



**UNIVERSIDAD  
DE ANTIOQUIA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE  
MOSQUITOS DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES Y  
EXTRACTO DE BOCCONIA FRUTESCENS EN AEDES  
AEGYPTI**

**Autor(es)**

**Leidy Yojana Escobar Ciro**

**Universidad de Antioquia  
Facultad de ingeniería, Bioingeniería  
Medellín, Colombia**

**2019**



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE MOSQUITOS DE MEZCLAS DE  
ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTO DE BOCCONIA FRUTESCENS EN AEDES  
AEGYPTI

**Leidy Yojana Escobar Ciro**

Informe de tesis  
como requisito para optar al título de:  
Bioingeniera.

Director  
Mauricio Esteban Sánchez. Ing. Químico MSc.

Co- Director  
César Augusto Vásquez Ruíz. Ing. Químico MSc.

Universidad de Antioquia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Bioingeniería  
Medellín, Colombia  
2019.

# EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE MOSQUITOS DE MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTO DE *BOCCONIA FRUTESCENS* EN *Aedes Aegypti*

---

## 1. Resumen

Las enfermedades transmitidas por mosquitos vectores se han convertido en un problema de salud pública. El mosquito *Aedes Aegypti* transmite enfermedades letales como el dengue, fiebre amarilla y chikunguya, por lo cual requieren una importante medida de atención y prevención. Una manera es por medio de repelentes de aplicación tópica. Aunque existen repelentes que contienen N,N-Dietil-meta-toluamida (DEET) que funcionan de manera muy eficiente, dicho componente ha sido asociado con efectos adversos sobre la salud de las personas: razón por la cual, apuesta a la formulación de un repelente que contiene aceites esenciales y extractos naturales obtenidos de plantas aromáticas. Algunos de los componentes en dichas plantas que han sido reportados por su actividad repelente: geraniol, citral, limoneno, eugenol, etc. En el presente trabajo se partió de la hipótesis de que mezclas de aceites naturales puedan tener un efecto sinérgico e incrementar su actividad repelente. Para corroborar la hipótesis de investigación se realizó el cultivo de mosquitos *Aedes Aegypti* de la cepa Rockefeller en el laboratorio del Programa de Estudios y Control de Enfermedades Tropicales – PECET - de la universidad de Antioquia. Se realizó la extracción de diez aceites esenciales y se empleó el extracto del arbusto conocido como Trompeto (*Bocconia Frutescens*) utilizando el método arrastre por vapor, en el laboratorio del grupo de investigación SIPCOD de la Universidad de Antioquia. Como resultado a dichos ensayos, se obtuvo el mejor rendimiento para el aceite esencial de clavo y el menor rendimiento para el aceite esencial de orégano. Las semillas de trompeto fueron tratadas varias veces con el método de arrastre con vapor y en ninguna se obtuvo una cantidad significativa de aceite esencial, razón por la cual se decidió trabajar con el hidrolato obtenido durante las destilaciones. Seguido, se evaluó la actividad repelente de la *Bocconia Frutescens* y de diferentes mezclas de los aceites esenciales extraídos utilizando una adaptación del protocolo sugerido por la Organización Mundial de la Salud para la experimentación de repelentes para mosquitos. Como resultados de dichos ensayos se encontró que el extracto de trompeto no posee una alta o significativa actividad repelente contra los mosquitos *Aedes Aegypti*. De las diferentes formulaciones de repelentes con aceites esenciales se evidenciaron mejores resultados en las mezclas realizadas en medio oleoso, utilizando como vehículo aceite de ricino, comparado con las mezclas hidroalcohólicas. Sin embargo, los resultados de tiempo completo de protección para las formulaciones con aceites esenciales fueron cortos (entre 0-30 minutos) e inferiores a los del control positivo con el repelente comercial a base de DEET. Es importante anotar que el hidrolato de Trompeto presentó un alto efecto calmante ante las picaduras de los mosquitos.

## 2. Introducción

A lo largo de su historia, la humanidad ha tenido que aprender a sobrellevar y superar diferentes adversidades propias de la naturaleza y el planeta en el que existimos. Desde que los primeros humanos aparecieron en el África tropical, el hombre ha encontrado las maneras y herramientas adecuadas para adaptarse y modificar de manera contundente su entorno. De acuerdo con el escritor español Sisteach (Sisteach, 2018), desde hace unos 3.000 años el hombre ha implementado conocidas y vigentes prácticas como son la deforestación masiva de selvas o la quema de bosques para la creación de pastizales y zonas de cultivos agrícolas. Sin embargo, estos cambios progresivos y sistemáticos en el entorno, especialmente en selvas tropicales generó el ambiente propicio para la proliferación en masa de mosquitos y vectores transmisores de enfermedades que datan de tiempos remotos y que siguen existiendo entre nosotros como es el caso de la malaria o el paludismo (Sisteach, 2018). En la actualidad, cada día es más agresiva la deforestación de nuestros bosques y selvas, especialmente en el trópico lo que sumado a los evidentes efectos del cambio climático ha propiciado las condiciones adecuadas para la incubación de promisorios vectores transmisores de enfermedades.

Paradójicamente, para la mayoría de las personas las picaduras de mosquitos no representan más que la incomodidad del picor o comezón seguida de un enrojecimiento e hinchazón de la parte afectada, aunque enfermedades letales como el dengue, la fiebre amarilla, chikunguña y zika son transmitidas por mosquitos vectores como los *Aedes Aegypti*. Específicamente para el caso del dengue, una de las enfermedades más importantes, se tienen reportados más de 50 millones de casos diagnosticados anualmente en más de 100 países. (Leyva et al., 2017) y aproximadamente 2500 millones de personas viven en países donde el dengue es endémico pueden estar en riesgo (Leyva et al., 2012).

Este mosquito se ubica en áreas tropicales; en Colombia el 95% de estos insectos son encontrados por debajo de 2.200 metros sobre el nivel del mar, condiciones que son favorables para su desarrollo y propagación. Sin embargo, la urbanización y globalización han hecho que se encuentren incluso a altitudes superiores (Zubieta, Giraldo, & Morales Olaya, 2015). El comportamiento del dengue en Colombia ha sido endémico con brotes epidémicos. Alrededor de 20 millones de personas están en riesgo de sufrir cualquiera de las patologías anteriormente mencionadas. En el 2002 fueron notificados 81.831 casos de dengue. Seguido, se encontró que en el año 2010 se presentó la mayor epidemia de la historia de nuestro país, con un total de 157.202 casos de dengue, 221 muertes confirmadas y una letalidad de 2,26%, teniendo un gran impacto en la salud de nuestra población. Por otro lado, se reporta que 50 millones de personas contraen enfermedades transmitidas por mosquitos cada año (Daza & Florez, 2006) y cerca de 500.000 de los pacientes contagiados por dengue requieren

hospitalización, la mayoría de ellos son niños. Cada año cerca del 2.5% de los afectados mueren (Pohlit et al., 2010). En general, los mosquitos prefieren zonas despejadas (en vez de zonas espesas) y zonas pantanosas con humedales y charcos estancados. Esto ha hecho que el control de vectores y mosquitos sea una de las problemáticas que mayor dificultad haya representado para el hombre; a su vez que, representa una de las amenazas más significativas en tiempos modernos. Si bien es cierto, que existen algunas recomendaciones básicas para disminuir la proliferación de mosquitos y vectores desde la fuente normalmente no resultan siendo más que palabras ya que mucha parte de la población mundial vive en condiciones de extrema pobreza donde la calidad de servicios públicos es deficiente y donde el hacinamiento, la escasa higiene o la insalubridad genera condiciones ideales para la incubación de mosquitos y vectores transmisores de enfermedades. Elementos de cuidado personal como las mezclas de sustancias químicas o biológicas con actividad repelente de mosquitos se han presentado como una alternativa exitosa para evitar y disminuir las picaduras de diferentes vectores transmisores de enfermedades. Estas sustancias se emplean de manera tópica actuando de manera localizada en el cuerpo humano por periodos de tiempo que pueden ir desde 4 hasta 11 horas de protección según reportan sus fabricantes. Existen diversas sustancias que presentan propiedades repelentes de mosquitos siendo la más conocida y estudiada la N-N Dietil-meta-toluamida abreviada como DEET; sin embargo, en los últimos años su uso frecuente se ha puesto en entredicho debido a diversas reacciones alérgicas y tóxicas presentadas en ciertos grupos de personas sensibles(Choi, Park, Ku, & Lee, 1994). En este sentido, el presente trabajo de investigación es abordado con el objetivo de comparar la actividad repelente de las mezclas de diversos aceites esenciales naturales y su posibilidad de presentarse como un eficaz sustituto del DEET.

### 3. Objetivos

#### 3.1 General

Evaluar la actividad repelente en mosquitos *Aedes Aegypti* con diferentes mezclas de aceites esenciales orgánicos y extracto de semillas de *Bocconia frutescens*.

#### 3.2 Específicos

- Realizar las extracciones de aceites esenciales de citronela, tomillo, clavo, romero, eucalipto, limoncillo y de semillas de *Bocconia frutescens* empleando la técnica de arrastre con vapor de agua.
- Implementar la metodología sugerida por la organización mundial de la salud para la evaluación de la dosis efectiva como repelente de mosquitos *Aedes Aegypti*.
- Implementar la metodología sugerida por la organización mundial de la salud para la evaluación del tiempo completo de protección (TCP) de mosquitos *Aedes Aegypti*.
- Proponer la formulación de un repelente de mosquitos a base de aceites esenciales y extracto de frutos de la especie *Bocconia frutescens*.
- Realizar pruebas de laboratorio para determinar la actividad repelente de las formulaciones propuestas.
- Comparar la actividad repelente de formulaciones de repelentes hidroalcohólicas y oleosas utilizando como vehículo aceite vegetal de ricino.

### 4. Marco Teórico

#### 4.1. Enfermedades transmitidas por mosquitos vectores

- **Dengue**

El dengue es una enfermedad vírica, cuyo principal mosquito vector es el *Aedes Aegypti*. Esta enfermedad, que rápidamente se propaga en el mundo, posee cuatro serotipos de virus, muy relacionados entre sí, que causan el dengue y la inmunidad permanente después de la infección. En los últimos 50 años, la incidencia se ha incrementado en un 300%. Actualmente, más de 2500 millones de personas, que representan el 40% de la población mundial, está expuesta al riesgo de contraer dengue. Según la OMS, cada año se producirían entre 50 a 100 millones de infecciones. Entre los síntomas del dengue se encuentran fiebre, cefalea intensa, dolores musculares y articulares, adenopatía y erupciones cutáneas. El dengue hemorrágico se caracteriza por presentar fiebre, dolor abdominal, vómitos, hemorragias y dificultad respiratoria. Éste puede ser mortal si se complica, y afecta principalmente a niños. El único método para limitar la transmisión del virus del dengue consiste en controlar los mosquitos vectores y protegerse contra las picaduras, por ejemplo, con el uso de repelentes. (WHO 2017).

- **Chikunguña**

La fiebre chikunguña es una enfermedad tropical vírica transmitida también por el mosquito *Aedes Aegypti*. Es relativamente inusual y está muy poco documentada. La enfermedad se ha detectado en África, Asia, en islas del Caribe, el Índico y el Pacífico. Los síntomas característicos son de enfermedad aguda con fiebre, erupción cutánea y dolores articulares incapacitantes que pueden durar varias semanas. Aunque los síntomas son similares a los del dengue, se diferencia en la ubicación geográfica de ocurrencia, y la duración del cuadro viral, ya que se extiende por varias semanas. No existe cura ni vacuna comercial contra esta enfermedad. La mayoría de los pacientes se recuperan totalmente, pero, en ciertos casos, los dolores articulares pueden durar varios meses, e incluso años. Como ocurre en el caso del dengue, el único método para limitar la transmisión del virus chikunguña consiste en controlar a los mosquitos vectores y protegerse contra sus picaduras (WHO 2017).

- **Fiebre amarilla**

La fiebre amarilla es una enfermedad hemorrágica vírica aguda transmitida por el mosquito *Aedes Aegypti*. El término “amarilla” alude a la ictericia que afecta a algunos pacientes. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, cada año existen en el mundo unos 200 000 casos de fiebre amarilla que provocan cerca de 30 000 muertes. El virus causante de la fiebre amarilla es endémico en zonas tropicales de África y América Latina, regiones cuyas poblaciones totalizan en conjunto unos 900 millones de personas. Los síntomas de la enfermedad incluyen fiebre, mialgias con dolor de espalda intenso, cefaleas, escalofríos, pérdida de apetito y náuseas o vómitos. La mayoría de los pacientes mejoran y los síntomas desaparecen en 3 o 4 días. El 15% de los casos se complican, presentando ictericia, dolor abdominal con vómitos y hemorragias internas. La mitad de los pacientes que entran en la fase tóxica mueren en un plazo de 10 a 14 días. La vacuna representa la medida de prevención más importante contra la fiebre amarilla. La vacuna es segura, asequible y muy eficaz. Una única dosis basta para proporcionar protección de por vida contra la enfermedad (WHO 2017).

## 4.2 Mosquito Vector: *Aedes Aegypti*

El *Aedes Aegypti* es un mosquito pequeño, oscuro con bandas horizontales blancas. Pertenece a la familia Flaviviridae y al orden Díptera. La hembra, la cual pica al humano, con el fin de obtener sangre para poner sus huevos, es un mosquito pequeño, oscuro, con marcas blancas notables y patas ligadas. La Probóscide es completamente negra. El *escutum* tiene un patrón dorsal de escamas blancas en forma de lira con rayas laterales curvadas. Las alas son oscuras y escamadas, las patas traseras tienen fémur pálido y tibia oscura (Diseases & Branch, n.d.). Mide aproximadamente 5mm de largo; las hembras son un poco más grandes que los machos, lo cual es bastante útil para poder diferenciarlos. El pico de los machos es de tipo chupador, mientras que en las hembras es de tipo picador-chupador. Las antenas de función sensorial son más pilosas en los machos que en las hembras. Son de dípteros porque su primer par de alas es funcional, mientras que el segundo, los halterios, les sirve para conservar el equilibrio durante el vuelo. En la figura 1 se señalan algunas características de la hembra.

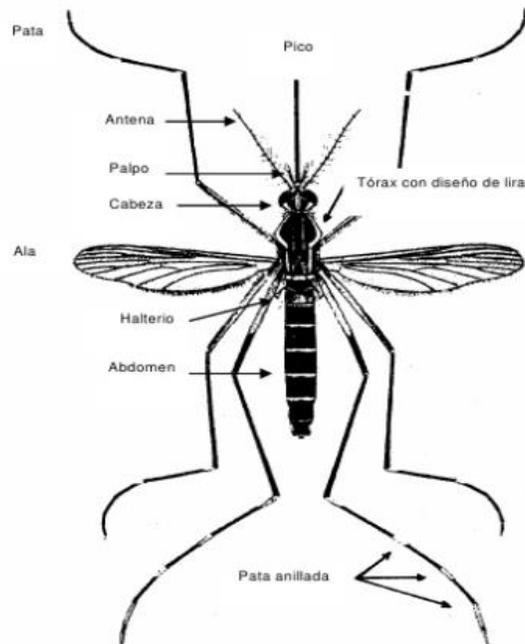


Figura 1 Hembra *Aedes Aegypti*. (Daza & Florez, 2006)

Su ciclo biológico como todos los mosquitos pasa por cuatro etapas: Huevo - larva-pupa-adulto. Los primeros tres estados son inmaduros. Las larvas y pupas son acuáticas y los adultos son de vida terrestre. Los huevos son alargados, elípticos de color claro cuando están recién puestos y se oscurecen después de algunas horas; miden menos de 1 mm y son colocados individualmente en las paredes del recipiente que contenga el agua e inmediatamente por encima del

nivel del agua. El desarrollo embrionario es de 2 a 3 días. Las larvas son esencialmente acuáticas y están dotadas de movilidad; poseen cabeza, tórax y abdomen. Su alimentación se basa de microorganismos presentes en el agua y el periodo larvario dura entre 8 a 10 días para convertirse así en adultos (Dávila Guerra & Dávila Guerra, 2016).

### **4.3 Repelencia de Mosquitos**

A diferencia de la mayoría de los mamíferos, los insectos voladores no poseen órganos olfativos, ellos en cambio utilizan las antenas localizadas en la cabeza para percibir aromas e incluso para comunicarse. Las antenas poseen células en forma de filamento o de placa con las que sienten el tacto, el sonido, la temperatura, la humedad, el olfato y el gusto (Leyva et al., 2017). Los mosquitos y otros insectos voladores que se alimentan de sangre (tales como moscas/insectos negros y moscas/insectos de venados) son atraídos para hospedarse por olores de la piel y dióxido de carbono del aliento. Cuando un mosquito se acerca a un hospedador, los repelentes obstruyen el sensor (los sentidos) del insecto y confunde al insecto para que éste no pueda aterrizar y picar exitosamente al hospedador. Los mosquitos hembras pican a la gente y animales porque necesitan la proteína que se encuentra en la sangre para ayudar a desarrollar sus huevos, este es el caso de la hembra del mosquito *Aedes Aegypti*, responsable de la transmisión del dengue.

Dentro de las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para evitar la picadura de diversos mosquitos transmisores de enfermedades tropicales se destacan el empleo de ropa gruesa, uso de mosquiteros en camas y el uso de repelentes. Los repelentes de mosquitos son sustancias sintéticas o biológicas que aplicadas de forma tópica pueden evitar el acercamiento y picaduras de insectos. La capacidad repelente de una sustancia se identifica por su mayor o menor potencial para alejar o evitar que un artrópodo vuele, aterrice o pique la superficie de la piel después de que en esta ha sido aplicada de manera tópica dicha sustancia (Pohlit et al., 2010). Usualmente, los repelentes de insectos funcionan proporcionando una barrera de vapor que impide el acercamiento y posterior picadura del artrópodo que está a punto de tener contacto con la superficie (Luz Stella Nerio, Olivero-Verbel, & Stashenko, 2010).

La repelencia producida por el DEET es debido al bloqueo de receptores del ácido láctico lo que produce la interferencia del vuelo de los mosquitos y resulta en la pérdida del hospedero. El ácido láctico está presente en el olor y sudor de animales de sangre caliente, que es atractivo para la hembra de *Aedes Aegypti*. Se ha establecido que el ácido láctico es esencial para las picaduras de este

mosquito, pero por si solo es ligeramente atractivo para este, lo que indica un sinergismo con otros componentes del olor humano. El mecanismo de acción de los repelentes botánicos no se conoce con exactitud, pero podría estar actuando por una acción mixta de un efecto desagradable sobre las terminaciones sensitivas de los insectos y por un bloqueo de la percepción química que utilizan para orientarse (Otiniano & Roldán, 2014).

#### 4.3.1 Repelentes Sintéticos

El repelente de origen sintético más comúnmente usado es el N,N-Dietil-toluamida. Esta sustancia fue desarrollada en 1946 por el ejército de los Estados Unidos y en el año 1957 se permitió su comercialización al público en general al considerarlo un pesticida no carcinogénico y de baja toxicidad humana (EPA, 2017). Sin embargo, investigaciones más recientes han enfocado esfuerzos en tratar de correlacionar episodios de intoxicación, náuseas e irritación cutánea en ciertos grupos de poblaciones sensibles al contacto con el DEET (ATSDR, 2015), (Luz Stella Nerio et al., 2010). A pesar de la cantidad de reportes sobre su potencial toxicidad, las cuales dramáticamente han afectado a adultos y especialmente a niños, incluyendo dermatitis, reacciones alérgicas, neurotoxicidad y toxicidad cardiovascular, el riesgo de los efectos tóxicos del DEET es aún considerado leve. Sin embargo, investigaciones como la realizada por Pohlit et al., (Pohlit et al., 2010) sugieren que el compuesto DEET debería ser usado en concentraciones mucho menores a las que son actualmente empleadas durante la formulación de repelentes sintéticos comerciales.

#### 4.3.2 Repelentes Naturales

Los extractos de origen natural como los aceites esenciales se han presentado desde hace varios años como una alternativa muy atractiva para ser empleados como repelente de mosquitos y posibles sustitutos del DEET. Los aceites esenciales son metabolitos secundarios los cuales tienen diversos mecanismos de acción como son agentes de defensa contra depredadores, plagas o insectos. Los aceites esenciales, así como diversos extractos naturales tienen el potencial de proporcionar una repelencia más segura para los seres humanos y para el medio o ambiente. Son varias las especies de plantas con actividad repelente que han sido objeto de estudio; sin embargo, se destacan plantas aromáticas como el limoncillo (*Cymbopogon Citratus*) y la citronela (*Cymbopogon Nardus*) que pertenecen a la familia de las poáceas (gramíneas), el romero (*Rosmarinus Officinalis*) de la familia de las *Lamiaceae*, o el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y el eucalipto (*Eucalyptus Melliodora*) que pertenecen a la familia de las *Myrtaceae*. Los metabolitos principales con comprobada actividad repelente de insectos presentes en los aceites esenciales obtenidos de estas

especies incluyen:  $\alpha$ -pineno, limoneno, citral, geraniol, eugenol, alcanfor y timol (Dávila Guerra & Dávila Guerra, 2016)]. Por lo general, la mezcla de todos los componentes de un aceite hace que posean mayor actividad biológica, en comparación con los componentes aislados. Inclusive, se ha comprobado que la mezcla de varios aceites tiene mejor resultado que los aceites por separados, debido a que aumenta la concentración de los componentes (Leyva et al., 2012). En la tabla 1 se comparan algunas características de los repelentes naturales y los sintéticos.

Tabla 1 Diferencias entre repelentes naturales y sintéticos. (Daza & Florez, 2006)

NATURAL	SINTETICO
Presenta muy baja o nula toxicidad No modifica el factor solar del producto.	Toxicidad muy alta El factor de protección solar se puede ver disminuido en un tercio.
Es un poco más complicada la obtención de los ingredientes activos para productos naturales.	Es más fácil la obtención de productos químicos de síntesis.
Depende de tiempos de cosecha, de cuidados de cultivo, del clima y de la procedencia.	Todos estos productos son factibles de ser fabricados en cualquier parte del mundo sin mayores requerimientos.
Cuida la salud de quien lo usa y proyecta un beneficio adicional de protección para la piel.	Suelen contener alcohol como deshidratante para la piel y butano/propano como propelente y desengrasante. Ambos efectos perjudiciales para la piel.
No presenta efectos adversos para el medio ambiente.	Afecta el medio ambiente
Durabilidad media	Alta durabilidad

## 4.4 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias de origen vegetal, que contienen metabolitos volátiles, insolubles en agua con características particulares. Estos aceites se originan de tejidos secretos de plantas. Son generalmente líquidos a temperatura ambiente, más ligeros que el agua, de olor fuerte y penetrante como su planta origen, incoloros o de color amarillo traslúcido. Se clasifican según su composición química; principalmente en terpenos y fenilpropanos. Es importante resaltar que 85 % de estos aceites suele tener uno o dos compuestos mayoritarios, mientras que el resto de su composición consiste en decenas de compuestos minoritarios. Los aceites esenciales pueden ser una fuente alternativa de agentes de control de mosquitos y otros insectos ya que son ricos en compuestos con actividad biológica, son biodegradables y se transforman en productos no tóxicos, son amigables con el medio ambiente y están potencialmente adecuados para su uso en los programas de control integral. De hecho, muchos Investigadores han informado sobre la eficacia de los aceites esenciales como agentes contra larvas y ejemplares adultos y por lo tanto pueden tener efectos, asimismo, como repelentes, entre otros se mencionan los pertenecientes a las familias botánicas *Lamiaceae*, *Myrtaceae* y *Poaceae* (Andrade-Ochoa et al., 2017).

Por lo general, la mezcla de todos los componentes de un aceite hace que posean mayor actividad biológica, en comparación con los componentes aislados. Inclusive, se ha comprobado que la mezcla de varios aceites tiene mejor resultado que los aceites por separados, debido a que aumenta la concentración de los componentes (Leyva et al., 2012).

### 4.4.1 Aceite de Citronela

Nombre científico: *Cymbopogon Nardus* (L.), algunos ejemplares se pueden observar en la figura 2.



Figura 2. Planta de citronela (Fuente: Cultivos María La judía en Guarne, Ant)

El aceite de citronela es uno de los aceites esenciales más usados para la elaboración de repelentes para insectos. Aunque no es muy claro el mecanismo

que produce dicha actividad repelente, una de las hipótesis plantea que es debido a una acción mixta que produce un efecto desagradable sobre las terminales sensitivas de los insectos voladores, así como un bloqueo en la percepción química que los insectos usan para orientarse (Daza & Florez, 2006), (Pohlit et al., 2010). La citronela fue usada en la India a comienzos del siglo XX y fue registrada en los Estados Unidos en 1948 como repelente comercial. Hoy, la citronela es uno de los repelentes naturales más usados a nivel mundial a concentraciones entre el 5-10% para prevenir irritaciones en la piel. Inicialmente, el aceite esencial de citronela es tan efectivo como el DEET a la misma dosis, pero luego sus aceites se evaporan rápidamente causando pérdida de la eficacia y dejando al usuario sin protección repelente (Maia & Moore, 2011).

Entre sus componentes mayoritarios con actividad repelente se encuentran geraniol, citral,  $\alpha$ -pineno, limoneno y acetato de geraniol (Pohlit et al., 2010). Para extraer su aceite esencial se manipulan sus hojas, utilizando el método de destilación por arrastre de vapor.

#### 4.4.2 Aceite de eucalipto

Nombre científico: *Eucalyptus globulus*, las hojas se pueden observar en la figura 3.



Figura 3 Planta de eucalipto (Fuente: Cultivos María La judía en Guarne,Ant)

Los eucaliptos son un género de árboles de la familia de las mirtáceas. Nativo de una reducida área del sureste de Australia y de Tasmania; En Colombia cultivado y asilvestrado entre 1500 y 3300 m. Las hojas jóvenes de los eucaliptos son sésiles, ovaladas y grisáceas, alargándose y tornándose coriáceas y de un color verde azulado brillante de adultas; contienen un aceite esencial de característico olor balsámico, que es un poderoso desinfectante natural. El aceite esencial de eucalipto contiene Flavonoides, cineol o eucaliptol, monoterpenos (alfapineno, p-cimeno, limoneno, felandreno) y aldehidos (butiraldeido, capronaldeido); Azuleno, taninos, resina, flavona (eucaliptina) y triterpenos derivados del ácido

ursólico: l-pinocarvona, alcoholes sesquiterpénicos, cíñelo, eudesmol, canfeno, mirtental, carvona, ácido elágico (Daza & Florez, 2006).

Es efectivo contra insectos y arácnidos. Entre sus principales ventajas están su eficacia, buena tolerancia, baja toxicidad, largo período de permanencia sobre la piel y olor. La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos ha registrado que el aceite esencial de Eucalipto es seguro y sus componentes son efectivos para repeler insectos. El 30.6% de las patentes registradas sobre repelente de mosquitos a base aceites esenciales, incluye eucalipto, el cual, mezclado con otros aceites esenciales, potencializa su efecto repelente (Pohlit et al., 2010).

#### 4.4.3 Aceite Esencial de Limoncillo

Nombre Científico: *Cymbopogon citratus*, algunos ejemplares de limoncillo se pueden observar en la figura 4.



Figura 4 Planta de Limoncillo. (Fuente: Cultivos María La judía en Guarne, Ant)

El limoncillo o hierba luisa es una planta aromática con diferentes propiedades medicinales gracias a su actividad repelente, analgésica, antiasmática, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana, entre otras. El aceite esencial posee un componente citral, el cual tiene un alto poder antibacteriano y antimicótico. Además, es usado ampliamente en la industria por sus propiedades antiinflamatoria, antirreumático y repelente contra mosquitos. El aceite esencial de limoncillo posee un color amarillo y un olor muy parecido al limón. Este se encuentra presente en las hojas de la planta, dentro del tejido foliar. La técnica

más utilizada para extraer aceite esencial es por arrastre con vapor ya que se obtiene aceite esencial de buena calidad que conserva sus propiedades organolépticas, físico – químicas (Del Pozo, 2006)

Este aceite esencial ha sido reportado por tener efecto repelente en contra de varias especies de mosquitos. Sin embargo, la efectividad que posee es de corta duración (Pohlit et al., 2010). Entre los componentes mayoritarios del limoncillo están el geraniol, neral, mirceno, citronelal y limoneno (Pohlit et al., 2010)

El aceite esencial de limoncillo ha demostrado anteriormente su efecto repelente, ya sea por sí mismo o mezclado, contra diferentes especies de mosquitos vectores (Díptera: Culicidae) y la mosca casera (Díptera: Muscidae), es por ello por lo que ya se encuentra presente en diferentes formulaciones comerciales. (Tramut et al., 2013).

#### 4.4.4 Aceite esencial de Romero

Nombre Científico: *Rosmarinus Officinalis* L. Algunos ejemplares se pueden observar en la figura 5.



Figura 5 planta de romero (Fuente: Cultivos María La judía en Guarne, Ant)

Pertenece a la familia de las lamináceas. Del romero, se utilizan las ramas para extraer su aceite esencial utilizando el método de destilación arrastre por vapor .

Entre sus componentes principales se encuentran pineno, canfeno, limoneno, borneol con alcanfor, lonanol, terpinol, entre otros.

Se ha reportado que el romero brinda protección del 43% contra *Aedes Aegypti* por 5.5 horas, repelencia del 100% contra *An. Stephensi* por 8 horas y *Cx. quinquefasciatus* por 8 horas. (Pohlit et al., 2010)

En condiciones de laboratorio, se reporta baja repelencia contra *Aedes Aegypti*. Sin embargo, es usado como fragancia final en formulación de repelentes. El aceite esencial de romero puede causar dermatitis y contribuir a el asma ocupacional. En respuesta a ello, se sugiere que las formulaciones que contenga romero sean probadas en la piel en pequeñas cantidades para determinar la presencia de una reacción alérgica antes de usar en el resto del cuerpo. (Luz Stella Nerio et al., 2010)

#### 4.4.5 Aceite Esencial de tomillo

Nombre científico: *Thymus Vulgaris*, algunas plantas de tomillo se pueden observar en la figura 6.



Figura 6 planta de tomillo, (Fuente: Cultivos María La judía en Guarne, Ant)

El tomillo pertenece a la familia de las labiadas. Es una planta con hojas opuestas, con bordes enrollados y densamente pilosas. La planta de tomillo desprende un fuerte aroma ya que posee muchas glándulas esenciales que contienen sus aceites (Medicinales & Tomillo, 2009). El aceite esencial de tomillo posee mono terpenos como los cuales han sido patentados por su actividad pesticida contra cucarachas o pretratamiento contra mosquitos. Entre los componentes del aceite esencial de tomillo se encuentran  $\alpha$ -terpineno, carvacrol, timol, p-cimeno linalol y Geraniol como componentes principales. Se ha reportado que el aceite esencial de tomillo puro brinda una protección del 100% contra *Aedes Aegypti* por 135 minutos aplicado tópicamente.

Existen varias formulaciones de repelentes contra insectos que incluyen aceite esencial de tomillo. Una de las más efectivas incluye tomillo, geranio, menta, cedro y clavo, las cuales se ha descubierto que repelen los mosquitos vectores; de la malaria y fiebre amarilla (*Aedes Aegypti*) por periodos entre 1 y 2.5 horas sin embargo, la mayoría de estos aceites esenciales son bastante volátiles, lo cual contribuye a la corta duración de dichos repelentes (Pohlit et al., 2010).

#### 4.4.6 Aceite esencial de clavo

Nombre científico: *Syzygium Aromaticum*, algunas plantas de clavo se pueden observar en la figura 7.



Figura 7 flores de clavo. (Fuente: Imagen extraída de la web <https://www.akamaibasics.com/blogs/learn-more/the-superpowers-of-clove-for-healthy-teeth-gums> Mayo del 2019)

El clavo es una flor sin abrir de un árbol tropical, el cual es secado al sol. Los clavos aromáticos fueron encontrados en la cocina europea, africana, árabe y de todas las américas. Los clavos contienen abundante aceite esencial, el cual es rico en eugenol, acetil eugenol, cariofileno, pineno y metil salicilato (Arraiza, 2011). Su aceite esencial se extrae utilizando el método de extracción por arrastre de vapor. Se ha encontrado actividad repelente contra *Aedes Aegypti* por un periodo entre 2 y 4 horas (Pohlit et al., 2010)

#### 4.4.7 Aceite esencial de orégano

Nombre científico: *Origanum vulgare*, algunas plantas de orégano se pueden observar en la figura 8.



Figura 8 Planta de orégano. (fuente: Cultivo María la Judía Guarne,Ant)

El orégano es una planta muy aromática con propiedades antimicrobianas, antivirales, antibióticas y fungicida. El aceite esencial de orégano se ha analizado ampliamente por su actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como contra hongos y protozoarios. Sin embargo, se ha estudiado combinada junto a otros aceites esenciales como repelente de mosquitos, aplicación por la cual posee un gran potencial (Leyva et al., 2017).

Entre los componentes del aceite esencial de orégano se encuentra el carvacrol, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, timol y linalol (Pohlit et al., 2010).

#### 4.4.8 Extracto de trompeto

Nombre científico: *Bocconia Frutescens*, la planta de trompeto se puede observar en la figura 10.



Figura 9. Árbol de *Bocconia Frutescens*, (Fuente: Cultivos María La judía en Guarne,Ant)

En la búsqueda de alternativas de origen natural, ambientalmente amigables y preferiblemente obtenidos a partir de especies nativas es importante destacar los extractos de la especie *Bocconia frutescens*. Esta especie es un arbusto de menor tamaño perteneciente a la familia de las Papaveráceas con distribución entre centro y Suramérica y especialmente en la región andina de Colombia (Henao & Niño, 2009). Tradicionalmente, el extracto hervido de las semillas de esta planta se ha empleado como remedio curativo contra la sarna y afecciones en la piel de animales de granja (Montes-Gonzalez & Vásquez-Sánchez, 2015).

#### **4.5 Aceites vegetales vehiculares.**

Varios aceites vegetales han sido utilizados para la formulación de repelentes para mosquitos como vehículos, los cuales fueron asociados con prolongar la acción repelente por varias horas al retardar la evaporación de aceites esenciales de la superficie. Los más usados son aceite de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss), aceite de ricino (*Ricinus Communis*), aceite de frijol de soya (*Sesamum Indicum*), aceite de oliva (*Olea Europae*), aceite de coco (*Cocos Nucifera*) y aceite de mostaza (*Sinapis Alba*) (Patel, Gupta, & Oswal, 2012).

##### 4.5.1 Aceite de Ricino

Nombre científico: *Ricinus Communis*. *Algunas semillas de higuera se pueden observar en la figura 11.*



Figura 10 Semilla de higuera o ricino. (fuente: <https://es.dreamstime.com/imagenes-de-archivo-semillas-de-ricino-image34563164> Fecha: mayo 2019)

Del ricino se pueden extraer aceites a partir de sus semillas. Este aceite es una excelente opción como vehículo de aceites esenciales con actividad repelente

no solo porque prolonga su acción, sino porque por sí mismo posee actividad repelente e insecticida contra *Aedes Aegypti* ya que contiene Ácidos ricinólicos, linoleicos, oleicos.

## **4.6 Técnica de extracción de aceites esenciales**

### **4.6.1 Destilación por Arrastre de vapor**

El principio fundamental de la destilación por arrastre de vapor se basa en la solubilidad que presentan los aceites esenciales en la fase vapor. Con el agua (Engineering, 2006). Es una de las técnicas más empleadas a nivel mundial y es eficiente para extracción de aceites esenciales de ramas, tallos y algunas raíces; mientras que no es adecuada para flores y la gran mayoría de semillas. Las plantas frescas o secas se colocan en recipiente hermético al cual se le introduce vapor de agua a presión mayor a la atmosférica y una vez pasa a través del lecho empacado con material vegetal solubiliza los aceites esenciales. Posteriormente, la mezcla vapor de agua/aceites esenciales es llevada a un intercambiador de calor donde es condensada y llevada a un separador líquido – líquido. En esta última etapa, los aceites esenciales son separados fácilmente del agua debido a que son inmiscibles y la densidad es menor a la del agua. El agua restante, es un bioproducto de la destilación llamado agua micelar, destilado, hidrolato o hidrosol. Esta agua contiene muchas de las propiedades terapéuticas de la planta destilada. En ciertas situaciones, el agua micelar puede ser preferible que el mismo aceite esencial para tratamientos en pieles sensibles, niños o cuando se requiere un tratamiento muy diluido. El agua micelar es altamente utilizada como antiséptico, antiinflamatorio o por su agradable aroma (Engineering, 2006). En la figura 11 se muestra un esquema de proceso de destilación por arrastre con vapor.

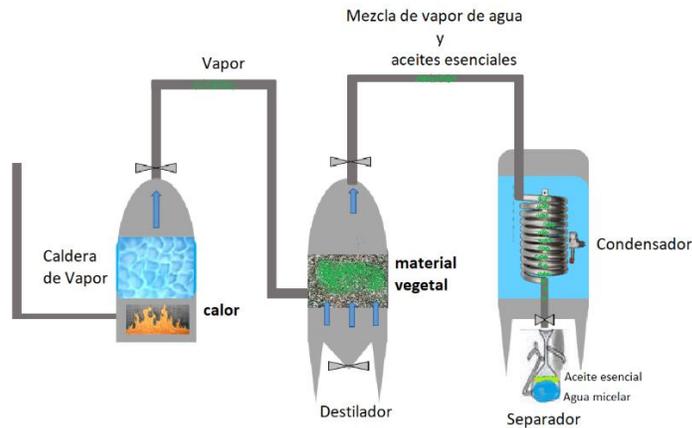


Figura 11. Proceso de destilación de aceite esenciales por arrastre de vapor. (Fuente: Autor)

Para comenzar se deben preparar las plantas para que los aceites salgan de las glándulas que los contienen. Si el material herbario son hojas, éstas se muelen; si son semillas, se maceran. La muestra se coloca en la parrilla de plato, y el vapor pasa a través de ella. Esto arrastra los aceites, que luego se condensan en el condensador. (Arraiza, 2011)

Varios factores determinan la calidad final del aceite esencial destilado. Aparte de la planta por sí misma, los más importantes son la temperatura usada y presión. Los aceites esenciales son sustancias muy complejas, cada uno hecho de muchas moléculas las cuales le dan al producto final su aroma característico y sus propiedades terapéuticas. Algunas de esas moléculas son estructuras delicadas las cuales pueden ser alteradas o destruidas por condiciones ambientales adversas (Engineering, 2006). Las plantas contienen muy poca cantidad de estos aceites esenciales es por ello por lo que, se requieren una gran cantidad de plantas para producir una onza de aceite esencial (Arraiza, 2011)

Varios factores determinan la calidad final del aceite esencial destilado. Aparte de la planta por sí misma, los más importantes son la temperatura usada y presión. Los aceites esenciales son sustancias muy complejas, cada uno hecho de muchas moléculas las cuales le dan al producto final su aroma característico y sus propiedades terapéuticas. Algunas de esas moléculas son estructuras delicadas las cuales pueden ser alteradas o destruidas por condiciones ambientales adversas (Engineering, 2006). Las plantas contienen muy poca

cantidad de estos aceites esenciales es por ello por lo que, se requieren una gran cantidad de plantas para producir una onza de aceite esencial (Arraiza, 2011)

#### 4.6.2 Ventajas

La destilación por arrastre de vapor es un proceso relativamente económico para operar a un nivel básico y las propiedades de los aceites producidos por este método son bien conocidos. Metodologías más modernas, como extracción de agua supercrítica, podría más adelante reemplazar la destilación por vapor, pero hasta ahora no ha representado una amenaza real, permaneciendo ésta como técnica principal (Engineering, 2006).

## 5 Metodología

### 5.1 EXTRACCION ACEITES ESENCIALES

La extracción de los aceites esenciales se realizó por medio del método Destilación Por Arrastre de Vapor. Para ello, se contó con el apoyo de la empresa *María la Judía*, quienes donaron el material herbario aromático y semillas de *Bocconia Frutescens*, las cuales se utilizaron como materia prima para la destilación de los aceites esenciales. El destilador utilizado pertenece al grupo de investigación SIPCOD de la Universidad de Antioquia. Y los ensayos fueron realizados igualmente en el laboratorio del grupo de investigación SIPCOD.

#### 5.1.1 Preparación de las plantas a utilizar

Las hojas o ramas de plantas como citronela, eucalipto, romero, geranio, limoncillo, tomillo y orégano fueron secadas al sol para retirar el exceso de agua que las mismas contienen y así poder favorecer la destilación que se va a realizar después. De igual manera, la canela, el clavo y las semillas de *Bocconia* fueron secadas. Es recomendado que el material herbario a utilizar, sea secado al sol por 1 o 2 días (Misni, Nor, & Ahmad, 2017). Por lo tanto, se siguió dicha recomendación y se molieron individualmente cada uno de los diferentes materiales vegetales. Las semillas de *Bocconia* fueron maceradas. Finalmente, cada material aromático fue almacenado por separado.

#### 5.1.2 Especificaciones de los equipos a utilizar

##### A. Generador de Vapor

Es un recipiente de cinco litros fabricado en acero inoxidable 304. Tiene una mirilla de vidrio para visualizar el nivel del líquido, una tapa superior hermética tipo brida, manómetro de carátula 0-100 psi, válvula de aguja para regulación de flujo de vapor, válvula de alivio calibrada y ajustada a 40 PSIG.

#### B. Destilador

Es un recipiente de cinco litros donde se almacena el material vegetal dispuesto a la extracción del aceite esencial. Es fabricado en acero inoxidable. Posee una tapa hermética tipo brida. El vapor ingresa por medio de una flauta para garantizar la correcta distribución del vapor.

#### C. Intercambiador de calor:

Es un intercambiador de calor de tubos y camisa tipo 1-1. Fabricado en acero inoxidable 304. Fluido de enfriamiento agua (por la camisa), mezcla de vapor de agua y aceites esenciales por los tubos.

#### D. Separador Líquido-Líquido

Es un embudo de separación de vidrio usado para la separar líquidos inmiscibles. Como en este caso lo son, el agua y el aceite. En la parte superior presenta una embocadura taponable, por la que se procede a cargar su interior. En la parte inferior posee un grifo de cierre o llave de paso que permite regular o cortar el flujo de líquido a través del tubo que posee en su extremo más bajo.

En la figura 12 se muestra en equipo de destilación en funcionamiento.



*Figura 12 Montaje en el laboratorio para extracción de aceites esenciales por arrastre con vapor. Equipo del laboratorio SIDCOP – Universidad de Antioquia*

### 5.1.3 Descripción y condiciones del proceso experimental

Se utilizan 1200 gramos de planta aromática seca para cada prueba de destilación. Inicialmente, se generó vapor de agua a una presión superior a la atmosférica en Medellín (entre 10 y 40 psi) Dicho vapor ingresó al destilador, en el cual se encontraba el material vegetal. El vapor del agua irrumpió en las fibras de las aromáticas y solubilizó los aceites esenciales en la fase de vapor. Una vez la mezcla de vapor de agua y aceites esenciales salía del destilador, ingresaba al intercambiador de vapor de tubos y camisa donde se condensó dicha mezcla, la cual finalmente pasó al separador de líquido-líquido, formándose dos fases: Una fase acuosa llamada agua micelar, y una fase rica en aceite esencial, el cual se separaría por decantación del agua micelar, ya que por lo general dichos aceites esenciales son de densidad menor a la densidad del agua, por lo que dicho aceite esencial se ubicaba en la parte superior del separador, como puede evidenciarse en la figura 13.



Figura 13 Separador líquido-líquido en laboratorio SIDCOP.

Los respectivos rendimientos a cada una de las extracciones realizadas están descritos más adelante en el apartado resultados y análisis.

## 5.2 OBTENCIÓN MOSQUITOS EN LABORATORIO

Para la obtención de los mosquitos en el laboratorio, se contó con la colaboración del grupo de investigación PECET junto con sus laboratorios en el centro de investigación universitario. El protocolo utilizado, es el sugerido por la organización mundial de la salud, siendo el mismo usado por el PECET para la reproducción de todos sus mosquitos. La razón por la cual se decidió realizarlo de esta manera es que los mosquitos de laboratorio, al no haber tenido contacto con el ambiente exterior durante su crianza, no transmiten ninguna enfermedad. De esta manera se garantiza a los voluntarios, asesores, auxiliar de laboratorio y

estudiante que no se transmitirá ningún virus por medio de las picaduras de los mosquitos.

#### 5.2.1 Preparación de los mosquitos a usar.

Fue esencial estandarizar la crianza de los mosquitos en un laboratorio para garantizar la confianza y reproducción fiel de los datos obtenidos. Se seleccionó para los ensayos mosquitos *Aedes aegypti* de la cepa *Rockefeller*. Los mosquitos fueron criados, mantenidos y probados en un cuarto a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C, humedad relativa de mayor a  $80 \pm 10\%$  y fotoperiodo 12:12 (día-noche). Dichas condiciones se plantearon con el fin de recrear en el laboratorio el ambiente natural de los mosquitos. La Tirilla de huevos fue inundada en agua tibia con levadura, en su fase larval fueron alimentados con comidas para peces. Cuando todos pasaron a la fase pupar, fueron pasados a jaulas Gerber de 35x35x35 cm con solución azucarada para que llegaran a su fase adulta, tal como lo sugiere el protocolo de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2009).

Se esperó que los machos fecundaran las hembras y estas fueron luego separadas con un aspirador bucal, una por una, a las jaulas Gerber donde se realizan los ensayos hasta que tuvieran la edad adecuada para las pruebas. Las hembras adultas debían ser de 4 a 7 días de edad, alimentadas únicamente con agua azucarada, no podían haber probado sangre, pues el propósito es que ellas estén hambrientas por sangre y listas para picar. Es por ello por lo que dichas hembras debían permanecer ávidas por al menos 12 horas antes de los ensayos. En las figuras 14 a 19 se muestran las diferentes etapas de la preparación de mosquitos para las pruebas.



Figura 14 Tirilla de huevos de mosquitos *Aedes Aegypti*, cepa *Rockefeller* antes de ser inundada. Foto tomada desde laboratorio del PECET, UdeA. Septiembre del 2018



Figura 15. Larvas alimentadas con comida para peces. Foto tomada desde laboratorio del PECET, UdeA. Septiembre del 2018



Figura 16 Pupas de los mosquitos *Aedes Aegypti*. Foto tomada desde laboratorio del grupo PECET, UdeA. Septiembre 2018



Figura 17 Mosquitos en transición de fase pupar a fase adulta. Alimentados con solución azucarada. Foto tomada desde laboratorio del grupo PECET, UdeA. Septiembre del 2018



*Figura 18 Aspirador bucal usado para la separación de los mosquitos hembra. Foto tomada en el PECET, UdeA. Octubre del 2018*

### **5.3 Metodología para ensayos actividad repelente**

El método utilizado es basado en el sugerido por la organización mundial de la salud OMS o como sus siglas en inglés lo representan WHO (World Health Organization) en la guía "Guide for Efficacy testing of mosquito repellents for human skin" publicada en el año 2009. Esta metodología es empleada para realizar ensayos de actividad repelente en mosquitos de la clase díptera. Existen además otros métodos donde no se hacen pruebas en humanos directamente sino en ratones de laboratorio depilados en su abdomen, o un método aún más complejo como bioensayo de olfactómetros de tubo Y. sin embargo, se eligió el método directo aplicado en humanos por su validez y facilidad de réplica en los laboratorios del grupo PECET de la Universidad de Antioquia. Es importante aclarar que, debido a la variabilidad en los métodos encontrados en la literatura para medir la repelencia, cada investigador usa diferentes condiciones, variables y parámetros para cuantificar la actividad repelente, haciendo muy difícil la comparación entre resultados de diferentes investigadores alrededor del mundo. Como consecuencia, los resultados obtenidos solo pueden ser comparados con un control positivo o negativo, u otras formulaciones de aceites esenciales usadas en los mismos ensayos, en orden para clasificar la repelencia de una formulación o mezcla de aceites esenciales (Luz S. Nerio, Olivero-Verbel, & Stashenko, 2009).

Se realizaron 2 clases de pruebas basadas en el protocolo sugerido por la Organización Mundial de la Salud para repelentes probados en piel humana. El objetivo de las pruebas de laboratorio fue estimar la dosis efectiva de un repelente y el tiempo de protección completa que provee un repelente después de aplicarlo en la piel (WHO, 2009).

Los objetivos específicos de estas pruebas fueron:

-Estimar la respuesta a la dosis y la dosis efectiva de un repelente correspondientes 50% y al 99.9% de protección a mosquitos aterrizando o rodeando.

-Estimar el tiempo de protección completo (TPC) de un repelente, el cual es el tiempo entre la aplicación del repelente y el aterrizaje del primer mosquito.

Para comparar la efectividad del repelente a probar, se utilizó una dilución de 20% de DEET en etanol y agua como control positivo.

### 5.3.1 Preparación de la piel del voluntario

Para la preparación de las pruebas de laboratorio, cada voluntario (persona que voluntariamente colaboró con las pruebas) se lavó el área de la piel a tratar con jabón neutro y se enjuagó con abundante agua. Seguido debía limpiarse con etanol al 70% y secar con una toalla. Dada la posibilidad de factores que podrían alterar la atracción de una persona a los mosquitos, lo cual podía afectar los resultados de los ensayos de repelencia, los voluntarios evitaron el uso de fragancias, perfumes y repelentes al menos 12 horas antes de las pruebas y durante las mismas. De igual manera, las personas voluntarias no eran fumadores. Era importante que los voluntarios no fueran fumadores, ya que el olor del tabaco podría afectar los resultados al ser molesto para los mosquitos.

## 5.4 Estimación de la dosis efectiva (material técnico)

Esta clase de ensayo se realizó inicialmente para diferentes diluciones en etanol del extracto de *Bocconia Frutescens* desde el 20% hasta el 100%. Se utilizaron 3 jaulas Gerber con 50 hembras cada una, hambrientas sin alimentar con sangre. Cada jaula estaba destinada para voluntario. Lo voluntarios ya con la piel preparada entre la muñeca y en codo, se aplicaban 1 ml de etanol y se dejaba secar por 1 minuto. Seguido, ingresaron la mano a la jaula con las 50 hembras por 30 segundos sin mover el brazo. Las manos fueron protegidas con guantes quirúrgicos para evitar picaduras. Para continuar las pruebas, la tasa de aterrizajes debía ser igual o mayor a 10. De lo contrario, se descartaba. Seguido, se aplicaba 1ml de dilución de *Bocconia Frutescens* al 20%, se dejaba secar por un minuto, e ingresaba el brazo nuevamente por 30 segundos. Se tomaba como primer resultado el número de aterrizajes obtenido en esos 30 minutos y se continuaba con la siguiente muestra. Para evitar acumulación de dosis en el brazo, el voluntario tras cada prueba se lavaba nuevamente y se aplicaba la siguiente dosificación. Finalmente, se aplicaba 1 ml de etanol en la mano contraria y la ingresaba por 30 minutos. La tasa de aterrizajes igualmente debía ser igual o mayor a 10 para poder tomar como valido el ensayo. De lo contrario

era descartado. En la figura 20 se muestran imágenes representativas de las etapas de las pruebas.



Figura 19. Jaulas con mosquitos y voluntario preparadas para el ensayo de dosis efectiva de *Bocconia Frutescens*. Fotos tomadas desde laboratorios del PECET, UdeA. Octubre 2018

## 5.5 ESTIMACIÓN DEL TIEMPO COMPLETO DE PROTECCIÓN (TCP)

El tiempo de protección completo o TPC de un repelente fue determinado usando formulaciones de aceites esenciales en concentraciones mayores a las referenciadas para su  $ED_{99.9}$  en medios alcohólicos y oleosos, comparados con DEET al 20%. Los tratamientos fueron aplicados a un área de aproximadamente 600 cm<sup>2</sup> de la piel del antebrazo entre la muñeca y el codo.

Se requirió de 7 Jaulas Gerber, cada una con 200 mosquitos hembras, sin alimentar con sangre. Una jaula fue diseñada para el control positivo (20% DEET en etanol), y los otros 6 restantes para las formulaciones de repelente a probar. Esto se hizo para que las hembras no se confundan al interactuar con diferentes formulaciones.

Inicialmente, las lecturas de aterrizaje de los mosquitos fueron comprobadas insertando un brazo sin tratar a la jaula por 30 segundos o hasta contar 10 mosquitos aterrizando. El procedimiento fue repetido con la otra mano en la segunda jaula destinada para el positivo. Si este nivel de aterrizajes no se conseguía, el experimento debía ser descartado. 1 ml del repelente candidato ya preparado en solución de alcohol se aplicó en un brazo y un 1ml de DEET fue aplicado en la otra mano. Después de 30 minutos, el brazo tratado con repelente fue ingresado en su respectiva jaula y expuesto por 3 minutos para determinar los aterrizajes. El brazo donde el DEET fue aplicado se expone en su respectiva jaula para determinar igualmente los aterrizajes. Este procedimiento debía ser repetido en intervalos de 30 minutos durante el experimento. La ocurrencia de un aterrizaje en una prueba de 3 minutos concluía el ensayo para este repelente. La primera formulación ensayada, fue la definida desde la bibliografía utilizando concentraciones de cada aceite esencial iguales o superiores a la reportadas como concentración de dosis efectiva y manteniendo concentraciones iguales o inferiores a las seguras para uso humano para descartar efectos secundarios

tóxicos o alergénicos. En la tabla 2 se resume la formulación 1 de repelente con aceites esenciales.

Tabla 2 Formulación 1 de Aceites esenciales

<b>Aceite esencial</b>	<b>Concentración (%)</b>
Citronela	45
Eucalipto	9
Tomillo	0
Romero	18
Estragón	6
Orégano	0
Limoncillo	0
Clavo	17
Canela	4
Geranio	1

Tras aplicar las dos formulaciones de repelentes en los voluntarios y esperar 30 min, se realizó el ingreso de cada brazo a su jaula correspondiente con 200 hembras *Aedes Aegypti* sin alimentar. Inmediatamente, se observó que los mosquitos aterrizaron en el brazo tratado con ambas formulaciones, con una tasa superior de 10 mosquitos en 10 segundos. Por ende, los antebrazos de los voluntarios fueron retirados de las jaulas y el experimento fue dado por terminado al no observar evidencia de actividad repelente en las formulaciones de aceites esenciales probadas tanto en medio hidroalcohólico como oleoso.

El antebrazo sometido a control con DEET al 20% no tuvo ningún aterrizaje, mostrando actividad repelente del 100% en un tiempo de exposición de 3 minutos como el protocolo de la OMS lo sugiere. Dichas pruebas fueron realizadas a 4 voluntarios.

Se vio la necesidad de realizar nuevas formulaciones de repelentes, utilizando nuevos aceites esenciales con actividad repelente reportada y diferentes concentraciones, según se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Formulaciones para ensayos oct 3 2018. MA: Mezcla A, MB: Mezcla B, MC: Mezcla C

	<b>MA</b>	<b>MB</b>	<b>MC</b>
Citronela	30	40	60
Eucalipto	20	40	10
Tomillo	10	10	25
Romero	10	5	0
Limoncillo	30	5	5

Las formulaciones representadas en la tabla 3 fueron diluidas al 20% nuevamente en medios hidroalcohólicos y oleoso (aceite de ricino). Se realizaron nuevamente controles tanto con etanol como con aceite ricino en jaulas con 200 hembras hambrientas, observando aterrizajes inmediatos de más de 10 mosquitos en 30 segundos. Tras probar el control, se procedió a aplicar 1 ml de cada muestra en el brazo izquierdo y 1 ml de DEET en el brazo derecho de los voluntarios y se esperaron 30 minutos antes de ingresar los antebrazos tratados en las jaulas. La figura 21 muestra las jaulas utilizadas para los ensayos.



Figura 20. Organización Jaulas con 200 hembras para ensayos de tiempo completo de protección. Control en la izquierda.



Figura 21. Organización de Jaulas con 200 hembras para ensayos de TCP.

## 6 Resultados y análisis

### 6.1 Resultados de las extracciones de aceites esenciales

Como resultado, se obtuvieron aceites esenciales de olor característico a cada una de las aromáticas destiladas. Insolubles en agua y color amarillo particular.

De las semillas de trompeta destiladas por duplicado, no se evidenció aceite esencial visible. Por lo cual se decidió tomar y trabajar con el hidrolato de trompeta, pues esta agua contiene muchas de las propiedades terapéuticas de la misma planta destilada. Además, en muchas ocasiones, el hidrosol, hidrolato

o agua micelar puede ser preferible que el mismo aceite esencial para tratamientos en pieles sensibles o cuando requiere un tratamiento muy diluido (Engineering, 2006). Dicho hidrolato de trompeta poseía un olor fuerte, agradable y característico de las semillas utilizadas.

Los rendimientos obtenidos expresados en mililitros de aceite esencial por gramos de material vegetal ingresado inicialmente se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Rendimientos de extracciones de aceites esenciales

<b>Aceite esencial extraído</b>	<b>Rendimiento (ml/g)</b>
A.E Eucalipto	8.33E-03
A.E Clavo	3.33E-02
A.E Citronela	7.08E-03
A.E Limoncillo	6.67E-03
A.E Tomillo	3.58E-03
A.E Orégano	5.00E-04
A.E Romero	2.14E-03
A.E Estragón	2.14E-03
A.E Canela	7.00E-03
A.E Geranio	2.86E-04
Hidrolato Trompeta	8.33E-01

El aceite esencial de clavo fue el que presentó mayor rendimiento, seguido del eucalipto y citronela. Los materiales aromáticos que menores rendimientos presentaron son orégano, seguido del geranio.

## **6.2 Resultados actividad repelente de aceites esenciales e hidrolato de trompeta**

### 6.2.1 Resultados de los ensayos de estimación de dosis efectiva

Los resultados obtenidos para la determinación de dosis efectivas de diferentes preparaciones de trompeta para tres voluntarios se muestran en las tablas 5 a 7.

Tabla 5. Resultados Dosis efectiva de *Bocconia Frutescens* - Voluntario 1.

<b>Secuencia de aplicación</b>	<b>Concentración de la Solución de repelente aplicado en 1 ml (%)</b>	<b>Numero de aterrizajes</b>
Mano Izquierda control	Pretratado sólo con etanol	13
Mano izq. Dosis 1	20	4
Mano izq. Dosis 2	40	3
Mano izq. Dosis 3	60	3
Mano izq. Dosis 4	80	1
Mano izq. Dosis 5	100	2
Mano derecha Control		3

Tabla 6. Resultados Dosis efectiva de *Bocconia Frutescens* - Voluntario 2.

<b>Secuencia de aplicación</b>	<b>Concentración de la Solución de repelente aplicado en 1 ml (%)</b>	<b>Numero de aterrizajes</b>
Mano Izquierda control	Pretratado sólo con etanol	13
Mano izq. Dosis 1	20	12
Mano izq. Dosis 2	40	9
Mano izq. Dosis 3	60	7
Mano izq. Dosis 4	80	12
Mano izq. Dosis 5	100	12
Mano derecha Control		15

Tabla 7. Resultados Dosis efectiva de *Bocconia Frutescens* - Voluntario 3.

<b>Secuencia de aplicación</b>	<b>Concentración de la Solución de repelente aplicado en 1 ml (%)</b>	<b>Numero de aterrizajes</b>
Mano Izquierda control	Pretratado sólo con etanol	13
Mano izq. Dosis 1	20	10
Mano izq. Dosis 2	40	6
Mano izq. Dosis 3	60	5
Mano izq. Dosis 4	80	7
Mano izq. Dosis 5	100	12
Mano derecha Control	Pretratado sólo con etanol	13

Los resultados obtenidos para el voluntario 1, mostrados en la tabla 5 fueron descartados debido a que al final de la prueba, al ingresar el antebrazo de

control, se observó que no hubo la tasa de aterrizajes apropiada para validar la prueba, ya que fue menor a 10.

Los resultados obtenidos en las tablas 6 y 7 muestran que la *Bocconia Frutescens* en concentraciones de 20% al 100% no posee una fuerte actividad repelente sobre *Aedes Aegypti* ya que hubo aterrizajes superiores a 10 hembras en periodos de 30 segundos. Sin embargo, se realizó el cálculo de porcentaje de protección utilizando la ecuación 1.

$$PP = \frac{C-T}{C} \quad (1)$$

Donde **PP** corresponde al porcentaje de protección, **C** es el promedio del número de aterrizajes en los brazos sin protección y **T** corresponde al número de aterrizajes obtenidos en el brazo con los diferentes tratamientos.

Al ser descartados los resultados obtenidos con el voluntario 1 debido a que los mosquitos en dicha jaula no estaban teniendo una respuesta adecuada, se utilizaron los resultados obtenidos con los otros dos voluntarios. Se realizaron cálculos del porcentaje de protección para ellos, seguidos fueron promediados, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 8 y se grafican en la figura 22.

Tabla 8. porcentaje de protección de Trompeto (*Bocconia Frutescens*)

<b>Concentración de hidrolato de Trompeto</b>	<b>Porcentaje de protección</b>
0.20	18.68%
0.40	54.70%
0.60	55.77%
0.80	30.22%
1	10.99%

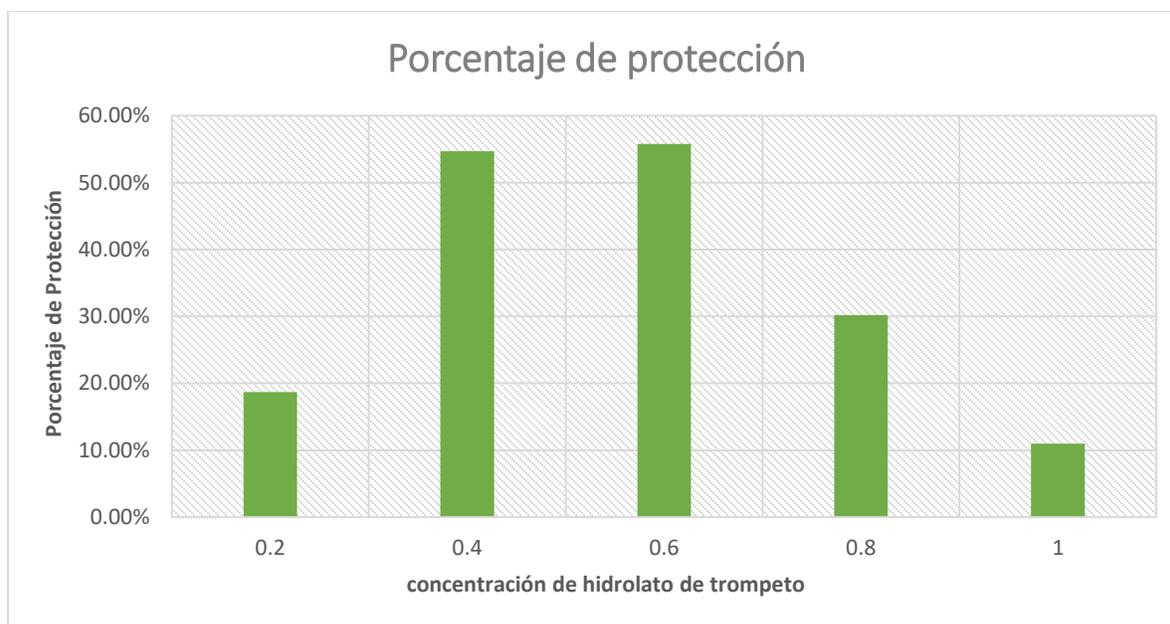


Figura 22. Porcentaje de protección vs. Concentración de trompeto. Fuente: Autor

### 6.2.2 Resultados de los ensayos de Tiempo Completo de Protección

En la tabla 9 se enseñan los resultados obtenidos para las diferentes formulaciones presentadas en la tabla 3 tanto en medio oleoso como medio hidroalcohólico.

Tabla 9. Resultados para muestras en medio Hidroalcohólico y oleoso.

<b>Formulación</b>	<b>Numero aterrizajes 30 minutos</b>	<b>Tiempo de primer aterrizaje [seg]</b>
MA HA	14	30
MA Oleoso	12	30
MB HA	14	20
MB Oleoso	10	58
MC HA	12	38
MC Oleoso	13	40
DEET	0	>180

Como se muestra en la tabla 9 en todos los voluntarios con los tratamientos de repelentes formulados con aceites esenciales se observaron evidentemente aterrizajes en tiempos inferiores a 2 minutos. Dando por terminado el experimento tal como lo sugiere el protocolo. Sin embargo, el repelente en medio oleoso observó mejor actividad repelente que la formulación en medio hidroalcohólico,

ya que los mosquitos tardaron entre 30 a 58 segundos en acercarse al brazo mientras que, en la mezcla en medio hidroalcohólico, los aterrizajes fueron en tiempos más cortos. Para los antebrazos tratados con DEET se observó en cada uno de los voluntarios protección absoluta en 2 minutos, pues no se evidenció ningún aterrizaje.

Al analizar los resultados obtenidos con las muestras anteriores, se decidió utilizar únicamente formulaciones en medios oleosos ya que se observaron mejores tiempos de protección. Además, se realizaron nuevas formulaciones agregando otros aceites esenciales con actividad repelente reportada para potencializar nuestro repelente. Además, se decidió utilizar concentraciones superiores. Las nuevas formulaciones se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Formulaciones aceites esenciales. 4 de octubre del 2018

	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>
	<b>[% v/v]</b>				
Citronela	45	40	45	35	35
Eucalipto	10	10	10	5	15
Tomillo	20	15	10	20	10
Romero	0	0	0	0	5
Estragón	0	10	20	15	15
Orégano	15	15	5	20	10
Limoncillo	10	10	5	5	5

Para las formulaciones de la tabla 7, se realizaron ensayos de dosis efectiva para concentraciones de 25% y 50% en medio oleoso. Luego se elige la que tenga mejores resultados para los ensayos de tiempo completo de protección. En las tablas 11 a 15 se muestran los resultados de las pruebas de dosis efectiva .

Tabla 11. Resultados dosis efectiva Formulación M1

<b>Secuencia aplicación</b>	<b>de Concentración de la solución de repelente en 1 ml (% v/v)</b>	<b>Número de aterrizajes</b>
Mano izquierda control	Pretratado sólo con aceite vegetal	10
Dosis 1	25	10
Dosis 2	50	2
Mano Derecha control	Pretratado sólo con aceite vegetal	10

Tabla 12. Resultados dosis efectiva Formulación M2

<b>Secuencia aplicación</b>	<b>de Concentración de la solución de repelente en 1 ml (% v/v)</b>	<b>Número de aterrizajes</b>
Mano izquierda control	Pretratado sólo con aceite vegetal	10
Dosis 1	25	4
Dosis 2	50	2
Mano Derecha control	Pretratado sólo con aceite vegetal	10

Tabla 13. Resultados dosis efectiva Formulación M3

<b>Secuencia de aplicación</b>	<b>de Concentración de la solución de repelente en 1 ml [% v/v]</b>	<b>Número de aterrizajes</b>
<i>Mano izquierda control</i>	Pretratado sólo con aceite vegetal	10
<i>Dosis 1</i>	25	2
<i>Dosis 2</i>	50	1
<i>Mano Derecha control</i>	Pretratado sólo con aceite vegetal	10

Tabla 14. Resultados dosis efectiva Formulación M4

<b>Secuencia de aplicación</b>	<b>de Concentración de la solución de repelente en 1 ml [% v/v]</b>	<b>Número de aterrizajes</b>
<i>Mano izquierda control</i>	Pretratado sólo con aceite vegetal	10
<i>Dosis 1</i>	25	0
<i>Dosis 2</i>	50	0
<i>Mano Derecha control</i>	Pretratado sólo con aceite vegetal	10

Tabla 15. Resultados dosis efectiva Formulación M5

<b>Secuencia de aplicación</b>	<b>de Concentración de la solución de repelente en 1 ml [% v/v]</b>	<b>Numero de aterrizajes</b>
<i>Mano izquierda control</i>	Pretratado sólo con aceite vegetal	10
<i>Dosis 1</i>	25	1
<i>Dosis 2</i>	50	3
<i>Mano Derecha control</i>	Pretratado sólo con aceite vegetal	10

La formulación M4 tuvo repelencia del 100% en concentraciones del 25% y 50%. Se eligió la concentración del 50% para realizar las pruebas de tiempo completo de protección en todos los voluntarios. Se aplicó el repelente M4 en todos los voluntarios en el antebrazo izquierdo y DEET en el brazo derecho y se esperaron 30 minutos para ingresar los brazos en las jaulas, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados TCP para M4 después de 30 min de aplicación

<b>Voluntario</b>	<b>Número de aterrizajes en 3 minutos. DEET</b>	<b>Número de aterrizajes en 3 minutos. M4</b>	<b>Tiempo primer aterrizaje [seg]</b>
1	0	10	49
2	0	7	90
3	1	7	60
4	1	8	120
5	0	11	40

Los resultados obtenidos para los ensayos de tiempo completo de protección tras 30 minutos de aplicación fueron inferiores a los de DEET. Sin embargo, mejoró notablemente el tiempo de protección durante la exposición del antebrazo tratado en las jaulas, pues el primer aterrizaje ocurrió en promedio a los 71.8 segundos; permitiendo observar que aunque la formulación con aceites esenciales mejoró, sigue siendo inferior al DEET.

## 7 Conclusiones

- Se logró determinar la actividad repelente de diferentes formulaciones basadas en aceites esenciales orgánicos e hidrolatos de plantas aromáticas contra mosquitos *Aedes Egypti*. En todos los casos el componente comercial DEET mostró mayor actividad. Las formulaciones con aceites esenciales presentaron una buena capacidad repelente inicial, pero esta se perdió rápidamente. Esto sugiere que es necesario mejorar la formulación en lo relacionado con la persistencia en la piel de los componentes activos de los aceites que parecen volatilizarse de manera rápida.
- Se logró obtener aceites esenciales de eucalipto, clavo, citronela, limoncillo, tomillo, orégano, romero estragón y geranio mediante destilación por arrastre de vapor. Para el trompeto no se obtuvo aceite esencial, sólo hidrolato que fue incorporado en algunas formulaciones.
- Los protocolos sugeridos por la Organización Mundial de la Salud para la evaluación de la dosis efectiva de repelente y tiempo completo de protección se lograron implementar de manera exitosa. Ellos permitieron obtener, de manera comparativa con DEET, las capacidades de

repelencia de mosquitos *Aedes Aegypti* de las formulaciones basadas en aceites esenciales e hidrolatos.

- Las formulaciones propuestas basadas en aceites esenciales orgánicos y extracto de trompeto no mostraron actividad repelente comparable a la sustancia DEET, pues esta última mostró efectividad de 100% mientras que para la muestra M4, la de mejor desempeño, los aterrizajes comenzaron en promedio a los 75 segundos aproximadamente.
- Las formulaciones oleosas, con aceite vegetal como vehículo, mostraron mejor desempeño que las muestras sin vehículo. Lo que se presume puede estar asociado con el hecho de que los componentes volátiles de los aceites esenciales se retuvieron mayor tiempo en la piel. Por lo tanto, es importante realizar futuras investigaciones donde se evalúe el efecto repelente de diversos aceites vegetales en mezcla con aceites esenciales.
- El hidrolato de trompeto mostró un efecto calmante sobre la piel de los voluntarios cuando se aplicó después de haber sido picados, lo que sugiere un posible uso alternativo de dicho hidrolato.

## 8 Referencias Bibliográficas

- Andrade-Ochoa, S., Sánchez-Torres, L. E., Nevárez-Moorillón, G. V., Camacho, A. D., Noguera-Torres, B., Andrade-Ochoa, S., ... Noguera-Torres, B. (2017). Essential oils and their components as an alternative in the control of mosquito vectors of disease. *Biomédica*, 37, 224–243. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3475>
- Arraiza, M. P. (2011). *Industrial Use of Medicinal and Aromatic Plants 1*. ATSDR. (2015). *Resumen de Salud Pública - DEET*.
- Choi, W.-S., Park, B.-S., Ku, S.-K., & Lee, S.-E. (1994). REPELLENT ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS AND MONOTERPENES. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 18(4), 348–351. <https://doi.org/https://pdfs.semanticscholar.org/173f/6b1e32ace1b51ec2d8ca70ed40a570e6f658.pdf>
- Dávila Guerra, C. E., & Dávila Guerra, C. E. (2016). Actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach; y elaboración de una crema repelente contra insectos adultos de la familia Culicidae. *Repositorio de Tesis - UNMSM*. Retrieved from <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/handle/cybertesis/4878>
- Daza, L. P., & Florez, N. A. (2006). Diseño de un repelente para insectos voladores con base en productos naturales, 133.
- Del Pozo, X. (2006). No Title.
- Diseases, Z. I., & Branch, D. (n.d.). Dengue and the *Aedes aegypti* mosquito.
- Engineering, C. (2006). Project Report on EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL AND ITS Bachelor of Technology ( Chemical Engineering ) Department of Chemical Engineering National Institute of Technology.
- EPA, A. E. P. (2017). What is an Insect Repellent ?
- Henao, L. M., & Niño, J. (2009). Evaluación de la actividad insecticida in vitro de extractos vegetales contra la broca del café. *Recursos Naturales y Ambientales*, (58), 45–50.
- Leyva, M., Castex, M., Montada, D., Quintana, F., Lezcano, D., Marquetti, M. del C., ... Gonzalez, I. (2012). Actividad repelente de formulaciones del aceite esencial de *Melaleuca quinquenervia* ( Cav .) S . T . Blake ( Myrtales : Myrtaceae ) en mosquitos. *Anales de Biología*, 34, 49–58.
- Leyva, M., Frnch, L., Pino, O., Montada, D., Morejon, G., & Marquetti, M. del carmen. (2017). Plantas con actividad insecticida : una alternativa natural contra mosquitos . Estado actual de la temática en la región de las Americas . *Revista Biomedica*, 28(3), 139–170. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>
- Medicinales, A., & Tomillo, D. E. L. (2009). Aplicaciones medicinales del tomillo 1, 16–20.
- Misni, N., Nor, Z. M., & Ahmad, R. (2017). Repellent effect of microencapsulated essential oil in lotion formulation against mosquito bites. *Journal of Vector Borne Diseases*, 54(1), 44–53.
- Montes-Gonzalez, I. T., & Vasquez-Sanchez, G. (2015). Craneosinostosis: Experiencia En Elhospital Universitario Del Valle 2007 – 2015. *Revista Gastroenterología Hepatología Nutrición Pediátrica*, 3, 154–162.
- Nerio, Luz S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. E. (2009). Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research*, 45(3), 212–214. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2009.01.002>
- Nerio, Luz Stella, Olivero-Verbel, J., & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*, 101(1), 372–378. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.048>

- Otiniano, G., & Roldán, J. (2014). Actividad repelente y tiempo de protección experimental del aceite del endospermo de *Ricinus communis* ( Euphorbiaceae ) en *Aedes aegypti* Experimental repellent activity and weather protection of *Ricinus*, 2(2).
- Patel, E. K., Gupta, A., & Oswal, R. J. (2012). A REVIEW ON : MOSQUITO REPELLENT METHODS, 2(3), 310–317.
- Pohlit, A. M., Lopes, N. P., Gama, R. A., Tadei, W. P., Ferreira, V., Neto, D. A., ... Biology, T. (2010). Patent Literature on Mosquito Repellent Inventions which Contain Plant Essential Oils – A Review, 598–617.
- Sisteach, X. (2018). *Historia de las moscas y de los mosquitos y su influencia en el devenir de la humanidad*. Barcelona, España: Arpa.
- Tramut, C., Salem, A., Lie, E., Dele, E., Jay-robert, P., & Martin, T. (2013). The repellency of lemongrass oil against stable flies , tested using video tracking. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013021>
- WHO. (2009). GUIDELINES FOR EFFICACY TESTING OF MOSQUITO REPELLENTS FOR HUMAN.
- Zubieta, A. L., Giraldo, L., & Morales Olaya, J. (2015). EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS EXTRACTOS NATURALES DE *Eucaliptus globulus* y *Platycladus orientalis* COMO REPELENTE NATURAL CONTRA MOSQUITOS ADULTOS DE LA ESPECIE *Aedes aegypti* &quot; Retrieved from <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/4712/1/ZubietaGiraldoAngelicaLize205.pdf>

## 9 Anexos

### 9.1 Anexo 1: Consentimiento informado

#### **CONSETIMIENTO INFORMADO PARA ENSAYOS DE EVALUACION DE ACTIVIDAD REPELENTE DE FORMULACIONES A BASE DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTO DE *BOCCONIA FRUTESCENS***

Nombre del investigador principal: Leidy Yojana Escobar Ciro

Nombre de la organización: SIDCOP - Universidad de Antioquia

Nombre del patrocinador: aceites esenciales María La Judía

Nombre de la Propuesta: Evaluación de la actividad repelente de formulaciones a base de aceites esenciales y extracto de *Bocconia Frutescens*

#### **Carta informativa**

##### **1.Introducción**

“Evaluación de la actividad repelente de formulaciones de aceites esenciales y extracto de *Bocconia Frutescens*” es un proyecto de investigación para optar por el título de Bioingeniera de la facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia. EL proyecto se encuentra a cargo de la estudiante de pregrado en Bioingeniería Leydi Escobar Ciro y es asesorado por los profesores Mauricio Esteban Sánchez y César Augusto Vásquez, ambos Ingenieros Químicos de la universidad de Antioquia. EL objetivo de este trabajo está orientado en la evaluación de la actividad repelente de mosquitos de la variedad *Aedes aegypti* para lo cual se elaborarán diferentes formulaciones de mezclas de aceites esenciales junto con el extracto de la especie *Bocconia Frutescens*. Para tal fin contamos con el patrocinio de la empresa de aceites esenciales María la judía, el apoyo del grupo de investigación PCET de la Universidad de Antioquia y con el apoyo de 8 voluntarios que serán los encargados de poner a prueba las formulaciones propuestas en el presente trabajo de investigación.

##### **2.Propósito de la investigación**

El objetivo de esta investigación es hacer pruebas experimentales de la efectividad de las formulaciones de repelentes naturales a base de aceites esenciales en soluciones hidroalcohólicas y oleosas, y determinar la actividad repelente de planta *Bocconia Frutescens* en mosquitos *Aedes Aegypti*, criados y mantenidos en los laboratorios del grupo PECET de la Universidad de Antioquia.

##### **3.Selección de participantes**

La selección de participante será aleatoria, se seleccionarán 8 personas todas mayores de edad que bajo su consentimiento deseen participar voluntariamente en las pruebas de actividad repelente. La selección del personal se realizará teniendo en cuenta que se requiere una población en proporciones iguales entre hombres (4) y mujeres (4), todos de piel mestiza. Los voluntarios del ensayo deben evitar el uso de fragancias y productos repelentes durante 12 horas antes. Además, los voluntarios deben ser personas preferiblemente no fumadoras o; por lo menos, que se hayan abstenido de haber fumado mínimo 12 horas antes de la prueba

#### **4. La participación voluntaria**

La participación de las personas es netamente voluntaria y ellos están en la libertad de abandonar o no la prueba antes de ser iniciada.

#### **5. Información sobre el repelente a base de aceites esenciales**

Las mezclas a las que se desean evaluar su actividad repelente se componen principalmente de aceites esenciales de citronela, eucalipto, romero, estragón, clavo, extracto de Bosconia. Dicha actividad repelente se debe a la presencia de ciertos componentes que repelen a mosquitos como Terpenos. Las propiedades repelentes de aceites esenciales varían regularmente entre plantas, al parecer, la bioactividad está asociada con la presencia conjunta de mono terpenos y sesquiterpenos en la composición de los aceites (Sukumar et al. 1991, Jaenson et al. 2006, Kiran & Devi 2007).

#### **6. Protección contra vectores enfermedades transmitidas**

Para evitar la transmisión de enfermedades, los mosquitos de la cepa Rockefeller han sido previamente criados en un laboratorio XXXXXXX NOMBRE DEL GRUPO PECET, de la Universidad de Antioquia, sin haberlos dejado probar sangre, se separan las hembras y estas se alimentan únicamente con agua azucarada, se organizan 50 hembras por jaula para los ensayos de dosis efectiva, y 200 hembras por jaula para los ensayos de tiempo de protección completo TPC

## **7.Efectos secundarios**

Pueden ser picados por mosquitos *Aedes aegypti* de una cepa apatógena (Cepa Rockefeller: es una cepa libre aprobada por el Instituto Nacional de Salud), por máximo se dejarán que 10 mosquitos aterricen sobre el antebrazo antes de que se suspenda la prueba en caso de baja repelencia del producto; estas picaduras pueden provocar hinchazón en caso de que el voluntario sea alérgico.

## **8.Riesgos**

Teniendo en cuenta la resolución 8430 de 1993 Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud artículo 11 esta evaluación se clasifica como Investigación con riesgo mínimo.

## **9.Confidencialidad**

El equipo de investigación mantendrá la confidencialidad de los datos personales.

## **10.Derecho a denegar o retirar**

Se confirma nuevamente la participación es voluntaria e incluye el derecho a retirarse en el momento que el voluntario desee.

## **11.Contactos**

**Leidy Y. Escobar Ciro**

**Cesar Augusto Vázquez**

**Mauricio Sánchez**

**Farlán Taborda**

|

## 9.2 Anexo 2: Certificado de consentimiento

### CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

Los mosquitos en general son los vectores con más importancia en la causa de enfermedades humanas que afectan en gran magnitud a la salud pública. Debido a esta problemática se hace esencial la búsqueda de alternativas para combatir al mosquito *Aedes Aegypti* (Organización Mundial de la Salud, 2014). *Aedes aegypti* se caracteriza por ser un mosquito hematófago, que ejerce picaduras principalmente al amanecer y al atardecer, siendo este vector del dengue, fiebre amarilla y Chikunguña. Es importante resaltar que las hembras de mosquito *Aedes Aegypti* han sido cultivadas cuidadosamente en las instalaciones del PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales) de la Universidad de Antioquia y por lo tanto se garantiza que no tienen contaminación o pueden llegar a ser transmisores de alguna enfermedad tropical producto de su eventual picadura.

El objetivo de esta investigación es hacer pruebas experimentales de la efectividad de los repelentes naturales a base de mezclas de aceites esenciales y extracto de *Bocconia Frutescens* los bioensayos en los que participaran los voluntarios consisten en aplicar cierta cantidad de repelente en el antebrazo de cada uno, e introducir el brazo en la caja entomológica donde estarán 50 hembras para ensayos de dosis efectiva y 200 hembras para ensayos de Tiempo de protección completo, preparadas para los bioensayos sin haberlas dejado picar sangre, se han alimentado de agua azucarada como única fuente de alimento, cada voluntario contará con una caja con hembras sin picar. Teniendo en cuenta la resolución 8430 de 1993 Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud artículo 11 esta evaluación se clasifica como Investigación con riesgo mínimo.

***He leído la información anterior, o me fue leída. He tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre el mismo, y cualquier pregunta que he pedido han sido contestadas a mi satisfacción. Doy mi consentimiento voluntariamente a participar en esta investigación y entiendo que tengo el derecho a retirarme de la investigación en cualquier momento sin en alguna manera afecta mi atención médica.***

Nombre del voluntario: \_\_\_\_\_

Firma del Voluntario: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ Día/Mes/Año

***Hemos leído o presenciado la lectura precisa del formulario de consentimiento al participante potencial, y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmamos que el individuo ha dado su consentimiento libremente.***

\_\_\_\_\_  
Leidy Yojana Escobar Ciro

\_\_\_\_\_  
Fecha

|

**9.3 Anexo 3: Protocolo para determinar la actividad repelente de las formulaciones a ensayar basado en el manual de la Organización Mundial de la Salud del año 2009**

**PROCOLO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD REPELENTE DE DIFERENTES FORMULACIONES DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTO DE BOCCONIA**

**Nombre de Voluntario:** \_\_\_\_\_

El objetivo de las pruebas de laboratorio es estimar la dosis efectiva de un repelente y el tiempo de protección completa que provee un repelente después de aplicarlo en la piel

Los objetivos específicos de estas pruebas son:

-Estimar la respuesta a la dosis y la dosis efectiva de un repelente correspondientes 50% y al 99.9% de protección a mosquitos aterrizando o rodeando.

-Estimar el tiempo de protección completo (TPC) de un repelente, el cual es el tiempo entre la aplicación del repelente y el aterrizaje del primer mosquito.

El DEET es un ingrediente activo en la mayoría de los repelentes comerciales disponibles, el cual es recomendado para ser el control positivo (usualmente un 20% de DEET diluido en Etanol) para comparar la efectividad del repelente alternativo a probar.

El uso de animales de laboratorio o membranas artificiales podría ser inadecuado para simular la situación de un repelente diseñado para ser usado en piel humana. Las pruebas se realizan en voluntarios humanos adultos, con baja o nula sensibilidad a las picaduras de mosquitos. Se prefiere que haya igual número de mujeres y hombres voluntarios.

**Preparación de la piel**

Para la preparación de las pruebas de laboratorio, el área de la piel del voluntario a tratar debe ser lavada con jabón neutro y enjuagada con agua, luego se debe enjuagar nuevamente con una solución de etanol al 70% o Alcohol Isopropílico en agua y secar con una toalla. Dada la posibilidad de factores que podrían alterar la atracción de una persona a los mosquitos, lo cual podría afectar los resultados de los ensayos de repelencia, los voluntarios

deberían evitar el uso de fragancias y repelentes por al menos 12 horas antes y durante las pruebas. Preferiblemente los voluntarios no deberían fumar, o al menos no hacerlo 12 horas antes y durante los ensayos.

#### Preparación de los mosquitos a usar

Es esencial estandarizar la crianza de los mosquitos en un laboratorio para garantizar la confianza y reproducción fiel de los datos obtenidos.

-Los mosquitos deben ser criados, mantenidos y probados en un cuarto a una temperatura de  $27 \pm 2$  C, humedad relativa de mayor a  $80 \pm 10\%$  y fotoperiodo 12:12 (día-noche).

-La población de mosquitos adultos debe ser alimentada con una solución de azúcar, pero no deben ser alimentadas con sangre.

-Las pruebas de repelencia se deben hacer con hembras hambrientas por al menos 12 horas antes de los ensayos.

-Los mosquitos deben estar en jaulas Gerber de 30x30x30 cm con fondo y techo sólidos, las otras paredes deben ser en acrílico transparente para poderlos observar en los lados derecho e izquierdo, y paredes de tela en el frente donde se vaya a realizar el ingreso. Las hembras adultas deben ser de 4 a 7 días de edad.

## 1. ESTIMACION DE LA DOSIS EFECTIVA (MATERIAL TECNICO)

**Se realiza para diferentes concentraciones de extracto de *Bocconia Frutescens***

Diluciones seriales del repelente son hechas con etanol y son probadas para identificar un rango de dosis efectiva. Dosificaciones que dan respuesta entre el 10% y el 90% son usadas para este análisis, preferiblemente 2-3 dosis que den menos del 50% de la actividad repelente y 2-3 dosis que den más del 50% de la actividad repelente.

Cada voluntario usa dosis incrementales en el antebrazo, al menos cinco aplicaciones de dosis incrementales. Se requiere una jaula con 50 mosquitos. Una sola prueba compromete el uso continuo de los mismos mosquitos por el mismo voluntario y es completada el mismo día. Para las réplicas se repite el mismo proceso usando diferentes mosquitos después de varios días. Se realizará una réplica. En total se requieren 2 jaulas, cada una con 50 mosquitos.

1. 1 ml de etanol se aplica uniformemente usando una pipeta a aproximadamente 600 cm<sup>2</sup> de la piel del antebrazo entre la muñeca y el codo y deja secar (Aproximadamente un minuto).
2. Antes de introducir el brazo en la jaula con 50 mosquitos hembras, las manos deben estar protegidas con guantes de nitrilo para evitar picaduras.
3. Ingresar el antebrazo con el diluyente y contar el número de mosquitos que aterrizan para probar la piel durante un periodo de 30 segundos. Durante los ensayos, el voluntario debe evitar mover el brazo. Para poder continuar con las pruebas, la tasa de picaduras debe ser mayor o igual a 10 aterrizajes en el periodo de 30 segundos.
4. El antebrazo de control es cuidadosamente retirado y el mismo brazo es tratado 1 ml de la dosis más baja del repelente y se deja secar. El brazo tratado es puesto en la jaula por otro periodo de 30 segundos y se procede a repetir el mismo procedimiento incrementando cada dosis de repelente.  
Se debe realizar cada prueba sucesivamente una tras otra, sin demorarse y la dosis del repelente para cada prueba es calculada como la suma de las dosis aplicadas para llegar a la dosis acumulada para cada prueba.
5. Para concluir con el experimento de la respuesta de dosis, 1 ml de etanol es aplicado en el otro brazo y se deja secar. Este antebrazo se introduce en la jaula por 30 segundos para verificar que el número de aterrizajes es aproximadamente mayor a 10 en este periodo, como se observó al comienzo del experimento. Si la tasa es menor a 10 en el periodo de 30 segundos. Los resultados de este experimento deben ser descartados.

Tabla 1. Aterrizajes por concentración de solución repelente

<b>Secuencia de aplicación</b>	<b>Concentración de la Solución de repelente aplicado en 1 ml (%)</b>	<b>Numero de aterrizajes</b>
Mano Izquierda control	Pretratado solo con etanol	
Mano izq. Dosis 1	20	
Mano izq. Dosis 2	40	
Mano izq. Dosis 3	60	
Mano izq. Dosis 4	80	
Mano izq. Dosis 5	100	
Mano derecha Control		

Si en algún momento, la tasa de aterrizajes es muy alta para garantizar el conteo de mosquitos acercándose a la piel, significa que dicha tasa debería ser calculada como una serie de 3 lecturas cada una de cinco segundos, y la suma multiplicada por dos para estimar los aterrizajes que deberían ocurrir en 30 segundos. El voluntario entrenado deberá apuntar el número de aterrizajes.

La protección ( $p$ ) es expresada como la proporción del número de mosquitos aterrizando en el brazo tratado con repelente ( $T$ ) en relación con el número de aterrizajes en el brazo de control ( $C$ ) del mismo individuo.

$$p = 1 - (T / C) = (C - T) / C \text{ (i)}$$

Donde  $C$  es el promedio de aterrizajes en los dos brazos sin repelente, únicamente con etanol aplicado (al comienzo y al final del experimento). Los datos son analizados usando la regresión del plano de probit donde el  $ED_{50}$  y  $ED_{99.9}$  y sus límites de confianza pueden ser estimados.

2. ESTIMACION DEL TIEMPO DE PROTECCION COMPLETO (MATERIAL TECNICO Y PRODUCTO FORMULADO)

El tiempo de protección completo o TPC de un repelente puede ser determinado de dos maneras diferentes. Preferiblemente, La dosis efectiva ED<sub>99.9</sub> es estimada usando los procedimientos descritos anteriormente. 1 ml del repelente es entonces probado a su ED<sub>99.9</sub> comparado con 1ml de DEET al 20% disuelto en etanol. Alternativamente, 1ml del 20% de DEET en alcohol puede ser comparado con la misma cantidad (peso/peso) del repelente candidato en el otro brazo. En ambos casos, los tratamientos son aplicados a un área de aproximadamente 600cm<sup>2</sup> de la piel del antebrazo entre la muñeca y el codo.

Se requieren de 7 Jaulas Gerber, cada una con 200 mosquitos hembras, sin alimentar con sangre. Una jaula es diseñada para el control positivo (20% DEET en etanol), y los otros 6 restantes para las formulaciones de repelente a probar:

Tabla 2. Repelentes por ensayar

Repelente (Positivo)	DEET	20% DEET en Etanol
Repelente A		Mezcla de aceites esenciales + etanol
Repelente B		Mezcla de aceites esenciales + Bocconia+ etanol
Repelente C		Extracto de Bocconia puro
Repelente D		Aceite de Ricino
Repelente E		Aceites esenciales + ricino
Repelente F		Aceites esenciales + ricino + Bocconia

1. Inicialmente, las lecturas de aterrizaje de los mosquitos deben ser comprobadas insertando un brazo sin tratar a la jaula por 30 segundos o hasta que se cuenten 10 mosquitos aterrizando. El procedimiento es repetido con la otra mano en la segunda jaula. Destinada para el positivo. Si este nivel de aterrizajes no se consigue, el experimento debería ser descartado.
- 2.
3. 1 ml del repelente candidato ya preparado en solución de alcohol es aplicado en un brazo y un 1ml de DEET es aplicado en la otra mano.
3. Después de 30 minutos, El brazo tratado con repelente es ingresado en su respectiva jaula y expuesto por 3 minutos para determinar los aterrizajes.



## TABLAS DE RESULTADOS POR VOLUNTARIOS

### 1. Ensayo de Dosis efectiva de Bocconia

Tabla 4. Aterrizajes por concentración de solución repelente

Secuencia de aplicación	Concentración de la Solución de repelente aplicado en 1 ml (%)	Numero de aterrizajes
Mano Izquierda control	Pretratado solo con etanol	
Mano izq. Dosis 1	20	
Mano izq. Dosis 2	40	
Mano izq. Dosis 3	60	
Mano izq. Dosis 4	80	
Mano izq. Dosis 5	100	
Mano derecha Control	Pretratado solo con etanol	

### 2. Tiempo completo de protección

REPELENTE \_\_\_\_\_

DEET	REPELENTE ( )	TIEMPO (MIN)
		30
		60
		90
		120
		150
		180
		210
		240
		270
		300
		330
		360
		390
		420
		450
		480

REPELENTE \_\_\_\_\_

DEET	REPELENTE ( )	TIEMPO (MIN)
		30
		60
		90
		120
		150
		180
		210
		240
		270
		300
		330
		360
		390
		420
		450
		480

