



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Optimización de una fórmula para la elaboración de un repelente a base de aceite esencial de *Dacryodes peruviana* (Copal)

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: González Sánchez, Inés Alejandra

DIRECTOR: Valarezo Valdez, Benito Eduardo, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACION

Master of Science

Edgar Santiago Ojeda Riascos

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

El presente trabajo de titulación: **Optimización de una fórmula para la elaboración de un repelente a base de aceite esencial de *Dacryodes peruviana* (Copal)**, realizado por Inés Alejandra González Sánchez ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, febrero del 2018

f).....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo. Inés Alejandra González Sánchez, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **Optimización de una fórmula para la elaboración de un repelente a base de aceite esencial de *Dacryodes peruviana* (Copal)**, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo director (a) Benito Eduardo Valarezo Valdez, del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

F.....

Autora: Inés Alejandra González Sánchez

Cédula: 1105231698

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, principalmente a mis padres Hilda y Humberto por ser los pilares fundamentales de mi vida, por el amor, confianza que me han brindado hasta el momento, doy a gracias a Dios por disfrutar los momentos grandes de la vida con ellos, también dedico este trabajo a mis hermanos Bolney, Henry, Anita , Elcy (+), Manuel, Diego, Ramiro, Joel por ser mi compañía, por ser fuerza y aliento para salir adelante en cada obstáculo que se presentó en el camino, por darme ánimos en los momentos difíciles de la vida y sobre todo por los consejos.

A mis sobrinos Hared, Paula, Justin, Kimy, Alejandro, Jhair, Victoria que han sido mis compañeros de malas noches, pero sobre todo por todos los momentos que hemos compartido y mis cuñados.

A mis amigas con las que he aprendido mucho y han sido fundamentales para culminar esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTO

“Mientras el río corra, los montes hagan sombra y en el cielo haya estrellas, debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre agradecido”.

Quiero dar gracias a Dios por bendecirme diariamente y permitirme culminar una etapa más en mi vida, por mi familia, amigos.

Agradezco a mis padres por todo el apoyo incondicional recibido por parte de ellos, por la vida y el amor que me dan, así mismo a mis hermanos por nunca dejarme sola, a mis sobrinos y cuñados.

Quiero agradecer inmensamente al Ph. D Eduardo Valarezo por el apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo, así mismo por las enseñanzas brindadas hacia mi persona.

Al M.Sc. Santiago Ojeda y M. Sc Lupe Espinoza por compartir sus conocimientos y de esta manera contribuir con la elaboración del presente proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACION	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	ix
ANEXOS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1	4
MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Aceites esenciales	5
1.1.1 Aplicaciones y Usos de los aceites esenciales	5
1.2. Familia de <i>Burseraceae</i>	5
1.2.1 Género de <i>Dacryodes</i>	6
1.2.2 <i>Dacryodes peruviana</i>	6
1.2.3 Clasificación taxonómica.....	7
1.2.4 Composición química del aceite esencial de <i>Dacryodes Peruviana</i>	7
1.3. Fitocosméticos	7
1.3.1 Formas farmacéuticas líquidas y tipos de administración	8
1.3.2. Tipos de lociones.....	8
1.3.3 Excipientes	9
1.4 Repelentes Naturales.....	10
1.4.1 Efecto repelente de los aceites esenciales.....	10
1.4.2 Concentración de los aceites esenciales con efecto repelente	10
1.4.3 Componentes responsables de la actividad repelente de los aceites esenciales	11
1.5 Diseño Factorial	11
CAPÍTULO 2	12

METODOLOGÍA	12
2.1 Composición química del aceite esencial.....	13
2.1.1 Cromatografía de gases.....	13
2.1.2. Identificación cuantitativa de <i>Dacryodes peruviana</i>	13
2.2 Determinación De Las Propiedades Físicas	14
2.2.1 Densidad relativa.....	14
2.2.2 Índice de refracción.	15
2.2.3 Determinación de la solubilidad	15
2.3 Diseño factorial.....	15
2.3.1 Fundamento.....	15
2.3.3 Tiempo de análisis.....	17
2.3.2 Composición de las muestras	16
2.3.3 Elaboración y acondicionamiento de las muestras	16
2.4 Planteamiento de la fórmula	18
2.4.1 Proceso de elaboración de la Loción repelente	19
2.5 Pruebas de repelencia	20
CAPÍTULO 3	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
3.1 Determinación química del aceite esencial	23
3.2 Preformulación	24
3.2.1 Solubilidad	25
3.3 Diseño factorial realizado al aceite esencial de <i>D.peruviana</i>	26
3.4 Elaboración de la loción repelente.....	39
3.4.1 Formula de composición	39
3.5 Bioensayos de repelencia	40
CONCLUSIONES.....	43
RECOMENDACIONES	44
ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación de la solubilidad (Método descriptivo)
- Tabla 2.** Excipientes utilizados dentro de las fórmulas para el diseño factorial
- Tabla 3.** Asignación de las muestras en los viales
- Tabla 4.** Distribución de los excipientes para llevar acabo el diseño factorial
- Tabla 5.** Fórmula para la elaboración de la loción repelente
- Tabla 6.** Clasificación del grado de repelencia
- Tabla 7.** Compuestos identificados a partir del Índice de Kovats
- Tabla 8.** Propiedades físicas del aceite esencial
- Tabla 9.** Determinación de la solubilidad de aceite esencial de *D. peruviana*
- Tabla 10.** Distribución de las mezclas en base al diseño factorial
- Tabla 11.** Matriz de mezclas obtenida a partir del diseño 2^3
- Tabla 12.** Concentración y porcentaje de degradación del limoneno a temperaturas de 30°C y 40°C durante dos meses
- Tabla 13.** Análisis de la varianza de los efectos Principales primer mes 30°C
- Tabla 14.** Resultados del análisis de ANOVA realizado de las interacciones dobles en relación al tratamiento 30°C primer mes
- Tabla 15.** Comparación en parejas Tukey en las interacciones dobles 30°C primer mes
- Tabla 16.** Análisis de la varianza de los efectos Principales primer mes 40°C
- Tabla 17.** Resultados del análisis de ANOVA realizado de las interacciones dobles de respuesta en relación al tratamiento 40°C primer mes
- Tabla 18.** Comparación en parejas Tukey en las interacciones dobles 40°C primer mes
- Tabla 19.** Análisis de la varianza de los efectos Principales Segundo mes 30°C
- Tabla 20.** Resultados del análisis de ANOVA realizado de las interacciones dobles de respuesta en relación al tratamiento 30°C segundo mes
- Tabla 21.** Comparación en parejas Tukey en las interacciones dobles 30°C segundo mes
- Tabla 22.** Análisis de la varianza de los efectos Principales segundo mes 40°C
- Tabla 23.** Resultados del análisis de ANOVA realizado de las interacciones dobles de espuesta en relación al tratamiento 30°C segundo mes
- Tabla 24.** Comparación en parejas Tukey en las interacciones dobles 40°C segundo mes
- Tabla 25.** Cálculos realizados para obtener formula unitaria
- Tabla 26.** Prueba de repelencia loción
- Tabla 27.** Prueba de repelencia Aceite esencial

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Figura 1.** Cromatograma del aceite esencial *D. peruviana*
- Figura 2.** Concentración Obtenida mediante los compuestos de DB5-ms
- Figura 3.** Grafica de efectos principales primer mes de 30°C
- Figura 4.** Interacciones dobles del primer mes a temperatura de 30°C
- Figura 5.** Efectos principales primer mes a 40°C
- Figura 6.** Interacciones dobles primer mes a 40°C
- Figura 7.** Efectos principales del segundo mes 30°C
- Figura 8.** Interacciones dobles segundo mes 30°C
- Figura 9.** Efectos principales del segundo mes 40°C
- Figura 10.** Interacciones dobles segundo mes 40°C
- Figura 11.** Prototipo de loción repelente elabora al 3%
- Figura 12.** Comparación de repelencia del aceite y loción

ANEXOS

- Anexo 1.** Cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas serie 5973 Inert
- Anexo 2.** Trampa de luz y aspirador de mosquitos utilizada en las pruebas de repelencia
- Anexo 3.** Parcelas de arroz ubicadas en el sector Santa Marianita de Macará
- Anexo 4.** Pruebas de repelencia del aceite esencial
- Anexo 5.** Pruebas de repelencia de Loción

RESUMEN

La presente investigación se realizó con la finalidad de optimizar una fórmula que tenga aceite esencial de *Dacryodes peruviana* (Copal) como principio activo y posteriormente determinar la repelencia de la muestra, para lo cual se realizaron estudios de preformulación y formulación para la elaboración del fitocosmético. Se utilizó un diseño factorial de 2^k con la objetivo de obtener una fórmula estable, como resultado final los excipientes que se incluirán dentro de la fórmula tenemos a BHT (Antioxidante), EDTA (regulador de pH), Alcohol desodorizado (Cosolvente), siendo estos los que generen una loción repelente segura y eficaz, de igual manera las pruebas de repelencia ayudaron a determinar que la loción al 3% es más efectiva.

Palabras clave: *Dacryodes peruviana*, excipientes, diseño factorial, repelencia

ABSTRACT

The present investigation was carried out in order to optimize a formula that has essential oil of *Dacryodes peruviana* (Copal) as an active ingredient and later to determine the repellency of the sample. for which preformulation and formulation studies were carried out for the preparation of phytocosmetic. A 2^k factorial design was used in order to obtain a stable formula, As a final result, the excipients that will be included in the formula have a BHT (Antioxidant), EDTA (pH regulator), Deodorized Alcohol (Cosolvent), these being the ones that generate a safe and effective repellent lotion, likewise Repellency tests helped determine that the 3% lotion is more effective

Key words: *Dacryodes peruviana*, excipients, factorial design, repellency

INTRODUCCIÓN

El presente estudio consiste en la optimización de una fórmula para la elaboración de un repelente a base de aceite esencial de *Dacryodes Peruviana*. Se ha desarrollado en tres capítulos, el primer capítulo es el marco teórico, consiste en la fundamentación teórica en la que se basa el proyecto, En el capítulo dos se muestran las técnicas y métodos que se van a utilizar en la investigación, el capítulo tres se presentan los resultados obtenidos en la investigación y a discusión. Este estudio contribuye al estudio de la flora aromática de la Región Sur del Ecuador, principalmente en la “Evaluación de la flora aromática de la provincia de Zamora Chinchipe”, que se lleva a cabo en el departamento de Química y Ciencias exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja. Mediante este estudio se incrementan los conocimientos dentro del ámbito de los aceites esenciales, acerca de sus propiedades y sus aplicaciones en las diferentes áreas como son: farmacéutica, cosmética, alimenticia; así mismo se determinan las propiedades físicas, químicas y biológicas de ellos, y el producto pueden ser considerados como materia prima en las industrias o para la formulación de subproductos dependiendo de los metabolitos secundarios.

El objetivo general a desarrollar es: Optimizar la fórmula de un repelente de aceite esencial de *Dacryodes peruviana* (copal) en base a un diseño factorial. Así mismo los objetivos específicos considerados también como componentes del proyecto son: Determinar los parámetros físico-químicos del aceite esencial de *Dacryodes peruviana*, determinar la capacidad repelente del aceite esencia de *Dacryodes peruviana*, determinar la mejor combinación de excipientes utilizando un diseño factorial para la elaboración del repelente de *Dacryodes peruviana* y evaluar efecto repelente de la formulación a base del aceite esencial de *Dacryodes peruviana*. Para los estudios de preformulación se realizaron estudios de solubilidad del aceite esencial con los diferentes excipientes que son utilizados en la fórmula. El diseño factorial escogido fue de 3 factores con dos niveles, con este diseño factorial se realiza las distintas mezclas de excipiente con el aceite esencial, probando, 30°C y 40°C. Por un periodo de 2 meses, luego mediante Cromatografía de gases se determinó en que mezclas el principio activo se mantiene en mayor cantidad. Una vez que se escoge la mezcla se vuelve a realizar las pruebas de repelencia. Para determinar la repelencia de la fórmula se utilizó una trampa de luz para atraer a los mosquitos y se los capturo mediante un aspirador, luego se utilizó el método planteado por Tolkder y Howse.

CAPÍTULO 1
MARCO TEÓRICO

1.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales, son fracciones líquidas y volátiles, que por lo común se lo obtienen por arrastre de vapor de agua, son estas fracciones las responsables del aroma de las plantas debido a que constituye mezclas complejas constituidas por una gran variedad de compuestos orgánicos. Este tipo de aceites son de gran impacto en lo que corresponde a la industria alimentaria, cosmética, agrícola y primordialmente las Farmacéuticas, ya que actualmente es una industria en constante desarrollo y crecimiento para un gran número de países (Plazas, 2011).

1.1.1 Aplicaciones y Usos de los aceites esenciales

Siempre ha existido una íntima relación entre el hombre y las plantas, permitiendo de esta forma que el ser humano aproveche las ventajas que éstas le brindan, ya sea como alimento o en la medicina tradicional. Sin embargo existe gran variedad de géneros y especies vegetales y es imposible poder conocer todos los beneficios que se pueden obtener de las mismas, por tal motivo se ha tenido que experimentar varias veces con la misma especie vegetal para conocer todas las virtudes que nos pueden brindar (Rendón, Rebollar, Caballera, & Martínez, 2001).

Los metabolitos secundarios dentro de la planta son los encargados de que sobreviva, estos son compuestos de bajo peso molecular generados por varias vías sintéticas, Los aceites esenciales son más populares debido a sus diferentes virtudes y se producen en porcentajes del 0.5% – 6% en las distintas plantas aromáticas, las distintas sustancias que se producen son alcoholes, ácidos, esteroides, fenoles, terpenos y otro tipo de sustancias, varios de estos compuestos son caracterizados por tener un olor típico y gran volatilidad (Sthashenko, 2009; Sellar, 1996).

1.2. Familia de *Burseraceae*

Los árboles de la familia de *Burseraceae* se distribuyen en las selvas bajas de todo el mundo actualmente se han reportado alrededor de 100 especies, en América esta clase de árboles se la puede encontrar desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Perú; una de las principales características de los árboles de esta familia es ser de tamaño promedio, ramificados; el color de la corteza puede variar y ser de color amarilla, roja o gris, la textura de algunas de las cortezas es exfoliante, en épocas de lluvia florecen y carecen de flores en temporada seca (Diaz et al., 2013).

1.2.1 Género de *Dacryodes*

Este género pertenece a la familia de las *Burseraceae*. Se han encontrado descritas alrededor de 70 de las especies están distribuidas en los bosques tropicales húmedos de Asia (16 especies), en los bosques tropicales de África (18 especies), y en los bosques tropicales de América (22 especies y 14 especies que no se encuentran descritas) (Onana, 2008).

El género *Dacryodes* tiene una amplia distribución geográfica, en los neotrópicos crecen naturalmente en zonas tropicales de América, África y Asia. Es un árbol alto, de profundas raíces, sin refuerzos, permanentemente verde, su corteza es lisa, escamosa con albura pálida. Las flores son unisexuales. Los frutos presentan un pericarpio carnoso y grueso y es el que predomina en las áreas de bosques lluviosas (Goldstein, 1974).

Los árboles de este género característicamente son arboles grandes, perennes, frutos carnosos, se conservan verdes, flores unisexuales, fruto con pericardio carnoso y grueso; muchas especies de este género son utilizadas como fuente maderera, sin embargo tiene una amplia aplicación en la medicina popular como para tratar la Malaria, fiebre y enfermedades cutáneas, y actualmente se han empezado a investigar la composición nutricional, fitoquímica y actividades biológicas de las especies del género *Dacryodes* (Hong et al., 2010).

1.2.2 *Dacryodes peruviana*

Dacryodes Peruviana es también conocido como copal, de hojas perennes, que mide alrededor de 20 metros de altura, este tipo de árbol es utilizado como madera local y comercialmente. Las hojas de este árbol tiene una longitud de 8 a 28 cm y de ancho de 4 a 10, de color verde oscuro, membranosas por su lamina oblonga, acuminadas en las base, margen o borde liso y su nerviación es pinnantineria, las inflorescencias de este árbol son espigas de 22 cm de largo, los pétalos semiovalados, el fruto es una drupa ovoide negro brillante, cuando madure mide aproximadamente 33 mm de largo y 24 mm de diámetro, el pericarpio llega a ser de 4 mm de grosos. La raíz es axomorfa pivotante. El uso medicinal que tiene esta planta es del látex que se obtiene del tronco, se aplica sobre la piel para curar las varices, mientras que sus hojas son utilizadas por medio de infusión para el asma (Diaz et al., 2013)

1.2.3 Clasificación taxonómica

Nombre Científico: *Dacryodes Peruviana*

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia Burseraceae

Género: *Dacryodes*

Epíteto Específico: peruviana

Autor de Epíteto Específico: (Loes) H.J Lam

Determinación: Daly, D

Fecha de Determinación: 2010

1.2.4 Composición química del aceite esencial de *Dacryodes Peruviana*

Entre los compuestos mayoritarios que se han logrado identificar del aceite esencial de *Dacryodes peruviana* tenemos el α - felandreno, limoneno, β - felandreno, terpinoleno. De los 44 compuestos que se lograron encontrar en el aceite esencial de *Dacryodes peruviana* mediante DB-5MS 32 de ellos fueron identificados, mientras con HPINNOWAX se identificaron 31 compuesto, con lo que se determinó que entre los compuestos mayoritarios que se encuentran en el aceite esencial de *Dacryodes peruviana* son: α -felandreno en un 50,32%, limoneno en un 23,03%, β -fellandreno en un 8,27%, terpinoleno 5,23%, cymene 3,06%, β -pineno en un 2,57% y sabiene 1, 44% (Andrade, 2016).

1.3. Fitocosméticos

Los ingredientes vegetales y otros productos naturales brindan información acerca de los extractos y componentes vegetales que son utilizados en la cosmética. Existe información del uso de plantas en productos cosméticos en alimentos y en medicina desde los tiempos más remotos. Los productos elaborados de ingredientes naturales se asocian con la salud, bienestar y belleza. La industria cosmética actualmente compite con las grandes industrias farmacéuticas (Ferraro, Martino, Bandoni, & Nadinic, 2015).

Los fitocosméticos son productos obtenidos mediante procesos tecnológicamente adecuados, empleando primordialmente materias primas vegetales, con un propósito profiláctico, paliativo, curativo, o con fines de diagnóstico, se caracteriza porque se conoce su eficacia y de los riesgos de su uso, así como reproducibilidad y la constancia de su calidad, los fitocosméticos pueden ser comercializados de diferentes maneras: tabletas, capsulas, grajeas, ungüentos, polvos, talcos, elixires y otros (Cea de Maya, 2013).

Los fitocosméticos se encuentran disponibles en todos los centros de dispensación de medicamentos, estos actualmente se han convertido en un arsenal terapéutico con los que cuenta el médico para poder laborar (Rodríguez, Lopez, & Casas, 2002).

1.3.1 Formas farmacéuticas líquidas y tipos de administración

Este tipo formas farmacéuticas pueden ser tópicas u orales, en el caso de las tópicas suelen ser aplicadas sobre la piel que no tiene lesión mediante frotación para poder obtener un efecto local. Las formas más frecuentes que podemos encontrar son lociones, suspensiones o emulsiones (Cremonini, 2011).

Es imprescindible que para estas formas farmacéuticas o de cualquier otro tipo, se tengan en cuenta diferentes factores, como es la elección del principio activo y excipientes adecuados, la forma farmacéutica y considerar los efectos dermatológicos y cosmetológicos del vehículo principal; con el cumplimiento de estos factores se cerciora el uso del medicamento y del efecto terapéutico que deseemos obtener (Muños, 2005).

1.3.2. Tipos de lociones

Las lociones son preparaciones acuosas que se aplican sobre la piel evitando fricción. Pueden ser clasificadas como soluciones verdaderas, soluciones coloidales, emulsiones o suspensiones. Actualmente mediante las lociones tipo emulsión y suspensión se ha reemplazado las pomadas y cremas, las primeras son fáciles de remover de la piel y la ropa, además que se ha comprobado que presentan menos irritación, las lociones se las aplica sobre la piel dejando una capa fina de principios activos y excipientes. Como vehículo para la preparación de lociones principalmente tenemos el agua purificada, se le puede agregar alcohol, glicerina, propilenoglicol, o diferentes sustancias que permitan una fácil aplicación de la loción sobre la piel.

Las lociones de tipo loción o emulsión sujeta a agentes emulsificantes o suspensores, así como pueden ser excipientes estabilizantes o preservantes.

Las Lociones emulsificantes son de tipo O/W es decir aceite en agua en donde es necesario saber que excipientes se encuentran en la fase oleosa y en la fase acuosa, por lo general en la fase oleosa vamos a encontrar excipientes como: lanolina, parafina, aceites vegetales, ceras, etc., (Sharapin & Pinzón, 2000).

1.3.3 Excipientes

Intentamos hablar de excipientes cuando nos referimos a los aditivos para transformar la materia en un producto que sea farmacológicamente activo, que puede ser un producto tanto farmacéutico o cosmético. Los excipientes son tan importante que es necesario conocer las características de cada uno antes de formular, las propiedades físico y químicas de cada excipiente son primordiales, ya que ayudan a modificar consistencia, viscosidad para evitar incompatibilidades y obtener las características deseadas en el producto (Alegria & Amaya, 2007).

- Cosolventes

Los cosolventes son utilizados para ayudar a disolver el principio activo y mejorar la combinación con los excipientes, la solubilidad de cada uno de estos depende de la polaridad, relacionada directamente con la constante dieléctrica

- Conservantes

Ayudan a evitar el crecimiento de microorganismos, aun más cuando la forma farmacéutica es multidosis, se corre el riesgo de que exista mayor contaminación, entre los principales conservantes tenemos los parabenes, ácido benzoico, etanol cloruro, etc.

- Antioxidantes

Los antioxidantes ayudan a prevenir alteraciones de oxidación por aire en el producto.

- Reguladores de pH

Es importante que el producto que se vaya a formular tenga un pH igual al de la piel, en este caso debería tener un pH ácido, para conseguir que el producto que tenemos se torne ácido podemos emplear ácido cítrico, ácido ascórbico y sulfatos.

1.4 Repelentes Naturales

Los repelentes sintéticos presentan ciertas desventajas debido a su conocida toxicidad y efectos indeseables ya sea por el principio activo o los excipientes, pero la mayoría presentan efectos indeseables. Uno de los compuestos calificados como perjudiciales para el ser humano y que se pueden hallar en los repelentes tenemos el DEET (N,N-DIETIL, META TOLUAMINA) (Wilson & Verpoorte, 2015), sin embargo entre las alternativas para combatir los mosquitos y evitar los repelentes sintéticos es el uso de repelentes botánicos, en varios sectores amazónicos se ha podido observar como las hojas de ciertas plantas y el humo que se produce al quemarlas es efectivo para evitar la picadura de zancudos (Hernandez, 2011).

1.4.1 Efecto repelente de los aceites esenciales

El uso de los repelentes sirven como medida preventiva para evitar ser mordido por insectos, molestias, reacciones alérgicas que se pueden generar, así como las enfermedades que se pueden transmitir (Gimenez Serrano, 2005).

Existe antecedentes de aceites esenciales de varias plantas que se les ha comprobado su efecto repelente y es por esto que en varios estudios se los ha utilizado como control, como ejemplo tenemos a: *Myzus persicae*, *Solanum berthaultii*, *Cymbopogon atratus*, *Diuraphis noxia*, *Brevicoryne brassicae* (Ricci, Padín, & Kahan, 2002).

1.4.2 Concentración de los aceites esenciales con efecto repelente

Los productos naturales como los aceites esenciales y los extractos vegetales son algunas de las alternativas naturales que se pueden utilizar para combatir los diferentes insectos, existen pruebas donde se han evaluado el efecto repelente utilizando aceite esencial de laurel en una solución acuosa de propilenglicol al 2% como emulsionante, las concentraciones utilizadas dentro del ensayo fueron de 0,5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, y 3%. Comprobándose de esta manera que el efecto repelente aumenta conforme la concentración del aceite esencial, concluyendo así que es directamente proporcional, es decir a mayor concentración de aceite esencial mejor será el efecto repelente, mientras que a menor concentración disminuirá el efecto repelente (Ricci, Padín, & Hennig, 2011).

1.4.3 Componentes responsables de la actividad repelente de los aceites esenciales

Los aceites se pueden almacenar en distintos órganos de la planta, por ejemplo en la raíz y rizomas de cúrcuma y jengibre, del fruto de anís, hinojo, enebro y semilla de mostaza se puede también extraer aceite. Los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de aromas volátiles pertenecientes a diferentes clases de química orgánica: compuestos terpénicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles; entre los principales compuestos que se encuentran en los aceites esenciales son los terpenos: α -pineno, β -pineno, limoneno, 1,8 cineol, mircenol, timol, carvacrol, (Zacaria, 2012).

Entre las plantas que contienen estos compuestos tenemos: Citronella (*Cymbopogon nardus*), árbol de ruda (*Ruta graveolens*), Eucalipto (*Eucalyptus Citriodora*) (Daza & Florez, 2006).

1.5 Diseño Factorial

Este tipo de diseño se utiliza para conocer si determinados factores influyen en las diferentes variables, y en el caso de que si exista cierta influencia, esta se debe cuantificar estadísticamente, lo que hace necesario que se seleccionen factores, niveles y la posible combinación que se desea estudiar (Badii, Rodríguez, & Villalpando, 2007).

Para poder analizar el efecto de las variables se debe elegir al menos dos niveles para cada factor. De esta forma se podrá determinar cuál combinación de factores da una mejor respuesta, además que permite estudiar el efecto individual y en conjunto de los factores. El efecto de un factor se mide mediante el cambio de respuesta que va a existir al momento de intercambiar un factor por otro (Perez. 2015).

Las posibles variables que se pueden analizar mediante el diseño factorial en el repelente serían los excipientes que se emplearían dentro de la formulación, los resultados nos ayudarán a conocer cuál es la mejor combinación de excipientes para llevar a cabo la elaboración de la loción.

CAPÍTULO 2
METODOLOGÍA

2.1 Composición química del aceite esencial

La determinación química del aceite esencial se la realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas, dichas corridas se realizaron en una columna polar DB-5ms con el objetivo de obtener resultados cualitativos y cuantitativos

Para poder llevar la muestra al cromatógrafo, en un vial de cromatografía se coloca 10ul de la muestra y 990ul de diclorometano obteniendo una dilución del 1%, el mismo proceso se realiza con los hidrocarburos que comercialmente se han conocido como TPH-6RPM de CHEM SERVICE. Los Hidrocarburos inyectados fueron desde C₁₀ (Decano) hasta C₂₅ (Pentacosano) en columna DB-5ms, el tiempo de retención de los hidrocarburos es importante para poder determinar los índice de Kovats y poder identificar los compuesto, estos hidrocarburos se inyectaron siguiendo la misma metodología que se utilizó para inyectar el aceite esencial (Andrade, 2016).

2.1.1 Cromatografía de gases

Los compuestos químicos del aceite esencial de *D. peruviana* se identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG-EM). El equipo utilizado es un cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N, acoplada a un espectrómetro de masas serie 5973 Inert; dispone un sistema de datos "MSD-Chemstation D.01.00 SP1", además de tener un inyector automático Split/splitless serie 7683 (Anexo 1).

2.1.2. Identificación cuantitativa de *Dacryodes peruviana*

El resultado de la corrida cromatográfica se expresa en un cromatograma el cual es una representación gráfica producida por el detector en función del tiempo o volumen de edición. Para poder identificar es necesario tener en cuenta la posición de los distintos picos con respecto al eje del tiempo y el área es proporcional a la concentración de cada compuesto; esto permite el análisis cuantitativo (Stashenko & Martínez, 2010).

Una vez obtenido los cromatogramas se procede a realizar el análisis mediante la de los índices de Kovats de los cromatogramas obtenidos. Para empezar se debe comparar los tiempos de retención de los hidrocarburos con los tiempos de retención de los compuestos obtenidos en el aceite, como se observa en la siguiente ecuación:

$$IK = 100n + 100 * \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Dónde:

IK: Índice de retención de Kovats

n: Número de átomos de carbono en n-alcano;

t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto analizado, que eluye en el centro de n-alcanos;

t_{Rn}: Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado;

t_{RN}: Tiempo de retención de n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

Los índices de kovats de los compuestos obtenidos en la columna apolar se compararon con los valores reportados por Adams (Adamsm 2009) y bases electrónicas como Nist (National Institute of Standars and tecnology). De tal forma que el Índice de kovats calculado y leído debe ser menor a 30 unidades. Se tomó en cuenta el CAS que cada compuesto presenta para poder facilitar la búsqueda y así poder identificar los compuestos del aceite esencial de *Dacryodes peruviana* (Mora, Piedra, Benavides, & Rupert, 2012).

2.2 Determinación de las propiedades físicas

Las pruebas físicas realizadas al aceite esencial de *D. peruviana* fueron, Índice de refracción, densidad y solubilidad.

2.2.1 Densidad relativa

La densidad relativa se determinó utilizando un picnómetro de 1ml y una balanza analítica, el picnómetro se lavó con acetona y se dejó secar; se realizaron tres mediciones, una del picnómetro vacío, otra con agua destilada en donde se pone el tapón del picnómetro para poder liberar el exceso de agua, se anota el peso, luego se vacía y se seca el picnómetro para proceder a realizar la tercera medición, para esto colocamos el aceite esencial en el picnómetro, eliminamos los excesos y pesamos, luego realizamos los cálculos para poder obtener el valor de la densidad aplicando la siguiente fórmula (Gutierrez, 2004).

$$\frac{m2-m1}{m3-m1}$$

Donde:

m1= gramos del picnómetro vacío

m2= gramos del picnómetro con agua destilada

m3= gramos del picnómetro con aceite esencial

2.2.2 Índice de refracción.

Para la determinación del índice de refracción se utilizó un refractómetro ABBE, este dispositivo electrónico mide la velocidad de una propagación de luz en el aceite esencial a una temperatura de 20°C. Se colocó una gota de aceite esencial y se procedió a la respectiva lectura.

2.2.3 Determinación de la solubilidad

La determinación de la solubilidad del aceite esencial contribuye a escoger cuál de los disolventes es el más apto para poder realizar la formulación. Los disolventes utilizados fueron, propilenglicol, polietilenglicol, butilenglicol, alcohol potable, polietilenglycol y glicerina.

La solubilidad se evaluó mediante el método descriptivo, este método se encuentra descrito en la farmacopea vigente y podemos observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de la solubilidad (Método descriptivo)

Clasificación del soluto	Cantidad de disolvente para disolver el soluto
Muy soluble	Menos de 1 parte
Fácilmente soluble	De 1 a 10 partes
Soluble	De 10 a 30 partes
Bastante insoluble	De 10 a 100 partes
Poco soluble	De 100 a 1000 partes
Insoluble	Más de 10000 partes

Fuente: (USP 33;NF 28)

Elaboración: Autora

2.3 Diseño factorial

2.3.1 Fundamento

El diseño factorial nos permite analizar de manera *in vitro* cual es la mejor combinación entre el principio activo y los excipientes, siendo las mezclas sometidas a diferentes

condiciones controladas para posteriormente ser analizadas, de esta manera determinar la compatibilidad y estabilidad para la elaboración de la fórmula final.

2.3.2 Composición de las muestras

Todas las mezclas fueron elaboradas mediante la siguiente composición.

Fórmula de composición

Principio Activo:.....1 g

Excipientes:.....csp

Los excipientes que se utilizaron fueron los podemos observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Excipientes utilizados dentro de las fórmulas para el diseño factorial

	Función	Excipientes
1	Antioxidantes	BHT Vit.E
2	Reguladores de pH	Acido cítrico EDTA
3	Cosolventes	Alcohol desodorizado
4	Solventes/humectantes	Glicerina
5	Conservantes	Sorbato de potasio
6	Emolientes	Cetomacrogol

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

2.3.3 Elaboración y acondicionamiento de las muestras

Para la elaboración de las muestras se pesó cada uno de los excipientes y el principio activo, para luego preparar cada una de ellas.

Las muestras se almacenaron en viales de vidrio ámbar de 10 ml debido a que el principio activo presente puede presentar fotosensibilidad, además de tener tapa rosca para evitar agentes externos adicionales que puedan alterar la mezcla, las diferentes temperaturas seleccionadas están basadas según las normas que se encuentran en WHO/2009 y fueron 30°C y 40°C.

El diseño factorial utilizado es de 2^k, en donde se trabaja con dos niveles que se diferencian mediante los signos + y -, tres factores están incluidos dentro de las mezclas.

El número de mezclas originadas fueron 8 por cada temperatura (Tabla 3).

Tabla 3. Asignación de las muestras en los viales

Número de viales	Mezcla	Cantidad vial	Condiciones
8	Todas	5g	30°C
8	Todas	5g	40°C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Para determinar los excipientes a utilizar fue necesario realizar ensayos de preformulación diseñando varias mezclas, para de esta manera llegar a los excipientes expuestos en la Tabla 4.

Tabla 4. Distribución de los excipientes para llevar a cabo el diseño factorial

Factor	Nivel	Excipiente
A	+	BHT
	-	Vit. E
B	+	Ac. Cítrico
	-	Edta
C	+	Alcohol desodorizado
	-	

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

2.3.4 Tiempo de análisis

Las muestras fueron analizadas a los 30 y 60 días. En cada mes se leyó en el cromatógrafo de gas acoplado a un espectrómetro de masas, cada una de las muestras sometidas a las diferentes condiciones.

Para realizar la lectura primero se debe elaborar una curva de calibración con el estándar de limoneno con diferentes concentraciones del mismo, las muestras deben ser inyectadas en iguales condiciones en las que se inyectó el aceite esencial. Los resultados se interpretan en base a las áreas obtenidas en cada una de las lecturas de las muestras, con la finalidad de cuantificar la cantidad de principio activo o de productos de degradación que se encuentran presentes (Arias, 2017).

2.4 Planteamiento de la fórmula

Con los resultados obtenidos en el diseño factorial en donde analizaron tres grupos de excipientes como fueron antioxidantes, reguladores de pH y cosolventes, se seleccionaron los excipientes idóneos para ser aplicados en la fórmula final (Tabla 5).

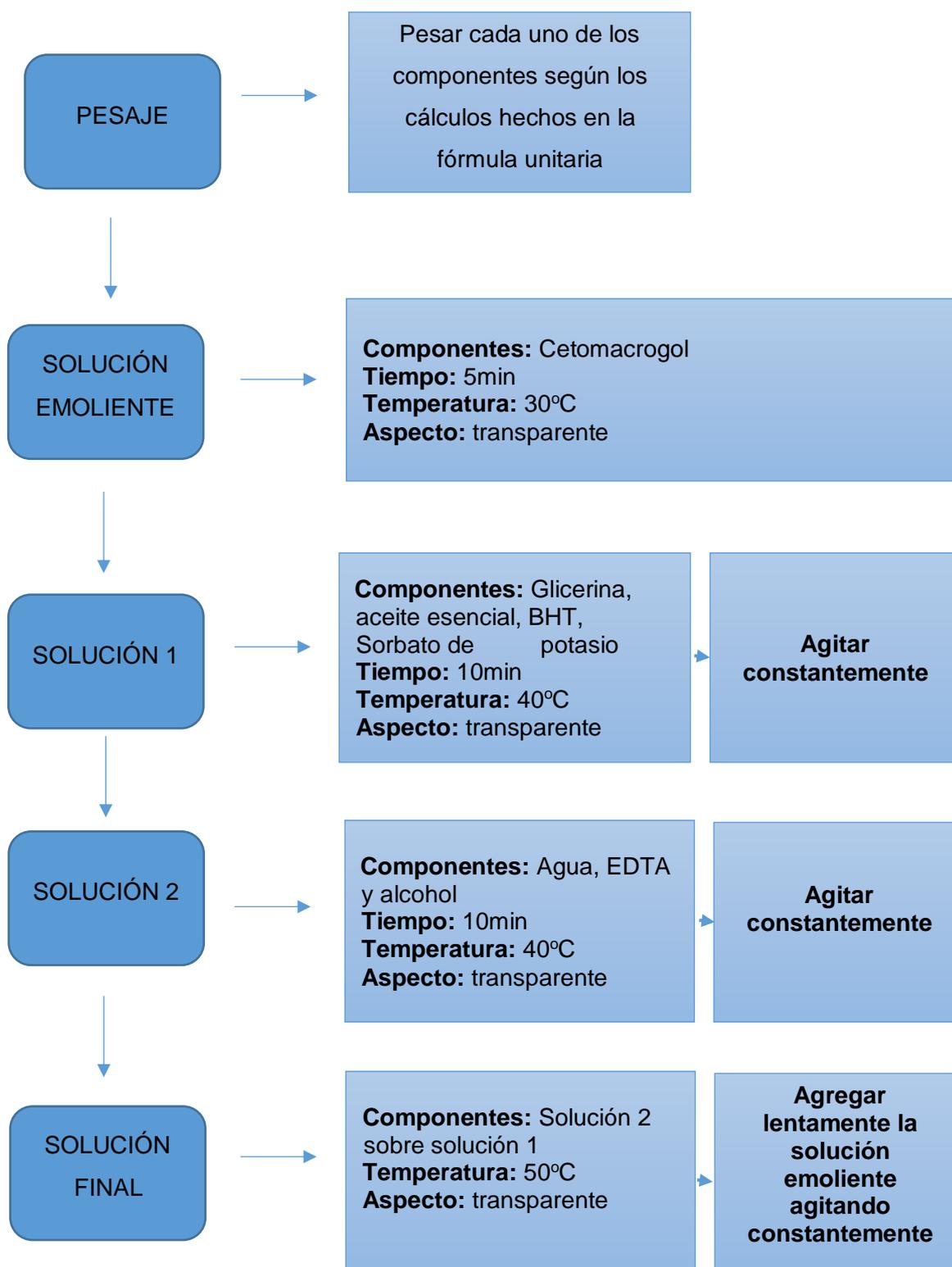
Tabla 5. Fórmula para la elaboración de la loción repelente

Función	Excipiente
Solvente	Glicerina
Conservante	Sorbato de potasio
Antioxidante	BHT
Regulador de pH	EDTA
Emulsificante	Cetomacrogol
Solvente	Alcohol desodorizado

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

2.4.1 Proceso de elaboración de la Loción repelente



2.5 Pruebas de repelencia

2.5.1 Repelencia del aceite esencial

Para la realización de las pruebas de repelencia del aceite esencial se utilizó el método *in vitro* propuesto por Talukder y Howse, 1993.

Para por llevar a cabo la práctica necesitamos con luz UV, aspirador de los zancudos, papel filtro cortado por la mitad de 9cm de diámetro, aceite esencial diluido en glicerina, agua destilada, repelente sintético que se utilizó como control positivo en nuestro caso fue Detan®.

Para poder empezar colocamos la trampa de luz led alrededor de las parcelas de arroz en el barrio Santa Marianita del cantón Macará, con el aspirador manual vamos capturando los zancudos (Anexo 2) y (Anexo 3); por otro lado a una de las mitades del papel filtro la empapamos con la dilución del aceite esencial y glicerina y a la otra mitad con agua destilada y dejamos a estas mitades secar. Luego de forma contigua son colocadas en la caja Petri en su interior se liberaron 10 zancudos de la especie culicidae. El recuento de zancudos se realizó cada hora por cuatro horas (Vacacela, 2012).

Para convertir los resultados en porcentaje de repelencia se aplica la siguiente fórmula:

$$PR (\%) = (Nc - 50) \times 2$$

Donde *Nc* es el porcentaje de zancudos presentes en la mitad donde se encuentra el agua destilada. Valores positivos indican repelencia valores negativos indican atracción (Anexo 4).

Los valores son clasificados según la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación del grado de repelencia

Grado de repelencia %	Clase
De 0,1 a 20	I
De 20,1 a 40	II
De 40,1 a 60	III
De 60,1 a 80	IV
De 80, 1 a 100	V

Fuente: Toluker y Howse, 1993

Elaboración: Autora

2.5.2 Repelencia de la Loción

Para el análisis de la prueba de repelencia de la loción se utilizó el mismo método mencionado anteriormente para el aceite esencial, sin embargo se probaron 3 concentraciones diferentes que fueron de 1%, 2%, 3%, más un control positivo (Anexo 5). Los cuales fueron evaluados según como se muestra Tabla 6.

CAPÍTULO 3
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación química del aceite esencial

Los compuestos analizados mediante el CG-EM los observamos en el cromatograma (figura 1). El eje de las x representa el tiempo de retención, y el eje “y” la abundancia del compuesto, entre unos de los compuestos mayoritarios tenemos al limoneno.

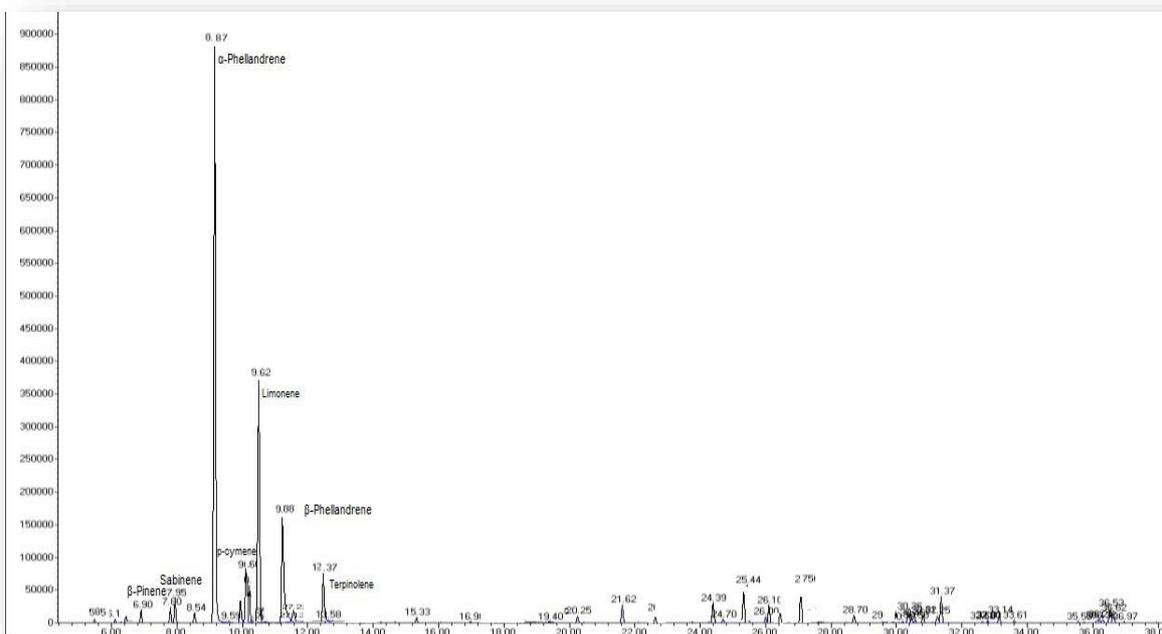


Figura 1. Cromatograma del Aceite esencial *D. peruviana*

Fuente Cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N

Elaboración: Autora

La identificación de los compuestos se realizó utilizando los tiempos de retención de los hidrocarburos inyectados con los cuales se determinó la pendiente para poder establecer el índice de Kovats de los compuestos para ser comparados con la bibliografía y de esta manera conocer si el espectro de masas corresponde con la bibliografía del libro de Adams (Figura 2). Los resultados obtenidos fueron comparados con los de Andrade, 2016, en los que el limoneno se encuentra en una concentración del 23,03% (Tabla 7).

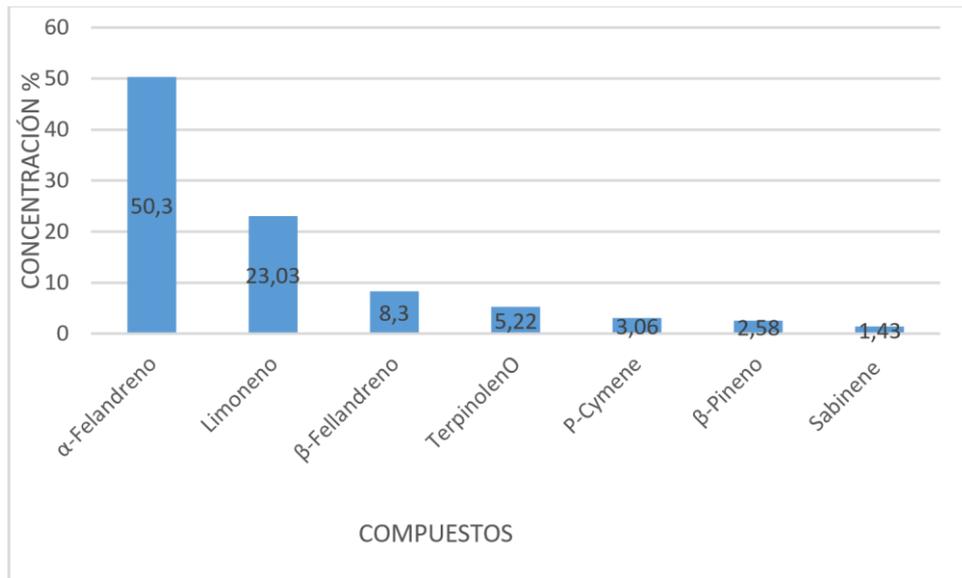


Figura 2. Concentración obtenida de los compuestos

Fuente: autora

Elaboración: Autora

Tabla 7. Compuestos identificados a partir del Índice de Kovats

Nº	Compuestos	IR(cal)	IR(ref)	% Cantidad Retenida
1	α-Felandreno	1003	1002	50.3
2	Limoneno	1026	1029	23.03
3	B-Felandreno	998	1025	8.3
4	Terpinoleno	1081	1088	5.23
5	B-cymene	1021	1020	3.06
6	B-pinene	975	974	2.58
7	Sabiene	972	975	1.43
Total				94.19
IR(ref): Índice de Kovats que se referido en la literatura. IR(cal): Índice de Kovats calculado.				

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

3.2 Preformulación

Como resultado de las propiedades físicas se obtiene lo siguiente:

Tabla 8. Propiedades físicas del aceite esencial

Propiedades	Resultado
Índice de refracción	1,4753
Densidad relativa	0,8429

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Dentro de las propiedades físicas del aceite esencial el índice de refracción ayuda a determinar calidad y pureza de los aceites esenciales. Según Viturro, et al., 2010 el resultado de *D. peruviana* obtenido con un valor 1, 4753 se encuentra dentro de los rangos establecidos que son 1,474 y 1,478 para considerar al aceite como óptimo para ser utilizado dentro de la formulación. Al igual que el índice de refracción la densidad del aceite esencial ayuda a determinar la calidad y pureza, para que el aceite sea considerado de esta manera el resultado debe encontrarse entre 0,84 g/cm³ a 1,18 g/cm³ lo que coincide con nuestro valor obtenido que es 0,8429 g/cm³ (Artuño, 2006).

Los valores de densidad e índice de refracción son similares a los obtenidos por Andrade, 2016 en donde se analizó las propiedades físicas de este aceite esencial.

3.2.1 Solubilidad

Las diferentes mezclas realizadas nos darán a conocer cuál de los solventes disuelven en menos partes el principio activo (Tabla 9).

Tabla 9. Determinación de la solubilidad de aceite esencial de *D. peruviana*

Disolventes	Partes de disolvente requeridas para 1 parte de soluto	Solubilidad
Glicerina	4	Fácilmente Soluble
Propilenglicol	15	Soluble
Polietenilglicol	10	Soluble
Alcohol potable	40	Moderadamente soluble
Etilenglicol	30	Moderadamente soluble
Butilenglicol	5	Fácilmente soluble

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

El solvente que disuelve el aceite en menor número de partes es la glicerina correspondiendo de esta manera el aceite esencial a la categoría de fácilmente soluble.

3.3 Diseño factorial realizado al aceite esencial de *D.peruviana*

El desarrollo de este diseño factorial es establecido con la final de averiguar si los diferentes factores seleccionados influyen en la variable de interés.

Mediante el diseño factorial establecido de 2^3 se determinó la matriz (Tabla 10) a elaboración de 8 mezclas con tres repeticiones cada una, la matriz de mezcla se expone en la Tabla 11.

Tabla 10. Matriz para el desarrollo de mezclas

Nº de Mezclas	Factores		
	A	B	C
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Tabla 11. Matriz de mezclas obtenida a partir del diseño 2³

Materia prima	%	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
BHT	0.047		*		*		*		*
VIT.E	0.5	*		*		*		*	
Ácido cítrico	3			*	*		*		*
EDTA	0.5	*	*			*		*	
Alcohol	3					*	*	*	*
Sin alcohol	0	*	*	*	*				
Glicerina	15	*	*	*	*	*	*	*	*
Cetomagrogol	3	*	*	*	*	*	*	*	*
Sorbato potasio	0.075	*	*	*	*	*	*	*	*
Aceite esencial <i>D. peruviana</i>	1	*	*	*	*	*	*	*	*
Agua	csp	*	*	*	*	*	*	*	*

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Se realizaron dos diferentes lecturas de las mezclas una a los 30 días (mes 1) y otra a los 60 días (mes 2) las cuales se sometieron a dos temperaturas diferentes de 30°C y 40°C en las cuales se determinó la concentración y el % de degradación del limoneno mediante cromatografía de gases los resultados se muestran en Tabla 12.

Tabla 12. Concentración y % de degradación del limoneno a 30°C y 40°C durante dos meses

MESCLAS	Tiempo 0			Mes 1						Mes 2					
	Temperatura Ambiente			30°C			40°C			30°C			40°C		
	Concentración relativa de limoneno (%)	Concentración Limoneno (%)	% Degradación	Concentración relativa de limoneno (%)	Concentración limoneno (%)	% Degradación	Concentración relativa de limoneno (%)	Concentración Limoneno (%)	% Degradación	Concentración relativa de limoneno %	Concentración Limoneno (%)	% Degradación	Concentración relativa de limoneno %	Concentración Limoneno (%)	% Degradación
M1	12,3	100	0	7,7	62,6	37,4	7,7	62,6	37,4	6,9	56,8	43,2	6,9	56,7	43,3
M2	9,3	100	0	7,7	83,3	16,7	5,5	70,8	29,2	6,5	70,3	29,7	6,5	59,4	40,6
M3	10,2	100	0	8,7	84,4	15,2	7,7	75,8	24,2	6,1	60,1	39,9	5,9	58,4	41,6
M4	8,2	100	0	7,6	92,8	7,2	3,1	66,1	33,9	5,4	65,1	34,9	5,3	61,9	38,1
M5	8,8	100	0	8,5	96,7	3,3	6,8	77,6	22,4	5,9	66,9	33,1	5,6	64,2	35,8
M6	7,7	100	0	6,9	89,6	10,8	6,8	88,2	11,8	5,7	74,7	25,7	5,6	72,4	27,6
M7	8,7	100	0	5,4	62,1	37,9	5,4	61,4	38,4	5,3	61,1	38,9	5,1	58,4	41,6
M8	8,6	100	0	5,8	67,9	32,2	5,8	67,5	32,5	5	58,2	41,8	5	58,2	41,8

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Como se puede observar en la tabla anterior las concentraciones de limoneno en tiempo 0 a temperatura ambiente son diferentes, la principal causa de estos resultados puede ser ocasionado por varios factores (temperatura, pureza de agua, pH, etc.) (Sánchez et al., 2012), sin embargo en nuestro caso es más probable que se dé por las distintas combinaciones de excipientes que se realizaron en cada mezcla.

A 30°C en el primer mes es la mezcla 5 presenta un 3,3% de % degradación con lo que se conserva un 96,7% de limoneno, considerando así que Vit. E, EDTA y alcohol mantienen la concentración de limoneno.

Por otro lado la mezcla 6 a 40°C del primer mes tiene un % de degradación del limoneno de 11,8%, conservándose un 88,2% de esta manera se puede concluir que el BHT, EDTA y alcohol mantienen la concentración de limoneno, con respecto al % de degradación para 30°C y 40°C tenemos 25,7% y 27,6% respectivamente, con lo que se conservaría el limoneno en un 74,7% y 72,4, estos resultados nos llevan a concluir que la mezcla 6 que contiene BHT, EDTA y alcohol es óptima para ser utilizada dentro de la formulación.

El programa Minitaba® ayudó a identificar la significancia de los resultados y la significancia de cada factor, los datos utilizados fueron los porcentajes de degradación,

obteniendo una fórmula en la cual el % degradación del principio activo es menor (Sarango, 2017).

Los efectos principales que se observan en Figura 3. Indican que en relación al regulador de pH el EDTA causa menor porcentaje de degradación. En el caso de los antioxidantes tenemos a BHT y con respecto a los cosolventes al no tener una diferencia marcada podría ser el alcohol como la no utilización de este. El análisis de la varianza de cada uno de los excipientes se lo expone en la Tabla 13.

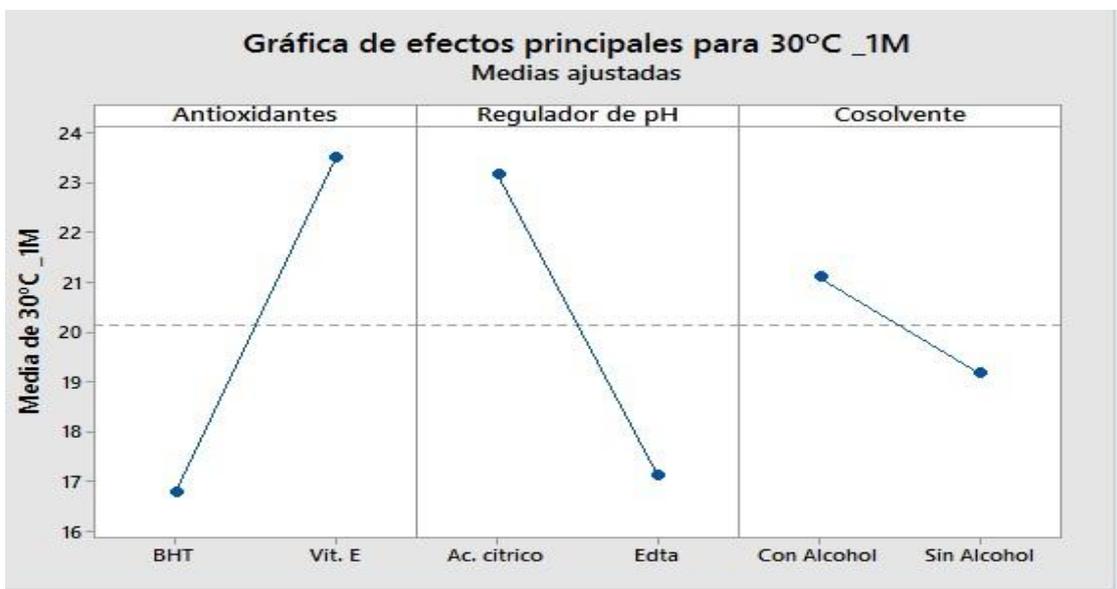


Figura 3. Grafica de efectos principales primer mes de 30°C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Tabla 13. Análisis de la varianza de los efectos Principales primer mes 30°C

	Grados de libertad	Sc. Ajuste	Mc. Ajuste	Valor F	Valor P
Antioxidantes	1	271,5	271,5	1,60	0,219
Reguladores de pH	1	219,5	219,5	1,28	0,270
Cosolventes	1	22,36	22,36	0,12	0,728

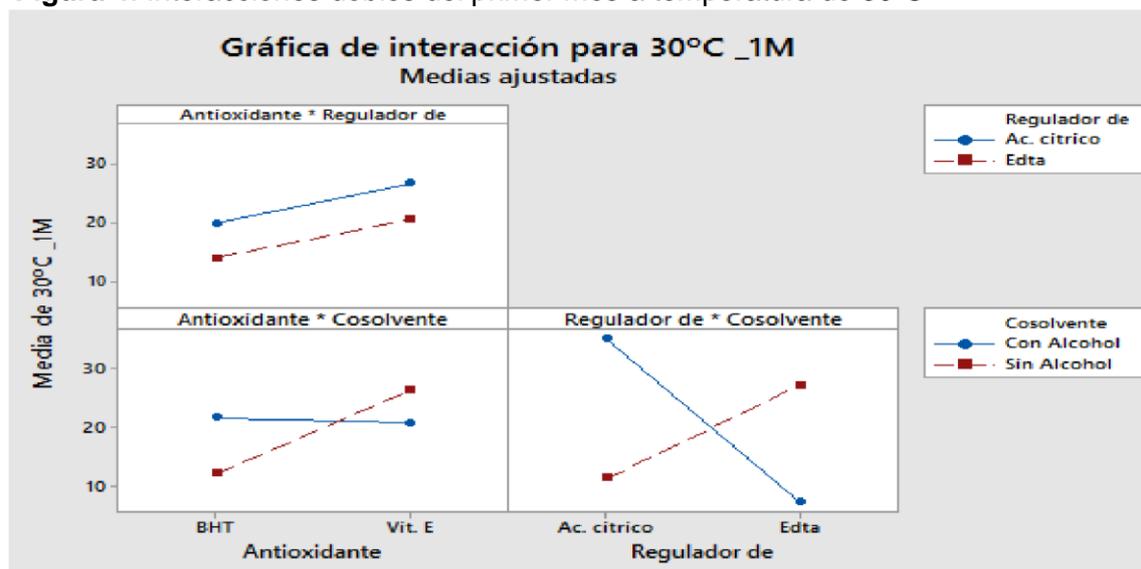
Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Observando el análisis de varianza de efectos principales concluimos que en ninguno de los tres casos existe diferencias significativas al ser todos los valores superiores a $p=0,05$, así mismo se analizaron las interacciones dobles mediante medias ajustadas, se observan en la Figura 4, las interacciones fueron Regulador de pH/antioxidante, antioxidante/Cosolvente y Regulador de pH/Cosolvente, además mediante ANOVA se analizó si los resultados fueron o no estadísticamente significativos, el valor de p

utilizado fue de 0.05, en base a estos resultados se determinará cuál de las combinaciones disminuye el porcentaje de degradación del principio activo (Tabla 14).

Figura 4. Interacciones dobles del primer mes a temperatura de 30°C



Fuente: Autora
Elaboración: Autora

Tabla 14. Resultados del análisis de ANOVA realizado de las interacciones dobles de respuesta en relación al tratamiento 30°C primer mes

	Fuente	GL	Sc. Ajustado	Mc. Ajustado	Valor F	Valor p.
Regulador de pH/antioxidante	Trat	2	158,5	79,24	0,44	0,654
	Error	15	2735,4	181,69		
	Total	17	2883,9			
Antioxidante/cosolvente	Trat	2	636,0	318,0	3,05	0,077
	Error	10	1561,8	104,1		
	Total	11	2897,8			
Regulador de pH/ Cosolvente	Trat	2	1337,0	668,52	12,24	0,001
	Error	15	819,1	254,61		
	Total	17	2856,1			

Fuente: Autora
Elaboración: Autora

Los resultados obtenidos nos indican que en las interacciones que no muestran diferencias significativas son las que se dan entre Regulador de pH/antioxidante y antioxidante/Cosolvente obteniendo resultados de $p= 0.654$ y $0,077$ respectivamente, sin embargo en el caso de Regulador de pH/Cosolventes existe diferencia significativa

con un resultado de $p=0.001$, para poder verificar estos resultados se utilizó Tukey en la cual los resultados obtenidos indicaron que no existen diferencia significativa en las primeras interacciones pero si en la relación pH/Cosolventes (Tabla 15), estos resultados indican que las mezclas realizadas entre regulador de pH/Cosolvente son estadísticamente diferentes.

Tabla 15. Comparación en parejas Tukey en las interacciones dobles 30°C primer mes

	Tratamiento	N	Media	Agrupación
Regulador de pH/antioxidante	B	6	20,42	A
	A	6	19,74	A
	C	6	13,81	A
Antioxidante/cosolvente	C	6	26,33	A
	A	6	21,53	A
	B	6	12,02	A
Regulador de pH/ Cosolvente	B	6	27,11	A
	C	6	11,24	B
	A	6	7,12	B

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

De igual manera la Figura 5 indica los efectos principales obtenidos en el primer mes a una temperatura de 40°C, en donde BHT, EDTA y alcohol son los responsables de que el porcentaje de degradación sea menor, el análisis de varianza lo podemos observar en la Tabla 15. Así mismo se analizaron las medias ajustadas que se observan en la Figura 6, así las interacciones fueron regulador de pH/antioxidante, Regulador de pH/Cosolvente, y antioxidante/Cosolvente, mediante ANOVA se analizó si los resultados fueron o no estadísticamente significativos, el valor de p utilizado fue de 0.05 (tabla 16).

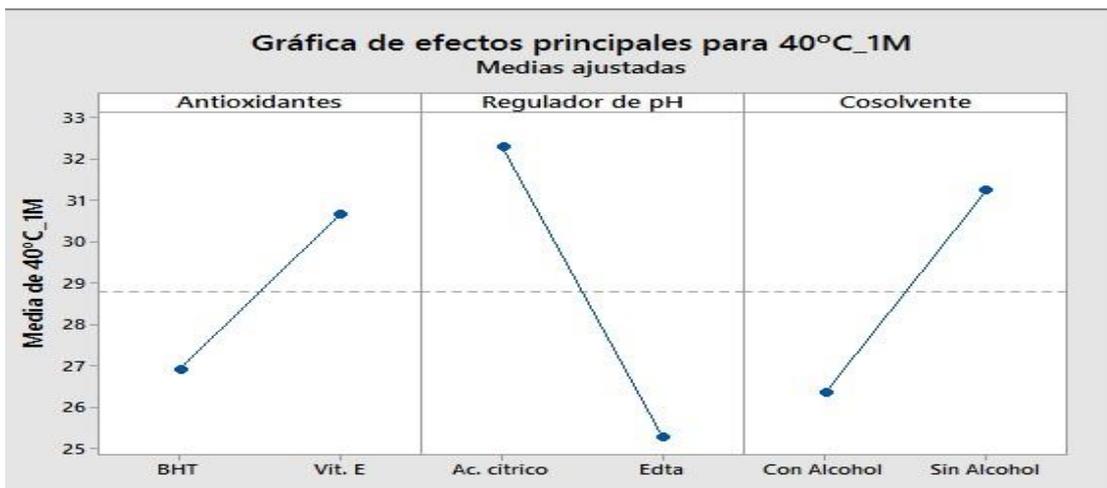


Figura 5. Efectos principales primer mes a 40°C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

TABLA 16. Análisis de la varianza de los efectos Principales primer mes 40°C

	Grados de libertad	Sc. Ajuste	Mc. Ajuste	Valor F	Valor P
Antioxidantes	1	84,37	84,37	1,17	0,290
Reguladores de pH	1	296,6	296,62	4,77	0,040
Cosolventes	1	143,30	143,3	2,07	0,164

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Los resultados de la varianza en la tabla expuesta nos reporta que únicamente hay diferencia significativa en el caso de los reguladores de pH, de esta manera concluimos que es el EDTA el que menor porcentaje de degradación produce.

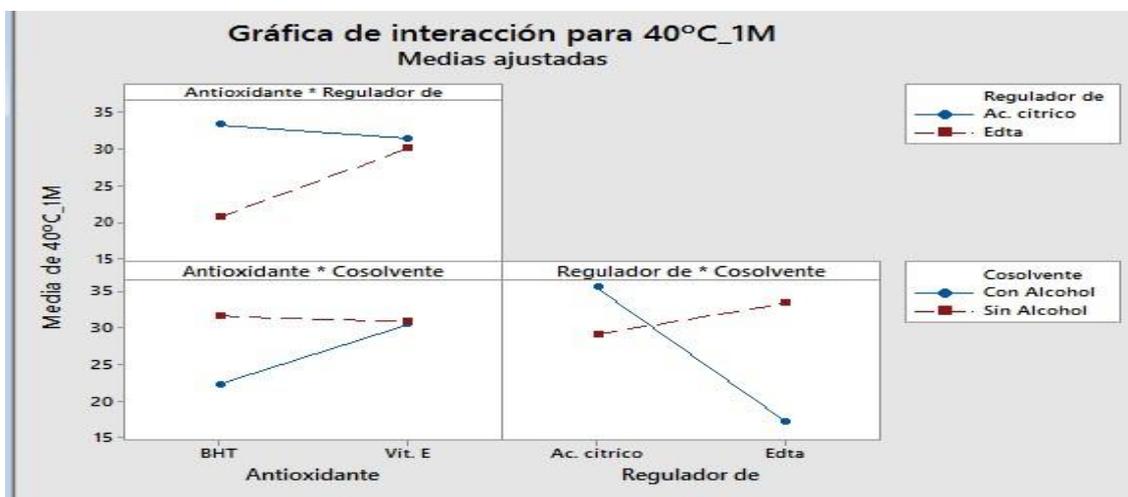


Figura 6. Interacciones dobles primer mes a 40°C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Tabla 17. Resultados del análisis de ANOVA realizado de las interacciones dobles de respuesta en relación al tratamiento 40°C primer mes

	Fuente	GL	Sc. Ajustado	Mc. Ajustado	Valor F	Valor p.
Regulador de pH/antioxidante	Trat	2	272,1	136,0	1,30	0,301
	Error	15	1565,4	104,4		
	Total	17	1837,5			
Antioxidante/cosolvente	Trat	2	162,8	63,42	3,25	0,067
	Error	15	292,8	19,52		
	Total	17	419,7			
Regulador de pH/ Cosolvente	Trat	2	624,4	312,21	7,49	0,006
	Error	15	625,3	41,69		
	Total	17	1249,7			

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Los resultados expuestos en la tabla anterior indican que si existe diferencias significativas en la interacción entre reguladores de pH/ Cosolvente con un valor de $p=0,006$, en el caso de las otras dos combinaciones ninguna es estadísticamente significativo. De igual manera al realizar el análisis de Tukey observamos de que existen diferencias significativas únicamente en las interacciones entre Regulador de pH/Cosolvente, relacionando los resultados directamente (Tabla 18).

Tabla 18. Comparación en parejas Tukey en las interacciones dobles 40°C primer mes

	Tratamiento	N	Media	Agrupación
Regulador pH/antioxidante	B	6	29,97	A
	A	6	26,59	A
	C	6	20,57	A
Antioxidante/cosolvente	C	6	35,49	A
	B	6	33,35	A
	A	6	29,10	A
Regulador de pH/ Cosolvente	B	6	30,19	A
	C	6	29,10	A
	A	6	17,19	B

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Con respecto al segundo mes se le realizaron las mismas pruebas en ambas temperaturas 30°C y 40°C, los efectos principales de 30°C se observan a continuación en la Figura 7, en donde se considera que BHT, EDTA y alcohol ocasionan menor porcentaje de degradación del principio activo. El análisis de varianza nos da a conocer que antioxidantes y reguladores de pH son significativos teniendo un valor de p menor a 0,05 (tabla 19).

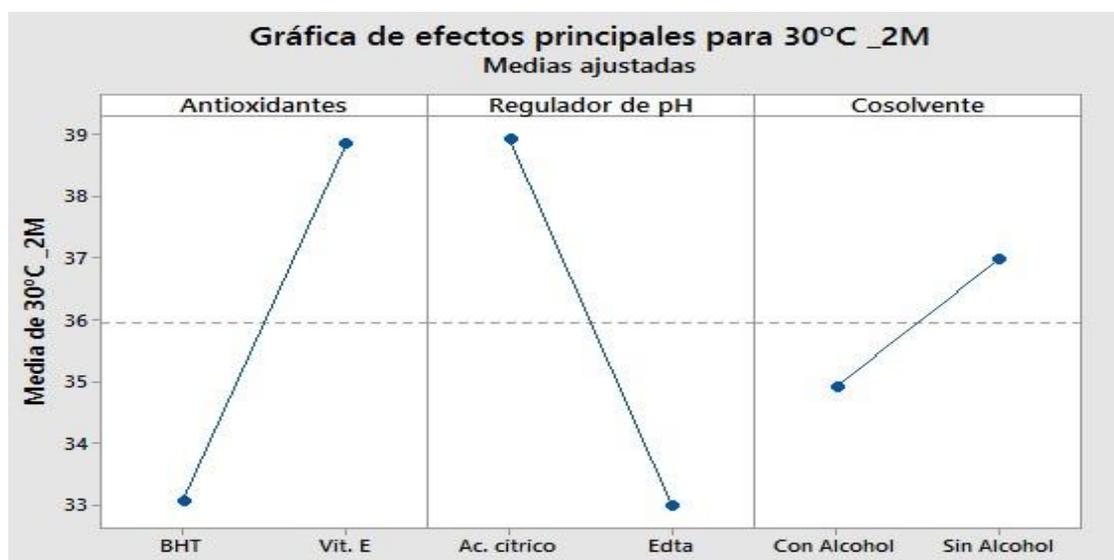


Figura 7. Efectos principales del segundo mes 30°C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Tabla 19. Análisis de la varianza de los efectos Principales Segundo mes 30°C

	Grados de libertad	Sc. Ajuste	Mc. Ajuste	Valor F	Valor P
Antioxidantes	1	200,1	200,07	7,35	0,013
Reguladores de pH	1	212,9	212,88	7,99	0,010
Cosolventes	1	25,70	25,70	0,73	0,402

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

El análisis de las medias ajustadas de los efectos principales se los puede visualizar en la Figura 8. Mediante el análisis de ANOVA se determinó que existen diferencias significativas entre Regulador de pH/Cosolvente y Regulador de pH/antioxidante obteniendo un valor de $p = 0.000$ cada uno (Tabla 20). Estos resultados están directamente relacionados con los obtenidos con Tukey en donde se observa que estas interacciones son significativas (Tabla 21).

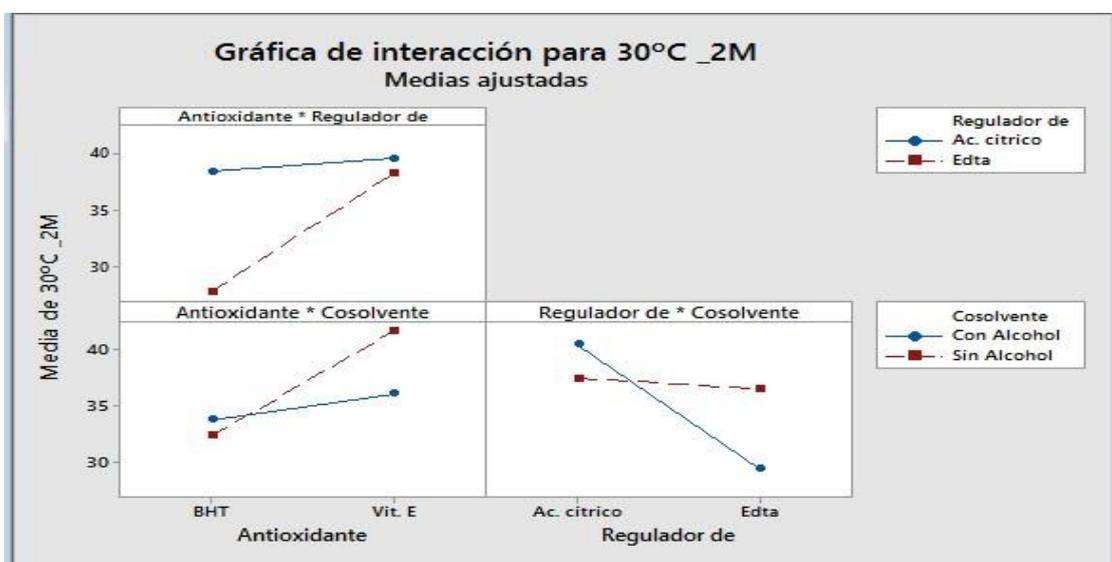


Figura 8. Interacciones dobles segundo mes 30°C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Tabla 20. Resultados del análisis de ANOVA realizado de las interacciones dobles de respuesta en relación al tratamiento 30°C Segundo mes

	Fuente	GL	Sc. Ajustado	Mc. Ajustado	Valor F	Valor p
Regulador de pH/antioxidante	Trat	2	445,0	222,49	12,18	0,000
	Error	15	253,2	16,58		
	Total	17	698,1			
Antioxidante/cosolvente	Trat	2	21,00	10,94	0,29	0,756
	Error	10	575,58	38,37		
	Total	11	597,46			
Regulador de pH/Cosolvente	Trat	2	2598,5	1299,23	85,57	0,000
	Error	15	227,8	15,18		
	Total	17	2826,2			

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Tabla 21. Comparación en parejas Tukey en las interacciones dobles 30°C segundo mes

	Tratamiento	G	Media	Agrupación
Regulador de Ph/antioxidante	C	6	38,38	A
	A	6	38,20	A
	B	6	27,74	B
Regulador de pH/ Cosolvente	C	6	35,05	A
	A	6	33,79	A
	B	6	32,25	A
Antioxidante/Cosolvente	B	6	40,37	A
	A	6	29,41	B
	C	6	11,24	C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

En el caso de 40°C para este mes el resultado de los efectos principales lo podemos observar en la Figura 9. En donde se indica que BHT, EDTA y alcohol son los que ocasionan menor degradación del principio activo, sin embargo el análisis de varianza (Tabla 22) nos indica que los excipientes considerados dentro del grupo Cosolventes son significativos obteniendo un valor de p menor a 0,05.

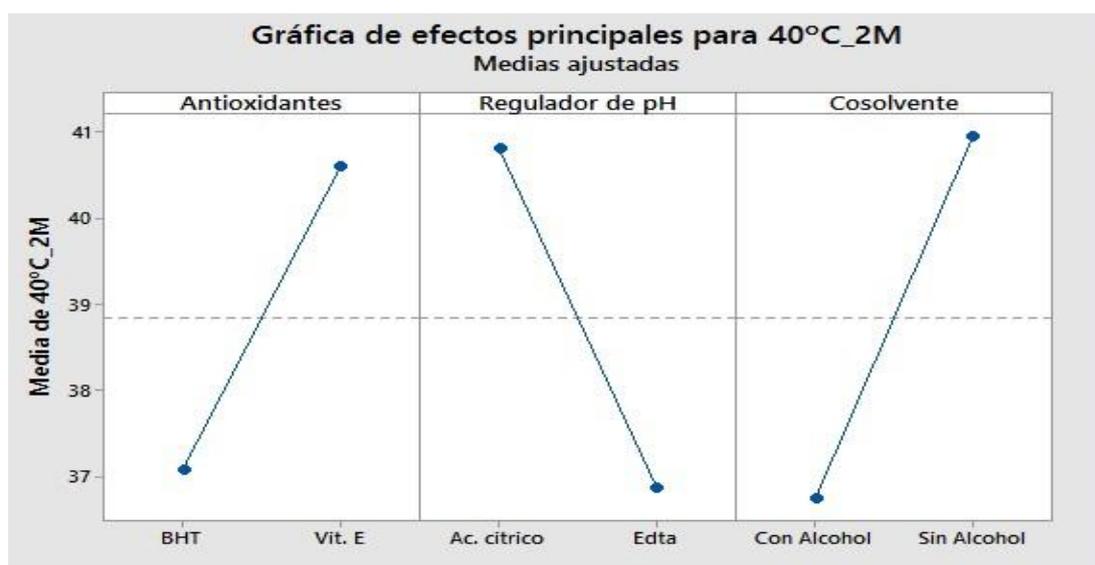


Figura 9. Efectos principales del segundo mes 40°C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

TABLA 22. Análisis de la varianza de los efectos Principales Segundo mes 40°C

	Grados de libertad	Sc. Ajuste	Mc. Ajuste	Valor F	Valor P
Antioxidantes	1	74,55	74,55	3,45	0,077
Reguladores de pH	1	93,46	93,46	4,51	0,045
Cosolventes	1	106,8	106,81	5,31	0,031

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Los resultados de las interacciones dobles podemos observarlos en la Figura 10 y su análisis de ANOVA en la Tabla 23. En donde observamos que la interacción entre Regulador de pH/Cosolvente es significativo con un valor de $p=0.000$.

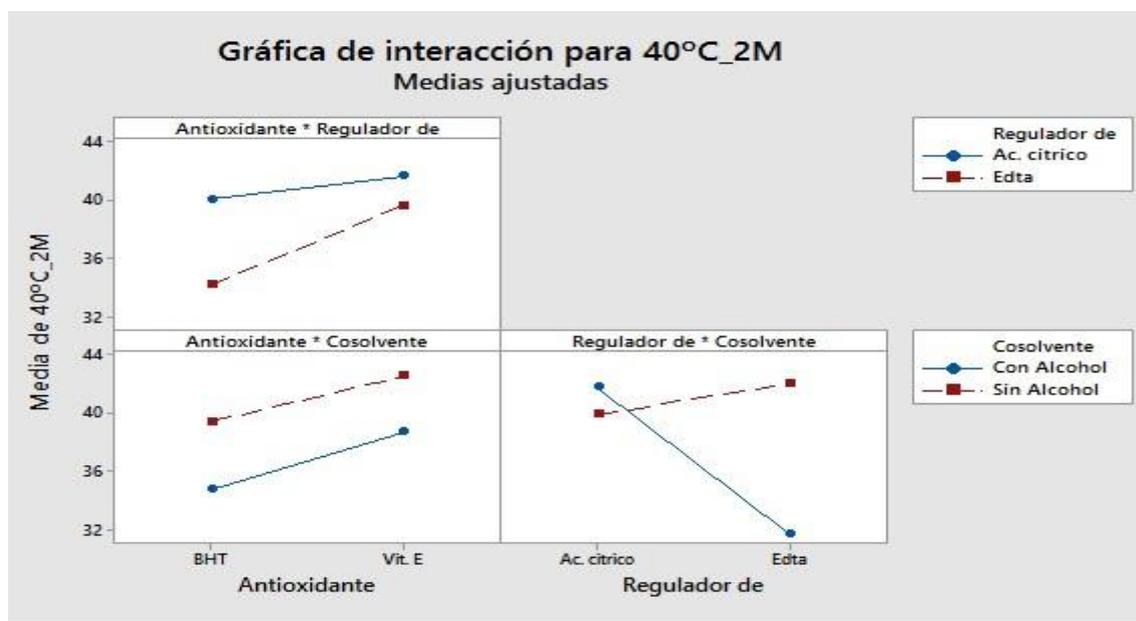


Figura 10. Interacciones dobles segundo mes 30°C

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Tabla 23. Resultados del análisis de ANOVA realizado de las interacciones dobles de respuesta en relación al tratamiento 40°C segundo mes

	Fuente	GL	Sc. Ajustado	Mc. Ajustado	Valor F	Valor p
Regulador de pH/antioxidante	Trat	2	140,9	74,94	2,23	0,142
	Error	15	508,7	33,56		
	Total	17	653,6			
Antioxidante/Cosolvente	Trat	1	178,1	89,04	1,71	0,048
	Error	10	357,7	23,84		
	Total	11	535,7			
Regulador de pH/ Cosolvente	Trat	2	410,0	204,9	27,75	0,000
	Error	15	110,8	7,38		
	Total	17	520,8			

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Los resultados de ANOVA se encuentran directamente relacionados con el análisis hecho por Tukey en donde Regulador de pH/Cosolvente tiene diferencias significativas con un valor de p de 0,000 (Tabla 24).

Tabla 24. Comparación en parejas Tukey en las interacciones dobles 40°C segundo mes

	Tratamiento	G	Media	Agrupación
Regulador de pH/antioxidante	B	6	39,56	A
	A	6	34,15	A
	C	6	32,92	A
Antioxidante/cosolvente	B	6	42,45	A
	C	6	38,72	AB
	A	6	34,75	B
Regulador de pH/ Cosolvente	A	6	41,97	A
	C	6	41,78	A
	B	6	31,71	B

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

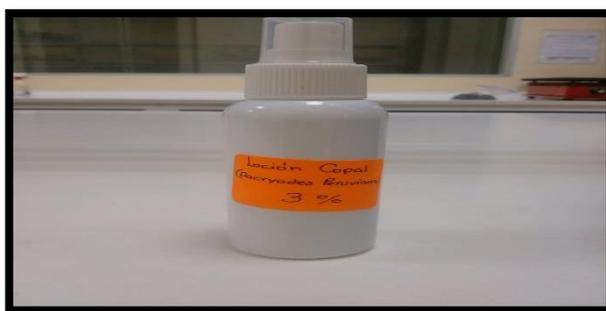
Con los resultados estadísticos obtenidos en primera instancia se consideró utilizar dentro de la fórmula BHT, EDTA y no incluir el alcohol. Sin embargo luego de realizar el análisis de todas las temperaturas en los dos meses se llegó a la conclusión de incluir alcohol pero únicamente si este se utiliza conjuntamente con EDTA, esta combinación

causa dentro de las mezclas menor porcentaje de degradación, siendo seleccionados BHT, EDTA y alcohol para la elaboración de la formula, que en nuestro caso correspondería a la mezcla número 6.

3.4 Elaboración de la loción repelente

Con los resultados de los ensayos del diseño factorial, se elaboró una loción de *D. peruviana* en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica del Departamento de química y ciencias exactas (Figura 11).

Figura 11. Prototipo de loción repelente elabora al 3%



Fuente: Autora

Elaboración: Autora

3.4.1 Formula de composición

Cada 120 ml contiene:

Aceite esencial ----- 3%

Excipientes-----csp

Tabla 25. Cálculos realizados para obtener fórmula unitaria

Función	Componente	% p/p (g)	% p/v (ml)	Fórmula unitaria (g)
Api	Aceite esencial	2.6	3	3.6
Solvente	Glicerina	15	11.90	14.28
Emulsificante	Cetomacrogol	3		3.6
Antioxidante	BHT	0.047	0.05	0.06
Conservante	Sorbato de K	0.075		0.9
Regulador de PH	EDTA	0.5		0.6
Cosolvente	Alcohol desodorizado	3%	3,73	3,6
	Agua de aforo	C.S	C.S	C.S

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

3.5 Bioensayos de repelencia

Luego de realizar el conteo de los mosquitos que se encuentran en la parte testigo y en la parte donde se encuentra la muestra, estos resultados fueron convertidos en porcentaje tanto para los ensayos realizados en el aceite como en los ensayos realizados en la loción Tabla 26 y Tabla 27. Los cuales se categorizaron según la escala de Toluker y Howse.

Tabla 26. Prueba de repelencia Loción

Concentración	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	Promedio %	Grado de repelencia
3%	80	80	60	40	65	IV
2%	80	60	60	40	60	III
1%	60	60	40	40	50	III
Control (+)	100	100	100	100	100	VI

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Tabla 27. Prueba de repelencia aceite esencial

Concentración	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas	Promedio %	Grado de repelencia
3%	100	60	60	60	70%	IV
2%	80	60	60	60	65%	IV
1%	80	60	60	60	65%	IV
0.5%	100	40	40	40	55%	III
Control (+)	100	100	100	100	100%	V

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Los resultados obtenidos en ambos casos nos indica que tanto el aceite como la formulación poseen actividad repelente a diferentes concentraciones lo que ocasionó que el grado de repelencia sea varié, así mismo el control positivo que es el Detan® mostró repelencia de 100% en ambos casos conservando así el grado de repelencia fijo.

Con estos resultados también podemos determinar que la loción a una concentración del 3% tiene actividad repelente. Sin embargo con el aceite esencial a partir del 1% se considera que es efectivamente repelente. Las diferencias se pueden observar en la Figura 12.

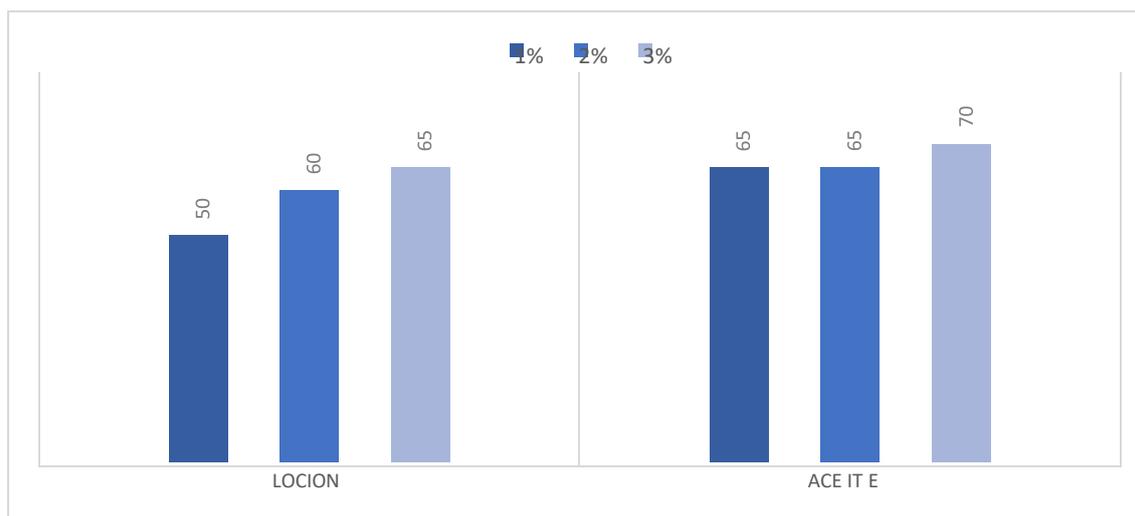


Figura 12: Comparación de repelencia del aceite y loción

Fuente: Autora

Elaboración: Autora

Comparando nuestra loción a base de copal con la elaborada por Vacacela, 2012 a base de Palo santo cuya concentración es de 3%, podemos decir que nuestra loción es ideal para ser utilizada como repelente. De igual manera al realizar una comparación con la loción de Palo santo hecha por Arias, 2017, en donde la concentración ideal es 2 %

alcanzando una grade de repelencia de nivel IV, concluimos que nuestra loción con una concentración de principio activo de 3% es idónea para actuar como repelente.

El aceite esencial de *D. peruviana* es el único principio activo con actividad repelente que se utiliza en nuestra formulación y puede actuar como tal por un periodo de 4 horas, analizando estos resultados con los obtenidos por Daza & flores, 2006, en donde su formulación posee como principios activos aceite de Citronella, aceite de Ruda, aceite de Eucalipto, y el periodo de duración del efecto repelente es de 2 horas, nos lleva a considerar a nuestra formulación como efectiva.

CONCLUSIONES

- Los estudios de preformulación ayudaron a obtener la información necesaria para desarrollar la fórmula para la elaboración de la loción repelente, porque nos permite conocer que excipientes pueden ser utilizados dentro de la formulación.
- Los estudios de solubilidad ayudaron a determinar que la glicerina es el mejor solvente dentro de la investigación.
- El diseño factorial contribuye a conocer cuáles son los excipientes idóneos que ocasionan menos porcentaje de degradación dentro de las mezclas.
- El BHT, EDTA y el alcohol desodorizado son los óptimos para ser utilizados dentro de la formulación.
- La loción repelente a una concentración de 3% presenta un grado de repelencia IV es decir de un 70% por un periodo de 4 horas.

RECOMENDACIONES

- Desarrollar pruebas de toxicidad dérmica del aceite esencial y del producto terminado
- Desarrollar estudios de estabilidad del producto terminado para poder evaluar el tiempo de vida útil

BIBLIOGRAFÍA

- Alegria, G; & Amaya, C. (2007). Recopilacion De Monografias De Excipientes Y Vehículos Utilizados En La Fabricación De Medicamentos Y Cosméticos En La Catedra De Tecnología Farmacéutica. *Universidad del Salvador*.
- Amela, j., Valero, E., (2001). Estudios de Preformulación. *Gestión de calidad en el desarrollo y fabricación industrial de Medicamentos*. Glatt Labortenic. 95-159. ESPAÑA
- Andrade, N., (2016). Determinación de las propiedades físicas, composición química, evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial del fruto Copal (*Dacryodes peruviana*) de la provincia de Zamora Chinchipe. Tesis previa a la obtención de título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Arias, C., (2017), Desarrollo y optimización de una loción con propiedad repelente a base de aceite esencial de Palo Santo (*Bursera graveolens*). Tesis previa a la obtención de título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja
- Artuño, M., (2006). Manual Practica de Aceites Esenciales, Aromas y perfumes. España. AYNARA ediciones
- Badii, J. C., Rodríguez, A., & Villalpando, P. (2007). Diseños Experimentales de investigacion científica. *Innovaciones de Negocios* , 283-330.
- Bermejo, M. (2005). *Concepto y clasificación de formas farmaceuticas*. Obtenido de Universidad de Valencia: <http://www.uv.es/~mbermejo/FFyPreformulacion05.pdf>
- Cabrera, D. (2014). *Herbario Digital Caripo - IASA*. Obtenido de Burceraceas: <http://herbariodigitalcarpioiasa.blogspot.com/p/burseraceae.html>.
- Cea de Maya, R. (2013). Fitofarmacos . *Célula Inventa Química y Farmacia*.
- Cremonini, V. (2011). *Apuntes de Tecnología Farmaceutica*. Obtenido de Asociación Cordobesa de Farmacéuticos Homeopáticos: <http://www.acfah.org/privado/apuntes/3-FF-UE.pdf>
- Daza, L., Flores, N. (2006). *Diseño de un repelente para insectos voladores a base de productos naturales*. Proyecto de grado para obtener el título de Ingeniería de procesos. Universidad de EAFIT

- Diaz, E., Loeza, J. M., Hernández, I., Herández, C., Jesús, C., Bravo, C., & Israel, O. (2013). *Manual Técnico para la propagación asexual de Burceraceae en la cañada OAXAQUEÑA*. Oaxaca-Mexico: Universidad de la Cañada.
- Delgado, L.(2017). *Ferrer gama de repelente de insectos*. Recuperado de: <http://www.auladelafarmacia.com/articulo/industria/ferrer-lanza-gama-repelentes-insectos/20170621142227001992.html>
- Gimenez Serrano, S. (2005). Repelntes de Insectos . *Farmacia Profesional*, 48-49.
- Gutierrez, A. (2004). Descripción y fundamentos del análisis del aceite . *Universidad de las Américas de Puebla*, 76-79
- Hernandez, R. C. (2011). *Repelente Natural Contra Mosquitos*. Obtenido de Secretaria de Agricultura y Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: <http://www.cm.colpos.mx/cesareo/Divulgaci%C3%B3n/Repelentes%20naturales%20c ontra%20mosquitos.pdf>
- Hong, L., Yangb, B., Nagendraa, K., Nagasundara, R., Sunc, L., Chana, E., . . . Jiang, y. (2010). Nutritional compositions and bioactivities of Dacryodes species:. *Food Chemistry*, 247-255.
- Mora, J., Piedra, G., Benavides, M., & Rupert, C. (2012). Clasificación de reactivos químicos en los laboratorios de la Universidad Nacional . *Universidad Nacional*, 50-57.
- Muños, M. (2005). Síntesis Y Caracterización De Geles, Como Vehículos De Meloxicam Y Acetato De Vitamina E De Aplicación Opica Terapéutica Y Cosmética. *Univerisdad de Granada* .
- Onana, J. (2008). A Synoptic Revision of Dacryodes (Burseraceae) in Africa, with a New Species from Central Africa. *Springer*, 385-400.
- Oliva, M. (2010).
- Plazas, E. (2011). *Curso de Aceites Esenciales*. Obtenido de Jardín Botánico de Bogotá: <http://jbbrepositorio.metabiblioteca.org/bitstream/001/156/2/Memoria%20Curso%20Aceites%20Esenciales.pdf>

- Rendón, B., Rebollar, S., Caballera, J., & Martínez, M. (2001). Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los árboles del siglo XXI. En B. Rendón, Rebollar, Silvia, J. Caballera, & M. Martínez, *Plantas, Cultura y Sociedad* (págs. 3335). Mexico: Universidad Autonoma Metropolitana.
- Rendon, B., Redollar, S., Caballero, J., & Martínez, M. A. (2001). *PLANTAS, CULTURA Y SOCIEDAD*. Mexico: Universidad Auntonoma de Mexico.
- Ricci, E., Padín, A., & Kahan, S. (2002). Efecto repelente de los aceites esenciales de laurel y lemongrass, sobre *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera: Aphididae) en repollo. *MAPAMA*, 207-212.
- Ricci, M., Padín, S. B., & Hennig, A. E. (2011). "Evaluación del efecto repelente del aceite esencial de *Laurus nobilis* L. (Lauracea) sobre *Myzus persicae* Sulz.(Homoptera:Aphididae) en cultivos de Pimiento y Repollo". *Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Buenos Aires Argentina* .
- Rodríguez, M., Lopez, L., & Casas, J. (2002). Fitofármacos en la Atención Primaria de la Salud: Disponibilidad y Uso. *Revista Lationamericana de Farmacologia*, 213217.
- Sanchez, M., Llambi, F., Salleras, M., Iglesias, M., Collgros, H., & Umbert, P. (2012). Compounding as a Current Therapeutic Option in Dermatology. *Dermo-Sifilograficas*, 738-753
- Sarango. P., (2017). Utilización y evaluación in vitro de un fitocosmético a partir del extracto etanólico de *Piper ecuadorensis* Sodiro de la región sur del Ecuador. Tesis previa a la obtención de título de Bioquímico Farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Sellar, W. (1996). *Guía de Aceites esenciales* . Mexico: Editorial EDAF.S.L.
- Sharapin, N., & Pinzón, R. (2000). Formas farmaceuticas para el us dermatológico. En *Fundamentos de Tecnología de Productos fitoterapeuticos* (págs. 123-24). Bogota: Secretaria Ejecutiva del convenio Andres Bello.
- Stashenko, E., & Martínez, J. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometria de masas. *Ciencia Cromatográfica* , 29-47.

- Soepadmo, E., Saw, L., & Chug, R. (2002). *Tree Flora of Sabah and Sarawak*. Malasia: Forest Research Institute Malasia.
- Sthashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Bucaramanga-Santander: Universidad Industrial de Santander.
- Tolukder, F., Howse, P., (1993). Laboratory evaluation of toxic and repellent properties of the pithraj tree. *Aphanamixis polystachya Wall & Parker, against Sitophilus oryzae (L.)*. International Journal of pest management, 40(3): 274-279
- Torres, V., & Castro, A. (2014). Fitoterapia. *Revista De actualización Clínica Investiga*. Vacaola, M. (2012). Diseño y desarrollo de una loción repelente a partir del aceite esencial de la especie palo santo (*Bursera graveolens*). *Universidad Técnica Particular de Loja*.
- Viturro, C; Bandoni, A; Dellacassa, E; Serafini, L. y Elder, H. . (2010). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana- Problemática Schinus en Latinoamérica. Portoalegre. Supernova Editorial.
- Wilson, E., & Verpoorte, R. (2015). *Proyecto de Fitoterapia de Cooperala*. Obtenido de Repelentes a base de plantas proveen alternativas a fórmulas sintéticas: <http://profitocoop.com.ar/articulos/Repelentes%20naturales.pdf>
- Zacaria, D. (2012). Aceites Esenciales una alternativa a los micromicidas . *Asociación Española de Ciencia Avícolas* . Obtenido de Aceites Esenciales Una Actividad Alternativa a los Microbianos : http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1182855355a.pdf
- Zuñiga, C., Peraza, J., & Hernández, E. (2009). Abordando la problemática del Dengue desde la perspectiva ambiental. *Tecnología en Marcha*, 81-89.

ANEXOS

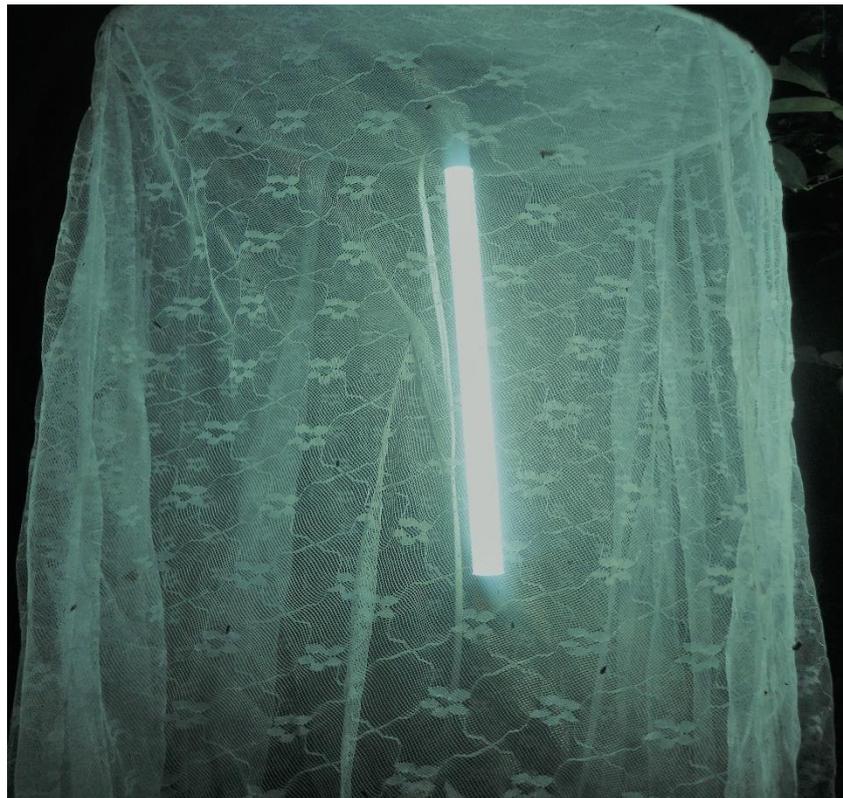
Anexo 1

Cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N, acoplado a un espectrómetro de masas serie 5973 Inert



Anexo 2

Trampa de luz y aspirador de mosquitos utilizada en las pruebas de repelencia



Anexo 3

Parcelas de arroz ubicadas en el sector Santa Marianita de Macará



Anexo 4

Pruebas de repelencia del aceite esencial



0.5 %



1%



2%



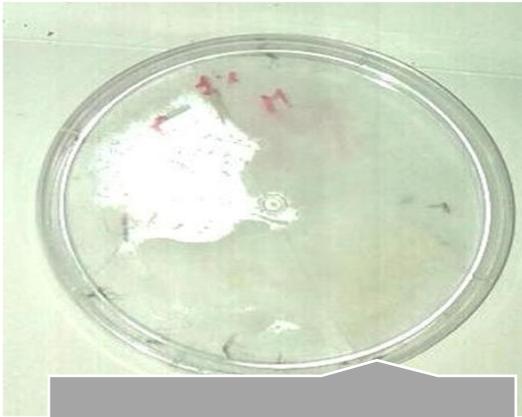
3 %



Control positivo a
base de Detan®

Anexo 5

Pruebas de repelencia de loción



1%



2%



3%



Control positivo
abase de Detan[®]