2.

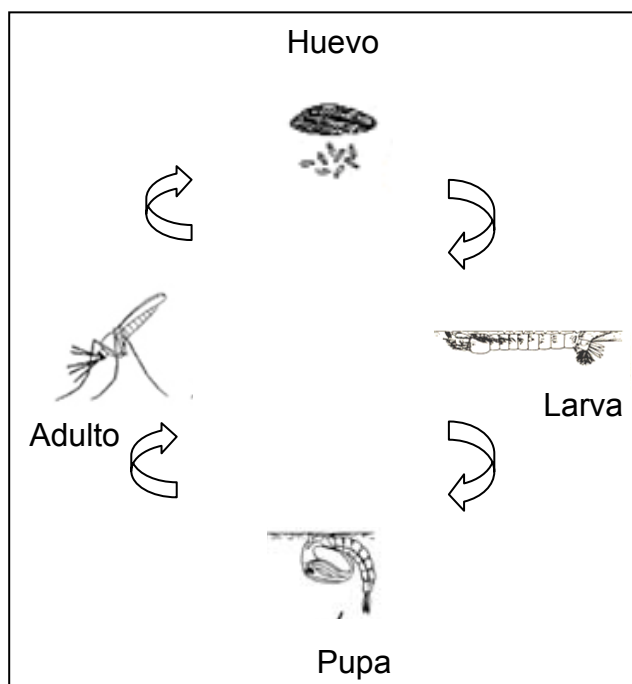


Figura 2. Representación gráfica de la fase acuática del Ciclo Biológico de los mosquitos (adaptación de Eldridge, 2001).

Huevecillo: Pueden resistir largos períodos fuera del agua. Los huevecillos de la mayoría de los grupos de mosquitos son depositados individualmente, por ejemplo, *Anopheles* y *Aedes*, o en grupos flotantes como hacen los miembros de los géneros *Culex* y *Culiseta*. La oviposición se lleva a cabo en la superficie o a lo largo de las orillas de estanques de agua tranquila. Varios autores han demostrado que las sustancias atractivas para la hembra que está ovipositando, ayudan a seleccionar los sitios específicos de oviposición. Estas sustancias pueden ser producidas por las formas inmaduras de mosquitos en los criaderos y pueden estar compuestas por diglicéridos y ácidos grasos asociados con los grupos de huevecillos flotantes o bacterias, o los atrayentes de la oviposición pueden ser también compuestos fenólicos de origen vegetal.

Larva: Las larvas de la mayoría de los *Culicinae* cuelgan suspendidas diagonalmente de la superficie del agua, por medio de un sifón respiratorio prominente. La mayoría de las larvas de mosquitos filtran microorganismos y otras partículas del agua o ramonean microorganismos presentes en las superficies sólidas. Las larvas producen un estimulante para la alimentación, soluble en agua y que promueve la actividad de alimentación. El alimento es llevado a la boca por medio de corrientes producidas por la acción de las largas sedas curvadas que se encuentran en la maxilar. Mudan cuatro veces, la última muda resulta en pupa. Para que se complete el desarrollo larval en los *Culicinae* más comunes, bajo condiciones óptimas de alimento en el verano se requieren aproximadamente 7 días, dependiendo de la temperatura; generalmente las larvas de *Anophelinae* requieren más tiempo.

Pupa: En este estadio no se alimenta y esta etapa es además muy corta, generalmente 2-3 días. Es extremadamente activa y sensitiva a molestias, moviéndose repentinamente con movimientos circulares hacia aguas más profundas y después de unos momentos regresa a la superficie con poco movimiento.

Adulto: Normalmente el alimento de ambos sexos para el vuelo y la manutención metabólica ordinaria se obtiene del néctar y fluidos vegetales. A excepción de unas cuantas especies, como los fitófagos *Toxorhynchitinae*, las hembras de los mosquitos perforan la piel de muchos tipos de animales y se alimentan de la sangre, requiriendo las proteínas de la misma para el desarrollo

de los huevecillos. Las hembras de especies hematófagas normalmente requieren una ingestión de sangre antes de la ovoposición. Durante el desarrollo normal o anautogénico, las proteínas de la ingestión de sangre estimulan a los oocitos en los ovarios para que produzcan yema y crezcan, la maduración de los óvulos es controlada por la liberación de la hormona del cerebro y por la vitelogenina, hormona estimulante del ovario. Los machos de los mosquitos permanecen vivos durante no más de una semana, aunque la manutención cuidadosa en el laboratorio puede dar una sobrevivencia de más de un mes. Durante su período de mayor actividad en los veranos calientes, la sobrevivencia de las hembras es de 2 semanas en promedio (Eldridge, 2001; Harwood, 1993).

1.2.2.1 Mosquitos del Género *Anopheles*.

La hembra deposita los huevos, los cuales poseen flotadores. Las larvas descansan paralelamente a la superficie del agua y sólo tienen un tubo respiratorio rudimentario. El ciclo de vida puede completarse en 9-14 días en condiciones favorables.

1.2.2.2 Mosquitos del Género *Aedes*.

La hembra deposita los huevos de uno en uno; no tienen flotadores. Las larvas descansan formando un ángulo con la superficie del agua y tienen un tubo respiratorio corto y grueso. El ciclo de vida puede completarse en 11 días en condiciones favorables.

1.2.2.3 Mosquitos del Género *Culex*.

La hembra deposita los huevos en balsas en forma de bote, sin flotadores. Las larvas descansan formando un ángulo con la superficie del agua y tienen un tubo respiratorio largo y delgado. El ciclo de vida puede completarse en 9-13 días en condiciones favorables.

1.2.3 Biología de la Picadura del Mosquito

Las hembras de mosquitos hematófagos utilizan señales físicas y químicas para localizar su fuente de alimentación sanguíneo en hospederos vertebrados. Los mosquitos zoofílicos responden preferentemente al CO₂ y al octenol liberados en la respiración y las excreciones, mientras que los mosquitos antropofílicos responden al ácido láctico y a una variedad de compuestos del sudor. Estos compuestos son modificados por microorganismos saprófitos asociados a las glándulas sebáceas de la piel generando otros productos volátiles que les son atractivos también (Torres-Estrada, 2003).

1.2.4 Factores determinantes del comportamiento

Los procesos fisiológicos más importantes en mosquitos están mediados por los olores que estos mismos perciben. La búsqueda de una comida de sangre está influida por factores inherentes del mosquito (vector), el posible hospedero vertebrado (hospedero) y las condiciones ambientales que determinan la activación del comportamiento, así como la detección y orientación hacia el posible hospedero. Las condiciones fisiológicas del vector determinan su

preferencia alimenticia, y su necesidad y disposición para alimentarse. Las condiciones ambientales (temperatura, luz, humedad) influyen en la activación del comportamiento de búsqueda, que se ve además influida por factores físicos (visuales). La asociación entre factores físicos (viento) y químicos (olores) orientan al mosquito hacia el hospedero por medio de estímulos que emanan del microambiente domiciliar y peridomiciliar. A corta distancia, estímulos químicos del hospedero (compuestos poco volátiles) inducen el aterrizaje sobre el hospedero y finalmente, la picadura es estimulada por factores químicos (ácidos grasos) como por factores físicos como la humedad y la temperatura. Los factores que determinan el comportamiento de los mosquitos hacia el hospedero se resumen en la Figura 3 (Torres-Estrada, 2003).

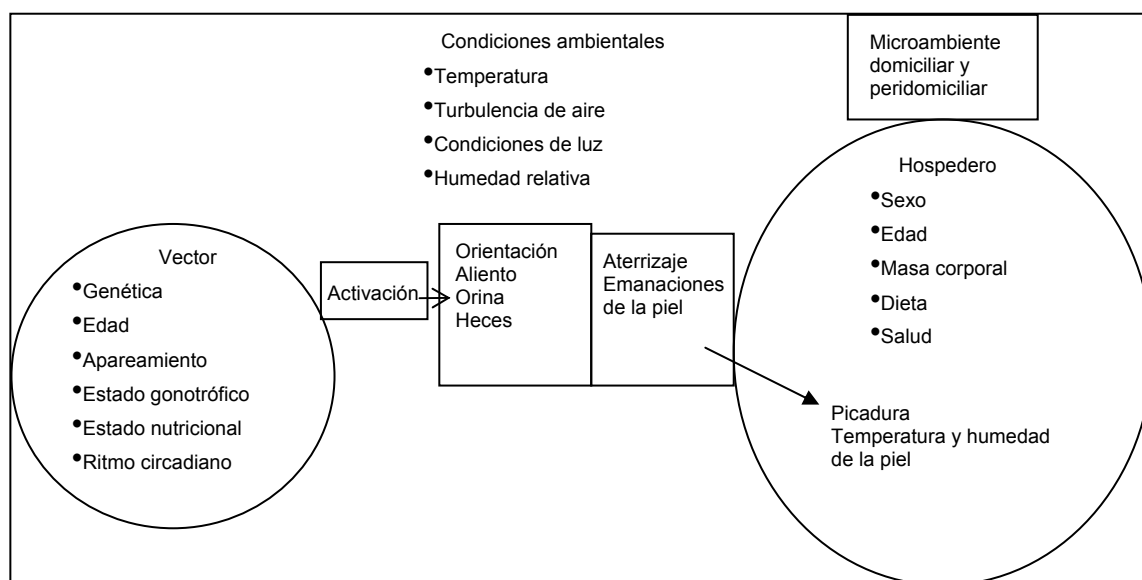


Figura 3. Diagrama que representa los factores que intervienen en la búsqueda de hospederos vertebrados por parte de los mosquitos (adaptado de Torres-Estrada, 2003).

1.2.5 Señales de inducción en la búsqueda y picadura de hospederos

En los mosquitos, la inducción del comportamiento de búsqueda de hospederos es mediada por estímulos físicos y químicos. Los estímulos físicos (visuales) como por ejemplo contraste e intensidad de luces, movimiento, son activadores del vuelo. Mientras que a distancias cortas, las señales químicas ayudan a los mosquitos a identificar el flujo de olor (estímulos químicos) que los orientan hacia el hospedero. Los estímulos químicos provocan la respuesta anemotáctica (orientación en contra del viento siguiendo un gradiente de olor) de búsqueda del hospedero y desencadenan la estimulación final para que se lleven a cabo el piquete y la alimentación (Torres-Estrada, 2003).

1.2.5.1 CO₂.

La percepción de un posible hospedero se inicia con la detección del CO₂ expedito por un mamífero vertebrado. Esto provoca que el vuelo de los mosquitos hembras se oriente hacia el posible hospedero.

1.2.5.2 Octenol.

Uno de los compuestos que constituyen los olores de mamíferos es el 1-octen-3-ol (octenol). Se ha documentado que este compuesto atrae a una amplia gama de dípteros hematófagos.

1.2.5.3 Acido Láctico.

Otros atrayentes de anofelinos presentes en emanaciones de animales y humanos son acetona, estradiol, cadaverina, lisina y ácido láctico. El ácido láctico es excretado con el sudor en la piel. El L-ácido láctico es el producto final de la glicólisis durante el metabolismo anaeróbico de las células mioepiteliales de las glándulas sudoríparas ecrinas. El contenido de L-ácido láctico en la piel de humanos es mayor que en otros mamíferos.

Los mosquitos zoofílicos se orientan por un atrayente generalista como lo es el CO₂, mientras que los mosquitos antropofílicos son atraídos por olores específicos del humano (Torres-Estrada, 2003).

1.3 Métodos de Control de Mosquitos

El fomento en las mejoras sanitarias con miras a erradicar, o bien, disminuir las poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades en entornos determinados están basados en la aplicación de métodos para su control. Dichos métodos de control pueden ser de tipo mecánico cuando se establecen por ejemplo, barreras como las telas mosquiteras adecuadas a puertas y ventanas, o los pabellones de gasa útiles para proteger las camas (Borrór, 1989). Los métodos físicos aplican para esta función el efecto del ultrasonido a frecuencias efectivas para ahuyentar las especies a controlar, y también el efecto de la electrocución mediante la atracción de los mosquitos a trampas incandescentes (Borrór, 1989; Coro, 1998).

Entre los métodos de control de mosquitos más difundidos y efectivos que se hayan aplicado se cuentan con los basados en la aplicación de sustancias químicas, aunque el uso de cada uno de ellas se lleve a cabo desde posturas o con objetivos muy diferentes. La muestra más clara de este tipo de método de control lo tenemos en la aplicación de sustancias con efecto insecticida, las cuales pueden diferir en extremo en cuanto a su origen y naturaleza química. Si bien se pueden encontrar entre estas especies químicas, sustancias de origen natural o sintético, todas ellas son esparcidas en los entornos habitados por los mosquitos con el fin de provocar su muerte por intoxicación (Pesante, 2005).

Otra modalidad del control de insectos empleando sustancias químicas lo podemos encontrar en la aplicación de compuestos que fungen como o imitan la actividad de las feromonas, las cuales son utilizadas para atraer a los insectos a trampas empleándolas como cebos (Pesante, 2005).

Y por último, en este tipo de control de insectos se puede citar el uso de sustancias químicas, que con un origen y estructuras muy variadas presentan un efecto repelente sobre los insectos. El mecanismo exacto de su acción está todavía por establecerse, pero sea cual fuere la forma en que estos actúan, son de gran utilidad puesto que si bien no eliminan al vector, si evitan el proceso que realmente pone en riesgo la salud del hospedero, ser picado por un mosquito.

1.3.1 Repelentes

Cuando los artrópodos están presentes, la aplicación de un grupo de sustancias generalmente referidas como repelentes protegen contra las picaduras. Los repelentes son compuestos químicamente diversos y no es conocida la forma en que previenen la picadura al actuar como repelentes (induciendo quimiotaxis negativa) en la caza del artrópodo por el hospedero (Dethier, 1972).

El sensor y el mecanismo de acción para este efecto no se conocen. McIver (1981) sugirió que la molécula no polar DEET provoca gran cantidad de poros en la membrana lipídica de los sensores en las dendritas de las sensillas olfatorias de los mosquitos causando un bloqueo de las entradas de los sensores que el sistema nervioso central del insecto no puede integrar. El resultado podría ser una interrupción de la respuesta por la caza del hospedero. El olor del repelente afecta muchas sensillas olfatorias diferentes en los mosquitos, incluyendo las zonas sensitivas al ácido láctico en las antenas y las sensillas sensitivas atrayentes a la ovoposición en los genitales de *Aedes aegypti*. Davis (1985) sugirió que hay evidencia que soporta un número de modos de acción (dependiendo del repelente en cuestión) incluyendo interferencia con la recepción del estímulo del hospedero, estimulación de las entradas sensoriales para el comportamiento competitivo y la activación del mensaje sensorial a una repulsión (Eldridge, 2001).

Los repelentes se clasifican en función de su origen, el cual puede ser natural, o bien, sintético. En la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos de cada uno de ellos.

TABLA 2
TIPOS DE REPELENTES SEGÚN SU ORIGEN

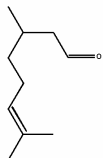
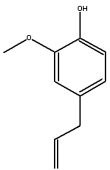
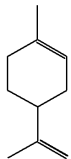
<u>Naturales</u>	<u>Sintéticos</u>
• Clavo • Zacate limón • Geranio • Crisantemo	• DEET (Dietil-toluamida) • Bayrepel (Marca Registrada (BAYER)). • IR35353 (Etil-butilacetil-amino-propionato). • Vitamina B1

DEET (N,N-diethyl-toluamide) es un repelente contra insectos versátil y efectivo. Los repelentes están disponibles en muchas formulaciones, incluyendo lociones, cremas, gelatinas, rociadores en pompas, y artículos de baño. Los repelentes contra insectos pueden reducir el riesgo de picadas de mosquitos y garrapatas, pero los productos que contienen DEET deben ser usados apropiadamente (O'Farril-Nieves, 2004).

Los repelentes son efectivos solo a cortas distancias de la superficie tratada, quiere decir que el usuario puede seguir viendo mosquitos volando de cerca. Siempre y cuando el usuario no sea picado por mosquitos, no hay razón para aplicarse más repelente (Rey, 2004)

Si no se quiere usar un repelente que contenga DEET, o si el médico advierte evitar el DEET, existen otros productos que pueden dar una protección limitada. Esos repelentes generalmente usan aceites extraídos de las plantas para repeler insectos, como los que se muestran en la Tabla 3. En comparación con el DEET, los productos repelentes con bases de aceites de plantas generalmente son efectivos por un corto período de tiempo (usualmente menos de dos horas) (Pesticide Regulation, 2005; O’Farril-Nieves, 2004).

TABLA 3
EXTRACTOS REPELENTES NATURALES

Repelente natural	Nombre IUPAC	Origen Aceite esencial de la planta:	Estructura
Citronela	3,7-dimetil-6-octenal	<i>Cymbopogon citratos</i> (Hierba limón)	
Eugenol	4-allyl-2-methoxyphenol	<i>Syzygium aromaticum</i> (Clavo)	
Limoneno	4-isopropenil-1-metilciclohexeno	<i>Citrus limon</i> (Limón)	

1.4 Aceites esenciales

1.4.1 Definiciones

Aceite esencial: Constituye el material formado por compuestos volátiles contenidos en las plantas, obtenidos por destilación (arrastre por vapor, hidrodestilación), por maceración, maceración en frío con aceites fijos, extracción con disolventes volátiles o por medios mecánicos (expresión) (Farmacopea Herbolaria, 2001).

Forma farmacéutica: En los productos herbolarios la forma farmacéutica es aquella preparación en que se presenta el producto final para su adecuada dosificación, conservación y administración (Farmacopea Herbolaria, 2001).

1.4.2 Características

Se caracterizan por su olor, apariencia aceitosa y su habilidad para volatilizarse a temperatura ambiente. Químicamente están compuestos de mezclas tales como terpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados (Bohlmann, 1998). Como fueron considerados la “esencia” de las materias vegetales, y a menudo son biológicamente activos, se les conoce como “aceites esenciales”. El término “aceite esencial” se prefiere en lugar de “aceite volátil” porque es más específico y describe las propiedades físicas (Farmacopea Herbolaria, 2001).

1.4.3 Precauciones en el manejo

Los aceites esenciales, en su estado natural vegetal, se encuentran siempre en concentraciones mínimas; en promedio, un gramo de aceite esencial representa 100 gramos de planta seca. Su uso en el ser humano en forma concentrada implica riesgos en función de sus diversos efectos neuroendócrinos y de otro tipo. No deben ser utilizados jamás sin diluir, ni administrados por vía oral, a menos que sean prescritos por personal médico debidamente acreditado para ello. Inclusive la administración tópica de ciertos aceites esenciales diluidos requiere supervisión médica calificada, dada su incorporación al torrente circulatorio, resultante de su absorción transdérmica. Ciertos aceites, aún en concentraciones mínimas, deben de ser proscritos por su toxicidad. Tal es el caso del aceite esencial de *Telexys ambrosioides* L. (epazote), *Artemisia absinthium* L. (ajenjo), *Hyssopus officinalis* L. (hisopo), *Ruta graveolens* L. (ruda) y *Mentha pulegium* L. (poleo), entre otros. Otros aceites pueden causar fotosensibilización, como los provenientes de cítricos; otros más generan irritación dérmica severa, como el aceite de *Cinnamomum zeylanicum* Nees. (canela); se encuentran también aquellos aceites esenciales que deben ser proscritos durante el embarazo, como los de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Foeniculum vulgare* Mill. (hinojo), *Melissa officinalis* L. (melisa), *Origanum majorana* L. (mejorana), *Juniperus communis* L. (enebro) y *Angelica archangelica* L. (angélica), entre otros (Farmacopea Herbolaria, 2001; NOM-032-SSA2-2003).

1.5 Terpenos

1.5.1 Definición

La mayor parte de los aceites esenciales son mezclas de terpenos, una clase de productos naturales que se encuentran en las plantas y los animales. El nombre deriva de trementina (en inglés: turpentine), que es rica en este tipo de compuestos (Fessenden, 1983).

1.5.2 Estructura

Todos los terpenos parecen haber sido contruidos por unión de unidades de isopreno cabeza a cola (Morrison, 1998). La cabeza es el extremo más próximo a la ramificación del metilo. Los terpenos contiene dos, tres, o más unidades de isopreno. Sus moléculas pueden ser de cadena abierta o cíclica. Pueden contener dobles enlaces, grupos oxhidrilo, grupos carbonilo u otros grupos funcionales. Una estructura del tipo terpeno que contenga otros elementos aparte de C y H se llama un terpenoide (Fessenden, 1983).

1.5.3 Clasificación

Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de pares de unidades de isopreno que contienen:

Monoterpenos: dos unidades de isopreno

Sesquiterpenos: tres unidades de isopreno

Diterpenos:	cuatro unidades de isopreno
Triterpenos:	seis unidades de isopreno
Tetraterpenos:	ocho unidades de isopreno

1.6 Propósito del proyecto

Hoy en día, reducir o eliminar la exposición a los vectores tiene una mayor importancia en salud pública como nunca antes en la historia. En este proyecto de investigación se plantea el diseño, formulación, elaboración y evaluación de parches de liberación prolongada de compuestos con efecto repelente de mosquitos. Todo ello con base en la obstaculización de la habilidad de los mosquitos para identificar el flujo de olor que los orientan hacia el blanco de la picadura. Los trabajos de experimentación en este proyecto tienen como objetivo el desarrollo de una forma farmacéutica de liberación prolongada que brinde protección contra la picadura de mosquitos (*Aedes aegypti*, *Anopheles spp.*, etc.) teniendo como resultado la disminución del riesgo de contraer enfermedades transmitidas por estos vectores, tales como malaria, fiebre del dengue, fiebre amarilla, virus del oeste del Nilo, y muchas otras. En concreto, se llevarán a cabo pruebas experimentales con distintas sustancias de origen natural, así como pruebas de diseño del sistema de soporte de dichas sustancias activas.

1.7 Antecedentes

En 1999, Rojas y colaboradores publican resultados de interés sobre el estado del uso de repelentes naturales bajo el título: “Extracción y rendimiento de aceite esencial de hojas de *Citrus medica* con uso para la protección personal contra mosquitos transmisores”, donde se menciona que desde el punto de vista comercial, la extracción de los aceites esenciales de limón ha sido un problema importante para obtener mayor rendimiento del efecto de los mismos. En su estudio reportan los resultados de repelencia obtenidos a diferentes horas del día, teniendo como objetivo la demostración del efecto repelente de este aceite esencial y su uso como repelente personal y de uso doméstico.

Ya en 1990 Rojas había trabajado junto a Scorza en el proyecto de “Protección personal con un repelente natural contra *Lutzomyia youngi*, vector de Leishmaniasis cutánea urbana en Venezuela”, donde reportan la actividad repelente del aceite de limón obtenido por los autores en combinación con extractos de citronella y DEET, tanto en experiencias de laboratorio como de campo. La actividad protectora contra mosquitos en el laboratorio fue de 70, 63 y 33 % para el aceite esencial de limón, DEET y el citronella respectivamente. Los coeficientes de protección en condiciones de campo, usando tres voluntarios, fueron de 84.8 para el aceite esencial y 3.7 para el DEET.

En el año 2002, un grupo de investigadores (Do-Hyoung, Kim, *et al.*) desarrolló el trabajo sobre la “Actividad repelente de constituyentes identificados en *Foeniculum vulgare* contra *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae)”, en el cual, la actividad de materiales derivados del extracto metanólico de esta planta se comparó con el compuesto comercial DEET y el ácido Z-9-octadecenoico. Caracterizaron el constituyente biológicamente activo [(+)-fencona y ácido (E)-9-octadecenoico] por análisis espectroscópicos. Variaron en la formulación el componente, la dosis y el tiempo de exposición. La efectividad y duración de la repelencia del químico depende del tipo de repelente (ingrediente activo y la formulación), del modo de aplicación, condiciones locales (temperatura, humedad), la atracción del mosquito por la persona, transpiración y abrasión, la sensibilidad del insecto al repelente, etc. La (+)-fencona reveló ser un agente con mayor efecto repelente que el ácido (E)-9-octadecenoico contra hembras de *A. aegypti*. La efectividad de (+)-fencona fue relativamente corta y está probablemente relacionada a su alta volatilidad.

En el año 2003, Koul Opendar y colaboradores desarrollaron el trabajo “Efecto de inapetencia de los limonenos de *Entandrophragma candolei* (Meliaceae) sobre el insecto barrenador de vainas (*Helicoverpa*)”. Ensayaron la actividad biológica de los limonoides. Los compuestos exhibieron fuerte actividad de inapetencia en una dieta preparada y formulada para el bioensayo. El efecto sobre las larvas fue concomitante con la reducción de apetito en neonatos y el tercer estado larvario. En el ensayo nutricional, todos los compuestos redujeron capacidades para la alimentación y el desarrollo.

Ninguna toxicidad fue observada, sugiriendo que los limonoides tipo prieurianina actúan específicamente como alteradores de la apetencia.

También en el 2003, Torres-Estrada y colaboradores, enfocaron sus investigaciones hacia establecer como las “Señales físico químicas involucradas en la búsqueda de hospederos inducen la picadura por mosquitos”, revelando que las hembras de los mosquitos vectores de enfermedades utilizan señales físicas y químicas para localizar su fuente de alimentación sanguínea en hospederos vertebrados. Los mosquitos zoofílicos responden preferentemente al CO_2 y al octenol liberados en la respiración y excreciones, mientras que los mosquitos antropofílicos responden al ácido láctico y a una variedad de compuestos en el sudor. Estos compuestos son modificados por microorganismos saprófitos de las glándulas sebáceas de la piel. Concluyen con la identificación de estos atrayentes químicos y sus moléculas receptoras en mosquitos puede ser utilizada como complemento de nuevos métodos para la vigilancia epidemiológica, para atraer a los mosquitos a trampas de colecta o para incrementar su contacto con insecticidas usados en su control, así como en la manipulación genética para desviar las picaduras de los mosquitos hacia otros hospederos vertebrados.

Mazzafera en junio del 2003 publicó el trabajo titulado “Efecto alelopático del extracto alcohólico de clavo de la India y eugenol”, donde se verificó que el extracto etanólico de clavo de la India y el eugenol puro poseen un efecto alelopático, inhibiendo la germinación de semillas de varias plantas. El eugenol

fue determinado en el extracto de clavo por cromatografía líquida de alta resolución, donde la separación de los componentes se hizo en una columna C₁₈ de fase reversa, con gradiente de metanol y solución acuosa de ácido acético, durante 60 minutos a 0.8mL/min.

En el presente año Ken y Wong publicaron su artículo: “Citronella como repelente de insectos en comida empacada”, donde se estudiaron 5 extractos de plantas comerciales (citronella, ajo, neem, pino y piretro), y en el cual, la citronella fue encontrada como la más efectiva en detener la infestación de cartones conteniendo cereales (muesli) y germen. El componente químico fue aplicado como parte de un recubrimiento sobre el cartón. En un experimento que aceleraba la infestación por un período de 2 semanas, los cartones tratados con cintronella (0.2 g/m² de cartón) redujo la infestación por insectos aproximadamente en un 50% del nivel observado en el cartón control. Con ello se pone de manifiesto que existe interés por encontrar nuevas y más versátiles aplicaciones del efecto repelente de este tipo de compuestos.

También en este año, fue publicado un artículo del autor Xiuli y colaboradores, sobre un “Ensayo sensitivo de Cromatografía de Líquidos para la determinación simultánea de Ibuprofen y sus profármacos, éster de Ibuprofen Eugenol, en plasma de ratas”, dicho método fue desarrollado para cuantificar el ibuprofen (IBU) y sus profármacos (IEE) a través de una cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa con detector de absorción al UV a

230nm. Los porcentajes de recuperación estuvieron entre el 82.6 y el 96.2%. El resultado mostró que el método establecido es reproducible y sensitivo.

Oyama-Okubo y colaboradores en 2005 trabajaron sobre el “Mecanismo de emisión del perfume floral de *Petunia axillaris*”, haciendo uso del análisis por HPLC para la cuantificación del iso-eugenol, a través de una columna CD-C18, a temperatura de 40°C, con flujo de 0.2mL/min, y usando un sistema de solventes de acetonitrilo y agua destilada, cuantificando la concentración al medir la absorbancia a 210nm.

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La hipótesis del presente trabajo de tesis se plantea demostrar que: El empleo de extractos naturales que contienen citronela, eugenol y limoneno funcionan como repelentes de insectos al estar contenidos en un dispositivo adaptado sobre un parche de uso externo.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

Construir parches de uso externo como base y soporte de dispositivos contenedores de extractos naturales con efecto repelente de mosquitos.

2.2.2 Objetivos Particulares

1. Formular la mezcla de efecto repelente.
2. Seleccionar los materiales adecuados para el diseño de la base y el soporte de la mezcla.
3. Evaluar la resistencia de la pieza ensamblada.
4. Evaluar la efectividad de la formulación.
5. Implementar presencia del producto.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Desarrollo y Selección de Formulación de Efecto Repelente

Para elaborar una mezcla de efecto repelente se llevó a cabo una selección de componentes para la formulación de un gel de acuerdo a lo estipulado por Banker y Rhodes (Modern Pharmaceutics, 2002). A continuación se enlistan los componentes empleados:

- Carbopol (Polímero sintético de ácido acrílico).
- Almidón.
- Alcohol Polivinílico.
- Ácido Cítrico
- Agua desionizada.
- Etanol desodorizado.
- Trietanolamina.
- NaHCO_3 .

- Glicerina.
- NaCl.
- Aceite esencial de Limón.
- Aceite esencial de Citronela.
- Aceite esencial de Clavo.
- Aceite esencial de Canela.
- Aceite esencial de Menta.
- Aceite esencial de Naranja.

Primeramente se prepararon tres tipos de formulaciones básicas, la cuales sirvieron como matriz para la incorporación de los extractos de efecto repelente de mosquitos. Las formulaciones base fueron adicionadas con cada uno de los aceites esenciales de efecto repelente en distintas proporciones. Además se añadieron colorantes, aromas y otros aditivos *ad libitum*. Las cantidades exactas de cada uno de los componentes de los tres grupos de formulaciones se presentan en las Tablas 4, 5 y 6.

Al primer grupo de formulaciones preparadas a base de una matriz de almidón y alcohol polivinílico, se le adicionaron glicerina y un volumen determinado de agua desionizada para la posterior incorporación de los aceites esenciales, todo esto con mezclado manual o mecánico mediante propelas, estas mezclas a su vez fueron sometidas a calentamiento por microondas para favorecer la incorporación de los componentes.

TABLA 4
COMPONENTES DE LAS FORMULACIONES
DE EFECTO REPELENTE DEL GRUPO 1

Formulación								
	1	2	3	4	5	6	7	8
Componente								
Almidón	8.5 g	8.45 g	8.45 g	8.45 g	4.22 g	4.22 g	2.11 g	2.11 g
Alcohol Polivinílico	1.4 g	1.4 g	1.4 g	1.4 g	0.7 g	0.7 g	0.35 g	0.35 g
Agua	10 mL	20 mL	-	20 mL	20 mL	15 mL	2 mL	5 mL
Glicerina	1 gota	1 gota	-	-	-	-	-	-
Aceite esencial	-	-	20 mL	1 mL	0.5 mL	200 µl ^a	2 mL ^b	-
Colorante	-	-	-	-	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	-	-

^a al 100%; ^b al 50%

Para el segundo grupo de formulaciones se procedió a combinar almidón y carbopol como base, y a esta misma mezcla se añadió trietanolamina (TEA), de modo manual, también se procedió al calentamiento de las muestras por medio de microondas.

TABLA 5
COMPONENTES DE LAS FORMULACIONES
DE EFECTO REPELENTE DEL GRUPO 2

Formulación		
Componente	9	10
Almidón	10 mL ^a	1 g
Agua	-	75 mL
Carbopol	0.5 g	0.3 g
TEA	1 mL	1 mL
Aceite esencial	-	<i>Ad libitum</i>
Colorante	-	<i>Ad libitum</i>

^a al 40%

TABLA 6
COMPONENTES DE LAS FORMULACIONES
DE EFECTO REPELENTE DEL GRUPO 3

Formulación									
Componente	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Carbopol	8.5 g ^d	8.24 g ^d	8.24 g ^d	9 g ^d	9 g ^d	9 g ^d	9 g ^d	20 mL ^d	14 g ^d
TEA	1 mL	1 mL		2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	1 mL	2 mL
Ac. Cítrico	-	-	16 mg	-	-	-	-	-	-
NaHCO ₃	-	-	16 mg	-	-	-	-	-	-
NaCl	-	-	-	0.5 g	-	0.5 g	0.25 g	-	0.5 g
Aceite esencial	1 mL ^c	1 mL	-	-	-	-	-	0.5 mL ^a	1 mL
Colorante	-	<i>Ad libitum</i>	-	-	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	-

^a al 100%; ^b al 70%; ^c al 10%; ^d al 5%

Tabla 6 (Continuación)

Formulación								
Componente	20	21	22	23	24	25	26	27
Etanol	-	-	1 mL	-	-	-	-	-
Carbopol	16 g ^c	50 g ^c en EOH ^b	16 g ^c	100 g ^c en EOH ^b	100 g ^c en EOH ^b	50 g	50 g	100.84 g
TEA	4 mL	4 mL	4 mL	18 mL	10 mL	4 mL	-	-
NaCl	1 g	-	1 g	-	-	1 g	<i>Ad libitum</i>	-
Glicerina	-	-	-	-	10 mL	-	17 mL	20 mL
Aceite esencial	2 mL	0.5 mL	2 mL	20 mL	20 mL	-	-	20 g
Colorante	<i>Ad libitum</i>	<i>Ad libitum</i>	-	-	-	-	-	-

^a al 100%; ^b al 70%; ^c al 10%; ^d al 5%

El tercer grupo de formulaciones se preparó con una base únicamente constituida por carbopol y glicerina, mezclando con propela o manualmente. En este grupo se hizo variar las proporciones de carbopol y glicerina, además, le fueron añadidos otros excipientes, tales como TEA, ácido cítrico, NaCl y NaHCO₃, con la finalidad de dar mayor firmeza al gel y mejorar la incorporación de los elementos de ambas fases, la acuosa y la fase oleosa (aceites esenciales).

Para las preparaciones hechas a base de carbopol, se llevó a cabo de manera previa, un proceso de hidratación con agua o etanol durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a homogenizar la preparación e incorporar el resto de los componentes.

Una vez hechas las incorporaciones de todos los componentes de la formulación con efecto repelente, se tomó como criterio de selección la conservación de la consistencia del gel. Se valoraron en forma visual aspectos como: homogeneidad de la preparación, presencia de grumos, estabilidad de la formulación en cuanto a su aspecto físico y sin separación de los componentes, así como la ausencia de exudados.

3.2 Diseño y Construcción del Dispositivo de soporte para la Formulación de Efecto Repelente

Con el propósito de proveer un soporte para la formulación de efecto repelente de mosquitos, se llevó a cabo el diseño y construcción de un dispositivo que fungiera como contenedor de esta misma. Para ello se seleccionaron materiales diversos tales como: textiles, adhesivos, plásticos o papel auto-adheribles, almohadillas adherentes de doble cara y láminas de etilvinil acetato en grosores y colores diversos. Los materiales anteriormente mencionados se dispusieron tal como se ilustra en la Figura 4. Para ello se montaron dos almohadillas adherentes de doble cara en la base del dispositivo, a cada una de ellas le fue retirado el protector que cubre una de las caras con adhesivo.

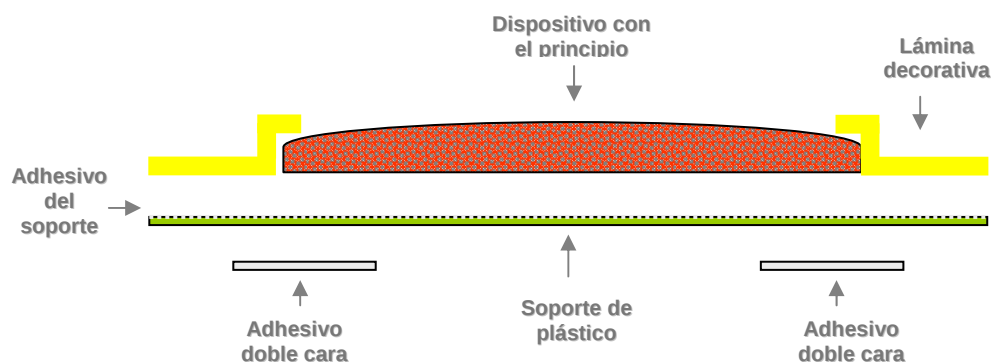


Figura 4. Representación gráfica de la disposición de los materiales utilizados en el diseño y construcción del dispositivo del soporte para la formulación de efecto repelente.

Lo anterior permitió que se adicionara el papel o plástico auto-adherible con su correspondiente cara engomada hacia arriba. Sobre dicha superficie se dispuso una figura de etil-vinil acetato laminado, la cual fue cortada con las mismas formas y dimensiones que la base correspondiente. No obstante, a cada una de las láminas de etil-vinil acetato le fue retirada una porción central, ya fuera de forma circular o pentagonal con un diámetro de 3 a 5 cm. Este espacio fue provisto en el diseño del dispositivo para contener la formulación de efecto repelente. Es así que la formulación queda contenida y adopta la forma de esta sección permaneciendo a la vez adherida a la base del dispositivo. El ensamblaje final del modelo se puede apreciar en la Figura 5.

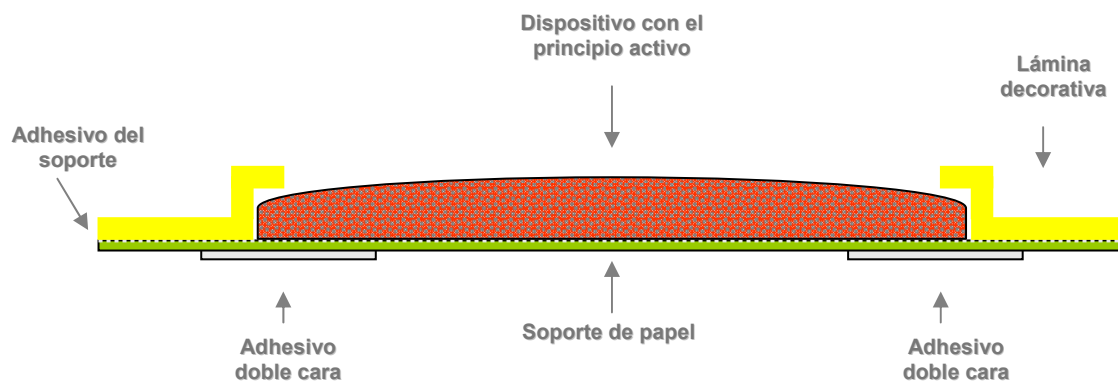


Figura 5. Representación gráfica del dispositivo ensamblado para soporte de la formulación de efecto repelente.

Con la finalidad de evitar tanto la deshidratación del gel como la evaporación de los aceites esenciales, los dispositivos ensamblados fueron empacados individualmente en envases herméticos, conservados a 4 °C hasta llevar a cabo las evaluaciones correspondientes.

3.2.1 Resistencia del Producto al Efecto del Movimiento y Temperatura

Los dispositivos de soporte ensamblados se colocaron con ayuda de las almohadillas de adhesivo doble cara en soportes verticales de acrílico recubiertos con muestras de textiles sintéticos y de fibras naturales (100 % algodón). Posteriormente fueron sometidos a tratamiento con y sin movimiento, así como, a la aplicación de temperatura de 25, 35 y 45 °C en una incubadora con agitación a 100 rpm. Se registraron de manera visual de los cambios que ocurrieron en los productos. Las evaluaciones se llevaron a cabo por duplicado de las muestras.

Las pérdidas por secado se determinaron de acuerdo al método general de análisis MGA 0671 (FEUM, 2000), a las temperaturas antes mencionadas. Los resultados obtenidos se graficaron ubicando en las abscisas el tiempo en horas y en las ordenadas el porcentaje de pérdida al secado. La ecuación que expresa esta condición es la siguiente:

$$PS = \frac{(W_{\text{inicial}} - W_{\text{final}})}{W_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (1)$$

donde W_{inicial} es el peso de la muestra mas la charola a peso constante al inicio de la prueba, W_{final} es el peso de la muestra y la charola al final del tratamiento.

3.3 Evaluaciones

3.3.1 Desarrollo de un método para la cuantificación de principios activos

La evaluación de la estabilidad de los principios activos de la formulación expresada como tasa de volatilización, se llevó a cabo mediante su cuantificación a través de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Para tal propósito fue necesario el desarrollo de una metodología para la extracción y cuantificación de estos componentes (García, 1988; Skoog, 1998; Snyder, 1997).

Para la cuantificación de los principios activos por medio de HPLC, se empleó un equipo Varian con sistema de bombeo terciario 9012, equipado con

un detector de fotoarreglo de diodos 9065 y un automuestreador 9300. Para la resolución de las muestras se utilizó una columna Hypersil ODS C18 (Supelco), con tamaño de partícula de 5 μ m, 25mm de longitud y 4.5mm de diámetro interno. Como fase móvil se utilizó una mezcla de Metanol:Agua (80:20 v/v) a un flujo de 0.8mL/min y con un tiempo de corrida de 30 minutos. Las señales de citronela y limoneno fueron registradas a una longitud de onda de 210nm, mientras que la señal para eugenol se registró a una longitud de onda de 244nm.

3.3.2 Desarrollo de un método para la extracción de los terpenos

En la fase que corresponde a la extracción de los principios activos y con miras a seleccionar el método de extracción apropiado, se pusieron en práctica varios procesos con el objetivo de liberar dichos compuestos de la matriz formulada. Los planteamientos para llevar a cabo el proceso de extracción de los terpenos citronela, limoneno y eugenol se trazaron en función de sus propiedades fisicoquímicas (Merck Index, 2001).

En la primera etapa, se seleccionó el solvente de extracción, para lo cual a tres muestras de 1 g cada una se les adicionaron 10mL de acetonitrilo, metanol o agua grado HPLC respectivamente. Con la finalidad de favorecer la extracción, estas preparaciones se mezclaron mediante agitación mecánica a 2500 rpm, durante al menos dos períodos continuos de 5 minutos cada uno con un reposo intermedio de hasta 24 horas.

En una segunda fase se seleccionó un método de disrupción del gel, por tal motivo muestras de 1 g de formulación tratadas con acetonitrilo fueron sometidas a dos procesos de rompimiento de la matriz polimérica. El primer método utilizado fue agitación mecánica con perlas de vidrio a 2500 rpm, mientras que el segundo consistió en sonicar la muestra en un baño ultrasónico (Branson 2510), por un espacio de 10 minutos. Los resultados fueron comparados con una extracción en acetonitrilo sin la utilización de un método de disrupción.

La tercera etapa en el desarrollo del método de extracción de terpenos consistió en incluir un proceso de expansión de las cavidades del gel, previo a la adición de acetonitrilo. Este proceso consistió en agregar a la formulación volúmenes de agua destilada equivalentes a 0.0, 1.0 y 2.0 mL que al expandir el gel favorecieran la liberación de los compuestos de interés.

3.3.3 Validación del método

Se aplicó la prueba de Mandel para verificar la linealidad de la curva de calibración de los terpenos según se describe en el siguiente apartado. Se determinó el límite de cuantificación y el límite de detección para cada uno de los principios activos (Apéndice A).

3.3.4 Estabilidad de la formulación

Para determinar la estabilidad de los componentes de la formulación, se realizaron cinéticas de descomposición y/o evaporación a tres diferentes temperaturas 25, 35 y 45 °C.

La formulación fue incubada por un lapso de 8 horas a las temperaturas antes mencionadas en una incubadora de la marca Barnstead/Lab-Line, tomando muestras cada 2 horas. Posteriormente, los componentes de las muestras fueron extraídos y cuantificados por HPLC. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la cuantificación de los principios activos, se prepararon curvas de calibración. Según la metodología para este punto y se obtuvo la ecuación de la recta. Se analizaron por HPLC, al igual que las muestras sometidas a los tratamientos establecidos según la metodología y se extrajeron para ser cuantificadas por HPLC, según el MGA 0241 (FEUM, 2000):

$$y=ax+b \quad (2)$$

donde y es el área del pico de interés, a es la pendiente de la curva, x es la concentración del terpeno a analizar y b es la ordenada al origen.

Despejando y traduciendo la fórmula se obtiene:

$$\text{Conc. Mta} = \frac{(A_{\text{mta}} - b)}{a} \times \frac{FD_{\text{mta}}}{W_{\text{mta}} \times P_{\text{MP}}} \quad (3)$$

donde Conc. Mta es la concentración de la muestra en mg/g, A_{mta} es el área del pico de interés registrada para la muestra, b es la ordenada al origen, FD_{mta} es el factor de dilución de la muestra, a es la pendiente de la curva, W_{mta} es el peso de la muestra en g, P_{MP} es la pureza del aceite esencial en cuestión como materia prima.

$$\%Ex = \frac{\text{Conc. Mta} \times 100}{(W_{\text{pamta}}/W_{\text{total}})} \quad (4)$$

donde %Ex es el porcentaje de extracción, Conc. Mta es la concentración de la muestra en mg/g, W_{pamta} es el peso del principio activo en la muestra en mg, W_{total} es el peso total de la muestra en g.

$$\%Ev = 100 - \%Ex \quad (5)$$

donde %Ev es el porcentaje de evaporación y %Ex es el porcentaje de extracción.

Durante la incubación, además de analizar los componentes de las muestras, también se monitoreó la humedad relativa (HR), del ambiente.

Se prepararon curvas de calibración con estándares de referencia primaria (SRP) de los principios activos con concentraciones de 0.035 mg/mL a 2.259 mg/mL para citronela, de 0.019 mg/mL a 2.465 mg/mL para limoneno y 0.0194 mg/mL a 2.482 mg/mL para eugenol.

3.4 Bioensayos

3.4.1 Diseño y Construcción de un *Olfatómetro*

Las evaluaciones del efecto repelente se llevaron a cabo tanto a nivel laboratorio como en pruebas de campo. Para determinar el efecto de repelencia de la formulación en el laboratorio se diseñó y construyó un *olfatómetro* que permitiera observar el comportamiento de los mosquitos; dicho equipo fue adaptado a las condiciones con las que se contaba en ese momento en el laboratorio. Ejemplos de algunos *olfatómetros* son los propuestos por Cerda *et al* (1994, 1996).

Este peculiar aditamento es de empleo frecuente y conveniente en los estudios etiológicos de insectos y su respuesta a estímulos químicos. Para este trabajo en particular, se hicieron las adaptaciones requeridas a un prototipo base de manera que se adecuara a presentar dos entornos, el primero completamente libre de sustancia alguna de efecto repelente, y un segundo ambiente con una atmósfera impregnada de las muestras sometidas a prueba. Tales innovaciones dieron como resultado un modelo con las siguientes características y dimensiones: se construyeron dos cajas de acrílico de 50 x 50

x 50 cm cada una (cámaras A y B), las cuales pudieron intercomunicarse a través de un conducto cilíndrico del mismo material de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro. En las caras opuestas a los orificios de comunicación de las cámaras se realizaron también dos orificios de 10 cm de diámetro para permitir la manipulación en el interior de cada una de ellas. Estos orificios se proyectaron hacia la parte exterior con un tubo de su mismo diámetro y 10 cm de largo, a los cuales se les proveyó de mangas de tela mosquitera flexible. Los detalles del diseño del *olfatómetro* se presentan en la Figura 6.

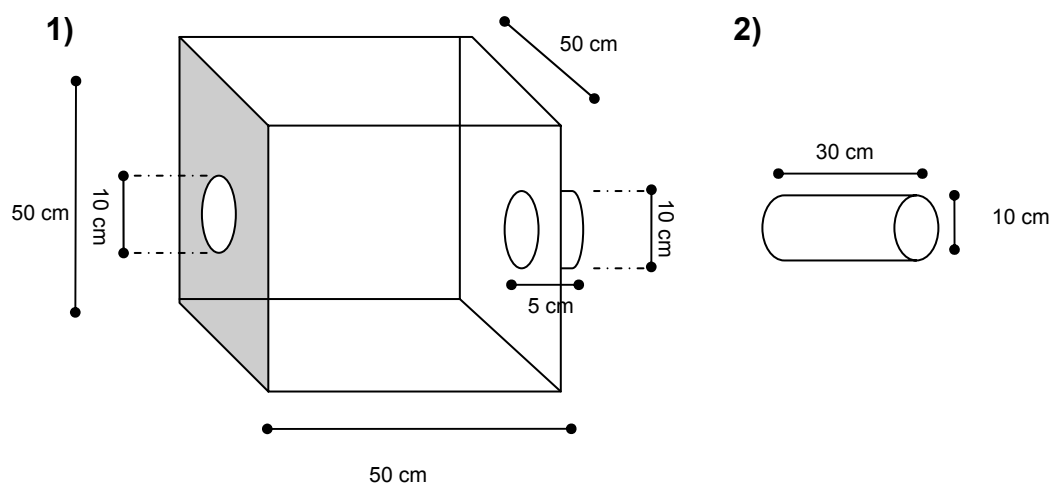


Figura 6. Representación gráfica del diseño empleado en la construcción de un *Olfatómetro* para la realización de las pruebas de repelencia de mosquitos a nivel laboratorio. 1) Dimensiones de las cámaras A y B; 2) Pieza C, que se emplea para la conexión de las cámaras A y B.

3.4.2 Establecimiento de la Cría de Mosquitos *Aedes aegypti*

Se estableció una cría de mosquitos *Aedes aegypti* la cual se inició mediante la incubación en el laboratorio de larvas colectadas en diferentes entornos. Para ello se recolectaron recipientes con agua estancada tanto en entornos domésticos, como floreros y guijarros, como reservorios con agua acumulada encontrados a la intemperie.

Las larvas se mantuvieron en vasos de precipitado de 600 mL a una temperatura de 27 ± 3 °C y al madurar al estado de pupa se transfirieron a la cámara A del *olfatómetro*. Una vez terminado este estadio y pasaron a fase adulta fueron alimentados con néctar de frutas (manzana, mandarina y uvas). Para promover su reproducción, una vez detectadas las conductas de apareamiento, los mosquitos fueron alimentados con sangre de voluntarios cada 3 días mediante exposición de la mano en un tiempo máximo de 30 minutos.

3.4.3 Pruebas de Repelencia

La actividad de repelencia de la formulación se evaluó a nivel laboratorio empleando el *olfatómetro* descrito en el apartado 3.4.1 (Do-Hyoung, 2002; Stevens, 2005; Hori, 2003). Inicialmente los mosquitos se mantuvieron en la cámara A. La cámara B fue cerrada herméticamente durante 30 minutos una vez se hubo colocado la formulación a evaluar en el centro de la misma,

permitiendo así la saturación de la atmósfera de la cámara con los compuestos volátiles liberados. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a comunicar ambas cámaras por medio de la pieza C, tal como se ilustra en la Figura 7; permitiendo entonces el paso libre a los mosquitos a través del tubo conector de las cámaras A y B.

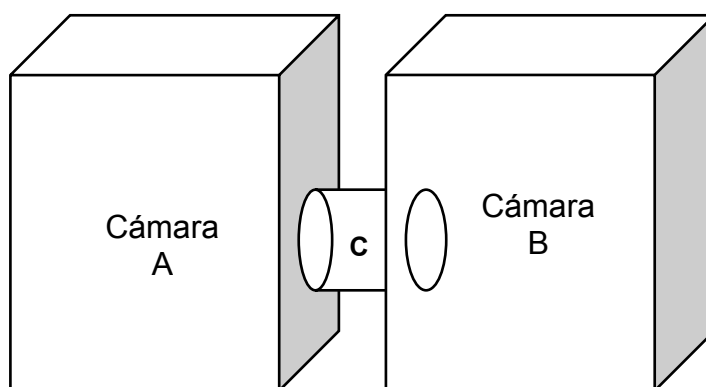


Figura 7. Representación gráfica del *Olfatómetro* ensamblado. Se muestran las cámaras A y B; y la pieza C que funge como conexión de ambas.

Una vez permitido el paso a los mosquitos a través del túnel conector de las cámaras A y B, se registró el número de mosquitos en la cámara B a cada hora por un período de 8 horas. Para establecer el porcentaje de repelencia de cada una de las formulaciones ensayadas se tomó en cuenta solo a los mosquitos hembra de entre el número total de mosquitos de la cámara B.

El porcentaje de repelencia se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Repelencia} = \frac{(\text{No. MT} - \text{No. MA}) \times 100}{\text{No. MT}} \quad (6)$$

donde MT es el número de mosquitos hembra totales, MA es el número de mosquitos hembra que lograron atravesar de la cámara A a la cámara B.

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de 2 factores con una muestra por grupo.

3.5 Pruebas de Campo

Se prepararon 28 parches que fueron distribuidos a 28 voluntarios de edades diversas y ambos sexos. Además de los parches, los voluntarios recibieron un cuestionario (Apéndice B) para recavar información de manera previa y posterior a su participación en esta prueba.

El estudio se llevó a cabo en la Ranchería “La Labor” en el municipio de Nochistlán, Zacatecas. El municipio de Nochistlán está situado entre los 21°48’03” de latitud Norte, 102°45’57” y 103°41’24” de Longitud Oeste del Meridiano de Greenwich. Estas pruebas de campo se llevaron a cabo durante los meses de mayor precipitación pluvial (INEGI, 2005). En esta zona del país se registró la presencia de mosquitos del género *Aedes*. Además, se contó con

las condiciones de temperatura y humedad relativa favorables para la proliferación de los mosquitos.

En la realización de esta prueba se indicó a cada voluntario que el tiempo mínimo de prueba sería de 8 horas.

3.6 Presentación del Producto

Se implementaron formas diversas del parche para hacer atractiva su presentación. Se ensayaron figuras atractivas y/o decorativas mediante moldeo de la lámina de etil-vinil acetato que sujeta a la formulación por la parte superior en el dispositivo de soporte de la misma. Lo anterior se llevó a cabo con el objetivo de incursionar en la *elegancia del producto* (Modern Pharmaceuticals, 2002), concepto asociado a la incorporación de elementos o componentes en los productos farmacéuticos o de cosmética de nueva aparición, que si bien no intervienen con el efecto principal, dan al producto en cuestión, posibilidad de complacencia en otros sentidos. Con este mismo propósito se llevó a cabo la incorporación de colorantes sintéticos a la formulación tales como: amarillo 6, azul 1 y rojo 40.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Desarrollo y Selección de Formulación de Efecto Repelente

Los tres grupos de formulaciones preparadas se evaluaron analizando el aspecto resultante de la mezcla de sus componentes y los diferentes matices que presentó cada una de ellas, todo esto con el objetivo de seleccionar una formulación que se adecuara, o bien, presentara características para ser moldeada y montada en el dispositivo diseñado para este propósito. Los aspectos evaluados, tales como: homogeneidad de la preparación, maleabilidad y flexibilidad, presencia de grumos, estabilidad de la formulación en cuanto a su aspecto físico y sin separación de los componentes, así como la ausencia de exudados fueron registrados. La Tabla 7 muestra las observaciones registradas para el primer grupo de formulaciones. Es necesario hacer notar que para favorecer la incorporación de las materias primas fue necesario aplicar calentamiento por microondas, lo que en un momento dado en el caso de los aceites esenciales podrían anticipar su oxidación, acelerar su volatilización ó en el peor de los casos alcanzar su punto de destello y poner en riesgo la integración del resto de los componentes. Ninguna formulación perteneciente a

este grupo resultó adecuada, debido a la consistencia y firmeza que mostraron o a la ausencia de éstas. El proceso de incorporación de los componentes no fue compatible con la agitación mecánica mediante propelas a causa de su extrema viscosidad.

TABLA 7
OBSERVACIONES REGISTRADAS PARA EL GRUPO 1 DE
FORMULACIONES DESARROLLADAS

Formulación	Observaciones
1	No logró una buena distribución, grumos blancos.
2	Se logró la incorporación de los excipientes, polímero blanco y viscoso.
3	Consistencia rígida al perder agua, posterior agrietamiento de la formulación.
4	El aceite permaneció en la parte superior hasta antes del calentamiento por microondas.
5	Polímero menos viscoso, con mayor cantidad de grumos.
6	Menos viscoso, presencia de grumos.
7	No hay homogeneidad.
8	No hay homogeneidad.

Las formulaciones del grupo dos que se presentan en la Tabla 8 fueron igualmente descartadas porque, en concreto, el resultado de la incorporación de los excipientes no fue completa a pesar del persistente mezclado, y por tanto, se favorecía la formación de grumos en la mezcla.

TABLA 8
OBSERVACIONES REGISTRADAS PARA EL GRUPO 2 DE
FORMULACIONES DESARROLLADAS

Formulación	Observaciones
9	Poco homogénea la formulación, gran cantidad de grumos, demasiada dureza.
10	Mezcla con pocos grumos pero maleable.

La Tabla 9 muestra las observaciones registradas de las formulaciones del grupo 3, las cuales fueron hechas a base únicamente de carbopol. Sin embargo, fueron descartadas aquellas formulaciones en las que el carbopol fue hidratado con agua, debido a que no se incorporaba la fase oleosa a esta matriz acuosa.

No obstante, el hidratar el carbopol con etanol al 70 % favoreció la unificación de los aceites esenciales con la matriz acuosa. Así pues, fueron descartadas también aquellas formulaciones a las cuales les fue adicionado TEA, debido a que al estar envuelta la formulación en tela no sería necesario clarificar el gel, esta propiedad o condición fue descartada. Sin embargo, la propiedad que no fue descartada fue la de homogeneidad y la nula formación de grumos, por tal motivo, fueron eliminadas también aquellas formulaciones en las que fue difícil la incorporación de las materias primas y no se lograron homogenizar bien, además de aquellas en las cuales se formaron grumos difíciles de deshacer.

Se llegó así a la formulación 26, la cual consistió solamente de carbopol 10 % en EOH al 70 % mezclado con glicerina. Cabe mencionar aquí que el uso de la glicerina favoreció una incorporación mayor de aceites esenciales.

La formulación 26 fue seleccionada como ideal de acuerdo a lo anteriormente descrito. Se ensayó la adición de aceites esenciales logrando incorporar hasta un 20 % (w/w) del mismo. La preparación que se obtuvo puede describirse como: una mezcla suave, maleable y flexible, opaca, sin presencia de grumos, estable físicamente y sin separación de sus componentes. Además, no se observaron exudados. A esta formulación se le designó con la clave 27.

Esta mezcla se empleó para llevar a cabo pruebas de compatibilidad con los materiales utilizados para construcción del soporte de la formulación de efecto repelente. No se observaron escurrimientos de la formulación, ni señales de desteñido o decoloración de los materiales. Tampoco se registraron indicios de migraciones de los colorantes hacia la formulación. Los adhesivos no presentaron ningún efecto de retracción formando aglomeraciones. Solo se registraron espacios con pérdida de la adhesión a causa de la humedad de la formulación en el soporte de papel. Por esta razón se prefirió entonces emplear como base del soporte del dispositivo, un material plástico que brindara las mismas funciones y que además garantizara no desestabilizar la formulación a causa de la pérdida de humedad.

TABLA 9
OBSERVACIONES REGISTRADAS PARA EL GRUPO 3
DE FORMULACIONES DESARROLLADAS

Formulación	Observaciones
11	Difícil la incorporación del aceite esencial, gel poco viscoso
12	Formulación poco viscosa
13	Muy poco viscoso
14	Gel con mayor resistencia
15	Buena unión entre el carbopol y la TEA, pero no se probó aceite esencial
16	Muy Grumoso
17	Muy Grumoso
18	Falta de consistencia. Falta dureza y firmeza
19	Incrementó la firmeza con el NaCl
20	El aceite no logró incorporarse totalmente. Hay exudado en exceso. Mancha material textil. Atraviesa el soporte de papel y mancha el adhesivo
21	El aceite no se incorporó del todo
22	No se incorpora. Se adicionó 1 mL de EOH quedando una goma blanca brillante todo bien incorporado
23	Mezcla con grumos, pero con agitación vigorosa emulsionó, quedando homogénea blanca cremosa, brillante, suave al tacto
24	Gel y la esencia no se unieron, ni con agitación mecánica prolongada
25	Se separó la fase sólida. Expulsa la fase líquida. No se volvió a incorporar
26	El carbopol y la glicerina formaron una buena unión
27	Mezcla suave. Maleable. Flexible. Opaca. Sin grumos. Estable. Sin exudados

4.2 Construcción y Resistencia del Producto

4.2.1 Diseño y Construcción del Dispositivo de soporte para la Formulación de Efecto Repelente

El diseño y construcción de un dispositivo que proporcionara soporte a la formulación de efecto repelente de mosquitos incluyó la utilización de materiales textiles, adhesivos, plásticos y papel auto-adheribles, almohadillas adherentes de doble cara y láminas de etil-vinil acetato en grosores y colores diversos. El objetivo principal fue seleccionar los materiales adecuados para fabricar un producto que se sujetara a la ropa, se adhiriese a superficies en habitaciones, paredes, muebles o tiendas de campaña, etc.

En la Figura 8 se ilustra la manera como fueron dispuestos los materiales mencionados anteriormente. En el ensamblaje de la pieza completa se empleó la formulación de efecto repelente designada con la clave 27.

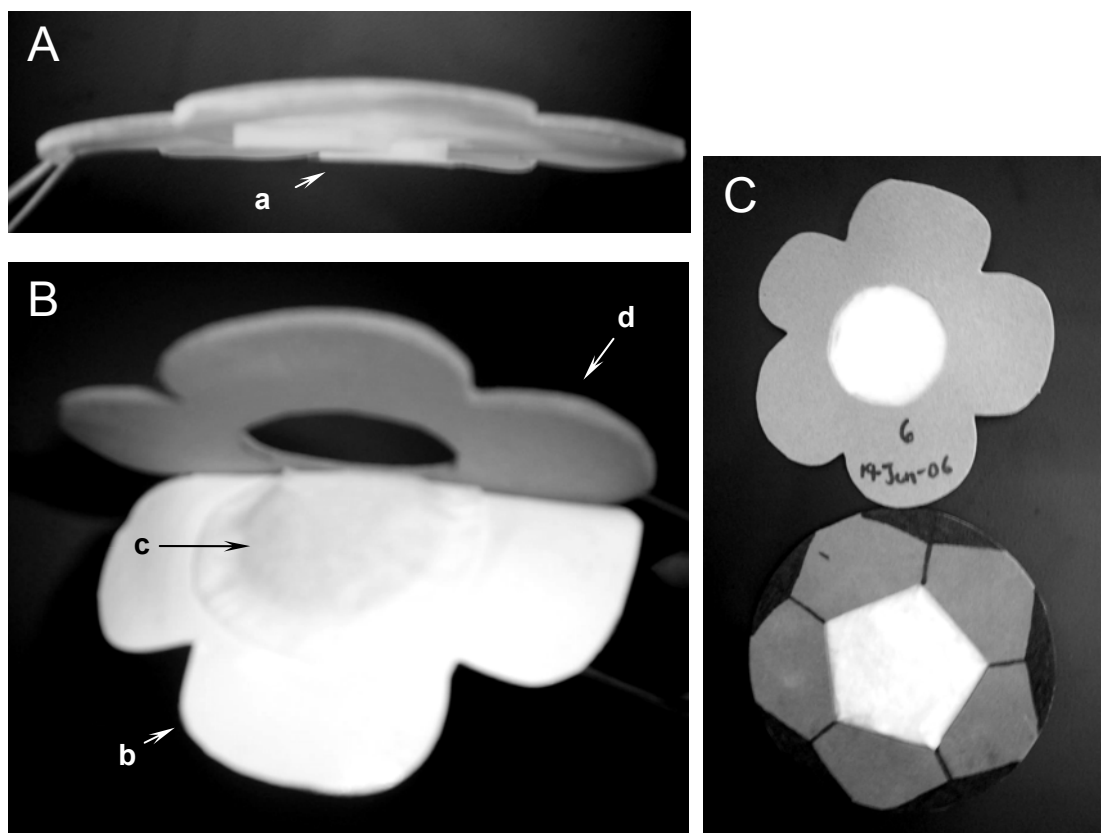


Figura 8. Imágenes fotográficas del ensamblado del parche para uso externo que funge como soporte a la formulación de efecto repelente de mosquitos. A) Muestra la vista de costado donde se puede apreciar la posición de las almohadillas adhesivas. B) Ilustra el soporte (b) del dispositivo con la formulación de efecto repelente (c) y la lámina de etil-vinil acetato que sujeta la formulación (d). C) Vistas frontales del ensamblado y las figuras atractivas y/o decorativas.

4.2.2 Resistencia del Producto al Efecto del Movimiento y Temperatura

En las pruebas de resistencia del producto a distintas temperaturas con y sin movimiento no se observaron alteraciones de importancia, como se puede apreciar en la Tabla 10.

TABLA 10

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA EVALUACION VISUAL DEL PRODUCTO
AL HABER SIDO SOMETIDO A CONDICIONES DE TEMPERATURA Y
MOVIMIENTO

T (°C)	Condiciones	rpm	Almohadillas + Base plástica	Base + Dispositivo	Base + Lámina	Dispositivo + Lámina	Ablandamiento	Deformaciones	Deterioro	Humedecimiento	Pérdida al secado	Pérdida de olor	Pérdida de color
25	Mov	200	+	+	+	+	-	-	-	-	N/A	-	-
	Rep	0	+	+	+	+	-	-	-	-	20.1 %	-	-
35	Mov	200	+	+	+	+	-	-	-	-	N/A	+/-	-
	Rep	0	+	+	+	+	-	-	-	-	28.2 %	+/-	-
45	Mov	200	+	+	+	+	-	-	-	-	N/A	+	-
	Rep	0	+	+	+	+	-	-	-	-	25.3 %	+	-

+ Permanece unido ó si hay pérdida.

- No permanece unido, no hay pérdida.

+/- Permanece poco, hay poca pérdida.

Rep = Reposo

Mov = Movimiento

N/A = No Aplica

En ninguna de las pruebas de resistencia del ensamblado se registró cambio alguno al finalizar el tiempo que duró el tratamiento. Todos los elementos, es decir; las almohadillas adhesivas, la base plástica, el dispositivo con la formulación y la lámina decorativa permanecieron sin alteración de su función, se mantuvieron tal y cual se dispusieron al inicio del experimento. No se registró desgaste ni se presentaron señales de deterioro relacionadas con ablandamiento o deformaciones de las piezas sometidas a prueba. Tampoco se presentaron signos de deterioro ni humedecimiento.

Con respecto al registro de pérdida al secado se observó que a mayor temperatura se incrementa la pérdida de aroma y humedad. Estos datos se pueden observar en la Figura 9, donde se presentan en forma gráfica los valores de pérdida por secado en porcentaje de la formulación sometida a cada una de las temperaturas. En ella se puede observar que la pérdida de peso por evaporación de los compuestos volátiles es gradual conforme al paso del tiempo.

El análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con una muestra por grupo confirmó que si hay diferencia estadística entre las temperaturas y los tiempos analizados. Los datos completos de estos análisis se encuentran en el Apéndice C.

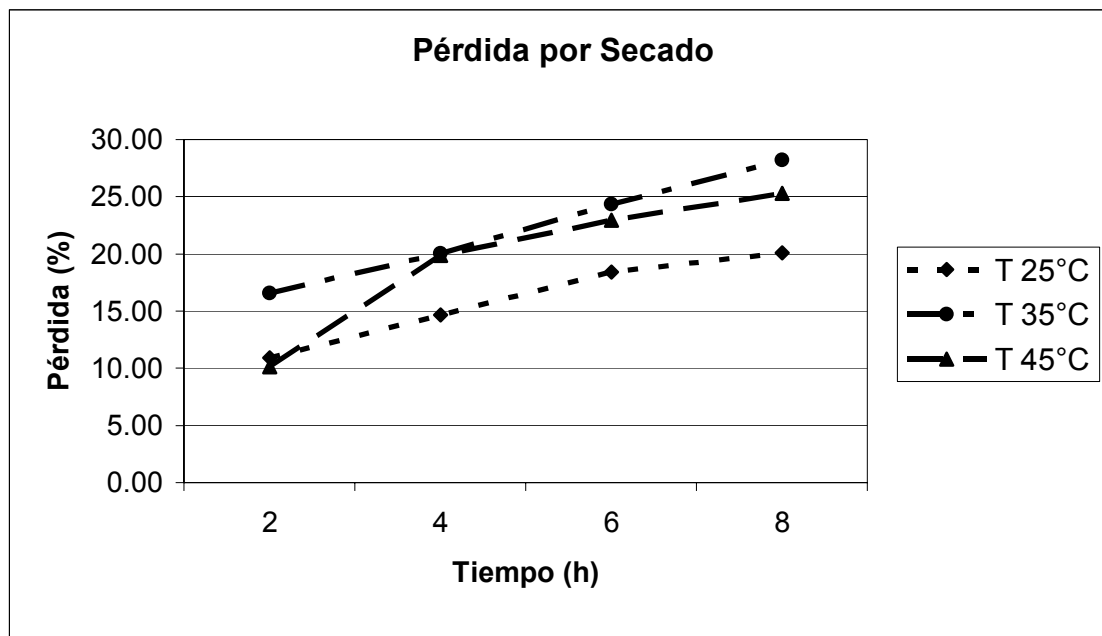


Figura 9. Gráfica de tiempo contra porcentaje de pérdida al secado de la formulación sometida a las temperaturas de 25, 35 y 45 °C.

4.3 Evaluaciones

4.3.1 Desarrollo de un método para la extracción de los terpenos

Se estableció el método de extracción de terpenos tal y como se describe a continuación: se pesó 1 g de gel, el cual fue hidratado con 2 mL de agua desionizada, se incubó a temperatura ambiente hasta aumentar por expansión su volumen por encima del volumen inicial. Con ello se logró desestabilizar la red de la matriz a través del aumento en su porosidad. Posteriormente se adicionaron 10 mL de acetonitrilo (Mallinckrodt) grado HPLC y se llevó a un baño ultrasónico Branson 2510 durante 10 minutos con el propósito de fracturar el gel, se dejó reposar la mezcla y posteriormente se transfirió la fase líquida a

un matraz de aforación de 50 mL. Este procedimiento se repitió tres veces más recolectando los sobrenadantes en el matraz y aforando con el mismo solvente de extracción, este proceso se aplicó a cada una de las muestras. El acetonitrilo de la extracción fue filtrado utilizando un acrodisco con membrana de nylon de 0.45µm de poro y 30mm de diámetro (Whatman) y analizado por HPLC.

4.3.2 Validación del método

Se prepararon curvas de calibración para cada uno de los terpenos a evaluar (citronela, limoneno y eugenol), las cuales fueron analizadas por HPLC. Mediante la prueba de Mandel aplicada a los valores obtenidos de dicho análisis, se confirmó la linealidad de la curva. Por otro lado, se determinaron los límites de cuantificación y de detección para cada uno de los terpenos. En la Tabla 11 se muestran dichos valores para cada uno de los principios activo analizados en este trabajo. Los datos completos y los cálculos se pueden apreciar en el Apéndice D. Para los tres tipos de terpenos analizados el valor de TV es menor al valor de $F_{(99\%, 1, N-3)}$ obtenido de tablas, lo que confirma que la función de calibración de primer orden es la que expresa el mejor ajuste de los puntos de la curva.

TABLA 11
RESULTADOS PARA LA VALIDACIÓN DE TERPENOS

	Citronela	Limoneno	Eugenol
LOD*	0.0441	0.0693	0.0758
LOQ*	0.1471	0.2312	0.2527
DS ²	1.26x10 ⁸	1.17x10 ⁸	1.01x10 ⁹
TV	9.97x10 ⁻¹	5.30x10 ⁻²	2.56x10 ⁰
F _(99%,1,N-3)	34.1161	34.1161	16.2581

* mg/mL

4.3.3 Estabilidad de la Formulación

Para la cuantificación de los principios activos, se prepararon curvas de calibración. Según la metodología para este punto y se obtuvo la ecuación de la recta. Se analizaron por HPLC, al igual que las muestras sometidas a los tratamientos establecidos según la metodología y se extrajeron para ser cuantificadas por HPLC, según el MGA 0241 (FEUM, 2000).

Se obtuvieron los cromatogramas para cada una de las muestras y se compararon las señales de las muestras con las de los SRP, y según el tiempo de retención para cada uno de los principios activos se integraron dichos picos para obtener el área del pico, con este dato se pudo determinar la concentración extraída.

En la Figura 10 se presenta un cromatograma obtenido de uno de los puntos de la curva mezclando SRP de citronela, limoneno y eugenol. Como se puede observar, el eugenol es el primer compuesto en ser eluído por la fase móvil en un tiempo de retención (TR) de 5.231 min; el citronela, es el segundo compuesto en salir con un tiempo de retención de 7.898 min, y finalmente para el limoneno se registra un TR de 21.260 min.

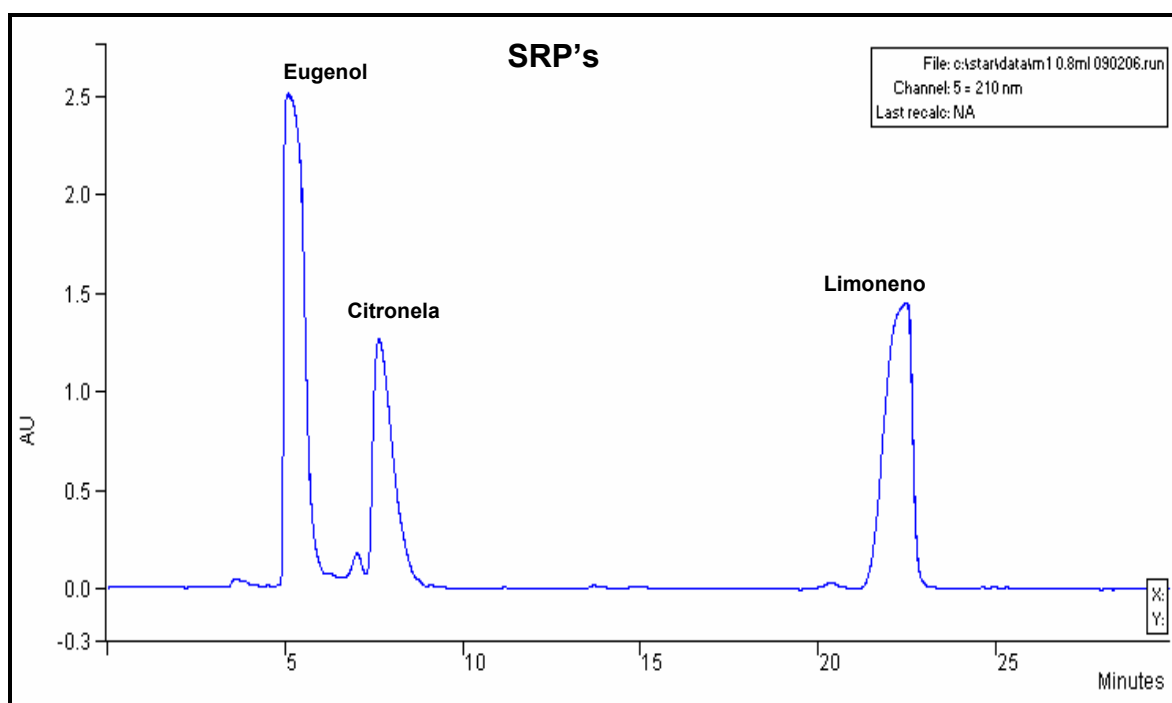


Figura 10. Cromatograma obtenido de la mezcla de los estándares de referencia primaria (citronela, limoneno y eugenol) analizados por HPLC.

En la Figura 11 se muestra el cromatograma de las sustancias extraídas de una formulación preparada con las materias primas, después del tratamiento de temperatura aplicado. Como se logra apreciar, existen señales que pueden ubicarse según los TR como las señales correspondientes a las del eugenol, citronela y limoneno. Se observan además, señales de otros compuestos tal

vez debido a contaminación de los aceites esenciales utilizados como materias primas o a transformaciones de los principios activos.

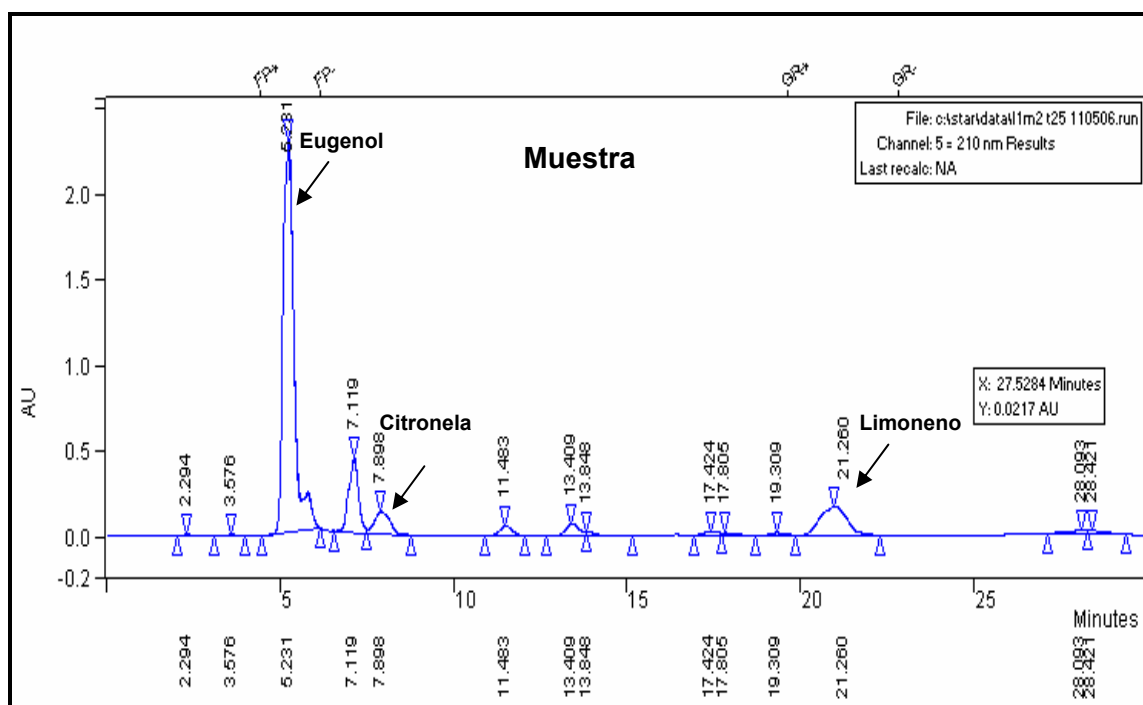


Figura 11. Cromatograma de una muestra extraída después de las dos primeras horas de tratamiento a una T de 25°C.

En la Figura 12 se aprecia el comportamiento del terpeno citronela en la formulación sometida a los tres tratamientos de temperatura aplicados durante un lapso de tiempo de 8 h. Como se puede observar en el gráfico y como es de esperarse, el porcentaje de evaporación tiende a aumentar conforme incrementa la temperatura, sin embargo, cabe señalar que a una temperatura de 25 °C, el porcentaje de evaporación pareciera permanecer constante al llegar a un tiempo de 4 h, es decir, en las primeras 2 horas de tratamiento se registró un valor de evaporación del 58.07 %, al tiempo de 4 h éste valor ha

disminuido a un 57.33 %, de ahí permanece relativamente constante, siendo para 6 y 8 horas los valores de 57.28 y 56.51 % respectivamente. En lo que respecta al comportamiento y a los valores de evaporación del terpeno a una temperatura de 35 °C, la curva tiende hacia el incremento de evaporación, empezando con un valor de 61.30 % a un tiempo de tratamiento de 2 h, e incrementándose este valor hasta un valor de evaporación del 68.12 % al término del ensayo. Sin embargo, para las muestras que recibieron el tratamiento de temperatura de 45 °C, se esperaba que estos valores incrementaran considerablemente, lo cual no ocurrió de ese modo, es decir, al tiempo de 2 h se registró un valor del 55.14 % y al finalizar el ensayo el porcentaje de evaporación fue de 69.11 %.

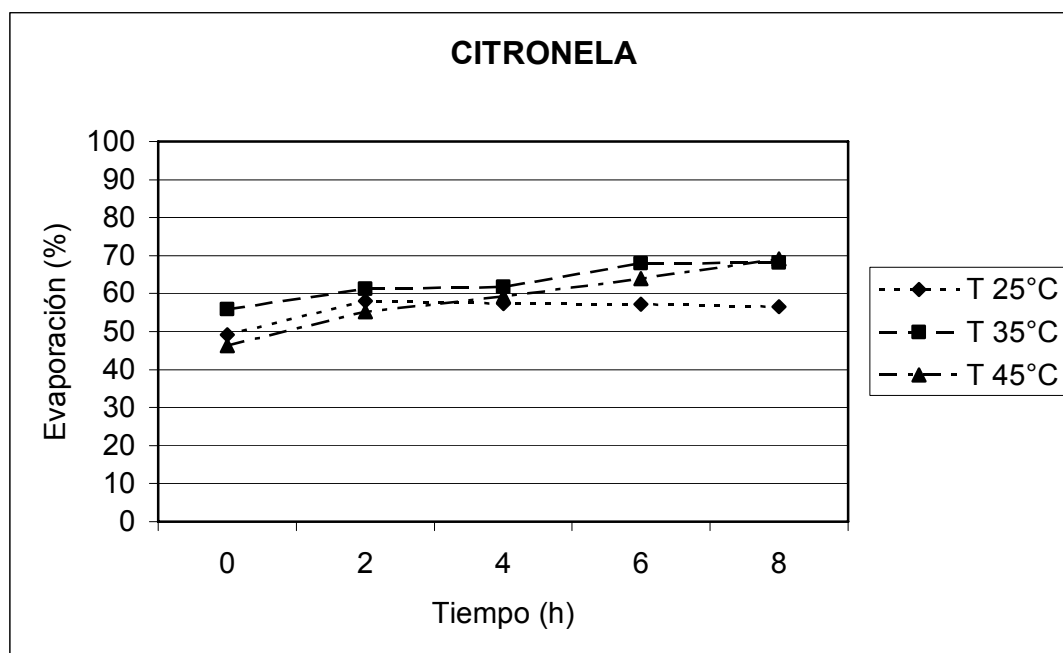


Figura 12. Gráfico de porcentaje de evaporación contra tiempo de la cinética de citronela realizada a la muestra en un lapso de tiempo de 8 h, a las temperaturas de 25, 35 y 45 °C.

En la Figura 13, se presenta el gráfico de porcentaje de evaporación contra tiempo obtenido después de los tratamientos de los lotes a las tres temperaturas manejadas. Ahí se puede apreciar el comportamiento del terpeno que inicia con un porcentaje de evaporación del 25.77 % al tiempo 0 h, el incremento se da conforme el paso de las primeras 2 h registrándose un valor del 48.58 %, posteriormente para las siguientes 6 h los valores de evaporación se mantienen muy cercanos, e inclusive pareciera que va disminuyendo la evaporación ó concentrándose el principio activo, siendo para los tiempos de 4, 6 y 8 h los valores de 46.63, 45.98 y 45.18 % respectivamente. El comportamiento del gráfico para la temperatura de 35 °C resulta en un incremento paulatino de la evaporación, registrándose valores que van desde 24.52 % en un tiempo inicial de 0 h, hasta un valor de 58.38 % al tiempo 8 h. Similar es la curva registrada para la temperatura de 45 °C, iniciando con un porcentaje de evaporación del 22.1 % y finalizando a las 8 h de tratamiento con un valor de 64.25 %.

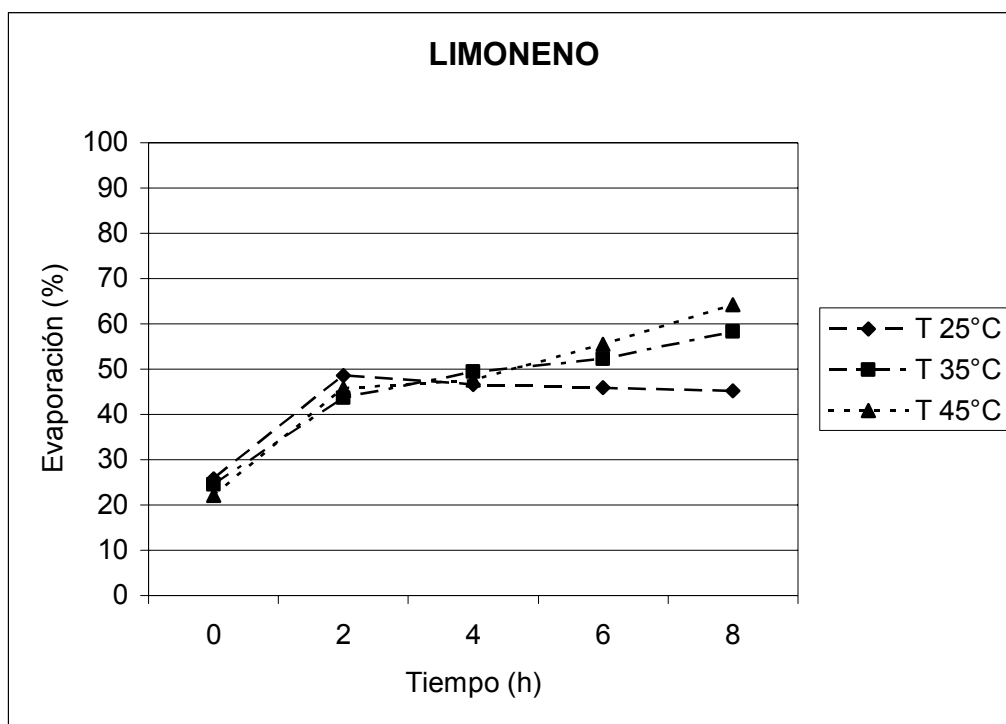


Figura 13. Gráfico de tiempo contra porcentaje de evaporación del terpeno Limoneno en la formulación sometida a tratamiento con tres temperaturas.

En la Figura 14 se puede observar el gráfico para el tercer terpeno en cuestión que fue el eugenol, el cual presenta en los tres casos de temperatura, un comportamiento muy peculiar. Se esperaba que al igual que los otros dos principios activos, la tendencia fuera hacia el incremento de la evaporación, sin embargo, esto no ocurre así. En los lotes a los que les fue aplicada una temperatura de 25 °C, se inicia con un porcentaje de evaporación del 16.2 %, al tiempo de 2 h el valor incrementó a un 17.59 %, sin embargo a partir de ahí, los porcentajes en lugar de ir en ascenso ocurre lo contrario, al tiempo de 4 h el valor registrado fue de 13.42 %, a las 6 h se registró una pérdida del 10.68 % y a las 8 h de tratamiento la pérdida fue sólo del 8.68 %. Este fenómeno se va

intensificando o marcando más conforme la temperatura se incrementa, es decir, para el ensayo realizado a una temperatura de 35 °C, el porcentaje de evaporación registrado al tiempo inicial fue de 19.65 %, dicho valor a partir de aquí va en disminución, pasando por un resultado de 10.75 % a las 4 h de tratamiento y llegando a un valor del 3.15 % de pérdida a las 6 h de tratamiento, no obstante, la gráfica tiende a partir de este hacia el ascenso, incrementándose los valores de evaporación a un 13.95 para 6 h y 19.87 % para 8 h. El comportamiento de la gráfica obtenida para una temperatura de 45 °C es aún más marcado que para la temperatura anterior. Se inició con un porcentaje de evaporación del 9.42 % y éste fue disminuyendo hasta valores por debajo del 0 % hasta el tiempo de 6 h, después de este punto el valor de evaporación incrementó nuevamente a un resultado de 4.45 % al término del estudio.

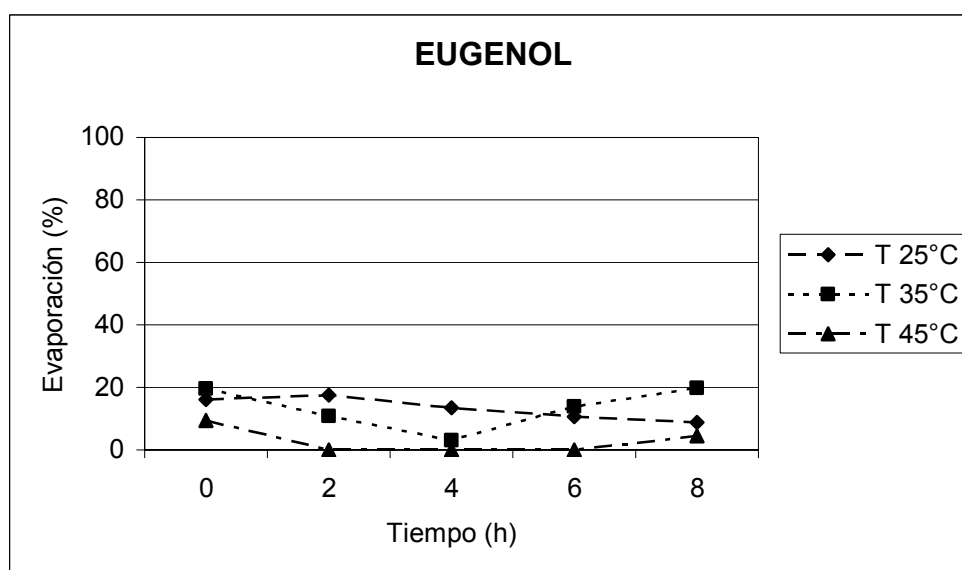


Figura 14. Gráfico obtenido para el terpeno eugenol después de haber recibido tratamientos de temperatura de 25, 35 y 45 °C.

4.4 Bioensayo

4.4.1 Pruebas de Repelencia

Las pruebas de repelencia en laboratorio se llevaron a cabo con la formulación 27 según su preparación en la metodología, a la cual se fueron adicionados cantidades de aceites esenciales de citronela, limón y citronela + limón, en concentraciones de 5 % de cada uno de dichos aceites esenciales. Se calcularon los porcentajes de repelencia para cada una de las formulaciones evaluadas que corresponden a valores promedio de los experimentos llevados a cabo por triplicado (ver Apéndice E).

En la Figura 15 se muestra un gráfico comparativo de las tres formulaciones analizadas en el bioensayo a nivel laboratorio. En el cual se puede observar que la formulación que contiene únicamente citronela presenta un porcentaje de repelencia de 91.01 % al tiempo de 1 h. Este valor resulta menor si se le compara con los porcentajes de repelencia obtenidos tanto para la formulación con aceite esencial de limón y cit+lim, los cuales fueron de 96.67 y 97.67 % respectivamente. La tendencia de las tres gráficas es hacia la disminución del porcentaje de repelencia con el transcurso del tiempo, obteniéndose valores de porcentaje de repelencia al término de 8 horas del estudio de 64.58, 87.67 y 87.67 % correspondientes a las formulaciones de citronela, limoneno y cit+lim respectivamente.

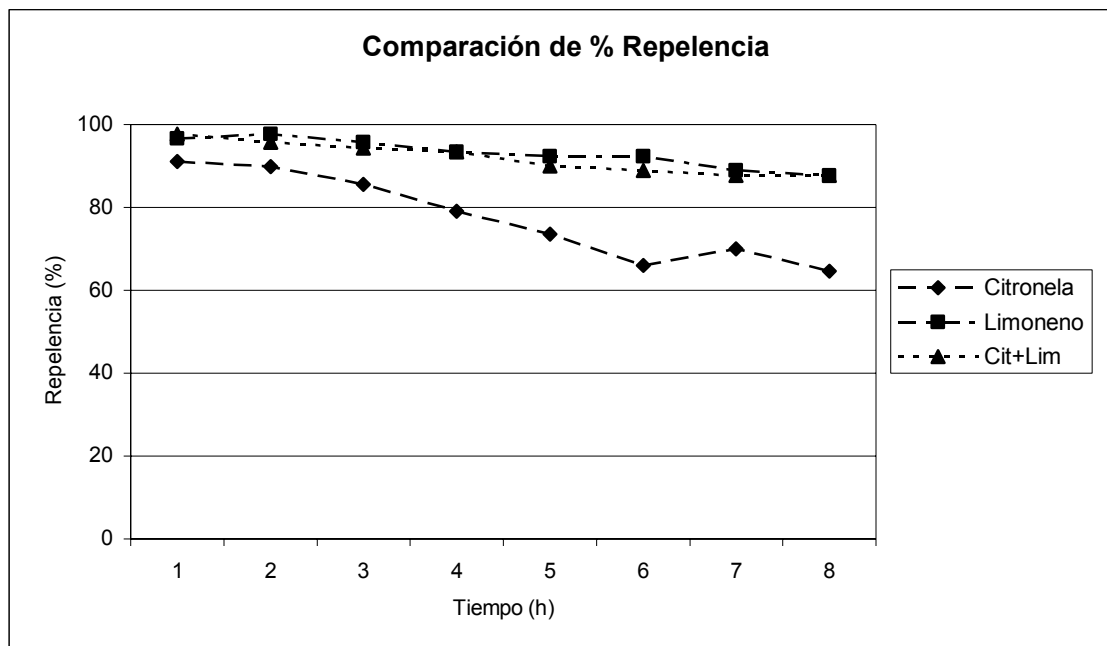


Figura 15. Gráfica que representa los porcentajes de repelencia de las tres formulaciones evaluadas en el laboratorio empleando un *olfatómetro*.

El resultado de la aplicación del análisis de varianza de dos factores con una muestra por grupo mostró que sí hay diferencia estadística entre las formulaciones y los tiempos de estudio. Sin embargo, como la Figura 15 muestra claramente que la curva para la formulación que solo contenía aceite de limón y la curva que contenía ambos aceites esenciales son prácticamente iguales, se aplicó el método de la Diferencia Significativa Mínima (LSD por sus siglas en inglés) de Fisher para demostrar entre qué pares de formulaciones existe diferencia estadística (Montgomery, 2002); para esta prueba se utilizó el software Design Expert (versión 6.0.1). La aplicación de este análisis arrojó como resultado que no hay diferencia significativa entre la formulación de limón y la que contiene cit + lim. Los datos completos del análisis estadístico se pueden encontrar en el Apéndice E.

4.5 Pruebas de campo

Se obtuvo una muestra poblacional de 28 voluntarios que participaron en el experimento, las cuales contestaron el cuestionario correspondiente. Los resultados obtenidos de las encuestas se muestran en los gráficos representados en las Figuras 16 a la 20.

La edad de los participantes se distribuye en seis intervalos presentados en la Figura 16. Como se aprecia un 7 % corresponde a niños de entre 0 y 10 años de edad, un 33 % de la población está comprendida en un rango de 11 a 20 años, el 21 % de la población corresponde a un rango de edades de entre 21 y 30 años, el 14 % de la población le corresponde un 14 %, el 18 % de la población participante fue representada por voluntarios de entre 41 y 50 años, y finalmente un rango de 51 a 60 años corresponde al 7 % de los participantes.

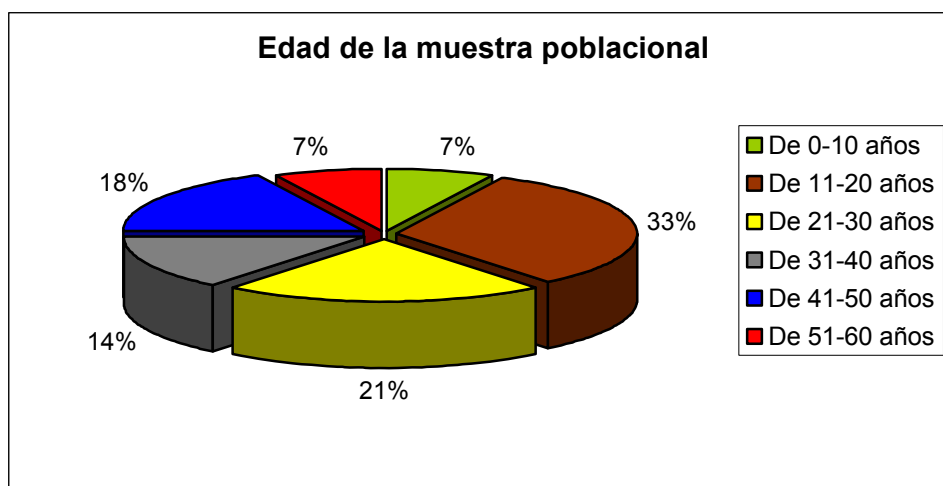


Figura 16. Gráfico de pastel que muestra los porcentajes y rangos de edades de los voluntarios que participaron en el estudio de campo.

Por lo que respecta al sexo de los encuestados, en la Figura 17, se presentan los valores que corresponden a los porcentajes de los participantes, siendo los de sexo masculino representados como un 54 %, y el 46 % corresponde al sexo femenino.

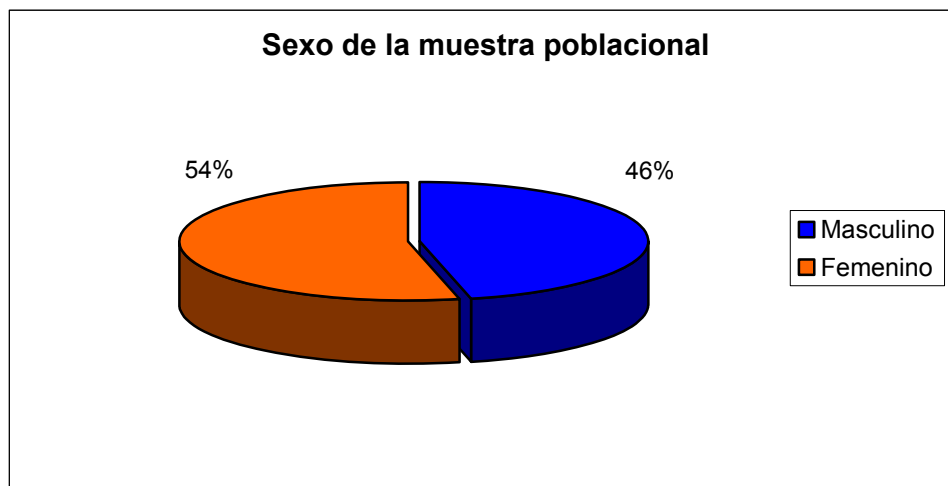


Figura 17. Gráfico de pastel que indica el porcentaje de los voluntarios masculinos y femeninos que participaron en el estudio.

El uso del parche se evaluó en ambientes abiertos y cerrados, en un intervalo de temperatura de entre los 24.0 °C como mínima y 26.7 °C como máxima. También fueron registrados datos de humedad relativa (HR) que estuvieron en un intervalo de entre 38 % y 60 %. La Figura 18 indica que el 25 % de los participantes usaron el producto en un ambiente cerrado, como lo sería en el interior de su habitación. El 43 % de la población usó el parche en un área abierta, es decir, como lo sería por ejemplo en el campo. Finalmente el 32 % de los voluntarios que usaron el producto estuvieron alternando entre un lugar cerrado y uno abierto, es decir, en constante movimiento.

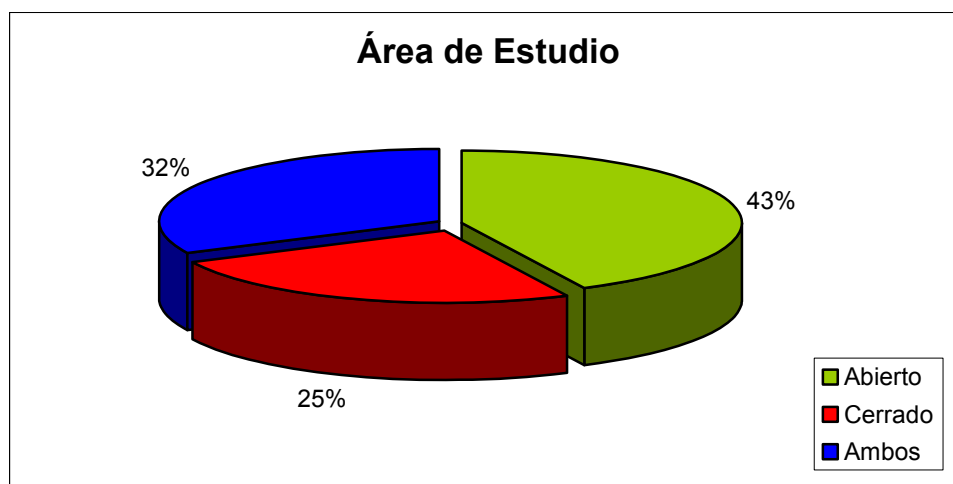


Figura 18. Gráfico de pastel que señala los ambientes de estudio en los que se llevó a cabo el estudio de campo, ya fuese en un ambiente abierto, cerrado o ambos.

Otro aspecto a considerar es saber la actividad desarrollada durante el uso del producto. Así pues las encuestas indican que el 39 % de la población estuvo realizando alguna actividad física, y el 61 % se mantuvo en reposo absoluto.

Como se puede apreciar en la Figura 19, un 11 % de los voluntarios usaron el producto durante un período de tiempo menor a 5 horas, otro 11 % de los participantes usaron el artículo en un lapso de tiempo de entre 5 y 8 horas, finalmente el 78 % de la población trajo consigo el producto en un lapso mayor a 8 horas.

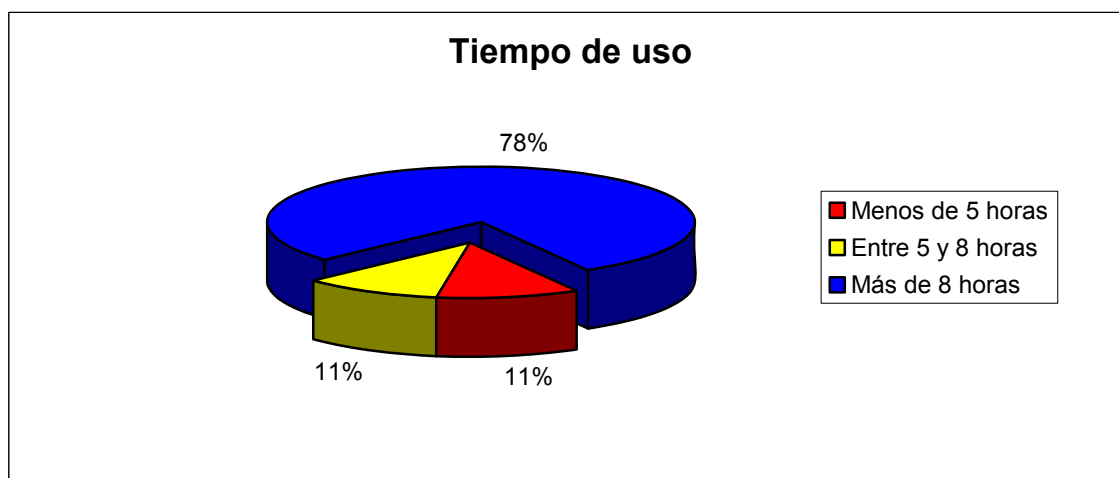


Figura 19. Gráfico de pastel que muestra los porcentajes de participantes que usaron el producto en un lapso de tiempo menor a 5 horas, entre 5 y 8 horas o por más de 8 horas.

Para que los participantes pudieran comparar nuestro producto con los de mercado se les preguntó si conocían algún otro repelente de mosquitos y si los habían llegado a usar en algún momento, revelando que el 93 % de los voluntario que participaron en el estudio de campo conocían algún otro repelente de mosquitos, y que en cambio, el 7 % de los participantes no conocían ningún repelente de mosquitos. El 71 % de los voluntarios expresaron no haber usado jamás algún repelente de mosquitos, y el 29 % dijo haber usado en alguna ocasión algún repelente de mosquitos. También se les preguntó si eran alérgicos a alguno de los componentes de la formulación, principalmente a los aceites esenciales, revelando que el 100 % de la población expresó no ser alérgico a alguno de los componentes de la formulación, en especial a los aceites esenciales utilizados en el producto. Sólo participaron en el estudio

aquellas personas que expresaron ser propensos a las picaduras por mosquitos.

Después del transcurso del estudio se les cuestionó a los voluntarios sobre el funcionamiento del producto, el 100 % de los participantes reveló no haber sido picado por ningún mosquito, lo que indica que el producto les funcionó muy bien como repelente de mosquitos.

De igual modo, la opinión general de los participantes en cuanto a la complejidad de uso del producto fue que no les pareció nada complicado el uso del artículo.

Sin embargo, en lo que respecta a molestias causadas debido a la concentración de los aceites esenciales, las encuestas revelan que al 79 % de los voluntarios no les causó ninguna molestia el aroma del producto, no obstante, el otro 21 % de los participantes expresaron haber sufrido alguna molestia con respecto al aroma.

Como se puede apreciar en la Figura 20, al 89 % de los participantes si les agradó la presentación del producto, es decir, un repelente de mosquitos que no se aplica tópicamente y que su duración se prolonga por más de 8 horas, al resto de los voluntarios correspondiente al 11 % no les agradó la presentación. Sin embargo, el 100 % de los voluntarios expresaron su aceptación a volver a usar el producto nuevamente.

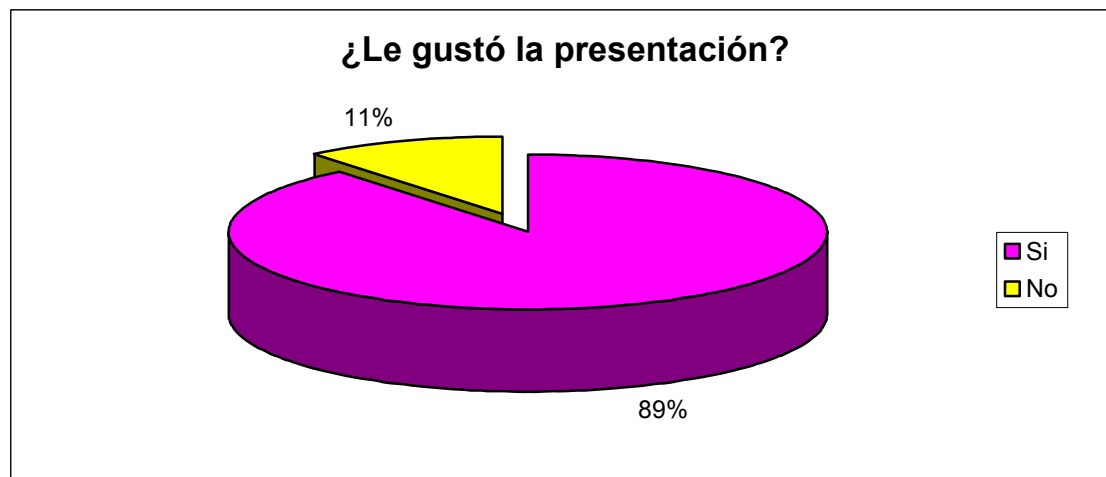


Figura 20. Gráfico que expresa el porcentaje de personas a las que les gustó o no la presentación del producto.

4.6 Presentación del producto

Se diseñaron diversas formas atractivas. Se dio forma a la lámina decorativa optando por las figuras de balón y flor en distintos colores. Se eligió el color amarillo para mejorar el aspecto visual de la formulación. En la Figura 21 se presenta una colección de fotografías de los parches terminados.



Figura 21. Fotografía de una colección de parches terminados.

CAPÍTULO 5

DISCUSIONES

Es un hecho conocido que los mosquitos son vectores de muchas de las enfermedades de mayor impacto clínico, y por tanto económico, que actualmente se conocen y temen. Entre ellas pueden mencionarse la malaria y el dengue, solo por citar algunas. Estos insectos son portadores de microorganismos principalmente de dos formas. La primera, por transmisión mecánica portando los agentes infecciosos en sus partes externas, tales como patas o alas. Y segunda, al hospedar en su organismo virus, bacterias o protozoarios, pueden propagar enfermedades a través de sus picaduras.

Con esta problemática en mente se planteó el desarrollo de un parche de uso no-dérmico y que fungiera como repelente de mosquitos. Se establecieron los objetivos del presente trabajo centrados en la elaboración de una formulación a la cual se pudiesen incorporar compuestos de efecto repelente tales como el citronela, el limoneno y el eugenol. Además de presentar efecto de repelencia sobre mosquitos, dicha formulación debería ser capaz de incorporar una mayor cantidad de los aceites esenciales mencionados, con la finalidad de extender su tiempo de acción ofreciendo con ello una protección prolongada contra los insectos blanco. Si bien, esto representa una alternativa

al empleo de repelentes de origen natural de uso tópico, se requería de un sistema o forma de aplicación que impidiera el contacto directo de la formulación con el usuario. Primero, porque las presentaciones comerciales existentes requieren de continuas aplicaciones (cada dos horas u hora y media), debido a las moderadas concentraciones de cada principio activo que manejan y que tolera la piel. Y segundo, obviamente a consecuencia del anterior, evitar la exposición directa del portador a altas concentraciones de los aceites de efecto repelente.

Se trabajó con varias matrices para incorporarles los aceites esenciales, obteniéndose la que mejor se acondicionó a nuestras expectativas que resultó ser la número 27.

El carbopol hidratado con etanol al 70% favoreció la unificación de los aceites esenciales con la matriz acuosa, esto debido a la propiedad de los aceites esenciales de ser solubles en alcoholes (Farmacopea Herbolaria, 2001, Merck Index, 2001). La formulación 26 consistió de carbopol 10% en EOH al 70% mezclado con glicerina, la cual fungiría en la formulación 27 como unión ó favorecedor de la unión entre la matriz acuosa y la fase oleosa que serían los aceites esenciales. Además el uso de la glicerina permitió la unión de una mayor cantidad de aceites esenciales, que era uno de los puntos a buscar, porque, dicho sea de paso, la preparación al estar más concentrada que los productos existentes en el mercado, daría como resultado un efecto repelente durante un lapso de tiempo mayor.

En lo que respecta al estudio del efecto de la temperatura y del movimiento, en un tiempo de 8 horas de haber sido sometida la muestra al estudio se observó que las piezas ensambladas arrojaron excelentes resultados en cuanto a la acción de mantenerse unidas todas las partes de la pieza, esto ocurrió gracias a que se contaron con materiales de buena calidad, como por ejemplo, la base con adhesivo que finalmente fue la plástica, porque en un principio se trabajó con una base hecha de papel con adhesivo en una de sus caras, pero nos encontramos con el inconveniente de que al momento de colocar el dispositivo que contenía la formulación, ésta llegaba a humedecer y manchar la base de papel, así como también el adhesivo no era lo suficientemente potente como para mantener unido a dicho dispositivo ni a la lámina decorativa de etilvinil acetato. No obstante, a esta pieza se le adhirió otra complementaria pero en esta ocasión fabricada en plástico. De tal manera que la pieza armada con estos materiales para la base fue sometida a una primera prueba de aplicación de temperatura y movimiento, arrojando el resultado de que efectivamente la pieza no se mantuvo ensamblada al término de las 8 h de estudio. Además otra razón para eliminar estos materiales como posibles base para el dispositivo, fue el hecho de que el rollo plastificado transparente con pegamento permitía ver el manchado que había en la base de papel, y que a su vez era mayor el trabajo de ensamblar estas dos primeras piezas incrementando así el costo del producto por usar mayor número de materiales. Por tal motivo se buscó otro material como lo fue el rollo plastificado color blanco con un mejor adhesivo que el que presentaba la base de papel, para favorecer la unión entre ésta y la lámina decorativa.

En lo que respecta a las almohadillas doble cara elegidas, no se presentó ningún problema en cuanto a la unión con la base del producto, sin embargo, ensayos previos que se realizaron revelaron que si se requiere usar el producto en más de una ocasión, el hecho de estar pegando y despegando la pieza varias veces disminuía la fuerza del adhesivo a la superficie.

En cuanto a la medición de la pérdida de humedad o material volátil, se presentó una tendencia hacia la pérdida de peso debida a la evaporación de los compuestos volátiles, se pensaría que a mayor temperatura, mayor sería la pérdida de humedad, sin embargo, esto no se aplica en el caso de la temperatura de 45 °C, donde el comportamiento de la gráfica es menor o igual a la de 35 °C, esto se pudiese deber a que en las primeras horas de exposición el material volátil de la parte exterior del gel se libera, deshidratando la formulación y formando una capa rígida y compacta en la superficie de dicha preparación, lo que impide en un momento dado que el resto del material se volatilice. Lo que procedería en este caso sería extender mejor la preparación para evitar que quede en el centro una mayor cantidad de agentes volátiles atrapados, es decir, que al disminuir el grosor que ocupa la preparación, haya mayor superficie para la liberación de los agentes volátiles y de este modo lo que pudiese quedar atrapado por debajo de dicha capa no comprometiera la efectividad de la formulación.

Se llevó a cabo la prueba de Mandel a las curvas de calibración de los tres principios activos de interés, para validar el método de cuantificación. De tal

modo que, al realizar los cálculos para dicha prueba se obtiene como resultado que los datos de las curvas se comportan mejor como una gráfica de primer orden que de segundo orden, lo que significa que la fórmula a aplicar para la cuantificación de las muestras sería la ecuación de la recta.

Así pues, se evaluaron cuantitativamente los terpenos durante las cinéticas de temperatura, observándose que para la citronela a las tres temperaturas la tendencia es a la evaporación, aunque en el caso de la gráfica de T 25°C ocurre que no es tan notoria la evaporación, e incluso pareciera que se llega a un punto de equilibrio durante el tratamiento de las muestras, lo que indica que al paso del tiempo el principio activo podría no estarse liberando debido a que como se pudo observar en los resultados obtenidos en los bioensayos para la preparación que solo contenía 5 % de citronela, los porcentajes de repelencia no son tan altos como para el limoneno, que obtuvo un resultado por encima del 87 % de repelencia de mosquitos al término de las 8 h de estudio, ésta comparación se da debido a que dichos bioensayos fueron realizados en un rango de temperatura de 27 ± 3 °C. Cabe destacar que los porcentajes de evaporación al tiempo 0 h para la citronela son superiores al 45 %, es decir, que al momento de extraer el principio activo para su análisis se está perdiendo casi la mitad de su contenido durante el proceso, principalmente al momento de la sonicación, no obstante, el ultrasonido es la técnica más efectiva de extracción, dando lugar a tiempos de extracción muy cortos, pero presenta el inconveniente que la elevada cantidad de energía suministrada produce un calentamiento que

puede provocar la degradación de los analitos, como lo mencionan Motlagn y Pauliszyn (1997) y Croreck y Pauliszyng (1999) en sus trabajos.

Para la cuantificación del limoneno el caso es similar, es decir, la tendencia de las gráficas de las cinéticas realizadas a las tres temperaturas muestran que la evaporación incrementa conforme aumenta dicha temperatura y al paso del tiempo. Sin embargo, comparando las gráficas de T 35 °C y 45 °C se observa que los valores son muy similares, es decir, se esperaría que a 45 °C el porcentaje de evaporación fuese mayor que a la temperatura de 35 °C, sin embargo, esto no ocurre de ese modo, se realizó un ANOVA de dos factores con una muestra por grupo (no se muestran resultados) para las tres temperaturas y los resultados muestran que no hay diferencia estadística entre los tres tratamientos, pero sí la hay entre los tiempos. Esto se pudo deber a que conforme se incrementa la temperatura, los compuestos volátiles llámense aceites esenciales, agua y etanol incluidos en la formulación se van perdiendo al paso del tiempo, quedando en la superficie una costra que impide la subsiguiente volatilización de los terpenos, dando como resultado la concentración o permanencia de dichos principios activos.

En el caso del eugenol ocurre el fenómeno anteriormente descrito, como se puede observar en la gráfica que representa los porcentajes de evaporación a 45 °C, la tendencia de la curva es hacia la concentración de estos compuestos, es decir, pareciera que se estuviera acumulando dicho terpeno, por lo que los porcentajes de evaporación dan por debajo del 0 %, esto es notorio al menos

hasta el tiempo de 6 horas, puesto que al término de las 8 horas de tratamiento ya se ve incrementado el valor de la evaporación, lo que haría pensar, que el eugenol empezaría a ejercer su efecto repelente después de transcurridas 8 horas de uso, que en un momento dado daría la pauta para prolongar la vida útil del producto.

Las pruebas de repelencia realizadas en el laboratorio arrojaron resultados importantes en cuanto a la efectividad de la formulación como repelente de mosquitos *Aedes aegypti* recolectados del medio ambiente y preservados en el laboratorio.

En esta etapa se evaluaron las tres formulaciones con aceites esenciales de citronela, otra con aceite de limón y una tercera con ambos aceites esenciales. Se graficaron las curvas de la cinética seguida en un lapso de 8 h de estudio, y se observó que el comportamiento de las tres curvas es similar, es decir, tiende a la disminución del efecto repelente conforme el paso del tiempo. Sin embargo, es notorio el comportamiento que ocurrió con la formulación que contenía sólo el aceite esencial de limón comparado con la formulación que contenía ambos aceites esenciales, donde los valores de repelencia empleando solamente aceite esencial de limón es igual a la que contenía ambas. Para confirmar esto, fue que se realizó el método LSD que comprueba que los porcentajes de repelencia o el efecto repelente es el mismo si se trabaja con sólo aceite esencial de limón en la formulación en un 5 %, o bien, con una

combinación de ambos (citronela y limón) a una concentración en la formulación correspondiente al 10 %.

El estudio correspondiente al eugenol no se llevó a cabo en laboratorio debido a que la cría de mosquitos finalizó su ciclo biológico y no se estableció nuevamente la cría de mosquitos. No obstante, el eugenol si fue incluido en la formulación elaborada para las pruebas de campo. De tal modo que se procedió a trabajar con una formulación que contuviera 5 % de aceite esencial de citronela, 5 % de aceite esencial de limón y 5 % de aceite esencial de clavo, así como el 75 % restante correspondió a la mezcla base de carbopol y glicerina.

De esta forma, se llevaron a cabo las pruebas de campo en la localidad llamada “La Labor”, en el municipio de Nochistlán en el estado de Zacatecas. Dichas pruebas se realizaron en este lugar porque en los datos estadísticos del INEGI (año 2005), se registra que para el estado de Nuevo León la precipitación pluvial anual (54 mm/mes) en promedio para el mes de julio no era suficiente para proporcionar las condiciones de humedad ideales para el desarrollo de mosquitos. Sin embargo, para el estado de Zacatecas el promedio mensual de precipitación pluvial es de 118 mm, el valor más alto registrado para ese estado y por encima del doble que para Nuevo León. Está claro que la precipitación pluvial es mucho mayor en otros estados de la República, tales son los casos de Chiapas, Guerrero o Nayarit, por mencionar algunos, pero no se contaba con los recursos para llevar a cabo la evaluación en esos lugares. No obstante, se

comprobó la presencia de mosquitos en este entorno la cual resultó ser abundante, además, se registró la presencia de mosquitos del género *Aedes*.

De los resultados obtenidos de las encuestas realizadas a los 28 voluntarios que participaron en el estudio se reveló que a la población le pareció cómodo, útil, práctico y accesible el uso del producto, expresando su aprobación por la práctica de protección personal contra las picaduras de mosquitos. Sin embargo, cabe destacar que al 21 % de la muestra poblacional participante le pareció incómodo o demasiado fuerte el aroma, es decir, expresaron haber sentido mareos e incluso leves náuseas a causa del potente olor, proponiendo que fuese menos intenso el aroma y/o que se cambiara de aroma, por ejemplo canela, cabe mencionar que de las personas que mostraron estos síntomas una se encontraba en su séptimo mes de embarazo y la otra persona se encontraba en un vehículo cerrado donde el aroma se concentró, además de que otras dos personas en el auto también llevaban consigo el producto.

En las encuestas realizadas a los 28 voluntarios se refleja la opinión general de que el tamaño de la lámina decorativa de los parches es demasiado grande y vistosa, por lo que se propone usar otras dimensiones del parche de menor tamaño, pero que contengan la cantidad suficiente de formulación para que sean efectivos, al menos por 8 horas. Esto sería, dimensiones del parche de 3 cm de diámetro y con una cantidad de muestra de entre 1-2 g/parche, éste valor se obtiene de los previos (no se muestran datos) realizados por 5 voluntarios que usaron parches con estas dimensiones durante un lapso de 3 días,

expresando su opinión acerca de que aunque estén elaborados con una menor cantidad de formulación, el efecto repelente de mosquitos es lo suficientemente amplio como para abarcar 1-3 días de eficacia con estas otras dimensiones.

De las encuestas se refleja también que los usuarios prefirieron el aroma del parche cuando ya había sido usado durante 6 horas, es decir, posterior a este tiempo el aroma se percibía de manera menos intensa pero seguía ejerciéndose su acción repelente contra mosquitos. Cabe destacar que a este tiempo la citronela ya no se percibe en gran medida debido a que se evaporó antes que los otros dos terpenos. Después de 6 horas el aroma que prevalece en mayor medida es el del aceite esencial de limón, y después de las 8 horas se empieza a desenmascarar el aroma del aceite esencial de clavo. Esto haría pensar que el efecto repelente es mayor a 8 horas y que se realiza por etapas.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en la realización de este estudio se concluye:

1. Se establece que la formulación de efecto repelente de mosquitos obtenida queda constituida por: Carbopol al 10 % en EOH al 70 % y Glicerina, ambos constituyen el 75 % de la formulación, el 15 % restante corresponde a los aceites esenciales de efecto repelente.
2. La formulación es efectiva y presenta hasta un 87.67 % de repelencia sobre mosquitos *Aedes aegypti* en las pruebas realizadas a nivel laboratorio al término de 8 horas.

3. La formulación es efectiva y presenta hasta un 100 % de repelencia sobre mosquitos en las pruebas realizadas en campo.
4. La liberación de los componentes volátiles de efecto repelente es paulatina y se prolonga hasta por un tiempo mayor de 8 horas.
5. Los materiales empleados para dar base y soporte a la formulación son compatibles con la mezcla de efecto repelente de mosquitos.
6. Los parches ensamblados son resistentes al efecto del movimiento y la temperatura.
7. La forma decorativa dada al producto es agradable y atractiva.

6.2 Recomendaciones

Este trabajo pone las bases de proyectos futuros. Claro está que queda mucho trabajo por realizar, como por ejemplo, se puede trabajar en la optimización del método de extracción, ya que como se observó en la cuantificación de la citronela principalmente, sólo se recupera alrededor del 50 % del principio activo al momento de haber iniciado el ensayo. Así pues, se puede trabajar mejorando las condiciones del laboratorio, es decir, equipándolo con una cámara para extraer aceites esenciales baja una atmósfera de argón, también se puede trabajar con otros métodos de extracción como lo sería la destilación por arrastre de vapor ó extracción líquido-líquido, sólo que estos requieren de mayor cantidad de reactivos e inversión de tiempo y espacio.

En el caso de los bioensayos quedaría por definir el porcentaje de repelencia que posee el eugenol en pruebas de laboratorio.

Se puede continuar trabajando en el mejoramiento y la elaboración de otras formulaciones que controlen en mayor medida la liberación de los principios activos, así como su conservación y apariencia. Así como también, es necesario ampliar los estudios de campo, realizando pruebas de efectividad en regiones con mayor humedad y a otras temperaturas. De igual modo, sería recomendable aplicar pruebas de repelencia con otras especies de mosquitos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Banker, G. y Rhodes, C.- "Modern Pharmaceu**t**ics".- Editorial Marcel and Dekker.- 4^a.- 2002.- NY.- pág. 1-838.
2. Borror, D. J.; Triplehorn, C. A. y Johnson, N. F.- "An Introduction to the Study of Insects".- Harcourt Brace Jor**an**ovich College Publishers.- 6^a edición.- 1989.- pág. 875.
3. California Department of Pesticide Regulation.- "*Fight the bite!*".- 2005.- Departamento de Regl**am**entación de Pesticidas.- Sacramento California.
4. Cerda, H.; López, A.; Sanoja, O.; Sánchez, P. y Jaffé, K.- "*Atracción Olfativa de Cosmopolites sordidus Germar (1824) (Coleoptera: Curculionidae) Estimulado por Volátiles Originados en Musáceas de Distintas Edades y Variedades Genómicas*".- 1994.- Journal Agronomía Tropical.- Vol. 46(4).- pág. 413-429.
5. Cerda, H.; Hernández, G.; López, A. y Vargas, J.- "*Estudio de la Atracción del Gorgojo Rayado Metamasius hemiptenis (Coleoptera: Curculionidae) Olores de su Planta Huésped su Feromona de Agregación*".- 1996.- Journal Caña de Azúcar.- Vol. 14 (2).- pág. 53-70.
6. Cerda, H.; Hernández, J. V.; Jaffe, K.; Martínez, R. y Sánchez, P.- "*Estudio Olfatométrico de la Atracción del Picudo del Cocotero Rhynchophorus palmarum (L) a Volátiles de Tejidos Vegetales*".- 1994.- Journal de Agronomía Tropical.- Vol. 44 (2).- 213-215.
7. Coro, F. y Suárez, S.- "*Repelentes electrónicos contra mosquitos: propaganda y realidad*".- 1998.- Rev. Cubana Med. Trop.- Vol. 50 (2).- pág. 89-92.
8. Dethier, V. G.- "*Sensitivity of the Contact Chemoreceptors of the Blowfly to Vapors*".-1972.- Proc. Nat. Acad. Sci.- Vol. 69, No. 8.- Pág. 2189-2192.
9. Do-Hyoung K.; Soon-Il D.; Kyu-Sik Ch. y Young-Joon A.- "*Repellent Activity of Constituents Identified in Foeniculum vulgare Fruit against Aedes aegypti (Diptera: Culicidae)*".- 2002.- Journal of Agricultural and Food Chemistry.- Vol. 50, pág. 6993-6996.

10. Eldridge, B. y Edman, J..- "Medical Entomology".- Editorial Kluwer Academia Publishers.- 2001.- pág. 13-65, 568-582.
11. Espinoza-Gómez, F.; Hernández, C. M.; Rendón, R.; Carrillo, M. L. y Flores, J. C..- "*Transmisión Interepidémica del Dengue en la Ciudad de Colima, México*".- 2003.- Salud Pública.- Vol. 45.- pág. 365-370.
12. Falabella, R.; Escobar, C. y Giraldo, N..- "Dermatología".- Editorial CIB.- 4ª edición.- 1993.- pág. 544.
13. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.- 7ª. edición.- 2000.- Secretaría de Salud.- Tomo I y II
14. Farmacopea Herbolaria.- 2001.- Secretaría de Salud.- México, D. F.
15. Fessenden, R. J. y Fessenden J. S..- "Organic Chemistry".- Grupo Editorial Iberoamericana.- 6ª edición.- 1998.- pág. 1200.
16. Funk, W.; Dammann, V. y Donnevert, G..- "Quality Assurance in Analytical Chemistry".- Editorial VCH.- 1ª edición.- 1995.- pág. 238
17. García, A. y Del Castillo, B..- "Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución".- Editorial Limusa.- 1ª edición.- 1988.- pág.253.
18. Goodman Gilman, A..- "Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica".- Editorial McGraw-Hill.- 10ª edición.- 2001.- pág. 1073-1088.
19. Harwood, R..- "Entomología Médica y Veterinaria".- Uteha Noriega Editores.- 1993.- pág. 201-273.
20. Hori, M..- "*Repellency of essential oils against the cigarette beetle, Lasioderma serricorne (Fabricius) (Coleoptera: Anobiidae)*".- 2003.- Appl. Entomology Zoology.- Vol. 38 (4).- pág. 468-473
21. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.- Distribución porcentual del clima según clasificación para cada entidad federativa.- 2005.- "*Carta de Climas escala 1:1 000 000. México 1980.* (versión digital 2005)".
22. Katzung, B..- "Farmacología Básica y Clínica".- Editorial Manual Moderno.- 7ª edición.- 1999.- pág. 1310.
23. Ken, K.; Signal, F. A.; Campion, S. H. y Motion, R. L..- "*Citronella as an Insect Repellent in Food Packaning*".- 2005.- Journal of Agricultural and Food Chemistry.- Vol. 53, pág. 4633-4636.

24. Koul, O.; Daniewski, W. M.; Singh, J.; Gumulka, M. y Singh, G..- "*Antifeedant Effects of the Limonoids from Entandrophragma candolei (Meliaceae) on the Gram Pod Borer, Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)*".- 2003.- Journal of Agricultural and Food Chemistry.- Vol. 51, pág. 7271-7275.
25. Mazzafera, P..- "*Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol*".- 2003.- Revista Brasil Bot..- Vol. 26.- pág. 231-238.
26. Merck Index.- 13ª edición.- 2001.
27. Miller, J. N. y Miller, J. C..- "Estadística y Quimiometría para Química Analítica".- Editorial Prentice Hall.- 4ª edición.- 2002.- pág. 296.
28. Montgomery, D..- "Diseño y Análisis de Experimentos".- Editorial Limusa-Wiley.- 2ª edición.- 2002.- pág. 686.
29. Morrison, R. T. y Boyd, R..- "Química Orgánica".- Editorial Pearson Educación.- 5ª edición.- 1998.- pág. 1478.
30. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002.- "Para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vector".- Diario Oficial de la Federación.- Publicada el 21 de julio del 2003.
31. O'Farril-Nieves, H..- "*Las Plagas del Hogar y el Jardín*".- 2004.- Colegio de Ciencias Agrícolas.- Universidad de Puerto Rico.- Vol. 8.- pág. s/n.
32. Organización Mundial de la Salud.- 2002
33. Oyama-Okubo, N.; Ando, T.; Watanabe, N.; Marchesi, E.; Uchida, K. y Nakayama, M..- "*Emisión Mechanism of Floral Scent in Petunia axillaris*".- 2005.- Journal Biosci. Biotechnol. Biochem..- Vol. 69.- pág. 773-777.
34. Pawliszyn, J..- "*Applications of Solid Phase Microextraction*".- The Royal Society of Chemistry.- Cambridge.- 1999.
35. Pawliszyn, J..- "*Solid Phase Microextraction, theory and practice*".- Wiley-VCH.- New York.- 1997.
36. PDR for Herbal Medicines.- "The Information Standard for Complementary Medicine".- Editorial Medical Economics Company.- 2ª edición.
37. Pelczar, M.; Reid, R. y Chan, E..- "Microbiología".- Editorial McGraw-Hill.- 4ª edición.- 1998.- pág. 826.

38. Pérez-Pacheco, R.; Rodríguez, C.; Lara, J.; Montes, R. y Ramírez, G..- *"Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquitos Culex quinquefasciatus Say (Díptera: Culicidae)"*.- 2004.- Acta Zoológica Mexicana.- Vol. 20.- pág. 141-152.
39. Pesante, D..- "Herramientas en el Control de Insectos".- [en línea].- Puerto Rico.- s.n. "fecha desconocida" [citado: 28 de Octubre del 2005; 2:21pm]. Disponible en url: <<http://www.culturaapicola.com.ar>>
40. Rey, J. R. y Rutledge, C. R..- *"Repelentes contra mosquitos"*.- 2004.- University of Florida.- ENY671S.- pág. 1-4.
41. Rojas, E. y Scorza, J. V..- *"Protección personal con un repelente natural contra Lutzomyia youngi, vector de Leishmaniasis cutánea urbana en Venezuela"*.- 1990.- Revista Talleres.- Vol. 6.- pág. 161.
42. Rojas, E..- *"Extracción y Rendimiento de aceite esencial de hojas de Citrus medica con uso para la protección personal contra mosquitos transmisores"*.- 1999.- Revista Talleres.- Vol. 6.- pág. 164-178.
43. Secretaría de Salud.- "Virus del Oeste del Nilo".- 2004.- Boletín Epidemiológico.- Vol. 13.- pág. 18-20.
44. Skoog, D. y Leary, J..- "Análisis Instrumental".- Editorial McGraw-Hill.- 4ª edición.- 1998.- pág. 935.
45. Snyder, L.; Kirland, J. y Glah, J..- "Practical HPLC Method Development".- Editorial John Wiley and Sons.- 2ª edición.- 1997.- pág. 765.
46. Stevens, C.V.; Smagghe, G.; Rammeloo, T. y De Kimpe, N..- *"Insect Repellent/Antifeedant Activity of 2,4-Mehtanoprolin and Derivatives against a Leaf- and Seed-Feeding Pest Insect"*.- 2005.- Journal of Agricultural and Food Chemistry.- Vol. 53.- pág. 1945-1948.
47. Tay, J.; Lara, R.; Velasco, O. y Gutiérrez, M..- "Parasitología Médica".- Mendez Editores.- 5ª edición.- 1996.- pág. 498.
48. Torres-Estrada, J. L. y Rodríguez, M. H..- *"Señales físico químicas involucradas en la búsqueda de hospederos y en la inducción de picadura por mosquitos"*.- 2003.- Salud pública de México.- Vol. 45, no. 6.- pág. 497-505.
49. Xiuli, Z.; Chen, D.; Li, K. y Wang, D..- *"Sensitive Liquid Chromatographic Assay for the Simultaneous Determination of Ibuprofen and its Prodrug, Ibuprofen Eugenol Ester, in Rat Plasma"*.- 2005.- Yokugaku Zasshi.- Journal of The Pharmaceutical Society of Japan.- Vol. 125.- pág. 733-737.

APÉNDICES

APÉNDICE A

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA VALIDACIÓN

APÉNDICE A

ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA VALIDACIÓN

A.1 Verificación de la linealidad de la función de calibración

Para probar que el modelo de calibración es el adecuado, es decir que los datos presentan un comportamiento de una función de calibración de primer orden, pueden emplearse los siguientes criterios:

- **Análisis residual:** consiste en graficar las diferencias entre la variable **y** experimental y la variable **y** obtenida de la ecuación de regresión contra la variable **x**. Si los residuales se distribuyen normalmente entonces el modelo de los datos es lineal. Si los residuales muestran una tendencia entonces los datos de regresión o los cálculos de los mismos deben ser verificados
- **Prueba de Mandel:** consiste en relacionar las desviaciones estándar de los residuales de primer y segundo orden de los datos de las gráficas de calibración y comparar con un valor crítico de prueba estadística.
- **Prueba t de Student para los coeficientes de correlación:** consiste en comparar un valor t calculado con un valor estadístico crítico, con la hipótesis nula de que no existe correlación entre las variables.

La prueba de Mandel es recomendada para la verificación matemática de linealidad.

Se calcula la diferencia de las varianzas DS^2 usando la desviación estándar de los residuales S_{y1} (de la función de calibración de primer orden) y S_{y2} (de la función de calibración de segundo orden) mediante la siguiente ecuación:

$$DS^2 = (N-2)S_{y1}^2 - (N-3)S_{y2}^2$$

Para un grado de libertad

El valor de prueba (TV) para la prueba F se calculó con la expresión:

$$TV = DS^2 / S_{y2}^2$$

Este valor se compara con el valor obtenido de la tabla de F ($f_1=1$, $f_2=N-3$, $P=99\%$).

Si el valor de $TV \leq F$ indica que la función de calibración de segundo orden no provee significativamente el mejor ajuste, por lo tanto, la función de calibración es lineal (Funk, 1995).

A.2 Límite de detección

Es la concentración que proporciona una señal (y) en el instrumento significativamente diferente de la señal de fondo. Actualmente existe la tendencia para definir el límite de detección como la concentración del analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, s_B (Miller, 2002).

$$LOD = y_B + 3s_B$$

donde: LOD es el límite de detección, y_B es la señal del blanco y s_B es la desviación estándar del blanco.

Para realizar el cálculo del límite de detección, se consideran las siguientes estimaciones: la desviación estándar del blanco, s_B , se determina mediante la siguiente fórmula:

$$s_B = [\Sigma(y_i - \hat{y}_i)^2 / (n-2)]^{1/2}$$

donde: y_i es cualquier valor de y , $\hat{y}_i$ es el valor de y ajustado con la ecuación de regresión, y $n-2$ son los grados de libertad.

También se considera que la lectura del blanco, y_B , es la intersección de la línea recta con el eje y (Miller, 2002).

A.3 Límite de cuantificación:

Es la concentración más baja de una sustancia dada que puede ser determinada con una precisión analítica. Este límite se determina con la ecuación:

$$LOQ = y_B + 10s_B \text{ (Miller, 2002).}$$

Tanto los resultados de LOD y LOQ corresponden al valor sobre el eje de las ordenadas y se debe sustituir en la ecuación de la recta para encontrar el valor correspondiente de la concentración (x).

APÉNDICE B

CUESTIONARIO DE OPCIÓN MÚLTIPLE

APÉNDICE B

CUESTIONARIO DE OPCIÓN MÚLTIPLE

(Prueba de Campo)

CUESTIONARIO (Proyecto: UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS REPELENTES DE INSECTOS EN EL DISEÑO DE UN PARCHO COMO FORMA FARMACÉUTICA).

Edad:

Sexo:

Temperatura:

Humedad Relativa:

Área de estudio:

Actividad:

Fase I.- Previo al uso del producto:

1.- ¿Conoce algún repelente de insectos? (si su respuesta es no, pase a la pregunta #3)

Sí ()

No ()

2.- ¿Los ha usado alguna vez?

Sí ()

No ()

3.- ¿Es alérgico a algún componente de la formulación (Aceites esenciales de clavo, limón y zacate limón)?

Sí ()

No ()

4.- ¿Se considera propenso a que le piquen los mosquitos? ¿en qué medida?

Sí ()

No ()

Mucho ()

Poco ()

Nada ()

5.- ¿Usaría un parche externo que funcionara como repelente de mosquitos?

Sí ()

No ()

Fase II.- Posterior al uso del producto.

1.- ¿Por cuánto tiempo lo usó?

Menos de 5 horas () 5-8 horas () Más de 8 horas ()

2.- ¿Le funcionó bien el producto?

Sí () No ()

3.- ¿Le pareció complicado su uso?

Sí () No ()

4.- En cuanto al aroma, ¿le causó alguna molestia?

Sí () No () ¿cuál (es)?

5.- En cuanto a la presentación, ¿le gustó la presentación?

Sí () No ()

6.- ¿Volvería a usar el producto?

Sí () No ()

7.- Sugerencias, comentarios y observaciones:

APÉNDICE C

RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA PÉRDIDA POR SECADO

APÉNDICE C

RESULTADOS ESTADÍSTICOS DE LA PÉRDIDA POR SECADO

Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

Tiempo	T 25°C	T 35°C	T 45°C
2	10.90	16.59	10.11
4	14.65	20.05	19.89
6	18.43	24.34	22.97
8	20.10	28.19	25.32

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$

Ha: Las μ no son iguales

RESUMEN	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	37.6	12.53	12.50
Fila 2	3	54.59	18.20	9.44
Fila 3	3	65.74	21.91	9.57
Fila 4	3	73.61	24.54	16.82
Columna 1	4	64.08	16.02	16.85
Columna 2	4	89.17	22.29	25.51
Columna 3	4	78.29	19.57	44.74

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen	SS	gl	CM	F	Prob	Fc
Filas	243.77	3.00	81.26	27.84	0.000642	4.76
Columnas	79.15	2.00	39.58	13.56	0.005945	5.14
Error	17.51	6.00	2.92			
Total	340.43	11.00				

Como la $F \geq F_c$ significa que hay diferencia estadística entre los tiempos y temperaturas.

APÉNDICE D

RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL ANÁLISIS POR HPLC DE LOS TERPENOS

APÉNDICE D

RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL ANÁLISIS POR HPLC DE LOS TERPENOS

D.1 Validación de Citronela

Prueba de Mandel

		1er orden		2o orden	
x	y _i	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
2.295	1781765	1787514.229	3.31E+07	1782921.660	1.34E+06
1.148	927310	912130.627	2.30E+08	919891.443	5.50E+07
0.574	467260	474057.228	4.62E+07	478207.859	1.20E+08
0.287	251033	255020.529	1.59E+07	254916.579	1.51E+07
0.143	155220	145120.583	1.02E+08	142266.710	1.68E+08
0.072	82189	90933.803	7.65E+07	86572.749	1.92E+07
Σ =	4.519	3664777	5.04E+08	3664777	3.78E+08

$$Sy1 = 1.12E+04$$

$$Sy2 = 1.12E+04$$

$$DS^2 = 1.26E+08$$

$$TV = 9.97E-01$$

$$F_{(99\%,1,N-3)} = 34.1162$$

ES LINEAL

Límite de Detección

x	y _i	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
2.295	1781765	1787514.229	33053637.568
1.148	927310	912130.627	230413371.763
0.574	467260	474057.228	46202314.762
0.287	251033	255020.529	15900389.994
0.143	155220	145120.583	101998229.871
0.072	82189	90933.803	76471587.618
$\Sigma =$	4.519	3664777	504039531.6

$$S_{y/x} = 11225.4124$$

$$g.l. = -2$$

$$LOD = 0.0441 \text{ mg/mL}$$

Límite de Cuantificación

x	y _i	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
2.295	1781765	1787514.229	33053637.568
1.148	927310	912130.627	230413371.763
0.574	467260	474057.228	46202314.762
0.287	251033	255020.529	15900389.994
0.143	155220	145120.583	101998229.871
0.072	82189	90933.803	76471587.618
$\Sigma =$	4.519	3664777	504039531.6

$$S_{y/x} = 11225.4124$$

$$g.l. = 4$$

$$LOQ = 0.1471 \text{ mg/mL}$$

D.2 Validación de Limoneno

Prueba de Mandel

x	y _i	1er orden		2o orden	
		$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
1.457	2648840	2647713.539	1.27E+06	2643291.630	3.08E+07
0.728	1332133	1354361.647	4.94E+08	1361850.448	8.83E+08
0.364	729192	708572.774	4.25E+08	712568.293	2.76E+08
0.182	448031	385678.338	3.89E+09	385569.259	3.90E+09
0.091	191645	224231.119	1.06E+09	221480.252	8.90E+08
0.046	115111	144394.583	8.58E+08	140192.118	6.29E+08
$\Sigma =$	2.868	5464952	6.73E+09	5464952	6.61E+09

$$S_{y1} = 4.10E+04$$

$$S_{y2} = 4.69E+04$$

$$DS^2 = 1.17E+08$$

$$TV = 5.30E-02$$

$$F_{(99\%,1,N-3)} = 34.1162$$

ES LINEAL

Límite de Detección

x	y _i	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
1.457	2648840	2647713.539	1268915.092
0.728	1332133	1354361.647	494112759.189
0.364	729192	708572.774	425152473.378
0.182	448031	385678.338	3887854503.456
0.091	191645	224231.119	1061855175.506
0.046	115111	144394.583	857528225.183
$\Sigma =$	2.868	5464952	6727772052

$$S_{y/x} = 41011.4985$$

$$g.l. = 4$$

$$LOD = 0.0693 \text{ mg/mL}$$

Límite de Cuantificación

x	y _i	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
1.457	2648840	2647713.539	1268915.092
0.728	1332133	1354361.647	494112759.189
0.364	729192	708572.774	425152473.378
0.182	448031	385678.338	3887854503.456
0.091	191645	224231.119	1061855175.506
0.046	115111	144394.583	857528225.183
$\Sigma =$ 2.868	5464952	5464952	6727772052

$$S_{y/x} = 41011.4985$$

$$g.l. = 4$$

$$LOQ = \boxed{0.2312} \text{ mg/mL}$$

D.3 Validación de Eugenol

Prueba de Mandel

x	y _i	1er orden		2o orden	
		$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
2.282	2026519	2035621.712	8.29E+07	2020858.755	3.20E+07
1.241	1108948	1115905.824	4.84E+07	1135578.933	7.09E+08
0.621	608493	568140.359	1.63E+09	582668.911	6.67E+08
0.31	316836	293374.133	5.50E+08	298109.303	3.51E+08
0.1552	145710	156609.465	1.19E+08	154673.745	8.03E+07
0.0776	83614	88050.433	1.97E+07	82321.395	1.67E+06
0.0388	40351	53770.916	1.80E+08	46032.713	3.23E+07
0.0194	17633	36631.158	3.61E+08	27860.245	1.05E+08
$\Sigma =$	4.745	4348104	2.99E+09	4348104	1.98E+09

$$S_{y1} = 2.23E+04$$

$$S_{y2} = 1.99E+04$$

$$DS^2 = 1.01E+09$$

$$TV = 2.56E+00$$

$$F_{(99\%,1,N-3)} = 16.2582$$

ES LINEAL

Límite de Detección

x	y _i	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
2.282	2026519	2035621.712	82859356.803
1.241	1108948	1115905.824	48411321.699
0.621	608493	568140.3586	1628335664.243
0.31	316836	293374.1330	550459201.4910
0.1552	145710	156609.4651	118798339.6851
0.0776	83614	88050.4326	19681934.3055
0.0388	40351	53770.9164	180094155.1200
0.0194	17633	36631.1582	360930016.3393
$\Sigma =$	4.745	4348104	2989569990

$$S_{y/x} = 22321.7756$$

$$g.l. = 6$$

$$LOD = 0.0758 \text{ mg/mL}$$

Límite de Cuantificación

x	y_i	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
2.282	2026519	2035621.712	82859356.803
1.241	1108948	1115905.824	48411321.699
0.621	608493	568140.3586	1628335664.243
0.31	316836	293374.1330	550459201.4910
0.1552	145710	156609.4651	118798339.6851
0.0776	83614	88050.4326	19681934.3055
0.0388	40351	53770.9164	180094155.1200
0.0194	17633	36631.1582	360930016.3393
$\Sigma =$	4.745	4348104	4348104
			2989569990

$$S_{y/x} = 22321.7756$$

$$g.l. = 6$$

$$LOQ = \boxed{0.2527} \text{ mg/mL}$$

APÉNDICE E

RESULTADOS DEL BIOENSAYO

APÉNDICE E

RESULTADOS DEL BIOENSAYO

E.1 RESULTADOS DEL BIOENSAYO EFECTUADO PARA LA CEPA *Aedes aegypti* CON FORMULACIÓN DE EFECTO REPELENTE

Tiempo (horas)	Citronela	Limoneno	Cit+Lim
1	91.01	96.67	97.67
2	89.92	97.67	95.67
3	85.56	95.67	94.33
4	79.02	93.33	93.33
5	73.57	92.33	90.00
6	64.94	92.33	89.00
7	70.03	89.00	87.67
8	64.58	87.67	87.67

Los valores presentados son promedios de las tres repeticiones de cada experimento expresados como porcentaje de repelencia realizados en el bioensayo.

E.2 ANOVA de dos factores con una sola muestra por grupo

<i>RESUMEN</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Fila 1	3	285.35	95.1166667	12.8985333
Fila 2	3	283.26	94.42	16.1875
Fila 3	3	275.56	91.8533333	30.1534333
Fila 4	3	265.68	88.56	68.2587
Fila 5	3	255.9	85.3	104.5519
Fila 6	3	246.27	82.09	223.3641
Fila 7	3	246.7	82.2333333	112.133233
Fila 8	3	239.92	79.9733333	177.716033
Columna 1	8	618.63	77.32875	114.248813
Columna 2	8	744.67	93.08375	12.5380268
Columna 3	8	735.34	91.9175	14.7512786

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen</i>	<i>SS</i>	<i>gl</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F crit</i>
Filas	733.338067	7	104.762581	5.69740593	0.00284586	2.76419926
Columnas	1233.09811	2	616.549054	33.5303904	0.0000046	3.73889183
Error	257.428758	14	18.3877685			
Total	2223.86493	23				

E.3 Método de la Diferencia Significativa Mínima (LSD)

(Salida de Computadora de Design Expert)

Response: Repelencia
ANOVA for Selected Factorial Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares]

Source	Sum of Square	DF	Mean Squares	F Value	Prob > F	
Model	1233.10	2	616.55	13.07	0.0002	significant
A	1233.10	2	616.55	13.07	0.0002	
Pure Error	990.77	21	47.18			
Cor Total	2223.86	23				

The Model F-value of 13.07 implies the model is significant. There is only a 0.02% chance that a "Model F-Value" this large could occur due to noise.

Values of "Prob > F" less than 0.0500 indicate model terms are significant.

In this case A are significant model terms.

Values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.

If there are many insignificant model terms (not counting those required to support hierarchy), model reduction may improve your model.

Treatment Means (Adjusted, If Necessary)

	Estimated Mean	Standard Error
1-Citronela	77.33	2.43
2-Limoneno	93.08	2.43
3-Cit + Lim	91.92	2.43

Treatment	Mean Difference	DF	Standard Error	t for H0 Coeff=0	Prob > t
1 vs 2	-15.75	1	3.43	-4.59	0.0002
1 vs 3	-14.59	1	3.43	-4.25	0.0004
2 vs 3	1.17	1	3.43	0.34	0.7375

Values of "Prob > |t|" less than 0.0500 indicate the difference in the two treatment means is significant.

Values of "Prob > |t|" greater than 0.1000 indicate the difference in the two treatment means is not significant.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

María Guadalupe Farfán Tavera

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: UTILIZACIÓN DE EXTRACTOS REPELENTES DE INSECTOS EN
EL DISEÑO DE UN PARCHE COMO FORMA FARMACÉUTICA

Campo de Estudio: Farmacia

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Aguascalientes, Ags. el 22 de Febrero de 1978, hija de Alfredo Farfán González y Laura Elena Tavera Díaz.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, grado obtenido Licenciado en Análisis Químico-Biológicos en el 2001.

Experiencia Profesional: Auxiliar del Laboratorio de Bioquímica en la Universidad Autónoma de Aguascalientes de Ago-Dic 2001, químico analista en el Laboratorio Clínico CMQ en Aguascalientes de Ago-2001 a Mayo-2002, químico analista en el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Productos Farmacéuticos S.A. de C.V. (Chinoín) de Mayo-2002 a Jul-2004.