



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CARRERA QUÍMICA FARMACÉUTICA

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN QUÍMICA
FARMACÉUTICA**

**TÍTULO: ELABORACIÓN DE REPELENTE ORGÁNICO A PARTIR DE PLANTAS
Eucalyptus camandulensis D. (EUCALIPTO), *Azadirachta indica* A. (**NEEM**) Y
Rosmarinus officinalis L. (ROMERO) CONTRA EL AGENTE *Aedes aegypti*.
LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y LABORATORIO 107
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA, UNAN-MANAGUA. ENERO
2021 - MAYO 2022**

Autor:

Br. Lorgia Karelia Saballos Bone

Tutor:

Lic. Miury Carolina Salmerón Urbina

Managua, mayo 2022



DEDICATORIA

Dios:

Por darme la fortaleza y sabiduría para llegar hasta acá y poder cumplir con este objetivo.

A mis Padres:

A Areli de los Angeles Bone Guzmán por el apoyo incondicional que me ha brindado desde el inicio, por todo el esfuerzo que día con día realizo para poder estar hasta acá y por enseñarme a ser una guerrera, todo este trabajo se lo dedico de corazón a ella.

A Manuel Antonio Saballos por todo el apoyo brindado, por motivarme a ser una profesional que en medio de todo siempre brindo su apoyo y esfuerzo día con día.

Mi Hermano:

A Jimmy Antonio Saballos Bone por el apoyo brindado en todas las etapas de mi vida jugando el papel de hermano mayor, en especial está, fue mi ejemplo a seguir y no rendirme nunca por muy difícil que se pongan las cosas, de su manera peculiar me animo a seguir adelante.

Mi Pareja:

A Jayson Josue Arce Quintanilla por todo el apoyo incondicional, por estar siempre para mí desde el principio, por creer en mí cuando ni yo podía creer en mí, por todo su cariño y amor incondicional, por motivarme a continuar, por ser mi hombro donde apoyarme en todos los momentos.

A mí:

a Lorgia Karelia Saballos Bone por todo el esfuerzo, dedicación y desempeño puesto desde el inicio de la carrera, por la paciencia y resiliencia en superar cada uno de los obstáculos que atravesaron mi camino, por todo lo aprendido en cada una de las etapas.





AGRADECIMIENTO

A Dios todo poderoso por permitirme siempre no decaer en este proceso, por todo lo misericordioso y bondadoso que es conmigo, que me ayudó a sobrellevar y poder combatir los problemas en el transcurso de este proceso.

*A mi tutora **Miury Carolina Salmeron Urbina** por haberme guiado en este arduo camino de muchas enseñanzas, por todo el apoyo y cariño brindado, por confiar en mis capacidades y por siempre tener la disposición de compartir su conocimiento y sobre todo agradecer porque siempre estuvo junto a mí en este largo camino.*

A los muchachos del laboratorio del departamento de Química que me brindaron siempre su apoyo, disponibilidad y su mano amiga en todo este proceso, ya que gracias a su apoyo se logró llevar a cabo cada uno de los procesos experimentales.

*A la **Lic. Lidie Valeria Baca Arana** que con su excelente trabajo me ayudó a sobrellevar y culminar este proceso, en donde me impulsó a no decaer y continuar.*





CARTA DE AVAL

“TUTORA DE ENSAYOS FARMACOGNÓSTICOS Y CLÍNICOS”

Por la presente, expreso en calidad de tutora, mi formal aceptación para que la tesis titulada: Elaboración de Repelente Orgánico a partir de plantas Eucalyptus camandulensis D. (Eucalipto), Azadirachta indica A. (Neem) Y Rosmarinus officinalis L. (Romero) contra el agente Aedes aegypti. Laboratorio de Tecnología Farmacéutica y Laboratorio 107 Departamento De Química Farmacéutica, Unan-Managua. Enero 2021 - mayo 2022, sea defendida ante el tribunal que a tal efecto se constituya. La autora de dicho trabajo, Br. Lorgia Karelia Saballos Bone, ha demostrado ser una persona responsable y competente con respecto a las actividades asignadas durante el desarrollo de dicha investigación. La monografía en mención, reúne todos los requisitos de un trabajo propio de esta índole, por su rigurosidad, alcance teórico y desarrollo metodológico y científico, representando un importante aporte en el campo de las investigaciones en salud.



Lic. Miury Carolina Salmeron Urbina
Tutora del Trabajo monográfico
Docente
Departamento de Química
UNAN-Managua



RESUMEN

El presente estudio se realizó con el propósito de evidenciar el efecto repelente de los extractos obtenidos de las plantas *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente al vector *Aedes aegypti*. El método empleado para la obtención de los extractos fue extracción por destilación directa para el cual se estableció como solvente alcohol isopropílico al 78% teniendo como resultado un rendimiento para *E. camandulensis* D. de 25,056%, un rendimiento de 24,609% para *A. indica* A. y 25,230% para *R. officinalis* L, en la forma farmacéutica se preformuló tres productos en el cual uno cumplió con los controles establecidos para productos de uso tópico. En la comprobación del efecto repelente se realizaron ensayos clínicos en personas contra vectores *Aedes Aegypti* criados bajo condiciones controladas, en donde se puso a prueba la pre formulación 1 y la combinación de los extractos en el cual se utilizó un diseño experimental 2³ utilizado en experimentos donde intervienen varios factores para analizar el efecto en conjunto de estos sobre una respuesta, se comprobó mediante el programa estadístico Minitab con los datos brindados de los resultados experimentales en donde la pre formulación 1 posee mayor efecto repelencia que el extracto puro sin embargo ambos presentaron una alta actividad repelente y un tiempo acción repelente de 60 minutos.

Palabras Claves: *Eucalyptus camandulensis* D., *Azadirachta indica* A., *Rosmarinus officinalis* L., *Aedes aegypti*, preformulación, extracción directa, vector.

INDICE

CAPITULO I: ASPECTOS GENERALES

1.1. Introducción.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Justificación.....	3
1.4. Objetivos	4
1.4.1. Objetivo general:	4
1.4.2. Objetivos específicos:.....	4

CAPITULO II: MARCO REFERENCIAL

2.1. Antecedentes	5
2.1.1. Internacionales:	5
2.1.2. Nacionales.....	8
2.2. Marco teórico.....	9
2.2.1. Productos naturales.....	9
2.2.1.1. Plantas biocidas	9
2.2.1.2. Extracto vegetal.....	9
2.2.1.3. Principio activo	9
2.2.1.4. Extractos hidroalcohólicos.....	10
2.2.2. Generalidades del árbol <i>Eucalyptus camandulensis</i> D. (Eucalipto)	10
2.2.2.1. Taxonomía	10
2.2.2.2. Descripción botánica	10
2.2.2.3. Composición química	11
2.2.2.4. Propiedades y usos medicinales	11
2.2.2.5. Toxicología	12
2.2.3. Generalidades del árbol <i>Azadirachta indica</i> A. (Neem).....	12
2.2.3.1. Taxonomía	12
2.2.3.2. Descripción botánica	13
2.2.3.3. Composición química	13
2.2.3.4. Propiedades y usos medicinales	14
2.2.3.5. Toxicología	14
2.2.4. Generalidades de la planta <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero).....	15

2.2.4.1. Taxonomía	15
2.2.4.2. Descripción botánica	15
2.2.4.3. Composición química	15
2.2.4.4. Propiedades y usos medicinales	16
2.2.4.5. Toxicología	16
2.2.5. Repelente	16
2.2.6. Tipos de repelentes	17
2.2.6.1. Repelentes sintéticos convencionales:	17
2.2.6.2. Repelentes de origen natural	20
2.2.7. Ventajas de los repelentes naturales	20
2.2.8. Diferencia entre repelente natural y sintético	20
2.2.9. Generalidades de los insectos voladores	21
2.2.9.1. El sentido del olfato en los insectos voladores	22
2.2.10. Generalidades del <i>Aedes aegypti</i>	22
2.2.10.1. Taxonomía	23
2.2.10.2. Descripción morfológica	23
2.2.10.3. Reproducción	23
2.2.10.4. Ciclo biológico	23
2.2.10.5. Enfermedades transmitidas por el mosquito <i>Aedes aegypti</i>	24
2.2.11. Tecnología de extracción de los aceites esenciales.....	25
2.2.11.1. Extracción por arrastre de vapor	25
2.2.11.2. Extracción con solvente.....	26
2.2.11.3. Extracción con Dióxido de Carbono	26
2.2.12. Preformulación	26
2.2.12.1. Spray	27
2.2.12.2. Excipientes	27
2.2.12.3. Componentes de un spray	27
2.2.12.4. Controles según el reglamento técnico centroamericano 11.03.56:09 ...	28
2.2.13. Estudios clínicos.....	29
2.3 Hipótesis.....	31

CAPITULO III: DISEÑO METODOLOGICO

3.1. Descripción del ámbito de estudio.....	32
3.2. Tipo de estudio.....	32
3.3. Población y Muestra.....	33
3.3.1. Población.....	33
3.3.2. Muestra.....	33
3.3.2.1. Criterios de Inclusión.....	33
3.3.2.2. Criterios de exclusión.....	34
3.4. Variables.....	34
3.4.1. Variables independientes.....	34
3.4.2. Variables dependientes.....	34
3.5. Operacionalización de las variables.....	35
3.6. Materiales y Métodos.....	36
3.6.1. Materiales para recolectar la información.....	36
3.6.2. Materiales para procesar la información.....	36
3.6.3. Métodos.....	36
3.6.3.1. Métodos para la obtención de los extractos de <i>Eucalyptus camandulensis</i> <i>D. Azadirachta indica A. y Rosmarinus officinalis L.</i>	36
3.6.3.2. Proceso de pre formulación de repelente.....	37
3.6.3.3. Ensayo clínico.....	38

CAPITULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Resultados en la obtención de los extractos.....	44
4.2. Resultados de la elaboración del repelente.....	46
4.3. Resultados de los ensayos clínicos experimentales en mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	50
4.4. Análisis Estadístico para extracto puro y pre formulación.....	56
4.4.1. Prueba de normalidad mediante el método de Anderson-Darling para la muestra de extracto puro y pre formulación de <i>A. indica A, E. camandulensis D. y R. officinalis L.</i> para actividad repelente.....	57
4.4.2. Prueba de normalidad mediante el método de Anderson-Darling para la muestra de extracto puro y pre formulación de <i>A. indica A, E. camandulensis D. y R. officinalis L.</i> para el tiempo de acción repelente.....	63

4.4.3.Prueba e IC para dos varianzas: actividad repelente ExtP- PreF.....	66
4.4.4.Prueba e IC para dos varianzas: tiempo de acción repelente ExtP- PreF.....	69
4.4.5.Prueba de Mann-Whitney en la comparación de las medianas en las dos muestras: de la actividad repelente ExtP- PreF	71
4.4.6.Prueba de Mann-Whitney en la comparación de las medianas en las dos muestras: del tiempo de acción repelente ExtP- PreF	73
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones.....	76
5.2. Recomendaciones.....	78
REFERENCIAS.....	79
ANEXOS	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición Química Eucalipto	11
Tabla 2	Toxicología.....	12
Tabla 3	Composición Química Neem	13
Tabla 4	Composición Química Romero	15
Tabla 5	Componentes de Repelentes Sintéticos	17
Tabla 6	Diferencia entre Repelente Natural y Sintético	20
Tabla 7	Componentes de un spray	27
Tabla 8	Operacionalización de Variables.....	35
Tabla 9	Matriz del Diseño Experimental (diseño factorial 2 ³).....	40
Tabla 10	Diseño de experimento para medir actividad y tiempo de repelencia	41
Tabla 11	Materiales y equipos utilizados en el desarrollo de los métodos experimentales.....	42
Tabla 12	Fases del proceso de extracción.....	44
Tabla 13	Características de los extractos	45
Tabla 14	Pre formulaciones del repelente para 100 mL	46
Tabla 15	Controles realizados a los productos	47
Tabla 16	Resultado del pH realizado a los productos.....	48
Tabla 17	Resultados de la repetición de los ensayos.....	49
Tabla 18	Matriz del diseño de experimento 2 ³	52
Tabla 19	Porcentaje de repelencia de cada ensayo	53
Tabla 20	Resultados de las variables	54
Tabla 21	Datos descriptivos del Extracto Puro	56
Tabla 22	Datos descriptivos de la preformulación	56

Tabla 23 Estadísticas descriptivas de la actividad repelente del extracto puro y preformulación	67
Tabla 24 Relación de desviaciones estándar de la actividad repelente del extracto puro y preformulación.....	67
Tabla 25 Estadísticas descriptivas del tiempo de acción repelente del extracto puro y preformulación.....	69
Tabla 26 Estadísticas descriptivas de las medianas de la actividad repelente del extracto puro y preformulación.....	72
Tabla 27 Estimación de la diferencia	72
Tabla 28 Estadísticas descriptivas de las medianas del tiempo de acción repelente del extracto puro y preformulación	74
Tabla 29 Estimación de la diferencia	74

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1 Prueba de normalidad de la actividad repelente del extracto puro de A. indica A, E. camandulensis D. y R. officinalis L.....	57
Grafica 2 Probabilidad de actividad repelente según la dispersión de los datos del extracto puro de A. indica A, E. camandulensis D. y R. officinalis L.	59
Grafica 3 Prueba de normalidad de la actividad repelente de la preformulacion.	60
Grafica 4 Prueba de probabilidad en la actividad repelente de la preformulación	62
Grafica 5 Prueba de normalidad del extracto puro y preformulación de A. indica A, E. camandulensis D. y R. officinalis L.	64
Grafica 6 Prueba de probabilidad del extracto puro y preformulación de A. indica A, E. camandulensis D. y R. officinalis L.	65
Grafica 15 IC de 95% para las dos varianzas actividad repelente ExtP; actividad repelente PreF y la relación = 1 o \neq 1	68
Grafica 16 IC de 95% para actividad repelente ExtP; actividad repelente PreF ...	68
Grafica 17 Relacion de desviaciones estándar del tiempo de acción repelente del extracto puro y preformulación.....	70
Grafica 18 IC de 95% para las dos varianzas del tiempo de acción repelente ExtP; actividad repelente PreF y la relación = 1 o \neq 1	70
Grafica 19 IC de 95% para tiempo de acción repelente ExtP; tiempo de acción repelente PreF	71

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Características generales del <i>Eucalyptus camandulensis</i> D.	83
Anexo 2	Estructura de los compuestos activos del <i>Eucalyptus camandulensis</i> D	84
Anexo 3	Generalidades de <i>Azadirachta indica</i> A.....	85
Anexo 4	Estructura de los compuestos activos de <i>Azadirachta indica</i> A.....	86
Anexo 5	Generalidades del <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	87
Anexo 6	Estructura de los compuestos activos de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	88
Anexo 7	Sentido del olfato de los insectos voladores.....	89
Anexo 8	Descripción morfológica del <i>Aedes aegypti</i>	89
Anexo 9	Identificación morfológica del macho y hembra del <i>Aedes aegypti</i>	90
Anexo 10	Ciclo biológico del <i>Aedes aegypti</i>	90
Anexo 11	Método de extracción directa con solvente	91
Anexo 12	Fases de los ensayos clínicos.....	91
Anexo 13	Cálculos de datos obtenidos en el desarrollo	92
Anexo 14	Proceso de la obtención de los extractos hidroalcohólicos de <i>Eucalyptus camandulensis</i> D. <i>Azadirachta indica</i> A. y <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	93
Anexo 15	Daños físicos en las plantas como parte de los criterios de exclusión .	94
Anexo 16	Medición de pH de los extractos por triplicado	100
Anexo 17	Proceso de preformulación de repelente.....	103
Anexo 18	Medición de pH por triplicado la pre formulación.....	104
Anexo 19	Proceso de los ensayos clínicos experimentales en mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	110
Anexo 20	Etiqueta del repelente.....	119
Anexo 21	Fichas toxicológicas de los excipientes	121

Anexo 22	Solicitud para ensayos preclínicos en el área de Entomología	125
Anexo 23	Certificado de identificación de las plantas.....	126

INDICE DE FIGURAS DE ANEXO

Figura 1 Hojas de <i>E. camandulensis</i> D. con daños físicos (hojas con cambio de color y mordedura de insectos)	94
Figura 2 Hojas de <i>A. indica</i> A. con daño físico (incompletas y con mordeduras de insectos).....	94
Figura 3 Hojas y tallos de <i>R. officinalis</i> L. con daños físicos (hojas secas con mordeduras de insecto).....	95
Figura 4 Estructura continua de la extracción por destilación directa.....	97
Figura 5 Extractos obtenidos de la destilación de cada muestra.....	98
Figura 6 Temperatura de 10°C del agua	98
Figura 7 Temperatura final de la extracción reflejada por los termómetros de los balones.....	99
Figura 8 Resultado del pH del extracto <i>E. camandulensis</i> D.....	100
Figura 9 Resultado del pH del extracto de <i>A. indica</i> A	101
Figura 10 Resultado del pH del extracto de <i>R. officinalis</i> L.	102
Figura 11 Resultados del pH de la glicerina	104
Figura 12 Resultados del pH de la preformulación 1	105
Figura 13 Resultado del pH de la preformulación 2.....	106
Figura 14 Resultado del pH de la preformulación 3.....	107
Figura 15 Resultado del pH de la combinación de los extractos puros	108
Figura 16 Productos finales	109
Figura 17 Jaulas de 35.5 cm ³ forradas con tela de tul	112
Figura 18 Captura de larvas <i>Aedes aegypti</i> en cementerio Nuevo de Nagarote.	112
Figura 19 Medición de la acción repelente de los productos.....	113
Figura 20 Larvas de <i>Aedes aegypti</i> alimentándose con pienso para conejo	114

Figura 21	Larvas de <i>Aedes aegypti</i> en estado de pupa listas para eclosionar ...	114
Figura 22	Apetencia de los zancudos <i>Aedes aegypti</i> en el ensayo blanco	115
Figura 23	Hembra <i>Aedes aegypti</i> alimentada en el ensayo con el blanco	116
Figura 24	Nivel bajo de iluminancia.....	117
Figura 25	Nivel bajo de iluminancia.....	118
Figura 26	Etiqueta del repelente de la pre formulación 1	119
Figura 27	Etiqueta del repelente de los extractos puros.....	120
Figura 28	Ficha toxicológica del alcohol isopropílico.....	121
Figura 29	Ficha toxicológica de la glicerina	122
Figura 30	Ficha toxicológica del metilparabeno.....	123
Figura 31	Ficha toxicológica del propilparabeno	124

INDICE DE DIAGRAMAS DE ANEXO

Diagrama 1 proceso de preparación de las muestras	93
Diagrama 2 Proceso de obtención de extracto hidroalcohólicos <i>E. camandulensis</i> D. R. officinalis L. y <i>A. indica</i> A.	96
Diagrama 3 Proceso de la elaboración del repelente	103
Diagrama 4 Proceso de crianza de los mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	110
Diagrama 5 Proceso de la realización de los ensayos clínicos	111

INDICE DE ILUSTRACION

Ilustración 1 Diagrama del Diseño de Experimentos	40
--	-----------

ABREVIATURAS

‰: Porcentaje

°C: Grado Celsius

cm: centímetro

g: gramos

kg: kilogramo

Nº: numero

min: minutos

mL: mililitros

m: metro

LD50: Dosis letal media

H₀: Hipótesis nula

H_a: Hipótesis alternativa

DEET: N,N-Dietil-3-metilbenzamida

RTCA: Reglamento Técnico Centroamericano

UNAN: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua

MINSA: Ministerio de Salud

CENAPRECE: Centro de Programas Preventivos y Control de Enfermedades

WHO: World Health Organization

ExtP: Extracto Puro

PreF: Pre formulación

CAPITULO I

ASPECTOS GENERALES



1.1. Introducción

La propagación de enfermedades infecciosas transmitidas por el vector *Aedes aegypti* se incrementa en zonas cálidas y temporada de verano, provocando brotes epidemiológicos; siendo el dengue el arbovirus más importante que afecta al hombre, en Nicaragua el número de personas afectadas por enfermedades relacionadas al mosquito ha aumentado debido a numerosos factores como: el crecimiento de la población en áreas urbanas de ocurrencia rápida y desorganizada, la insuficiente provisión de agua potable, la inadecuada recolección de residuos entre otras.

Por lo antes mencionado es una necesidad notoria, la obtención de una alternativa para combatir al mosquito que reduzca los impactos en la salud y el ambiente, a este aspecto, un repelente orgánico se convierte en un candidato perfecto para hacerle frente a esta plaga que día a día nos acecha cada vez más; siendo los productos naturales como los extractos de las plantas y sus componentes puros una buena opción.

La utilización de recursos de origen natural han demostrado resultados positivos en el control de diversos insectos, por lo tanto la utilización de extractos obtenidos de las hojas de *Eucalyptus camandulensis D.* (Eucalipto) que contiene eucaliptol como componente encargado del efecto repelente, *Azadirachta indica A.* (*Neem*) que produce el metabolito azadiractina, el cual ha demostrado tener actividad repelente contra insectos y la *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) que su acción repelente se debe a que contiene pineno, son una gran alternativa para la elaboración de un repelente orgánico; aunque en Nicaragua actualmente estas plantas son especies con importancia alimenticia, medicinal e industrial, estas mismas poseen propiedades biocidas, al cual no se le da un aprovechamiento de gran impacto.

El presente estudio se realizó con el propósito de investigar que la combinación de los extractos obtenidos de las plantas *Eucalyptus camandulensis D.* (Eucalipto), *Azadirachta indica A.* (*Neem*) y *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) poseen una actividad repelente contra mosquitos hembras *Aedes aegypti*.

1.2. Planteamiento del problema

Para muchas enfermedades transmitidas por vectores como el *Aedes aegypti* no se encuentran tratamientos preventivos, solamente el control químico como: campañas de limpieza, control físico (abatización) y fumigación, estos métodos son básicos para disminuir las plagas de mosquitos y controlar la incidencia de las enfermedades. Otro método de control es el uso de insecticidas como los repelentes químicos, los cuales se han venido utilizando durante décadas.

El DEET es un pesticida denominado como ligeramente tóxico con categoría III, actualmente es el ingrediente activo más predominante en el mercado, encontrándose en barreras físicas, ropas, mosquiteros y en la mayoría de repelentes de uso común. A través del uso prolongado de repelentes con DEET se han presentado casos con reacciones negativas como: hormigueo, descamación e irritación en la piel, convulsiones, movimientos no coordinados, agitación, comportamiento agresivo, presión arterial baja, dermatitis por sobreexposición y empeoramiento en condiciones médicas preexistentes de la piel.

Las concentraciones de DEET en la elaboración de repelentes comerciales de uso diario han venido aumentando dado a la resistencia que los mosquitos presentan, encontrándose en el mercado productos con tiempo de repelencia hasta de 8 horas, la exposición prolongada no solo puede generar daños en la salud de los usuarios, también puede ser perjudicial para el medio ambiente encontrándose en aguas residuales que posteriormente son vertidas hacia otros cuerpos de agua.

Ante estas problemáticas las plantas con propiedades biocidas presentes en Nicaragua podrían asumir un papel importante disminuyendo el riesgo a la vida humana. Los repelentes de origen natural no pretenden reemplazar a los insecticidas sintéticos, al contrario, se consideran una nueva alternativa, segura, accesible y sostenible ecológicamente para el control vectorial, para lo cual se plantea la siguiente interrogante.

¿Los extractos de plantas *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) tienen efecto repelente contra el vector *Aedes aegypti*?

1.3. Justificación

En la actualidad, la mayor parte de las enfermedades infecciosas emergentes son transmitidas por mosquitos y no pueden prevenirse mediante la vacunación; sin embargo, la aplicación de repelentes es una medida de protección para evitar ser picado. En la actualidad las investigaciones se han enfocado en desarrollar repelentes de origen naturales que contribuyan a la mitigación endémica causada por picaduras de mosquitos vectores de enfermedades infecciosas como el *Aedes aegypti*.

La necesidad de encontrar una nueva alternativa para el control de estos insectos que ofrezcan una mayor seguridad para la salud y el medio ambiente sin presentar toxicidad en comparación a los insecticidas sintéticos, se encuentran en Nicaragua una amplia biodiversidad de plantas con propiedades biocidas que no son aprovechadas en su totalidad. Algunos estudios demuestran que los extractos del *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) presentan propiedades repelentes. Es por esta razón que dichas plantas se seleccionan como fuente de materia prima para la obtención de extractos orgánicos que combinados puedan presentar una mayor y mejor eficacia.

Por lo antes mencionado se considera de gran importancia la realización de esta investigación dirigida a plantear una nueva alternativa a partir de plantas *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) con propiedades biocidas, combinando sus extractos para potenciar su actividad repelente y generar así una pre formulación para un repelente dermoprotector. Así mismo con esta investigación se pretenden fortalecer los conocimientos en el área de farmacognosia y tecnología farmacéutica, permitiendo que futuros investigadores tomen como referentes los datos experimentales y desarrollen otros métodos a partir de los empleados.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general:

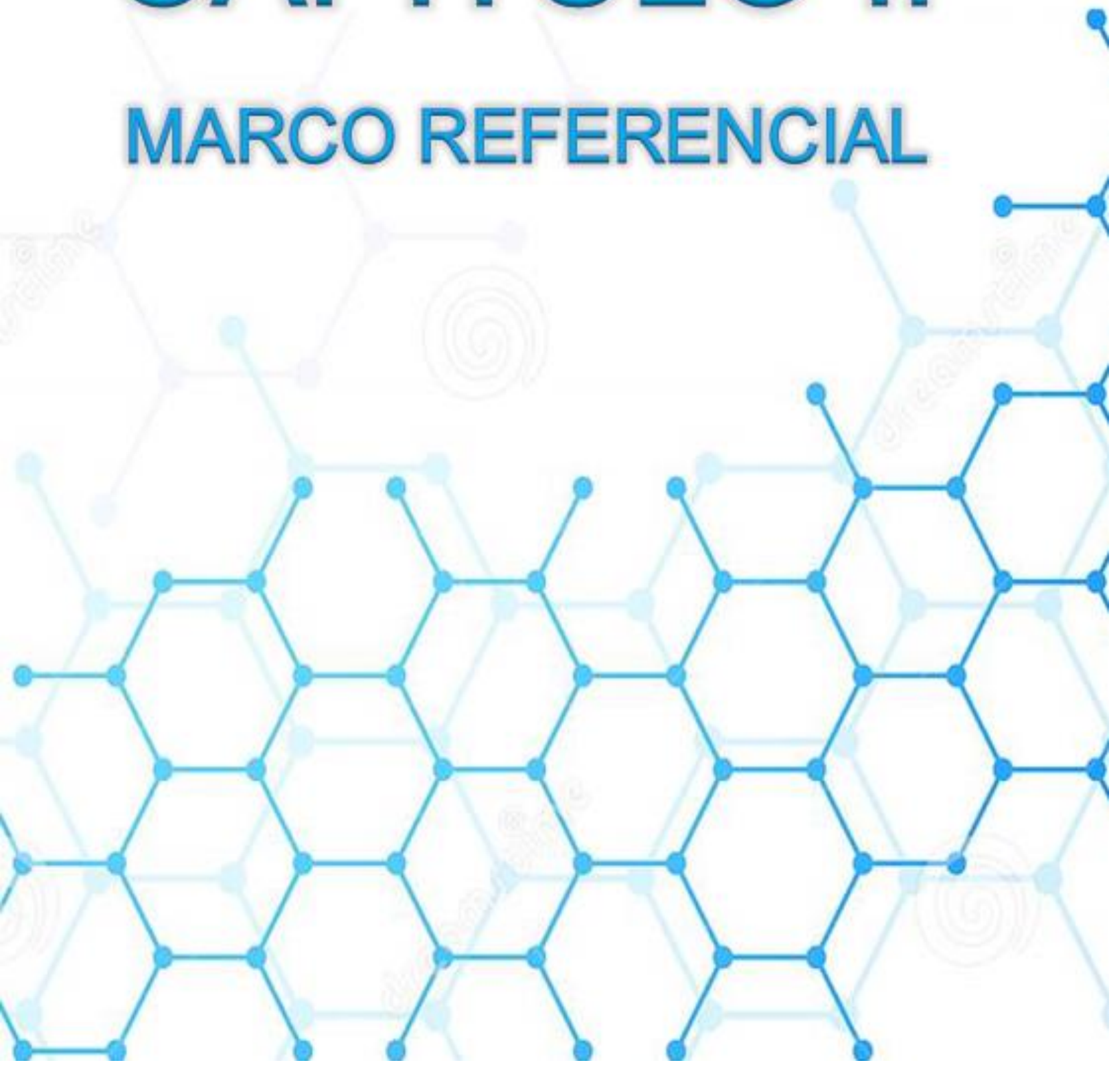
Elaboración de un repelente orgánico de extractos de plantas *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) contra el vector *Aedes aegypti*. Laboratorio de Tecnología Farmacéutica departamento de Química Farmacéutica. Enero 2021 – Mayo 2022

1.4.2. Objetivos específicos:

1. Aplicar el método de extracción de destilación directa para la obtención de los extractos de las plantas *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).
2. Pre formular un repelente orgánico a base de los extractos obtenidos de las plantas en estudio.
3. Realizar los controles de calidad según reglamento técnico centroamericano 11.03.56:09 para productos naturales y 71.03.45:07 para productos cosméticos.
4. Efectuar ensayo clínico para evaluar la eficacia del repelente contra mosquitos *Aedes aegypti*.
5. Comparar el extracto puro y pre formulación a través del análisis estadístico y datos experimentales, tomando en cuenta las variables de estudio.

CAPITULO II

MARCO REFERENCIAL



2.1. Antecedentes

Para la realización de este trabajo monográfico se realizó una revisión y recopilación de estudios asociados al tema de investigación. Los cuales fueron de utilidad en la comparación de resultados y en el análisis de los datos encontrados. Cabe mencionar que los antecedentes encontrados fueron nacionales e internacionales.

2.1.1. Internacionales:

Gutiérrez L. y Col. (2020); realizaron un proyecto de grado con el nombre de **“Desarrollo técnico y evaluación de la eficacia de un repelente de mosquitos libre de DEET a base de productos naturales”**. En el cual evaluaron la eficacia y la estabilidad fisicoquímica y microbiológica de un repelente de mosquito a base de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* L. (*eucalipto*), *Mentha piperita* E. (*menta*) y *Lavándula* L. (*lavanda*), mediante bioensayos en el laboratorio de entomología se logró evidenciar que el repelente es eficiente como protector frente a picaduras del mosquito, cumpliendo con las especificaciones de calidad.

Llanos A. y Col. (2020); En su publicación informativa con el nombre **“Efecto repelente del aceite de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) contra zancudos (*Anophelex spp*) en lechones”**. El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia repelente para zancudos (*Anophelex spp*) de tres dosis de aceite de *Azadirachta indica* en cerdos bajo condiciones de campo. El aceite de neem se extrajo con el equipo soxhlet y la fórmula incluyó 30% de glicerina, 1, 2 o 3% de aceite de neem (T1, T2, T3, respectivamente), y llevado al 100% con alcohol farmacéutico. Se aplicó 50 ml al lechón distribuido en todo el cuerpo. Obteniendo como resultado un porcentaje de protección (eficiencia del repelente) de 93.92%, 85.71% y 67.78% para T1, T2 y T3.

Escobar L. (2019); En su investigación titulada **“Evaluación de la actividad repelente de mosquitos de mezclas de aceites esenciales y extracto de *Bocconia frutescens* en *Aedes Aegypti*”** se realizó 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.

Realizaron pruebas de laboratorio para determinar la actividad repelente. Tuvieron como resultado que 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.

Leyva M. y Col. (2017). En su artículo de revista titulada “**Plantas con actividad insecticida: una alternativa natural contra mosquitos. Estado actual de la temática en la región de las Américas**”. Reunieron la información existente con respecto a la evaluación de la actividad insecticida de plantas contra mosquitos, obteniendo como resultado que en 239 especies de plantas se evaluó la actividad larvicida. Los extractos evaluados fueron aceites esenciales, etanólicos, metanólicos y acuosos, la parte vegetal más utilizada fueron las hojas y la familia de plantas más estudiada fueron *Myrtaceae* con 27 especies dentro de las que se destacan 15 especies de *Eucalyptus*.

Vilchez A. (2017); Realizó una tesis monográfica con el nombre “**Efecto repelente de una loción de extractos fluidos de hojas de *Azadirachta indica* y *Eucalyptus globulus***”. Mediante bioensayos en ratones se evaluó una loción a base de extractos fluidos *Azadirachta indica* y *Eucalyptus globulus* obtenidos por maceración en frío, donde se obtuvo como resultado que el producto presentó efecto repelente frente a zancudos *Aedes aegypti* estable a 1h, 2h, 3h, 4h y 5h.

CENAPRECE (2017); en su guía titulada con el nombre “**Guía para la crianza y mantenimiento de colonias de *Aedes aegypti* en condiciones de insectarios**”. Establece un protocolo para la instalación de insectario con colonias de mosquitos *Aedes aegypti* como base necesaria para la valuación de insecticidas utilizados en contra de este vector en el programa de control nacional y estatal en condición de laboratorios donde especifica el mantenimiento y crianza bajo parámetros controlados.

Zubieta A. y Col. (2015); en su tesis monográfica con el nombre “**Evaluación de la eficacia de los extractos naturales de *Eucalyptus globulus* y *Platycladus orientalis* como repelente natural contra mosquitos adultos de la especie**

Aedes aegypti". Determinaron la eficacia de *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) y *Platycladus orientalis* (Pino Libro), como repelente natural a base de etanol por medio de bioensayos a 10 personas voluntarias en concentraciones de 0,2 %, 0,4 % y 0,6 %. Obteniendo como resultado el *Eucalyptus globulus* tiene un 100 % de eficiencia a una concentración de 0,6%, concentraciones 0,4%, ya representa una protección de 97.67%. Y el *Platycladus orientalis*, tiene un 100 % de eficiencia a una concentración de 0,6%. En bajas concentraciones 0,4% protección de 93,02%.

WHO (2009); en su guía titulada "**Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin**". Diseñaron directrices con el propósito de proporcionar información específica, procedimientos sobre laboratorio, estudios, ensayos de campo y criterios estandarizados para pruebas de eficacia y evaluación de material técnico en productos de repelentes de mosquito para la piel humana, para determinar su seguridad, toxicidad y tasa de aplicación y efectividad.

Ortega I. y Col. (2008); realizaron una investigación con el nombre "**Inventario de plantas repelentes y/o fitoplaguicidas en las unidades de la agricultura urbana de la provincia de Cienfuegos**" Tuvo como objetivo determinar las especies de plantas con acción repelente y/o fitoplaguicidas presente en la agricultura urbana en donde se detectaron 68 plantas destacándose *Azadirachta indica* A. Juss (nim), *Origanum vulgare*, L. (orégano) *Eucalyptus sp*, (eucalipto) utilizadas con doble acción, fitoplaguicidas y repelentes eran ampliamente conocidas y utilizadas por el personal encuestado.

Daza L. y Col. (2006); desarrollaron un proyecto con el nombre "**Diseño de un repelente para insectos voladores con base en productos naturales**". Diseñaron un repelente en spray a base de aceites esenciales de citronela, ruda, neem, eucalipto y manzanilla; aplicaron ensayos biológicos para comprobar la eficacia, obteniendo como resultado una eficacia del 90% de repelencia con las contracciones citronela 5%, ruda 5%, neem 0,5%, eucalipto1% y manzanilla 1% se determinó el tiempo de efectividad del producto logrando mantenerse luego de una sola aplicación sobre la piel un efecto duradero de aproximadamente 2 horas.

2.1.2. Nacionales

Alemán N. y Col. (2015); desarrollaron una investigación con el nombre **“Evaluación *in vivo* de la actividad repelente de semillas *Azadirachta indica A. Juss* (NEEM) CONTRA *Aedes aegypti* vector de importancia en salud pública”**. En donde se evaluó la actividad repelente de extractos acuosos de semillas de Neem obtenidos a través de la técnica extractiva maceración en frío a concentraciones del 3 y 5 %, se realizaron ensayos *in vivo* en donde obtuvieron como resultado que los extractos acuosos de Neem al 3 y 5% poseen entre 33-90% de actividad repelente y que esta es proporcional al incremento de la concentración.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Productos naturales

Un producto natural es un compuesto químico o sustancia producida por un organismo vivo encontrado en la naturaleza que tiene generalmente una actividad farmacológica o biológica para su uso en el descubrimiento de fármacos y drogas de diseño. Los productos naturales pueden ser extraídos de los tejidos de las plantas terrestres, organismos marinos o caldos de fermentación de microorganismos entre otros (Ortega , 2013).

2.2.1.1. Plantas biocidas

Son vegetales (raíz, tallos, hojas, flores y semillas) que por sus características propias producen sustancias químicas que controla todo el complejo de plagas y enfermedades del cultivo dependiendo de su variedad. No son plantas del consumo alimenticio y en su mayoría las calificamos como malas hierbas y otras medicinales (Hurtado, 2015)

2.2.1.2. Extracto vegetal

Es una mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos o microbiológicos a partir de una fuente natural; son una forma práctica y cómoda de concentrar todos los principios activos de las plantas. Estos se elaboran colocando la planta seca o fresca en contacto con un disolvente que extrae sus principios activos. La extracción a partir de una planta vegetal con un solvente primario proporciona, en primera un extracto bruto o bien, un extracto general no tratado. (Ortega , 2013).

2.2.1.3. Principio activo

Los principios activos son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano. La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, los mucílagos y gomas, y los taninos. Existen en las plantas otros principios activos relevantes denominados nutrientes esenciales,

como las vitaminas, minerales, aminoácidos, carbohidratos y fibras, azúcares diversos, ácidos orgánicos, lípidos y los antibióticos (Gimeno, 2013).

2.2.1.4. Extractos hidroalcohólicos

Son extractos líquidos concentrados, obtenidos de la extracción de una planta o parte de ella, utilizando como solvente alcohol y agua. Presentan sedimento, color y aroma característicos de la planta de la cual se obtienen. Su concentración es 1:1, es decir, de un kilo de planta, se obtiene 1 litro de extracto (Castex, 2012).

2.2.2. Generalidades del árbol *Eucalyptus camandulensis D.* (Eucalipto)

2.2.2.1. Taxonomía

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Myrtales
- **Familia:** Myrtaceae
- **Género:** Eucalyptus
- **Especie:** Eucalyptus camandulensis
- **Nombre Científico:** Eucalyptus
- **Nombre Común:** eucalipto
- **Origen:** Comenzó a ser empleado en plantaciones en Europa hace menos de 200 años.

Fuente: (Silva, 2016)

2.2.2.2. Descripción botánica

Árbol de gran porte, puede alcanzar hasta 30 m de altura (varía entre 9 y 50 m en Australia), con diámetros de hasta 2 m. Tronco a menudo bifurcado y torcido, aunque también puede verse ejemplares bastantes rectos. Copa generalmente extendida con ramitas péndulas. De corteza lisa, grisácea o blanquecina, a veces algo parda. Caediza en placas pudiendo persistir en la base del tronco, sobre todo en regiones o sitios secos (Plagas, 2015).

Sus hojas juveniles son aovadas o anchamente lanceoladas, opuestas o alternas y pecioladas. Sus hojas adultas son oblongo-lanceoladas, acuminadas y generalmente falcadas, alternas, pecioladas (pecíolos de 1-2 cm de largo) y péndulas; miden de 10 a 23 cm de longitud. La nervadura central es bien notable en ambas caras, siendo las secundarias poco marcadas o insertas en ángulo de 45° respecto al principal. Las flores son blanquecinas, pequeñas, dispuestas en umbelas axilares con 3-15 flores o aún más, generalmente más de 8. Pedicelos largos y cilíndricos. Pedúnculos de la umbela cilíndricos. Opérculo rostrado, no mucho más largo que el receptáculo (Plagas, 2015).

2.2.2.3. Composición química

Tabla 1

Composición Química Eucalipto

Nombre compuesto	Concentración %
α -Pino	3,16
β -Mirceno	1,12
α -Felandreno	0,4
α -Terpino	1,1
Limoneno	3,7
Eucaliptol o 1,8-Cineol	82,27
Linanol	1,3
Terpino-4-ol	1,4
α -Terpineol	1,2
α -Copaeno	0,6
β -Selineno	0,59
Guaiol	2,76

Fuente: (Rueda & Mogollon, 2012)

2.2.2.4. Propiedades y usos medicinales

Las hojas frescas del eucalipto se utilizan para la elaboración de aceites, y sus flores secas son ideales para la preparación de infusiones. Presenta

propiedades como: antiinflamatorias, repelentes, antimicrobianas y expectorantes. Respecto a su capacidad antimicrobiana, con su uso se consigue acabar con aquellos microorganismos que son los causantes de procesos infecciosos en las vías respiratorias como: son la bronquitis, la sinusitis, la traqueítis y los constipados. Su propiedad expectorante fluidifica las secreciones pulmonares y favorece la expulsión de las mismas. A su vez, es antitusivo y un inhibidor de la irritación bronquial, se utiliza en enfermedades tales como la bronquitis aguda y crónica (Inma, 2019).

2.2.2.5. Toxicología

No se clasifica como toxicidad aguda, generalmente es inocuo puede presentar toxicidad en dosis >70 % por el alto contenido de cineol (Centelles, 2020).

Tabla 2

Toxicología

Vía de exposición	Parámetro	Valor	Especie
Oral	LD50	2,480 mg/kg	Rata
Cutánea	LD50	2,480 mg/kg	Conejo

Fuente: (Roth, 2017)

2.2.3. Generalidades del árbol *Azadirachta indica* A. (Neem)

2.2.3.1. Taxonomía

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Orden:** Sapindales
- **Familia:** Meliaceae
- **Género:** Azadirachta
- **Especie:** *Azadirachta indica*
- **Nombre científico:** *Azadirachta indica*
- **Nombre común:** Neem, margosa o lila india

- **Origen:** Originario de la India y de Birmania, que sólo vive en regiones tropicales y subtropicales.

Fuente: (Garcia, 2017).

2.2.3.2. Descripción botánica

El Neem es un árbol de crecimiento rápido, robusto, de hoja perenne y frondoso. El tronco alcanza un grosor de hasta 2,5 metros; la corteza es de color gris rojizo y de un espesor de hasta 2,5 cm; puede alcanzar una altura de 30 metro y un diámetro de copa de 25 metro. Su fruto es una drupa elipsoidal, lisa de 1,4 a 2,4cm de largo, producido en racimos; el color de la cascara al inicio de su formación es verde con endocarpio blanco y duro, al madurar la cascara se torna amarillenta (Cruz, 2004).

Su hoja es peciolada de forma aserrada de alrededor de 7 a 10 cm de largo; cuando son jóvenes son de color rojo cobrizo, al madurar cambian a verde oscuro; estas agrupan foliolos de 35 cm de largo, con separación entre hojas de 3 a 4 cm. Cada foliolo presenta 7 pares, las hojas son compuestas de imparipinadas más una terminal (Cruz, 2004).

2.2.3.3. Composición química

Los componentes principales del neem son los esteroides, alcaloides, flavonoides, glucósidos y primordialmente terpenoides existiendo en un número aproximado de 100. Los limonoides (triterpenoides) de mayor importancia por su concentración y actividad que han demostrado ser excelentes en proteger de una gran cantidad de plagas con una gran cantidad de ingredientes plaguicidas son: (Gomar, 2012).

Tabla 3

Composición Química Neem

Nombre compuesto	Concentración %
Azadiractina	16
Azadirona	10,8
Vepinina	5

Vilasinina	1,9
Geduninina	4,5
Nimbina	3,8
Salanina	2,4
Melantriol	2,6
Sitosterol	0,9
Meliacina	0,5

Fuente: (Gomar, 2012)

2.2.3.4. Propiedades y usos medicinales

Tiene múltiples usos, la madera se usa para la construcción y leña, como repelente de plagas y es de efecto sistémico, las plantas al absorber esa sustancia se vuelven inapetecibles para ciertos insectos, además, también es ampliamente utilizada para el mejoramiento de los suelos. Varias partes del árbol tienen acción antihelmíntica, antiséptica, antisifilítica, astringente, demulcente, emoliente y purgativa. Además, se utiliza para el tratamiento de tumores, enfermedades de los ojos, eczemas, dolor de cabeza, hepatitis, lepra, reumatismo, enfermedades venéreas y úlceras (Castillo, 2010).

2.2.3.5. Toxicología

Numerosos estudios de posible toxicidad resultaron en una determinación que la hoja y corteza tienen muy poca toxicidad, especialmente cuando son tomadas oralmente, pero grandes dosis de hojas de Neem tomadas internamente causaron algunos efectos secundarios en algunos de los animales en que fueron probados. Aparentemente no debe ser tomado en grandes cantidades durante largos periodos de tiempo (Bio-amantolli, 2015).

Extensas investigaciones han sido conducidas en el aceite de Neem por agencias regulatorias en diversos países, incluyendo Estados Unidos, y se ha encontrado que es segura en dosis limitadas durante cortos periodos de tiempo (Bio-amantolli, 2015).

Pruebas en animales requeridas por la Agencia de Protección al Medioambiente mostraron que extractos del alcohol de las semillas no produjeron

irritación externa en conejos y no produjeron efectos tóxicos en los ratones cuando se aplicó internamente, aún en grandes cantidades (Bio-amantolli, 2015).

Algunas personas tomando aceite de Neem internamente experimentaron náuseas e incomodidad general (Chopra, 1965) que es el caso de la mayoría de los compuestos sulfúricos que contienen los aceites (Bio-amantolli, 2015).

2.2.4. Generalidades de la planta *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)

2.2.4.1. Taxonomía

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Lamiales
- **Familia:** Lamiaceae
- **Género:** Rosmarinus
- **Especie:** *officinalis*
- **Nombre científico:** *Rosmarinus officinalis* L.
- **Nombre común:** Romero
- **Origen:** En la región mediterránea del Sur de Europa, Norte de África.

Fuente: (Lozano, 2019)

2.2.4.2. Descripción botánica

Arbusto denso y aromático de aspecto espigado que conserva todo el año las hojas y el color verde. Tallos leñosos y ramificados, hojas estrechas y agudas, con margen recurvado y blanquecino, en ángulo muy cerrado con el tallo. Las flores forman grupos y pueden ser blancas, lilas, azules e incluso rosadas, ligeramente moteadas, con cáliz bilabiado y dos medios estambres (Torres, 2018).

2.2.4.3. Composición química

Tabla 4

Composición Química Romero

Componente	Concentración %
Alfa Pineno	15,3

Camfeno	5,7
Mirceno	4,9
Limoneno	3,7
1,8 Cineol	3,7
Alcanfor	21,5
Borneol	3,7
Cariofileno	3,4

Fuente: (Rommeu, 2007)

2.2.4.4. Propiedades y usos medicinales

La actividad principal del romero está íntimamente vinculada al sistema digestivo por estimular y favorecer las secreciones y la producción de jugos gastrointestinales. Entre ellos están: efecto carminativo que favorece la disminución de la generación de gases en el tubo digestivo y con ello disminuyen las flatulencias y cólicos; facilita la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar; efecto diurético, antiinflamatorio, repelente, antiulcerogénico y antioxidante; efecto antibactericida, antiséptico, fungicida y balsámico; efecto rubefaciente y cicatrizante aumenta el flujo de sangre en la zona localizada aliviando dolores de afectaciones osteomusculares (MAPFRE, 2018).

2.2.4.5. Toxicología

Se considera que el principio activo del romero carece de toxicidad; sin embargo, las personas especialmente sensibles pueden experimentar reacciones alérgicas, especialmente dermatitis por contacto (Lopez, 2008).

Finalmente, aunque la probabilidad de presentar una intoxicación por el consumo de infusiones de romero es muy baja, una sobredosis podría derivar en un cuadro caracterizado por espasmo abdominal, vómitos, gastroenteritis, hemorragia uterina e irritación renal (Lopez, 2008).

2.2.5. Repelente

Los repelentes son compuestos químicos que, aplicados sobre la piel, interfieren los receptores químicos de los insectos e impiden que estos se fijen en

la piel para realizar la picadura. Estos productos solo actúan cuando el artrópodo se encuentra a poca distancia de su objetivo, es decir, a poca distancia de la piel. Las diferentes especies de insectos u otros artrópodos reaccionan de manera diferente ante un mismo repelente. La eficacia del repelente depende básicamente de su concentración y de la frecuencia y uniformidad de la aplicación (Mancera, 2018).

2.2.6. Tipos de repelentes

2.2.6.1. Repelentes sintéticos convencionales:

- **DEET (N, N-dietil-3-metilbenzamida):** Se trata del repelente más estudiado y utilizado por parte de la población mundial. Es eficaz para la mayoría de especies de insectos y arácnidos. Las concentraciones utilizadas van desde el 5% hasta el 40%, pero se han estudiado también concentraciones superiores al 90%, la toxicidad podría ser uno de los factores limitantes de su uso (CedimCat, 2017).
- **ICARIDIN:** Este principio activo piperidínico es uno de los más conocidos y utilizados en nuestro medio en concentraciones que oscilan entre el 10 y el 20%. Es un derivado de la pimienta y tiene un espectro que cubre las garrapatas, los mosquitos y las moscas. Es un repelente con unas características organolépticas agradables y no daña los plásticos ni los tejidos (CedimCat, 2017).
- **IR3535 (etil-butil-acetil-aminopropionato):** Es un compuesto sintético que deriva de la β -alanina, un aminoácido natural, este compuesto es efectivo contra artrópodos que no son repelidos por la Deet, como las garrapatas y el piojo de la cabeza, y además protege contra picaduras de abejas y avispas. La efectividad del IR3535 resultó ser entre 10 y 20% menor que la de la Deet (Gancedo, 2017).

Componentes de repelentes sintéticos

Tabla 5

Componentes de Repelentes Sintéticos

Producto	Ingrediente
----------	-------------

OFF: Extra duración. SC Johnson a Family Company, S.A. de C.V.	Deet 25%, agua, alcohol, estearílico, fragancia, metil, parabeno, surfactante no ionico, TEA, polímero, acrílico, polioxietilen, estearil eter.
Autan Active, SC, Johnson and Son, S.A.	I pperidinecarboxilico acido, 2-(2-hidroxietyl)-ester-I, metilpropil-ester "KBR" 16%, alcohol desnaturalizado, propelente a base de hidrocarburos, perfume.
Las Dos Caras Repelente, Proquímica Laboratorios S.A.	Deet, fragancia, glicerina, conservador agua.
Selva Maya, Selva maya repelentes.	Citronella, árbol Neem, sábila, coco, matranto, eucalipto, agua.
Bugbracelet Mystical	15% de aceite de geraniol, 5% aceite de limoncillo, 2% aceite de citronela, 78% polietileno

Fuente: (Carmona, 2016)

Afectaciones de los repelentes sintéticos

Investigaciones detalladas publicadas en la revista BioMed Central Biology alerta sobre la posibilidad de que la Deet sea tóxica para el sistema nervioso central. La revisión analizó una variedad de estudios sobre la seguridad del uso de Deet, incluida la investigación con animales, informes de casos y otras evaluaciones de seguridad, y llegó a la conclusión que no había evidencia suficiente de riesgos en humanos (Biology, 2014).

Sin embargo en un estudio llamado "Evidencia de la inhibición de colinesterasas en los sistemas nerviosos de insectos y mamíferos por el repelente de insectos Deet" publicado en dicha revista se encontró mediante el uso de técnicas toxicológicas, bioquímicas y electrofisiológicas, mostraron que el Deet no es simplemente una sustancia química que modifica el comportamiento, sino que también inhibe la actividad de la colinesterasa, tanto en preparaciones neuronales de insectos como de mamíferos (Central, 2009).

Se encuentran los síntomas de usar aerosoles que contienen DEET en diferentes partes del cuerpo: (Central, 2009).

Ojos, oídos, nariz y garganta:

- Sensación de ardor temporal y enrojecimiento. Lavar la zona generalmente hará que los síntomas desaparezcan. Las quemaduras en los ojos pueden requerir medicamentos (Central, 2009).

Corazón y la sangre

- Bajo presión sanguínea
 - Ruido cardíaco muy lento
- Fuente: (Central, 2009).

Sistema nervioso

- Torpeza al caminar
 - Coma (falta de capacidad de respuesta).
 - Desorientación
 - Insomnio y cambios en el estado de ánimo
 - Muerte
 - Convulsiones
- Fuente: (Central, 2009).

Piel

- Ronchas o una irritación o enrojecimiento leves. Estos síntomas generalmente son leves y desaparecen cuando el producto es eliminado de la piel (Central, 2009).
- Las reacciones cutáneas más graves incluyen ampollas, quemaduras y cicatrices permanentes en la piel. Estos síntomas se pueden presentar cuando alguien usa productos que contienen altas cantidades de Deet durante un largo período de tiempo. El personal militar o los guardabosques pueden usar este tipo de productos (Central, 2009).

Estómago e intestinos

- Irritación estomacal de moderada a intensa

- Náuseas y vómitos

Fuente: (Central, 2009).

2.2.6.2. Repelentes de origen natural

Los repelentes botánicos son sustancias naturales que se extraen de plantas; las plantas generan sustancias para defenderse de los ataques de los insectos siendo esta la razón por la cual los mosquitos no atacan a las plantas sino a los animales de sangre caliente, estas mismas sustancias tienen muchas veces acción contra ellos y otros insectos picadores por tener una estructura orgánica similar a aquellos insectos que atacan a las plantas. Estos principios activos generalmente se encuentran en los aceites esenciales de las plantas y pertenecen a la familia de los terpenos (CedimCat, 2017).

2.2.7. Ventajas de los repelentes naturales

- Al ser aplicados en la piel no causan reacciones alérgicas.
- Aquellos que son esparcidos por el hogar no dañan las vías respiratorias.
- Se pueden utilizar con niños y mascotas presentes.
- Brindan aromas agradables en toda la casa.
- Mantienen lejos a toda clase de insecto.
- Su uso frecuente genera mejores resultados.
- Evitan la inmunidad de los insectos
- Respetan el medio ambiente.
- Posibilidad de fabricación casera

Fuente: (FITOMOLINA, 2020)

2.2.8. Diferencia entre repelente natural y sintético

Tabla 6

Diferencia entre Repelente Natural y Sintético

Repelente Natural	Repelente Sintético
Duración Máxima 2 horas	Duración Máxima 8 horas
utiliza concentraciones bajas	Utiliza concentraciones altas

Bajo Costo	Alto Costo
Durabilidad media	Alta durabilidad.
Baja toxicidad	Se han presentado casos de intoxicación
No presenta efectos adversos para el medio ambiente	Afecta el medio ambiente
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.

Fuente: (FITOMOLINA, 2020)

2.2.9. Generalidades de los insectos voladores

Existen millones de insectos en el planeta. Constituyen el grupo más numeroso de seres vivos y poseen características muy variadas, aunque comparten algunas peculiaridades, como el hecho de ser animales con exoesqueleto (Coello, 2019).

Se han estudiado más de 750.000 especies de insectos, y son incalculables las que todavía falta conocer. De modo que hay entre ellos una fabulosa variedad. Sin embargo, existen características comunes que los definen (Coello, 2019).

- **Seis patas:** los insectos pertenecen al grupo de los hexápodos (Coello, 2019).
- **Tres partes:** el cuerpo de los insectos adultos está conformado por tres partes principales: la cabeza, el tórax y el abdomen. El tamaño relativo de estas partes entre sí es muy variable (Coello, 2019).
- **Con alas:** muchos insectos han perdido la capacidad de volar, pero no las alas. Pueden tener un solo par o dos desarrollados. Las alas pueden tener escamas o estar transformadas en un par de duros élitros más un par de alas membranosas. (Coello, 2019).

- **Antenas:** la presencia de antenas es característica de los insectos. Les sirven como órganos del gusto, del olfato y del tacto, además de permitirles orientarse y conservar el equilibrio. (Coello, 2019).
- **Pequeño tamaño:** Miden pocos centímetros, o menos de un centímetro (Coello, 2019).

2.2.9.1. El sentido del olfato en los insectos voladores

A pesar de que no poseen una nariz para captar los olores, los insectos voladores utilizan las antenas localizadas en la cabeza para percibir y 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 (Daza & Flores, 2006).

Las antenas pueden variar enormemente en forma y tamaño entre grupos de insectos, generalmente dado por modificaciones del flagelo. Los tipos de antenas más comunes para los insectos voladores son (Daza & Flores, 2006).

- **Plumosa:** tipo de antena larga y delgada, los segmentos tienen pelo. Lo poseen los mosquitos machos (Daza & Flores, 2006).
- **Birramosa:** antena con pelos cortos y escasos. Lo poseen los mosquitos hembras (Daza & Flores, 2006).

Los mosquitos y otros insectos voladores que se alimentan de sangre 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 este no pueda aterrizar y picar exitosamente al hospedador (Daza & Flores, 2006).

2.2.10. Generalidades del *Aedes aegypti*

El mosquito *Aedes aegypti* es el principal vector de los virus que causan el dengue. Los seres humanos se infectan por picaduras de hembras infectadas, que a su vez se infectan principalmente al succionar la sangre de personas infectadas. Es una especie antropofílica; tiene hábitos domiciliarios y peri domiciliarios, es de

origen africano, donde existen formas selváticas y domésticas; en América es un mosquito doméstico que se caracteriza por reproducirse en aguas estancadas en recipientes artificiales del domicilio o sus alrededores (OMS, 2017).

2.2.10.1. Taxonomía

- **Reino:** Animalia
- **Filo:** Arthropoda
- **Clase:** Insecta
- **Orden:** Diptera
- **Familia:** Culicidae
- **Género:** Aedes
- **Especie:** *A. aegypti*

Fuente: (Hernandez, 2010)

2.2.10.2. Descripción morfológica

Es un mosquito de coloración oscura, con franjas plateadas-blancas, el tórax presenta una estructura en forma de lira y las patas son anilladas. Miden aproximadamente 5 mm de largo, el macho es de menor tamaño que las hembras y estas tienen el pico largo de tipo picador-chupador. Los huevos son de coloración oscura y tienen forma alargada (Almiron, 2015).

2.2.10.3. Reproducción

Los mosquitos pasan por 4 etapas de ciclo de vida: huevo, larva, pupa y adulto para poder llegar a reproducirse, estos buscan los elementos necesarios tales como alimentación, clima y hábitat para que las próximas generaciones sobrevivan (Almiron, 2015).

2.2.10.4. Ciclo biológico

Después que la hembra ha puesto sus huevos estos sufren un sin número de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y de comportamiento que se pueden diferenciar en cuatro fases de vida las cuales duran alrededor de 10 días (Almiron, 2015).

- **Huevo:** Está encerrado en una cubierta de tres capas con un pasaje con aspecto de embudo que facilita la entrada de los espermatozoides para ser fecundados dentro de la hembra (Almiron, 2015).
- **Larva:** son cuatro estadios larvales en los cuales va aumentando su tamaño hasta formar al mosquito adulto, de manera general las larvas son alargadas, cilíndricas, compuestas por cabeza, tórax y abdomen, estas nadan desordenadamente alcanzando la superficie para respirar, ya que se desarrollan en medio acuáticos (Almiron, 2015).
- **Pupa:** Es cuando se excreta una sustancia dura que pasa a recubrir el cuerpo esta permite el desarrollo de alas, tres patas y ovarios en caso de las hembras, aquí se asemeja a un signo de puntuación coma y presenta movilidad en respuesta a estímulos como la luz y las vibraciones (Almiron, 2015).
- **Adulto:** Es el fin del desarrollo acuático, ya que el mosquito adulto emerge de la pupa en donde sucedieron los cambios fisiológicos antes mencionados, después de su salida reposa sobre la película de agua en el que se crío y al transcurrir 24 horas está listo para volar, copular y alimentarse (Almiron, 2015).

2.2.10.5. Enfermedades transmitidas por el mosquito *Aedes aegypti*

- **Dengue:** El virus del Dengue pertenece a la Familia *Flaviviridae*, se conforma por cuatro tipos serológicos: DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4. Es transmitido por la picadura de las hembras de la especie de mosquitos *Aedes Aegypti*. Sus síntomas aparecen de 3 a 14 días (en promedio 7 días) después de la picadura infectiva (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2019).

Cuando una persona se recupera de la infección adquiere inmunidad de por vida contra el serotipo del cual estuvo infectada. Sin embargo, la inmunidad cruzada a los otros serotipos es parcial y temporal. Esto significa que las infecciones posteriores y causadas por otros serotipos pueden aumentar el riesgo de padecer dengue grave (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2019).

- **Chikungunya:** Es un virus transmitido al ser humano por mosquitos. Generalmente los mosquitos implicados son *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, dos especies que también pueden transmitir otros virus como el dengue y el Zika. La enfermedad suele aparecer entre 4 y 8 días después de la picadura de un mosquito infectado, aunque el intervalo puede oscilar entre 2 y 12 días, y pueden ser de tipo agudo, subagudo o crónicos (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2019).
- **Zika:** El virus del Zika es un flavivirus transmitido por mosquitos, el cual se identificó por primera vez en algunas especies de macacos que eran estudiados a través de una red de monitoreo de la fiebre amarilla (Uganda, 1947). Posteriormente, en 1952, se identificó en el ser humano en Uganda y la República Unida de Tanzania. Se han registrado brotes de enfermedad por este virus en África, las Américas, Asia y el Pacífico. (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2019).

Se transmite a las personas principalmente a través de la picadura de mosquitos del género *Aedes*, sobre todo la especie *Aedes aegypti* en las regiones tropicales. (WORLD MOSQUITO PROGRAM, 2019).

2.2.11. Tecnología de extracción de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden obtener por diversos métodos, los cuales varían de acuerdo con la naturaleza de la esencia y donde está contenido en el material vegetal (Oviedo & Orochena, 2011).

2.2.11.1. Extracción por arrastre de vapor

La destilación es la operación de separar, mediante evaporización y condensación, los diferentes componentes líquidos, sólidos disueltos en líquidos o gases licuados de una mezcla, aprovechando los diferentes puntos de ebullición (temperaturas de ebullición) de cada una de las sustancias, ya que el punto de ebullición es una propiedad intensiva de cada sustancia, es decir, no varía en función de la masa o el volumen, aunque sí en función de la presión (Oviedo & Orochena, 2011).

2.2.11.2. Extracción con solvente

Se basa en la facilidad de los disolventes orgánicos para penetrar en el material vegetal y disolver sus aceites volátiles, debido a las diferencias de punto de ebullición entre el aceite esencial y el solvente. Tiene la ventaja de trabajar a temperaturas bajas, por lo que no provoca la termodestrucción ni alteración química de los componentes del aceite. Además, ofrece la posibilidad de separar componentes individuales y/o presentes en poca cantidad (SENA, 2017).

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como éter de petróleo, pentano, éter etílico, alcohol, cloroformo. Estos solventes solubilizan la esencia y extraen otras sustancias tales como ácidos grasos, ceras y pigmentos, que se pueden separar por destilación controlada (SENA, 2017).

2.2.11.3. Extracción con Dióxido de Carbono

Se trata de un método reciente, que utiliza temperaturas relativamente más bajas a las de la destilación, lo que lo hace menos agresivo para las plantas. Consiste en colocar las plantas en un tanque de acero inoxidable, al que posteriormente se le introduce dióxido de carbono para aumentar la presión. Cuando el dióxido de carbono se somete a altas presiones, se liquifica, actuando como un solvente que permite extraer los aceites esenciales de las plantas. Después, la presión disminuye y el dióxido de carbono vuelve al estado gaseoso sin dejar cualquier tipo de señal (SENA, 2017).

2.2.12. Preformulación

Desarrollo de las investigaciones destinadas a determinar la compatibilidad de las sustancias que componen una forma farmacéutica. Este trabajo es clave para la obtención de un producto final que esté en condiciones de cumplir con sus objetivos específicos (Porto & Gardey, 2019).

Cabe recordar que la forma farmacéutica o forma galénica se establece a partir de una combinación precisa de sustancias para permitir que administrar un medicamento sea más sencillo. Esta forma hace que los principios activos y los excipientes del fármaco se adapten a una cierta disposición (Porto & Gardey, 2019).

2.2.12.1. Spray

Sistemas presurizados dentro de un recipiente de aluminio, plástico, hojalata o vidrio provisto de una válvula para la liberación del medicamento reducido a gotas muy finas, el mecanismo de expulsión puede ser activado manualmente o mediante un gas (Jato, 2008).

Estos contienen un agente activo y uno o más excipientes, como el vehículo para transportar el agente activo. La exigencia de las preparaciones de aplicación tópica es que posea buena adherencia lo que hace que permanezcan sobre la superficie de aplicación por un tiempo razonable hasta que se eliminan por lavado o su efecto desaparezca (Jato, 2008).

2.2.12.2. Excipientes

Los excipientes son cualquier componente aditiva e inactivas diferentes del principio activo, presente en un medicamento o utilizado en su fabricación. Los cuales cumplen con funciones específicas como soporte (vehículo o base) o como componente del soporte del principio o los principios activos, contribuyendo así a propiedades tales como la estabilidad, el perfil biofarmacéutico, el aspecto y la aceptación por parte del paciente, y para facilitar su fabricación (Porto & Gardey, 2019).

2.2.12.3. Componentes de un spray

Tabla 7

Componentes de un spray

Componentes	Función	Valores permitidos en las concentraciones en uso tópico %
Glicerina	Vehículo, humectante no grasoso	≤30%
Extracto de Neem	Repelente	-
Extracto de eucalipto	Repelente	-

Extracto de romero	Repelente	-
Metilparabeno	Conservante	0,02 – 0,3%
Propilparabeno	Conservante	0,01 – 0,6%
Alcohol isopropílico al 78%	Solvente, vehículo	60 – 90%

Fuente: (Daza & Flores, 2006)

2.2.12.4. Controles según el reglamento técnico centroamericano 11.03.56:09

- **Características organolépticas:** Se debe proveer una descripción cualitativa del medicamento. Los criterios de aceptación deben incluir el aspecto final aceptable de la forma farmacéutica terminada y del envase. En esta etapa es importante detectar si existe alguna alteración en las características físicas como olor, sabor, color y forma, etc que puedan constituir signos de estabilidad y alteración de la calidad del producto (RTCA, 2015).
- **pH:** Cuando corresponda, el pH de los medicamentos de aplicación tópica deberá analizarse. Algunos medicamentos de aplicación tópica contienen cantidades muy limitadas de agua o fase acuosa, por lo que no siempre se requiere la medición de su pH. Esta prueba por lo general depende de la Formulación. Por lo tanto, no se incluye en la monografía oficial del medicamento, pero forma parte de la especificación del fabricante para el medicamento (RTCA, 2015).
- **Peso de llenado neto:** La prueba de llenado mínimo asegura que la cantidad de material llenado en el producto cumple con la cantidad declarada. Consiste en minimizar el impacto del aire atrapado en los productos donde el contenido declarado se expresa en volumen, la determinación del llenado se lleva a cabo usando el peso a partir del cual se calcula el volumen usando la densidad de la preparación (RTCA, 2015).
- **Etiquetado del producto:** Es la información obligatoria incluida en la etiqueta, rótulo, imagen u otra materia descriptiva o gráfica que se haya

escrito, impreso, estarcido, marcado en relieve, que se adhiere o incluye en el envase de un producto cosmético. Debe de contener lo siguiente: Forma cosmética, nombre, cantidad neta declarada, declaración de la lista de ingredientes, declaración del lote, información de seguridad (RTCA, 2015).

2.2.13. Estudios clínicos

Un estudio clínico es una investigación médica en la que se prueban tratamientos, equipos o medicamentos en personas. Los estudios clínicos se conducen bajo el cuidado de personal médico y sirven para determinar si estos tratamientos, equipos o medicamentos son eficaces y seguros para curar, prevenir o controlar ciertas enfermedades. Los estudios clínicos también se llaman ensayos clínicos o investigaciones clínicas, y en inglés se llaman “clinical trials” (Tijerino, 2010).

Los estudios clínicos son el paso final de un largo proceso que empieza con investigación en un laboratorio. Antes de que cualquier tratamiento nuevo se use en personas en estudios clínicos, los investigadores trabajan por muchos años para entender sus efectos en las células cancerosas en el laboratorio y en animales. Ellos tratan también de determinar los efectos secundarios que puedan causar (Tijerino, 2010).

Antes de llegar a las investigaciones con humanos en ensayo clínico hay que pasar por fases previas que garanticen la seguridad de lo que va a analizarse en el ensayo con personas. Por ello, de manera previa se hacen ensayos in vitro (en laboratorio, sobre células, tejidos u órganos) e in vivo sobre animales no humanos. Si se demuestra seguridad y la técnica o el medicamento que se prueba muestra eficacia, llega el turno de probarla en personas (Tijerino, 2010).

Una manera de dividir los estudios clínicos es calificándolos de experimentales u observacionales. En los primeros se controla y modifica el factor de estudio, es decir, se seleccionan los pacientes y se elige qué intervención se va a hacer. En los segundos no hay control ni influencia sobre el objeto de estudio y la investigación se limita a observar, medir y analizar (Tijerino, 2010).

Los ensayos experimentales incluyen los ensayos clínicos aleatorizados, que se consideran los más completos y que pueden aportar una mejor evidencia para evaluar la eficacia de una intervención; y los ensayos comunitarios. Los ensayos observacionales incluyen diferentes tipos: estudios de cohortes, casos controles, transversales, ecológicos y estudios de caso o series de caso (Tijerino, 2010).

2.3 Hipótesis

Las hipótesis se plantean conforme a las variables en estudio:

HIPÓTESIS PARA ACTIVIDAD REPELENTE

H₀= No hay diferencias estadísticamente significativas para la actividad repelente entre el extracto puro y pre formulación contra el vector *Aedes aegypti*.

H_a = Hay diferencias estadísticamente significativas para la actividad repelente entre el extracto puro y pre formulación contra el vector *Aedes aegypti*.

HIPÓTESIS PARA TIEMPO DE ACCIÓN REPELENTE

H₀= No hay diferencias estadísticamente significativas para el tiempo de acción repelente entre el extracto puro y pre formulación contra el vector *Aedes aegypti*.

H_a= Hay diferencias estadísticamente significativas para el tiempo de acción repelente entre el extracto puro y pre formulación contra el vector *Aedes aegypti*.

CAPITULO III

DISEÑO METOLOGICO



3.1. Descripción del ámbito de estudio

El ámbito de estudio en el cual se desarrolló esta investigación está conformado por dos escenarios:

- **Área geográfica del sitio de recolección de las muestras**

Las muestras de las hojas de *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) para la realización de la investigación fueron obtenidas de la finca el “Cortijo” del laboratorio Isnaya, ubicada a orillas de la carretera panamericana al norte de la ciudad de Estelí en el km 158.

Las muestras de mosquitos *Aedes aegypti* en estado larval utilizadas en el proceso de los ensayos clínicos se recolectaron en el “Cementerio Nuevo” de Nagarote, ubicado de la alcaldía municipal 1 cuadra al sur, 2 cuerdas al oeste.

- **Áreas experimentales para los diferentes ensayos:**

Este ámbito comprende dos áreas:

Área para la obtención de extractos y ensayos clínicos de repelencia:

Laboratorio 107 del Departamento de Química UNAN-Managua Pabellón 1.

Área para el proceso de pre formulación: Laboratorio de Tecnología

Farmacéutica Departamento de Química Farmacéutica.

3.2. Tipo de estudio

La presente investigación monográfica es de tipo experimental, a su vez es un estudio descriptivo porque se definen las etapas del proceso con un orden consecutivo (Piura, 2008). Tomando en cuenta el método utilizado se considera hipotético deductivo porque se emite una hipótesis la cual se desea comprobar a través del desarrollo experimental, por medio y de acuerdo al tiempo de ocurrencia de los hechos el estudio es prospectivo ya que los datos recopilados surgen conforme la realización de cada ensayo, de igual manera es longitudinal según su periodo y secuencia y por último es analítico ya que los datos deben ser procesados y analizados para emitir una conclusión. (Pineda. et al. 1994).

3.3. Población y Muestra

3.3.1. Población

- **Población para la obtención de los extractos**

La población utilizada para este proceso es correspondiente a las especies vegetales *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) procedentes de la finca el “Cortijo” del laboratorio Isnaya, ubicada a orillas de la carretera panamericana al norte de la ciudad de Estelí en el km 158 que se encuentran bajo condiciones naturales favorables para su desarrollo, y sin presencia de ningún tipo de plaga.

- **Población para la prueba clínica de repelencia**

Se considera como población todos los mosquitos *Aedes aegypti* capturados en estado larval en el “Cementerio Nuevo”, ubicado en el municipio de Nagarote.

3.3.2. Muestra

- **Muestra para la obtención de los extractos**

Las muestras utilizadas a partir de la población especificada anteriormente son: hojas obtenidas de las ramas de *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).

- **Muestra para ensayo clínico**

La muestra correspondió a 400 mosquitos hembras *Aedes aegypti* para la realización de 10 ensayos totales.

3.3.2.1. Criterios de Inclusión

Criterios de inclusión para la obtención de los extractos

- Hojas todas en estado joven
- Hojas sin picaduras de insectos
- Hojas sin presencia de daño foliar por hongos
- Hojas firmes y verdes

Criterios de inclusión para ensayos clínicos

- Mosquitos hembras *Aedes aegypti* en estado adulto.
- Mosquitos hembras *Aedes aegypti* sin alimentarse tres días.

3.3.2.2. Criterios de exclusión

Criterios de exclusión para la obtención de los extractos

- Hojas con manchas.
- Hojas amarillas
- Hojas con deformaciones

Criterios de exclusión para ensayos clínicos

- Mosquitos *Aedes aegypti* machos.
- Mosquitos que no pertenecen a la especie *Aedes aegypti*

3.4. Variables

3.4.1. Variables independientes

- Estado de los extractos de las plantas en estudio
- Pre formulación el repelente orgánico
- Iluminancia
- Temperatura ambiente controlada

3.4.2. Variables dependientes

- Actividad repelente
- Tiempo de acción repelente

3.5. Operacionalización de las variables

Tabla 8

Operacionalización de Variables

Variables	Definición Operacional	Indicadores	Valores
Variables independientes			
Estado de los extractos de las plantas en estudio	Sustancia en forma concentrada o sometida a un proceso de desarrollo, de consistencia líquida extraída a partir de las plantas <i>E. camandulensis</i> D. (<i>Eucalipto</i>), <i>A. indica</i> A. (<i>Neem</i>) y <i>R. officinalis</i> L. (<i>Romero</i>) mediante la técnica de extracción directa, con propiedades para ejercer la actividad terapéutica conocida.	Estado de los extractos	Extracto puro Preformulado
Pre formulación	Desarrollo de las investigaciones destinadas a determinar la compatibilidad de las sustancias que componen una forma farmacéutica, sus propiedades físico-químico y farmacológico de un principio activo solo o combinado, con excipientes.	Humectante Principio activo Principio activo Principio activo Disolvente Conservante Conservante	0,5-30mg/mL 0,5-0,7 mg/mL 1-3 mg/mL 1-3 mg/mL 60-90mg/mL 0,02-0,3 mg/mL 0,01-0,6 mg/mL
Iluminancia	Flujo luminoso que se proyecta es una superficie	Lux	30 - 603
Temperatura ambiente controlada	Temperatura mantenida termostáticamente ente 15 y 30 °C en un área trabajo	grados Celsius (°C)	25-30 °C
Variables dependientes			
Actividad Repelente	Es la acción de evitar que un insecto en pleno vuelo se pose sobre una persona, animal o planta.	$\%PR = \left[\frac{(N_c - N_r)}{(N_c + N_r)} \right] \times 100\%$	0 - 100 %
Tiempo de acción repelente	Duración de la actividad repelente para la pre formulación.	Tiempo de repelencia observado	0 - 60 min

Fuente: Propia

%PR: Porcentaje de Repelencia

NC: N° de mosquitos que se posan en el blanco.

NT: N° de mosquito que se posan en la muestra.

3.6. Materiales y Métodos

3.6.1. Materiales para recolectar la información

Se utilizaron diferentes fuentes de información para recopilar los datos necesarios que nos permitieron alcanzar los objetivos de esta investigación, que provienen de fuentes como:

- **Fuentes primarias:** Libros, artículos científicos, monografías, tesis, sitios web de medicina.
- **Fuentes secundarias:** Fichas de recolección de datos manual y computarizado de los procesos experimentales desarrollados.

3.6.2. Materiales para procesar la información

Se utilizaron herramientas informáticas que permitieron el análisis y procesamiento de la información.

- Microsoft Office Word 2016
- Microsoft Office Excel 2016
- PowerPoint
- Photoscape
- Minitab® 18

3.6.3. Métodos

3.6.3.1. Métodos para la obtención de los extractos de *Eucalyptus camandulensis* D. *Azadirachta indica* A. y *Rosmarinus officinalis* L.

- **Tipo de método**

Método con solvente (Sólido-líquido)

- **Técnicas empleadas para la extracción**

Extracción por destilación directa para la obtención de extractos de *Eucalyptus camandulensis* D. *Azadirachta indica* A. y *Rosmarinus officinalis* L.

- **Preparación para la muestra para *Eucalyptus camandulensis* D. *Azadirachta indica* A. y *Rosmarinus officinalis* L.**

Como parte de este proceso se verificó el buen estado de las muestras tomando como principal aspecto su estado físico botánico. Se seleccionaron las

hojas de forma independiente para cada muestra, seguido se sometieron a lavado con agua destilada, se dejó secar naturalmente. Posteriormente las muestras por separado se trituraron con mortero para disminuir su tamaño y así garantizar un mayor contacto entre muestra y solvente. Por último, se pesaron las muestras individualmente.

- **Obtención de los extractos *Eucalyptus camandulensis* D. *Azadirachta indica* A. y *Rosmarinus officinalis* L.**

Para la realización de esta etapa de proceso, se utilizaron 30 g de muestra total, para cada planta previamente tratadas. Se le agregaron 300 mililitros de solvente alcohol isopropílico (mezcla hidroalcohólica 22% agua - 78% alcohol). Realizándose una única extracción para cada muestra.

Se realizó el montaje del equipo de destilación directa con una estructura continua, se colocó la muestra en los balones de destilación y se procede a la destilación utilizando una placa calefactora la cual se programó a 50 °C y luego se aumentó a 75°C la temperatura para evitar ebullición de un solo. Se dio por iniciado el proceso de extracción cuando el solvente llegó a su punto de ebullición y se obtuvo la primera gota de destilado. Se da la suspensión del proceso de extracción con un volumen de extracto de 130 mL.

3.6.3.2. Proceso de pre formulación de repelente

Para la fabricación de un repelente orgánico en spray se elaboraron cuatro presentaciones de las cuáles una en fitofármaco con la combinación de los tres extractos puros en determinadas concentraciones llevadas al 100% y tres pre formulaciones aplicando procesos de tecnología farmacéutica integrada en concentraciones diferentes y la adición de excipientes con las concentraciones permitidas (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009).

Al fitofármaco se le aplicó los controles descritos Reglamento Técnico Centroamericano 11.03.56:09 producto farmacéutico para productos naturales para uso humano (RTCA, 2015) y Reglamento Técnico Centroamericano 71.03.49:08 para productos cosméticos (RTCA., 2008) a las tres pre formulaciones, como son:

color, olor, aspecto, pH, de las cuales determinaron la calidad del producto para la aceptación de estos. Su proceso de elaboración fue el siguiente:

Se pesaron y midieron cada uno de los componentes por separado para cada producto, en una balanza analítica se pesó en un vidrio reloj el metilparabeno y propilparabeno, se utilizaron probetas de 100 mL tanto para la medición de la glicerina como de los extractos.

Cada extracto fue medido en probetas y añadidos en beaker de 600 mL para cada pre formulación, los cuales se dividieron en dos partes iguales para diluir la glicerina y parabenos por separado, posterior se procedió a calentar las mezclas glicerina-extractos y extractos-parabenos en baño maría a una temperatura de 50 °C para lograr una consistencia homogénea.

Luego del calentamiento en baño maría se procedió agregar la mezcla extractos-parabenos a la mezcla extractos-glicerina y se agitaron hasta obtener una mezcla homogénea. Se procedió hacer los controles pertinentes y envasar el producto final.

De igual modo se realizó la etiqueta del producto según lo descrito en el Reglamento Técnico Centroamericano para productos farmacéuticos requisitos de etiquetado 11.04.41:06 (RTCA., 2011)

3.6.3.3. Ensayo clínico.

Se realizó la evaluación de los productos a nivel de laboratorio siguiendo la metodología descrita por la Organización Mundial de la Salud "Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin" (WHO, 2009) para probar la capacidad de repelencia de cada una de las pre formulaciones y extracto puro.

Para la realización de la prueba primero se llevó a cabo el protocolo para la crianza del zancudo *Aedes aegypti* para bioensayos y control biológico aplicado (Emfermedades, 2017) donde se detalla el proceso de crianza a nivel de laboratorio, se procedió la captura de las larvas *Aedes aegypti* en el "cementerio Nuevo" ubicado en Nagarote, se colocaron 20 larvas por cada recipiente, se aseguraron con tela de tul, se alimentó cada colonia de larvas con pienso para conejo.

Luego llevadas al laboratorio 107 del departamento de química con el fin de criarlas bajo condiciones climáticas y alimentarias controladas que permitieron monitorear su desarrollo hasta la realización del ensayo clínico. Se utilizó la aplicación Luxómetro para medir la iluminancia del área tanto con la luz apagada como encendida para establecer los valores mínimos y máximos para los ensayos.

Las larvas ya en estadio de pupas se colocaron en un recipiente dentro de jaulas elaboradas de metal 35.5 cm³ forradas con tela de tul hasta su eclosión como zancudo, una vez obtenidos los mosquitos en etapa adulta, los machos como las hembras criadas en una misma jaula se dejaron en inanición durante 3 días antes de cada ensayo, pasado ese tiempo con un succionador plástico se capturó los zancudos y se separaron los machos de las hembras para iniciar el estudio ya que los zancudos hembras son las únicas que se alimentan de sangre.

Se colocaron 10 zancudos hembras en la jaula y se dejaron reposar por 5 minutos para que se habituarán, la persona introdujo la mano control, es decir sin repelente, se contabilizaron cuantos zancudos se acercaron al área del antebrazo. Luego a la otra mano se le aplicó el repelente, se dejó secar por unos segundos y se introdujo a la caja y se procedió a contabilizar cuantos zancudos se posaron en el área que contenía el repelente, el tiempo de repelencia finalizó cuando el primer zancudo se posó en esa área.

Se realizaron 10 ensayos en total, en los cuales se utilizaron 1 persona por cada ensayo, un brazo utilizado para la prueba con el repelente y el otro como blanco; En cada ensayo los mosquitos fueron reemplazados ya que, con la aplicación del repelente, estos pueden causar estrés en los mosquitos alterando su comportamiento, utilizándose 20 mosquitos hembras para cada ensayo.

Se implementó la construcción de un diseño factorial 2³ (Figura 1) utilizado en experimentos donde intervienen varios factores como temperatura y luz los cuales pueden influir en la respuesta de los mosquitos ante los productos en estudio (Ferré, 2015). Se manipularon las variables más significativas y sus interacciones mediante el diseño experimental para analizar el efecto en conjunto de estos sobre una

respuesta tabla 9. Se definieron dos niveles uno alto y otro bajo para cada variable operacional como descrito en el trabajo investigativo (Aleman. et al. 2016)

Ilustración 1

Diagrama del Diseño de Experimentos



Tabla 9

Matriz del Diseño Experimental (diseño factorial 2³)

Nº de ensayos	Variables Operacionales		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	-
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	-	-	+
10	+	-	+

Fuente: (Bao, 2010)

Dónde:
Nivel alto (+)
Nivel bajo (-)

Tabla 10

Diseño de experimento para medir actividad y tiempo de repelencia

Matriz de diseño experimental 2³				
Factores	Variables operacionales	Unidad de medida	Niveles	
			Alto (+)	Bajo (-)
A	Estado del extracto	-	Preformulado	Fitofármaco
B	Temperatura ambiente controlada	Grado Celsius (°C)	30 (°C)	25 (°C)
C	Iluminancia	Lux	603	30

Fuente: propia

Tabla 11

Materiales y equipos utilizados en el desarrollo de los métodos experimentales

Materiales y equipo	Cantidad
Preparación de la muestra	
Beaker 2 000 mL	3
Mortero y pilón	3
Pizetas 1000 mL	1
Papel toalla	1
Guantes de nitrilo	1
Balanza analítica	1
Obtención de los extractos: extracción directa con solvente	
Erlenmeyer 250 mL	6
Refrigerante para destilación directa	3
Balones para destilación directa 250 mL	3
Cabezas de destilación directa con sus termómetros	3
Placas calefactoras	3
Soportes universales	6
Pinzas de 3 dedos	6
Nuez para pinza	6
Espátulas	3
Mangueras para destilación directa	7
Vidrio reloj	3
Bomba de agua	1
Pre formulación	
Beaker 600 mL	3
Probeta 25 mL	1
Espátulas	3
Probetas 100 mL	3
Balanza analítica	1
Vidrio reloj	3
Beaker 100 mL	1
Equipo baño María	1



Ensayo preclínico

Jaulas de 35.5 Cm ³ forradas tela de tul	2
Cronometro con segundero	1
Papel toalla	1
Recipientes de plásticos	2
Tela de tul	-
pipeta	1

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS



Para analizar los datos obtenidos durante el desarrollo de los diferentes métodos utilizados en cada fase de trabajo, se detallan en los resultados los aspectos más importantes demostrando así la relación o diferencia con los resultados de los antecedentes ya descritos anteriormente. Esto permite evaluar de alguna manera la efectividad con la que se procedió en la realización de cada ensayo.

4.1. Resultados en la obtención de los extractos

Tabla 12

Fases del proceso de extracción

Extractos	Obtención de los extractos puros por destilación directa					
	MU	SU	EHO	SRdo	SR	%RE
<i>E. camandulensis</i> D.	30,08 g	300mL	133 mL	150 mL	17 mL	25,056%
<i>A. indica</i> A.	30,00 g	300mL	132,5 mL	150 mL	17,5 mL	24,609%
<i>R. officinalis</i> L.	30,06 g	300mL	133 mL	150 mL	17 mL	25,230%

Dónde: MU (Muestra utilizada), SU (Solvente utilizado), EHO (Extracto hidroalcohólico), SRdo (Solvente recuperado), SR (Solvente retenido) y %RE (Porcentaje de Rendimiento de extracto).

Fuente propia

Como resultado del empleo del método de extracción con solvente aplicando la técnica de extracción por destilación directa para la obtención de los extractos hidroalcohólicos en la tabla 12 se muestra que para el extracto de *E. camandulensis* D. donde se utilizó 30,083 g de hojas fresca se obtuvo 133 mL de extracto hidroalcohólico con un porcentaje de rendimiento del 25,056%, para *A. indica* A. se obtuvo 132,5 mL de extracto hidroalcohólico con un porcentaje de rendimiento del 24,609% donde se utilizó 30,006 g de muestra fresca y para el extracto *R. officinalis* L. se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 25,230% de extracto hidroalcohólico de 133 mL donde se utilizó 30,068 g de muestra fresca.

Se pudo observar que se obtuvo un porcentaje de rendimiento bastante bajo, un tercio en comparación a la cantidad de solvente utilizado, pero se debió a la

cantidad de solvente contra la pequeña cantidad de muestra fresca que se utilizó, todo esto debido a la adaptación del equipo que había disponible, sin embargo, para cada uno de los extractos se recuperó el total de 150 mL de alcohol isopropílico al 78%.

Posteriormente se le realizó sus controles respectivos donde se observó sus características organolépticas mediante la técnica de visualización y pH. Se almacenaron los extractos en Erlenmeyer envueltos con papel aluminio a temperatura ambiente.

Tabla 13

Características de los extractos

Extractos	Color	Olor	Aspecto	pH
<i>E. camandulensis</i> D.	Verde alga	Característico a la planta	Sin sedimento, liquido.	4,6
<i>A. indica</i> A.	Verde intenso	Característico a la planta	Sin sedimento, liquido.	5,8
<i>R. officinalis</i> L.	Verde intenso	Característico a la planta	Poco sedimento, liquido, poco sedimento	5,4

Fuente propia

En la tabla 13 se observa como resultado de los controles para los extractos hidroalcohólicos donde *E. camandulensis* D. presento un color verde alga y olor característico a la planta, sin sedimento y con un pH de 4,6, *A. indica* A. presento un color verde intenso, olor característico a la planta, sin sedimento y con un pH de 5,8 y *R. officinalis* L. con un pH de 5,4 color verde intenso con presencia de poco sedimento lo cual demuestra que el solvente penetro los poros de las hojas para un buen arrastre de metabolitos presentando partículas disuelta y el olor característico a las plantas, se pudo observar que cada uno de los extractos presento un pH en la escala acida.

Se puede concretar que fue un proceso bastante simple llevado a cabo en un tiempo corto, en donde se hizo la extracción y recuperación del solvente deseado

en un mismo proceso, además de ser rentable ya que requiere la utilización de equipos simples y disponibles en laboratorio.

4.2. Resultados de la elaboración del repelente

Tabla 14

Pre formulaciones del repelente para 100 mL

Componentes	Concentración permitida Handbook	pre formulación 1 (mínima)	pre formulación 2 (media)	pre formulación 3 (máxima)	Producto puro
Glicerina	≤30	5,0 g	17,5 g	30 g	-
Extracto de <i>A. indica</i> A.	-	40 mL	30 mL	22,5 mL	40 mL
Extracto de <i>E. camandulensis</i> D.	-	30 mL	27 mL	25 mL	30 mL
Extracto de <i>R. officinalis</i> L.	-	25 mL	25 mL	22 mL	30 mL
Metilparabeno	0,02 – 0,3	0,02 g	0,16 g	0,3 g	-
Propilparabeno	0,01 – 0,6	0,01 g	0,3 g	0,6 g	-
Total	100 mL	99.9 mL	100,4 mL	100 mL	100 mL

Fuente propia

Como resultado de la elaboración del repelente orgánico a base de extractos hidroalcohólicos de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L. en la tabla 14 demuestra que se realizó tres pre formulaciones donde cada una contenía concentraciones diferentes de excipientes, se utilizaron en concentraciones mínimas, medias y máximas como lo permitió el libro de excipientes (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009). Las concentraciones de los extractos en cada una de estas pre formulaciones se ajustaron para llevar al producto a 100 mL.

Para la realización del producto puro se hizo nada más la mezcla de cada uno de los extractos hidroalcohólicos de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L. con concentraciones diferentes hasta llevarlo a 100 mL, sin la adición de ningún excipiente para comparar la eficacia de este y si la adición de estos excipientes mantuvo o cambio los resultados de repelencia con un producto preformulado.

Tabla 15

Controles realizados a los productos

Productos	Color	Olor	Aspecto	pH
Pre formulación 1	Verde musgo	Característicos a los principios activos	Líquido, sin residuos, sensación fresca.	5,5
Pre formulación 2	Verde musgo	Característicos a los principios activos	Líquido, sin residuos, sensación fresca,	7,7
Pre formulación 3	Verde musgo	Característicos a los principios activos	Líquido, sin residuos, sensación grasosa.	8,5
Extractos puros	Verde musgo	Olor fuerte característicos a las plantas	Líquido, Poco residuo.	5,5

Fuente propia

Se realizaron los controles detallados en el reglamento técnico centroamericano 11.03.56:09 (RTCA, 2015) y 71.03.49:08 (RTCA., 2008) a cada uno de los productos, en base a los resultados de acuerdo a las características organolépticas, se obtuvo para las tres pre formulaciones un color verde musgo, olor característico a las plantas, cada una presentó un aspecto líquido y sin suspensión de partículas sin embargo, la pre formulación 3 presentó una sensación grasosa poco absorbible en la piel esto debido a la cantidad de glicerina, lo cual generó que el spray no tuviera una consistencia adecuada, al presentar ese aspecto el producto no cumple con las características organolépticas especificadas.

Por otro lado, el producto puro presento igual un color verde musgo, olor característico a la planta y aspecto líquido, pero con presencia de sedimento, esto debido al que el extracto hidroalcohólico al finalizar la extracción ya lo contenía.

Se determinó que la pre formulación 1, pre formulación 2 y el producto puro cumplían con las características organolépticas, ya que se obtuvo un aspecto líquido, olor y color aceptados, con una sensación fresca lo que permitió ser aplicada sobre la superficie de la piel y absorbida de la manera correcta.

Tabla 16

Resultado del pH realizado a los productos

Muestra	Rango de especificaciones del pH		Pre formulación	Pre formulación	Pre formulación	Producto puro
	Límite de pH superior	Límite de pH inferior	1	2	3	
1			5,5	7,7	8,5	5,5
2	6	4,5	5,5	7,7	8,5	5,5
3			5,6	7,7	8,5	5,5
Promedio			5,5	7,7	8,5	5,5

Fuente propia

La medición de pH se le hizo por triplicado a cada pre formulación en la tabla 16 se registró que el extracto puro tuvo un pH de 5,5 para la pre formulación 1, lo cual la coloca dentro de la escala acida, aun así, la pre formulación cumple con los criterios de aceptación para pre formulaciones de uso tópico.

En la pre formulación 2 se obtuvo un pH de 7,7 que lo coloca en la escala neutra, según los criterios de aceptación para pre formulaciones tópicas no cumple ya que el valor esta fuera del rango de aceptación.

El pH de la pre formulación 3 fue de 8,5 lo cual se coloca como básico dentro de la escala de alcalinidad, según los rangos de aceptación la pre formulación no cumple los criterios de aceptación para preparaciones tópicas.

El producto puro se obtuvo un pH de 5.5 característico de los extractos hidroalcohólicos de *A. indica A*, *E. camandulensis D.* y *R. officinalis L.* que lo coloca dentro de la escala ácida según los rangos, cumpliendo con los criterios de aceptación para productos de uso tópico.

Según (Dermocosmetica, 2015) la piel tiene un amplio rango de pH que oscila entre 4 y 7 y lo adecuado es utilizar producto con pH entre 4,5 a 6 en la superficie de la piel para no ocasionar ningún daño. Por lo que la pre formulación 1 y el producto puro fueron aceptadas, ya que presentaron un pH dentro de los rangos establecidos para productos tópico cumpliendo con las especificaciones establecidas.

Transcurrido dos meses a cada uno de los productos se les repitió los controles detallados en el reglamento técnico centroamericano 71.03.45:07 (RTCA, 2015) para verificar su estabilidad y así comprobar si conservaron sus propiedades físicas y químicas dentro de los límites especificados a lo largo de su tiempo de conservación obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 17

Resultados de la repetición de los ensayos

Productos	Color	Olor	Aspecto	pH
Pre formulación 1	Verde musgo	Característico a los principios activos	Líquido, sin residuos, sensación fresca.	5,3
Pre formulación 2	Café rojizo	Característicos a los principios activos	Líquido, sin residuos, sensación fresca.	6,9
Pre formulación 3	Café rojizo más oscuro	Característicos a los principios activos	Líquido, sin residuos, sensación grasosa.	7,7
Extractos puros	Café rojizo	Olor fuerte característicos a las plantas	Líquido, Poco residuo.	5,2

Fuente propia

Como resultado de los controles realizados nuevamente a cada producto en la tabla 17 se contempla que la pre formulación 1 mantuvo sus características físicas y químicas de acuerdo los rangos de aceptación (**RTCA, 2015**), la pre formulación 2 presentó cambios en sus características tanto como en su color y cambios en su pH, en cuanto a la pre formulación 3 presentó cambios significativos en sus características tanto como cambio de color como disminución de su pH, el producto final presentó cambio de color y un pequeño cambio de pH los cuales se encontró en los rangos de especificación aceptados para productos de uso tópico según (**RTCA, 2015**).

El cambio de color que sufrieron cada uno de los productos se debió según (**Barreto, 2006**) a que todos los productos naturales son fotosensibles y se descomponen con los rayos ultravioleta lo que produce una degradación o destrucción fotoquímica, lo que se traduce en la pérdida del color verde una vez que este pigmento ya no está, se observan sus colores rojizos o anaranjados de las plantas. Por lo que los frascos utilizados para el almacenamiento no fueron los adecuados ya que se colocaron en frasco de spray transparentes en lugar de frascos ámbar para evitar la degradación, pero no se encontró disponibilidad de estos en presentación en spray para facilitar la aplicación al momento de los ensayos.

Se determinó que la pre formulación 1 y el producto puro fueron los adecuados para comprobar su eficacia en los ensayos clínicos ya que cumplieron con las especificaciones establecidas para productos de uso tópico.

4.3. Resultados de los ensayos clínicos experimentales en mosquitos *Aedes aegypti*

La realización de los ensayos experimentales para comprobar la eficacia de los productos elaborados se realizaría en el área de Entomología ubicado en el Complejo Nacional de Salud Dra. Concepción Palacio el cual cuenta con el área especializada para la crianza del agente vector en estudio, sin embargo este estudio no se efectuó debido a factores ajenos de la investigadora, la solicitud se realizó en

apoyo de la tutora y de la dirección del departamento, siguiendo los protocolos correspondiente, pero nunca se recibió respuesta por parte de la institución.

Se crearon las condiciones medio ambientales en un área del laboratorio 107 donde se realizó la montada de los equipos para la crianza de los vectores de *Aedes aegypti* siguiendo con el protocolo (Emfermedades, 2017) y los ensayos clínicos. Las muestras de los zancudos fueron recolectadas en su fase larval donde se criaron hasta obtener su etapa adulta, estas muestras cultivadas en laboratorio representaron una fuente predecible de organismos de prueba de una edad conocida; El tener disponibilidad de forma inmediata de vectores aclimatados, saludables, que fueron criados bajo las mismas condiciones trajo grandes ventajas para la realización de los ensayos.

Se planeó su desarrollo con 15 días de anticipación garantizando que el ciclo de vida en la etapa final como mosquito adulto tenga entre 5 y 7 días. Después obtenida la colonia de zancudos *Aedes aegypti* se procedió a la prueba para comprobar la actividad repelente de los productos realizados en lo cual los zancudos fueron mantenidos en inanición por 3 días luego de su eclosión a su etapa de adultez con el fin de garantizar que tuvieran apetencia de sangre. Conociendo las características físicas de las hembras se seleccionaron de los machos los cuales estos fueron eliminados, con un succionador portátil se trasladaron a las hembras a los recipientes de plásticos elaborados con un orificio con malla, donde luego fueron colocadas 10 zancudos para cada ensayo a las jaulas.

Para la realización de los ensayos según (Aleman. et al. 2016) el tiempo estipulado para comprobar el efecto repelente de un producto es de 30 minutos, pero este ensayo se sometió a prueba a 60 minutos para estipular y verificar el tiempo de repelencia del producto pre formulado y los extractos puros.

Tabla 18

Matriz del diseño de experimento 2³.

N° de ensayos	Variables operacionales			Cantidad de mosquitos	
	Estado del extracto	Temperatura ambiente (°C)	Iluminancia (Lux)	Con repelente	Blanco
1	Extracto puro	25 °C	30 lux	3	8
2	Pre formulación	25 °C	30 lux	0	9
3	Extracto puro	30 °C	30 lux	0	8
4	Pre formulación	30 °C	30 lux	1	9
5	Extracto puro	25 °C	30 lux	2	10
6	Pre formulación	25 °C	603 lux	0	7
7	Extracto puro	30 °C	603 lux	0	8
8	Pre formulación	30°C	603 lux	0	5
9	Extracto puro	25 °C	603 lux	0	10
10	Pre formulación	25 °C	603 lux	0	7

Fuente propia

Como resultado de los ensayos clínicos en la tabla 18 se muestra la cantidad de zancudos que se posaron en el brazo con repelente y sin repelente es decir el blanco, donde se combinaron los valores establecidos de las variables operaciones como estado del extracto, temperatura y luz. Con la aplicación del diseño de experimentos en personas se demostró que los productos a base de *Eucalyptus camandulensis* D. *Azadirachta indica* A. y *Rosmarinus officinalis* L. poseen un efecto repelente de los zancudos *Aedes aegypti*.

Se observó que el extracto puro a temperatura de 25 °C en el ensayo 1 y ensayo 5 a la misma iluminancia de 30 lux se posaron 3 y 2 zancudos respectivamente en cada ensayo, también se mostró que para la pre formulación en el ensayo 4 a temperatura 30 °C e iluminancia a 30 lux se posó 1 zancudo finalizando así cada ensayo.

El estudio de repelencia terminó al posarse el primer mosquito en el área roseada con el repelente, en el caso donde las pruebas presentaron que ningún mosquito se posó en el brazo con repelente cabe recalcar que el estudio se canceló pasado los 60 min ya que ningún zancudo se posó en el tiempo estipulado.

Tabla 19

Porcentaje de repelencia de cada ensayo

N° de ensayo	N° de mosquito que se posan en la muestra con repelente	N° de mosquito que se posan en el blanco	% de repelencia
1	3	8	45%
2	0	9	100%
3	0	8	100%
4	1	9	80%
5	2	10	67%
6	0	7	100%
7	0	8	100%
8	0	5	100%
9	0	10	100%
10	0	7	100%

Fuente propia

En la tabla 19 se muestra el porcentaje de repelencia que presentaron tanto el extracto puro como la pre formulación, sin tomar en cuenta las variables operaciones de cada ensayo. Se comprueba que los dos productos puestos a pruebas presentaron repelencia con o sin sus variables manipuladas. Sin embargo, la pre formulación presento mayor efecto de repelencia en comparación del extracto puro, dado que en los 10 ensayos realizados 5 mosquitos en total se posaron en las pruebas con el extracto puro y en el caso de la pre formulación se evidenció que 1 mosquito se posó en total, lo que significó que existió mayor repelencia en la pre formulación que en el extracto puro.

Tabla 20

Resultados de las variables

N° de ensayos	Variables operacionales			Variables respuestas	
	Estado del extracto	Temperatura ambiente (°C)	Iluminancia (Lux)	Actividad Repelente (%)	Tiempo de acción repelente
1	Extracto puro	25 °C	30 lux	45%	60 min
2	Pre formulación	25 °C	30 lux	100%	60 min
3	Extracto puro	30 °C	30 lux	100%	60 min
4	Pre formulación	30 °C	30 lux	80%	45 min
5	Extracto puro	25 °C	30 lux	67%	45 min
6	Pre formulación	25 °C	603 lux	100%	60 min
7	Extracto puro	30 °C	603 lux	100%	60 min
8	Pre formulación	30°C	603 lux	100%	60 min
9	Extracto puro	25 °C	603 lux	100%	60 min
10	Pre formulación	25 °C	603 lux	100%	60 min

Fuente propia

En la tabla 20 se observa los resultados de la combinación de las variables operacionales manipuladas en cada ensayo, donde en el ensayo número 1 a una temperatura 25 °C e iluminancia a 30 lux el cual fue rociado el brazo en prueba con el extracto puro se observó el tiempo de repelencia de 1 hora donde pasado ese tiempo se posaron 3 zancudos, presentando un porcentaje de repelencia de 45%; el ensayo número 4 donde se sometió la pre formulación a estudio a una temperatura de 30 °C e iluminancia de 30 lux se observó al minuto 45 se posó 1 zancudo, dando por terminado en ese momento el ensayo y presentando un porcentaje de repelencia de 80%; se obtuvo como resultado en el ensayo número 5 a una temperatura de 25 °C e iluminancia de 30 lux un tiempo de repelencia de 45 minutos donde cumplido ese tiempo se posaron 2 zancudos en el brazo que se roció con el extracto puro obteniendo un porcentaje de repelencia de 67%.

En estos tres ensayos donde se presentó bajo porcentaje de repelencia se pudo observar que al estímulo de iluminancia bajo se obtuvo menos repelencia y a menor temperatura menos efecto repelencia.

En los 7 ensayos donde se obtuvo una actividad de repelencia al 100% tanto el extracto puro como la pre formulación presentaron un tiempo de acción repelente de 60 min, sin embargo (Aleman. at el. 2016) estipulo 30 minutos para la prueba de repelencia lo que se cumplio con el tiempo estipulado pero para una mayor verificación de repelencia se asigno mas tiempo tanto para el extracto puro como la pre formulación que fue de 60 min, en este caso los ensayos se cancelaron pasando la hora estipulada, viendo que ambos presentaron muy buenos resultados superaron el tiempo asignado para mostrar efecto repelente sin embargo la pre formulación sigue mostrando mejores resultados de repelencia.

4.4. Análisis Estadístico para extracto puro y pre formulación

Como parte de las variables operacionales en el estudio, se establecieron 5: El tipo de extracto (puro y pre formulación), temperatura ambiente (25°C - 30°C), iluminancia (30 lux – 603 lux), Actividad repelente (0% - 100%) y el tiempo de acción repelente (0 min – 60 min). De todas estas variables, el tiempo de acción y la actividad repelente se definen como dependientes, ya que según la manipulación de las otras variables así cambia la acción repelente.

El análisis estadístico parte de dos muestras que según sus propias características y resultados del ensayo fueron comparadas y evaluadas para conocer cuál de ellas presenta un mayor efecto o actividad repelente. Para tal conclusión se aplicó el Software Minitab® 18, diseñado para ejecutar funciones estadísticas básicas y avanzadas.

Tabla 21

Datos descriptivos del Extracto Puro

Variable	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv. Est.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Tiempo de Acción Repelente	5	0	57.00	3.00	6.71	45.00	52.50	60.00	60.00	60.00
Actividad Repelente	5	0	82.4	11.3	25.3	45.00	56.0	100.0	100.0	100.0

Tabla 22

Datos descriptivos de la pre formulación

Variable	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv. Est.	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Tiempo de Acción Repelente	5	0	57.00	3.00	6.71	45.00	52.50	60.00	60.00	60.00
Actividad Repelente	5	0	96.00	4.00	8.94	80.00	90.00	100.00	100.00	100.00

4.4.1. Prueba de normalidad mediante el método de Anderson-Darling para la muestra de extracto puro y pre formulación de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L. para actividad repelente.

- **EXTRACTO PURO**

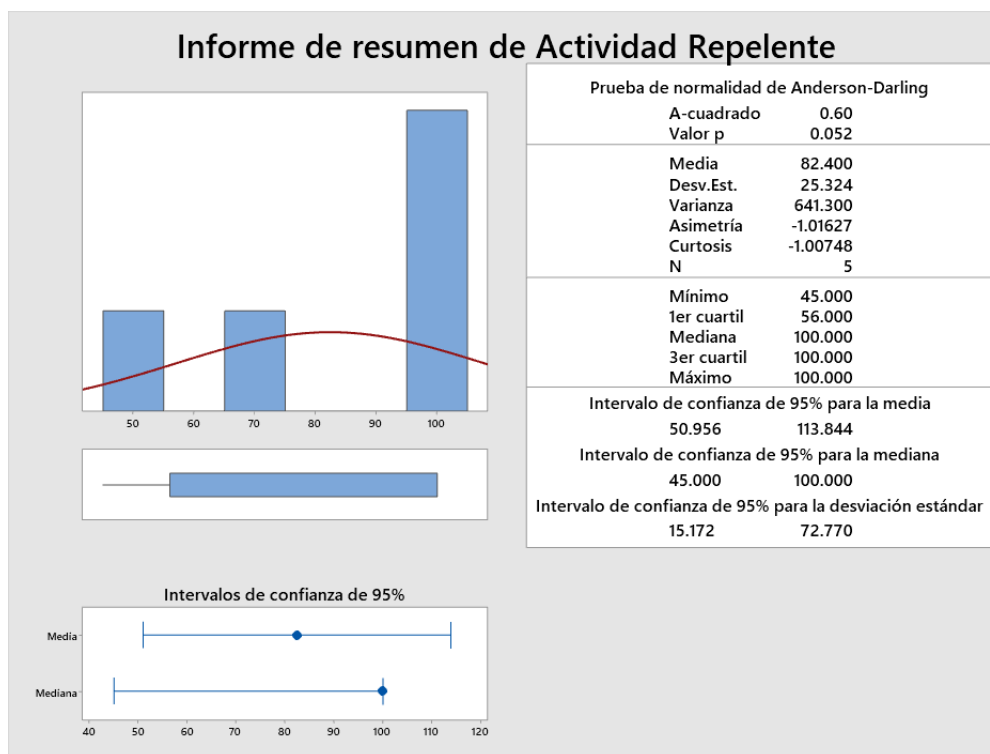
Planteamiento de hipótesis

H_0 = Todos los valores de la actividad repelente pertenecientes al Extracto Puro de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L. siguen una distribución normal.

H_a = Al menos un valor de actividad repelente pertenecientes al Extracto Puro de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L. no sigue una distribución normal.

Grafica 1

Prueba de normalidad de la actividad repelente del extracto puro de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L.



Normalidad en los datos: Media y mediana tienen valores idénticos y $SD = 1$

No normalidad en los datos: Media y mediana tienen valores diferentes y $SD \neq 1$.

Para esta prueba se obtuvo un valor de media de 82.400, un valor de mediana de 100.000 y una desviación estándar "SD" de 25.324. Se puede observar que tanto la media como la mediana son diferentes y que el valor de SD es $\neq 1$, por lo tanto, los datos no siguen una distribución normal, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

Normalidad en los datos: Hay Simetría y Curtosis con valor = 0

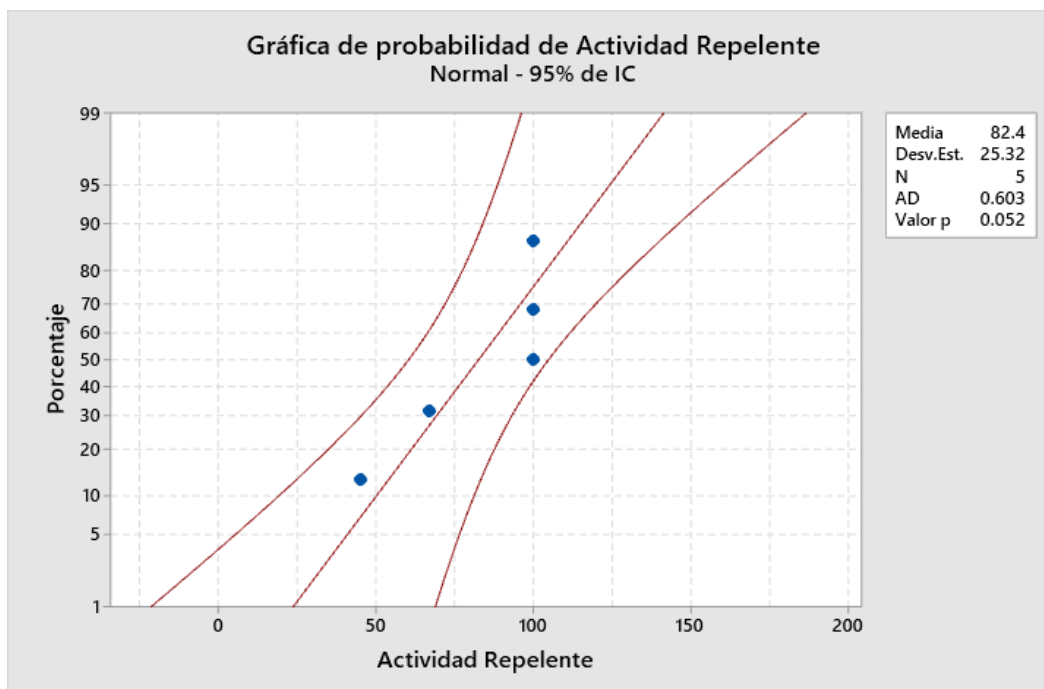
No normalidad en los datos: Hay Asimetría y Curtosis con valor $> 0 (+)$ ó valor $< 0 (-)$

Se puede observar una asimetría con valor negativo de -1.01627 lo que indica que no hay normalidad en los datos y por tanto el gráfico se sesga hacia la izquierda. También se observa una curtosis negativa de -1.00748 lo que indica una forma de distribución platicúrtica, que se interpreta como no normalidad en los datos.

Para ambos resultados se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Grafica 2

Probabilidad de actividad repelente según la dispersión de los datos del extracto puro de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L.



Si AD = 0 Se sigue una distribución normalizada

Si AD ≠ 0 No se sigue una distribución normalizada

En el gráfico de probabilidad para extracto puro de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L. se pueden observar valores alejados de la línea de distribución normalizada, y la distancia de estos valores respecto a la recta es diferente en cada uno, es por ello que el valor de AD es ≠0, según el estadístico es de 0.603. Se puede comprobar que no se sigue una distribución normal, rechazando la hipótesis nula y aceptando la alternativa.

Si p < 0,05 se rechaza la hipótesis nula

El valor de p obtenido para las muestras de extracto puro en su actividad repelente es de 0,052, se puede observar que es mayor al nivel de significancia del 95%, para lo cual no se rechaza la hipótesis nula.

En conclusión, en los cuatro parámetros que evalúan la distribución normalizada de los datos, se puede concluir que, para las 5 muestras de actividad repelente en extracto puro, el valor de p acepta la hipótesis nula indicando que los datos siguen una distribución normal, pero las pruebas de AD, simetría-curtosis y media-moda-SD según sus valores indican que se rechaza la hipótesis nula y por lo tanto los datos no siguen una distribución normal. De los cuatro parámetros tres coinciden en rechazar la H0 y esto se toma como referente para proceder con las demás pruebas estadísticas para datos que no tienen distribución normal.

- **PRE FORMULACIÓN**

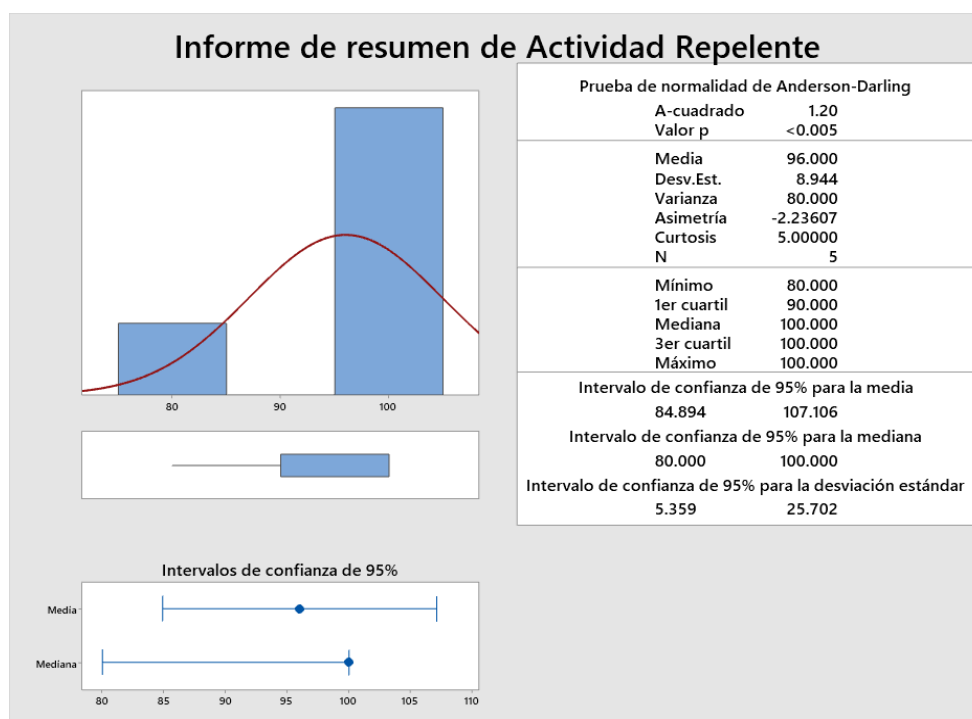
Planteamiento de hipótesis

H_0 = Todos los valores de actividad repelente pertenecientes a la pre formulación siguen una distribución normal.

H_a = Al menos un valor de actividad repelente pertenecientes a la pre formulación no sigue una distribución normal.

Grafica 3

Prueba de normalidad de la actividad repelente de la pre formulación



Normalidad en los datos: Media y mediana tienen valores idénticos y $SD = 1$

No normalidad en los datos: Media y mediana tienen valores diferentes y $SD \neq 1$.

Para esta prueba se obtuvo un valor de media de 96.000, un valor de mediana de 100.000 y una desviación estándar "SD" de 8.944. Se puede observar que tanto la media como la mediana son diferentes y que el valor de SD es $\neq 1$, por lo tanto, los datos no siguen una distribución normal, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

Normalidad en los datos: Hay Simetría y Curtosis con valor = 0

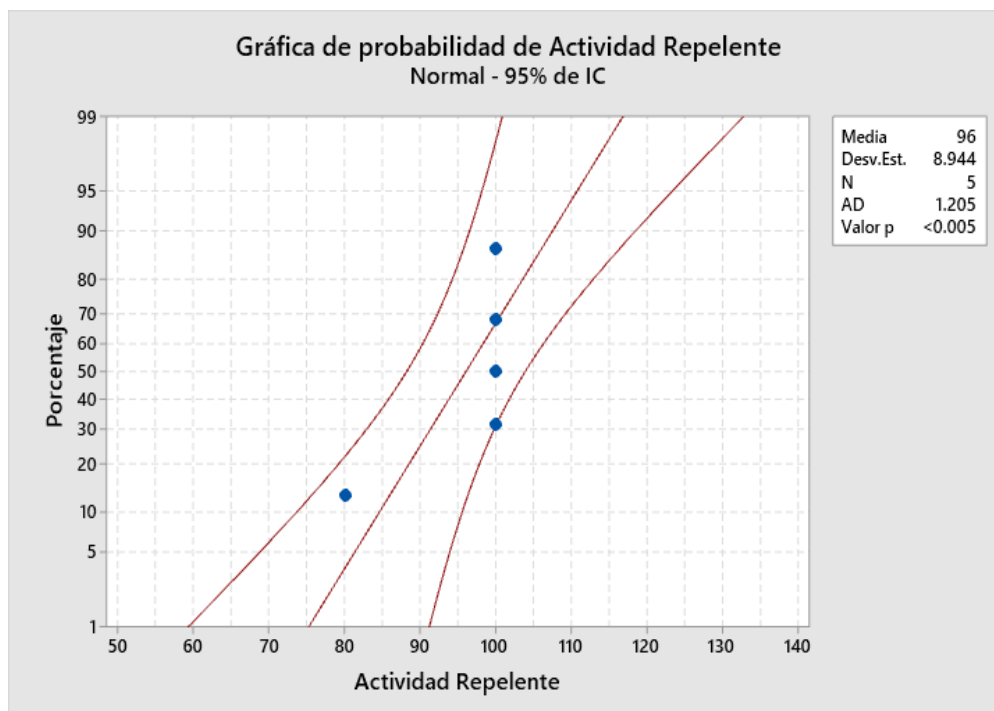
No normalidad en los datos: Hay Asimetría y Curtosis con valor $> 0 (+)$ ó valor $< 0 (-)$

Se puede observar una asimetría con valor negativo de -2.23607 lo que indica que no hay normalidad en los datos y por tanto el gráfico se sesga hacia la izquierda. También se observa una curtosis positiva de 5.0000 lo que indica una forma de distribución leptocúrtica, interpretándose una no normalidad en los datos.

Para ambos resultados se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Grafica 4

Prueba de probabilidad en la actividad repelente de la pre formulación



Si AD = 0 Se sigue una distribución normalizada

Si AD \neq 0 No se sigue una distribución normalizada

En el gráfico de probabilidad se pueden observar valores alejados de la línea de distribución normalizada, y la distancia de estos valores respecto a la recta es diferente en cada uno, es por ello que el valor de AD es \neq 0, según el estadístico es de 1.205. Se puede comprobar que no se sigue una distribución normal, rechazando la hipótesis nula y aceptando la alternativa.

Si $p < 0,05$ se rechaza la hipótesis nula

El valor de p obtenido para las muestras de pre formulación en su actividad repelente es de 0,005, se puede observar que es menor al nivel de significancia del 95%, para lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

En conclusión, en los cuatro parámetros (p , AD, asimetría-curtosis, media-mediana-SD) que evalúan la distribución normalizada de los datos, se puede concluir que para las 5 muestras de actividad repelente en pre formulación, según sus valores se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, por lo tanto, los datos no siguen una distribución normal. Esto se toma como referente para proceder con las demás pruebas estadísticas para datos que no tienen distribución normal.

4.4.2. Prueba de normalidad mediante el método de Anderson-Darling para la muestra de extracto puro y pre formulación de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L. para el tiempo de acción repelente.

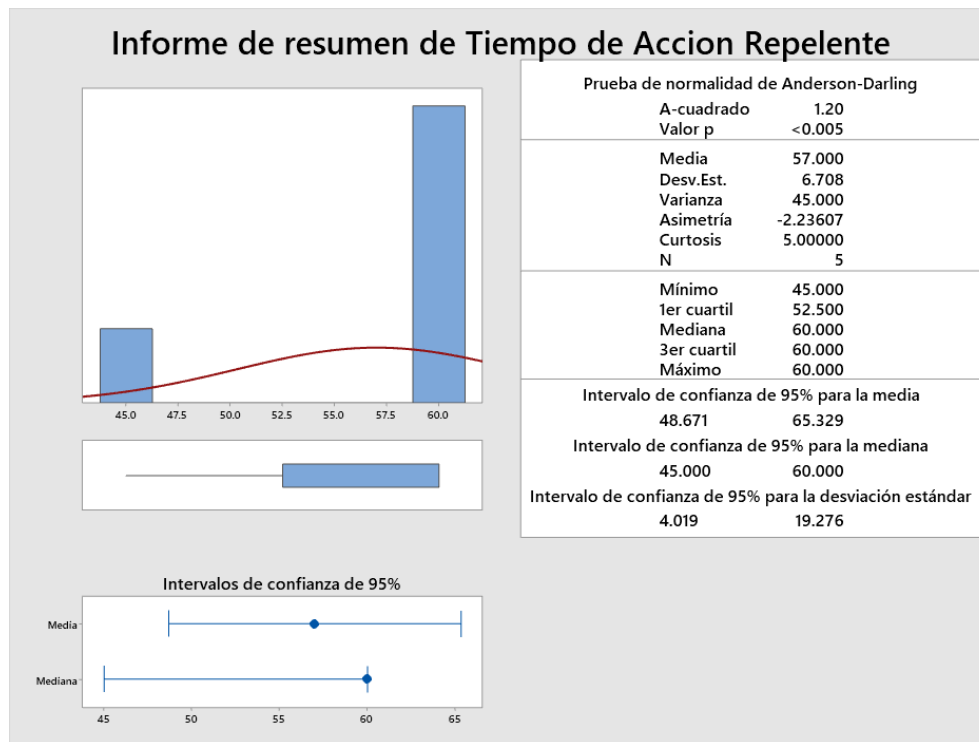
Planteamiento de hipótesis

H_0 = Todos los valores del tiempo de acción repelente pertenecientes al extracto puro y pre formulación siguen una distribución normal.

H_a = Todos los valores del tiempo de acción repelente pertenecientes al extracto puro y pre formulación no siguen una distribución normal.

Grafica 5

Prueba de normalidad del extracto puro y pre formulación de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L.



Normalidad en los datos: Media y mediana tienen valores idénticos y $SD = 1$

No normalidad en los datos: Media y mediana tienen valores diferentes y $SD \neq 1$.

Para esta prueba se obtuvo un valor de media de 57.000, un valor de mediana de 60.000 y una desviación estándar "SD" de 6.708. Se puede observar que tanto la media como la mediana son diferentes y que el valor de SD es $\neq 1$, por lo tanto, los datos no siguen una distribución normal, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

Normalidad en los datos: Hay Simetría y Curtosis con valor = 0

No normalidad en los datos: Hay Asimetría y Curtosis con valor $> 0 (+)$ ó valor $< 0 (-)$

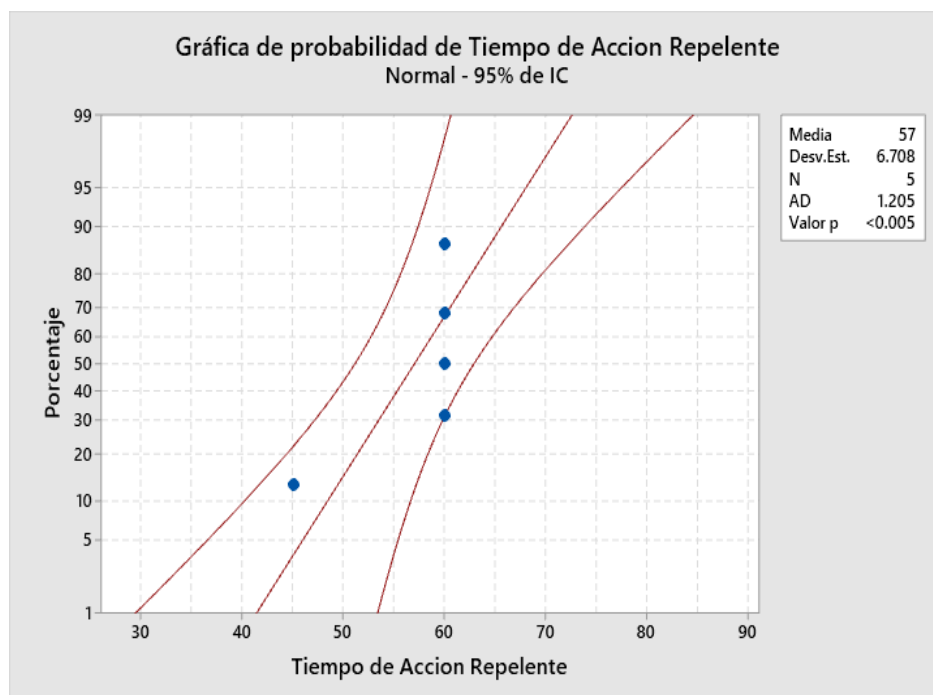
Se puede observar una asimetría con valor negativo de -2.23607 lo que indica que no hay normalidad en los datos y por tanto el gráfico se sesga hacia la

izquierda. También se observa una curtosis positiva de 5.0000 lo que indica una forma de distribución leptocúrtica, interpretándose una no normalidad en los datos.

Para ambos resultados se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa.

Grafica 6

Prueba de probabilidad del extracto puro y pre formulación de *A. indica* A, *E. camandulensis* D. y *R. officinalis* L.



Si AD = 0 Se sigue una distribución normalizada

Si AD ≠ 0 No se sigue una distribución normalizada

En el gráfico de probabilidad se pueden observar valores alejados de la línea de distribución normalizada, y la distancia de estos valores respecto a la recta es diferente en cada uno, es por ello que el valor de AD es ≠0, según el estadístico es de 1.205. Se puede comprobar que no se sigue una distribución normal, rechazando la hipótesis nula y aceptando la alternativa.

Si p < 0,05 se rechaza la hipótesis nula

El valor de p obtenido para las muestras de pre formulación en su actividad repelente es de 0,005, se puede observar que es menor al nivel de significancia del 95%, para lo cual se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa.

En conclusión, en los cuatro parámetros (p , AD, asimetría-curtosis, media-mediana-SD) que evalúan la distribución normalizada de los datos, se puede concluir que para las 5 muestras en el tiempo de acción repelente en pre formulación y extracto puro, según sus valores se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, por lo tanto, los datos no siguen una distribución normal. Esto se toma como referente para proceder con las demás pruebas estadísticas para datos que no tienen distribución normal.

4.4.3. Prueba e IC para dos varianzas: actividad repelente ExtP- PreF

σ_1 : Desviación estándar de actividad repelente ExtP

σ_2 : Desviación estándar de actividad repelente PreF

Relación: σ_1/σ_2

Si $p < 0,05$ se rechaza la hipótesis nula

Si $p \geq 0,05$: Las SD para ambas muestras no son estadísticamente significativas.

Si $p < 0,05$: Las SD para ambas muestras son estadísticamente significativas.

Planteamiento de hipótesis

$H_0 = \sigma_1 / \sigma_2 = 1$ No hay diferencia entre ambas muestras.

$H_a = \sigma_1 / \sigma_2 \neq 1$ Hay diferencia entre ambas muestras.

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

H_0 = La relación de las desviaciones estándares o varianzas en la actividad repelente entre el extracto puro y pre formulación no son estadísticamente significativos.

H_a = La relación de las desviaciones estándares o varianzas en la actividad repelente entre el extracto puro y pre formulación son estadísticamente significativos.

Tabla 23

Estadísticas descriptivas de la actividad repelente del extracto puro y pre formulación

Variable	N	Desv.Est.	Varianza	IC de 95% para σ
Actividad Repelente ExtP	5	25.324	641.300	(12.741; 82.785)
Actividad Repelente PreF	5	8.944	80.000	(2.943; 44.715)

Tabla 24

Relación de desviaciones estándar de la actividad repelente del extracto puro y pre formulación

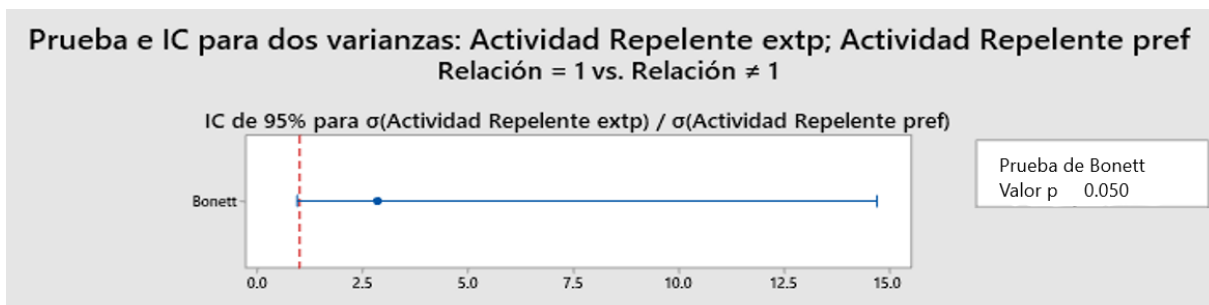
Relación estimada	IC de 95% para la relación usando Bonett
2.83130	(0.948; 14.695)

Método	Estadística de prueba	GL1	Valor p
Bonett	3.55	1	0.050

Respecto a la relación entre las SD para las dos muestras (Ext. P y Pre formulación) desde un análisis experimental, se puede observar claramente una diferencia de 2.83130 en la relación estimada de Bonett, dicho valor a su vez es \neq 1, por tal razón de forma experimental se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa donde la relación en las SD refleja una diferencia para ambas muestras.

Grafica 7

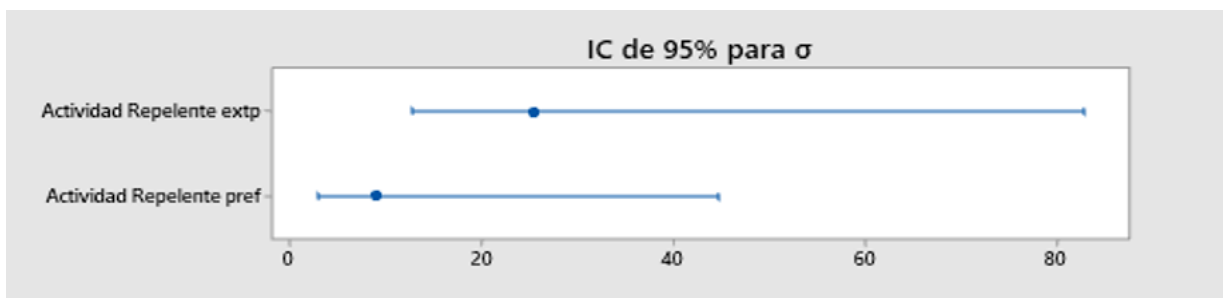
IC de 95% para las dos varianzas actividad repelente ExtP; actividad repelente PreF y la relación = 1 o $\neq 1$



El gráfico de IC muestra con una confianza del 95% un valor p de 0,05 el cual se interpreta como un dato “ \geq ” al nivel de significancia, esto corresponde a no rechazar la hipótesis nula y concluir que la relación entre ambas SD no es estadísticamente significativas, ósea que no hay diferencias entre las SD de ambas muestras. También se puede observar que el valor para la hipótesis nula ($\sigma_1 / \sigma_2 = 1$) se encuentra en el grafico con líneas rojas consecutivas dentro de los IC de la relación estimada de Bonett, por lo tanto, no se sigue rechazando la hipótesis nula, concluyendo que no existe una diferencia estadística significativa y que la actividad repelente tanto en el extracto puro como en pre formulación tienen el mismo efecto.

Grafica 8

IC de 95% para actividad repelente ExtP; actividad repelente PreF



En este gráfico, se puede observar que cada valor de SD (Ext. P = 25.324 y Pref = 8.944) está dentro de los IC para un 95%.

4.4.4. Prueba e IC para dos varianzas: tiempo de acción repelente ExtP- PreF

σ_1 : Desviación estándar del tiempo de acción repelente ExtP

σ_2 : Desviación estándar del tiempo de acción repelente PreF

Relación: σ_1/σ_2

Si $p < 0,05$ se rechaza la hipótesis nula

Si $p \geq 0,05$: Las SD para ambas muestras no son estadísticamente significativas.

Si $p < 0,05$: Las SD para ambas muestras son estadísticamente significativas.

Planteamiento de hipótesis

$H_0 = \sigma_1 / \sigma_2 = 1$ No hay diferencia entre ambas muestras.

$H_a = \sigma_1 / \sigma_2 \neq 1$ Hay diferencia entre ambas muestras.

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

H_0 =La relación de las desviaciones estándares o varianzas en el tiempo de acción repelente entre el extracto puro y pre formulación no son estadísticamente significativos.

H_a = La relación de las desviaciones estándares o varianzas en el tiempo de acción repelente entre el extracto puro y pre formulación son estadísticamente significativos.

Tabla 25

Estadísticas descriptivas del tiempo de acción repelente del extracto puro y pre formulación

Variable	N	Desv.Est.	Varianza	IC de 95% para σ
Tiempo de Acción Repelente ExtP	5	6.708	45.000	(2.207; 33.536)
Tiempo de Acción Repelente PreF	5	6.708	45.000	(2.207; 33.536)

Grafica 9

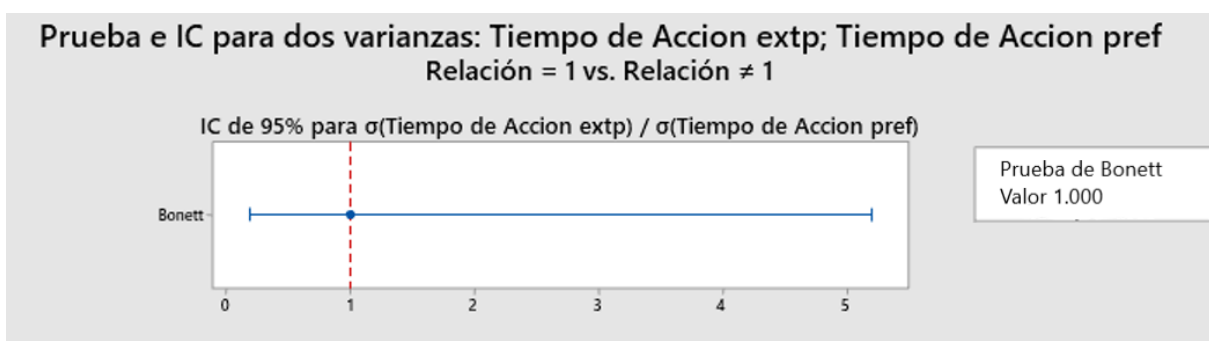
Relación de desviaciones estándar del tiempo de acción repelente del extracto puro y pre formulación

Relación estimada	IC de 95% para la relación Usando Bonett	
1	(0.193; 5.193)	
Método	Estadística de prueba	Valor p
Bonett	0.00	1.000

Respecto a la relación entre las SD para las dos muestras (Ext. P y Pre formulación) desde un análisis experimental, se puede observar una relación estimada de Bonett igual a 1, por tal razón no se puede rechazar la hipótesis nula y se afirma que no hay diferencias entre ambas muestras para su tiempo de acción repelente.

Grafica 10

IC de 95% para las dos varianzas del tiempo de acción repelente ExtP; actividad repelente PreF y la relación = 1 o $\neq 1$

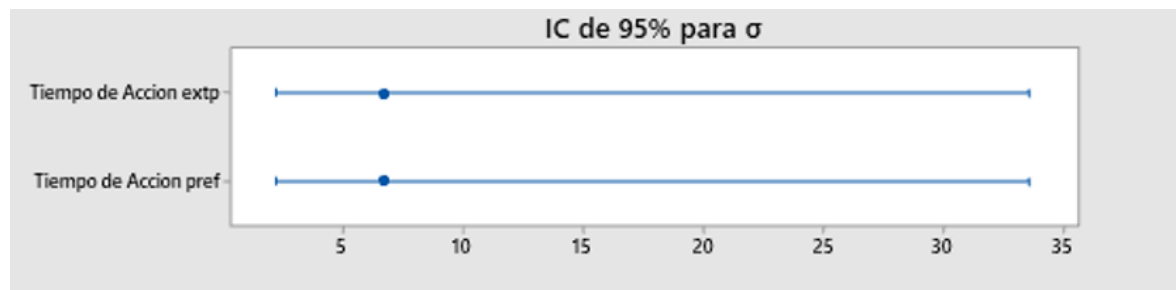


El gráfico de IC muestra con una confianza del 95% un valor p igual a 1 el cual se interpreta como un dato "≥" al nivel de significancia, esto corresponde a no rechazar la hipótesis nula y concluir que la relación entre ambas SD no es estadísticamente significativas, ósea que no hay diferencias entre las SD de ambas

muestras. También se puede observar que el valor para la hipótesis nula ($\sigma_1 / \sigma_2 = 1$) se encuentra dentro de los IC de la relación estimada de Bonett, por lo tanto no se sigue rechazando la hipótesis nula, concluyendo que no existe una diferencia estadística significativa y que el tiempo de actividad repelente tanto en el extracto puro como en pre formulación cumplen con el mismo tiempo de efecto.

Grafica 11

IC de 95% para tiempo de acción repelente ExtP; tiempo de acción repelente PreF



En este gráfico, se puede observar que cada valor de SD (Ext. P = 6.708 y Pref = 6.708) está dentro de los IC para un 95%.

4.4.5. Prueba de Mann-Whitney en la comparación de las medianas en las dos muestras: de la actividad repelente ExtP- PreF

η_1 : mediana de la actividad repelente ExtP

η_2 : mediana la actividad repelente PreF

Diferencia: $\eta_1 - \eta_2$

Si $p < 0,04$ se rechaza la hipótesis nula

Si $p \geq 0,04$: Las medianas para ambas muestras no son estadísticamente significativas.

Si $p < 0,04$: Las medianas para ambas muestras son estadísticamente significativas.

Planteamiento de hipótesis

H_0 : $\eta_1 - \eta_2 = 0$ No hay diferencia entre ambas muestras

H_1 : $\eta_1 - \eta_2 \neq 0$ Hay diferencia entre ambas muestras.

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

H_0 = Las diferencias de las medianas en la actividad repelente del extracto puro y pre formulación no son estadísticamente significativo.

H_1 = Las diferencias de las medianas en la actividad repelente del extracto puro y pre formulación son estadísticamente significativo.

Tabla 26

Estadísticas descriptivas de las medianas de la actividad repelente del extracto puro y pre formulación

Muestra	N	Mediana
Actividad Repelente ExtP	5	100
Actividad Repelente PreF	5	100

Tabla 27

Estimación de la diferencia

Diferencia	IC para la diferencia	Confianza lograda
-0.0000000	(-55; 20)	96.33%

Método	Valor W	Valor p
No ajustado para empates	24.00	0.531
Ajustado para empates	24.00	0.441

Se realizó la prueba de Mann-Whitney debido a que los datos de la actividad repelente del extracto puro comparados a la pre formulación no se distribuyen de forma normal y por tanto son considerado no paramétrico. Como resultado se puede observar que para ambas muestras se obtuvieron igual medianas con valor de 100, por lo tanto, la diferencia entre estas corresponde a -0.000 con una confianza de 96.33%. El método muestra dos valores de p, un valor no ajustado de 0.531 y un valor ajustado de 0.441. Para el análisis de la hipótesis se deben tomar en cuenta ambos valores de p, ya que el p ajustado es el más exacto, pero el p sin ajustar es mayor y más conservador.

Los dos valores de p son mayores al nivel de significancia de 0.04, por lo tanto, las medianas de ambas muestras no son estadísticamente significativas, es decir, ambas muestras presentan heterogeneidad entre sí y su valor de diferencia es igual a cero, afirmando que no se rechaza la hipótesis nula y que tanto la pre formulación como el extracto puro presentan la misma actividad repelente.

4.4.6. Prueba de Mann-Whitney en la comparación de las medianas en las dos muestras: del tiempo de acción repelente ExtP- PreF

η_1 : mediana del tiempo de acción repelente ExtP

η_2 : mediana del tiempo de acción repelente PreF

Diferencia: $\eta_1 - \eta_2$

Si $p < 0,04$ se rechaza la hipótesis nula

Si $p \geq 0,04$: Las medianas para ambas muestras no son estadísticamente significativas.

Si $p < 0,04$: Las medianas para ambas muestras son estadísticamente significativas.

Planteamiento de hipótesis

H_0 : $\eta_1 - \eta_2 = 0$ No hay diferencia entre ambas muestras

H_1 : $\eta_1 - \eta_2 \neq 0$ Hay diferencia entre ambas muestras.

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

H_0 = Las diferencias de las medianas en el tiempo de acción repelente para ambas muestras no son estadísticamente significativo.

H_1 = Las diferencias de las medianas en el tiempo de acción repelente para ambas muestras son estadísticamente significativo.

Tabla 28

Estadísticas descriptivas de las medianas del tiempo de acción repelente del extracto puro y pre formulación

Muestra	N	Mediana
Tiempo de Acción Repelente ExtP	5	60
Tiempo de Acción Repelente PreF	5	60

Tabla 29

Estimación de la diferencia

Diferencia	IC para la diferencia	Confianza lograda
-0.0000000	(-15; 15)	96.33%

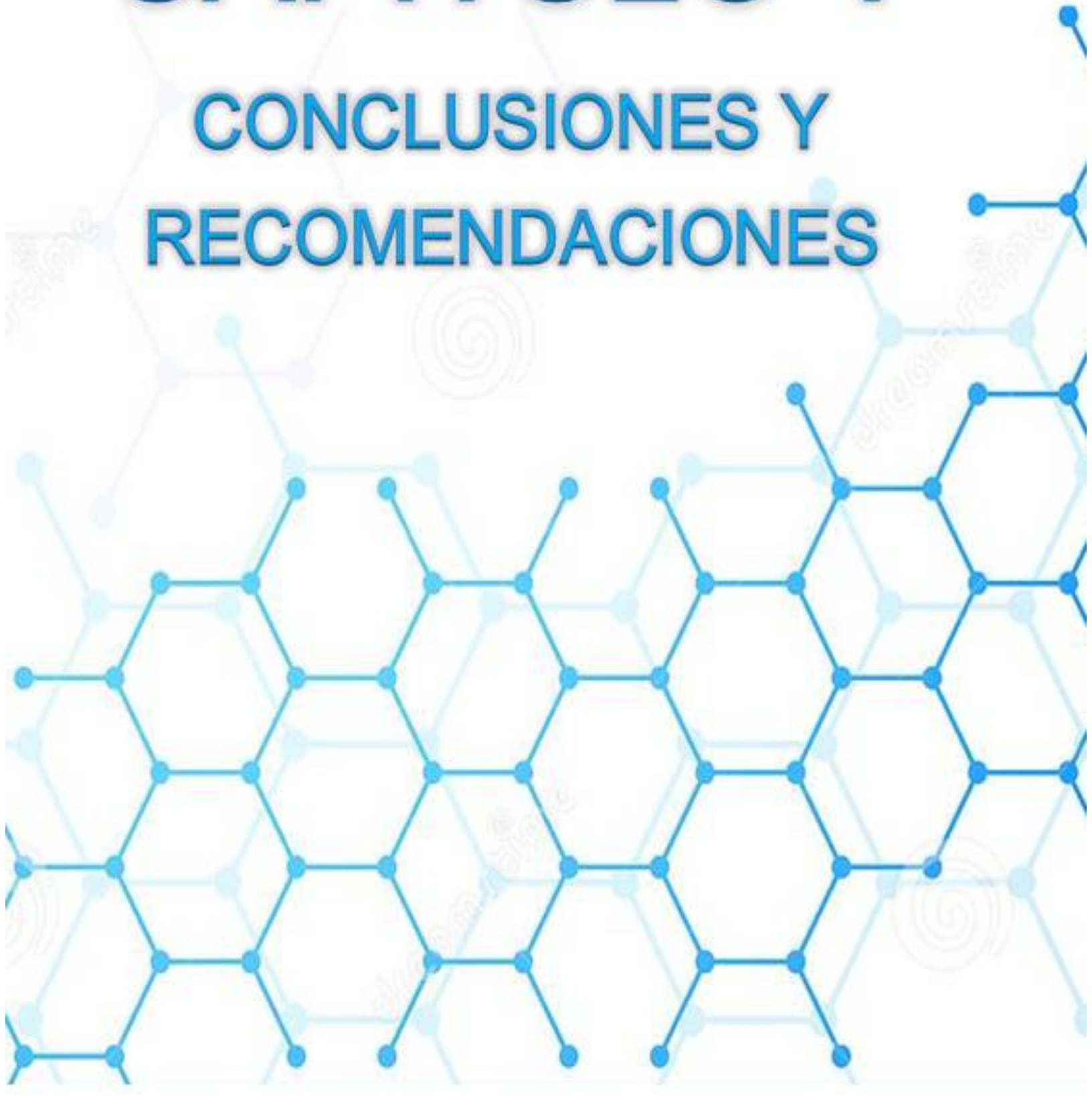
Método	Valor W	Valor p
No ajustado para empates	27.50	1.000
Ajustado para empates	27.50	1.000

Se realizó la prueba de Mann-Whitney para datos no paramétrico, se puede observar que para ambas muestras se obtuvieron igual medianas con valor de 60, por lo tanto, la diferencia entre estas corresponde a -0.000 con una confianza de 96.33%. El método muestra dos valores de p, un valor no ajustado y un valor ajustado, para ambos es de 1.00.

Los dos valores de p son mayores al nivel de significancia de 0.04, por lo tanto, las medianas de ambas muestras no son estadísticamente significativas, es decir, no hay diferencias entre estas y su valor de diferencia es igual a cero, afirmando que se no se rechaza la hipótesis nula y que tanto la pre formulación como el extracto puro presentan el mismo tiempo de acción repelente.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



5.1. Conclusiones

Como resultado a los objetivos planteados para el desarrollo de cada una de las etapas del presente trabajo monográfico, se establecen las siguientes conclusiones:

- Se aplicó adecuadamente el método de extracción con solvente a través de la técnica de destilación directa, obteniendo como resultado un rendimiento para *E. camandulensis* D. de 25,056%, un rendimiento de 24,609% para *A. indica* A. y 25,230% para *R. officinalis* L. Se puede concretar que fue un proceso bastante simple llevado a cabo en un tiempo corto, donde se logró la extracción y recuperación del solvente deseado en un mismo proceso, además de ser rentable ya que requiere la utilización de equipos simples y disponibles en laboratorio.
- A través de la realización de la forma farmacéutica del repelente se elaboró 3 diferentes pre formulaciones para obtener la que más se adecuaba a las características de la piel, donde se concluye que la pre formulación 1 era acta para someterse a los ensayos clínicos ya que cumplía con todos los criterios de calidad en productos de uso tópico.
- Se efectuaron los controles establecidos en Reglamento Técnico Centroamericano 11.03.05.56.09 y 71.03.45:07 los cuales estos mismo se repitieron pasado los dos meses en donde se permitió comprobar la calidad de la pre formulación 1 pH 5,3 características organolépticas (color verde musgo, olor característicos a las plantas, liquido, sensación fresca) y extracto puro pH 5,2 características organolépticas (color café rojizo, olor característicos a las plantas, liquido, poco sedimento) cumpliendo con los criterios establecidos para para pre formulación de uso tópico.
- Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos utilizando el diseño experimental 2³ demuestra que todas las variables operacionales permitieron

comprobar que el extracto puro y pre formulación poseen actividad repelente frente a la especie mosquitos hembras *Aedes aegypti*.

- En la comparación de la actividad repelente entre el extracto puro y pre formulación se observó mediante los datos experimentales una diferencia entre ambas muestras, sin embargo, mediante el análisis estadístico se comprobó que dichas diferencias no son estadísticamente significativas a lo cual no se rechaza la hipótesis nula. En relación al tiempo de acción repelente entre ambas muestras de igual manera no se rechaza la hipótesis nula ya que se demostró que no hay diferencia estadísticamente significativa ya ambas muestras presentan datos experimentales idénticos en su tiempo de acción repelente.

En general se pudo concluir que los extractos obtenidos de las hojas de *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) Y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) demuestran actividad repelente contra mosquitos *Aedes aegypti* tanto en extracto puro como en pre formulación.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda a futuros investigadores del área de salud, estudiantes en cursos y egresados de la carrera de química farmacéutica en la continuidad de esta investigación:

- Utilizar otros métodos para evaluar el rendimiento de los extractos en relación a su cantidad de muestra.
- Realizar tamizaje fitoquímico en los extractos obtenidos para la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Eucalyptus camandulensis* D. (Eucalipto), *Azadirachta indica* A. (Neem) Y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).
- Aplicar técnicas cromatográficas para la cuantificación de metabolitos secundarios y posterior aislamiento de las moléculas específicas con acción repelente.
- Se recomienda realizar controles microbiológicos y de estabilidad que cumpla con los criterios de uso tópico para posterior formulación, así mismo dar seguimiento para determinar la durabilidad del repelente de extracto puro y la pre formulación.

REFERENCIAS

- Aleman, N., Gurdian , X., & Ortiz, H. (2016). Evaluacion in vivo de la actividad repelente de semillas Azadirachta indica.
- Alemán, N., Gurdíán, X., & Ortiz, H. (2015). Evaluacion in vivode la actividad repelente de semillas Azadirachta indica A.
- Alemán, N., Gurdíán, X., & Ortiz, H. (s.f.). EVALUACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD REPELENTE DE SEMILLAS Azadirachta indica A. Juss (NEEM) CONTRA Aedes aegypti.
- Almiron, W. (2015). *PROTOCOLO DE ACCIONES DE CONTROL DE Aedes aegypti*. Cordoba: Universidad de Buenos Aires.
- American Cancer Society. (12 de Abril de 2019). *INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER*. Obtenido de INSTITUTO NACIONAL DE CANCER: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/estudio-preclinico>
- association, T. a. (2008). Repelentes. *The american mosquito control association*.
- Bao, F. (2010). Modelo de diseños factoriales y diseños 2k. *academic*.
- Barreto, E. (2006). Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de Azaradichta indica, Piper auritum y Petiveria alliacea para el control de Spodoptera exigua Hübner. *Universidad Nacional Chapingo*.
- Bautista, M. G., Alonso, D., & Marquez, G. (2011). *Formulación de una emulsión dermocosmética para el tratamiento del acne y cicatrices*. Merida.
- Bio-amantolli. (12 de Septiembre de 2015). *Neem Bio-amantolli*. Obtenido de Neem Bio-amantolli: http://bioamantolli.mex.tl/1903416_Toxicologia-del-Neem.html
- Biology, B. C. (2014). Evidence for dangers of repellent DEET in question. *biomedcentra*.
- Carmona, C. (2016). *Efectividad de repelentes comerciales disponibles contra el mosquito*. Mexico.
- Castex, M. (2012). *Actividad repelente de formulaciones del aceite esencial de Melaleuca*. Mexico.
- Castillo, J. (3 de marzo de 2010). *Herbal de Chiapas*. Obtenido de Herbal de Chiapas: [www. herbaldechiapas.com](http://www.herbaldechiapas.com)
- CedimCat. (13 de Julio de 2017). *Centre d'Informació de Medicaments de Catalanuya*. Obtenido de Centre d'Informació de Medicaments de Catalanuya:

https://www.cedimcat.info/index.php?option=com_content&view=article&id=188:repelentes-de-insectos&catid=46:farmacoterapia-esp&lang=es

- Centelles, V. (12 de Diciembre de 2020). *Botanical*. Obtenido de Botanical: <https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/eucalipto-toxicidad>
- Central, B. B. (2009). Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *biomedcentral*.
- Coello, Z. (17 de Octubre de 2019). *Experto Animal*. Obtenido de Experto Animal: https://www.expertoanimal.com/insectos-voladores-nombres-caracteristicas-y-fotos-24516.html#anchor_3
- Cruz, M. (2004). El arbol de nim establecimiento y aprovechamiento. *inifap*.
- D" Alessandro, M. (12 de Enero de 2017). *Flores*. Obtenido de Flores: <https://www.flores.ninja/eucalipto/>
- Daza, L., & Flores, N. (2006). *DISEÑO DE UN REPELENTE PARA INSECTOS VOLADORES CON BASE EN PRODUCTOS NATURALES*. Medellín.
- Dermocosmetica, I. (2015). El PH de la piel y de los cosméticos. *Instituto Dermocosmetica*.
- Emfermedades, C. N. (2017). Guia para la cria y mantenimiento de colonias de Aedes Aegypti en condiciones de insectario . *Secretaria de la Salud*.
- Ferré, J. (2015). EL DISEÑO FACTORIAL COMPLETO 2k. *Grupo de Quimiometría, Cualimetría y Nanosensores*.
- FITOMOLINA. (20 de Octubre de 2020). *FITOMOLINA*. Obtenido de FITOMOLINA: <https://fitomolina.es/2020/08/18/cuales-son-los-beneficios-de-los-insecticidas-organicos/>
- Gancedo, M. (2017). *Efecto de repelentes sintéticos y naturales en el comportamiento de la cucaracha alemana Blattella germanica*. Argentina.
- Garcia, M. (2 de Octubre de 2017). *Taxonomia en plantas*. Obtenido de Taxonomia en plantas: <http://taxonomiaenplantas2017.blogspot.com/2017/10/neem.html>
- Gimeno, N. (2013). *TALLER LA FARMACIA DE LA NATURALEZA*. MADRID: UPA MADRID.
- Gomar, M. (2012). *CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LIPÍDICA EXTRACTABLE DE LA SEMILLA DEL ÁRBOL DE NEEM (Azadirachtin indica A. Juss)*. Guatemala.
- Hernandez, J. (2010). *Determinacion molecular del impacto de infecciones mixtas con el virus del Dengue*. Reynosa.

- Hurtado, F. (23 de Mayo de 2015). *SCRIBD*. Obtenido de SCRIBD:
<https://es.scribd.com/presentation/484360229/PLANTAS-BIOCIDAS-ppt>
- Inma , A. (21 de Febrero de 2019). *WebConsultas*. Obtenido de Web Consultas:
<https://www.webconsultas.com/belleza-y-bienestar/plantas-medicinales/eucalipto-te-ayuda-respirar-mejor-6189>
- Jato, J. (2008). *Tecnología farmacéutica: formas farmacéuticas*. Madrid, España: Editorial Síntesis S.A.
- Lopez, J. (2008). *El romero. Planta aromática con efectos antioxidantes*. Mexico.
- Lozano, S. (12 de Agosto de 2019). *El Romero y sus beneficios*. Obtenido de Blogspot:
<https://romeroysusbeneficios.blogspot.com/p/clasificaci%C3%B3n.html>
- Mancera, G. (15 de Enero de 2018). *CANIPEC*. Obtenido de CANIPEC:
<http://canipec.org.mx/cuidando-tu-hogar/que-son-los-repelentes/>
- MAPFRE. (18 de Febrero de 2018). *Salud Canales Mapfre*. Obtenido de <https://www.salud.mapfre.es/cuerpo-y-mente/naturopatia/romero-propiedades-beneficios/#:~:text=Efecto%20carminativo%3A%20favorece%20la%20disminuci%C3%B3n,%20antiinflamatorio%20antiulcerog%C3%A9nico%20y%20antioxidante.>
- OMS. (20 de Agosto de 2017). *Organizacion Mundial de la Salud*. Obtenido de Organizacion Mundial de la Salud:
<https://www.who.int/denguecontrol/mosquito/es/>
- Ortega , N. (12 de junio de 2013). *Organicosas*. Obtenido de organicosas:
<http://www.organicosas.com/que-son-los-productos-naturales-y-porque-el-concepto-se-confunde/>
- Oviedo, D., & Orochena, S. (2011). *Metodos de extraccion de aceites esenciales, comparacion y empleo en productos de perfumeria*. Leon.
- Pineda, B., Alvarado, E., & Canales, F. (1994). *Metodología de la investigación: Manual para el desarrollo de Manual de Salud*. Washington DC: OPS.
- Piura, J. (2008). *Metodología de la Investigación Científica*. Mexico: Xeror.
- Plagas, S. N. (2015). *Eucalyptus camandulensis D. Argentina.gob*.
- Porto, J., & Gardey, A. (12 de Agosto de 2019). *DefinicionDe*. Obtenido de DefinicionDe: <https://definicion.de/preformulacion/>
- Rommeu, C. (2007). *CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO (ROSMARINUS)*. La Habana.
- Roth, C. (2017). *ficha de datos de seguridad*. Munich.

- Rowe, R., Quinn, M., & Sheskey, P. (2015). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Washington, DC: Pharmaceutical Press.
- Rowe, R., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. Italia: L.E.G.O. S.p.A.
- RTCA, C. T. (2015). Productos farmacéuticos, productos naturales medicinales para uso humano. verificación de la calidad. *Reglamento Tecnico CentroAmericano*.
- RTCA., C. T. (2008). Productos cosméticos. Buenas prácticas de manufactura para los laboratorios fabricantes de productos cosméticos. *RTCA*.
- RTCA., C. T. (2011). Productos farmacéuticos, productos naturales medicinales para uso humano. Requisitos de etiquetado. *Reglamento Tecnico Centroamericano*.
- Rueda, X., & Mogollon, O. (2012). *Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus Globulus* y *E. de tres zonas de Pamplona (Colombia)**. Pamplona: Revista de la Facultad de Ciencias Basicas.
- Sanchez Torres, S. (2017). *Essential oils and their components as an alternative in the control of mosquito vectors of disease*. . Kansas: Biomedica.
- SENA. (2017). *Introduccion a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromaticas*. Mexico.
- Silva, F. (2016). *El Genero *Eucalyptus* (Myrtaceace) en Galicia*. Galicia: Xunta de Galicia.
- Tecnica, R. C. (s.f.).
- Tijerino, J. (2010). Estudios clinicos . *Instituto Nacional del Cancer*.
- Torres, J. (11 de Mayo de 2018). *EcuRed*. Obtenido de EcuRed:
<https://www.ecured.cu/Romero#Fuentes>
- WHO, W. H. (2009). Guidelines for efficacy testing of mosquito repellents for human skin. *Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)*.
- WORLD MOSQUITO PROGRAM. (20 de Febrero de 2019). *WORLD MOSQUITO PROGRAM*. Obtenido de WORLD MOSQUITO PROGRAM:
<http://www.eliminatedengue.com/colombia/enfermedades-mosquito>

ANEXOS

Anexo 1

Características generales del *Eucalyptus camandulensis* D.

Propiedades del *Eucalyptus camandulensis* D.



Los eucaliptos son árboles y plantas medicinales perennes pirófitas, de porte recto. Pueden llegar a medir más de 60 m de altura, si bien se habla de ejemplares ya desaparecidos que han alcanzado los 150 m.2 En algunos ejemplares la corteza exterior (ritidoma) es marrón clara con aspecto de piel y se desprende a tiras dejando manchas grises o parduscas sobre la corteza interior, más lisa.

La madera es blanca amarillenta a cremosa, de textura mediana con veteado suave de tonalidades rosadas. Orano entrecruzado que le otorga un veteado acabado. Anillos de crecimiento evidentes. Es una madera relativamente durable. Peso específico: 0,7 – 0,8 Kg/dm³.



Las hojas jóvenes de los eucaliptos son sésiles, ovaladas, grisáceas y de forma falciforme. Estas se alargan y se tornan de un color verde azulado brillante, de adultas



Flores axilares, solitarias o en grupos de 2-3, de hasta 3 cm de diámetro, con numerosos estambres de color blanco.



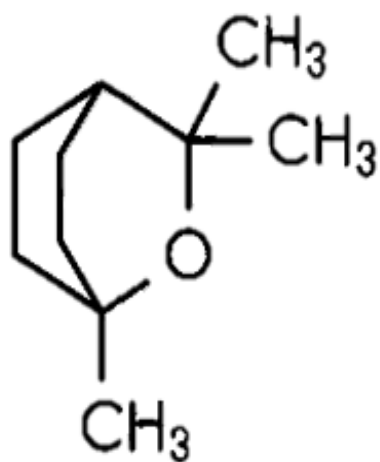
fruto en cápsula campaniforme de color glauco y cubierta de un polvo blanquecino, puede medir hasta 3 cm de diámetro con 3 - 6 lóculos, de valvas anchas y triangulares

PROPIEDADES

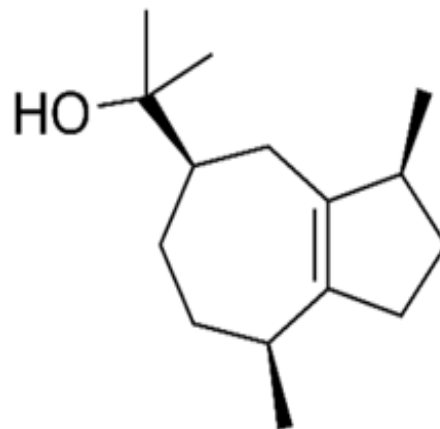
- ANTIINFLAMATORIO
- ESPECTORANTE
- ANTISEPTICO
- PROPIEDADES REPELENTES
- ANTIBACTERIANO

Anexo 2

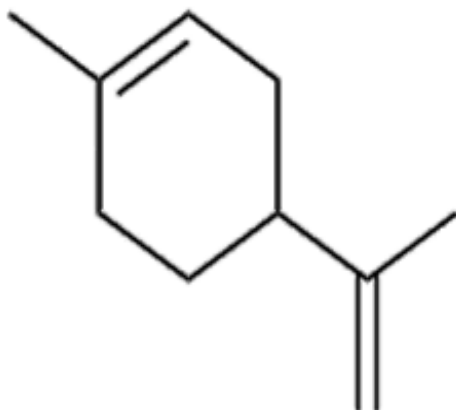
Estructura de los compuestos activos del *Eucalyptus camandulensis* D.



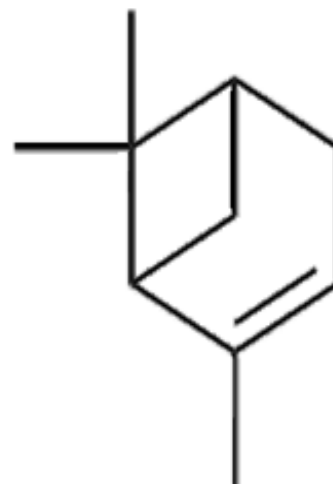
a) Eucalyptol



c) Guaiol



b) Limonene



d) α -Pineno

Anexo 3

Generalidades de *Azadirachta indica* A.

AZADIRACHTA INDICA A.



EL NIMBO DE LA INDIA O MARGOSA DE LA INDIA (AZADIRACHTA INDICA), TAMBIÉN CONOCIDO COMO NIM O NEEM EN LATINOAMÉRICA

- **ÁRBOL DE RÁPIDO CRECIMIENTO QUE PUEDE ALCANZAR 15 A 20 METROS DE ALTURA Y RARAMENTE 35 A 40 M.**
- **EL TALLO DE HOJAS MIDE DE 20 A 40 CM DE LONGITUD, CON 20 A 31 HOJAS VERDE OSCURAS DE 3 A 8 CM DE LONGITUD**



SU FRUTO ES UNA DRUPA PARECIDA A LA ACEITUNA EN FORMA QUE VARÍA DESDE UN ÓVALO ELONGADO HASTA UNO LIGERAMENTE REDONDO, Y CUANDO MADURA MIDE 14 A 28 MM DE LONGITUD Y 10 A 15 MM DE ANCHO.

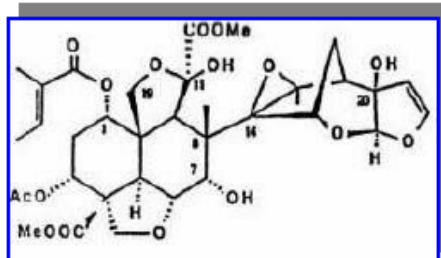
PROPIEDADES

1. antihipertensivo
2. insecticida
3. antihelmintica
4. purgativas
5. repelente
6. antihepatico

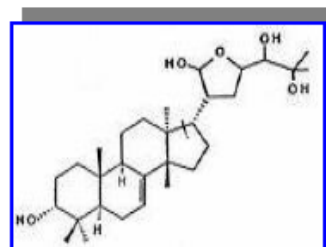
LAS FLORES, BLANCAS Y FRAGRANTES, ESTÁN DISPUESTAS AXIALMENTE, NORMALMENTE COMO PANÍCULAS COLGANTES QUE MIDEN MÁS DE 25 CM DE LONGITUD. LAS INFLORESCENCIAS, QUE SE RAMIFICAN EN TERCER GRADO TIENE 150 A 250 FLORES, CADA UNA MIDE 5 A 6 MM DE LONGITUD Y DE 8-11 MM DE ANCHO.

Anexo 4

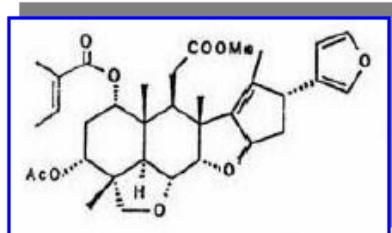
Estructura de los compuestos activos de *Azadirachta indica* A.



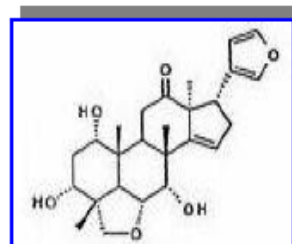
(A) Azadirachtina



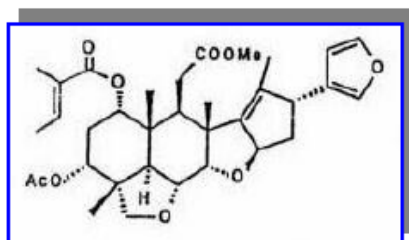
(B) Mellantriol



(C) Nimbin



(D) Nimbidin



(E) Salannin

Anexo 5

Generalidades del *Rosmarinus officinalis* L.

CARACTERÍSTICAS

Rosmarinus officinalis L.



**PUEDE LLEGAR A MEDIR
HASTA 2 METROS DE
ALTURA.**

El romero es un arbusto aromático, leñoso, de hojas perennes, muy ramificado y ocasionalmente achaparrado

**LAS HOJAS, PEQUEÑAS Y MUY
ABUNDANTES, PRESENTAN FORMA
LINEAL.**

Son opuestas, sésiles, enteras, con los bordes hacia abajo y de un color verde oscuro, mientras que por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de vellosidad.



**LAS FLORES SON
DE UNOS 5 MM DE
LARGO.**

Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acompañado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas; se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados soldados a la corola y con un pequeño diente.

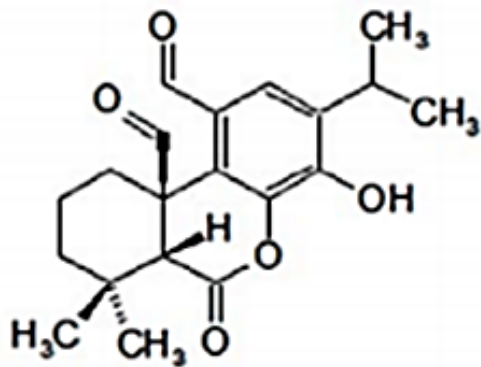
BENEFICIOS

- antiinflamatorio
- bactericida
- diurético
- analgésico
- hepático
- actividad repelente
- mejora la circulación
- potenciador del sistema inmune

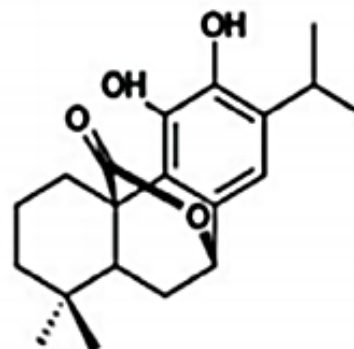


Anexo 6

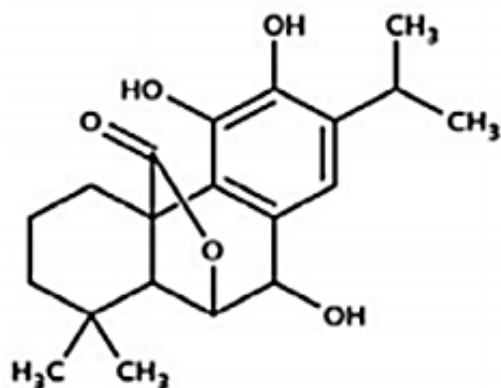
Estructura de los compuestos activos de *Rosmarinus officinalis* L.



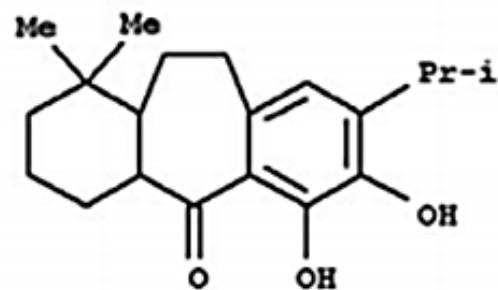
Acido carnósico



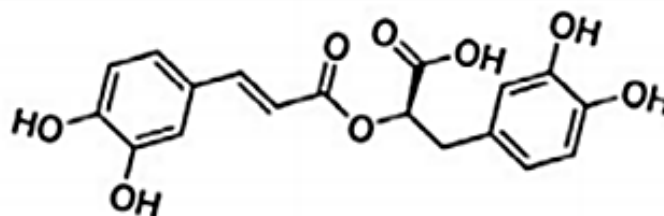
Carnosol



Epirosmanol



Rosmaridifenol



Acido rosmarínico

Anexo 7

Sentido del olfato de los insectos voladores



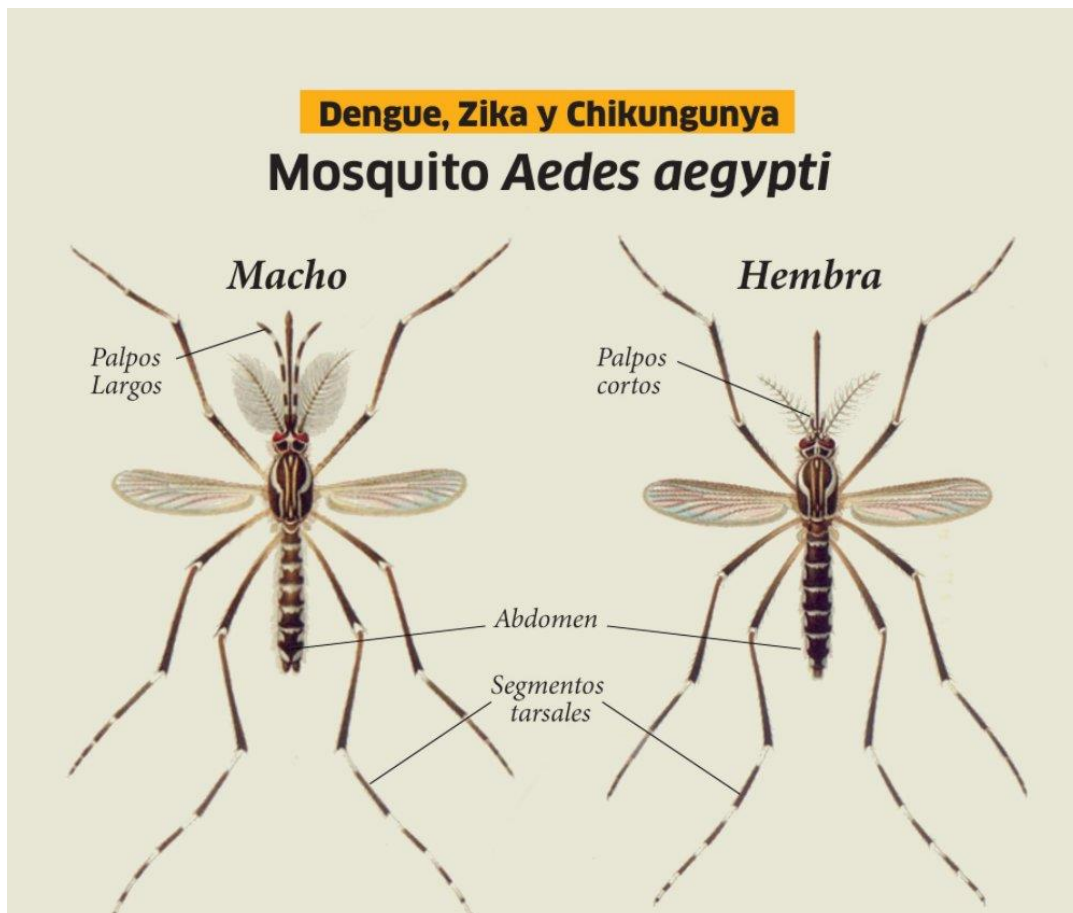
a. Plumosa



b. Birramosa

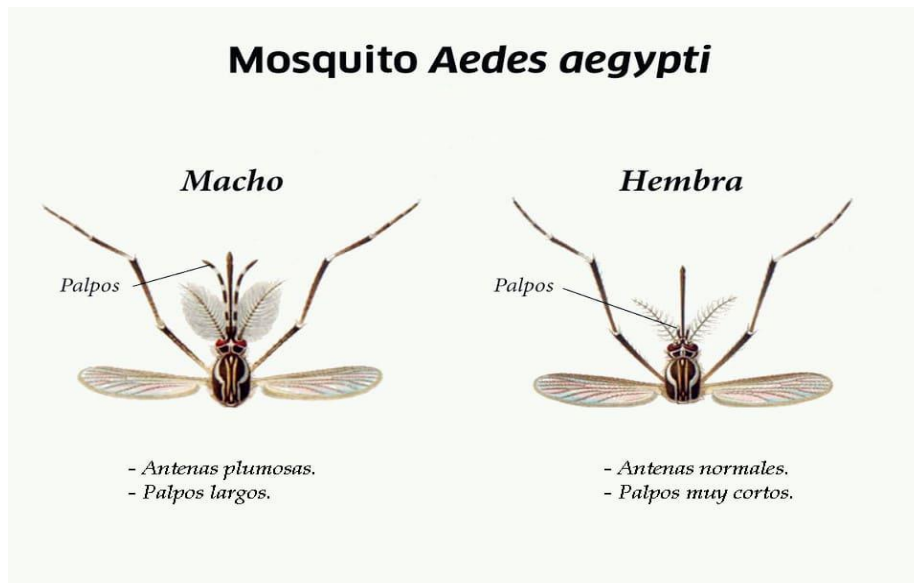
Anexo 8

Descripción morfológica del *Aedes aegypti*



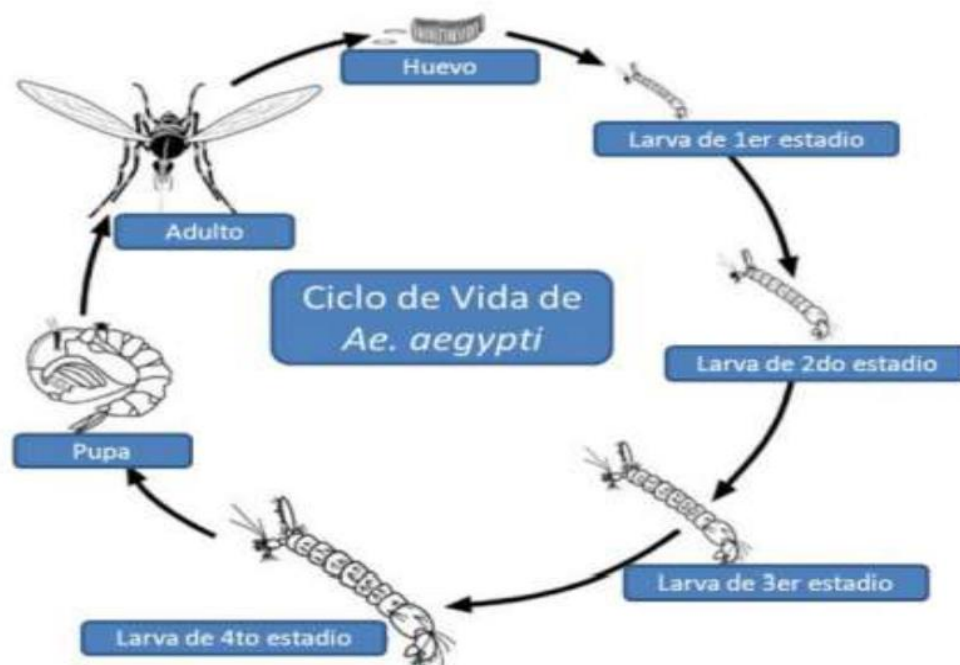
Anexo 9

Identificación morfológica del macho y hembra del *Aedes aegypti*



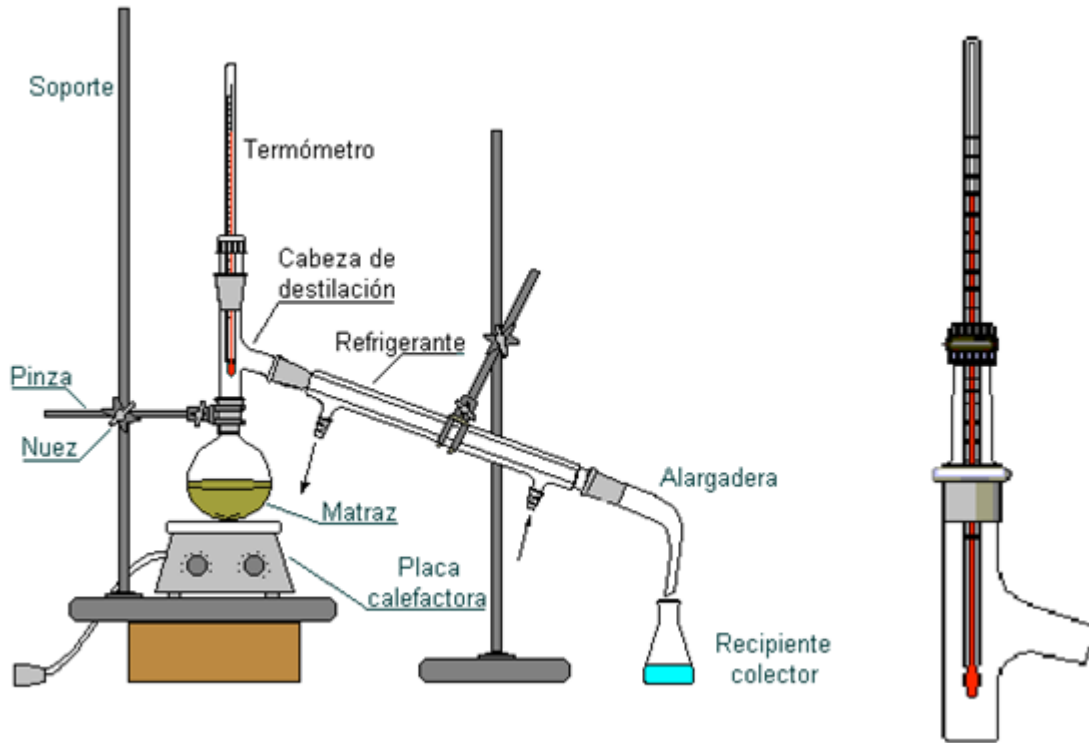
Anexo 10

Ciclo biológico del *Aedes aegypti*



Anexo 11

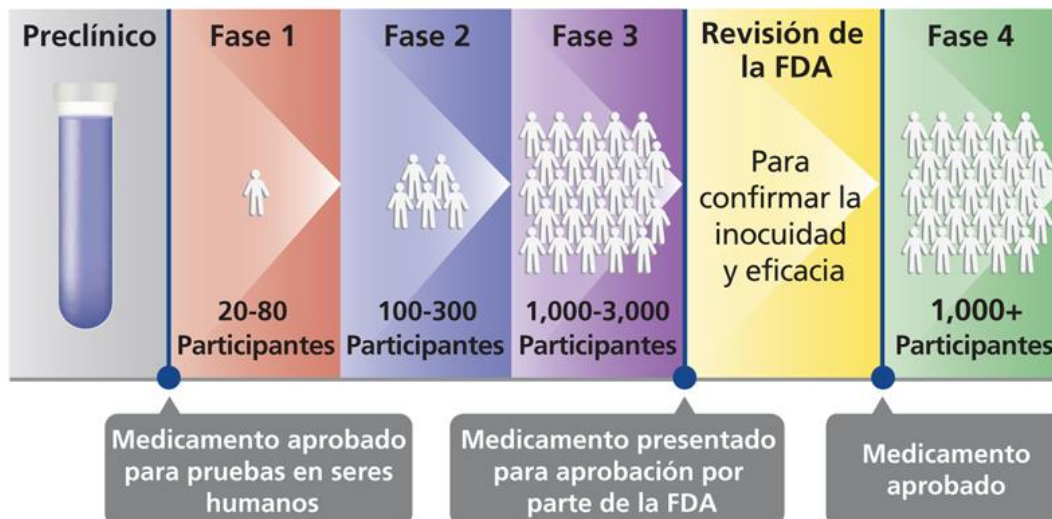
Método de extracción directa con solvente



Anexo 12

Fases de los ensayos clínicos

Ensayos Clínicos



Anexo 13

Cálculos de datos obtenidos en el desarrollo

Cálculos del porcentaje de rendimiento en los extractos

Ecuación:

$$\%RE = \frac{\text{masa de muestra utilizada}}{\text{masa de extracto puro obtenido}} \times 100\%$$

a. Porcentaje de rendimiento del *Eucalyptus camandulensis* D.

Masa de la muestra utilizada = 30,083 g

Masa del extracto puro = 120,060 g

133 mL de extracto puro equivalentes a 120,060 g

$$\%RE = \frac{30,083 \text{ g}}{120,060 \text{ g}} \times 100\% = 25,056 \%$$

b. Porcentaje de rendimiento de *Azadirachta indica* A

Masa de la muestra utilizada = 30,006 g

Masa del extracto puro = 121,929 g

132,5 mL de extracto puro equivalentes a 121,929 g

$$\%RE = \frac{30,006 \text{ g}}{121,929 \text{ g}} \times 100\% = 24,609 \%$$

c. Porcentaje de rendimiento de *Rosmarinus officinalis* L.

Masa de la muestra utilizada 30,068 g

Masa del extracto puro = 119,175 g

133 mL de extracto puro equivalentes a 119,175 g

$$\%RE = \frac{30,068 \text{ g}}{119,175 \text{ g}} \times 100\% = 25,2301 \%$$

Anexo 14 Proceso de la obtención de los extractos hidroalcohólicos de *Eucalyptus camandulensis* D. *Azadirachta indica* A. y *Rosmarinus officinalis* L.

Diagrama 1

proceso de preparación de las muestras



Obtención de la materia en Laboratorio Isnaya



Selección de las hojas Sanas (sin deformaciones)



Lavado de las hojas de *E. camandulensis* D. *A. indica* A. y *R. officinalis* L. con agua destilada



Trituración de las muestras de *E. camandulensis* D. *R. officinalis* L. y *A. indica* A.



Secado de las hojas de *E. camandulensis* D. *R. officinalis* L. y *A. indica* A.



Pesado de las muestras de *E. camandulensis* D. *R. officinalis* L. y *A. indica* A.

Anexo 15

Daños físicos en las plantas como parte de los criterios de exclusión

Figura 1

Hojas de E. camandulensis D. con daños físicos (hojas con cambio de color y mordedura de insectos)



Figura 2

Hojas de A. indica A. con daño físico (incompletas y con mordeduras de insectos)



Figura 3

Hojas y tallos de *R. officinalis* L. con daños físicos (hojas secas con mordeduras de insecto)



Diagrama 2

Proceso de obtención de extracto hidroalcohólicos *E. camandulensis* D. *R. officinalis* L. y *A. indica* A.



Figura 4

Estructura continua de la extracción por destilación directa



Figura 5

Extractos obtenidos de la destilación de cada muestra



Figura 6

Temperatura de 10°C del agua

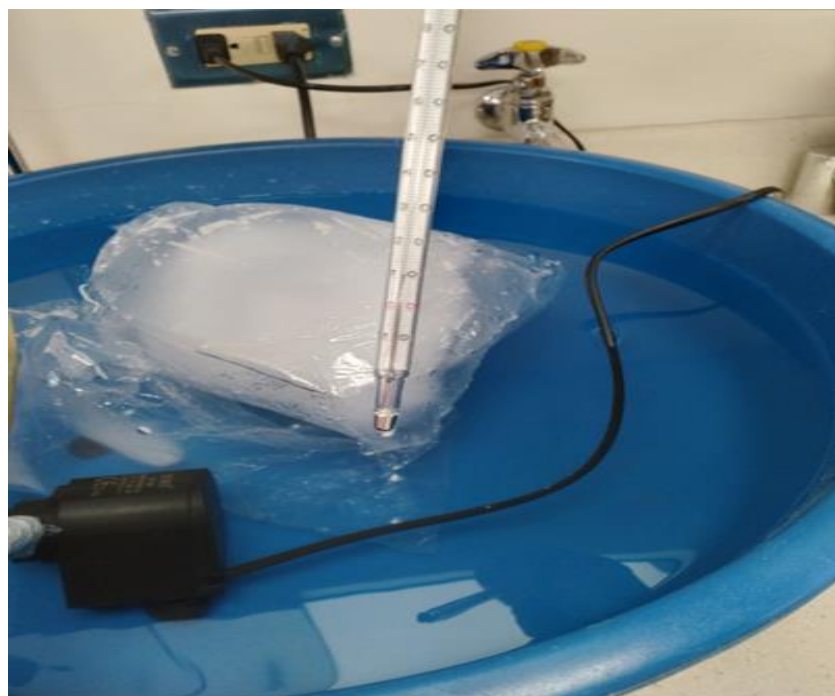
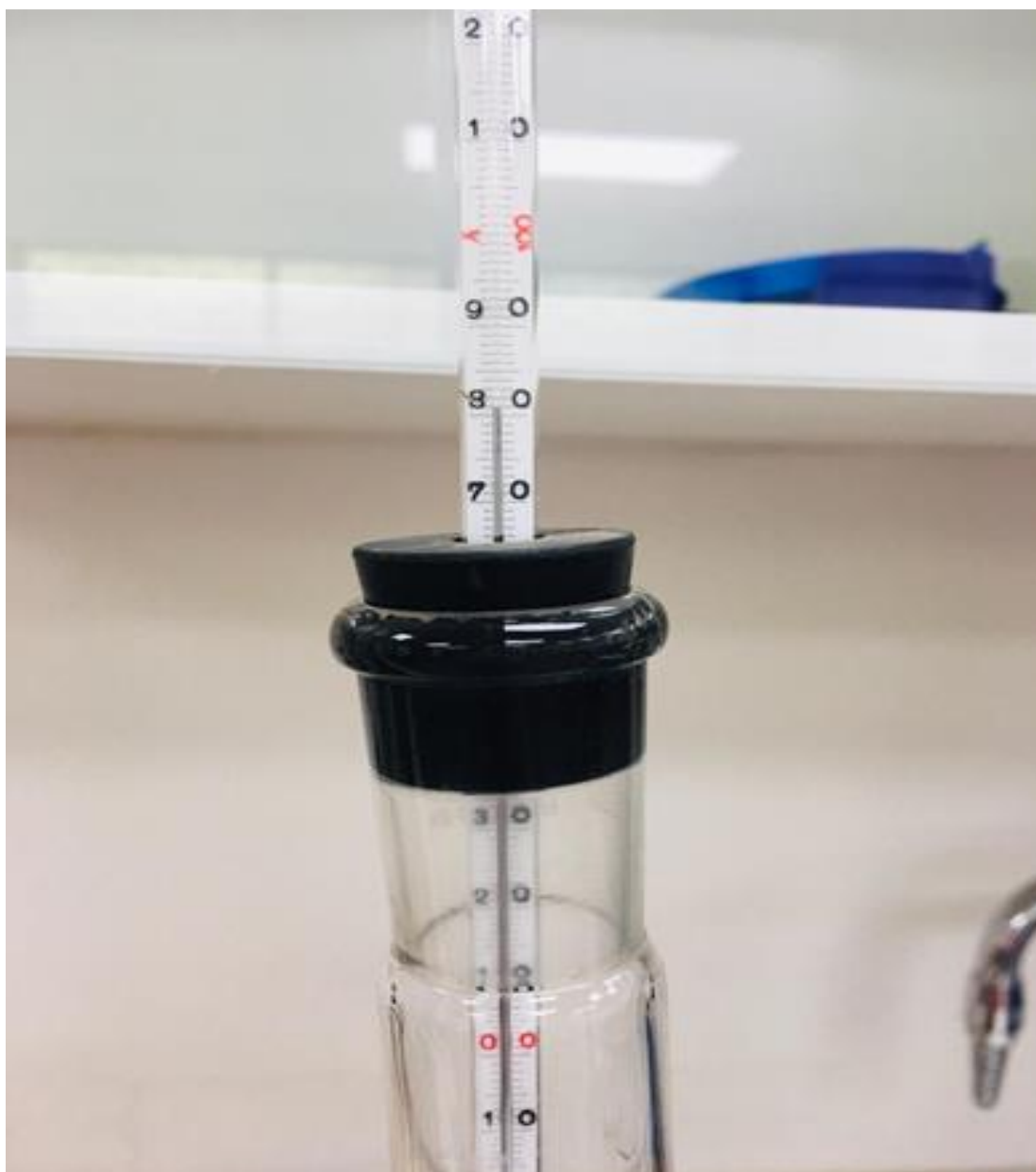


Figura 7

Temperatura final de la extracción reflejada por los termómetros de los balones



Anexo 16

Medición de pH de los extractos por triplicado

Figura 8

Resultado del pH del extracto *E. camandulensis* D.



Figura 9

Resultado del pH del extracto de *A. indica* A



Figura 10

Resultado del pH del extracto de *R. officinalis* L.

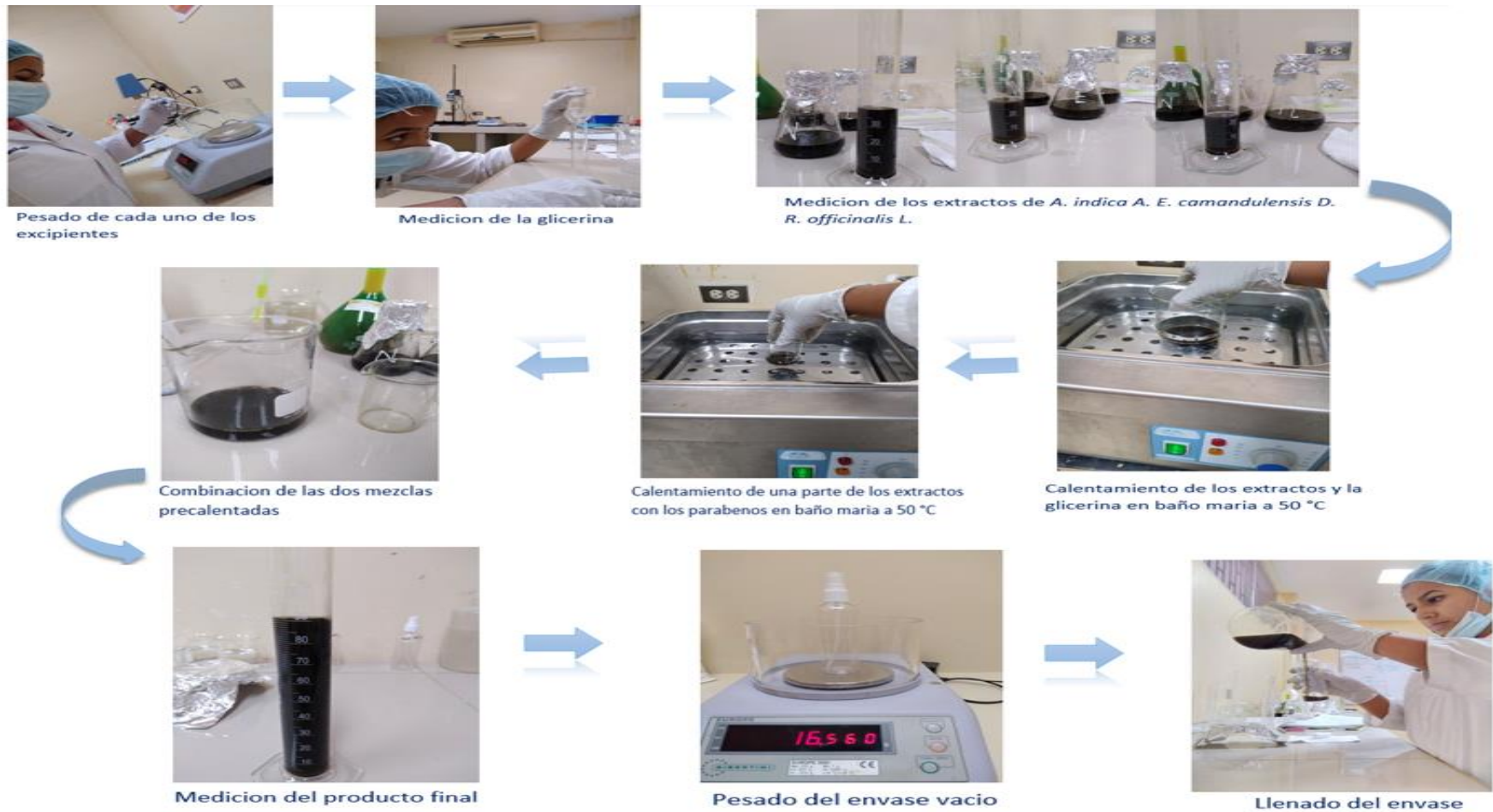


Anexo 17

Proceso de pre formulación de repelente

Diagrama 3

Proceso de la elaboración del repelente



Anexo 18

Medición de pH por triplicado la pre formulación

Figura 11

Resultados del pH de la glicerina



Figura 12

Resultados del pH de la pre formulación 1



Figura 13

Resultado del pH de la pre formulación 2



Figura 14

Resultado del pH de la pre formulación 3



Figura 15

Resultado del pH de la combinación de los extractos puros



Figura 16

Productos finales



Anexo 19

Proceso de los ensayos clínicos experimentales en mosquitos *Aedes aegypti*

Diagrama 4

Proceso de crianza de los mosquitos *Aedes aegypti*



Recolección de las larvas *Aedes aegypti* capturados en estado larval en el "Cementerio Nuevo",



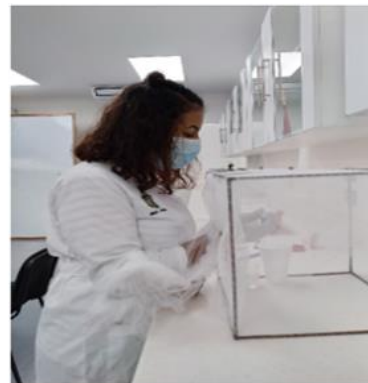
Cambio de agua de las larvas limpia y a temperatura ambiente



Alimentación de las larvas con pienso para conejo triturado en pequeñas partículas



Pupas de *Aedes aegypti* listas para eclosionar a zancudo adultos en tres días



Colocación dentro de las jaulas los frascos que contienen las pupas listas para eclosionar



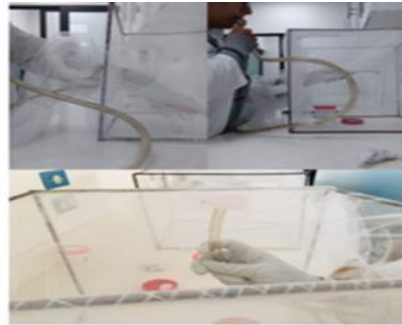
Selección de las larvas en estadio pupa

Diagrama 5

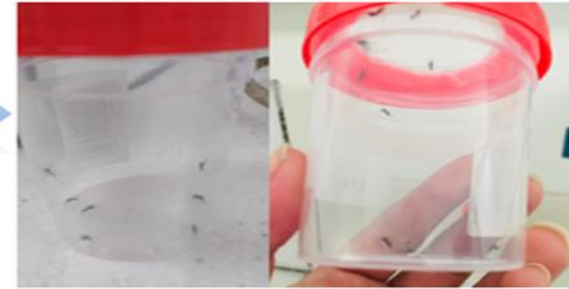
Proceso de la realización de los ensayos clínicos



Identificación morfológica de los zancudos hembras y macho



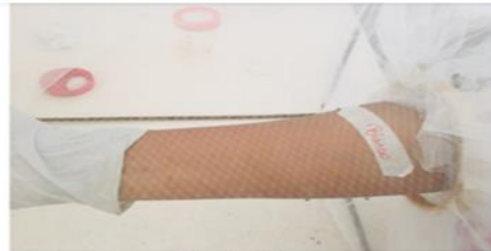
Selección del zancudo hembra para iniciar los ensayos



Colocación de los 10 zancudos hembras para el ensayo con repelente y 10 para el blanco en frascos adaptados para su traslado a las jaulas



Colocación de las 10 hembras *Aedes aegypti* en la jaula para el inicio del ensayo con el repelente



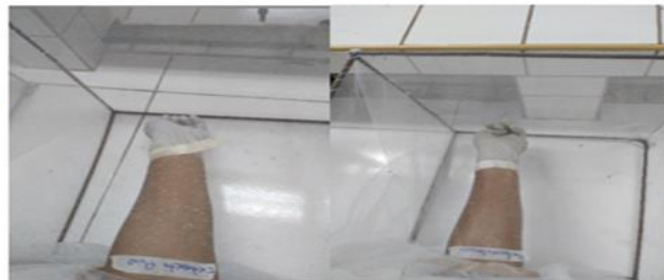
Introducción del brazo control, es decir, sin repelente para medir la apetencia de las hembras *Aedes aegypti*



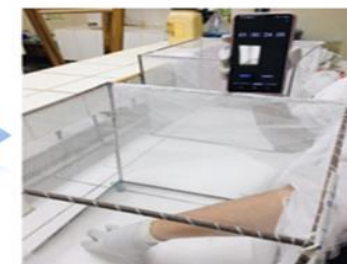
Colocación de las 10 hembras *Aedes aegypti* en la jaula para el inicio del ensayo con el blanco para medir su apetencia



Brazo rociado con repelente listo para iniciar las pruebas



Introducción a la jaula del brazo que contiene el repelente



Medición del tiempo de repelencia de cada producto

Figura 17

Jaulas de 35.5 cm³ forradas con tela de tul

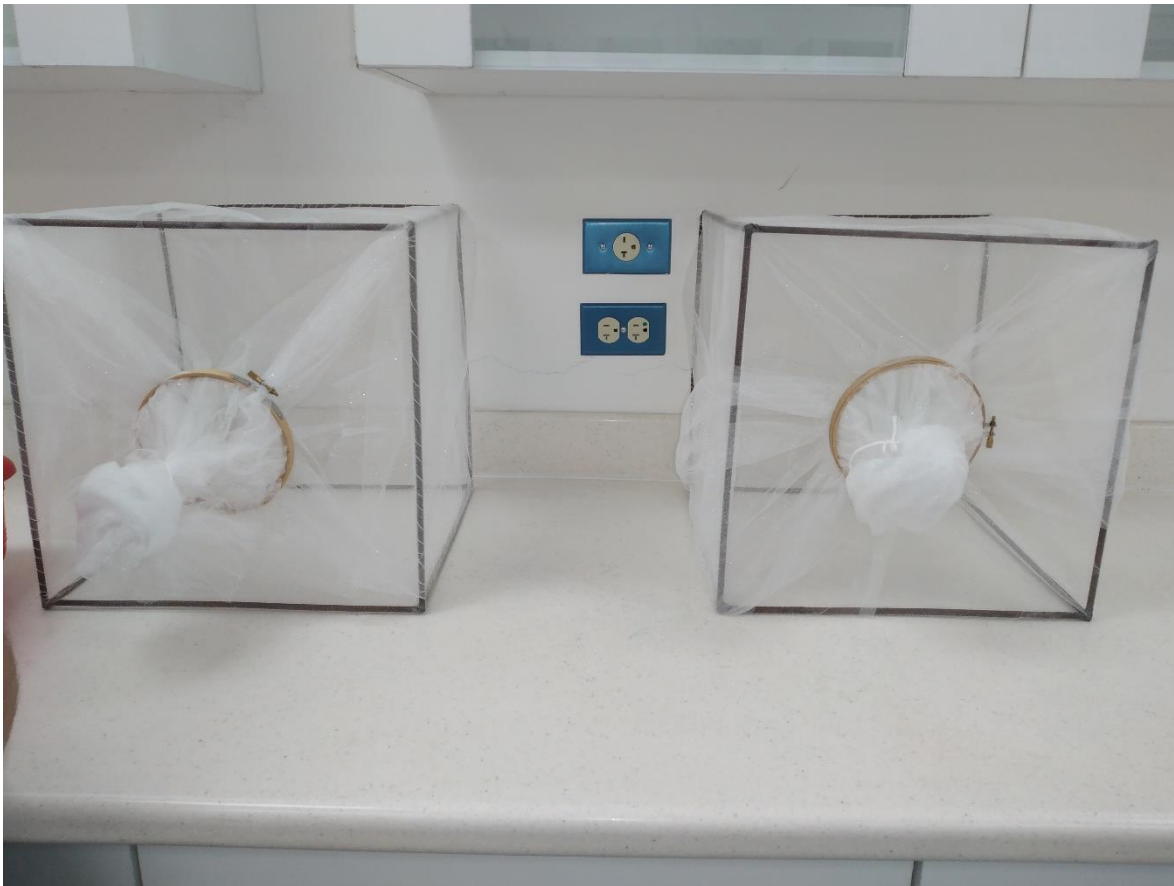


Figura 18

Captura de larvas *Aedes aegypti* en cementerio Nuevo de Nagarote



Figura 19

Medición de la acción repelente de los productos



Figura 20

Larvas de Aedes aegypti alimentándose con pienso para conejo



Figura 21

Larvas de Aedes aegypti en estado de pupa listas para eclosionar



Figura 22

Apetencia de los zancudos *Aedes aegypti* en el ensayo blanco



Figura 23

Hembra Aedes aegypti alimentada en el ensayo con el blanco



Lorgia Karelia Saballos Bone

Figura 24

Nivel bajo de iluminancia

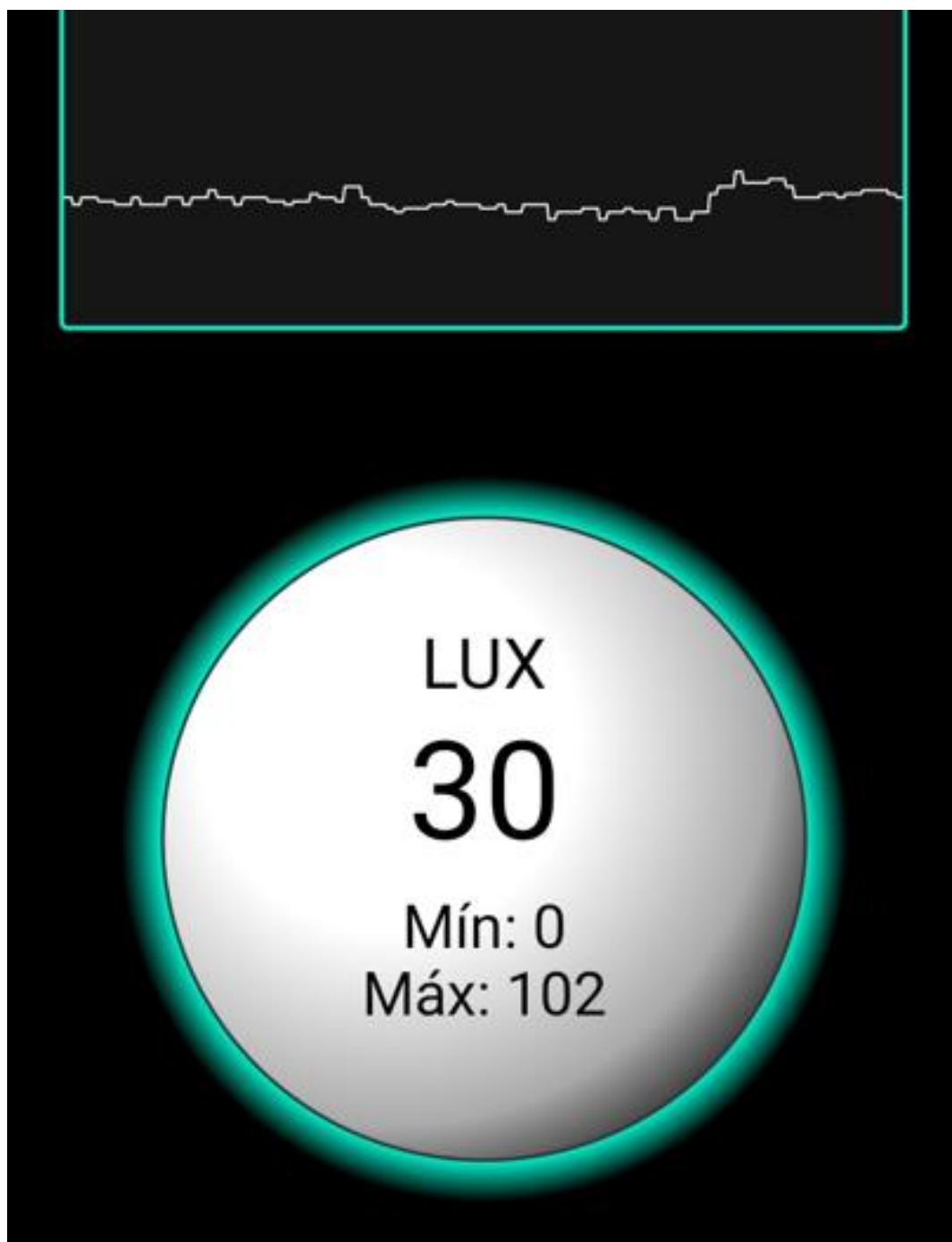


Figura 25

Nivel bajo de iluminancia



Anexo 20

Etiqueta del repelente

Figura 26

Etiqueta del repelente de la pre formulación 1



Figura 27

Etiqueta del repelente de los extractos puros

REPELENTE

ORGAN REPLEX

CON EXTRACTOS NATURALES

- INGREDIENTE:
EXTRACTO DE UCALIPTO, NEEM Y
ROMERO



SPRAY
100 ML
LOTE 205111

EVITE EL CONTACTO CON LOS OJOS Y MUCOSA
NO INGERIR. NO APLICAR SOBRE LA PIEL
DAÑADA. NO APLIQUE CERCA DE LOS OJOS Y BOCA
DESCONTINUE SU USO SI APARECE ALGUN SIGNO
DE IRRITACIÓN

Anexo 21

Fichas toxicológicas de los excipientes

Figura 28

Ficha toxicológica del alcohol isopropílico

**HOJA DE SEGURIDAD
(MSDS)
ALCOHOL ISOPROPILICO (IPA)**

Rótulo NFPA

Rótulos UN

Fecha Revisión: 15/10/1997

TELEFONOS DE EMERGENCIA: Corquiven: +58 (241) 832.73.49 / 832.70.92 / 838.95.68

IDENTIFICACION

Sinónimos: IPA, Isopropanol, 2-Propanol, Dimetil Carbinol, Carbinol dimetilico.
Fórmula: CH₃CHOHCH₃
Composición: 99 % mínimo de pureza.
Número Interno:
Número CAS: 67-63-0
Número UN: 1219
Clases UN: 3.2
Usos: Manufactura de acetona y sus derivados, acetato de isopropilo y glicerina; disolvente para aceites esenciales, alcaloides, gomas, resinas, derivados de celulosa, de revestimientos; agente anticongelante para combustibles líquidos, productos farmacéuticos, perfumes, lacas, procesos de extracción, agente

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

Apariencia: Líquido incoloro de olor característico agradable.
Gravedad Especifica (Agua=1): 0.786 / 20 °C
Punto de Ebullición (°C): 82
Punto de Fusión (°C): -82 a -89
Densidad Relativa del Vapor (Aire=1): 2.07
Presión de Vapor (mm Hg): 33.0 / 20 °C
Viscosidad (cp): 2.1
pH: N.A.
Solubilidad: Soluble en alcohol, éter y cloroformo.

ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Estabilidad: Estable bajo condiciones normales.
Incompatibilidades o materiales a evitar:
Agua: No **Aire:** No **Otras:** Ácido nítrico concentrado, ácido sulfúrico, agentes oxidantes fuertes, aldehidos, halógenos y compuestos halogenados.

INFORMACION TOXICOLOGICA

Moderadamente tóxico por ingestión. Baja toxicidad por contacto. Se puede absorber a través de la piel.
 DL50 (oral, ratas) = 5.84 g/kg.

Figura 29

Ficha toxicológica de la glicerina

RIF: J-30845025-1

HOJA DE SEGURIDAD
(MSDS / Material Safety Data Sheet)

GLICERINA



Rombo NFPA-704



Rótulos UN

Fecha Revisión: 02/06/2007

*** TELEFONOS DE EMERGENCIA ***

CORQUIVEN, C.A. : +58 (241) 832.73.49 / 832.70.92 / 838.95.68 - Otros: *171

IDENTIFICACION

Sinónimos	: Glicerol, Alcohol Glicílico, Glicil alcohol, 1, 2, 3 Propanotriol, Trihidroxipropano.
Fórmula	: C3H5(OH)3
Composición	: 99.8% de pureza
Número Interno	:
Número CAS	: 56-81-5
Número UN	: N.R.
Clases UN	: 9.1
Usos	: Resinas alquídicas, celofán, explosivos, gomas de ester, productos farmacéuticos, perfumería, plastificante para celulosa regenerada, acondicionamiento de tabaco, licores, disolventes, rollos para tinta de imprenta, polioles de poliuretano, agente emulsionante, sellos de gomas y tintas de copia, humectante.

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

Apariencia	Líquido viscoso transparente de olor neutro.
Gravedad Específica (Agua=1)	1.260 / 20°C
Punto de Ebullición (°C)	290
Punto de Fusión (°C)	18
Densidad Relativa del Vapor (Aire=1)	3.20
Presión de Vapor (mm Hg)	3 / 20°C
Viscosidad (cp)	N.R.
pH	N.A.
Solubilidad	Soluble en agua y alcohol. Insoluble en éter, benceno, cloroformo, aceites finos y volátiles.

ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Estabilidad : Estable bajo condiciones normales

Incompatibilidades ó Materiales a Evita

Agua : No **Aire** : No

Otras : Peligro de fuego o explosión al contacto con agentes oxidantes fuertes como hidróxido de cromo, clorato o permanganato de potasio, hipoclorito de sodio, cloro, óxido crómico, permanganato de potasio. Riesgo de explosión al contacto con oxidantes, peróxido sódico, ácido nítrico más ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno.

INFORMACION TOXICOLOGICA

Considerado como no tóxico.
DL50= 12.6 g/Kg.

Figura 30

Ficha toxicológica del metilparabeno

HOJA DE SEGURIDAD
(MSDS)
METIL PARABENO



Fecha Revisión: 15/06/2001

TELEFONOS DE EMERGENCIA: Corquiven: +58 (241) 832.73.49 / 832.70.92 / 838.95.68

IDENTIFICACION

Sinónimos: Para-hidroxibenzoato de metilo; Metil para-hidroxibenzoato; P-hidroxibenicoato ester, Acido metil ester p-hidroxibenzoico.
Fórmula: C₈H₈O₃
Composición: 100% de pureza
Número Interno:
Número CAS: 99-76-3
Número UN: N.R.
Clases UN:
Usos: Medicina; aditivos de alimentos (conservador); agente antimicrobiano.

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

Apariencia: Cristales incoloros o polvo cristalino blanco. Inodoro o olor débil característico, sabor ligeramente ardiente.
Gravedad Específica (Agua=1): N.A.
Punto de Ebullición (°C): 270-280
Punto de Fusión (°C): 125 - 128
Densidad Relativa del Vapor (Aire=1): N.A.
Presión de Vapor (mm Hg): 0.5 / 113°C
Viscosidad (cp): N.A.
pH: 5.8
Solubilidad: Soluble en acetona, alcohol, éter. Ligeramente soluble en agua, benceno, tetracloruro de carbono.

ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Estabilidad: estable bajo condiciones normales.
Incompatibilidades o materiales a evitar:
Agua: No **Aire:** No **Otras:** Es incompatible con álcalis y agentes oxidantes fuertes.

INFORMACION TOXICOLOGICA

LD50 (oral, rata) = 960 mg/kg. Producto poco tóxico. No hay información disponible sobre cancerogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, efectos reproductivos y dosis letales.

Figura 31

Ficha toxicológica del propilparabeno

HOJA DE SEGURIDAD (MSDS) PROPILPARABENO

Rótulo NFPA

Rótulos UN

Fecha Revisión:

TELEFONOS DE EMERGENCIA: Corquiven: +58 (241) 832.73.49 / 832.70.92 / 838.95.68

IDENTIFICACION

Sinónimos: p-hidroxibenzoato de propilo, Nipasol, Tegosept p, Protaben, Propil ester del ácido 4-hidroxibenzoico, Propil ester del ácido p-hidroxibenzoico, Paseptol, Parasept, Aseptofom P, Betacide P, Bonomold OP, Aseptofom de Propilo, p-oxibenzoato de propilo.

Fórmula: HO-C6H4-CO2C3H7

Composición: 100% puro

Número Interno:

Número CAS: 94-13-3

Número UN: N.R.

Clases UN:

Usos: Medicina; aditivo de alimentos; fungicida; control de moho en el envasado de salchicha.

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS

Apariencia:	Cristales pequeños e incoloros, o polvo blanco.
Gravedad Específica (Agua=1):	1.063 / 102 °C
Punto de Ebullición (°C):	133
Punto de Fusión (°C):	95-98
Densidad Relativa del Vapor (Aire=1):	N.A.
Presión de Vapor (mm Hg):	N.A.
Viscosidad (cp):	0.5 / 122 °C
pH:	6 - 7
Solubilidad:	En agua: 0.04 g/ml a 25 °C, Ligeramente soluble en alcohol, éter y acetona.

ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

Estabilidad: Estable bajo condiciones normales.

Incompatibilidades o materiales a evitar:

Agua: No **Aire:** No **Otras:** Materiales oxidantes y álcalis.

INFORMACION TOXICOLOGICA

LD50 (oral, ratón) = 6332 mg/kg. LD50 (oral, conejo) = 6 g/kg. LD50 (subcutáneo, ratón) = 1650 mg/kg. LD50 (oral, perro) = 6000 mg/kg. LD50 (intraperitoneal, ratón) = 200 mg/kg. No hay información disponible sobre cancerogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad, efectos reproductivos y dosis letales. Sensibilizante de la piel.

Anexo 22

Solicitud para ensayos preclínicos en el área de Entomología



FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
2021: "Año del Bicentenario de la Independencia de Centroamérica"

Managua, 03 de mayo del 2021

Dr. Carlos Sáenz
Directora CNDR
MINSa
Sus manos

Estimado Doctor Sáenz:

Reciba saludos fraternos de la Dirección del Departamento de Química de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua.

El Departamento de Química ofrece la carrera de Química-Farmacéutica, la cual según su plan de estudio se desarrolla a lo largo de 5 años. Uno de los requisitos para optar al título de Químico Farmacéutico consiste en la elaboración de un trabajo de culminación de estudio.

En ese sentido, deseamos solicitar su buena voluntad en apoyar el desarrollo de la investigación titulada: "Elaboración de repelente orgánico a partir de plantas *Eucalyptus globulus L.* (Eucalipto), *Azadirachta indica A.* (Neem) y *Salvia Rosmarinus L.* (Romero) contra el agente *Aedes aegypti*".

Para tal fin se requiere su autorización para realizar la crianza del agente vector y la realización de ensayos preclínicos del producto en el área de entomología que usted dignamente dirige.

La estudiante a cargo de esta investigación será:

- Lorgia Karelía Saballos Bone

Esperando su amable colaboración y ánimo de apoyar y participar en el proceso de formación de nuevos profesionales que estarán al servicio de la población, me despido de usted deseándole éxitos en sus labores.

Adjunto a la presente el protocolo de investigación.

Atentamente,



Ph.D. Frank Medina
Director del Departamento de Química
UNAN-Managua
Tel.: 22786769 Ext.155
Correo: frankmedra2018@gmail.com

Cc. Lic. Emperatriz Lugo-Directora de Entomología Médica.

¡A la libertad por la Universidad!

Rotonda Universitaria Rigoberto López Pérez 150 m al este /pabellón 46
Cod. Postal 663-Managua, Nicaragua/ Telf.: 22786765/Ext.5145/www.unan.edu.ni/madizu76@yahoo.com



Anexo 23

Certificado de identificación de las plantas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN-MANAGUA

CERTIFICADO DE IDENTIFICACION

El Herbario del Departamento de Biología de la UNAN Managua a petición de la bachillera Br. Lorgia Karellia Saballos Bone (287-0303097-0000Q), hace constar las siguientes identificaciones con base en criterios taxonómicos: *Eucalyptus camandulensis* Dehnh conocido comúnmente como eucalipto; *Azadirachta indica* A. Juss conocido como neem; y *Rosmarinus officianalis* L. de nombre común romero. Todas especies introducidas no pertenecientes a la flora nativa de América.

A solicitud de la parte interesada y para los fines que estime conveniente se extiende la presente en la ciudad de Managua a los 23 días del mes de septiembre del 2021.

Sin más que referir

Layo Leets Rodríguez
layo.leets@unan.edu.ni
Técnico del herbario del
departamento de Biología



Henry López Guevara
henry.lopez@unan.edu.ni
Técnico del herbario del
departamento de Biología